

成長ホルモン腺腫および血清における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

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

成長ホルモン（GH）産生細胞の腫瘍化機構として、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特定の遺伝子発現低下以外は不明である。

microRNA（miRNA）は約20塩基対からなるタンパク質に翻訳されない RNAで、標的となる mRNAの 3' 非翻訳領域に配列相補的に結合し、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腫瘍形成において重要な役割を担うことが示されているが、下垂体腺腫における miRNAの解析については、数編の報告があるのみである^{1,8)}。

本研究では、GH腺腫におけるmiRNAの発現プロファイルの解析および血清における各種miRNAレベルを解析することによりGH産生細胞の腫瘍化機序を明らかにすることを目的とする。

研究方法

1. 下垂体腺腫および正常下垂体組織におけるmiRNA発現プロファイルの解析

正常下垂体組織5例、GH腺腫11例、PRL腺腫6例、ACTH腺腫8例、silent ACTH腺腫5例、FSH/LH腺腫12例からmirVana miRNA Isolation kit（Ambion）にてsmall RNAを抽出した。small RNAが抽出されていることは2010 Bioanalyzer（Agilent）にて確認した。723種のヒトmiRNAのプロープを搭載したhuman miRNAマイクロアレイキット（V2）（Agilent）を用いて解析を行った。結果の解析にはGeneSpringGX10（Agilent）を用いた。

2. 血清RNAの抽出およびmiRNAのqRT-PCRによる解析

a) ヒト血清miRNAのマイクロアレイ解析によるプロファイリング

細胞成分を除くために10,000xgで遠心した健常人血清625 μ lを用いた。mirVana PARIS Kit（Ambion）を用いてtotal RNAを抽出し、Agilent human miRNAマイクロアレイキット（V2）によるマイクロアレイ（北海道システムサイエンス）およびGeneSpringGX11による解析を行った。

b) 下垂体腺腫症例における各種miRNAの血清レベルの解析

下垂体腺腫摘出術前に血液を採取し、血清を -20°C に保存した。血清625 μ lを用い、mirVana PARIS Kitを用いてtotal RNAを抽出した。グリコーゲン担体としたエタノール

沈殿でRNAを濃縮後、miScript PCR System (Qiagen) を用いてcDNAを合成した。健常者13例、GH腺腫11例、FSH/LH腺腫11例、ACTH腺腫6例を対象に、THUNDERBIRD™ SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いてqRT-PCR解析を行った。

以下の条件で血清におけるqRT-PCR解析を行うmiRNA種を選択した。組織マイクロアレイ解析において、正常組織と比較してGH腺腫において2倍以上の変化を示し、かつGH腺腫で特異的に認められた4種(正常組織に比して増加: miR-129-5p, miR-485-3p; 低下: miR-542-3p, miR-542-5p)、FSH/LH腺腫においては5倍以上上昇し、FSH/LH腺腫特異的に認められた11種(miR-139-5p, miR-532-3p, miR-582-5p, miR-660, miR-33b, miR-532-5p, miR-95, miR-181c, miR-140-3p, miR-181c*, miR-140-5p)、ACTH腺腫においては6倍以上低下を認めた7種(miR-214, miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-1225-5p, miR-212, miR-132, miR-132*)について検討した。miRNA量比較のための内部標準として、miR-185, miR-16, miR-638を用いた。

miScript PCR Systemでは、miScript Reverse Transcriptase Mix中のpoly (A) ポリメラーゼによりRNAの3' 端にpoly (A) を付加後、Universal Tag配列を有したプライマーで逆転写しcDNAを合成した。PCRではUniversal Tag配列に対応するプライマーを共通のReverse プライマーとして用いた。Forwardプライマーとして、既製のmiScript Primer Assay (QIAGEN) で用意されたプライマー(miR-16: Hs_miR-16_1, miR-185: Hs_miR-185_1, miR-212: Hs_miR-212_1)を、他のmiRNAに関してはmiRBase (<http://www.mirbase.org/search.shtml>) におけるmature sequenceの情報から作製したプライマーを用いた。

結果

1. GH腺腫、PRL腺腫、ACTH腺腫、FSH/LH腺腫と正常下垂体組織におけるmiRNA発現プロファイルの比較

全ての腺腫と正常下垂体組織のmiRNAマイクロアレイ解析結果より、腺腫全体で発現が増加しているものとしてmiR-144 (6.9倍)、miR-301a (3.3倍)、miR-451 (5.5倍)、miR-500* (4.3倍)、miR-720 (5.7倍)、miR-1260 (8.3倍)、miR-1274a (5.8倍)、miR-1274b (5.6倍)が、発現が低下しているものとしてmiR-424 (23倍)、miR-940 (2.3倍)、miR-1202 (8.3倍)、miR-1225-5p (4.5倍)、miR-1915 (3.5倍)が認められた。またサイズの大きい腺腫では、miR-7, miR-29b-1, miR-144, miR-181c, miR-451, miR-485-3p, miR-500の発現が高く、miR-214, miR-376の発現が低い傾向が見られた。海綿静脈洞への浸潤を示した腺腫では、miR-7, miR-20, miR-33b, miR-1274bが高く、miR-154, miR-410が低い傾向を示した。

GH腺腫において2倍以上の有意な変化が認められたmiRNA種の種類は10種類(正常組織に比して増加を示すもの: miR-720, miR-1274a, miR-129-5p, miR-1260, miR-485-3p, miR-1274b; 低下を示すもの: miR-542-3p, miR-542-5p, miR-424, miR-1202)であった。PRL腺腫において変化が認められたものは4種(増加: miR-1274b; 低下: miR-572, miR-424, miR-1202)であった。GH腺腫およびPRL腺腫に共通に認められるものはなかったが、GH腺腫で特異的に認められるものが4種(増加: miR-129-5p, miR-485-3p; 低下: miR-542-3p, miR-542-5p)あった。GH腺腫・PRL腺腫群とFSH/LH

腺腫間で3種（増加：miR-720、miR-1274a、miR-1274b）が共通に認められた。またGH腺腫・PRL腺腫群とACTH腺腫間のみで共通に認められるものはなかった。また、GH腺腫・PRL腺腫群、ACTH腺腫、FSH /LH腺腫間で共通に認められるものが4種（増加：miR-1260; 低下：miR-1202、miR-424、miR-572）存在した（図1）。ACTH腺腫およびFSH /LH腺腫特異的に増減が認められたmiRNAは、それぞれ13種および66種であった。

2. 血清におけるmiRNAレベルの解析

健常者血清のmiRNAマイクロアレイ解析において、存在量が多い25種類は、miR-923、miR-1207-5p、miR-1225-5p、miR-638、miR-1202、miR-940、miR-1268、miR-1228、miR-1915、miR-1275、miR-1234、miR-483-5p、miR-939、miR-1238、miR-1249、miR-1280、miR-129-3p、miR-1281、miR-191*、miR-1225-3p、let-7b*、let-7f-1*、miR-129*、miR-766、miR-933であった。

qRT-PCR解析における $\Delta\Delta Ct$ 法を用いた定量法では、PCR 1サイクルあたり産物が2倍となる累乗的な増幅効率が行われることが前提となる。qRT-PCR解析の予備実験として、各プライマーを用いた場合に効率よく増幅されること、PCR産物の解離曲線のピークが1つであること、および41サイクル後の増幅産物のゲル電気泳動において単一バンドであることを確認した。その結果、使用可能なプライマーは、miR-16、miR-185、miR-638のほか、miR-139-5p、miR-532-3p、miR-582-5p、miR-660、miR-95、miR-181c、miR-199a-5p、miR-199a3p、miR-212、miR-132、miR-542-5pであった。GH腺腫組織で特異的に発現上昇が認められたmiR-129-5pおよびmiR-485-3pのプライマーは使用不相当と判断された。内部標準として用いたmiR-16、miR-185、miR-638は、検討した各血清サンプルのいずれにおいても存在が認められた。FSH/LH腺腫組織で特異的に上昇が認められたmiR-181cは、健常者血清のmiRNAマイクロアレイ解析ではシグナルが認められなかったが、qRT-PCR解析では正常者13例のうち8例で信頼できるPCR産物のピークが検出された。miR-181cはACTH腺腫症例血清では低値を示したが、FSH/LH腺腫症例血清においては11例中9例で信頼できるピークが検出され、上昇傾向が認められた。一方、GH腺腫症例血清では11例中8例で信頼できるピークが検出されなかったが、検出された3例においては正常者に比べ増加を認めた（図2）。他のmiRNA種のqRT-PCR解析では検体間での成功・不成功のばらつきが大きかった。一部のACTH腺腫でmiR-199a-3pおよびmiR-199a-5pの低下傾向が認められたが、安定した結果を得るためにqRT-PCRに用いるRNAの増量および症例数を増やすことを検討している。

考察

近年、miRNAの発現異常が種々の腫瘍で見いだされている。miRNAは組織発生、分化、細胞増殖、アポトーシスに重要な役割を果たしているが、腫瘍の発症、進展の過程にも関与している。また、腫瘍の診断や予後予測に有用な可能性のあるmiRNA種が報告されてきている。本研究においては、GH腺腫を含む下垂体腺腫におけるmiRNA発現プロファイルを網羅的に解析し、GH腺腫に特徴的な発現パターンを明らかにすることを目的とした。

Bottoniらは、GH腺腫とPRL腺腫でmiR-23a、miR-23b、miR-242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腺腫・PRL腺腫とACTH腺腫、非機能性腺腫を分別するのに有用であると報告している²⁾。MaoらはmiRCURY LNA array (Exiqon) を用い、21個のGH腺腫におけるmiRNA発現プロファイルを解析し52種のmiRNAの発現量の変化（3種が高発現、29種が低発現）を認めた⁷⁾。本研究結果およびBottoniら、Maoらの結果と共通するのは、miR-542-3pの減少のみであった。この差異の原因については不明であるが、人種差による違いよりも、用いたmiRNAアレイの種類差による可能性が高い。他のグループによる報告も含めて、GH腺腫で発現増加あるいは低下が認められたmiRNA種について、qRT-PCRによる発現差異の確認が必要である。

PRL腺腫に関しては3種が発現低下を示し、1種のみが増加を示したが、既報例との一致は認められない。ACTH腺腫に関しては21種が発現低下を示す一方、miR-1260のみが増加を示した。これらの結果のうち、miR-212とmiR-132*の低下は Stillingらの結果⁵⁾ と一致している。FSH/LH腺腫に関しては、図1に示すように発現量変化を示す種類が多い。発現増加を示すmiR-20a、miR-93、miR-582-5p、miR-99b、miR-137、miR-93および発現低下を示すmiR-154が本研究結果と既報例^{6,8)} 間で一致している。

microRNAは、血漿、唾液、涙、尿、羊水、初乳、母乳、気管支洗浄液、脳脊髄液、腹水、胸水、精液いずれの体液にも認められる⁹⁾。血液中にはRNA分解酵素が豊富に認められることから、mRNAやmiRNAは存在しないと考えられていた。ところが血清あるいは血漿中にはmiRNAが安定に存在すること、その理由としてエクソゾーム内に存在するためにRNA分解酵素から防御されていることが明らかにされた¹⁰⁻¹²⁾。さらに、血漿中におけるmiRNAはエクソゾームのみならず、Argonaute2複合体、nucleophosmin 1、high-density lipoprotein (HDL) などのタンパク質と結合して存在していることが報告されている¹³⁻¹⁵⁾。しかも、エクソゾームやHDLと関連しているmiRNAが受け手の細胞へ移行し、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¹⁵⁻¹⁸⁾。

種々の腫瘍におけるバイオマーカーとして血漿あるいは血清におけるmicroRNAの有用性を示す報告が多く認められるが、下垂体腺腫における報告例はない¹⁹⁻²²⁾。ただし、定量性をどう扱うか問題点が残されている。組織あるいは細胞内におけるmiRNA量はU6を内部標準にして表示されることが多い。しかし、U6は血漿あるいは血清中では検出されず、内部標準となる適当なmiRNA種が明らかにされていない。現在は血漿あるいは血清の容積（例えば1 μ Lあたり）のコピー数で表すか、血漿中に豊富に存在するという理由からmiR-638、miR-16などが内部標準として使われている報告が多い。今回実施した血清qRT-PCR解析において、miR-185、miR-16、miR-638のいずれも検出されたため、この3種を内部標準として用いた。3種のmiRNAいずれを内部標準として用いた場合でも、健常者およびACTH腺腫症例血清で検出されたレベルに比べ、FSH/LH腺腫症例9例の血清ではmiR-181cの増加傾向が認められた。本結果は、下垂体腺腫組織における発現上昇が血清レベルに反映される可能性を示唆する。GH腺腫組織で特異的に高発現が認められたmiR-129-5pおよびmiR-485-3pは、血清レベルの増加が認められる可能性があるため、今後、特異性の高いTaqManシステム (ABI) あるいは高感度なLNA primerシステム (Exiqon) 等を用いたqRT-PCR解析を導入することで検証できる可能性を有する。

結語

GH腺腫において、正常下垂体に比して2倍以上の有意な発現量変化を示すmiRNAが10種類に認められた。このうち、GH腺腫で特異的に認められるものが4種あった。FSH/LH腺腫組織で発現増加が認められたmiR-181cが血清レベルでも増加していることを確認した。今後、GH腺腫で特異的な発現変化の機序の検討と、その量的変化が血清レベルに反映されるか否かの検討が必要である。

文献

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Qian ZR, Asa SL, Siomi H, Siomi MC, Yoshimoto K, Yamada S, Wang EL, Rahman MM, Inoue H, Itakura M, Kudo E, Sano T. Overexpression of HMGA2 relates to reduction of the let-7 and its relationship to clinicopathological features in pituitary adenomas. *Mod Pathol* 22:431-441, 2009.
5. Stilling G, Sun Z, Zhang S, Jin L, Righi A, Kovács G, Korbonits M, Scheithauer BW, Kovacs K, Lloyd RV. MicroRNA expression in ACTH-producing pituitary tumors: up-regulation of microRNA-122 and -493 in pituitary carcinomas. *Endocrine* 38:67-75, 2010.
6. Butz H, Likó I, Czirják S, Igaz P, Khan MM, Zivkovic V, Bálint K, Korbonits M, Rácz K, Patócs A. Down-regulation of Wee1 kinase by a specific subset of microRNA in human sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 95:E181-191, 2010.
7. Mao ZG, He DS, Zhou J, Yao B, Xiao WW, Chen CH, Zhu YH, Wang HJ. Differential expression of microRNAs in GH-secreting pituitary adenomas. *Diagn Pathol* 5:79, 2010.
8. Butz H, Likó I, Czirják S, Igaz P, Korbonits M, Rácz K, Patócs A. MicroRNA profile indicates downregulation of the TGF β pathway in sporadic non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary* 2010 Nov 10. [Epub ahead of print]
9. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 56:1733-1741, 2010.
10. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li 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.
11. 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 USA* 105:10513-10518, 2008.
 12. Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, van Eijndhoven MA, Hopmans ES, Lindenberg JL, de Gruijl TD, Würdinger T, Middeldorp JM. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Aca Sci USA* 107:6328-6333, 2010.
 13. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:5003-5008, 2011.
 14. Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 38:7248-7259, 2010.
 15. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 13:423-433, 2011.
 16. Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, Sun F, Lu J, Yin Y, Cai X, Sun Q, Wang K, Ba Y, Wang Q, Wang D, Yang J, Liu P, Xu T, Yan Q, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell* 39:133-144, 2010.
 17. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* 285:17442-17752, 2010.
 18. Pigati L, Yaddanapudi SC, Iyengar R, Kim DJ, Hearn SA, Danforth D, Hastings ML, Duelli DM. Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS ONE* 5:e13515, 2010.
 19. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci* 101:2087-2092, 2010.
 20. Brase JC, Wuttig D, Kuner R, Sultmann H. Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Mol Cancer* 9:306, 2010.
 21. Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010 Dec 7. [Epub ahead of print]
 22. Etheridge A, Lee I, Hood L, Galas D, Wang K. Extracellular microRNA: A new source of biomarkers. *Mutat Res* 2011 Mar 23. [Epub ahead of print]

図1 下垂体腺腫における miRNAのマイクロアレイ解析

正常組織に比し 2 倍以上の有意な変化が認められたmiRNA種を示す。

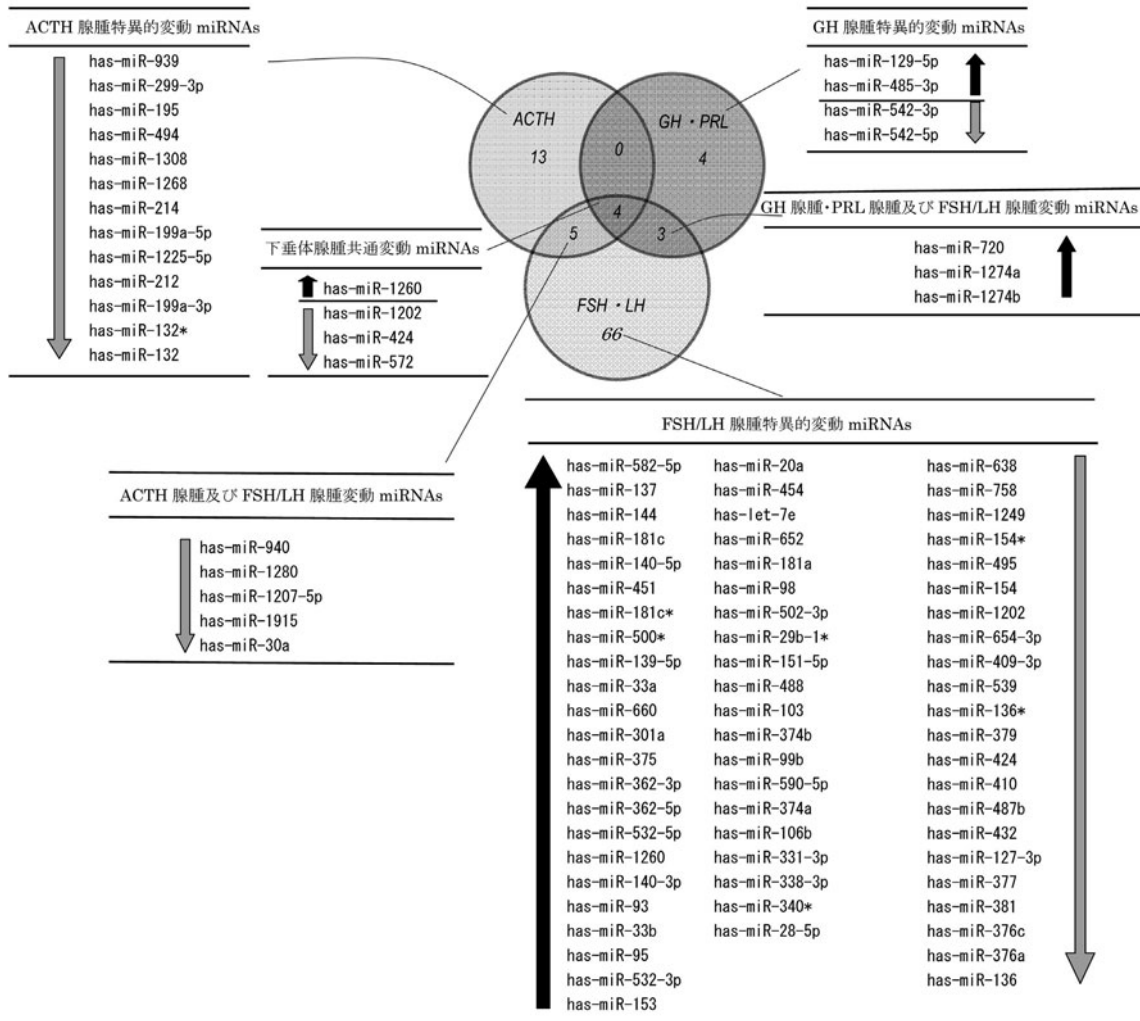
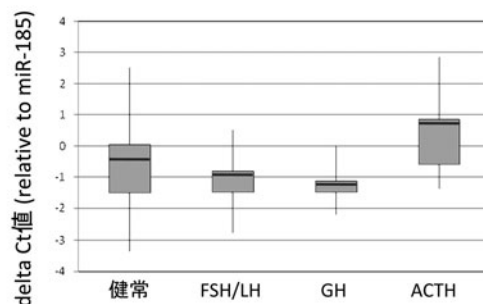


図2 血清における miR-181c量の解析



健常者(8例)に比して、delta Ct値が低いFSH/LH(9例)およびGH腺腫(3例)では miR-181cの増加を示す。ACTH腺腫(6例)では正常者に比し減少を示す。なお、GH腺腫症例は11例中8例が検出できず、3例のみの結果を示す。内部標準として miR-185を用いた。

研究年報 第34号 平成22年度

平成23年8月1日発行

編集 公益財団法人 成長科学協会
発行 公益財団法人 成長科学協会
東京都文京区本郷5-1-16 (〒113-0033)
電話 (03) 5805-5370
印刷 株式会社デイ・エム・ピー
東京都新宿区早稲田鶴巻町5-6-1 (〒162-0041)
電話 (03) 5292-6800

非売品