

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：72696

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09895

研究課題名(和文) Cushing病におけるUSP8変異体標的蛋白を介したシグナル伝達異常の解明

研究課題名(英文) Elucidation of signal transduction mediated by target protein(s) of USP8 mutation in Cushing's disease

研究代表者

竹下 章 (TAKESHITA, AKIRA)

(財) 冲中記念成人病研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：20322646

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：厚労省の難病に指定されるクッシング病はACTHの概日リズムの消失によるACTH過剰分泌を特徴とする下垂体腺腫が原因である。約半数の腫瘍で脱ユビキチン化酵素USP8の体細胞性変異が認められるが、変異体が疾患を生じる機序はいまだ不明である。我々はDNAマイクロアレイという手法を用いて検討し、USP8変異陽性の腫瘍では時計遺伝子が過剰発現しており、特定の分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)経路の遺伝子発現およびACTHの前駆体であるPOMC発現と相関することを見出した。クッシング病におけるACTHの概日リズムの消失に時計遺伝子の活性化との関連性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クッシング病はACTHの概日リズムの消失によるACTHの過剰分泌を特徴とするが、USP8変異による時計遺伝子群の活性化と特定の分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)経路の活性化との関連性が示唆された。USP8変異を介した特定の遺伝子の活性化が明らかになると、それらを標的とする薬物治療にも繋がる可能性が高い。さらには時計遺伝子の発現を調節し、USP8の基質となる蛋白が明らかとなると、Cushing病の新たな発症機構の解明にも役立つ。

研究成果の概要(英文)：Cushing's disease (CD) is designated as an intractable disease by the Ministry of Health, Labor and Welfare. CD is caused by a pituitary adenoma characterized by excessive secretion of ACTH due to loss of circadian rhythm of ACTH. Somatic mutations in the deubiquitinase USP8 are found in about half of the tumors, but the mechanism by which the mutations cause the disease remains unclear. We investigated using a method called DNA microarray and found that USP8 mutation-positive tumors overexpress the group of clock genes and correlate with the expressions of specific mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway and ACTH precursor, POMC. We conclude that the loss of ACTH circadian rhythm in CD may be related to the activation of the clock genes.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：クッシング病 Cushing病 USP8

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Cushing 病は ACTH 産生下垂体腺腫が原因である。ほとんどが良性の腫瘍であるが、高コルチゾール血症による中心性肥満、高血圧、糖尿病、筋萎縮、骨粗鬆症、鬱病、易感染性や虚血性心疾患、心不全、脳血管障害を合併しやすく、無治療な場合の QOL は低く予後も不良である。

Cushing 病の ACTH 産生下垂体腺腫の約 3 分の 1 に脱コピキチン化酵素 USP8 の体細胞変異が報告された (Reincke M *et al.* Nat Genet 47:31, 2015, Ma Z-Y *et al.* Cell Res 25:306, 2015)。変異体が EGFR の脱コピキチン化を促進し、EGF シグナルを介して POMC 発現を誘導することが *in vitro* の解析で想定されたが、ACTH 産生腺腫 60 例を用いた我々の *in vivo* の解析では変異と腫瘍の EGFR 発現に関連性は認められず、ACTH 産生腺腫における USP8 の標的蛋白は未だ明らかでない (Hayashi K, Takeshita A, *et al.* Eur J Endocrinol. 174:213, 2016)。

2. 研究の目的

USP8 変異の有無で変化する遺伝子を DNA マイクロアレイを行って検討し、USP8 の標的蛋白を同定して Cushing 病におけるシグナル伝達ネットワーク機構異常のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

インフォームドコンセントを得、当院で 2004 年 3 月～2013 年 8 月に手術した Cushing 病患者の腫瘍組織から RNA 抽出が可能であった 60 例を対象とした。内訳は女性 47 例と男性 13 例、また腫瘍の大きさが 1cm 未満のミクロ腺腫は 28 例、1cm 以上のマクロ腺腫は 32 例であった³⁾。上記 60 例の RNA を用いて SYBR-Green 法による定量リアルタイム PCR (qPCR) により PIT1 遺伝子発現を検討し、PIT1 遺伝子発現が無視できる程度で正常下垂体の混在がないと判断した 50 例 (変異陽性の MUT16 例、野生型の WT34 例) を用いて以下の検討を行った。

マイクロアレイ解析はクッシング病下垂体腫瘍組織のうち 6 例 (MUT の典型例 3 例と WT で周囲組織への浸潤性の強い大きな腫瘍の 3 例) から total RNA を抽出し、Affymetrix 社の GeneChip® WT PLUS Kit で処理後 Affymetrix GeneChip® Human Gene 2.0 ST Array を用いて遺伝子発現プロファイルを比較した。

マイクロアレイ解析をもとに WT と MUT で発現が有意に異なる遺伝子に関しては正常下垂体の混在を否定した 50 例 (MUT16 例、WT34 例) の腫瘍 RNA を用いて qPCR により mRNA 発現を評価した。qPCR は GAPDH を内部標準とし、mRNA の発現量を補正した。正常下垂体 5 例の各遺伝子発現量の平均を 1 として表示した。

4. 研究成果

使用したマイクロアレイは 53,981 個のプローブを有し、24,670 個の既知遺伝子の発現解析を行った。その結果、MUT での発現量が WT に比べ有意に平均 2 倍以上 ($p < 0.05$) を呈した既知遺伝子は 1,128 個 (4.6%)、逆に 1/2 以下 ($p < 0.05$) の発現を呈した遺伝子数は 288 個 (1.2%) であった。有意差のある遺伝子が多いため、パスウェイ解析を参考にして検討したところ USP8 変異陽性例で時計遺伝子と特定の MAP キナーゼパスウェイに高発現する遺伝子群が認められた。

このため 50 例の患者腫瘍 RNA を用いて qPCR により多数例で検討したところ、時計遺伝子として BMAL1、NPAS2、PER2 が変異体で有意に高発現していた。変異体の MAPK パスウェイに高発現する遺伝子として、上流から PRKACA (protein kinase cAMP-activated catalytic subunit)、MAP3K5、MAPK13、MAPK14 が認められた。

これら時計遺伝子や MAPK 遺伝子の発現と POMC 遺伝子発現との関連性を検討するため、発現量の相関を検討した。BMAL1 遺伝子と PRKACA の発現量には $R=0.772$ と高い相関が認められ、下流の PRKACA と MAP3K5、MAP3K5 と MAPK13 や MAPK14 にも $R=0.5$ 前後の中等度の相関が得られた。さらに MAPK13 と POMC 発現に中等度の相関 ($R=0.578$) が認められ、BMAL1 と POMC 発現にも弱い相関 ($R=0.353$) が認められたことから、POMC 発現には時計遺伝子～MAPK パスウェイ (PRKACA～MAPK13) を介した経路がある可能性が示唆された。

そのほか USP8 変異は一般に小さな腫瘍に認められる変異であるが、腫瘍サイズと関連する cell cycle 関連遺伝子が同定された。

-考察-

Cushing 病は ACTH 概日リズムの消失による過剰分泌を特徴とするが、本研究では USP8 変異と関連し時計遺伝子の過剰発現を介した MAPK の活性化が想定された。ラット GH 産生下垂体細胞株 GH4C1 を用いた報告では時計遺伝子や GH、PRL 遺伝子遺伝子発現には概日リズムが確認されており、正常 ACTH 産生下垂体細胞においても時計遺伝子が POMC 発現を介して ACTH 産生を調節している可能性が考えられる。今回の検討では BMAL1 遺伝子と POMC 発現に相関が認められ、その介在経路として PRKACA～MAP3K5～MAPK13 (MAPK14) が考えられた。MAPK13 や MAPK14 は、p38 分裂促進因子 MAPK に属し、浸透圧ショック、熱ショック、炎症性サイトカイン、リポ多糖 (LPS)、紫外線、成長因子を含む様々な細胞ストレスによって活性化され、細胞の分化、アポトーシス、オートファジーに関与している。Cushing 病は CRH の刺激なしに持続的に POMC が発現することから、どのような細胞ストレスが上記経路に関与するのか興味深い。

今回の研究により、Cushing 病における持続的な ACTH 過剰分泌は、時計遺伝子の概日リズムの消失が原因であることを裏付けるものである。一方、Cushing 病の亜型として ACTH が数

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

日から数年の単位で高値～正常あるいは低値と変動し、高コルチゾール血症に基づく臨床症状が増悪と寛解を繰り返す「周期性 Cushing 病」が知られている。その病態は不明であるが、腫瘍内の時計遺伝子発現が変動すると POMC 遺伝子も対応して変動する可能性があり、周期性 Cushing 病の病態として説明できるかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukuhara Noriaki, Inoshita Naoko, Yamaguchi-Okada Mitsuo, Tatsushima Keita, Takeshita Akira, Ito Junko, Takeuchi Yasuhiro, Yamada Shozo, Nishioka Hiroshi	4. 巻 66
2. 論文標題 Outcomes of three-Tesla magnetic resonance imaging for the identification of pituitary adenoma in patients with Cushing's disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 259 ~ 264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/encocrj.EJ18-0458	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Murase Toshio, Takeshita Akira, Arimoto Sadao	4. 巻 12
2. 論文標題 Biphasic dyslipidemia in a patient with painless thyroiditis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Lipidology	6. 最初と最後の頁 1367 ~ 1370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacl.2018.09.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aida Kaoru, Kobayashi Tetsuro, Takeshita Akira, Jimbo Erika, Nishida Yoriko, Yagihashi Soroku, Hosoi Mitsuko, Fukui Tomoyasu, Sugawara Akira, Takasawa Shin	4. 巻 503
2. 論文標題 Crucial role of Reg I from acinar-like cell cluster touching with islets (ATLANTIS) on mitogenesis of beta cells in EMC virus-induced diabetic mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 963 ~ 969
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.06.103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamada Shozo, Fukuhara Noriaki, Yamaguchi-Okada Mitsuo, Nishioka Hiroshi, Takeshita Akira, Takeuchi Yasuhiro, Inoshita Naoko, Ito Junko	4. 巻 21
2. 論文標題 Therapeutic outcomes of transsphenoidal surgery in pediatric patients with craniopharyngiomas: a single-center study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery: Pediatrics	6. 最初と最後の頁 549 ~ 562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2017.10.PEDS17254	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Shozo, Fukuhara Noriaki, Yamaguchi-Okada Mitsuo, Nishioka Hiroshi, Takeshita Akira, Takeuchi Yasuhiro, Inoshita Naoko, Ito Junko	4. 巻 -
2. 論文標題 Therapeutic outcomes of transsphenoidal surgery in pediatric patients with craniopharyngiomas: a single-center study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery: Pediatrics	6. 最初と最後の頁 1~14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2017.10.PEDS17254	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 竹下 章、荻久保明香、辰島啓太、福原紀章、岡田満夫、西岡宏、山田正三、竹内靖博
2. 発表標題 DNAマクロアレイによるCushing病における脱ユビキチン化酵素USP8変異依存性に变化する遺伝子の解析
3. 学会等名 第92回 日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年~2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	竹内 靖博 (TAKEUCHI YASUHIRO) (50202164)	(財) 冲中記念成人病研究所・その他部局等・研究員 (72696)	
研究分担者	山田 正三 (YAMADA SHOZO) (80260131)	(財) 冲中記念成人病研究所・その他部局等・研究員 (72696)	