

成長ホルモン産生腺腫における 14q32.3 インプリンティング領域の miRNA 発現増加機構の解析

吉本勝彦、岩田武男、水澤典子、小野信二
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
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

成長ホルモン産生腺腫（GH 産生腺腫）の約半数に *Gsa* 変異が認められ、腫瘍化との関連が示唆されるが、残りの GH 産生腺腫の腫瘍化機構は不明である。他の遺伝子変異はまれであることから、エピゲノム調節分子としての miRNA の関与が示唆される。

これまでのマイクロアレイを用いた研究により、数種の miRNA が GH 産生腺腫に特徴的な発現を示すこと、特にゲノムインプリンティング領域の一つである 14q32.3 に位置する miRNA クラスターが、GH 産生腺腫において発現が増加していることを認めた。本研究は GH 産生腺腫に特徴的な miRNA の発現解析とインプリンティング領域 miRNA 発現異常の機構を解析することにより、GH 産生細胞の正常機能の維持および腫瘍化への関与を解明することを目的とする。

研究方法

1. 下垂体腺腫における miRNA 発現量の検討

一部の miRNA について qRT-PCR を行い、マイクロアレイ解析結果の検証を行った。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 産生腺腫 6 例、ナルセル腺腫 5 例の下垂体組織を使用した。

各下垂体腺腫から 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 Biosciences, Foster City, CA, USA）と TaqMan[®] MicroRNA RT Kit（Applied Biosystems）を用いて cDNA を合成した。cDNA を鋳型に各 miRNA 特異的プライマーおよびプローブ（TaqMan[®] MicroRNA Assay）を用いて、7300 real-time PCR System（Applied Biosciences）による qRT-PCR により miRNA 発現量を評価した。内部標準の小分子 RNA として RNU44（TaqMan MicroRNA Assay）および RNU48（TaqMan MicroRNA Assay）を用いた。各 miRNA 発現量を、それぞれの内部標準の発現量に対する相対値として表した。

2. 下垂体腺腫における mRNA 発現量の検討

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、各遺伝子特異的プライマーと THUNDERBIRD[™] SYBR[®] qPCR Mix（東洋紡、大阪）を用いて

qRT-PCRを行った。内部標準の mRNA として GAPDH を用いた。

3. 下垂体腺腫における MEG3-DMR のメチル化解析

各 2 例の正常下垂体組織と GH 産生腺腫、FSH/LH 産生腺腫における MEG3 メチル化可変領域 (differentially methylated region: DMR) (MEG3-DMR の CG7) のメチル化解析をバイサルファイトシーケンシング法により行った。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。ゲノム DNA を鋳型に、MEG3-DMR の CpG アイランドを含む領域を Ex Taq™ Polymerase (タカラバイオ) とプライマー対により増幅した。得られた PCR 産物を pT7Blue 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。

4. 下垂体腺腫における 14q32.3 インプリンティング領域のゲノムコピー数の解析

GH 腺腫においては 14q32.3 領域のゲノムコピー数の増幅の可能性、FSH/LH 腺腫においては欠失している可能性については、SALSA® MLPA® UPD7/UPD14 (MRC-Holland, Amsterdam, the Netherland) を用いて解析した。

結果

1. GH 産生腺腫で特徴的発現を示す miRNA の同定

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、11 種類の miRNA について qRT-PCR による検証を行った (図 1)。正常下垂体と比較して miR-7 (9q21) の発現は GH 産生腺腫で有意に高かった。miR-137 (1p21.3) 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。miR-410 (14q32) 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。miR-495 (14q32) 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。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。

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 (7q32.2) 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。miR-132 (17q13.3) は ACTH 産生腺腫でのみ低発現が認められた。miR-183 (7q32.2) 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。miR-551b (3q26.2) 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。miR-144 (17q11.2)、miR-375 (2q35)、miR-1260 (14) 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。

この経過において 14q32.3 のインプリンティング領域に位値シクラスターを形成する miRNA が GH 産生腺腫で発現上昇が認められることを見いだした。

2. 14q32.3 インプリンティング領域の miRNA レベル

マイクロアレイ解析において、FSH/LH 腺腫およびナルセル腺腫では 14q32.3 インプリンティング領域に位置する miR-1185 から miR-656 において、46 種の miRNA いずれにおいても正常下垂体に比べ発現低下（2 倍以上）を認めた。一方、GH 腺腫においては miR-494 および miR-410 を除いた他の miRNA で発現増加（2 倍程度）を認めた（図 2）。

3. 14q32.3 インプリンティング領域の mRNA レベル

母親アレル由来の発現を示す long non-coding RNA である *MEG3* (maternally expressed 3) と *MEG8* の発現レベルは正常下垂体と GH 産生腺腫間で差を認めなかった（図 2）。一方、FSH/LH 産生腺腫およびナルセル腺腫においては正常下垂体に比べて発現低下を認めた。父親アレルから発現し、タンパク質をコードする *DLK1* (delta-like 1 homolog) は GH 産生腺腫で発現増加を認めたが、FSH/LH 産生腺腫およびナルセル腺腫においては低下を認めた。一方、*DIO3* (deiodinase, iodothyronine, type III) の発現は GH 産生腺腫では、FSH/LH 産生腺腫とともに低下を認めた。*RTL1* (retrotransposon-like 1) の発現レベルは *DLK1* と同様に GH 産生腺腫で増加を、FSH/LH 産生腺腫、ナルセル腺腫においては低下を認めた。

4. 14q32.3 インプリンティング領域の CpG のメチル化の解析

2 種の正常下垂体における *MEG3*-DMR の CG7 のメチル化を解析した結果、1 種では 8 ヶ所の CpG がほとんどメチル化されているプラスミドクローンとほとんどメチル化されていないプラスミドクローンが 1:1 の比で得られ、他の 1 種ではメチル化と非メチル化クロンの割合が 2:1 の比が得られた。この結果は正常下垂体において、この領域は父親アレルでのみメチル化を受けている結果を示すと考えられる。

GH 産生腺腫においては、2 種の腫瘍（番号 23, 24）においては、24 では全プラスミドクローン（5 個）が、23 では 15 プラスミドクローン中 13 クローンが高メチル化状態であった。1 種のナルセル腺腫では 6 プラスミドクローンが全てメチル化されていた。

5. GH 産生腺腫における 14q32.3 インプリンティング領域のゲノムコピー数の解析

4 例の GH 腺腫および 3 例の FSH/LH 腺腫においては、ゲノムコピー数は正常コントロールと同様に 2 コピーで、増幅あるいは欠失は認められなかった。

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ことが明らかにされている。

ゲノムインプリンティング（遺伝子刷り込み）とは、特定の一方の親から継承した遺伝子が選択的に機能し、他方の遺伝子は機能しないという遺伝子発現様式を示す。現在までに 100 種以上のインプリンティング遺伝子が同定され、Wilms 腫瘍や神経芽細胞腫などの胎児性がんや種々の成人がんの腫瘍化に関与する遺伝子も含まれる。

14q32.3 には父性発現遺伝子である *DLK1*、*RTL1*、母性発現遺伝子である *MEG3*、*MEG8*、多く

の snoRNA および miRNA がクラスターを形成して存在している。これらの領域の遺伝子の発現の調節は、IG-DMR と MEG3-DMR によって制御されていると考えられている¹⁾。ともに父親アレルでメチル化を受け、母親アレルではメチル化を受けない。14q32 領域の miRNA 発現低下が認められる腫瘍として、神経芽細胞腫、メラノーマ、乳がん、グリオーマ、上皮性卵巣がんなどが報告されている。一方、14q32.3 領域の miRNA 発現増加が、肝がん、子宮がん肉腫、t (15;17) 転座を示す急性前骨髄性白血病、甲状腺髄様がん、前庭部神経鞘腫などで報告されている¹⁾。

これらの miRNA および *MEG3* が非機能性腺腫において発現低下を示し、*MEG3* と 14q32 miRNA の発現レベルは正の相関を示すことが Klibanski らのグループによって報告されている^{2,3)}。また、彼らは非機能性腺腫において MEG3-DMR がメチル化を受けていることを示している²⁾。

本研究においては GH 産生腺腫における *MEG3* と 14q32 miRNA の発現レベルに関して明らかな正の相関は認められなかった。この結果は GH 産生腺腫では *MEG3* と 14q32 miRNA が別の発現調節を受けている可能性を示唆する。一方、FSH/LH 産生腺腫およびナルセル腺腫においては、*DLK1*、*MEG3*、*MEG8*、14q32 miRNA はいずれも低発現であった。我々の MEG3-DMR の CG7 のメチル化解析では、ナルセル腺腫で高メチル化を認めた。GH 産生腺腫では、低メチル化であるとの仮説のもと検討したが、むしろ高メチル化の状態であった。IG-DMR と今回検討した部位以外の MEG3-DMR の低メチル化が GH 産生腺腫での miRNA の高発現に関与している可能性、ヒストン修飾状況の変化が関与している可能性、あるいは本領域の発現調節に関与する転写因子の活性化の可能性を今後検討する必要がある。

さらに、14q32 miRNA が高値を示す GH 産生腺腫での転写活性型の母方アレルの遺伝子増幅が認められる可能性、14q32 miRNA が低値を示す FSH/LH 腺腫では転写活性型の母方アレルが欠失し、転写不活性型の父方アレルが残存している可能性について MLPA 法を用いて検討したが、ゲノムコピー数は 2 コピーと異常は認められなかった。しかし、FSH/LH 腺腫では転写活性型の母方アレルが欠失し、転写不活性型の父方アレルが 2 コピーである可能性は否定されていない。

以上、GH 産生腺腫における 14q32.3 インプリンティング領域の miRNA は、FSH/LH 産生腺腫と異なり発現上昇を認めた。この発現上昇に MEG3-DMR の CG7 のメチル化状態、ゲノム DNA のコピー数の変化は関与しない可能性がある。

文献

1. Benetatos L, Hatzimichael E, Londin E, Vartholomatos G, Loher P, Rigoutsos I, Briasoulis E. The microRNAs within the DLK1-DIO3 genomic region: involvement in disease pathogenesis. *Cell Mol Life Sci* 70 : 795-814. 2013.
2. Gejman R, Batista DL, Zhong Y, Zhou Y, Zhang X, Swearingen B, Stratakis CA, Hedley-Whyte ET, Klibanski A. Selective loss of MEG3 expression and intergenic differentially methylated region hypermethylation in the MEG3/DLK1 locus in human clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 93:4119-4125, 2008.
3. Cheunsuchon P, Zhou Y, Zhang X, Lee H, Chen W, Nakayama Y, Rice KA, Tessa Hedley-Whyte E, Swearingen B, Klibanski A. Silencing of the imprinted DLK1-MEG3 locus in human clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *Am J Pathol* 179:2120-2130, 2011.

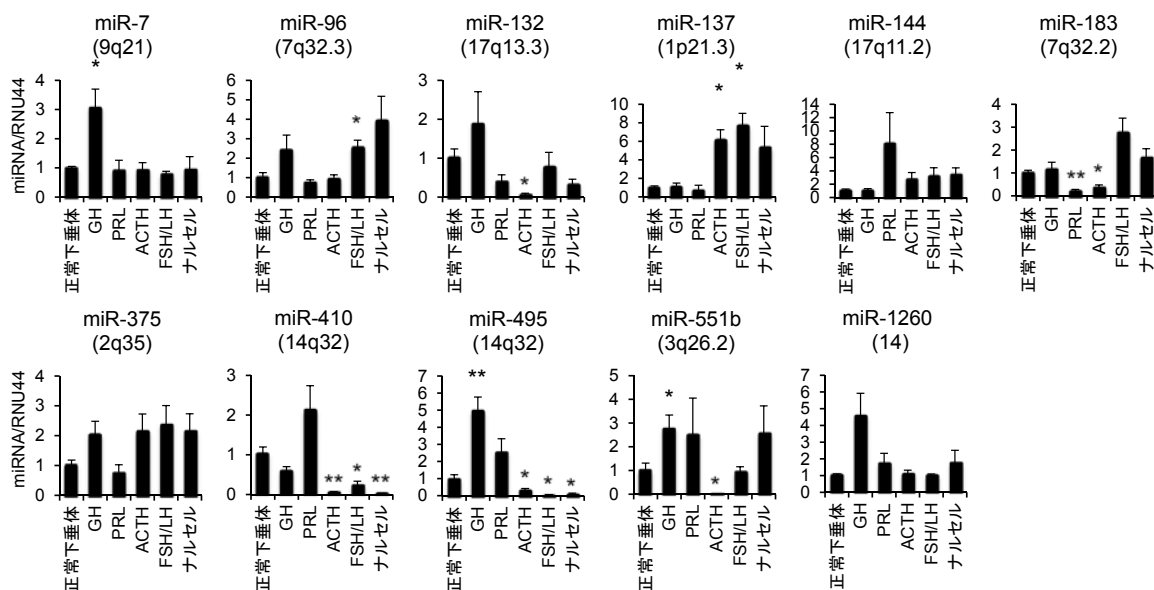


図1 各タイプの下垂体腺腫における miRNA 発現

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 (括弧内は染色体上の位値を示す) に対して 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。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。

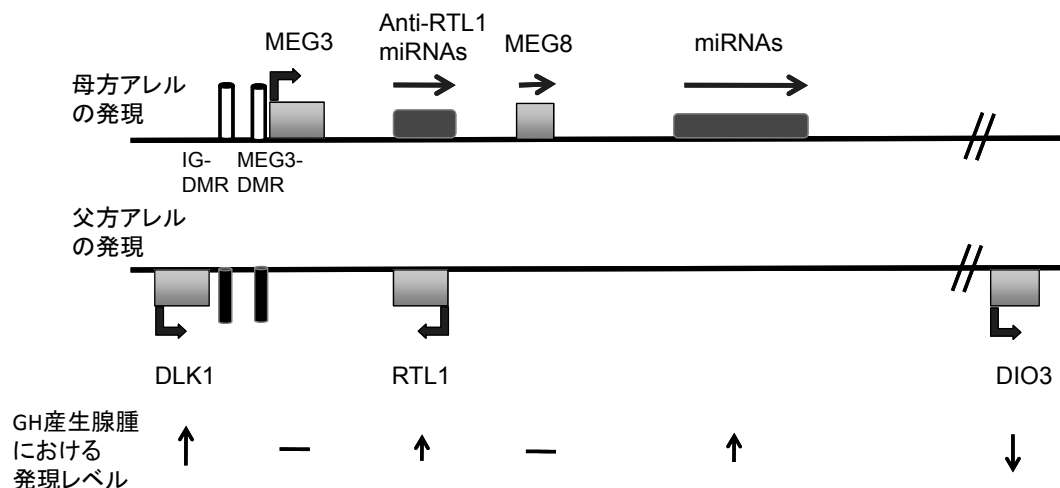


図2 14q32.3 インプリンティング領域における遺伝子発現

IG-DMR および MEG3-DMR 部分の白抜きは非メチル化を、黒塗りはメチル化状態を示す。