

令和 2 年 5 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06229・19K21329

研究課題名(和文)ニューロメジンBはクッシング病の新規治療薬となるか

研究課題名(英文)Neuromedin B receptor antagonist as a new treatment for Cushing disease

研究代表者

亀田 啓 (Kameda, Hiraku)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：20826127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：下垂体腺腫が原因となる難治性疾患であるクッシング病の新規治療法を見つけ出すための研究を行った。ニューロメジンBの働きを抑えることで腫瘍からのホルモンの過剰分泌や腫瘍の増大が抑制されることを細胞実験で証明した。実験動物(マウス)を用いた研究についてもクッシング病のモデルマウスを米国より取り寄せ繁殖させ、成長した段階で実験を行う予定である。また、下垂体手術の際に得られるヒトの下垂体腺腫の細胞を用いた研究も準備が進んでおり、今後検討予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クッシング病は副腎皮質刺激ホルモン産生下垂体腺腫を原因とする難治性疾患である。手術が第一選択として行われるが、寛解率は高くなく、有効な治療薬が望まれている。本研究ではクッシング病の新たな治療薬候補としてニューロメジンBの働きを抑える薬剤を用いて検討を行った。まず細胞を用いた実験で同薬剤が細胞の増殖やACTHの分泌を抑えることを発見した。次にクッシング病のモデルマウスを米国より取り寄せた。今後同薬剤をマウスに投与する予定である。手術の際に得られた下垂体腫瘍検体を用いた検討も臨床研究として承認され、今後検討予定である。本研究からクッシング病の新たな治療薬を見出し患者の生活の質の向上が期待される。

研究成果の概要(英文)：To find a new treatment for Cushing disease, which is caused by pituitary ACTH secreting adenoma, we investigated the effects of neuromedin B (NMB) receptor antagonist in AtT-20 cells. NMB receptor antagonist successfully suppressed ACTH production and cell proliferation in AtT-20 cells. We have obtained the Cushing disease model mouse (Corti-EGFR mice) from Cedars-Sinai Medical Center (USA). We will treat them with NMB receptor antagonist and clarify the effects on pituitary adenoma in vivo. We are also performing clinical study using the human pituitary adenoma samples. We are now waiting for patients entry in the clinical study.

研究分野：内分泌学

キーワード：クッシング病 下垂体腫瘍 副腎皮質刺激ホルモン ニューロメジンB

1. 研究開始当初の背景

< 研究の学術的背景と目的 >

申請者らは神経ペプチドであるニューロメジン B (NMB) が副腎不全状態のマウスの ACTH 産生細胞においてその発現が亢進していることを発見し、NMB と ACTH の分泌において関連性を指摘してきた (Kameda et al. *Endocrinology* 2014)。ACTH 産生下垂体腺腫を原因とするクッシング病は難病に指定されているが、その病態としては下垂体腺腫から分泌された過剰な ACTH が副腎皮質からのコルチゾール分泌を刺激し、高コルチゾール血症を引き起こす。臨床症状としては中心性肥満や皮膚のひ薄化などの外見上の変化、高血圧、高血糖、骨粗しょう症などの代謝異常、易感染性、精神異常など多彩な症状を呈し、感染症から死に至ることもまれではない。治療法としては外科的下垂体腺腫摘除が第一選択であるが、1cm を超える腺腫では寛解率は 43% と低く、また寛解例でも 33% が再発すると報告されている (Nieman et al. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015)。薬剤治療としては現在コルチゾール合成酵素阻害薬であるメチラポンが使用されているが、副腎に作用し高コルチゾール血症を是正し合併症を抑制することが目的であり、下垂体腫瘍を標的とした薬剤が望まれている。

< 関連する研究の動向と本研究の関連 >

近年上皮成長因子受容体 (EGFR) がクッシング病の病態に関わることが報告され (Fukuoka et al. *JCI* 2011)、また EGFR をユビキチン化する USP8 の遺伝子異常がクッシング病の原因となりうることも報告されている (Reincke et al. *Nat Genet* 2015)。申請者らは下垂体プロオピオメラノコルチン (POMC) 産生細胞特異的 EGFR 過剰発現マウスを作成し、ACTH 産生下垂体腺腫のモデル動物として治療薬の効果を *in vivo* で評価できる系を樹立した (Araki, Kameda et al. *J Endocr Soc.* 2017, 研究業績 1)。申請者らは神経ペプチドであるニューロメジン B (NMB) が副腎不全状態のマウスの ACTH 産生細胞においてその発現が亢進していることを発見し、NMB と ACTH の分泌において関連性を指摘してきた (Kameda et al. *Endocrinology* 2014)。NMB 受容体は EGFR のチロシンキナーゼリン酸化を促進することが報告されており (Moody et al. *Eur J Pharmacol.* 2010)、NMB 受容体拮抗薬は EGFR の非活性化を介して ACTH 産生を抑制できる可能性が考えられる。

< 本研究の特徴と予想される成果 >

申請者らは以前に作成した ACTH 産生下垂体腺腫のモデル動物を用いて NMB 受容体拮抗薬の効果を *in vivo* で評価することができる (Araki, Kameda et al. *J Endocr Soc.* 2017)。また脳神経外科と連携しヒト下垂体腺腫の検体を用いて実験を行うことで、細胞株、マウスで得られた知見をヒトの下垂体腺腫細胞に対して応用できるかどうかを確認することができ、さらに臨床情報との関連を検討することで NMB 受容体拮抗薬の効果が期待できる患者群を同定できる。これらの評価系により基礎研究から臨床への応用が迅速に行える環境が整っている。申請者らは予備的な検討で NMB ならびに NMB 受容体がヒト下垂体 ACTH 産生下垂体腺腫に発現していることを確認しており、また NMB 受容体拮抗薬をマウス下垂体腺腫細胞株 AtT-20 に投与することで細胞増殖抑制、ACTH の前駆体である *Pomc* 遺伝子発現抑制作用を認めた。以上から NMB 受容体拮抗薬が ACTH 産生下垂体腺腫のモデル動物やヒト検体においても効果があることが十分に期待でき、研究期間内に本計画を達成可能な準備が整っていると考える。このように本研究計画は NMB 受容体拮抗薬のクッシング病治療薬としての可能性を細胞実験からマウス、臨床検体・情報を用いて検討でき、将来的にクッシング病患者の QOL 向上に貢献できると考えられる。

< 根拠となる先行研究 >

計画を進めていく上で申請者は次のような予備的な研究結果を得ている (未発表)。

- (1) ヒト ACTH 産生下垂体腺腫において非機能性下垂体腺腫と比較して NMB、NMB 受容体の双方の発現が増加していることを免疫染色とリアルタイム PCR で確認した。
- (2) ACTH 産生マウス下垂体腺腫細胞株 AtT-20 細胞への NMB 受容体拮抗薬 (PD168368) 投与によって *Pomc* 遺伝子発現抑制効果と細胞増殖抑制効果を有することを確認した。

以上から NMB 受容体拮抗薬が ACTH 産生下垂体腺腫のモデル動物やヒト検体においても効果があることが十分に期待でき、研究期間内に本計画を達成可能な準備が整っていると考えられる。

2. 研究の目的

上記の背景・先行研究から「NMB 受容体拮抗薬がクッシング病の新規治療薬となるか」を検討することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

本研究では NMB 受容体拮抗薬のヒト下垂体 ACTH 産生腺腫への治療薬としての可能性を追求するとともに、その作用機序を検討する。具体的には以下の研究を行った

(1)NMB 受容体拮抗薬の Pomc 遺伝子発現抑制ならびに細胞増殖抑制効果の作用機序の解明

具体的方法：AtT-20 細胞を PD168368 が各濃度で混合された培養液中で 24 時間培養したのち RNA、蛋白質を抽出する。リアルタイム PCR 法で Pomc ならびにその転写に関する転写因子や細胞周期に関する蛋白の発現を調べる。ウェスタンブロット法で CaMKII、CREB、AKT、ERK などの POMC の転写促進に関する蛋白や細胞周期関連蛋白のリン酸化を評価する

(2)NMB 受容体拮抗薬のクッシング病モデルマウスへの投与による生体内効果の確認

前述のクッシング病モデルマウスに対して NMB 受容体拮抗薬 PD168368 を投与し高 ACTH 血症の改善が見られるかを調べると共に、マウスの健康状況を体重や摂餌量、活動性から評価し薬剤としての副作用についても評価する。

具体的方法：1.2mg/kg の PD168368 をマウス腹腔内に 3 週間連続投与したのち血液を採取し、血中 ACTH、コルチコステロンを測定し治療による高 ACTH 血症の改善が見られるかを調べる。また下垂体から蛋白を抽出し、POMC 蛋白や の実験で確認した転写因子や細胞周期関連蛋白の発現を調べ、対照群と比較する。健康状況についても適宜確認し副作用を評価する。

(3)NMB 受容体拮抗薬のヒト下垂体腺腫における効果の検討

患者より得られたヒト ACTH 下垂体腺腫細胞に PD168368 を投与し、Pomc 遺伝子発現低下や細胞増殖抑制効果が得られるかを調べる。

具体的方法：脳神経外科での下垂体腺腫摘出術時に腫瘍の一部を採取し培養プレートに播種する。ACTH 下垂体腺腫に加え対照群として非機能性下垂体腺腫の細胞についても同様に検討する。PD168368 を各濃度で投与し、24 時間後に培養上清、RNA を採取し培養液中 ACTH 濃度を ELISA 法で、Pomc 遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で評価する。細胞生存率については同様の薬物投与後に生細胞、死細胞を染色して評価する。

PD168368 投与による培養液中 ACTH 濃度の低下を認めた場合、ACTH 低下率と患者の年齢、性別、手術前の血中 ACTH・コルチゾール濃度や腫瘍の大きさなどの臨床情報との相関を調べ、NMB 受容体拮抗薬の効果を期待できる患者群を同定する。

4 . 研究成果

< 実験 1 >

AtT-20 細胞に溶媒ならびに PD168368 (10^{-10} ~ 10^{-6} M) を投与し、24 時間後に RNA ならびに蛋白を回収し、リアルタイム PCR 法ならびウェスタンブロット法で遺伝子ならびに蛋白発現を検討した。

ACTH の前駆蛋白質である Pomc 遺伝子の発現は濃度依存性に低下し、cFos、cJun、Creb、Nur77、Nurr1 などの転写因子も同様に濃度依存性に低下を認めた。Tpit、Neurod1 は低下しなかった (図 1)。

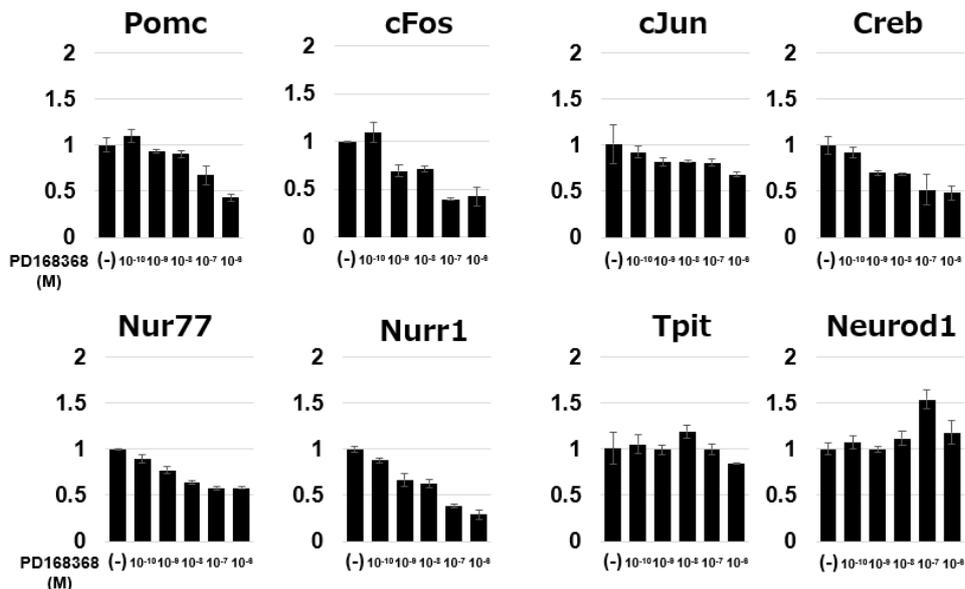


図 1：薬剤投与 24 時間後の AtT-20 細胞遺伝子発現の変化

ウェスタンブロット法での解析でも Pomc は低下した。またリン酸化 CREB は低下したがリン酸化 ERK1/2 は変化しなかった (図 2)。

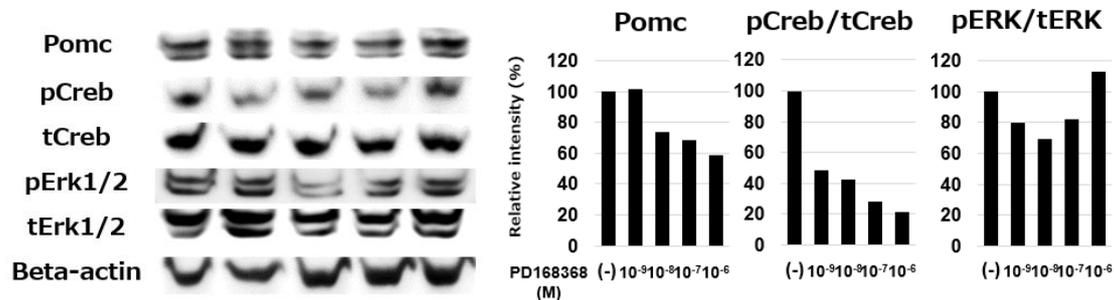


図 2：薬剤投与 24 時間後の AtT-20 細胞蛋白発現の変化

MTT アッセイを用いた薬剤投与後 24 時間後の細胞生存率では PD168368 は濃度依存性に細胞増殖を抑制した (図 3)。

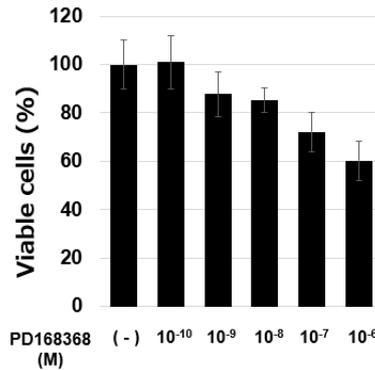


図 3：薬剤投与 24 時間後の AtT-20 細胞生存率

< 実験 1 の成果 >

NMB 受容体拮抗薬 PD168368 はマウス ACTH 産生下垂体腺腫細胞株において Pomc の発現を抑制した。発現抑制の機序としては CREB や cFos、Nur77 などの転写因子の発現・リン酸化抑制を介していることが示唆された。

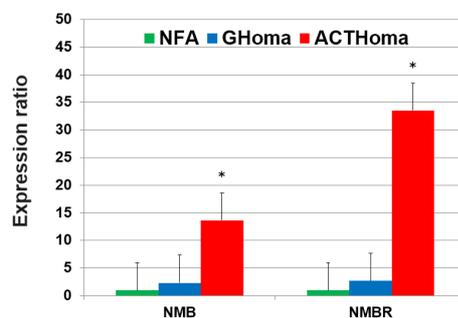
< 実験 2 >

クッシング病モデルマウスである Corti-EGFR マウス (Araki, Kameda et al. J Endocr Soc. 2017, 研究業績 1) を米国 Cedars-Sinai Medical Center の Melmed Lab より譲り受け、繁殖している段階である。MTA 契約、輸送等の手続きに時間を要した事ならびに表現型を呈するのに最低 8 か月かかるマウスであることから薬剤投与と実験は期間中に行えなかった。マウスの繁殖は順調に進んでおり、今後予定した実験を進めていく予定である。

< 実験 3 >

ヒト下垂体腺腫検体を用いるための臨床研究計画が承認され (自施設内番号 019-0111) クッシング病の患者のエントリーを待っている状態である。コントロールとして非機能性下垂体腺腫、GH 産生下垂体腺腫において下垂体腺腫の初代培養を行い、腺腫細胞の培養ならびに薬剤投与は問題なく行えることを確認した。

また、同臨床研究では過去の検体も研究対象に含まれており、ヒト下垂体腺腫細胞における NMB と NMB 受容体 (NMBR) の発現をリアルタイム PCR 法ならびに免疫染色法で検討した。リアルタイム PCR 法では非機能性下垂体腺腫 (NFA) や GH 産生下垂体腺腫 (GHoma) と比較して ACTH 産生下垂体腺腫 (ACTHoma) で NMB と NMBR の発現上昇していた (図 4)。



mean ± SEM, n = 8-10, *p < 0.05, ANOVA

図 4：ヒト下垂体腺腫における NMB と NMBR 遺伝子発現

免疫染色では NFA では NMB、NMBR 陽性細胞は認めず、GHoma では一部の GH 産生細胞に陽性であった。ACTHoma では背景細胞を含めて広範囲に陽性であった (図 5)。

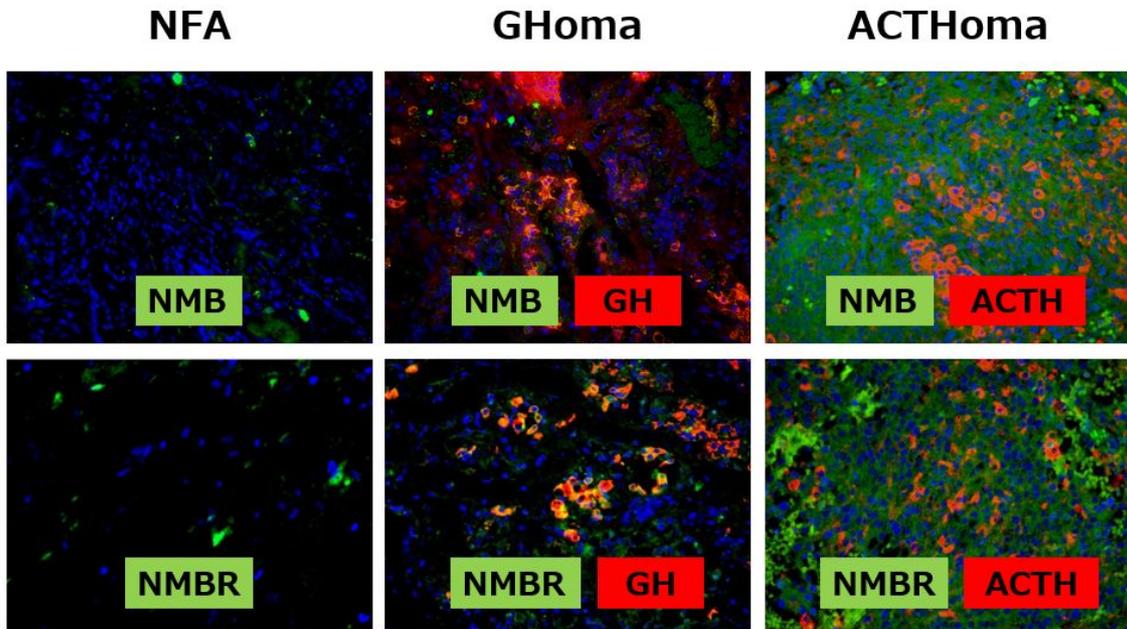


図 5：ヒト下垂体腺腫における NMB と NMBR 蛋白発現

<実験 3 の成果>

ヒト ACTH 産生下垂体腺腫において NMB ならびにその受容体 (NMBR) が双方発現していた。ACTH 産生下垂体腺腫は NMB を分泌し、自己分泌 (autocrine) あるいは傍分泌 (paracrine) の機序を通して自己の増殖や ACTH 分泌を増加させている可能性が考えられた。NMB 受容体拮抗薬 (PD168368) はその機序をブロックし、腫瘍縮小や ACTH 分泌抑制できる可能性が示唆された (図 6)。

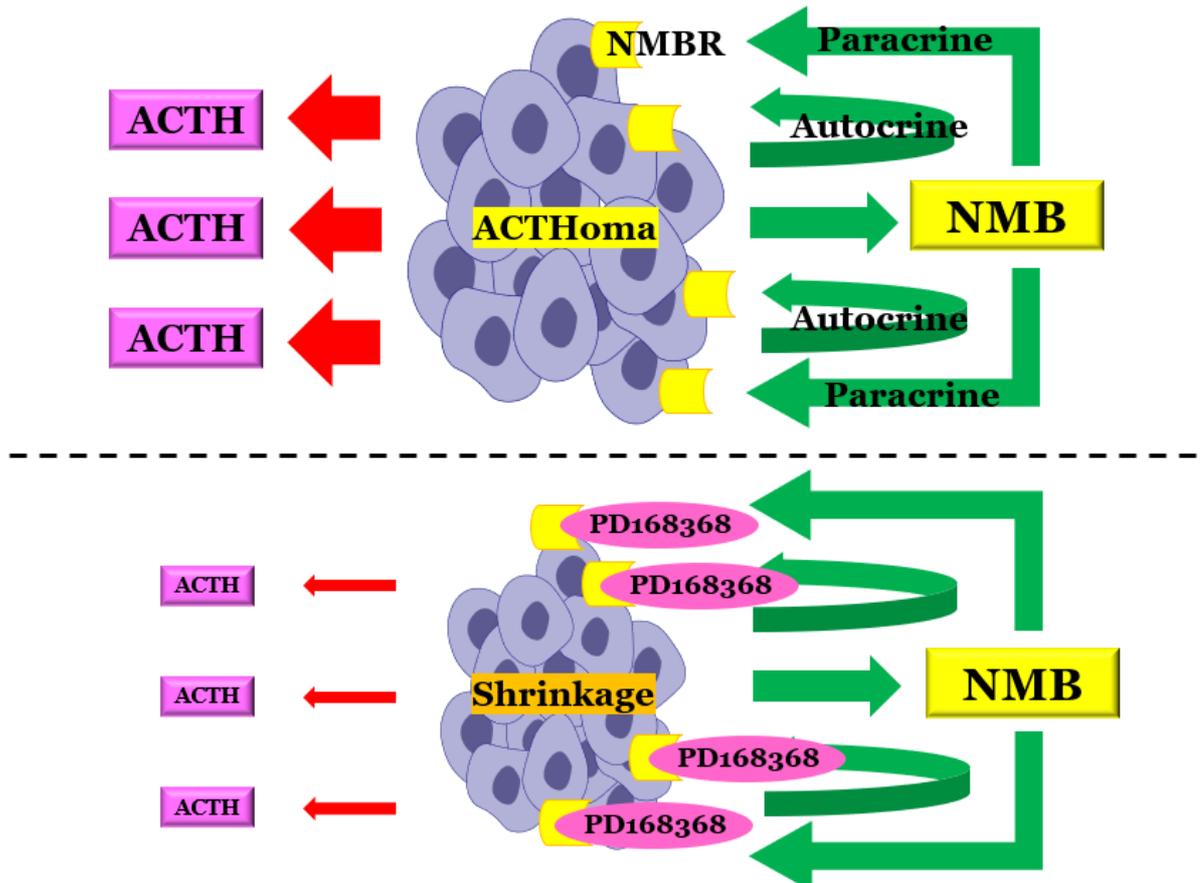


図 6：ヒト下垂体腺腫における NMB の分泌と NMB 受容体拮抗薬の作用仮説

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 亀田 啓
2. 発表標題 Neuromedin B receptor antagonist suppress Pomc expression and cell proliferation in AtT-20 cells
3. 学会等名 16th Pituitary Congress (国際学会)
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----