

令和 6 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：2020～2023

課題番号：20K08899

研究課題名(和文) Cushing病におけるUSP8変異体標的蛋白の同定と発症機序の解明

研究課題名(英文) Identification and characterization of USP8 mutant target proteins 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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ACTH産生下垂体腫瘍のクッシング病では、脱ユビキチン化酵素USP8の体細胞変異が高率に認められる。しかしながらその分子機構は不明である。野生型WTと変異体MUTで遺伝子発現プロファイルと比較したところMUTはPRKACA、MAP3K5、MAPK13/14のMAPK系パスウェイやNPAS2、PER2、BMAL1等の時計遺伝発現の活性化が認められBMAL1とPRKACAの発現量には $R=0.77$ と高い相関が認められた。一方、プロテオミクス解析ではsynaptotagminなどACTHのエクソサイトーシスに関わる蛋白がmRNA発現とは独立して高発現していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Cushing病はACTH・コルチゾールの概日リズム消失を伴う過剰分泌を特徴とするが、USP8変異体では時計遺伝子の過剰発現が生じ、特定のMAPK系を活性化してPOMC発現を誘導する可能性があること、またACTHの開口分泌機構を調節する蛋白の高発現がACTHの過剰分泌に関与している可能性が考えられた。このことは臨床的にも変異体は野生型に比べPOMC発現が高いことと合致している。しかしながらUSP8変異体の標的蛋白は未だ不明であり今後の解明が望まれる。

研究成果の概要(英文)：Somatic mutations in the deubiquitinating enzyme USP8 are highly prevalent in the ACTH-producing pituitary tumour Cushing's disease. However, the molecular mechanism is unknown. Comparison of gene expression profiles between wild-type WT and mutant MUT showed that MUT is activated in the MAPK pathway of PRKACA, MAP3K5 and MAPK13/14, and in the expression of clock genes such as NPAS2, PER2 and BMAL1, and that the expression levels of BMAL1 and PRKACA are highly correlated ( $R = 0.77$ ). A high correlation was observed between the expression levels of BMAL1 and PRKACA with  $R=0.77$ . On the other hand, proteomic analysis revealed high expression of proteins involved in ACTH exocytosis such as synaptotagmin independently of mRNA expression.

研究分野：神経内分泌

キーワード：クッシング病 USP8

### 1. 研究開始当初の背景

2015年、Cushing病のACTH産生下垂体腺腫に脱コピキチン化酵素 USP8 の体細胞変異が約3分の1の症例で認められることが報告された(1, 2)。in vitro の解析で変異体が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発症機序として当初想定されたが、実際のACTH産生腺腫における変異の意義は不明であった。

我々はACTH産生腺腫60例のUSP8遺伝子解析と変異体の機能解析、臨床像の評価、qRT-PCRや免疫染色によるPOMC、USP8、EGFR、5型ソマトスタチン受容体(SSTR5)、O<sup>6</sup>-メチルグアニンDNAメチルトランスフェラーゼ(MGMT)等の発現を検討し、変異と臨床的特徴や分子病理学所見との関連を明らかにした。即ちUSP8変異は、女性のミクロアデノーマに多くPOMC発現が高いことから、典型的なCushing病の臨床的特徴を反映している。USP8変異例はSSTR5発現陽性例が多く、新規ソマトスタチンアナログのパシレオチドの効果が期待できる。一方海綿静脈洞浸潤を伴う大きな腫瘍はUSP8変異の頻度、発現量ともに低く、SSTR5とMGMTの発現が低い症例が多いことからパシレオチドよりもアルキル化剤テモゾロミドの効果が期待されることを以前報告した(3)。

USP8変異は受容体など標的蛋白の脱コピキチンを促進し受容体の分解を抑制する活性型変異である。HeLa細胞やマウス下垂体ACTH産生細胞株AtT-20にEGFRや変異USP8を強制発現させたin vitroの検討では変異USP8によりEGFRの膜発現が増強しEGFシグナルが活性化されPOMC mRNA発現が誘導されることが明らかとなったが(1)、多数例の患者腫瘍組織を用いた我々の検討ではUSP8変異陽性例におけるEGFR発現増加は認められず(3)、ACTH産生腺腫におけるUSP8の標的蛋白は未だ明らかでない。

### 2. 研究の目的

本研究ではUSP8変異により正または負に制御される遺伝子群や蛋白質の解析をもとに、USP8の標的蛋白を同定することで、Cushing病におけるACTH概日リズムの消失やACTH産生腺腫におけるシグナル伝達ネットワーク機構異常を解明することを主目的とする。

### 3. 研究の方法

ACTH産生腺腫のRNAを抽出しDNAマイクロアレイを用いて、USP8変異陽性腫瘍(MUT)と野生型腫瘍(WT)間で発現様式の異なる遺伝子を選び50例の症例サンプルを使ってリアルタイムPCRで検証する。一方Tandem Mass Tag (TMT) 試薬を用いた高感度質量分析によるプロテオーム解析により、USP8変異の有無で変化する蛋白を同定しmRNAと蛋白発現の網羅的な解析を行う。これらの情報からどのようなシグナル伝達系がUSP8変異により変化するのかを推定する。またmRNA発現量に有意差はないが、変異陽性例で蛋白の発現が有意に高いUSP8標的蛋白候補を絞りこむ。

### 4. 研究成果

#### 1) DNAマイクロアレイとリアルタイムPCRによる検討

DNAマイクロアレイでは24,670個の既知遺伝子の発現について2群間(MUT3例、WT3例)で比較した。MUT > WT 2倍以上(p<0.05) 遺伝子は1,128個(4.6%)で、倍率の高い遺伝子の中から関連性の予想される40個を抽出しリアルタイムPCRを行ったところ28遺伝子でPOMC発現とR>0.3の相関を認めた。POMC遺伝子発現を目的変数として前進法によるステップワイズ重回帰分析を施行したところ、28遺伝子のうち2つの遺伝子(MAP3K5とCYP3A4)の発現量が説明変数として選ばれた(R=0.795, p<0.0001)。

MAP3K5はMAPK系パスウェイに属するが、関連してMUTはWTに比べMAPK系パスウェイのPRKACA、MAP3K5、MAPK13/14(図1)が28遺伝子には含まれていた。またNPAS2、PER2、BMAL1等の時計遺伝子発現(図2)が高値であった。

USP8とBMAL1発現量にはR=0.68(p<0.00001)の相関を、BMAL1とPRKACAの発現量にはR=0.77(p<0.00001)の強い相関が認められ、更にPRKACAと下流のMAP3K5の相関はR=0.450(p=0.001)、MAP3K5と下流のMAPK13の相関はR=0.491(p=0.001029)、MAPK13とPOMCの相関はR=0.578(p=0.00001)であり、USP8時計遺伝子MAPK系POMC発現に続くパスウェイが想定された。

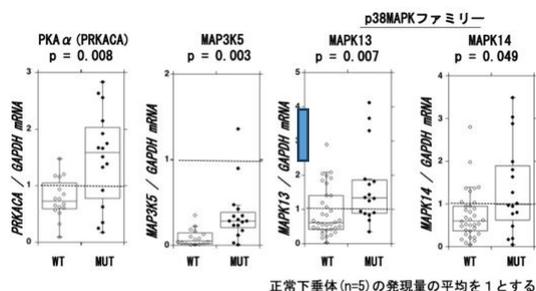


図1 クッシング病下垂体腫瘍におけるMAPK系遺伝子発現

## 2) クッシング病下垂体腫瘍における CYP3A4 の発現

CYP3A4 は肝臓や十二指腸・小腸に多く発現し、正常下垂体には発現は認められないことから、CYP3A4 のモノクローナル抗体を用いて 68 例のクッシング病下垂体腺腫の免疫染色を行ったところ 59%が陰性、22%が弱陽性、19%が陽性であり約 40%に発現が認められた(図 3A)。腫瘍の CYP3A4 の免疫染色(IHC)スコアと mRNA 発現量には正の相関が認められた( $R=0.403$ ,  $p=0.012$ ) (図 3B)。CYP3A4 発現は USP8 変異陽性例が陰性例よりも mRNA と IHC スコアの両者で有意に高値であった。

肝臓や腸管では CYP3A4 の発現は核内受容体であるステロイドゼノバイオティック受容体 SXR を介して調節されており SXR の発現について 66 例の免疫染色を行ったところ発現陰性は 41%、弱陽性 21%、陽性 36%であった(図 4)。CYP3A4 と SXR 発現に有意な相関は認められなかった。USP8 変異陽性の腫瘍の初代培養を用いた解析で、生理濃度のコルチゾール(30 nM)や低濃度のデキサメタゾン(3 nM)で CYP3A4 の mRNA と蛋白発現量や CYP3A4 の酵素活性が用量依存性に上昇する腫瘍が認められた。一方、SXR の強力なリガンドであるリファンピシン(10  $\mu$ M)では CYP3A4 mRNA 発現に変化を認めなかった。以上のことから SXR ではなくグルココルチコイド受容体 GR を介した CYP3A4 の発現調節機構が考えられた。

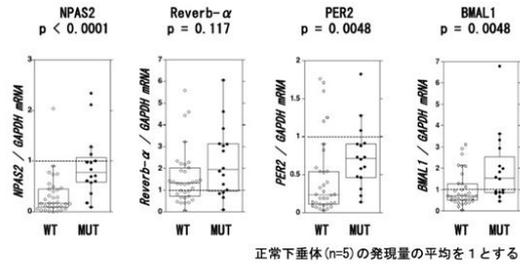


図2 クッシング病下垂体腫瘍における時計遺伝子発現

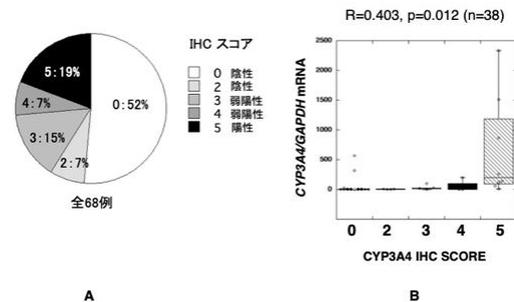


図3

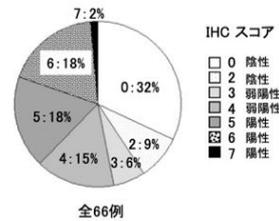


図4

## 3) プロテオーム解析による検討

プロテオーム解析では 6,953 個の蛋白の発現について 2 群間 (MUT3 例、WT3 例) で比較が可能であった。MUT で有意( $P<0.05$ )に 2 倍以上発現が多い蛋白は 59 個(図 5)で、うち DNA マイクロアレイでは発現量に有意差がなかった蛋白は 36 個であった。そのなかには Synaptotagmin など ACTH のエクソサイトーシスに関わる蛋白が複数含まれていた。ACTH の分泌は分泌小胞(分泌顆粒)の膜が細胞膜に融合後 ACTH が放出されるエクソサイトーシスと、分泌小胞が回収されるエンドサイトーシスが繰り返されるメンブレントラフィックによって調節されているが、それに関わる膜輸送制御蛋白が 5 個含まれていた。また残りの 31 個の蛋白の中で corticotroph に比較的特異的に発現している蛋白が 1 種認められた。機能解析を行っているが USP8 の標的蛋白と証明するに至っていない。

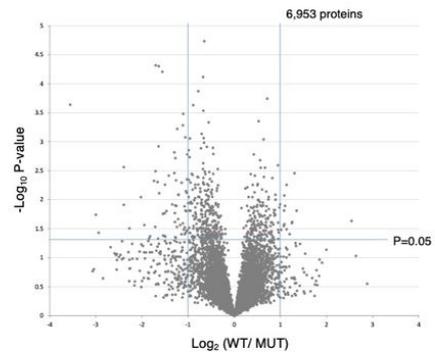


図5 プロテオミクス解析におけるボルケーノプロット

### < 引用文献 >

- Reincke M et al. Nat Genet 47:31, 2015.
- Ma Z-Y et al. Cell Res 25:306, 2015.
- Hayashi K, et al. Eur J Endocrinol. 174:213, 2016.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Mizuno Tomoko, Inoshita Naoko, Fukuhara Noriaki, Tatsushima Keita, Takeshita Akira, Yamada Shozo, Nishioka Hiroshi, Takeuchi Yasuhiro	4. 巻 61
2. 論文標題 Pasireotide-resistant Refractory Cushing's Disease without Somatostatin Receptor 5 Expression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 679 ~ 685
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.6314-20	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 Yoshimura Yusuke, Tatsushima Keita, Goshima Yukiko, Hoshino Yoshitomo, Nakashima Saki, Inaba Tatsuro, Ikeda Sara, Hattori Daisuke, Koyama Rikako, Imamura Tsunao, Takeshita Akira, Takeuchi Yasuhiro	4. 巻 6
2. 論文標題 A Case of Methimazole-Induced Acute Pancreatitis With an HLA Allele Causing Antithyroid Drug-Induced Agranulocytosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the Endocrine Society	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/jendso/bvac038	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 竹下彰	4. 巻 55
2. 論文標題 Cushing病における遺伝子異常	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 糖尿病・内分泌代謝科	6. 最初と最後の頁 3 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Nishio Rie, Takeshita Akira, Uchida Toyoyoshi, Herai Takashi, Sakamoto Kenichi, Shimizu Yuichiro, Arai Makoto, Tatsushima Keita, Fukuhara Noriaki, Okada Mitsuo, Nishioka Hiroshi, Yamada Shozo, Koibuchi Noriyuki, Watada Hirotaka, Takeuchi Yasuhiro	4. 巻 68
2. 論文標題 GH-induced LH hyporesponsiveness as a potential mechanism for hypogonadism in male patients with acromegaly	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 953 ~ 968
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ20-0596	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 Tatsushima Keita, Takeshita Akira, Fukata Shuji, Fukuhara Noriaki, Yamaguchi-Okada Mitsuo, Nishioka Hiroshi, Takeuchi Yasuhiro	4. 巻 2021
2. 論文標題 Challenges in the functional diagnosis of thyroid nodules before surgery for TSH-producing pituitary adenoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrinology, Diabetes & Metabolism Case Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/EDM-20-0221	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 Araki Takako, Tone Yukiko, Yamamoto Masaaki, Kameda Hiraku, Ben-Shlomo Anat, Yamada Shozo, Takeshita Akira, Yamamoto Masato, Kawakami Yasuhiko, Tone Masahide, Melmed Shlomo	4. 巻 106
2. 論文標題 Two Distinctive <i>POMC</i> Promoters Modify Gene Expression in Cushing Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism	6. 最初と最後の頁 e3346 ~ e3363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/clinem/dgab387	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 該当する

1. 著者名 Fukuhara Noriaki, Iwata Takeo, Inoshita Naoko, Yoshimoto Katsuhiko, Kitagawa Masanobu, Fukuhara Hirokazu, Tatsushima Keita, Yamaguchi-Okada Mitsuo, Takeshita Akira, Ito Junko, Takeuchi Yasuhiro, Yamada Shozo, Nishioka Hiroshi	4. 巻 32
2. 論文標題 Immunohistochemistry or Molecular Analysis: Which Method Is Better for Subtyping Craniopharyngioma?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrine Pathology	6. 最初と最後の頁 262 ~ 268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12022-020-09644-z	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 Fukuhara Noriaki, Nishihara Tetsuhiro, Sato Kengo, Inoshita Naoko, Tatsushima Keita, Yamaguchi-Okada Mitsuo, Ishojima Tsuyoshi, Takeshita Akira, Ito Junko, Takeuchi Yasuhiro, Yamada Shozo, Nishioka Hiroshi	4. 巻 166
2. 論文標題 Long-term outcomes of neuroendoscopic cyst partial resection combined with stereotactic radiotherapy for craniopharyngioma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Acta Neurochirurgica	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00701-024-06113-y	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 Hoshino Yoshitomo, Inoue Kosuke, Ikeda Sara, Goshima Yukiko, Tatsushima Keita, Fukuhara Noriaki, Okada Mitsuo, Nishioka Hiroshi, Yamada Shozo, Takeuchi Yasuhiro, Takeshita Akira	4. 巻 109
2. 論文標題 Clinical Factors Affecting Daily Dosage of Desmopressin Orally Disintegrating Tablets in Arginine Vasopressin Deficiency	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism	6. 最初と最後の頁 e983 ~ e996
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/clinem/dgad694	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 Hayashida Michikata, Sakaguchi Kazushige, Yasuoka Shotaro, Tanaka Makoto, Oshina Takahiro, Oka Suguru, Tatsushima Keita, Takeshita Akira, Takeuchi Yasuhiro, Urakami Shinji	4. 巻 31
2. 論文標題 Perirenal fat thickness is a powerful predictor for surgical outcomes of transperitoneal laparoscopic adrenalectomy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 56 ~ 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.15307	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9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 瀧澤裕樹, 福原紀章, 竹下彰, 小椋貴文, 岡田満夫, 五嶋由紀子, 辰島啓太, 竹内靖博, 西岡宏
2. 発表標題 内視鏡下経鼻経蝶形骨洞手術後SIADHに対する予防的水制限の安全性と有効性の検討
3. 学会等名 第33回日本間脳下垂体腫瘍学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 瀧澤裕樹, 竹下彰, 古川滉一郎, 五嶋由紀子, 辰島啓太, 小椋貴文, 福原紀章, 岡田満夫, 西岡宏, 伊藤慎治, 永田雄一, 竹内靖博
2. 発表標題 下垂体腫瘍術後に発症する下垂体炎の臨床的特徴
3. 学会等名 第96回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹下彰, 瀧澤裕樹, 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 先端巨大症におけるCRH負荷試験を用いた副腎皮質機能の検討
3. 学会等名 第96回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹下 章
2. 発表標題 PitNET への名称変更、名前が変わっただけ・・・ではなかったこと (内分泌内科の視点から)
3. 学会等名 第24回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹下彰
2. 発表標題 下垂体機能評価のpitfall
3. 学会等名 第32回臨床内分泌代謝Update
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大國皓平, 竹下彰, 五嶋由紀子, 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 Cushing病患者に対するGHRP-2負荷試験でのGHおよびACTH反応性の特徴
3. 学会等名 第32回日本間脳下垂体腫瘍学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹下章, 右高潤子, 荻久保明香, 辰島啓太, 福原紀章, 岡田満夫, 西岡宏, 井下尚子, 山田正三, 竹内靖博
2. 発表標題 クッシング病下垂体腺腫におけるグルココルチコイドを介したCYP3A4発現誘導とPOMC発現の関連性
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹下章, 山田正三, 西岡宏, 井下尚子, 竹内靖博
2. 発表標題 クッシング病におけるUSP8変異の有無と診断・治療との関連性
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹下章, 右高潤子, 荻久保明香, 辰島啓太, 福原紀章, 岡田満夫, 西岡宏, 井下尚子, 山田正三, 竹内靖博
2. 発表標題 クッシング病下垂体腺腫におけるCYP3A4発現とPOMC発現の関連性
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 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)	

6. 研究組織（つづき）

	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	西岡 宏  (Nishioka Hiroshi)  (60218120)	(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)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関