

原 著

## 下垂体腺腫における遺伝子治療応用への

### Stem cell 遺伝子検索

昭和大学医学部脳神経外科学教室

桑島 淳氏 阿部 琢巳

谷岡 大輔 佐々木晶子

昭和大学歯学部口腔病理学教室

山 本 剛 立川 哲彦

要約：Stem cell は、自己複製能力やホルモン産生細胞へ分化する能力を有し、下垂体腺腫形成に関わる可能性が示唆されている。近年、Stem cell の能力を用いて新しい臨床応用の可能性が検討されはじめ、基礎研究としてStem cell の性質分析と細胞分化系譜を明確にすることが急務とされている。本研究は、各下垂体腺腫に含まれるStem cell のspecific markers 発現を解析し、Stem cell の臨床応用への基礎研究として下垂体腺腫Stem cell の性状分析を行った。手術で摘出された下垂体腺腫から凍結切片を作成後、Laser Microdissectionを用いて腺腫細胞だけを回収した。Total RNA 抽出後、RT<sup>2</sup>Profiler PCR Array Systemを用いてcDNAを合成し、ABI PRISM<sup>®</sup>7000 Sequence SystemでPCRを行った。PAHS-405A Array プレートに準じてspecific markersを検索し、正常下垂体組織RNAデータで補正後、 $\Delta$ CT法にて解析した。神経形成に関わるNEUROG2は、機能性下垂体腺腫よりも、下垂体ホルモンを分泌しない非機能性下垂体腺腫で低値を表し、ホルモン分泌機能の働きが弱いことを明示した。下垂体特有のProp1, pit1の補助因子SOX2は、機能性下垂体腺腫で認めたが、非機能性下垂体腺腫では検出されなかった。非機能性下垂体腺腫では検出されなかったことから、非機能性腺腫はSox2の影響を受けずにホルモンを分泌しない細胞となることが明らかとなった。胚細胞の分化に関与する遺伝子ISL1は、機能性下垂体腺腫で検出されず、非機能性下垂体腺腫で検出されたことから、非機能性下垂体腺腫は、ラトケ嚢原基細胞Stem cellを有していることが明らかとなり、非機能性下垂体腺腫細胞のなかに未分化な細胞を有することが示唆された。下垂体腺腫細胞に含まれる下垂体Stem cell specific markers 発現の検索を行った。機能性下垂体腺腫よりも非機能性下垂体腺腫で多くの未分化細胞の存在を認め、ホルモンを分泌しない非機能性下垂体腺腫にstem cell細胞が多いことが示唆された。Stem cell発現を調整する遺伝子をしらべることで、各下垂体腺腫に含まれるStem cellの存在を明らかとし、将来の下垂体腺腫遺伝子治療への臨床応用の可能性を提示した。

キーワード：pituitary adenoma, Stem cell, genetic analysis

近年、下垂体腺腫細胞にStem cellが存在するという結果が多く報告されている<sup>1,2)</sup>。今まで、ホルモン産生能をもつgrowth hormone (GH) secreting cells, adrenocorticotrophic Hormone (ACTH), thyroid stimulating hormone (TSH), prolactin (PRL), luteinizing hormone / follicle stimulating hormone (LH/FSH) 細胞は下垂体前葉細胞の高分化型で、細胞の中にStem cellは存在しないと考えられてきた。しかし最近、下垂体腺腫細胞には分化能を有する未分化な組織幹細胞の存在を有すること

が報告されている<sup>3)</sup>。

下垂体前葉はラトケのう遺残腔辺縁上皮細胞から発生して分化増殖する。下垂体原基細胞Stem cellは、転写因子NeuroD1, Ptx1の影響を受けて $\alpha$ -subunit ( $\alpha$ GSU) 細胞になる。

次に転写因子Prop1とFoxn4によってTSH、転写因子ERによってPRL、転写因子GHRHによってGH細胞へと分化する。POMC/ACTH細胞へは、 $\alpha$ -subunitから転写因子NeuroD1の活性を受けてACTH細胞と変化する。LH/FSHホルモン産生細胞

胞へは、転写因子 SH1 と GATA2 の影響を受けて分化していく。このように、下垂体細胞は Stem cell から各ホルモン産生細胞固有の転写因子の影響を受けながら、異なったホルモンを産生する 5 種類の内分泌細胞へと分化していくことが知られている<sup>4,5)</sup>。

近年、高分化した成体下垂体細胞と腺腫細胞にも stem cell が含まれていることが報告され、腺腫細胞に含まれる Stem cell の存在が注目されている<sup>6)</sup>。下垂体腺腫の良性腫瘍から分離した Stem cell を成長因子 (EGF と bFGF) によって補充された媒体により培養を行うと 10 日後に GFAP, BIII チューブリンと S-100 を表し、細胞分化することが報告されている<sup>3)</sup>。腺腫細胞に未分化な Stem cell が含まれていることや、細胞を分化させることができることから将来的に Stem cell を用いた遺伝子治療の可能性も示唆されている。

細胞が未分化な状態であることを確認する指標遺伝子として、Cell cycle の調節機能を持つ CyclinD1, CyclinD2, FGF2, MYC や、遺伝子制御や細胞分裂の遺伝子の NUMB, ヒト癌の要因の 1 つとなる NOTCH2 などが挙げられる<sup>7,8)</sup>。自己複製遺伝子としては、MYST1 や NEUROG2, 転写因子 SOX1, SOX2, 細胞周期や初期胚から成人性幹細胞まで細胞プロセスを調整する MYST1 がある<sup>9)</sup>。NEUROG2 は下垂体結節部発現遺伝子 Hes と結合し、活性化することにより幹細胞維持と神経形成を調整する<sup>10,11)</sup>。SOX は、Stem cell に関与する代表的なタンパク質である<sup>12-15)</sup>。その他にも、骨形態形成タンパク質 BMP2<sup>16)</sup>、ニューロンの化学遊走物質 CXCL12 などがある<sup>17)</sup>。遺伝子制御、細胞同士の情報伝達遺伝子 GJA1, GJB1<sup>18)</sup> 細胞器質接着遺伝子 CD44<sup>19)</sup>、CTNNA1, APC, CD4, CDH1, CDH2, stem cell 分化に関与する遺伝子の CTNNA1 などがある。胚細胞からの分化には ISL1, MYOD1 が関与しているとの報告がある<sup>20)</sup>。stem cell からニューロンへの分化を抑え、未分化な状態を保つための Notch Pathway 遺伝子 DTX1, DTX2, NOTCH2 も未分化細胞を分別するマーカー遺伝子である。

本研究では、いまだ報告されていない下垂体腺腫に含まれる stem cell 遺伝子の存在を明らかとして、stem cell 遺伝子の性状と含有割合を明らかとすることを研究目的とした。本研究を通して、下垂体腺

腫の将来的な遺伝子治療における臨床応用への可能性を提示する。

## 研究 方法

### 1. Laser Microdissection および RNA 抽出

1) 検体は Cresyl Violet Stain (Ambion) 染色を行い Laser microdissection (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG and Meiwafoysis, Osaka, Japan) を用いて 2000  $\mu\text{m}^2$  以上を取り出した。RNAqueous-Micro Kit (Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX) を用いて Total RNA 25 ng ~ 50 ng を抽出した<sup>21)</sup>。Total RNA は、Nano Drop<sup>®</sup> ND-1000 Spectrophotometer (L.M.S, Tokyo, Japan) を用いて定量を行った。

### 2) Realtime PCR

RT<sup>2</sup>Profiler PCR Array System (SABioscience Corporation), PAHS-405A (human stem cell) プレートを用いた。total RNA を SuperArray kit に付属されている GE (5×gDNA Elimination Buffer) を用いて 42℃ で 5 分, 4℃ で 1 分逆転写後, BC3 (5×RT Buffer 3), P2 (Primer and External Control Mix), RE3 (RT Enzyme Mix3) を用いて 42℃ で 15 分, 95℃ で 5 分インキュベートして cDNA を合成した。cDNA に 2×SuperArrey RT<sup>2</sup> qPCR Master Mix を添加し ABI PRISM<sup>®</sup>7000 Sequence System を用いて 95℃ 10 分, 95℃ 15 秒, 60℃ で 1 分, 50 Cycle で定量した。測定は、各下垂体腺腫ごと PAHS-405A プレートを用いて行った。各プレートでアレイデータを標準化するためにハウスキーピング遺伝子 5 つの平均 CT 値を算出した。各、遺伝子 CT 値からハウスキーピング遺伝子平均 CT 値を引いて  $\Delta\text{CT}$  値を算出した。対象となる遺伝子の発現レベルをハウスキーピング遺伝子に対して標準化するため、発現レベル (L) =  $2^{-\Delta\text{ct}}$  公式に当てはめて数値化した各下垂体腺腫ごと出された数値は、正常下垂体の値で補正を行い解析を行った。

### 2. 検体

下垂体腺腫組織は昭和大学医学部脳神経外科で経蝶形骨洞下垂体腫瘍摘出術によって摘出された検体を用いた。GH 3 症例, ACTH 3 症例, TSH1 症例, PRL 3 症例, null cell adenoma 2 症例, gonadotropin adenoma 2 症例を使用した。正常下垂体組織は、剖検で得られた神経膠芽腫の患者で下垂体転移のな

い組織 1 症例を使用した。テクニカルミスを防ぐために実験は各症例について 3 回ずつ同じ手法で試行し、平均値を算出した。使用した検体については昭和大学ヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査委員会において承認を得た。(申請番号第 60 号) 全ての検体は OCT compound (Sakura, Torrance, CA, USA) に入れ、液体窒素を用いて冷却したイソペンタン内で凍結させ、 $-80^{\circ}\text{C}$  冷凍庫に保存した。切片は Laser Microdissection 用に厚さ  $10\text{ }\mu\text{m}$  の連続凍結切片を作成した。

## 結 果

GH 産生腺腫, PRL 産生腺腫, ACTH 産生腺腫, TSH 産生腺腫, null cell adenoma, gonadotropin adenoma の各腺腫 RNA から測定した値を正常下垂体細胞 RNA 値で補正を行った (Table1)。細胞周期に関する遺伝子 CCND1 (CyclinD1) は, PRL 産生腺腫で 0.4966223, ACTH 産生腺腫で 0.218959, GH 産生腺腫で 0.032016, null cell adenoma で 0.117909, gonadotropin adenoma で 0.173132。血管新生を促す働きを持つ線維芽細胞増殖因子 FGF2 は GH 産生腺腫で  $1.02\text{E-}03$ , ACTH 産生腺腫で  $3.256\text{E-}03$ , TSH 産生腺腫で  $8.03\text{E-}03$ , null cell adenoma で  $2.93\text{E-}04$ , gonadotropin adenoma  $2.256\text{E-}03$  であった。腺腫形成の原因遺伝子 MYC は GH 産生腺腫で  $4.2\text{E-}04$ , PRL 産生腺腫  $6.94\text{E-}04$ , TSH 産生腺腫で  $2.735\text{E-}03$ , null cell adenoma で  $3.57\text{E-}04$ 。染色体に関与し、初期胚から成人性幹細胞まで細胞プロセスを調整する遺伝子 MYST1 は GH 産生腺腫  $7.4813\text{E-}02$ , PRL 産生腺腫  $0.126136$ , TSH 産生腺腫  $3.3829\text{E-}03$ , null cell adenoma  $1.7633\text{E-}02$ , gonadotropin adenoma  $0.103983$  とホルモンを産生しない非機能性下垂体腺腫で低値であった。不均等な細胞分裂を行う原因遺伝子の中に、NOTCH1 と結合する膜結合タンパク質 NUMB がある。GH 産生腺腫  $0.80632$ , PRL 産生腺腫  $0.236364$ , TSH 産生腺腫  $0.146039$ , null cell adenoma  $0.29668$  を示した。Notch Pathway の DTX1 は, ACTH 産生腺腫で  $375.6592$  と高値を示し, TSH 産生腺腫で  $0.115755$ , null cell adenoma で  $0.585719$ , gonadotropin adenoma で  $23.72409$ , DTX2 は, GH 産生腺腫  $1.21\text{E-}03$ , TSH 産生腺腫で  $1.887\text{E-}03$ , null cell adenoma で  $9.08\text{E-}05$ , gonadotropin adenoma で  $1.55\text{E-}04$  を示した。NOTCH1 は PRL 産生腺腫  $1$ ,

TSH 産生腺腫  $0.357428$ , null cell adenoma  $0.194688$ , NOTCH2 は GH 産生腺腫  $3.81\text{E-}04$ , TSH 産生腺腫  $1.031\text{E-}03$ , null cell adenoma  $3.57\text{E-}04$ , gonadotropin adenoma  $6.0\text{E-}04$  であった。幹細胞維持と神経形成に関わる NEUROG2 遺伝子は GH 産生腺腫  $2.37\text{E-}06$ , TSH 産生腺腫で  $4.54\text{E-}04$ , null cell adenoma で  $6.37\text{E-}07$ , gonadotropin adenoma  $6.73\text{E-}07$  で、機能性下垂体腺腫よりも、ホルモンを産生しない非機能性下垂体腺腫で低値であった。下垂体特有の転写因子 Prop1, pit1 の補助因子で Stem cell の自己複製にも関与する SOX2 は、非機能性下垂体腺腫で検出されず、GH 産生腺腫で  $2.376\text{E-}03$ , PRL 産生腺腫で  $1.462\text{E-}03$ , ACTH 産生腺腫で  $1.8555\text{E-}02$ , TSH 産生腺腫で  $1.3461\text{E-}02$  であった。骨形態形成タンパク質 BMP2 は, PRL 産生腺腫で  $14.9676$ , TSH 産生腺腫で  $9.3393\text{E-}02$ , 非機能性下垂体腺腫では検出されなかった。GABA 作動性介在ニューロンの化学物質 CXCL12 は, ACTH 産生腺腫で  $14.9676$ , PRL 産生腺腫で  $0.143885$ , TSH 産生腺腫で  $9.3393\text{E-}02$ , null cell adenoma で  $1.30411$ , gonadotropin adenoma で  $5.0723\text{E-}02$  であった。骨形成タンパク質 BMP- 9 の形質転換成長因子 GDF2 は, GH 産生腺腫で  $1.19\text{E-}04$ , TSH 産生腺腫で  $5.09\text{E-}04$ , null cell adenoma で  $1.1\text{E-}05$ , gonadotropin adenoma で  $5.2\text{E-}06$  を示した。胚細胞からの分化に関する遺伝子 ISL1 は、機能性下垂体腺腫で検出されず、非機能性下垂体腺腫 null cell adenoma で  $5.8096\text{E-}02$ , gonadotropin adenoma で  $0.350681$ 。下垂体発生における特有の転写因子 Pitx2 遺伝子を発現させる調節因子 MYOD1 は, GH 産生腺腫で  $4.137\text{E-}03$ , TSH 産生腺腫で  $5.12\text{E-}04$ , null cell adenoma で  $8.07\text{E-}05$ , gonadotropin adenoma で  $1.03\text{E-}04$  であった。

## 考 察

Stem cell の自己複製に関与する遺伝子 SOX2 は、転写因子 Prop1 と pit1 の補助因子 (コンピテンス因子) であり、神経前駆細胞が分化増殖するのに必要な因子である。転写因子 Prop1, pit1 は、下垂体原基細胞が下垂体前葉細胞へと細胞分化していくために必要な転写因子である<sup>3,4)</sup> (Fig. 1)。Sox2 単独では転写因子として働かず、前駆細胞が細胞分化誘導するのに必要な因子となる。Prop1 と pit1 の存

下垂体腺腫の Stem cell 遺伝子検索

Table 1 Stem cell specific markers

	GH	PRL	ACTH	TSH	null cell	gonado
cell cycle regulators						
CCNA2(CyclinD1)	0	0.9591837	0	3.903863	0.7716799	0
CCND1(CyclinD2)	0.032016	0.496623	0.2189592	0.00293	0.1179083	0.173132
FGF1	0.000312	0	0	1.27E-05	0	0
FGF2	0.00102	0	0.0032558	0.000803	0.0002927	0.002256
FGF3	0	0	0	0.027453	0	0
FGF4	8.19E-06	0	0	5.49E-05	3.857E-05	0
MYC	0.00042	0.0006942	0	0.002735	0.0002093	0
chromosome and chromation modulatores						
MYST1	0.074813	0.1261364	0	0.033829	0.017633	0.103983
MYST2	0.007056	0.0083282	0.0352342	0.067364	0.0074827	0.017801
NUMB	0.80632	0.2363636	0	0.146039	0.2966798	0
self-renewal markers						
NEUROG2	2.37E-05	0	0	0.000454	6.374E-06	6.73E-06
SOX1	6.74E-05	5.594E-06	3.182E-06	0.000515	2.844E-05	1.67E-05
SOX2	0.002376	0.001462	0.0185547	0.013461	0	0
cytokines and growth factors						
BMP1	0	0.0003352	0.0006076	5.85E-05	0	0
BMP2	0	14.300805	0	0.171618	0	0
BMP3	0	0	0	29.66771	0	0
CXCL12	0	0.1438849	14.967603	0.093393	1.30411	0.050723
GDF2	0.000119	0	0	0.000509	1.103E-05	5.2E-06
GDF3	0	0	6.245E-05	0.002916	0	0
IGF1	2.450139	0.3207547	0	3.951656	0	0
cell adhesion molecules						
APC	0.003941	0.0117967	0.0167227	0.010233	0.0047035	0.005041
CD4	5.59E-05	5.577E-05	1.034E-05	0.002896	3.295E-05	0
CD44	0	0.0005169	0.003162	0.005385	0.0003058	0
CDH1	0	0.0006568	0.0022326	5.75E-06	0.0005756	0.000199
CDH2	3.66E-05	0.0001476	0.0054799	0.003794	0.0002072	0
CTNNA1	0.000543	0.0005347	0.0014487	0.000975	0.0002303	0.001296
metabolic markers						
ALDH1A1	24.7745	180.73612	138.69558	316.6106	103.75995	139.6609
embryonic cell lineage markers						
ISL1	0	0	0	0	0.058096	0.350681
MYOD1	0.004137	0	0	0.000512	8.069E-05	0.000103
mesenchymal cell lineage markers						
ALPI	7.12E-05	0	0	0.000351	4.391E-06	2.58E-06
Notch Pathway						
DTX1	0	0	375.65924	0.115755	0.5857191	23.72409
DTX2	0.000121	0	0	0.001887	9.082E-05	0.000155
NOTCH1	0	1	0	0.357428	0.1946885	0
NOTCH2	0.000381	0	0	0.001031	0.000357	0.0006



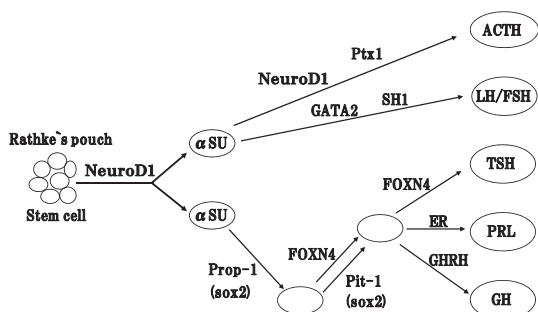


Fig. 1 下垂体細胞の分化系譜

在下で Sox2 の影響を受ける細胞だけが、ホルモンを産生する下垂体細胞へと分化する。SOX は、Stem cell に関与する代表的なタンパク質としても知られている。初期胚の Sox を機能阻害すると前脳（大脳、間脳）は発生しないことから、Sox は前脳の発生に必要な必須因子であることが証明されている<sup>13)</sup>。また、Sox2 を機能阻害した初期胚では、中枢神経、末梢神経など神経全体の発生が抑制され、神経の発生および、下垂体の発生時に必須のタンパク質であることも報告されている<sup>14-16)</sup>。下垂体腺腫細胞の RNA 値を正常下垂体細胞 RNA 値で補正した結果では、Sox2 はホルモン非分泌性腺腫の null cell adenoma, gonadotropin adenoma では検出されなかった。これは、ホルモンを分泌しない非機能性腺腫は Sox2 が存在しないことを示す。Sox2 が存在しない細胞は転写因子 Prop1 や pit1 が存在しても結合できず、ホルモン産生能を有する細胞へは分化しない。したがって非機能性腺腫は Sox2 の影響を受けずにホルモンを分泌しない細胞となることが明らかとなった。ホルモンを過剰分泌する機能性下垂体腺腫では正常組織と比較し、相対的に低い値を示した。しかし、機能性下垂体腺腫では Sox2 が存在し、転写因子 Prop1 や pit1, FOXN4, GHRH, ER に Sox2 が結合してホルモンを過剰産生する細胞に分化していくことが明らかとなった。

自己複製に関与する遺伝子 NEUROG2 では、ホルモン分泌性腺腫よりも非分泌性腺腫のほうが低い値を示した。NEUROG2 は下垂体結節部発現のために必要な遺伝子 Hes と結合し、原種細胞分化を制御している。下垂体の結節部（The hypophyseal pars tuberalis）は、ラトケ囊の原基細胞から分化生成しており、下垂体ホルモン分泌を媒介する役割

を担っている<sup>12)</sup>。下垂体ホルモンを分泌しない非分泌性腺腫 null cell adenoma, gonadotropin adenoma では、ホルモンを分泌する必要がないため、また、この NEUROG2 が低いためにホルモン分泌機能が働かず低い値を示したと考えられる。MYST1 は初期胚から成人性幹細胞まで細胞プロセスを調整する遺伝子である<sup>10)</sup>。PRL 産生腺腫で他の腺腫細胞よりも値が高い理由として、PRL 産生腺腫は分化が進んだ細胞を有し、stem cell から細胞分化までのプロセスが活発に働いていることが考えられる。GABA、グルタミン酸、アミノ酸は、脳の伝達物質が作用するための基本的な機構を形成している。神経伝達を抑制する GABA の化学遊走物質のひとつに CXCL12 がある。CXCL12 は、発育過程の大脳皮質と海馬で、移動性の GABA 作動性介在ニューロンの化学遊走物質として作用し、細胞の分化状態を測るための指標となる遺伝子である<sup>18)</sup>。また、他にも骨の再生を促進し、骨形成効果を奏する骨形態形成タンパク質 BMP2<sup>17)</sup> が未分化な細胞の標識遺伝子となる。このサイトカインや成長因子のなかで、ホルモンを過剰分泌する機能性下垂体腺腫の比率値が非機能性腺腫に比べて高く検出された。BMP2 でも、PRL 産生腺腫の値が高値を示した。CXCL12 では ACTH 産生腺腫の値が高値を示し、ニューロンの化学遊走物質が活発に働いていることが示された。GDF2 は、非機能性下垂体腺腫 null cell adenoma, gonadotropin adenoma で低値を示した。機能性下垂体腺腫 GH 産生腺腫、TSH 産生腺腫に、明らかな差は検出されなかった。GDF2 は、TGFβ の受容体であり骨形成タンパク質（BMP-9）の形質転換成長因子である。それは、神経伝達物質アセチルコリンと反応する胚前脳基底核コリン作動性ニューロン（BFCN）を誘導する役割を持っている。以上のことから、ホルモンを分泌しない非機能性下垂体腺腫でも機能性下垂体腺腫と同じように骨形成タンパク質やニューロン発達に関する遺伝子を低量保有していることが明らかとなった。また、サイトカインや成長因子は、非機能性腺腫よりも機能性下垂体腺腫のほうが高い値を示したことから腺腫細胞への分化を活発に促進していることが示唆された。胚細胞からの分化に関する ISL1 遺伝子は、下垂体発現の初期の調節装置であり、ラトケ囊原基細胞の初期だけに発現する遺伝子である。今回、機能

性下垂体腺腫 (GH 産生腺腫, PRL 産生腺腫, ACTH 産生腺腫, TSH 産生腺腫) では ISL1 は検出されなかったが, 非機能性下垂体腺腫の null cell adenoma, gonadotropin adenoma では検出された。ラトケ囊原基細胞に発現する ISL1 遺伝子が非機能性下垂体腺腫だけに発現していたことから, 非機能性下垂体腺腫は, 機能性下垂体腺腫よりも未分化な細胞を有していることが明らかとなった。非機能性下垂体腺腫細胞がホルモンを分泌する機能性下垂体腺腫よりも未分化な細胞を有することが示唆された。骨格の筋形成および筋原細胞の形態を決定付ける因子 MYOD1 遺伝子は, 下垂体特有の転写因子 Pitx2 遺伝子を発現させる調節因子としても働いている<sup>22)</sup>。Pitx2 遺伝子は, 下垂体および頭蓋顔面の発現に不可欠な転写因子であり, 胚性筋形成, 外眼性躯幹や骨格の筋肉型と肢の筋肉形成にも関与している<sup>23)</sup>。今回の結果では, GH 産生腺腫, TSH 産生腺腫, null cell adenoma, gonadotropin adenoma が検出された。いずれも低値であったが, 機能性下垂体腺腫, 非機能性下垂体腺腫ともに MYOD1 遺伝子を通して Pitx2 遺伝子を発現させていることが明らかとなった。Deltex1 (DTX1) は, Notch Pathway に関する遺伝子であり, 核内の転写制御因子 MASH1 によって転写活性化を抑え, 神経前駆細胞の分化を抑制することが報告されている<sup>24)</sup>。ACTH 産生腺腫, gonadotropin adenoma で高値を示し, 細胞が未分化な状態で存在していることが示唆された。腺腫細胞に含まれる Stem cell は, 自己複製能力や自己増殖能力の特徴を有しているため, この特徴を生かした臨床応用への取り組みが期待されている。現在, Stem cell の自己増殖能力を用いて, 非機能性下垂体腺腫に特定のホルモン産生細胞へ分化誘導させた Stem cell を埋め込む方法や, 下垂体腺腫の成長を制御して腺腫を退縮へ導く新しい下垂体腺腫遺伝子治療の臨床応用の可能性が模索されている<sup>7)</sup>。

本研究では, 各ホルモン産生下垂体腺腫細胞に含まれる下垂体 Stem cell の存在を解析し明らかとした。また, 今後の遺伝子治療の方法として, 下垂体腺腫に含まれる Stem cell を各腺腫治療に効果的な細胞へと分化または退縮させる遺伝子治療の可能性を示唆した。具体的には, 分化を制御する転写因子を活性化させたり阻害したりすることで, より有用

な遺伝子治療への可能性が考えられる。今後, 下垂体腺腫における stem cell 遺伝子治療を実現させるために, さらなる基礎研究が期待される。

## 文 献

- 1) Rizzoti K: Adult pituitary progenitors/stem cells: from in vitro characterization to in vivo function. *Eur J Neurosci* 32 : 2053-2062, 2010.
- 2) Johnson MD, Fan X, Bourne P, *et al*: Neuronal differentiation and expression of neural epitopes in pituitary adenomas. *J Histochem Cytochem* 12 : 1265-1271, 2007.
- 3) Tunici P and Yu JS: Pituitary adenoma stem cells. *Methods Mol Biol* 568 : 195-201, 2009.
- 4) Wagner J, Lepore D and Thomas P: Differentiation of mouse embryonic stem cells into growth hormone and prolactin expressing cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 273 : 68-74, 2007.
- 5) Egashira N, Minematsu T, Miyai S, *et al*: Pituitary changes in Prop1 transgenic mice: hormone producing tumors and signet-ring type gonadotropes. *Acta Histochem Cytochem* 41 : 47-57, 2008.
- 6) Xu Q, Yuan X, Tunici P, *et al*: Isolation of tumour stem-like cells from benign tumours. *Br J Cancer* 101 : 303-311, 2009.
- 7) Gao Z, Chi FL, Huang YB, *et al*: Expression of Numb and Numb-like in the development of mammalian auditory sensory epithelium. *Neuroreport* 22 : 49-54, 2011.
- 8) Rebeiz M, Miller SW and Posakony JW: Notch regulates numb: integration of conditional and autonomous cell fate specification. *Development* 138 : 215-225, 2010.
- 9) Brabletz S, Bajdak K, Meidhof S, *et al*: The ZEB1/miR-200 feedback loop controls Notch signalling in cancer cells. *EMBO J* 30 : 770-782, 2011.
- 10) Ichi S, Boshnjaku V, Shen YW, *et al*: Role of Pax3 acetylation in the regulation of Hes1 and Neurog2. *Mol Biol Cell* 22 : 503-512, 2010.
- 11) Akimoto M, Nishimaki T, Arai Y, *et al*: Hes1 regulates formations of the hypophyseal pars tuberalis and the hypothalamus. *Cell Tissue Res* 340 : 509-521, 2010.
- 12) Vankelecom H and Gremeaux L: Stem cells in the pituitary gland: a burgeoning field. *Gen Comp Endocrinol* 166 : 478-488, 2009.
- 13) Tziaferi V, Kelberman D and Dattani MT: The role of SOX2 in hypogonadotropic hypogonadism. *Sex Dev* 2 : 194-199, 2008.
- 14) Gautron L, De-Smedt V and Layé S: Age-related changes in nestin immunoreactivity in the rat pituitary gland. *Neuroendocrinology* 90 :

- 19-30, 2009.
- 15) Bhatia B, Singhal S, Tadman DN, *et al*: SOX2 is required for adult human muller stem cell survival and maintenance of progenicity in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52** : 136-145, 2011.
- 16) Kim MJ, Park JS, Kim S, *et al*: Encapsulation of BMP2 with Cbfa1-overexpressing osteogenic cells derived from human embryonic stem cells in hydrogel accelerates bone tissue regeneration. *Stem Cells Dev* 2011 Jan 27, DOI:10.189/scd.2010.0311.
- 17) Hartman NW, Carpentino JE, LaMonica K, *et al*: CXCL12-mediated guidance of migrating embryonic stem cell-derived neural progenitors transplanted into the hippocampus. *PLoS One* **5**(12) : c15856, 2010.
- 18) Kerr NM, Johnson CS, Green CR, *et al*: Gap junction protein connexin43 (GJA1) in the human glaucomatous optic nerve head and retina. *J Clin Neurosci* **18** : 102-108, 2011.
- 19) Zhang Y, Hosaka N, Cui Y, *et al*: Effects of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation plus thymus transplantation on malignant tumors: comparison between fetal, newborn, and adult mice. *Stem Cells Dev* **20** : 599-607, 2010.
- 20) Proszkowiec-Weglarz M, Higgins SE and Porter TE: Changes in gene expression during pituitary morphogenesis and organogenesis in the chick embryo. *Endocrinology* **152** : 989-1000, 2011.
- 21) L'honoré A, Ouimette JF, Lavertu-Jolin M, *et al*: Pitx2 defines alternate pathways acting through MyoD during limb and somitic myogenesis. *Development* **137** : 3847-3856, 2010.
- 22) Murakami K, Abe T, Sasaki A, *et al*: Gene expression analysis of non-functioning pituitary adenoma. *Showa Univ J Med Sci* **20** : 149-160, 2008.
- 23) L'Honore A, Ouimette JF, Lavertu-Jolin M, *et al*: Pitx2 defines alternate pathways acting through MyoD during limb and somitic myogenesis. *Development* **137** : 3847-3856, 2010.
- 24) Yamamoto N, Yamamoto S, Inagaki F, *et al*: Role of Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor. *J Biol Chem* **276** : 45031-45040, 2001.

## GENETIC ANALYSIS OF STEM CELL-SPECIFIC MARKERS IN PITUITARY ADENOMAS

Atsuuji KUWAJIMA, Takumi ABE, Daisuke TANIOKA  
and Akiko SASAKI

Neurosurgery, Showa University School of Medicine

Tsuyoshi YAMAMOTO and Tetsuhiko TACHIKAWA

Oral Pathology, Showa University Faculty of Dentistry

**Abstract** — Stem cells have the ability to self-renew and to differentiate into hormone-producing cells, and have been reported to possibly be involved in the formation of pituitary adenomas. In the present study, we analyzed the properties of stem cells in pituitary adenomas by analyzing the expression of stem cell-specific markers in pituitary adenomas. Frozen sections were prepared from surgically resected pituitary adenomas, and adenoma cells were then isolated using laser microdissection. Following total RNA extraction, cDNA was synthesized using the RT2 Profiler PCR Array System and PCR was performed using the ABI PRISM®7000 Sequence System. Specific markers were detected with the PAHS-405A array plate and analyzed using the  $\Delta$ CT method following correction in reference to RNA data for normal pituitary tissue. Cyclin D1, which is involved in the cell cycle, was detected in all pituitary adenomas. The NEUROG2 gene, which is involved in neurogenesis, was more highly expressed in functional pituitary adenomas than in non-functioning pituitary adenomas. SOX2, a transcription factor and cofactor specific to the pituitary gland, was detected in functional pituitary adenomas but not non-functioning pituitary adenomas. ISL1, a gene involved in differentiation from embryonic cells, was detected in non-functioning pituitary adenomas but not in functional pituitary adenomas. More undifferentiated cells were present in non-functioning pituitary adenomas compared to functional pituitary adenomas, suggesting that more stem cells are present in the former, which does not involve hormone secretion.

**Key words:** pituitary adenoma, Stem cell, genetic analysis

〔受付：2月4日，受理：2月17日，2011〕