

令和元年5月31日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16160

研究課題名（和文）異所性ACTH産生褐色細胞腫の発症機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanism underlying ectopic ACTH producing pheochromocytoma

研究代表者

佐久間 一基（SAKUMA, Ikki）

千葉大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：70791721

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：異所性ACTH産生症候群は、下垂体以外の組織から発生した腫瘍がACTHを産生・分泌し、過剰分泌されたACTHによってクッシング様徴候を呈する症候群であるが、腫瘍におけるACTH自律分泌獲得の分子機構は十分には明らかにされていない。本研究では褐色細胞腫でのACTH自律分泌能獲得におけるPOMCメチル化制御異常とPOMC制御の上流シグナル・腫瘍の発症起源を検討した。その結果、異所性ACTH産生症候群において、POMC発現の機能性獲得に、POMC promoter領域の脱メチル化が重要であることが示され、その病態として腫瘍での神経発生分化制御因子の発現制御機構の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

褐色細胞腫はカテコラミンを自律分泌するクロム親和性細胞由来の腫瘍である。稀にACTHを異所性に産生することが報告されているが、その発症機構は十分に明らかにされていない。本研究では、異所性ACTH産生症候群において、POMC発現の機能性獲得に、POMC promoter領域の脱メチル化が重要であることが示された。本研究の成果が、異所性ACTH産生症候群の新たな治療薬への臨床応用に展開するための基盤になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The molecular mechanism of ACTH production has not been fully elucidated in ectopic ACTH syndrome. In this study, I examined POMC methylation deregulation, upstream signals of POMC regulation, and onset origin of tumor in ectopic ACTH producing pheochromocytoma. I found that demethylation of POMC promoter region was important for POMC expression in ectopic ACTH production syndrome. In addition, analysis of RNA-sequencing using ectopic ACTH secreting pheochromocytoma tumor.

研究分野：内分泌

キーワード：ACTH 褐色細胞腫 内科

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

1. 研究開始当初の背景

異所性 ACTH 産生症候群は、下垂体以外の組織から発生した腫瘍が ACTH を産生・分泌し、過剰分泌された ACTH によって副腎機能亢進症によるクッシング様徴候を呈する症候群である。腫瘍の組織型は、小細胞肺癌、胸腺カルチノイド、褐色細胞腫などがある。臨床的な課題として、治療は原発巣の切除が第一選択であるが、局在診断困難例が存在することや、有効な ACTH 産生抑制薬がないため高コルチゾール血症の是正に難渋し予後不良となる例が存在する。このような背景のもと、申請者らは局在診断困難な異所性 ACTH 産生症候群における肺結節の機能性評価に肺動脈サンプリングが有用であることを報告している (Sakuma et al. Hormone 2013)。下垂体腫瘍における ACTH 産生機構については、転写因子 Tpit の関与が大きいことや、近年脱コピキチン化酵素 USP8 の変異による EGF 経路の活性化が報告されている。一方、異所性 ACTH 産生腫瘍での ACTH 自律分泌能獲得の分子機構は十分に明らかにされていない。

2. 研究の目的

申請者らは、カテコラミンを自律分泌するクロム親和性細胞由来の腫瘍である褐色細胞腫症例において、ACTH 前駆体である POMC の promoter 領域の低メチル化とグルココルチコイドによる奇異性調節の存在を報告している (Sakuma et al. J Clin Endocrinol Metab 2016)。本研究では褐色細胞腫での ACTH 自律分泌能獲得における POMC メチル化制御異常と POMC 制御の上流シグナル・腫瘍の発症起源を解明することを目的とした。本研究の成果が、異所性 ACTH 産生症候群の新しい診断方法や治療薬への臨床応用に展開するための基盤になると期待される。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍組織を用いた POMC promoter 領域の DNA メチル化評価

異所性 ACTH 産生褐色細胞腫、異所性 ACTH 産生胸腺カルチノイド、ACTH 非産生褐色細胞腫の腫瘍組織を対象に、パイロシーケンスを用いた POMC promoter 領域の DNA メチル化定量を行った。加えて、クッシング病 (ACTH 産生下垂体腺腫)、非機能性下垂体腺腫、GH 産生下垂体腺腫、TSH 産生下垂体腺腫も同様に解析を施行した。

(2) 細胞株を用いた POMC promoter 領域の DNA メチル化評価と POMC 遺伝子発現評価

クロム親和性細胞由来の腫瘍である神経芽腫細胞株 (IMR32)、ACTH 産生小細胞肺癌細胞株 (DMS79)、ACTH 非産生小細胞肺癌細胞株 (N417)、非小細胞肺癌細胞株 (H1299) を対象にパイロシーケンスを用いた POMC promoter 領域の DNA メチル化定量と POMC 遺伝子発現の評価を行った。加えて、DNA 脱メチル化剤デシタピンを神経芽腫細胞株 (IMR32) に添加し、POMC promoter 領域の DNA メチル化と POMC 遺伝子発現を評価し、POMC 発現調節に関わる脱メチル化部位の同定を行った。

(3) 異所性 ACTH 産生褐色細胞腫の腫瘍組織を用いたエクソーム解析

褐色細胞腫の原因遺伝子として SDHB、SDHD、RET、VHL、TMEM127、MAX、SDHA などが同定されている。褐色細胞腫の 25% が遺伝性であり、遺伝子変異が褐色細胞腫の臨床病型を規定する重要な因子と考えられている。異所性 ACTH 産生褐色細胞腫は POMC の DNA 低メチル化を認めることから、その上流に DNA メチル化制御異常を引き起こすエピジェネティック制御遺伝子変異が存在する可能性が考えられる。異所性 ACTH 産生褐色細胞腫の腫瘍組織を用いたエクソーム解析を行い、DNA メチル化制御異常を引き起こすエピジェネティック制御遺伝子変異の有無を評価した。

(4) POMC 発現制御の上流シグナル・腫瘍の発症起源の評価

異所性 ACTH 産生褐色細胞腫、ACTH 非産生褐色細胞腫の腫瘍組織の RNA シークエンスを行い、異所性 ACTH 産生褐色細胞腫で高発現の遺伝子の検索を行い、相関ネットワーク解析から POMC と強い相関を認める遺伝子の探索を行った。

4. 研究成果

(1) 腫瘍組織を用いた POMC promoter 領域の DNA メチル化評価

異所性 ACTH 産生褐色細胞腫、異所性 ACTH 産生胸腺カルチノイドにおいて、POMC promoter 領域は広範に低メチル化を呈していたのに対して、ACTH 非産生褐色細胞腫では高メチル化を認めた。POMC promoter 領域の低メチル化により、腫瘍における異所性 ACTH 産生能を獲得したと考えられた。続いて、下垂体腫瘍について解析を行うと、クッシング病 (ACTH 産生下垂体腺腫) において、POMC promoter 領域の広範な低メチル化を呈したのに対して、その他の下垂体腺腫 (非機能性下垂体腺腫、GH 産生下垂体腺腫、TSH 産生下垂体腺腫) では高メチル化を呈しており、異所性 ACTH 産生症候群と同様に、クッシング病 (ACTH 産生下垂体腺腫) においても、POMC 発現の機能性獲得に、POMC promoter 領域の脱メチル化が重要であると考えられた。

(2) 細胞株を用いた POMC promoter 領域の DNA メチル化評価と POMC 遺伝子発現評価

ACTH 産生能を有する DMS79 では、POMC promoter 領域は広範な低メチル化、POMC 高発現を呈したのに対して、H1299、IMR32 では高メチル化、POMC 低発現を呈した。N417 は比較的低メチル化を呈しているものの、POMC 発現は DMS79 と比較して低く、POMC 発現の機能的獲得に、POMC promoter 領域の脱メチル化に加えて、POMC 発現制御に関わる転写因子の関与の可能性が示唆された。また、IMR32 に脱メチル化剤であるデシタピン投与を行い、パイロシークエンスによる POMC promoter のメチル化定量と遺伝子発現解析を施行した。POMC promoter の E2F 結合領域が脱メチル化したサンプルにおいて、POMC mRNA 発現の上昇を認めた。

(3) 異所性 ACTH 産生褐色細胞腫の腫瘍組織を用いたエクソーム解析

褐色細胞腫の 25% が遺伝性であり、遺伝子変異が褐色細胞腫の臨床病型を規定する重要な因子と考えられており、異所性 ACTH 産生褐色細胞腫と異所性 ACTH 産生胸腺カルチノイドの腫瘍組織を用いたエクソーム解析を行い、DNA メチル化制御異常を引き起こすエピジェネティック制御遺伝子変異の有無を評価したが、同定されなかった。

(4) POMC 発現制御の上流シグナル・腫瘍の発症起源の評価

異所性 ACTH 産生褐色細胞腫、異所性 ACTH 非産生褐色細胞腫の腫瘍組織の RNA シークエンス解析から、異所性 ACTH 産生褐色細胞腫において、POMC に加えて、神経ペプチドである NPY、AGRP の高発現を認めた。また、Ingenuity Pathway Analysis を用いた相関ネットワーク解析から、POMC は NPY、AgRP と強い相関を認め、これらの遺伝子群は共通の因子によって、発現調節を受ける可能性が示唆された。POMC、NPY、AgRP はともに摂食調節を担う神経ペプチドであり、視床下部弓状核に局在する特徴があることから、視床下部弓状核の発生分化制御機構が異所性 ACTH 産生褐色細胞腫の病態形成に関与することが示唆された。更に興味深いことに異所性 ACTH 産生褐色細胞腫の腫瘍組織を用いた RNA-sequencing の解析から、着目した神経発生制御に関わる転写因子が、デシタピン添加により POMC の発現誘導された際に発現上昇を認め、POMC 発現制御に関わることが示唆されており、現在その詳細な機序について更に解析をすすめている。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- 1 . [Sakuma I](#), Nagano H, Yoshino I, Yokote K, Tanaka T. Ceritinib Aggravates Glycemic Control in Insulin-treated Patients with Diabetes and Metastatic ALK-positive Lung Cancer Intern Med 58(6) 817-820, 2019 (査読あり)
- 2 . [Sakuma I](#), Saito J, Matsuzawa Y, Omura M, Matsui S, Nishikawa T. A Unique Case of Renovascular Hypertension due to Fibromuscular Dysplasia in an Extra-renal Artery Intern Med 57(18) 2689-2694, 2018 (査読あり)
- 3 . Nagano H, Hashimoto N, Nakayama A, Suzuki S, Miyabayashi Y, Yamato A, Higuchi S, Fujimoto M, [Sakuma I](#), Beppu M, Yokoyama M, Suzuki Y, Sugano S, Ikeda K, Tatsuno I, Manabe I, Yokote K, Inoue S, Tanaka T. p53- inducible DPYSL4 associates with mitochondrial supercomplexes and regulates energy metabolism in adipocytes and cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 14;115(33):8370-8375, 2018 (査読あり)
- 4 . Tamura A, Ogasawara T, Fujii Y, Kaneko H, Nakayama A, Higuchi S, Hashimoto N, Miyabayashi Y, Fujimoto M, Komai E, Kono T, [Sakuma I](#), Nagano H, Suzuki S, Koide H, Yokote K, Iseki K, Oguma R, Matsue H, Nojima H, Sugiura K, Yoshitomi H, Ohtsuka M, Rahmutulla B, Kaneda A, Inoshita N, Ogawa S, Tanaka T. Glucagonoma with necrolytic migratory erythema: metabolic profile and detection of biallelic inactivation of DAXX gene. J Clin Endocrinol Metab 1;103(7):2417-2423, 2018 (査読あり)
- 5 . [Sakuma I](#), Koide H, Yoshida T, Yamato A, Fujimoto M, Tamura A, Komai E, Kono T, Nagano H, Horiguchi K, Yokote K, Tanaka T. CONGESTIVE HEART FAILURE SECONDARY TO A TSH-SECRETING PITUITARY ADENOMA AGGRAVATED BY TAKOTSUBO CARDIOMYOPATHY IN AN ELDERLY PATIENT. AACE Clinical Case Reports 4 e115-e123, 2018 (査読あり)
- 6 . Nagano H, Nakagawa Y, Ishikawa N, Watanabe Y, Miyabayashi Y, Nakayama A, Fujimoto M, Komai E, Shiga A, Tamura A, Kono T, Takiguchi T, Higuchi S, [Sakuma I](#), Hashimoto N, Suzuki S, Koide H, Yokote K, Tanaka T. SEVEN FAMILIAL DYSALBUMINEMIC HYPERTHYROXINEMIA CASES IN THREE UNRELATED JAPANESE FAMILIES AND HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY ANALYSIS OF THE THYROXINE BINDING PROFILE. Endocr Pract. 23(11) 1325-1332, 2017 (査読あり)
- 7 . Takiguchi T, Koide H, Nagano H, Nakayama A, Fujimoto M, Tamura A, Komai E, Shiga A, Kono T, Higuchi S, [Sakuma I](#), Hashimoto N, Suzuki S, Ishiwatari N, Horiguchi K, Nakatani Y, Yokote K, Tanaka T. Multihormonal pituitary adenoma concomitant with Pit-1 and Tpit lineage cells causing acromegaly associated with subclinical Cushing's disease: a case report BMC Endocr Disord 17(1) 54, 2017 (査読あり)
- 8 . Koide H, Shiga A, Komai E, Yamato A, Fujimoto M, Tamura A, Kono T, Nakayama A,

Takiguchi T, Higuchi S, Sakuma I, Nagano H, Hashimoto N, Suzuki S, Takeda Y, Shibuya M, Nishioka H, Yamada S, Inoshita N, Ishiwatari N, Horiguchi K, Yokote K, Tanaka T. Prednisopone-Responsive Postpartum IgG4-related Hypophysitis Intern Med 57(3) 367-375, 2018 (査読あり)

9. 佐久間一基、小出尚史、横手幸太郎 内臓脂肪蓄積の代謝異常、血管障害に与える影響 Pharma Medica 35 巻 11 号 pp25-28、2017 (査読なし)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Ikki Sakuma, Yue Yao, Masanori Fujimoto, Hidekazu Nagano, Koutaro Yokote and Tomoaki Tanaka Characterization and Categorization Based on Genotype-Biochemical Phenotype Association in Fructose-1,6-Bisphosphatase Deficiency ENDO2019 MON-188 New Orleans, USA 2019.3 (Outstanding Abstract Awards)

2. 佐久間一基、姚躍、藤本真徳、永野秀和、横手幸太郎、田中知明 FBPase 欠損症におけるミスセンス変異の分子病態の解明 第 28 回臨床内分泌代謝 Update EP09 福岡 2018.11 (口頭)(優秀ポスター賞)

3. ○佐久間一基、姚躍、横手幸太郎、田中知明 p53 下流遺伝子 FDXR による鉄代謝依存的 ROS 制御を介した肝糖新生の調節機構 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会 - 14 - 28 東京 2018.5 (口頭)

4. 佐久間一基、姚躍、藤本真徳、永野秀和、横手幸太郎、田中知明 FBPase 欠損症における新規 FBP1 変異の同定と機能解析 第 91 回日本内分泌学会学術総会 01-10-19 2018.4 (口頭)(高得点演題)

5. 佐久間一基、山崎 有人、笹野 公伸、横手 幸太郎、田中 知明 症例から学ぶ副腎性高血圧症の病理と遺伝子変異 副腎静脈サンプリングで機能性を確認しえたアルドステロン産生腺腫合併の無症候性褐色細胞腫 第 40 回日本高血圧学会総会 SY8-4 松山 2017.10 (口頭)(招待講演)

6. 佐久間一基、藤本真徳、大和梓、田村愛、駒井絵里、志賀明菜、河野貴史、中山哲俊、永野秀和、鈴木佐和子、小出尚史、田中知明、横手幸太郎 FBPase 欠損症の成人例で同定された FBP1 新規変異とその機能解析 第 90 回日本内分泌学会学術総会 02-9-11 2017.4 (口頭)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。