

成長ホルモン産生腺腫におけるmiRNAの解析

吉本勝彦、岩田武男、水澤典子

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部分子薬理学分野

銭志 栄、佐野壽昭

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部人体病理学分野

山田正三

虎の門病院内分泌センター間脳下垂体外科

はじめに

2006年に、家族性成長ホルモン（GH）産生腺腫の原因遺伝子がaryl hydrocarbon receptor - interacting protein（AIP）であることが報告されたが¹⁾、散発性のGH産生腺腫における体細胞変異による不活化はまれであることが明らかにされている²⁾。これまでのGH産生細胞の腫瘍化機構の解析において、約50%に認められるgsp遺伝子変異や一部の腺腫で認められるメチル化異常による発現低下以外は明らかになっていない³⁾。

microRNA（miRNA）は21～23塩基対からなる機能性non-coding RNAで、標的となるmRNAに結合し、その翻訳を抑制する。最近、miRNAは標的遺伝子発現調節に関与し、発生や細胞死、細胞増殖、分化のみならず腫瘍形成において重要な役割を担うことが示唆されている。しかしながら、下垂体腺腫におけるmiRNAの解析については、一部の報告があるのみである^{4,6)}。

本研究では、新たながん遺伝子・がん抑制遺伝子の候補であるmiRNAに着目し、GH産生腺腫におけるmiRNAの発現レベルの解析および血清におけるmiRNAレベルを解析した。

研究方法

1. クローニング・塩基配列決定法によるmiRNAプロフィールの解析

正常下垂体組織および下垂体腺腫組織よりISOGEN（ニッポンジーン）にてtotal RNAを抽出した。Total RNAからsmall RNA画分をカラムで分別し、15%変性アクリルアミドゲルにて200ヌクレオチド以下のSmall RNA画分を電気泳動後、20～23ヌクレオチド付近を切り出して抽出した。T4 RNA ligaseでRNAに3'ドナーオリゴヌクレオチドをつなげた後、RNAをゲルで精製した。その後、T4 RNA ligaseでRNAに5'アクセプターオリゴヌクレオチドをつなげた。RNAをゲルで精製した後、RT-PCRでRNAを増幅した。T-ベクターにクローニング後、大腸菌の形質転換体を選抜し、cDNAの挿入を確認した。挿入クローンに対して塩基配列の決定を行った。データベースとしてはmiRBaseなどを用いた。

2. 定量的リアルタイムRT-PCR法 (qRT-PCR)

正常下垂体組織および下垂体腺腫組織からRNAを抽出し、mirVana qRT-PCR miRNA detection Kit (Ambion) を用いてlet-7 miRNAの定量を行った。組織における発現の内部標準としてはU6 RNAを用いた。

3. 免疫組織化学

正常下垂体組織および下垂体腺腫組織のパラフィン包埋標本を用いて、high mobility group AT-hook 2 (HMGA2) 蛋白の発現を検討した。抗体は、ヤギポリクロナル抗HMGA2抗体 (Santa Cruz) を用い、抗原抗体複合体はcobalt-3,3'-diaminobenzidine反応にて検出した。

4. miRNAのアレイ解析

正常下垂体 5 例、GH産生腺腫14例、プロラクチノーマ 6 例、ACTH産生腺腫13例 (うちCushing病を示すもの 8 例)、FSH/LH産生腺腫15例からsmall RNAを抽出し、723種のヒトmiRNAおよび76種類のヒトウイルスmiRNAのプローブを搭載したhuman miRNAマイクロアレイキット (V2) (Agilent) を用いて解析を行った。

5. 血清からの低分子RNAの抽出およびmiRNAの定量

下垂体腺腫手術前に血液を採取し、 -20°C に保存していた血清を、細胞成分を除くためにさらに10,000 x gで遠心した。低分子RNAの抽出にはAmbion mirVana PARIS Kit (ABI) を用いてmiRNAを含むsmall RNAを分離した。

cDNA 5'末端のUniversal Tag配列に結合するmiScript Universal Primer、miRNA特異的なプライマーとQuantiTect SYBR Green PCR Master Mixを含むmiScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen) を用いてqRT-PCR解析を行った。個々のmiRNA特異的なプライマーはmiScript Primer Assay Set (Qiagen) で用意されているものを用いた。

結果

1. 正常下垂体におけるmiRNAプロフィール

クローニング・塩基配列決定法により、miRNAとしてmiR-7-1、miR-7-2、miR-375、let-7a、let-7b、let-7c、let-7e、let-7g、let-7i、miR-29a、miR-29b、miR-29c、miR-26a、miR-26b、miR-30a-5p、miR-30b、miR-30c、miR-125a、miR-125b、miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-99a、miR-99b、miR-34a、miR-320、miR-342、miR-127、miR-199a、miR-652、miR-16、miR-17-5p、miR-24、miR-96、miR-107、miR-128、miR-148b、miR-181a、miR-181b、miR-182、miR-185、miR-186、miR-195、miR-204、miR-212、miR-212、miR-218、miR-324-3p、miR-368、miR-374、miR-409-3p、miR-410、miR-424、miR-454-3p、miR-520a、miR-565、miR-593、miR-597、miR-633、miR-638、miR-566を検出した。このうち、miR-7、miR-375、let-7が高頻度に検出された。

2. 下垂体腺腫におけるlet-7 miRNA発現低下

下垂体腺腫55例について検討した結果、let-7の発現が50%以上減少しているのが23例（42%）に認められた。一方、let-7の発現の軽度増加が15例（27%）、3倍以上の増加が17例（31%）に認められた。let-7の発現減少はプロラクチノーマ（6例中9例、68%）、ACTH産生腺腫（12例中7例、58%）、FSH/LH産生腺腫（6例中17例、35%）に認められた。しかしながら、GH産生腺腫ではlet-7の発現減少は12例中1例（8%）にしか認められなかった。むしろ、let-7の発現増加が12例中6例（50%）に認められた。

3. ヒト下垂体腺腫におけるHMGA2蛋白の過剰発現

let-7の標的遺伝子の一つであるHMGA2の発現を免疫組織化学法により検討した。正常下垂体組織において、HMGA2蛋白発現は認められなかった。下垂体腺腫において、核におけるHMGA2蛋白発現は39%で認められた。このうち、FSH/LH産生腺腫では22例中15例（38%）に、ACTH産生腺腫では18例中12例（67%）に、プロラクチノーマでは16例中5例（31%）に認められた。一方、GH産生腺腫では26例中2例（7%）、GH・プロラクチン産生腺腫では5例中0例と、低頻度の発現を認めた。let-7の発現レベルとHMGA2蛋白発現レベル間には負の相関が認められた。

4. 正常下垂体と下垂体腺腫におけるmiRNAのアレイ解析

正常下垂体と下垂体腺腫間で、47種のmiRNA発現レベルの差異を認めた。このうち32種は下垂体腺腫で発現が増加し、残りの15種は下垂体腺腫での発現低下を認めた。加えて、GH産生腺腫、プロラクチノーマ、TSH産生腺腫においては、3種の腺腫での共通のmiRNA発現が多く認められた。これらの結果より、miRNAの発現パターンからも、GH産生腺腫・プロラクチノーマ・TSH産生腺腫系、ACTH産生腺腫系、FSH/LH産生腺腫系に区別しうることが明らかとなった。また、どの系の腺腫にも共通に増減を示すmiRNAが3種認められた。変化が認められたmiRNAについては、qRT-PCRによる発現量の差異についての確認を進めている。

5. 血清におけるmiRNA

これまでの報告から、miR-23a、miR-26a、miR-26b、miR-7、miR-21、miR-375、miR-212を選んで血清中での存在を検討した。このうち、miR-375、miR-212は血清ではほとんど認められなかった。マウス単離腺腫における同一プライマーセットを用いたmiR-375の検討では、発現を確認できた。miRNA量比較のための内部標準として、miR-185を用いた。GH産生腺腫の血清において、miR-23a、miR-26a、miR-26b量は健常人血清に比して、減少傾向を認めた。

考察

miRNAは癌細胞における染色体の不安定領域にしばしばマップされ、各種がん細胞が固有のmiRNA発現プロファイルを有することや各種がん患者の生命予後に関連するプロファイルが同定されるなど、さまざまな形でmiRNAの異常が腫瘍化に関与していることが明らかになっている。実際

に、これらの発現異常を示すmiRNAの一部は、がん遺伝子あるいはがん抑制遺伝子として働くことが確認されつつある。

本研究において、下垂体腺腫でのlet-7 miRNA発現低下を高頻度に認めた。let-7の標的遺伝子としてはK-ras遺伝子、c-myc遺伝子やHMGA2遺伝子が知られている。このことから、let-7の発現低下はK-ras、c-myc、HMGA2などの発現増加につながると考えられる。これまでの研究で、let-7は腫瘍抑制因子として作用していることが、多くの研究で支持されている⁷⁾。すなわち、let-7は肺がん、大腸がん、卵巣がんなどで発現低下が認められ、発現レベルががんの進展度と関連していることが報告されている。しかしながら、腫瘍におけるlet-7発現低下の機構については解明されていない。

HMGA2を発現させたトランスジェニックマウスにおいては、GH・プロラクチン産生腺腫が発症する⁸⁾。このことから、HMGA2は下垂体腫瘍化に関わるがん遺伝子の候補の一つと考えられる。本研究では、GH産生腺腫やGH・プロラクチン産生腺腫に比べて、ACTH産生腺腫やFSH/LH産生腺腫において、HMGA2の発現増加が認められた。また、GH産生腺腫やGH・プロラクチン産生腺腫では、HMGA2蛋白の発現を負に制御するlet-7の低発現は認められなかった。let-7およびHMGA2のGH・プロラクチン産生腺腫の腫瘍化への関与の差異が、ヒトとマウスの種の違いによるものか否か、今後の検討が必要である。

GH産生腺腫とプロラクチノーマで、miR-23a、miR-23b、miR-24-2発現が増加していること、miR-23aおよびmiR-23bの発現増加は、GH産生腺腫・プロラクチノーマとACTH腺腫、非機能性腺腫を分別するのに有用であるとの報告がある⁵⁾。しかしながら、我々のマイクロアレイによる検討では、正常下垂体組織との間に、これらのmiRNAの発現量の差異は確認できなかった。マイクロアレイによる解析で、GH産生腺腫で発現増加あるいは発現抑制が認められたmiRNAについて、qRT-PCRにて発現差異が確認できるか検討を進めている。

血清でのmiRNAはエクソソーム（細胞外に放出される細胞膜構造物）内に存在することにより、RNaseによる分解を免れ、安定な存在様式をとることや、エクソソームが他の細胞と融合することにより、細胞内に移行したmiRNAが標的mRNAを切断するなどの生理的機能を示すことが報告されている⁹⁻¹³⁾。また、がんのバイオマーカーとしてのmiRNAの重要性が注目されており、特に血清中あるいは血漿中に存在するmiRNAの検討が種々の腫瘍で始まっている。

GH産生腺腫症例血清におけるmiR-23a、miR-26a、miR-26b量の減少傾向については、症例数を増やすことによる確認が必要である。また、血清や血漿におけるmiRNAの定量において、内部標準としてのmiRNA種は確立されていない。どの条件でも発現レベルが変わらないsmall RNA種の同定が必要である。また、GH産生腺腫をはじめとする下垂体腺腫でのmiRNA発現量の変化が血清中に反映されるか否かについても、今後の検討が必要である。

結語

GH産生腺腫におけるlet-7の発現減少はまれであること、その標的遺伝子であるHMGA2の発現増加も認められないことが明らかとなった。今後、GH産生腺腫で特異的な発現変化を示すmiRNA種の検索と、その量的変化が血清において反映されるか否かの検討が必要である。

文献

1. Vierimaa O, Georgitsi M, Lehtonen R, Vahteristo P, Kokko A, Raitila A, Tuppurainen K, Ebeling TM, Salmela PI, Paschke R, Gündogdu S, De Menis E, Mäkinen MJ, Launonen V, Karhu A, Aaltonen LA. Pituitary adenoma predisposition caused by germ-line mutations in the AIP gene. *Science* 312:1228-1230, 2006.
2. Iwata T, Yamada S, Mizusawa N, Golam HM, Sano T, Yoshimoto K. The aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene is rarely mutated in sporadic GH-secreting adenomas. *Clin Endocrinol* 66:499-502, 2007.
3. Yamasaki H, Mizusawa N, Nagahiro S, Yamada S, Sano T, Itakura M, Yoshimoto K. GH-secreting pituitary adenomas infrequently contain inactivating mutations of PRKAR1A and LOH of 17q23-24. *Clin Endocrinol* 58:464-470, 2003.
4. Bottoni A, Piccin D, Tagliati F, Luchin A, Zatelli MC, degli Uberti EC. miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas. *J Cell Physiol* 204:280-285, 2005.
5. Bottoni A, Zatelli MC, Ferracin M, Tagliati F, Piccin D, Vignali C, Calin GA, Negrini M, Croce CM, Degli Uberti EC. Identification of differentially expressed microRNAs by microarray: a possible role for microRNA genes in pituitary adenomas. *J Cell Physiol* 210:370-377, 2007.
6. Amaral FC, Torres N, Saggioro F, Neder L, Machado HR, Silva WA, Moreira AC, Castro M. MicroRNAs differentially expressed in ACTH-secreting pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 94:320-323, 2009.
7. Boyerinas B, Park SM, Hau A, Murmann AE, Peter ME. The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr Relat Cancer* 17: F19 - F36, 2010.
8. Fedele M, Palmieri D, Fusco A. HMGA2: A pituitary tumour subtype-specific oncogene? *Mol Cell Endocrinol* 2010 Mar 27 [Epub ahead of print].
9. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, HLi X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 18:997-1006, 2008.
10. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10513-10518, 2008.
11. Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, van Eijndhoven MA, Hopmans ES, Lindenberg JL, de Gruijl TD, Wüdingen T, Middeldorp JM. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Aca Sci USA* 107:6328-6333, 2010.

12. Wang J, Chen J, Chang P, LeBlanc A, Li D, Abbruzzesse JL, Frazier ML, Killary AM, Sen S. MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood based biomarkers of disease. *Cancer Prev Res* 2:807-813, 2009.
13. Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer* 127:118-126, 2009.