

---

## 学位論文 (Thesis)

---

### 下垂体腺腫における miRNA 解析

小野 信二

キーワード：下垂体腺腫, マイクロアレイ, miRNA

#### 緒 言

様々なホルモンを分泌する内分泌器官である下垂体は前葉・中葉・後葉に区分される。前葉からは、成長ホルモン (GH), プロラクチン (PRL), 甲状腺刺激ホルモン (TSH), 卵胞刺激ホルモン (FSH), 黄体形成ホルモン (LH), 副腎皮質刺激ホルモン (ACTH), 中葉からはメラニン細胞刺激ホルモン, 後葉からはバソプレッシンとオキシトシンが分泌される。

下垂体腺腫は脳腫瘍の約15%を占め, 多くは良性で, 脳以外の他臓器への転移は稀とされる。そのほとんどが下垂体前葉細胞を由来とし, 臨床的に下垂体ホルモンの過剰分泌を伴う機能性腺腫 (functioning adenoma) とホルモン分泌を伴わない非機能性腺腫 (non-functioning adenoma: NF 腺腫) に大別される。機能性腺腫は分泌するホルモンの種類により GH 産生腺腫, PRL 産生腺腫, TSH 産生腺腫, ACTH 産生腺腫, FSH/LH 産生腺腫に分類され, 複数のホルモン産生を認める多ホルモン産生腺腫は少ない。FSH/LH 産生腺腫に関してはホルモンの過剰産生を伴う腺腫はまれで, FSH あるいは LH の各  $\beta$  サブユニット抗体を用いた免疫染色で陽性を示すが, 血清 FSH/LH 値は異常高値を示さない NF 腺腫を主とする。また各ホルモンに対する抗体による免疫染色で陰性を示すナルセル腺腫がある<sup>1)</sup>。

下垂体腺腫のほとんどは散発性であるが, 3-5% に遺伝性を示す症例が認められる。遺伝性に下垂体に腺腫を生じる疾患には多発性内分泌腫瘍症 1 型 (Multiple endocrine neoplasia type 1: MEN1), Caney complex (CNC), 家族性成長ホルモン産生腺腫 (Isolated familial somatotropinomas: IFS), 家族性下垂体腺腫 (Familial isolated pituitary adenoma: FIPA) があり, MEN1 の症例の 70% に 11q13 領域に位置する *MEN1* の変異が<sup>2)</sup>, CNC 発症患者の 60% に 17q24.2 領域の cAMP-dependent protein kinase A R1 $\alpha$  regulatory subunit (*PRKARIA*) の変異

が<sup>3)</sup>, また FIPA の 15-20% および IFS の 40-50% に Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein をコードする *AIP* の変異が<sup>4)</sup>, それぞれ報告されている。遺伝性下垂体腺腫ではこれらの遺伝子の胚細胞変異および腫瘍におけるヘテロ接合性の消失 (loss of heterozygosity: LOH) などの体細胞変異による機能蛋白質の不活性化が腺腫発症に関連する<sup>2-4)</sup>。

一方, 散発性下垂体腺腫では, GH 産生腺腫の約 50% に G 蛋白質 Gs の  $\alpha$  サブユニットをコードする *GNAS* 変異が報告されており<sup>5)</sup>, この変異を有する腫瘍では G 蛋白質の持続的活性化が生じ, 増殖シグナルが増強していると推察される。細胞周期を負に制御する retinoblastoma 1 (*Rb1*) 遺伝子のヘテロノックアウトマウスは中葉由来下垂体腺腫を発症するが<sup>6)</sup>, ヒトでは浸潤性下垂体腺腫の一部で, *RBI* を含む領域の LOH を認めた報告があるにすぎない<sup>7)</sup>。他にも, *RAS*<sup>8)</sup>, *TP53*<sup>9)</sup>, *MEN1*<sup>10)</sup>, *PRKARIA*<sup>11)</sup> の体細胞変異が報告されているが, これらの遺伝子変異を有する散発性下垂体腺腫は稀である。このように, *GNAS* 変異を有する GH 産生腺腫を除き, 遺伝子変異と腺腫発症の関連性を支持する根拠は乏しく, 散発性下垂体腺腫の発症機序には, DNA のメチル化, ヒストン修飾などのエピゲノム調節や, 転写/翻訳後調節の破綻が関与していることが示唆される。

癌抑制遺伝子 Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1 (*RASSF1*) mRNA の低発現を示す下垂体腺腫のほとんどに, そのプロモーター領域の CpG アイランドにおいて高頻度のメチル化が認められる<sup>12)</sup>。Buslei らは, 検討したほぼ全ての NF 腺腫と一部の ACTH 産生腺腫と GH 産生腺腫での, JAK/STAT 経路を介する増殖シグナルの抑制因子 Suppressor of cytokine signaling 1 (*SOC1*) 遺伝子の低発現とそのプロモーター領域の DNA メチル化を報告している<sup>13)</sup>。他

にも一部の下垂体腺腫で、細胞周期制御因子である *RBI*<sup>14)</sup> と *p16<sup>INK4</sup>* (*CDKN2A*)<sup>15)</sup>, ソマトスタチン受容体 2 (*SSTR2*)<sup>16)</sup>, ドーパミン受容体 D2 (*DRD2*)<sup>17)</sup>, 癌抑制遺伝子 growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma (*GADD45G*)<sup>18)</sup>, インプリンティング遺伝子 maternally expressed 3 (*MEG3*) (non-protein coding)<sup>19)</sup> の発現低下が、DNA メチル化やヒストン修飾により引き起こされることが示されている。

マイクロ RNA (miRNA) は 20 数ヌクレオチドの短い 1 本鎖 RNA で、標的 mRNA の 3' 側の非翻訳領域 (UTR) に結合し、mRNA の分解あるいは翻訳阻害により遺伝子発現を負に制御する<sup>20)</sup>。miRNA は細胞増殖やアポトーシス、分化、代謝などに関連する遺伝子を標的とすることで、様々な生体機能を制御しており、その発現異常は様々な疾患の発症と関連する<sup>20)</sup>。いくつかの miRNA は癌遺伝子あるいは癌抑制遺伝子的に作用することが知られている。これらの miRNA は様々な腫瘍組織での発現異常が認められ、腫瘍発症機序に重要な役割を担う<sup>21)</sup>。

各タイプの下垂体腺腫で発現異常を示す miRNA の同定の試みは、複数のグループでマイクロアレイ解析を用いてなされているが<sup>11, 22-27)</sup>, 腺腫間で発現に差異が認められる miRNA の種類は必ずしも一致せず、統一された見解は得られていない。私は銭志栄先生 (元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) から提供されたマイクロアレイ解析のデータから各タイプの腺腫で特徴的な発現を示す miRNA 候補を選別し、各タイプの下垂体腺腫でのそれらの miRNA 発現を逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) により検証した。そのうち一部の miRNA の各組織・細胞株での発現・細胞増殖に対する作用を検討することで、これらの miRNA と下垂体腺腫発症の関連性について考察した。

## 材料および方法

### 1. 下垂体腺腫

正常下垂体および下垂体腺腫組織は虎の門病院・山田正三先生から提供された。本研究では正常下垂体 4 例、GH 産生腺腫 10 例、PRL 産生腺腫 5 例、ACTH 産生腺腫 7 例、FSH/LH 腺腫 6 例、ナルセル腺腫 5 例の下垂体組織を使用した。本研究は虎の門病院および徳島大学病院倫理委員会の承認および患者から書面による同意を得た (徳島大学病院倫理委員会承認番号 714)。

### 2. 細胞培養

下垂体細胞株としてマウス ACTH 産生細胞株 AtT-20, マウス FSH/LH 産生細胞株  $\alpha$ T3-1 および L $\beta$ T2, ラット GH 産生細胞株 GH3 および MtT/S, ラット PRL 産生細胞株 MMQ, ラット下垂体上皮細胞株 RC-4B/C を用いた。また細胞増殖の検討及びルシフェラーゼアッセイには、ヒト胎児腎由来線維芽細胞株 293FT 細胞と AtT-20

細胞を用いた。AtT-20,  $\alpha$ T3-1, L $\beta$ T2, MtT/S, RC4-B/C, 293FT 細胞には 10% ウシ胎児血清 (FBS) を含む DMEM 培地 (和光純薬, 大阪) を, GH3 細胞には 10% FBS を含む  $\alpha$ -MEM 培地 (Gibco, Grand Island, NY, USA) を, MMQ 細胞には 10% 正常ウマ血清と 2.5% FBS を含む DMEM/Ham's F12 培地 (和光純薬) をそれぞれ用い、5% CO<sub>2</sub>・37℃の条件下で培養した。

### 3. miRNA 発現量測定

各下垂体腺腫、マウス組織および細胞株から ISOGEN II (ニッポンジーン, 東京) を用いて、small RNA 画分を含む total RNA を抽出した。100 ng の各 total RNA を鋳型として、各 miRNA に対応する逆転写用プライマー (TaqMan MicroRNA Assay: Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) と TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA RT Kit (Applied Biosystems) を用いて cDNA を合成した。cDNA を鋳型に各 miRNA 特異的プライマー及びプローブ (TaqMan MicroRNA Assay: Applied Biosystems) を用いて、7300 real-time PCR System (Applied Biosystems) による qRT-PCR により miRNA 発現量を評価した。PCR は、95℃ 10 分の初期変性後に、95℃ 15 秒、60℃ 1 分を 1 サイクルとする 40 サイクルの反応で行った。ヒト腫瘍サンプルでは RNU44 の、マウス組織では snoRNA202 (sno202) の、マウス由来細胞株およびラット由来細胞株では RNU6B (U6) の各発現を、それぞれの TaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystems) を用いて同様に測定し、各 miRNA 発現量の補正に用いた。

### 4. 細胞増殖の評価

293FT 細胞を 24 ウェルプレートに播種し、50% コンフルエントまで培養後、30 nM の Cy<sup>TM</sup>3 Labeled pre-miR<sup>TM</sup> Negative Control #1 (pre-NC; Ambion, Austin, TX, USA), miR-132, miR-551b の pre-miR<sup>TM</sup> miRNA precursor (Ambion) を、Effectene Transfection Reagent (QIAGEN, Hilden, Germany) により導入した。導入後 0, 1, 2, 3 日目の細胞に 20  $\mu$ l/ウェルの Cell Counting Kit 8 (同仁化学, 熊本) を加え 3 時間培養後、450 nm の吸光度を測定した。

浮遊細胞である AtT-20 細胞を 10<sup>5</sup>/ウェルずつ 24 ウェルプレートに播種し、pre-miRNA を同様に導入した。導入後 2, 4, 6 日目の細胞を遠心により回収し、トリパンブルー染色後、血球計算板により生細胞の細胞数を計測した。

### 5. miRNA の標的遺伝子候補の検索

それぞれ独自のアルゴリズムで miRNA の標的を検索するオンラインプログラムである TargetScan (<http://www.targetscan.org>), miRDB (<http://mirdb.org/miRDB>), DIANA-microT-CDS (<http://diana.imis.athena-innovation.gr>) を用いた。miRDB では Target Score が 60 以上, TargetScan では total context score が -0.4 以下あるいは aggregate P<sub>CT</sub>

0.6以上, DIANA-microT-CDS では miTG score が0.57以上を示した候補遺伝子の中から, 3つのプログラムによる検索で共通し, かつ細胞増殖との関連性や腫瘍での発現異常が報告されている遺伝子を選別した。

## 6. mRNA 発現量測定

miRNA の発現量測定と同様に small RNA 画分を含む total RNA を抽出した。500 ng の各 total RNA を鋳型として, Primescript™ RT reagent kit (タカラバイオ, 滋賀) を用いて cDNA を合成し, miR-551b の標的遺伝子候補である v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (*ERBB4*) 特異的プライマー (forward: 5'-GGTGCTTTTGGAAACGGTTTA-3'; reverse: 5'-AACCGACTAGGTGTGGATG-3') と THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix (東洋紡, 大阪) を用いて qRT-PCR を行った。PCR の条件は, 50°C 2分, 95°C 10分の初期変性後, 95°C 15秒, 60°C 1分を1サイクルとする40サイクルとし, 95°Cから60°Cの解離曲線によりプライマーの特異性を確認した。glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) の mRNA 発現量を特異的プライマー (forward: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGCT-3'; reverse: 5'-GAAGATGGTGTGGGATTC-3') を用いて同様に測定し, 遺伝子発現量の補正に用いた。

## 7. ルシフェラーゼアッセイ

miR-551b の標的遺伝子候補である *ERBB4* 遺伝子の miR-551b 結合予測領域を含む約 1 kb の 3'-UTR をルシフェラーゼ遺伝子の下流に組み込んだルシフェラーゼ発現ベクターを構築した。最初に, 293FT 細胞から抽出した total RNA を鋳型に Super Script III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) による cDNA 合成を行い, 5'末端に *PmeI* 認識配列を付加した forward primer: 5'-GTTTAAAC TTATTATCATAAAGGTAAAG-3' と *NheI* 認識配列を付加した reverse primer: 5'-GCTAGCGAAAATAAGGAAGTGA GTAC-3' を用いた PCR を行った。得られた PCR 産物を pCR4-Blunt TOPO® (Invitrogen) にサブクローニング後, *PmeI* と *NheI* により切断し得られた約 1 kb の DNA 断片を pmirGLO vector (Promega, Madison, WI, USA) のこれらの酵素切断部位に挿入した。

293FT を 24 ウェルプレートに播種し, 0.2 µg のルシフェラーゼ発現ベクターと 30 nM pre-NC あるいは pre-miR-551b precursor を各ウェルに Effectene Transfection Reagent (QIAGEN) を用いて導入した。導入後 2 日目の細胞中のルシフェラーゼ活性を Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega) を用いて Mithras LB940 (Berthold Technologies, Calmbacher, Germany) で測定した。

## 8. メチル化解析

各 2 例の正常下垂体組織と ACTH 産生腺腫における miR-551b のプロモーター領域のメチル化解析をバイサ

ルフアイトシーケンシング法により行った。各サンプルを 400 µl の Lysis buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.5, 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 200 mM NaCl, 200 µg/ml Proteinase K) に加え, 42°C で一晩震盪後, フェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い, ゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA のバイサルファイト処理には MethylEasy™ Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification Kit (Human Genetic Signature, North Ryde, Australia) を用いた。バイサルファイト処理したゲノム DNA を鋳型に, miR-551b プロモーター領域の CpG アイランドを含む領域を Ex Taq™ Polymerase (タカラバイオ) と forward primer: 5'-GTTTGTGGGGTTAAGTTGTTGT-3', reverse primer: 5'-AAATAT CTATCCCCACCTCCTACC-3' とを用いた 1 回目の PCR (95°C 1分, 62°C 2分, 72°C 2分の30サイクル) と forward primer: 5'-GTTTGTGGGGTTAAGTTGTTGT-3', reverse primer: 5'-CCCCATCCCTTCCCAAACCTCAA-3' による 2 回目の PCR (95°C 30秒, 62°C 30秒, 72°C 45秒の30サイクル) により増幅した。得られた PCR 産物を pT7 Blue T-vector (Novagen, Darmstadt, Germany) にサブクローニングし, クローンの塩基配列を ABI 3500xL sequencing analyzer (Applied Biosystems) により解析した。

## 9. 統計処理

各データは, 平均±標準誤差で表した。統計処理は Student's t-test により行い, *P* 値が 0.05 以下を有意な差とした。

## 結 果

### 1. 各タイプの下垂体腺腫で特徴的な発現を示す miRNA の同定

錢志榮先生らは, 正常下垂体 8 例, GH 産生腺腫 14 例, PRL 産生腺腫 6 例, ACTH 産生腺腫 13 例, FSH/LH 産生腺腫 12 例, ナルセル腺腫 8 例を用いた miRNA マイクロアレイの解析を行った (未発表データ)。この解析結果を用いて, 各タイプの下垂体腺腫で発現する miRNA 量の比較を行い, 正常下垂体でのマイクロアレイの検出蛍光強度が 50 以上, かつ各タイプの腺腫で正常下垂体に比べて 2 倍以上の有意な発現量の差異を認めた miRNA の中から, 表 1 に示す miRNA について qRT-PCR による検証を行った (図 1)。その結果, 正常下垂体と比較して miR-7 の発現は GH 産生腺腫で有意に高かった (図 1 上段)。miR-137 は ACTH 産生腺腫と FSH/LH 産生腺腫で高発現しており, ナルセル腺腫でも発現が高い傾向にあった (図 1 上段)。miR-410 は ACTH 産生腺腫, FSH/LH 産生腺腫, ナルセル腺腫での低発現が認められた (図 1 下段)。miR-495 は GH 産生腺腫での高発現, ACTH 産生腺腫, FSH/LH 産生腺腫, ナルセル腺腫での低発現が認められた (図 1 下段)。これらの各タイプの腺腫における miRNA 発現はマイクロアレイ解析によるものとほぼ一致した。

表1 マイクロアレイ解析で発現の差異が2倍以上認められた主な miRNA

	GH 産生腺腫	PRL 産生腺腫	ACTH 産生腺腫	FSH/LH 産生腺腫	ナルセル 腺腫
miR-7	<b>2.5 倍</b>	1.4 倍	0.65 倍	1.1 倍	0.82 倍
miR-96	<b>3.0 倍</b>	0.73 倍	<b>0.46 倍</b>	<b>3.3 倍</b>	1.6 倍
miR-132	<b>3.5 倍</b>	1.0 倍	<b>0.072 倍</b>	1.2 倍	<b>0.35 倍</b>
miR-137	1.3 倍	0.54 倍	<b>4.4 倍</b>	<b>14 倍</b>	<b>6.3 倍</b>
miR-144	1.0 倍	<b>2.3 倍</b>	<b>2.6 倍</b>	<b>3.3 倍</b>	<b>4.3 倍</b>
miR-183	<b>3.1 倍</b>	0.61 倍	<b>0.37 倍</b>	<b>4.0 倍</b>	<b>2.5 倍</b>
miR-375	1.9 倍	1.2 倍	0.86 倍	<b>4.7 倍</b>	1.4 倍
miR-410	2.0 倍	1.0 倍	<b>0.31 倍</b>	<b>0.032 倍</b>	<b>0.45 倍</b>
miR-495	<b>3.5 倍</b>	1.0 倍	<b>0.15 倍</b>	<b>0.024 倍</b>	<b>0.42 倍</b>
miR-551b	<b>3.9 倍</b>	1.9 倍	<b>0.036 倍</b>	<b>3.2 倍</b>	<b>0.0030 倍</b>
miR-1260	<b>17 倍</b>	<b>8.1 倍</b>	<b>3.1 倍</b>	<b>6.1 倍</b>	<b>6.3 倍</b>

各値は正常下垂体との比較倍率を示す。太字は  $p < 0.01$  を表す。

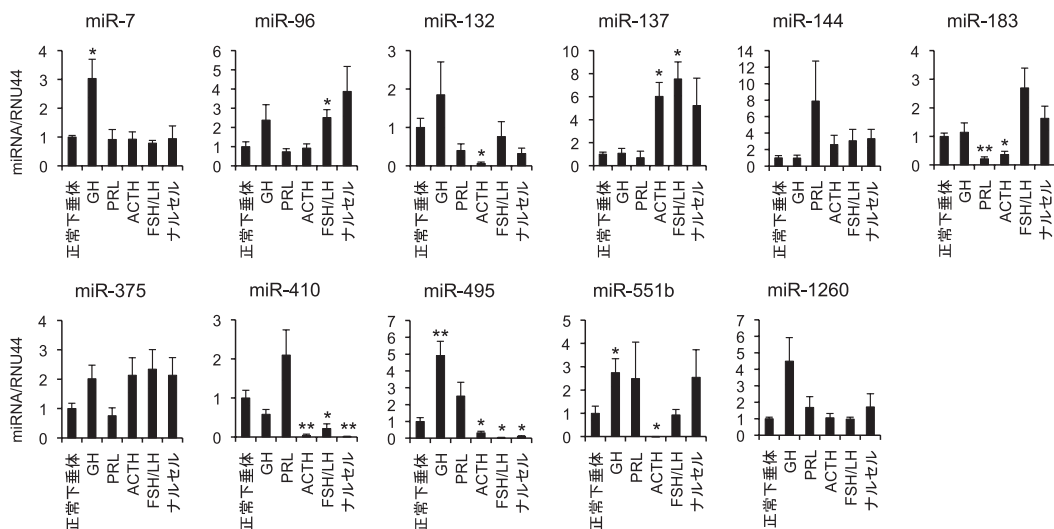


図1 各タイプの下垂体腺腫における miRNA 発現

正常下垂体4例, GH産生腺腫 (GH) 10例, PRL産生腺腫 (PRL) 5例, ACTH産生腺腫 (ACTH) 7例, FSH/LH産生腺腫 (FSH/LH) 6例, ナルセル腺腫 (ナルセル) 5例の small RNA 画分を含む total RNA を鋳型に各 miRNA に対する TaqMan プローブおよび特異的プライマーを用いた qRT-PCR を行った。各 miRNA 発現量を内部標準小分子 RNA である RNU44 の発現量で補正し, 正常下垂体での発現量を 1 とする相対値で表した。正常下垂体の発現量と比較して有意差を求めた。\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ 。

一方, マイクロアレイ解析において GH 産生腺腫と FSH/LH 産生腺腫で高発現, ACTH 産生腺腫で低発現を認めた miR-96 は, qRT-PCR では FSH/LH 産生腺腫での高発現および GH 産生腺腫とナルセル腺腫で発現が高い傾向を認めたが, ACTH 産生腺腫での低発現は認められなかった (図1上段)。miR-132 は ACTH 産生腺腫でのみ低発現が認められた (図1上段)。miR-183 は正常下垂体, GH 産生腺腫, FSH/LH 産生腺腫, ナルセル腺腫間に発現の差異はなく, PRL 産生腺腫と ACTH 産生腺腫において低発現を示した (図1上段)。miR-551b は GH 産生腺腫での高発現と ACTH 産生腺腫での低発現が

認められた (図1下段)。miR-144, miR-375, miR-1260 では qRT-PCR では正常下垂体と各タイプの腺腫間で発現に有意な差はみられなかった (図1)。

これらの miRNA の中で正常下垂体と ACTH 産生腺腫あるいは FSH/LH 産生腺腫で顕著な発現量の差異が認められた miR-132, miR-137, miR-551b について以下の実験を行った。

## 2. miR-132, miR-137, miR-551b の各組織・各下垂体細胞株での発現

マウスの各組織から total RNA を抽出し, qRT-PCR に



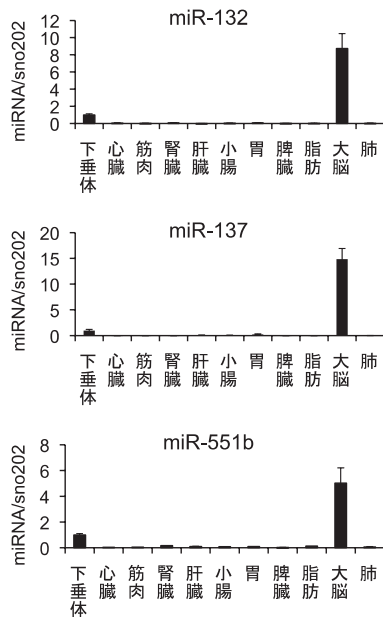


図2 マウス組織における miR-132, miR-137, miR-551b の発現

マウス各組織の small RNA 画分を含む total RNA を鋳型に, 各 miRNA に対する TaqMan プローブおよび特異的プライマーを用いた qRT-PCR を行った。各 miRNA 発現量を内部標準小分子 RNA である sno202 の発現量で補正し, マウス下垂体組織での発現量を 1 とする相対値で表した。(n=3)

より miR-132, miR-137, miR-551b の発現量を測定した(図2)。これらの miRNA では, 他の組織に比べ下垂体および大脳に高発現を認めたことから, 下垂体および神経組織特異的に発現している可能性が示唆された。次にこれらの miRNA の各種ホルモン産生細胞での発現を, 各種下垂体ホルモン産生細胞株を用いて検討した(図3)。miR-132 の発現はマウス下垂体と比較すると, 検討した全ての細胞株で低かった(図3)。miR-137 は FSH/LH 産生細胞株である  $\alpha$ T3-1 および L $\beta$ T2, GH 産生細胞株の MtT/S, PRL 産生細胞株 MMQ, 下垂体上皮細胞株 RC-4B/C でほとんど発現が認められなかった(図3)。miR-551b はヒト・マウスとラット間で塩基配列が保存されていないため, マウス由来の細胞株のみで発現を検討したところ AtT-20,  $\alpha$ T3-1, L $\beta$ T2 での miR-551b の発現は qRT-PCR の検出限界以下であった。

### 3. miR-132, miR-551b の細胞増殖への影響

図1で示したように ACTH 産生腺腫では miR-132 と miR-551b の低発現が認められた。そこで, miR-132 および miR-551b の発現抑制が ACTH 産生腺腫の発症に関与する可能性を検証するために, これらの pre-miRNA precursor を ACTH 産生細胞株 AtT-20 に導入した際の細胞増殖能を検討した。miR-132 あるいは miR-551b の

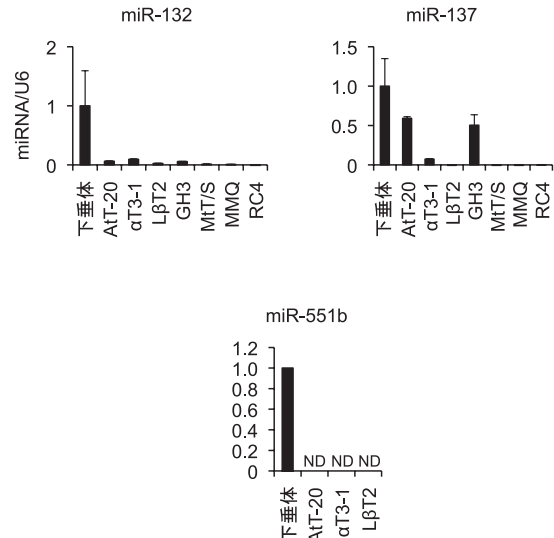


図3 下垂体ホルモン産生由来細胞由来細胞株における miR-132, miR-137, miR-551b の発現

各下垂体ホルモン産生細胞株の small RNA 画分を含む total RNA を鋳型に, 各 miRNA に対する TaqMan プローブおよび特異的プライマーを用いた qRT-PCR を行った。各 miRNA 発現量を内部標準小分子 RNA である U6 の発現量で補正し, マウス下垂体組織での発現量を 1 とする相対値で表した。(n=3) ND; 検出限界以下。

pre-miRNA precursor を導入した AtT-20 では有意に細胞増殖の抑制が認められた(図4A)。またヒト胎児腎由来線維芽細胞である 293FT 細胞を用いて同様の検討を行ったところ, これらの pre-miRNA precursor の細胞増殖における効果は認められなかった(図4B)。これらの結果により, miR-132 および miR-551b は ACTH 産生細胞特異的に細胞増殖を抑制する作用を有することが示唆された。

### 4. miR-551b のターゲット遺伝子の探索

miR-551b のターゲット候補遺伝子を *in silico* 解析により検討した。表2に示す TargetScan, miRDB, DIANA-microT-CDS による標的遺伝子候補の中から, 悪性腫瘍での発現上昇が報告されている *ERBB4*<sup>28)</sup> に着目した。*ERBB4* の遺伝子の 3'-UTR における miR-551b の結合予測部位を図5Aに示す。*ERBB4* mRNA 量は GH 産生腺腫で少なく, ACTH 産生腺腫で高い傾向にあり(図5B), これらの腺腫における miR-551b の発現と逆相関を示した。そこで *ERBB4* が miR-551b の標的遺伝子であるか否か検討するため, ルシフェラーゼ遺伝子の翻訳領域の下流に *ERBB4* の miR-551b の結合予測部位を含む約 1 kb の 3'-UTR を組み込んだベクターと, miR-551b の pre-miRNA precursor を導入した 293FT 細胞におけるルシ

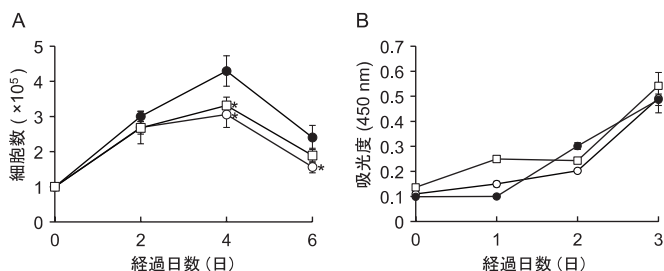


図4 miR-132およびmiR-551b過剰発現による細胞増殖への影響

A: AtT-20細胞に pre-NC (●), miR-132 (○), miR-551b (□) を過剰発現させ、0, 2, 4, 6日後の生細胞数を計測した。  
B: 293FT細胞に pre-NC (●), miR-132 (○), miR-551b (□) を過剰発現させ、0, 1, 2, 3日目の生細胞活性を Cell Counting Kit-8 を用いて測定した。pre-NC を発現させた細胞数と比較して有意差を求めた。\*  $p < 0.05$  (n=3)。

表2 各オンラインプログラムによる miR-551b の標的遺伝子候補

TargetScan	DIANA-microT-CDS
LPHN1	ERBB4
GALNTL6	WDFY4
ZFP36	PCCA
STX1B	PJA1
ERBB4	PCTK2
CTIF	PHF8
	LPHN1
	TCHH
miRDB	GMDS
TCHH	ZNF35
TRPM7	WDR5
WDFY4	AGA
RNF168	ITSN1
CRB2	SLAIN1
LPHN1	GALNTL6
KIAA1804	ANKRD50
PAR6G	ANGPTL4
ERBB4	ZFP36
PTK2	GSPT2

フェラーゼ活性を測定した (図5C)。miR-551b を導入した細胞でルシフェラーゼ活性の抑制が認められたことから、*ERBB4* は miR-551b の標的遺伝子である可能性が示唆された。

### 5. miR-551b プロモーター領域のメチル化解析

miR-551b は3q26.2の偽遺伝子である EGF-like and EMI domain containing 1, pseudogene (*EGFEMIP*) の第3イントロン上に位置する。慢性リンパ性白血病において *EGFEMIP* のエクソン1とイントロン1にまたがる CpG アイランド領域の CpG アイランドの DNA メチル化と miR-551b の低発現の相関が報告されている<sup>29)</sup>。そこで

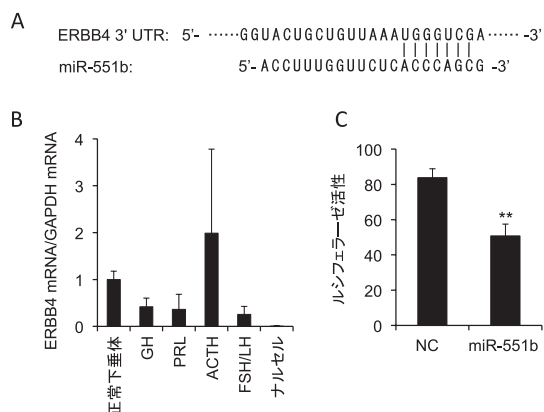


図5 miR-551b の標的遺伝子 *ERBB4* の同定

A: *ERBB4* における 3'-UTR での miR-551b の結合予測部位。  
B: 各タイプの下垂体腺腫における *ERBB4* mRNA 発現量。正常下垂体 4 例, GH 産生腺腫 (GH) 10 例, PRL 産生腺腫 (PRL) 5 例, ACTH 産生腺腫 (ACTH) 7 例, FSH/LH 産生腺腫 (FSH/LH) 6 例, ナルセル腺腫 (ナルセル) 5 例の small RNA 画分を含む total RNA を鋳型に *ERBB4* 特異的プロイマーを用いた qRT-PCR を行った。  
C: *ERBB4* の 3'-UTR を下流に組込んだルシフェラーゼベクターと pre-NC あるいは pre-miR-551b を 293FT 細胞に導入し、48 時間後のホタルルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性はウミシイタケルシフェラーゼによる化学発光量で補正した。pre-NC を導入した細胞のルシフェラーゼ活性と比較して有意差を求めた。\*\*  $p < 0.01$  (n=3)。

ACTH 産生腺腫での miR-551b の低発現における DNA メチル化の関与を検討するため、正常下垂体と ACTH 産生腺腫でのこの領域における 42 個の CpG のメチル化状態をバイサルファイトシーケンシングにより検討した (図6A)。正常下垂体・ACTH 産生腺腫ともにこの領域での CpG アイランドのメチル化はほとんど認められなかった (図6B)。少なくともこの領域の DNA メチル

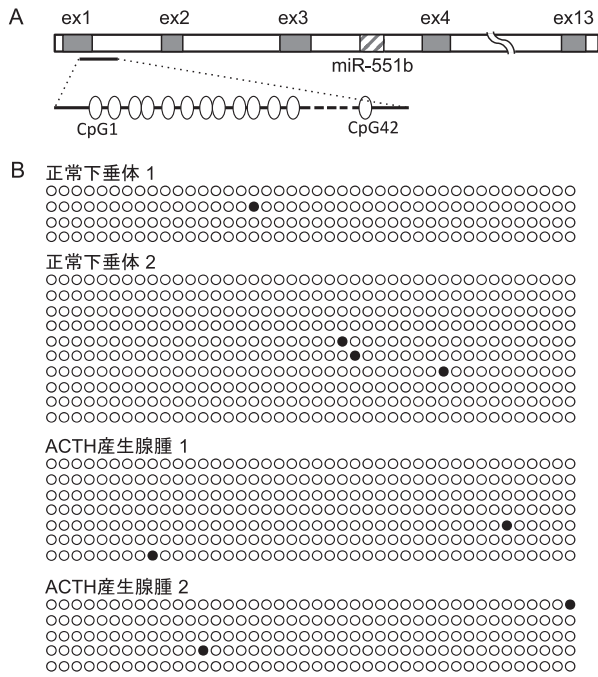


図6 miR-551b プロモーター領域の CpG アイランドのメチル化解析

A: *EGFEMIP* 遺伝子の模式図。13個のエキソン(ex) からなり、イントロン3に miR-551b 遺伝子を含む。ex1とイントロン1にまたがる42個の CpG を含む CpG アイランドが認められる。

B: 正常下垂体および ACTH 産生腺腫におけるバイサルファイトシーケンスによるメチル化解析。○はメチル化されていない CpG, ●はメチル化された CpG を表す。

化は ACTH 産生腺腫での miR-551b の低発現と関連しないことが示唆された。

## 考 察

特定の miRNA は様々な腫瘍で発現異常が認められ、腫瘍の発症に重要な役割を担うと考えられており<sup>21)</sup>、下垂体腺腫で変動する miRNA もいくつか知られている<sup>30)</sup>。例えば、GH 産生腺腫では miR-15a, miR-16, miR-136 の低発現と let-7a, miR-20a, miR-26b, miR-93, miR-96, miR-155, miR-516a-3p の高発現が<sup>22, 23, 31, 32)</sup>、PRL 産生腺腫では miR-132 の低発現, miR-212 の高発現が<sup>22)</sup>、ACTH 産生腺腫では miR-223, miR-15a, miR-16, miR-21, miR-141, miR-143, miR-145 などの低発現が認められている<sup>22, 33)</sup>。NF 腺腫では、片親由来の遺伝子のみが発現するインプリンティング遺伝子群をコードする 14q32 領域の mRNA および miRNA が低発現である<sup>34)</sup> ほか、miR-144 の高発現と miR-212, miR-414 の低発現が報告されている<sup>25, 27)</sup>。このように変動する miRNA の種類は各タイプの腺腫によって異なる。下垂

体腺腫で発現が変動する miRNA のいくつかは、アポトーシス、細胞増殖との関連が示唆されている<sup>30)</sup>。GH 産生腺腫で低発現を示す miR-126, miR-381 は pituitary tumor-transforming 1 (*PTTG1*) を標的遺伝子とする<sup>23)</sup>。PTTG1 は血管新生促進と癌遺伝子 *c-myc* の転写促進, p21<sup>CIP1</sup> (*CDKN1A*) の転写抑制により腫瘍の発症と関連する<sup>35)</sup>。様々なタイプの下垂体腺腫で低発現を示す let-7, miR-15, miR-16, miR-26, miR-196a-2 の 5 種は下垂体腺腫の発生に関与する high mobility group AT-hook 遺伝子を標的とする<sup>32, 36-39)</sup>。

上述した miRNA を含め、各タイプの腺腫で変動する miRNA の同定は、主にマイクロアレイ解析や PCR アレイを用いて行われている<sup>11, 22-27)</sup>。しかしながら、これらの報告で変動する miRNA は必ずしも一致しない。例えば miR-150 は Bottoni らの報告では ACTH 産生腺腫で高発現しているが<sup>22)</sup>、Amaral らは逆に低発現であることを報告している<sup>33)</sup>。これらの違いはアレイの種類、用いたサンプルの純度、データの処理方法、サンプル数の少なさなどが主な要因と考えられる。従って、各タイプの腺腫で変動する miRNA を評価するには、マイクロアレイ解析により得られた結果を、qRT-PCR やノザン解析などにより多検体で確認することが必要となる。実際に本研究でも、マイクロアレイ解析と qRT-PCR での結果に差異を生じた miRNA が確認された。

各タイプの腺腫を比較的多数用いたマイクロアレイによる本研究の結果と、これまでの報告とを比較すると、GH 産生腺腫で発現低下が報告されている miR-15a, miR-16, miR-26a は、本研究のマイクロアレイのデータでは発現変動は認められず、miR-136 は逆に高発現を示すなど、異なる発現を示す miRNA が多く認められた(未掲載データ)。GH 産生腺腫は PRL 産生腺腫と並び、下垂体腺腫の中でも頻度が高く、GH 産生細胞だけでなく PRL 産生細胞を含むタイプも散見される。また約半数の GH 産生腺腫は *GNAS* 変異を有するなど、その腫瘍発症機序にも複数のタイプがあると考えられる。さらに miR-15a, miR-16-1 の発現量は GH 産生腺腫, PRL 産生腺腫において腫瘍の直径と負の相関を示すことが報告されており<sup>31)</sup>、変動する miRNA は腫瘍の大きさにも依存することが示唆される。従って、今回の結果を基に、GH 産生腺腫で興味深い発現挙動を示す miRNA 候補を絞り込むためには、腺腫の大きさ、*GNAS* 変異の有無、ホルモン産生細胞の種類などの情報により区分して考慮する必要があると考えられ、今後の課題としたい。

一方、NF 腺腫と ACTH 産生腺腫に関しては、Stilling らの報告<sup>24)</sup> および Butz らの報告<sup>25)</sup> と類似した結果が得られた(未掲載データ)。さらに、FSH/LH 産生腺腫とナルセル腺腫では miR-410 や miR-495 などの 14q32 領域に位置する miRNA の多くが低発現しており、これは Cheunschon らの報告<sup>34)</sup> と一致した。これらの結果は GH 産生腺腫と比べ、ACTH 産生腺腫と NF 腺腫はそれ



ぞれ腺腫間での性質の差異が少ないことを示唆するのかもしれない。そこで、本研究では ACTH 産生腺腫および NF 腺腫で、特徴的な発現変動を示した miR-132, miR-137, miR-551b に着目した。

ACTH 産生腺腫で低発現であった miR-132 は膵臓癌<sup>40)</sup>、慢性リンパ性白血病<sup>41)</sup> で発現が上昇することが報告されている。また、その過剰発現は膵臓癌細胞株 Panc1 の細胞増殖を促進する。これらの結果は、miR-132 の癌遺伝子様作用を示唆する。一方で、前立腺癌では miR-132 は低発現を示し、前立腺由来細胞株に miR-132 を過剰発現させると、その標的遺伝子 heparin-binding EGF-like growth factor (*HBEGF*), *talin2* (*TLN2*) の発現抑制により細胞増殖の抑制およびアポトーシスが誘導されることが報告されている<sup>42)</sup>。また miR-132 の低発現を示す骨肉腫は悪性度が高く、抗癌剤抵抗性を示し、予後が増悪することが報告されている<sup>43)</sup>。このように miR-132 の細胞増殖に対する機能には細胞特異性があり、ACTH 産生腺腫では腫瘍抑制遺伝子的に作用する可能性がある。miR-132 を過剰発現させた AtT-20 細胞では細胞増殖が抑制されるのに対し、ヒト線維芽細胞株である 293FT 細胞では細胞増殖の抑制は認められなかったことは、その仮説を支持するものである。興味深いことにマウスの正常下垂体と比べ、各ホルモン産生細胞株での miR-132 は低発現を示す。これらの細胞株での増殖能の獲得に miR-132 の発現減少が関与する可能性があり、今後明らかにすべき課題である。また、各タイプの腺腫における *HBEGF* mRNA 発現量を検討したところ、ほとんど全ての下垂体腺腫で低発現を示したことから (未掲載データ)、下垂体では *HBEGF* の発現は腺腫発症に関与しない可能性が高く、他の miR-132 の標的遺伝子の存在が示唆される。また前立腺癌での miR-132 の発現制御には、そのプロモーター領域の CpG アイランドのメチル化が関与することが知られている<sup>42)</sup>。ACTH 産生腺腫での miR-132 の低発現に DNA メチル化が関与しているか、今後検討する必要がある。

ACTH 産生腺腫および FSH/LH 産生腺腫を含む NF 腺腫で高発現を示した miR-137 の腫瘍での発現、細胞増殖に対する作用は数多く研究されており、その全ては miR-137 の腫瘍抑制遺伝子としての作用を示している<sup>44-50)</sup>。本研究では miR-137 は腫瘍で発現が高い癌遺伝子様の特徴を示し、これらの報告と相反した。miR-137 は他の細胞株に比べ ACTH 産生細胞株 AtT-20 で発現が高いことから、ACTH 産生細胞で何らかの役割を担っている可能性がある。ACTH 産生腺腫での高発現は、miR-137 を本来高発現する細胞が増殖した結果である可能性があり、腫瘍発症機序に関与しないのかもしれない。一方、miR-137 は FSH/LH 産生腺腫でも高発現を示したが、FSH/LH 産生細胞株 ( $\alpha$ T3-1 細胞および L $\beta$ T2 細胞) では発現がほとんど認められなかった。これらの細胞株は FSH $\beta$  の遺伝子発現・蛋白質産生が認められな

いなど、正常のゴナドトロピン産生細胞とは性質が異なることが示唆されており<sup>51,52)</sup>、ゴナドトロピン産生細胞での miR-137 発現を *in situ* ハイブリダイゼーションなどを用いて確認する必要がある。

近年、miRNA は血清中にも存在し、各疾患のバイオマーカーとなりうる可能性が示唆されている<sup>53)</sup>。miR-137 はアルツハイマー病患者の脳皮質で発現量の低下が認められ、アルツハイマーのモデルマウスでは、血清中 miRNA 量と脳皮質の miRNA 量が正の相関を示すことから<sup>54,56)</sup>、アルツハイマー病のバイオマーカーとして期待されている。FSH/LH 産生腺腫のほとんどは NF 腺腫であり、血清の FSH や LH 値の変動により腫瘍の経過を簡便に診断することはできない。NF 腺腫で高発現を示す miR-137 は、NF 腺腫の血中バイオマーカーとして利用できる可能性があり、NF 腺腫と血中 miR-137 量の相関を今後検討したい。

miR-551b の標的遺伝子や機能を解析した報告はほとんどない。本研究では、miR-551b は AtT-20 細胞特異的に増殖抑制効果を示した。これは miR-551b が ACTH 産生腺腫の発症に関与する可能性を示唆する。本研究で miR-551b の標的遺伝子であることを示した *ERBB4* は 4 種類のアイソフォームを有する<sup>57)</sup>。Paatero らは、そのアイソフォームのうち CYT-1 および CYT-1/CYT-2 の比と卵巣癌の予後の相関を報告している<sup>28)</sup>。図 5 B で示した下垂体の *ERBB4* mRNA 量はアイソフォーム 4 種類で共通するプライマーを用いた qRT-PCR により測定された。正常下垂体および下垂体腺腫では *ERBB4* CYT-1 の発現量は少なく (未掲載データ)、その他のアイソフォームの発現量が反映されていると考えられ、下垂体腺腫と卵巣癌の *ERBB4* のアイソフォームの発現は一致しない。また、miR-551b の標的 mRNA は全ての ACTH 産生腺腫で *ERBB4* mRNA が高発現しているわけではなく、miR-551b は少なくとも一部の ACTH 産生腺腫では、*ERBB4* 発現を制御するが、*ERBB4* 以外の遺伝子を介する機序も存在すると考えられる。miR-551b の発現調節に関して、慢性リンパ性白血病での DNA のメチル化と miR-551b の低発現の相関が報告されている<sup>29)</sup>。本研究では、その報告で用いられたプロモーター領域の DNA メチル化を検討したが、少なくともこの領域の DNA メチル化は、ACTH 産生腺腫での miR-551b の低発現と関連しない。しかしながら、他の領域を miR-551b のプロモーター領域と予測する報告もあり<sup>58,59)</sup>、DNA メチル化との関連性を完全には否定出来ず、今後の検討が必要である。

## 結 論

・マイクロアレイ解析と qRT-PCR 解析により、各タイプの下垂体腺腫に特徴的な発現を示す miRNA を同定した。GH 産生腺腫での miR-7, miR-495, miR-551b の高発現を、PRL 産生腺腫での miR-183 の低発現をそ



それぞれ認めた。ACTH 産生腺腫での miR-137 の高発現, miR-132, miR-183, miR-410, miR-495, miR-551b の低発現を認めた。FSH/LH 産生腺腫での miR-96, miR-137 の高発現, miR-410, miR-495 の低発現を認めた。ナルセル腺腫での miR-410, miR-495 の低発現を認めた。

- ・ miR-132, miR-137, miR-551b は他の組織に比べ下垂体と脳での発現が高かった。また, miR-132 と miR-551b は各下垂体ホルモン産生細胞株では低発現であった。
- ・ ACTH 産生腺腫で低発現を示した miR-132, miR-551b を過剰発現させると, ACTH 産生由来細胞株である AtT-20 細胞特異的に細胞増殖抑制作用を示したことから, この 2 種の miRNA は ACTH 産生腺腫の発生に関与する可能性が示唆された。
- ・ ACTH 腺腫の一部に miR-551b の標的遺伝子である *ERBB4* の高発現を認めた。この ACTH 産生腺腫では, miR-551b の発現低下による *ERBB4* の高発現が腫瘍発症に関与している可能性が示唆された。
- ・ ACTH 産生腺腫における miR-551b の低発現と *EGFEMIP* に存在する CpG アイランドのメチル化に関連はないことが示された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり, 終始御指導と御校閲を賜りました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・吉本勝彦教授に深甚なる謝意を表します。御校閲, 御助言を戴きました徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部口腔組織学分野・羽地達次教授ならびに徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部口腔分子病態学分野・石丸直澄教授に深謝いたします。直接御指導と御助言を戴きました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・岩田武男助教, プラスミドベクターを譲っていただきました徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部口腔分子病態学分野・工藤保誠准教授, 下垂体腺腫のマイクロアレイデータを提供していただきました元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・銭志栄先生, 下垂体組織を提供していただきました虎の門病院・山田正三先生に深謝いたします。最後に本研究にあたりご協力いただきました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の諸先生方に深謝いたします。

## 参考文献

- 1) 竹井麻生, 長村義之: 下垂体腫瘍の機能的病理分類。下垂体腫瘍のすべて。寺本明, 長村義之 編集 東京, 医学書院, 2009, 108-115
- 2) Lemos MC and Thakker RV: Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): analysis of 1336 mutations reported in the first decade following identification of the gene. *Hum Mutat* 29, 22-32 (2008)
- 3) Bertherat J, Horvath A, Groussin L, Grabar S, Boikos S, Cazabat L, Libe R, René-Corail F, Stergiopoulos S, Bourdeau I, Bei T, Clauser E, Calender A, Kirschner LS, Bertagna X, Carney JA, and Stratakis CA: Mutations in regulatory subunit type 1A of cyclic adenosine 5-monophosphate-dependent protein kinase (PRKAR1A): phenotype analysis in 353 patients and 80 different genotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 94, 2085-2091 (2009)
- 4) Leontiou CA, Gueorguiev M, van der Spuy J, Quinton R, Lolli F, Hassan S, Chahal HS, Igreja SC, Jordan S, Rowe J, Stolbrink M, Christian HC, Wray J, Bishop-Bailey D, Berney DM, Wass JA, Popovic V, Ribeiro-Oliveira A Jr, Gadelha MR, Monson JP, Akker SA, Davis JR, Clayton RN, Yoshimoto K, Iwata T, Matsuno A, Eguchi K, Musat M, Flanagan D, Peters G, Bolger GB, Chapple JP, Frohman LA, Grossman AB, and Korbonits M: The role of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in familial and sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 2390-2401 (2008)
- 5) Landis CA, Masters SB, Spada A, Pace AM, Bourne HR, and Vallar L: GTPase inhibiting mutations activate the  $\alpha$  chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours. *Nature* 340, 692-696 (1989)
- 6) Jacks T, Fazeli A, Schmidt EM, Bronson RT, Goodell MA, and Weinberg RA: Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* 359, 295-300 (1992)
- 7) Cryns VL, Alexander JM, Klibanski A, and Arnold A: The retinoblastoma gene in human pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 77, 644-646 (1993)
- 8) Lin Y, Jiang X, Shen Y, Li M, Ma H, Xing M, and Lu Y: Frequent mutations and amplifications of the PIK3CA gene in pituitary tumors. *Endocr Relat Cancer* 16, 301-310 (2009)
- 9) Tanizaki Y, Jin L, Scheithauer BW, Kovacs K, Roncaroli F, and Lloyd RV: P53 gene mutations in pituitary carcinomas. *Endocr Pathol* 18, 217-222 (2007)
- 10) Tanaka C, Kimura T, Yang P, Moritani M, Yamaoka T, Yamada S, Sano T, Yoshimoto K, and Itakura M: Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 11 and infrequent inactivation of the MEN1 gene in sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 2631-2634 (1998)
- 11) Palumbo T, Faucz FR, Azevedo M, Xekouki P, Iliopoulos D, and Stratakis CA: Functional screen analysis reveals miR-26b and miR-128 as central regulators of pituitary somatotroph tumor growth through activation of the PTEN-AKT pathway. *Oncogene* 32, 1651-1659 (2013)

- 12) Qian ZR, Sano T, Yoshimoto K, Yamada S, Ishizuka A, Mizusawa N, Horiguchi H, Hirokawa M, and Asa SL: Inactivation of RASSF1A tumor suppressor gene by aberrant promoter hypermethylation in human pituitary adenomas. *Lab Invest* 85, 464-473 (2005)
- 13) Buslei R, Kreutzer J, Hofmann B, Schmidt V, Siebzehner übl F, Hahnen E, Eyupoglu IY, Fahlbusch R, and Bl ümcke I: Abundant hypermethylation of SOCS-1 in clinically silent pituitary adenomas. *Acta Neuropathol* 111, 264-271 (2006)
- 14) Simpson DJ, Hibberts NA, McNicol AM, Clayton RN, and Farrell WE: Loss of pRb expression in pituitary adenomas is associated with methylation of the RB1 CpG island. *Cancer Res* 60, 1211-1216 (2000)
- 15) Ogino A, Yoshino A, Katayama Y, Watanabe T, Ota T, Komine C, Yokoyama T, and Fukushima T: The p15<sup>INK4b</sup>/p16<sup>INK4a</sup>/RB1 pathway is frequently deregulated in human pituitary adenomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 398-403 (2005)
- 16) Torrisani J, Hanoun N, Laurell H, Lopez F, Maoret JJ, Souque A, Susini C, Cordelier P, and Buscail L: Identification of an upstream promoter of the human somatostatin receptor, hSSTR2, which is controlled by epigenetic modifications. *Endocrinology* 149, 3137-3147 (2008)
- 17) Al-Azzawi H, Yacqub-Usman K, Richardson A, Hofland LJ, Clayton RN, and Farrell WE: Reversal of endogenous dopamine receptor silencing in pituitary cells augments receptor-mediated apoptosis. *Endocrinology* 152, 364-373 (2011)
- 18) Bahar A, Bicknell JE, Simpson DJ, Clayton RN, and Farrell WE: Loss of expression of the growth inhibitory gene GADD45 $\gamma$ , in human pituitary adenomas, is associated with CpG island methylation. *Oncogene* 23, 936-944 (2004)
- 19) Zhao J, Dahle D, Zhou Y, Zhang X, and Klibanski A: Hypermethylation of the promoter region is associated with the loss of MEG3 gene expression in human pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 2179-2186 (2005)
- 20) Esquela-Kerscher A and Slack FJ: Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 259-269 (2006)
- 21) Croce CM: Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 10, 704-714 (2009)
- 22) Bottoni A, Zatelli MC, Ferracin M, Tagliati F, Piccin D, Vignali C, Calin GA, Negrini M, Croce CM, and 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)
- 23) Mao ZG, He DS, Zhou J, Yao B, Xiao WW, Chen CH, Zhu YH, and Wang HJ: Differential expression of microRNAs in GH-secreting pituitary adenomas. *Diagn Pathol* 5, 79 (2010)
- 24) Stilling G, Sun Z, Zhang S, Jin L, Righi A, Kovács G, Korbonits M, Scheithauer BW, Kovacs K, and Lloyd RV: MicroRNA expression in ACTH-producing pituitary tumors: up-regulation of microRNA-122 and -493 in pituitary carcinomas. *Endocrine* 38, 67-75 (2010)
- 25) Butz H, Likó I, Czirják S, Igaz P, Korbonits M, Rác K, and Patócs A: MicroRNA profile indicates downregulation of the TGF $\beta$  pathway in sporadic non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary* 14, 112-124 (2011)
- 26) Trivellin G, Butz H, Delhove J, Igreja S, Chahal HS, Zivkovic V, McKay T, Patócs A, Grossman AB, and Korbonits M: MicroRNA miR-107 is overexpressed in pituitary adenomas and inhibits the expression of aryl hydrocarbon receptor-interacting protein in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303, E708-719 (2012)
- 27) Liang S, Chen L, Huang H, and Zhi D: The Experimental Study of miRNA in Pituitary Adenomas. *Turk Neurosurg* 23, 721-727 (2013)
- 28) Paatero I, Lassus H, Junttila TT, Kaskinen M, Bü tzow R, and Elenius K: CYT-1 isoform of ErbB4 is an independent prognostic factor in serous ovarian cancer and selectively promotes ovarian cancer cell growth in vitro. *Gynecol Oncol* 129, 179-187 (2013)
- 29) Baer C, Claus R, Frenzel LP, Zucknick M, Park YJ, Gu L, Weichenhan D, Fischer M, Pallasch CP, Herpel E, Rehli M, Byrd JC, Wendtner CM, and Plass C: Extensive promoter DNA hypermethylation and hypomethylation is associated with aberrant microRNA expression in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 72, 3775-3785 (2012)
- 30) Sivapragasam M, Rotondo F, Lloyd RV, Scheithauer BW, Cusimano M, Syro LV, and Kovacs K: MicroRNAs in the human pituitary. *Endocr Pathol* 22, 134-143 (2011)
- 31) Bottoni A, Piccin D, Tagliati F, Luchin A, Zatelli MC, and degli Uberti EC: miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas. *J Cell Physiol* 204, 280-285 (2005)
- 32) Qian ZR, Asa SL, Siomi H, Siomi MC, Yoshimoto K, Yamada S, Wang EL, Rahman MM, Inoue H, Itakura M, Kudo E, and 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)
- 33) Amaral FC, Torres N, Saggiaro F, Neder L, Machado HR,

- Silva WA Jr, Moreira AC, and Castro M: MicroRNAs differentially expressed in ACTH-secreting pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 94, 320-323 (2009)
- 34) Cheunsuchon P, Zhou Y, Zhang X, Lee H, Chen W, Nakayama Y, Rice KA, Tessa Hedley-Whyte E, Swearingen B, and Klibanski A: Silencing of the imprinted DLK1-MEG3 locus in human clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *Am J Pathol* 179, 2120-2130 (2011)
- 35) Chesnokova V and Melmed S: Pituitary senescence: the evolving role of *Pttg*. *Mol Cell Endocrinol* 326, 55-59 (2010)
- 36) De Martino I, Visone R, Wierinckx A, Palmieri D, Ferraro A, and Cappabianca P: HMGA proteins up-regulate *CCNB2* gene in mouse and human pituitary adenomas. *Cancer Res* 69, 1844-1850 (2009)
- 37) Kaddar T, Rouault JP, Chien WW, Chebel A, Gadoux M, Salles G, Ffrench M, and Magaud JP: Two new miR-16 targets: *caprin-1* and *HMGA1*, proteins implicated in cell proliferation. *Biol Cell* 101, 511-524 (2009)
- 38) Fedele M, Palmieri D, and Fusco A: *HMGA2*: A pituitary tumour subtype-specific oncogene? *Mol Cell Endocrinol* 326, 19-24 (2010)
- 39) Palmieri D, D'Angelo D, Valentino T, De Martino I, Ferraro A, Wierinckx A, Fedele M, Trouillas J, and Fusco A: Downregulation of *HMGA*-targeting microRNAs has a critical role in human pituitary tumorigenesis. *Oncogene* 31, 3857-3865 (2012)
- 40) Park JK, Henry JC, Jiang J, Esau C, Gusev Y, Lerner MR, Postier RG, Brackett DJ, and Schmittgen TD: miR-132 and miR-212 are increased in pancreatic cancer and target the retinoblastoma tumor suppressor. *Biochem Biophys Res Commun* 406, 518-523 (2011)
- 41) Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, Shimizu M, Cimmino A, Zupo S, Dono M, Dell'Aquila ML, Alder H, Rassenti L, Kipps TJ, Bullrich F, Negrini M, and Croce CM: MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 11755-11760 (2004)
- 42) Formosa A, Lena AM, Markert EK, Cortelli S, Miano R, Mauriello A, Croce N, Vandesompele J, Mestdagh P, Finazzi-Agrò E, Levine AJ, Melino G, Bernardini S, and Candi E: DNA methylation silences miR-132 in prostate cancer. *Oncogene* 32, 127-134 (2013)
- 43) Yang J, Gao T, Tang J, Cai H, Lin L, and Fu S: Loss of microRNA-132 predicts poor prognosis in patients with primary osteosarcoma. *Mol Cell Biochem* 381, 9-15 (2013)
- 44) Bemis LT, Chen R, Amato CM, Classen EH, Robinson SE, Coffey DG, Erickson PF, Shellman YG, and Robinson WA: MicroRNA-137 Targets Microphthalmia-Associated Transcription Factor in Melanoma Cell Lines. *Cancer Res* 68, 1362-1368 (2008)
- 45) Silber J, Lim DA, Petritsch C, Persson AI, Maunakea AK, Yu M, Vandenberg SR, Ginzinger DG, James CD, Costello JF, Bergers G, Weiss WA, Alvarez-Buylla A, and Hodgson JG: miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med* 6, 14 (2008)
- 46) Balaguer F, Link A, Lozano JJ, Cuatrecasas M, Nagasaka T, Boland CR, and Goel A: Epigenetic silencing of miR-137 is an early event in colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 70, 6609-6618 (2010)
- 47) Chen X, Wang J, Shen H, Lu J, Li C, Hu DN, Dong XD, Yan D, and Tu L: Epigenetics, MicroRNAs, and Carcinogenesis: Functional Role of MicroRNA-137 in Uveal Melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 1193-1199 (2011)
- 48) Zhao Y, Li Y, Lou G, Zhao L, Xu Z, Zhang Y, and He F: MiR-137 Targets Estrogen-Related Receptor Alpha and Impairs the Proliferative and Migratory Capacity of Breast Cancer Cells. *PLoS One* 7, e39102 (2012)
- 49) Althoff K, Beckers A, Odersky A, Mestdagh P, Köster J, Bray IM, Bryan K, Vandesompele J, Speleman F, Stallings RL, Schramm A, Eggert A, Sprüssel A, and Schulte JH: MiR-137 functions as a tumor suppressor in neuroblastoma by downregulating *KDM1A*. *Int J Cancer* 133, 1064-1073 (2013)
- 50) Li KK, Yang L, Pang JC, Chan AK, Zhou L, Mao Y, Wang Y, Lau KM, Poon WS, Shi Z, and Ng HK: MIR-137 suppresses growth and invasion, is downregulated in oligodendroglial tumors and targets *CSE1L*. *Brain Pathol* 23, 426-439 (2013)
- 51) Alarid ET, Windle JJ, Whyte DB, and Mellon PL: immortalization of pituitary cells at discrete stages of development by directed oncogenesis in transgenic mice. *Development* 122, 3319-3329 (1996)
- 52) Kaiser UB, Conn PM, and Chin WW: Studies of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Action Using GnRH Receptor-Expressing Pituitary Cell Lines. *Endocr Rev* 18, 46-70 (1997)
- 53) Allegra A, Alonci A, Campo S, Penna G, Petrunaro A, Gerace D, and Musolino C: Circulating microRNAs: new biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer. *Int J Oncol* 41, 1897-1912 (2012)
- 54) Geekiyana H and Chan C: MicroRNA-137/181c regulates serine palmitoyltransferase and in turn amyloid  $\beta$ , novel targets in sporadic Alzheimer's disease. *J*



- Neurosci 31, 14820-14830 (2011)
- 55) Geekiyanage H, Jicha GA, Nelson PT, and Chan C: Blood serum miRNA: non-invasive biomarkers for Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 235, 491-496 (2012)
  - 56) Geekiyanage H, Upadhye A, and Chan C: Inhibition of serine palmitoyltransferase reduces A $\beta$  and tau hyperphosphorylation in a murine model: a safe therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 34, 2037-2051 (2013)
  - 57) Junttila TT, Laato M, Vahlberg T, Söderström KO, Visakorpi T, Isola J, and Elenius K: Identification of Patients with Transitional Cell Carcinoma of the Bladder Overexpressing ErbB2, ErbB3, or Specific ErbB4 Isoforms: Real-Time Reverse Transcription-PCR Analysis in Estimation of ErbB Receptor Status from Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 9, 5346-5357 (2003)
  - 58) Fujita S and Iba H: Putative promoter regions of miRNA genes involved in evolutionarily conserved regulatory systems among vertebrates. *Bioinformatics* 24, 303-308 (2008)
  - 59) Sethupathy P: Illuminating microRNA Transcription from the Epigenome. *Curr Genomics* 14, 68-77 (2013)