

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09003

研究課題名(和文) ACTH産生下垂体腺腫の浸潤性、増殖性と関連するCRNDEの機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the function of CRNDE associated with invasiveness and proliferation in ACTH-producing pituitary adenomas

研究代表者

福岡 秀規 (Fukuoka, Hidenori)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80622068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Cushing病はACTH産生下垂体腺腫(ACTHoma)を原因とする疾患である。治療の第一選択は外科的摘出だが、大きな腫瘍、浸潤性の高い腫瘍では手術による寛解は困難であり治療に難渋する。本研究ではACTHomaの浸潤性に関連する腫瘍における遺伝子異常を明らかにすることを目的とする。術後腫瘍検体を用いて網羅的に遺伝子解析を行ったところ、CRNDEというlncRNAを増殖と関連する因子として同定し、その機能を解析した。同時に治療抵抗性の下垂体腺腫に対して3次元培養系(スフェロイド)を構築し、薬剤の反応性を確認するモデルとしての意義を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ACTHomaにおける浸潤性を規定している分子についてはほとんど明らかになっておらず、本分子の同定により、ACTHomaの臨床に与えるインパクトとして、3つの点が考えられる。まずACTHomaの浸潤性を予測する因子としての意義、次に治療標的となる可能性、さらに治療モニターとしての意義である。また、現在鑑別診断の困難である異所性ACTH症候群との鑑別バイオマーカーとしての有用性も期待される。また、下垂体腺腫術後検体を用いたスフェロイド培養系は薬剤反応性を予測するツールとして有用であることが明らかとなり、今後薬剤選択におけるツールとして臨床応用が可能かもしれない。

研究成果の概要(英文)：Cushing disease, which caused by ACTH producing pituitary adenomas (ACTHomas), is primary treated by surgical tumor resection. However, the remission rate of large or invasive tumor is not so high, and still in clinically challenging. This study aims to elucidate the genetic factor associated with invasiveness in these tumors. We identified lncRNA CRNDE by comprehensive transcriptome analysis using surgically resected tumors as associated factor with tumor aggressiveness. We analyzed the function of CRNDE in ACTHomas using 3 dimensional culture system (spheroid culture). In the mean time, spheroid culture was constructed for treatment-resistant pituitary adenomas, including GHomas and PRLomas, and its significance as a model for confirming drug responsiveness was clarified.

研究分野：内分泌腫瘍学

キーワード：Cushing病 腫瘍浸潤性 CRNDE lncRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ACTH 産生下垂体腺腫 (ACTHoma) は下垂体腺腫の中でも臨床的に最も治療に難渋する疾患として知られている。特に浸潤性の高い腫瘍では手術による寛解率が低く、再発率が高いことから、ACTHoma の浸潤性に関与する病態を明らかにすることは、治療標的を明らかにするという意味でも臨床的意義が高い。我々はこれまでに ACTHoma の浸潤性に関連する因子について検討し、long non-coding RNA *CRNDE* の発現が ACTHoma の浸潤性、サイズと正の相関性を持つことを見出してきた。*CRNDE* は正常大腸組織と比較して大腸腺腫、大腸癌でより発現の高い lncRNA として報告され、神経膠腫、卵巣癌でもその発現量が増殖、浸潤性の進展と関連している。また、我々は下垂体腺腫術後検体を用いて 3 次元培養系を作成し、その培養系での実験系を確立した。

2. 研究の目的

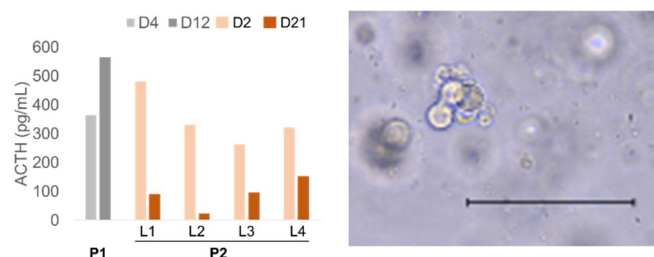
ACTHoma 術後検体における 3D 培養系を用いて *CRNDE* の腫瘍における機能、特に増殖性との関連性を明らかにする。また、ACTHoma の腫瘍術後検体はその頻度の低さ、腫瘍の大きさの小ささ、腫瘍増殖速度の遅さから、培養系として多くの検討を行う事が困難であるため、現在の 3D 培養系を用いて ACTHoma に対する病態解明に加え、それ以外の下垂体腺腫に対しても、3D 培養系を用いて薬剤反応性の検討を行い、臨床における薬剤選択基準として応用する。

3. 研究の方法

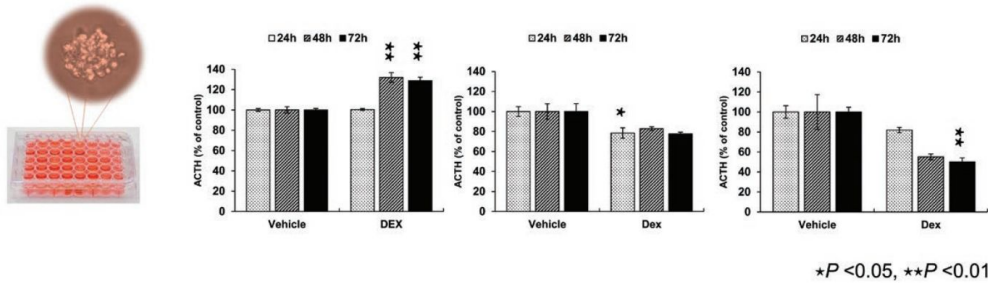
- 1) 下垂体腺腫術後検体をコラゲナーゼ、蛋白分解酵素、DNase1 を用いて分散させ、マトリゲル内に包埋して 3 次元培養としてスフェロイド培養を行う。
- 2) レンチウイルスベクターを用いて *CRNDE* の強制発現系を構築し、細胞増殖を Realtime Glo を用いて測定する。
- 3) グルココルチコイドポジティブフィードバックを呈する ACTHoma について 3D 培養系を用いてデキサメタゾン投与により、その病態を解析する。
- 4) GH 産生下垂体腺腫 (GHoma)、PRL 産生下垂体腺腫 (PRLoma) についても同様の検討を行う。
- 5) 薬剤検討として、ドパミン作動薬 (カベルゴリン)、アルキル化剤 (テモゾロミド)、抗悪性腫瘍剤 (カペシタビン) についてその効果を検討する

4. 研究成果

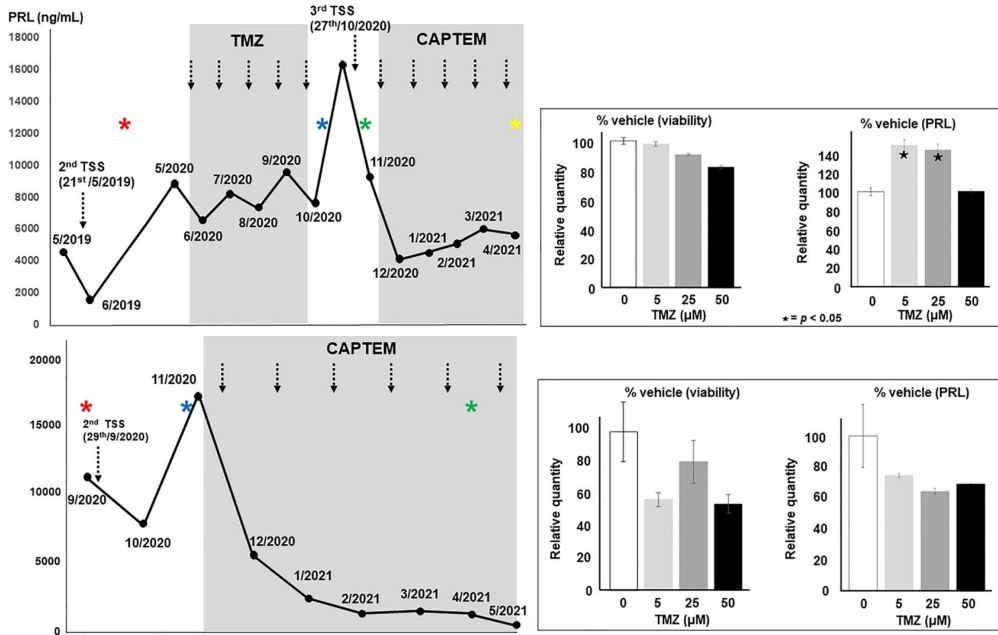
1) まず我々は ACTHoma の術後検体を用いてオルガノイド培養系作成を試みた。Wnt3a を用いた下垂体オルガノイド用に調整した培地によりパッセージ 2 (P2) の Day21 まではコンスタントに ACTH 分泌の維持を確認する事ができたが、その後 P3 では ACTH 分泌を失い、細胞が増殖もできなくなることから、ヒト ACTHoma によるオルガノイド系の確立は現在の条件設定では困難である事が明らかとなった。同様の結果がマウス下垂体からオルガノイド系を確立したハンガリーのグループからも報告されており、更なる発展が必要である。また、このことから *CRNDE* のレンチウイルスベクターの作成には成功したものの、その機能を確認するオルガノイド実験系として使用する事は現時点では難しいと考えられた。



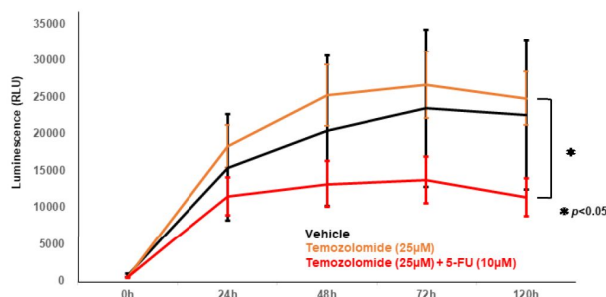
2) 我々は ACTHoma の 3D スフェロイド培養系を確立していたため、本実験モデルを用いて ACTHoma の特殊な病態について検討を行った。ACTHoma は通常 ACTH を抑制する作用を持つグルココルチコイドに対して ACTH が十分に抑制されない事が知られており、これが臨床の現場ではデキサメタゾン抑制試験として診断に用いられる。一方、稀にグルココルチコイドに対して ACTH が上昇するという腫瘍がある事が知られており、ポジティブフィードバックとして知られている。また、このような腫瘍は周期性クッシング症候群を呈する事も知られている。我々は明石医療センターとの共同研究で、このようなポジティブフィードバックを呈する周期性クッシング症候群症例の術後検体を用いてスフェロイド培養系を作成し、実際の腫瘍においてもグルココルチコイドに対してポジティブフィードバックを呈している事を初めて明らかにし、Journal of the Endocrine Society に報告した (J Endocr Soc. 2021 Mar 30;5(6):bvab055.)

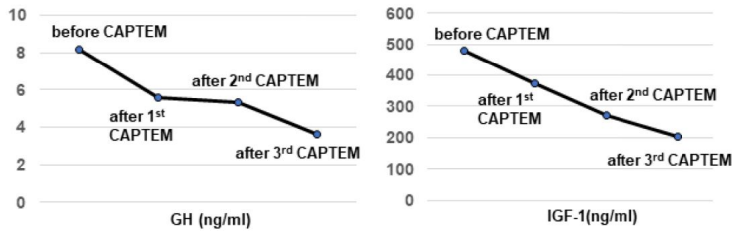


3) 次に下垂体腺腫の3Dスフェロイド培養系を用いて臨床薬剤抵抗性を示した症例に対して薬剤感受性を検討する系として本モデルを用いた。PRLomaはカベルゴリンが第一選択薬で、多くの症例に対し奏功性を示す。しかし、カベルゴリン抵抗性を示す症例は増殖性も高いものが多く、複数回の手術でも寛解に至らず、治療に難渋するものが多い。現在次の手としてテモゾロミドの効果が示されているが、近年更なる効果を示す治療薬としてテモゾロミドとカペタビン併用するCAPTEM療法の効果が主にACTHomaに対して示された。しかし、PRLomaについては不明な点も多かったため、我々はこの感受性をPRLoma術後スフェロイド培養系を用いて検討したところ、スフェロイド系におけるテモゾロミド抵抗性は患者におけるテモゾロミドに対する抵抗性と一致し、そのような症例におけるCAPTEMの効果を初めて報告した。その際このスフェロイド系が薬剤選択の予測ツールとして有用である可能性を初めて示し、報告した(Pituitary. 2022 Apr;25(2):238-245.)



4) 上記PRLomaの結果を得、アグレッシブなGHomaについても術後検体に対し3Dスフェロイド培養系を用いて同様にテモゾロミド単剤とCAPTEMによる薬剤感受性の検討を行い、CAPTEMでのより強い腫瘍増殖抑制効果を認めため、倫理委員会の承認を得たうえでCAPTEM治療を行ったところ、著明な腫瘍縮小とGH、IGF-1抑制というホルモン抑制効果を認めた。本研究はGHomaに対するCAPTEM効果を示した世界でも初めての報告であり、Frontiers in Oncologyに報告した。今後の本治療法の臨床応用が期待される(Front Oncol. 2022 May 26;12:916982.)





引用文献

Melmed S, Kaiser UB, Lopes MB, Bertherat J, Syro LV, Raverot G, Reincke M, Johannsson G, Beckers A, Fliseriu M, Giustina A, Wass JAH, Ho KKY. Clinical Biology of the Pituitary Adenoma. *Endocr Rev.* 2022:bnac010.

Sakuma I, Higuchi S, Fujimoto M, et al. Cushing syndrome due to ACTH-secreting pheochromocytoma, aggravated by glucocorticoid-driven positive-feedback loop. *J Clin Endocrinol Metab.* 101:2016;841-846.

McCormack A, Dekkers O. M, Petersenn S, Popovic V, Trouillas J, Raverot G, Burman P, & ESE survey collaborators. Treatment of aggressive pituitary tumours and carcinomas: results of a European Society of Endocrinology (ESE) survey 2016, *European Journal of Endocrinology*,178,2018,265-276.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Yasutaka Tsujimoto, Hiroki Shichi, Hidenori Fukuoka, Masaaki Yamamoto, Itsuko Sato, Takamitsu Imanishi, Tomoaki Nakamura, Naoko Inoshita, Atsushi Ishida, Shozo Yamada, Yutaka Takahashi, Kazuo Chihara	4. 巻 5
2. 論文標題 Tumor shrinkage by metyrapone in Cushing's disease exhibiting glucocorticoid-induced positive feedback	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the Endocrine Society	6. 最初と最後の頁 bvab055
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/jendso/bvab055	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 Fukuoka H, Shichi H, Yamamoto M, Takahashi Y.	4. 巻 21
2. 論文標題 Share The Mechanisms Underlying Autonomous Adrenocorticotrophic Hormone Secretion in Cushing's Disease.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 9132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21239132.	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 Yamada T, Fukuoka H, Hosokawa Y, Odake Y, Yoshida K, Matsumoto R, Bando H, Okada Y, Hirota Y, Iguchi G, Ogawa W, Takahashi Y.	4. 巻 20
2. 論文標題 Share Patients with pheochromocytoma exhibit low aldosterone renin ratio-preliminary reports.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Endocr Disord.	6. 最初と最後の頁 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12902-020-00620-6.	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 Kanzawa M, Fukuoka H, Yamamoto A, Suda K, Shigemura K, Hara S, Imagawa N, Tsukamoto R, Aoyama Y, Nakamura Y, Fujisawa M, Ogawa W, Takahashi Y, Itoh T.	4. 巻 4
2. 論文標題 Adrenal Corticomedullary Mixed Tumor Associated With the FGFR4-G388R Variant.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Endocr Soc	6. 最初と最後の頁 bvaa101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/jendso/bvaa101.	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 Fukuoka H, Shigemura K, Kanzawa M, Kanda T, Yamamoto M, Kitagawa K, Sakamoto M, Iguchi G, Ogawa W, Fujisawa M, Takahashi Y	4. 巻 69
2. 論文標題 The impact of adrenal tumor multidisciplinary team meetings on clinical outcomes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrine.	6. 最初と最後の頁 519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12020-020-02361-x. Epub 2020 Jul 23.	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 Suda Kentaro, Fukuoka Hidenori, Yamazaki Yuto, Shigemura Katsumi, Mukai Miki, Otake Yukiko, Matsumoto Ryusaku, Bando Hironori, Takahashi Michiko, Iguchi Genzo, Fujisawa Masato, Oka Masahiro, Ono Katsuhiko, Chihara Kazuo, Sasano Hironobu, Ogawa Wataru, Takahashi Yutaka	4. 巻 105
2. 論文標題 Cardiac Myxoma Caused by Fumarate Hydratase Gene Deletion in Patient With Cortisol-Secreting Adrenocortical Adenoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism	6. 最初と最後の頁 dgaa163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/clinem/dgaa163	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 Araki Takako, Cooper Odelia, Fukuoka Hidenori	4. 巻 10
2. 論文標題 Editorial: Targeted Therapy for Pituitary Adenomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2019.00358	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 Hozumi Kaori, Fukuoka Hidenori, Otake Yukiko, Takeuchi Takehito, Uehara Tomoko, Sato Takeshi, Inoshita Naoko, Yoshida Kenichi, Matsumoto Ryusaku, Bando Hironori, Hirota Yushi, Iguchi Genzo, Taniguchi Masaaki, Otsuki Naoki, Nishigori Chikako, Kosaki Kenjiro, Hasegawa Tomonobu, Ogawa Wataru, Takahashi Yutaka	4. 巻 66
2. 論文標題 Acromegaly caused by a somatotroph adenoma in patient with neurofibromatosis type 1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 853 ~ 857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ19-0035	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 Yamamoto Masaaki, Iguchi Genzo, Bando Hironori, Kanie Keitaro, Hidaka-Takeno Ryoko, Fukuoka Hidenori, Takahashi Yutaka	4. 巻 41
2. 論文標題 Autoimmune Pituitary Disease: New Concepts With Clinical Implications	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrine Reviews	6. 最初と最後の頁 261 ~ 272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/edrv/bnz003	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 Matsumoto Ryusaku, Suga Hidetaka, Aoi Takashi, Bando Hironori, Fukuoka Hidenori, Iguchi Genzo, Narumi Satoshi, Hasegawa Tomonobu, Muguruma Keiko, Ogawa Wataru, Takahashi Yutaka	4. 巻 130
2. 論文標題 Congenital pituitary hypoplasia model demonstrates hypothalamic OTX2 regulation of pituitary progenitor cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 641 ~ 654
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI127378	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 Ishida Atsushi, Shichi Hiroki, Fukuoka Hidenori, Shiramizu Hideki, Inoshita Naoko, Yamada Shozo	4. 巻 12
2. 論文標題 Temozolomide and Capecitabine Treatment for an Aggressive Somatotroph Pituitary Tumor: A Case Report and Literature Review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 916982
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2022.916982	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 Shichi Hiroki, Fukuoka Hidenori, Kanzawa Maki, Yamamoto Masaaki, Yamamoto Naoki, Suzuki Masaki, Urai Shin, Matsumoto Ryusaku, Kanie Keitaro, Fujita Yasunori, Bando Hironori, Iguchi Genzo, Inoshita Naoko, Yamada Shozo, Takahashi Yutaka, Ogawa Wataru	4. 巻 25
2. 論文標題 Responsiveness to DDAVP in Cushing's disease is associated with USP8 mutations through enhancing AVPR1B promoter activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pituitary	6. 最初と最後の頁 496 ~ 507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11102-022-01220-4	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 Ishida Atsushi, Shichi Hiroki, Fukuoka Hidenori, Inoshita Naoko, Ogawa Wataru, Yamada Shozo	4. 巻 25
2. 論文標題 Efficacy of temozolomide combined with capecitabine (CAPTEM) on refractory prolactinomas as assessed using an ex vivo 3D spheroid assay	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pituitary	6. 最初と最後の頁 238 ~ 245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11102-021-01192-x	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 Yamamoto Naoki, Urai Shin, Fukuoka Hidenori, Yamamoto Masaaki, Yoshida Kenichi, Suzuki Masaki, Shichi Hiroki, Fujita Yasunori, Kanie Keitaro, Iguchi Genzo, Takahashi Yutaka, Ogawa Wataru	4. 巻 13
2. 論文標題 The Effect of Aging on Quality of Life in Acromegaly Patients Under Treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 819330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2022.819330	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 Mizukoshi Tadashi, Fukuoka Hidenori, Takahashi Yutaka	4. 巻 36
2. 論文標題 Immune checkpoint inhibitor-related hypophysitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism	6. 最初と最後の頁 101668 ~ 101668
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.beem.2022.101668	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 Yamamoto Masaaki, Nakao Takahiro, Ogawa Wataru, Fukuoka Hidenori	4. 巻 12
2. 論文標題 Aggressive Cushing's Disease: Molecular Pathology and Its Therapeutic Approach	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 650791
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2021.650791	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 Inaba Yuiko, Yamamoto Masaaki, Urai Shin, Suzuki Masaki, Nishikage Seiji, Kanzawa Maki, Aoyama Yayoi, Kanda Tomonori, Shigemura Katsumi, Bando Hironori, Iguchi Genzo, Nakamura Yasuhiro, Fujisawa Masato, Imagawa Akihisa, Fukuoka Hidenori, Ogawa Wataru	4. 巻 12
2. 論文標題 Bilateral adrenal uptake of 123I MIBG scintigraphy with mild catecholamine elevation, the diagnostic dilemma, and its characteristics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-13132-1	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 1Hiroki Shichi, 2Yasutaka Tsujimoto, 3Hidenori Fukuoka, 3Masaaki Yamamoto, 2Tomoaki Nakamura, 4Atsushi Ishida, 4Shozo Yamada, 1Yutaka Takahashi, 2Kazuo Chihara
2. 発表標題 A Case of Cushing's Disease with Glucocorticoid Positive-Feedback
3. 学会等名 ENDO2020 (国際学会)
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 志智大城1)、福岡秀規2)、浦井伸1)、蟹江慶太郎1)、藤田泰功1)、山本雅昭2)、井口元三3)、山田正三4)、小川涉1)、高橋裕1)
2. 発表標題 Cushing病におけるCRH試験の反応性と関連する臨床的特徴の検討
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 合田 菜穂1)、福岡 秀規1)、岡田 裕子1)、廣田 勇士1)、井口 元三1)、臼井 健2)、小川 涉3)、高橋 裕3)
2. 発表標題 SCSに両側性PAを合併したPBMAHの一例
3. 学会等名 第29回臨床内分泌代謝Update
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 矢崎 義雄	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 5
3. 書名 新臨床内科学	

1. 著者名 南学正臣、伊藤 裕、大田 健、小澤敬也、下村伊一郎、田中章景、千葉 勉、伴 信太郎、平井豊博、深川雅史、福田恵一、藤田次郎、三森経世、持田 智、山田俊幸、山本和利	4. 発行年 2019年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 4
3. 書名 内科学書	

〔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	高橋 裕 (Takahashi Yutaka) (70301281)	神戸大学・医学研究科・客員教授 (14501)	
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)	
研究分担者	青井 貴之 (Aoi Takashi) (00546997)	神戸大学・科学技術イノベーション研究科・教授 (14501)	

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
---------	---------