

令和元年5月30日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10483

研究課題名(和文) 副腎皮質再生メカニズムの解明と自家移植への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the adrenal gland regeneration mechanism and application to adrenocortical autotransplantation

研究代表者

吉田 崇 (YOSHIDA, Takashi)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：00714966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Hedgehogタンパク(HH)の一つであるSonic Hedgehog(SHH)は、副腎で唯一発現しているHHタンパクであり、細胞系譜追跡研究の結果からShh陽性細胞が成体副腎幹・前駆細胞として報告されている。本研究では、移植片再生過程において、Shhではなく、副腎で発現が報告されていないDesert hedgehog(Dhh)が一過性に上昇することを明らかにした。同時期に、副腎の発生発達期に認められる遺伝子群の発現上昇を認めており、副腎自家移植片再生へのDHHの関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

副腎皮質移植片の再生過程におけるヘッジホッグ経路のタンパク、遺伝子を検討した研究は皆無である。本研究では移植片再生過程でShhではなくDhhの発現上昇を認めるという、これまでの通説を覆す結果を得た。DHHの副腎皮質自家移植片における組織再構築と内分泌機能獲得への関与が示唆された。この研究成果は、副腎自家移植片の機能増強、ならびに早期生着方法を導き出し、自家移植のみならず、幹細胞移植、異種移植への応用も可能としていく。すなわち、本研究による成果は対象疾患を家族性褐色細胞腫に限定せず、ACTH非依存性副腎皮質大結節性過形成やAddison病の加療にも応用できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Bilateral adrenalectomy forces the patient to undergo glucocorticoid replacement therapy and face a lifetime risk of adrenal crisis. Adrenal autotransplantation is considered useful to avoid adrenal crisis and the replacement therapy. However, the basic process of regeneration in adrenal autografts is poorly understood. Here, we investigated the essential regeneration factors in rat adrenocortical autografts, with a focus on the factors involved in adrenal development and steroidogenesis, such as Hh signalling. The autografts showed increased Dhh expressions 3 weeks after autotransplantation, but not Shh, which is the only Hh family member to have been reported to be expressed in the adrenal gland. Increased Gli1 expression was also found in the regenerated capsule 3 weeks after autotransplantation. Dhh and Gli1 might function in cooperation to regenerate adrenocortical autografts. This is the first report to clearly show Dhh expression and its elevation in the adrenal gland.

研究分野：泌尿器科、副腎腫瘍、尿路上皮癌、尿路結石

キーワード：副腎 自家移植 再生 DHH GLI1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

両側副腎腫瘍に対する両側副腎摘除術後の副腎不全のリスク回避を目的として、副腎部分切除術が行われている。しかしながら、すべての症例で十分な内分泌機能を発揮できる副腎皮質を温存できるとは限らない。副腎部分切除術以外に、両側副腎摘除術時に腫瘍から剥離した正常副腎皮質を再び患者体内に戻す副腎自家移植手術が試みられていたが、成績不良であり、現在臨床応用には至っておらず、研究レベルで試みられる程度である。

副腎移植片の再生過程では、発生発達期の副腎皮質の層構造形成に關与する Hedgehog、Delta-like homolog、WNT/ $\beta$ -catenin シグナル経路、転写因子 SF-1、DAX-1、WT1、GATA-6 などの関与が考えられるが、それらを明らかにした報告はない。生着効率のよい移植片を作成するには、これらの因子を移植片に含むことが重要と考えられる。移植片再生過程における、これらの因子の動態の解明は移植片再生促進、早期内分泌機能回復のための糸口になるとともに、本研究が導き出した知識・技術を応用することにより、自家移植のみならず、延いては、幹細胞移植、異種移植への道も開けると期待される。

## 2. 研究の目的

げっ歯類副腎を用いて種々の条件下での自家移植片の細胞生存増強、血流量の増加、ならびに再生過程に關与する因子の同定から、早期の移植片生着率の向上を検討することにより、ヒト両側副腎摘除術による後天性副腎不全症治療への応用を目指す。

## 3. 研究の方法

Wistar ラット (9 週齢、雄) を用い麻酔下に両側副腎を摘出、摘出副腎を 4 分割の上、髓質を除去し、移植片とした。右大腿二頭筋内に自家移植をおこない、移植後 1、2、3、4 週目に移植片ならびに血液を採取し、種々の方法で解析した (自家移植群)。開腹のみの副腎未摘除 sham 群を対照とした。EIA を用いた内分泌機能の評価、免疫組織化学によるタンパク発現、*in situ* hybridization (ISH) と nCounter を用いた遺伝子の局在同定・発現定量を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 内分泌機能の回復

酵素免疫抗体法による内分泌機能の評価：血中のラット糖質コルチコイド (コルチコステロン) と副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone: ACTH) を、酵素免疫抗体法にて測定した。移植後 3 週目には、移植片の内分泌機能は sham 群と有意差がないまでに回復していた。

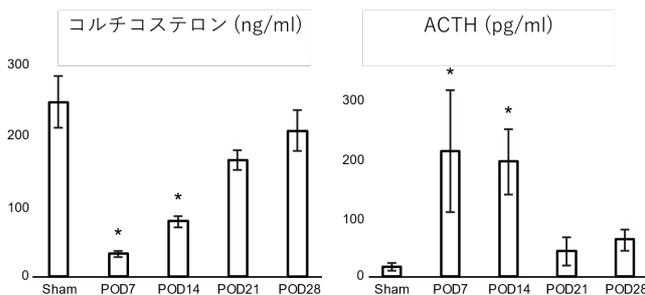


図 1 . 血中コルチコステロン値と ACTH 値 (POD: postoperative day)

nCounter による遺伝子発現定量解析：副腎皮質束状層に局在し糖質コルチコイド合成酵素をコードする CYP11B1 と球状帯に局在するアルドステロン合成酵素 CYP11B2 について、移植片から抽出した total RNA を用いて、増幅なしに直接 mRNA をカウントできる nCounter system を用いて定量解析した。術後 2 週目に認められた Cyp11b1 のピークは EIA の結果と一致しなかった。Cyp11b1 に対して相同性の高い遺伝子群が存在するため、正確に Cyp11b1 の発現定量が出来ていない可能性が考えられた。他方、アルドステロン合成酵素である Cyp11b2 については特異的なプローブが作成でき、これにより移植後 1 か月目までに Cyp11b2 が発現していないことが明らかとなった。

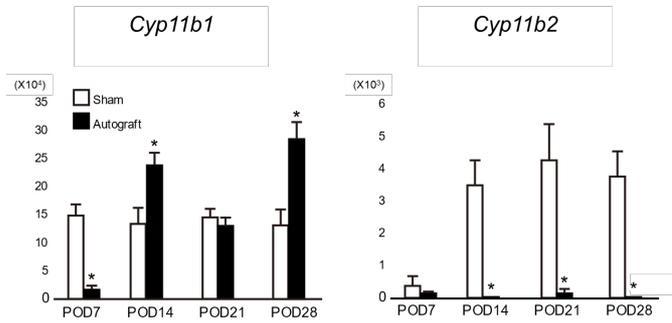
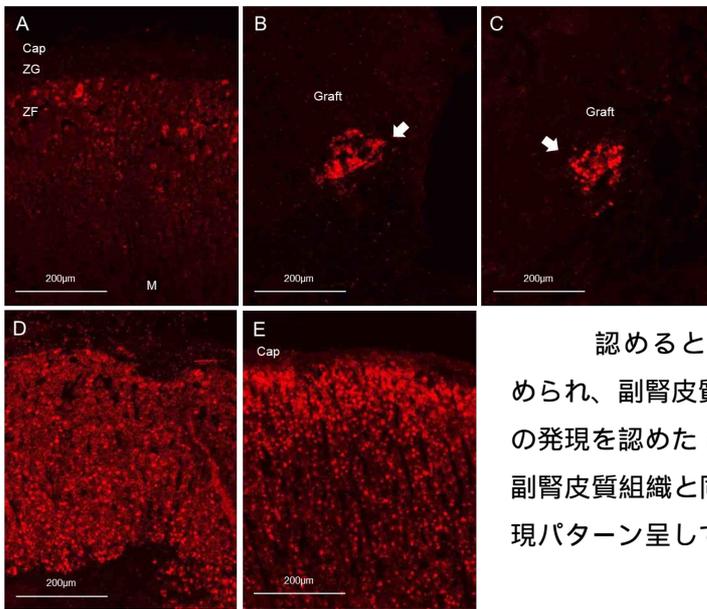


図2 . Cyp11b1 と Cyp11b2 の遺伝子発現量の推移 (POD: postoperative day)

Basescape Assay による遺伝子発現の局在解析：内分泌機能の経時的な回復過程を確認するため、*Cyp11b1* の ISH を行った。解析には、独自に設計された特異的なプローブと試薬キットを使用することにより、従来の ISH 法と比べてターゲット mRNA を高感度かつ容易に検出でき、



1塩基の違いから検出できる技術である BaseScope を用いた。*Cyp11b1* は移植後 1, 2 週では移植片のごく限られた領域に発現を認める程度であった(図3 . B, C)。移植後 3 週では、副腎皮質細胞の急速な増殖を

認めるとともに正常副腎皮質類似構造が認められ、副腎皮質細胞において *Cyp11b1* のびまん性の発現を認めた(図3 . D)。移植後 4 週では、正常副腎皮質組織と同様に、*Cyp11b1* は極性を持った発現パターン呈していた(図3 . A, E)。

図3 . *Cyp11b1* の発現と局在

A (sham 副腎)：束状帯に一致して発現を認め、髄質に向かって発現は減弱している。B (移植後 1 週移植片) C (移植後 2 週移植片)：移植片のごく一部に認められる副腎皮質細胞に局限した発現を認める。D (移植後 3 週移植片)：増殖した副腎皮質細胞にびまん性発現を認める。E (移植後 4 週移植片)：被膜下で強く、対側に向かって減弱する、正常副腎類似の極性をもった発現様式を呈している。

白矢印：副腎皮質細胞集団、Cap: capsular, ZG: zona glomerulosa, ZF: zona fasciculata, M: Medulla

免疫組織化学 (CYP11B2)：anti-CYP11B2 抗体を用いて免疫染色を行った。正常副腎(sham)では、球状帯 ZG に発現を認めるが、移植片では移植後 7-28 日いずれにおいても発現を認めなかった。これは nCounter の解析結果と一致している。

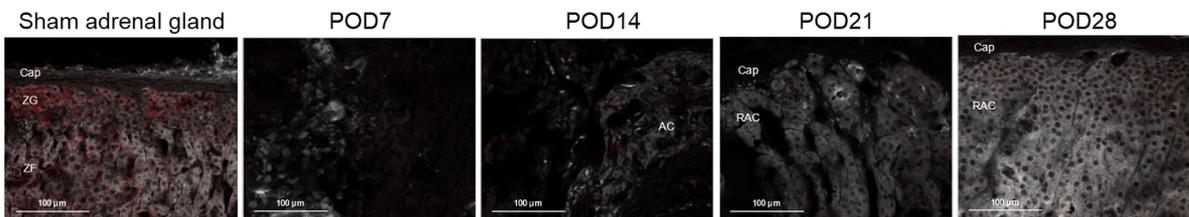


図4 . 免疫染色 (CYP11B2: 赤)

## (2) HH シグナル経路遺伝子群の発現解析

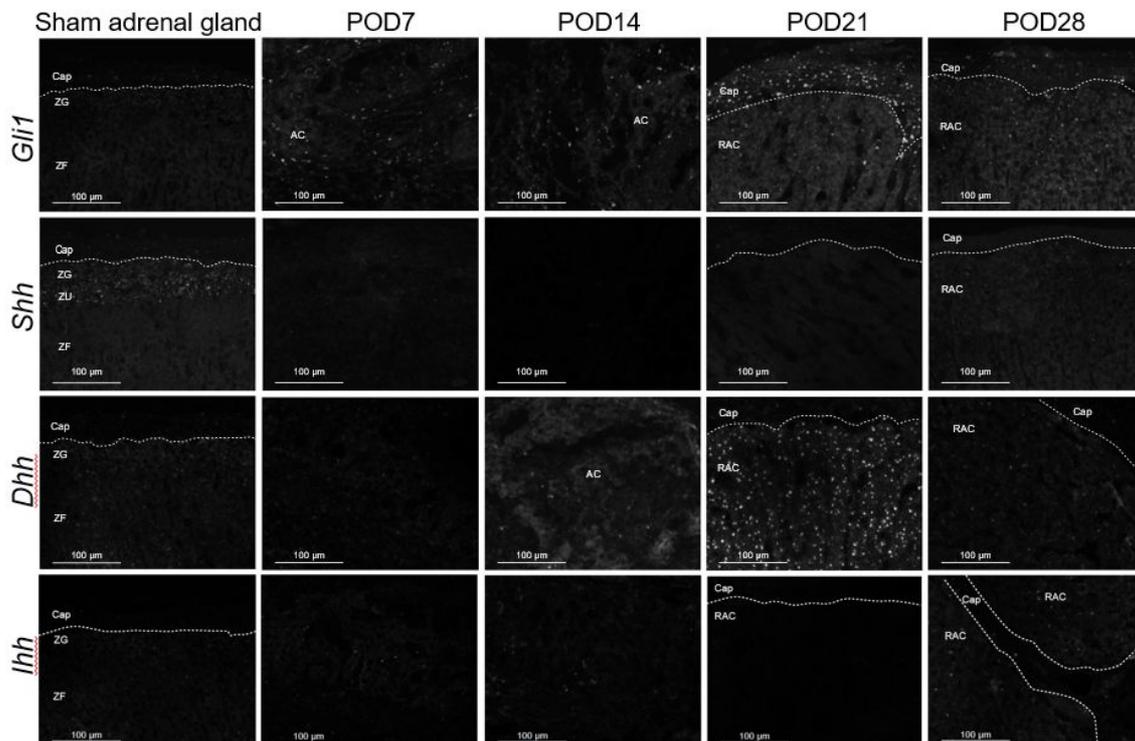


図5 . Gli1: Glioma-associated oncogene1; Shh: Sonic hedgehog; Dhh: Desert hedgehog; Ihh: Indian hedgehog; AC: adrenocortical cells; RAC: renewal adrenocortical cells.

副腎で発現する唯一のHHタンパク質であり、成体副腎皮質組織の幹・前駆細胞マーカーとされるSonic Hedgehog (SHH)が副腎自家移植片の再生過程においても重要な働きを示すと予想しHHシグナル経路遺伝子群についてRNAscopeを用いたISHをおこなった。移植後3週目に被膜においてGli1の発現上昇を認めた。副腎ではHHタンパクのうちSHHのみが発現するとされていたが、SHHの発現は移植片では認めず、DHHのGli1発現時期に一致した副腎皮質細胞でのびまん性発現を認めた。IHHは正常副腎、移植片いずれにおいても有意な発現上昇は認めなかった。

(3) nCounterによる遺伝子発現定量解析：移植群の移植片と、sham群の副腎皮質からtotal RNAを抽出し、SF-1、DAX-1、WT1、GATA-6などのmRNAの定量解析をnCounterで実施した。

移植後4週目には、sham群の副腎に類似した遺伝子発現パターンを呈した。移植後2,3週目では、正常副腎皮質と異なり、副腎性腺原基で発現するSf1、WT1、Gata4の発現を認めた。

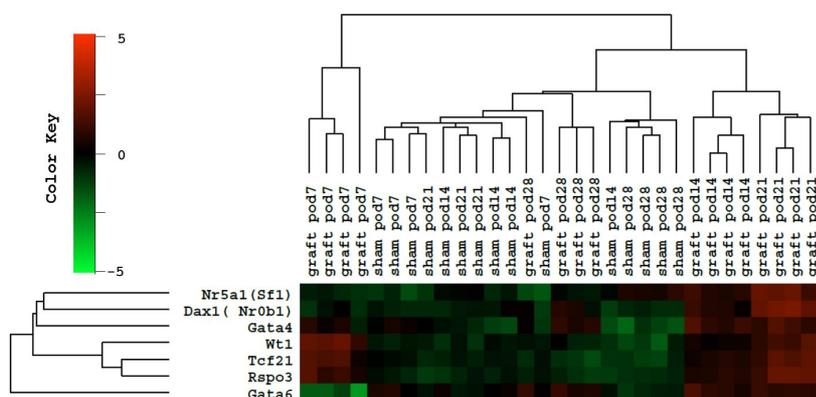


図6 . 副腎皮質自家移植片における遺伝子発現 Heat map

<まとめ>

解析結果から、移植後2-3週目に、内分泌機能回復のための重要な変化が生じていることが示唆され、同時期に一致してHHシグナル経路遺伝子の発現上昇を認めたことから、HHシグナル経路が重要な働きをしていることが示唆された。また、移植片の再生過程でGli1を制御しているのはSHHではなく、これまで副腎での発現が報告されていないDHHであることが示唆された。移植後2-3週目には副腎性腺原基で発現する遺伝子群が発現しており、細胞表現型が副腎皮質細胞よりも副腎性腺原基に近づいていることが示唆された。

## <引用文献>

Takizawa N, Tanaka S, Oe S, Koike T, Yoshida T, Hirahara Y, Matsuda T, Yamada H. Involvement of DHH and GLI1 in adrenocortical autograft regeneration in rats. Scientific Reports. 査読有 28;8(1), 2018, 14542. doi: 10.1038/s41598-018-32870-9.

Yoshida T, Taguchi 1, Inoue T, Kinoshita H, Matsuda T. Thulium laser ablation facilitates retrograde intra-renal surgery for upper urinary tract urothelial carcinoma.

International journal of urology. 査読有 25(4), 2018, 379-380. doi:10.1111/iju.13522.

Yoshida T, Inoue T, Abe T, Matsuda T.

Evaluation of intrapelvic pressure when using small-sized ureteral access sheaths of  $\leq 10/12$ Fr in an ex vivo porcine kidney model. Journal of Endourology. 査読有 32(12), 2018, 1142-1147. doi: 10.1089/end.2018.0501.

## [学会発表](計1件)

Yoshida T, Taguchi M, Inoue T, Matsuzaki T, Kinoshita H, Matsuda T.

Development and internal validation of a nomogram for predicting spontaneous passage of ureteral stones of  $\leq 10$ mm.

American Urological Association Annual Meeting 2018

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計2件)

吉田崇, 井上貴昭, 松田公志.

10/12Fr 以下の尿管アクセスシースと術中腎盂内圧との関連性の評価: ex vivo study.

日本尿路結石症学会第28回学術集会(2018)

吉田崇, 小林恭, 伊藤克弘, 牧田哲幸, 河源, 川喜田睦司, 小川修, 木下秀文, 松田公志.

上部尿路上皮癌患者における、局所進行を予測する術前ノモグラムの構築.

日本泌尿器腫瘍学会第4回学術集会(2018)

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 松田 公志

ローマ字氏名: (MATSUDA, Tadashi)

所属研究機関名: 関西医科大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 20192338

研究分担者氏名: 田中 進

ローマ字氏名: (TANAKA, Susumu)

所属研究機関名: 関西医科大学

部局名: 医学部

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 30399472

### (2)研究協力者

研究協力者氏名: 滝澤 奈恵

ローマ字氏名: (TAKIZAWA, Nae)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。