

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17481

研究課題名（和文）ニューロメジンB受容体拮抗薬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 antagonists as a novel treatment for Cushing's 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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、マウスACTH産生細胞株であるAtT-20細胞を用いた検討でニューロメジンB受容体拮抗薬PD168368の投与によりACTH産生ならびに腫瘍増殖がいずれも抑制され、さらにサイクリンEの遺伝子発現も抑制を認めた。AtT-20を胸腺無形成マウスの皮下に投与したマウスへのPD168368の投与により血中ACTH、コルチコステロンの低下を認め、生体への投与についても効果を発揮する可能性が示された。ヒトACTH下垂体腺腫細胞では半数の症例でPD168368の投与によりACTH分泌低下を認めた。以上から本検討によりニューロメジンB受容体拮抗薬がクッシング病の新規治療薬となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究からニューロメジンB受容体がクッシング病の新規治療ターゲットとなりうること、経路として細胞周期関連蛋白、特にサイクリンEの抑制を介することが初めて示された。クッシング病では手術で寛解に至らない場合の薬物治療薬の選択肢が限られており、ニューロメジンB受容体拮抗薬が将来的にクッシング病の新規治療薬として開発を進めることで、クッシング病患者のQOLの改善に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, using AtT-20 cells, a murine ACTH-producing cell line, we found that administration of the neuromedin B receptor antagonist PD168368 suppressed ACTH production, tumour growth and cyclin E gene expression. Administration of PD168368 to mice with thymic aplasia, transplanted AtT-20 cells subcutaneously, resulted in a decrease in blood ACTH and corticosterone, suggesting that PD168368 may also be effective when administered in vivo. In human ACTH pituitary adenoma cells, half of the cases showed decreased ACTH secretion after treatment with PD168368. These results suggest that a neuromedin B receptor antagonist may be a novel therapeutic agent for Cushing's disease.

研究分野：内分泌

キーワード：クッシング病 ACTH ニューロメジンB受容体

1. 研究開始当初の背景

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る。下垂体腫瘍を標的とした薬剤としてパシオレチドが近年使用されるようになったが奏効率は 41.9%にとどまり、新規薬剤が必要とされている。

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ということが報告され (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 (Reinke 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)。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。

2. 研究の目的

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 H et al. Endocrinology 2014)。また NMB の受容体は肺非小細胞癌細胞株で (Moody et al. Eur J Pharmacol. 2010) 発現しており、腫瘍の増殖因子として研究されていることから、腫瘍からの ACTH 分泌が亢進するクッシング病においても NMB が腫瘍の増殖やホルモン分泌に関与し、NMB 受容体拮抗薬が治療薬となる可能性を考えた。

申請者はクッシング病・ACTH 産生下垂体腺腫のモデルマウスを以前に作成しており (Araki, Kameda et al. J Endocr Soc. 2017)、本研究ではマウス ACTH 産生腺腫のモデル細胞である AtT-20 細胞、クッシング病モデルマウス、ヒト ACTH 産生下垂体腺腫細胞をそれぞれ用いて実験を行い、薬剤の作用機序から臨床応用までを評価することを目的とする。

3. 研究の方法

・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

申請者らは予備実験で NMB 受容体拮抗薬 PD168368 がマウス下垂体 ACTH 産生腺腫由来細胞株である AtT-20 細胞の細胞増殖効果、Pomc 遺伝子発現抑制効果が見られることを確認した。本年度は上記の効果がどのような細胞内シグナルを介しているかについて検討を加える。

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。DNA マイクロアレイ法で薬剤投与によって変化するシグナル伝達系を同定し、リアルタイム PCR 法ならびにウェスタンブロット法でその系に関わる因子の変化が起きていることを確認する。

・NMB 受容体拮抗薬の AtT-20 移植無胸腺マウスへの投与による生体内効果の確認

AtT-20 移植無胸腺マウスに対して 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。マウスが表現型を呈するまでに約 8 ヶ月を要するため、マウスの交配は令和 2 年度中から開始し、本年度に薬剤投与実験を行う。

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。健康状況についても適宜確認し副作用を評価する。

・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見られるかを調べる。ACTH 下垂体腺腫は発症頻度が低い疾患であるため、十分な症例数を得るため本実験については令和 1 年度に院内倫理委員会に計画を提出済みであり、令和 2 年度から 4 年度にかけて対象患者の組み入れを行う予定である。

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。

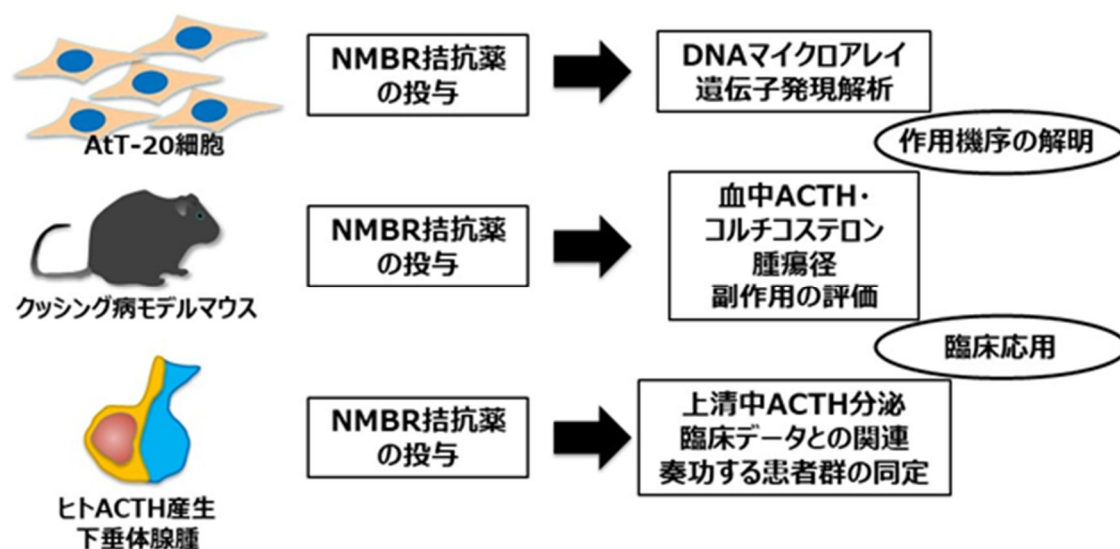


図 1 実験計画のまとめ

4. 研究成果

・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

マウス下垂体癌細胞株である AtT-20 細胞をニューロメジン B (NMB) 受容体拮抗薬である 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、蛋白質を抽出して解析した。リアルタイム PCR 法では c-Fos、Nur77 などの転写因子の発現低下を認めた (図 2)。また、ウェスタンブロッティング法では Pomc、サイクリン E1、CDK2 を抑制することが示された。WST-1 アッセイを用いた細胞増殖抑制効果の検討では PD168368 の投与 24 時間後の細胞生存率はコントロールと比較して 60%まで低下した。

マイクロアレイ解析ではニューロメジン B 受容体拮抗薬 PD168368 の AtT-20 細胞への投与によって、パスウェイ解析では細胞周期、脂肪合成系、mRNA プロセッシング、p53 シグナリング、コレステロール代謝などにかかわる遺伝子系の変化が大きかった。特に細胞周期について、クッシング病腫瘍細胞で発現が報告されているサイクリン E の遺伝子発現を検討したところ PD168368 の投与により抑制を認め、NMBR 拮抗薬の腫瘍抑制機序に関連すると考えられた。

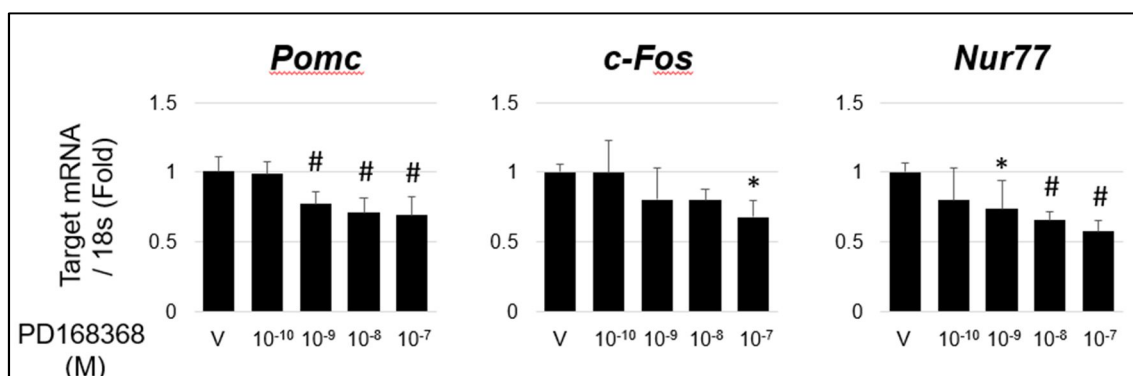


図 2 リアルタイム PCR

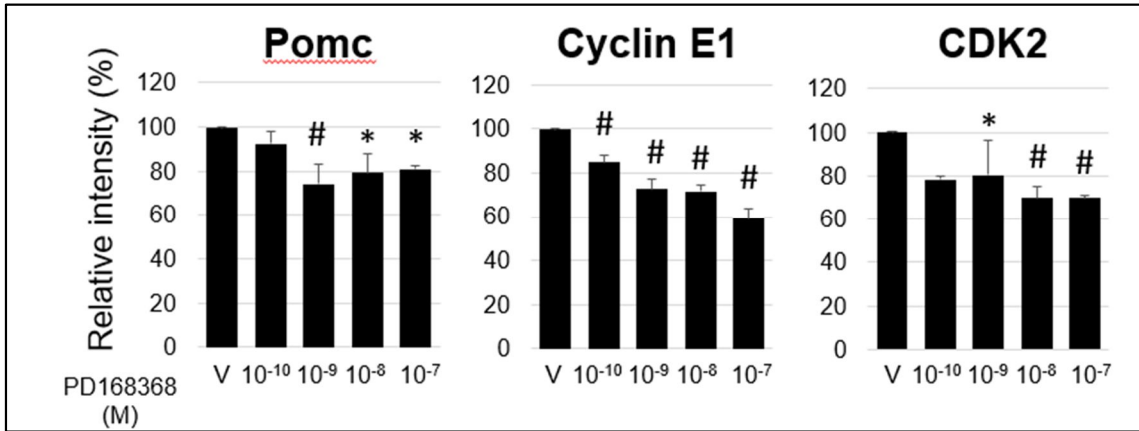


図3 ウェスタンブロッティング

・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

AtT-20 を胸腺無形成マウスの皮下に投与したのちに PD168368 ならびに対照としての DMSO を連日腹腔内投与し腫瘍サイズの測定並びに投与 2 週後の血中 ACTH、コルチコステロンを測定した。腫瘍サイズは PD168368 群で有意に小さく、2 週投与後の血中 ACTH、コルチコステロンも PD168368 群で有意に低かった (図 4、図 5)。

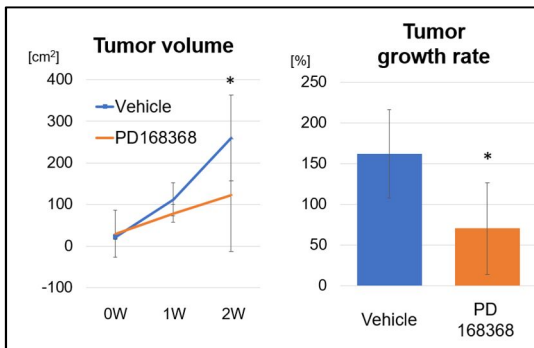


図4 腫瘍サイズ・増殖率

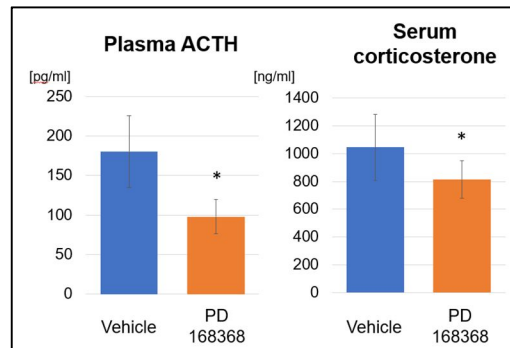


図5 血中 ACTH・コルチコステロン

・NMB 受容体拮抗薬のヒト下垂体腺腫における効果の検討

ヒト副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 産生下垂体腺腫の検討の症例を追加し計 7 例での検討を行った。ニューロメジン B 受容体拮抗薬 PD168368 の投与により 6 例中 4 例で POMC 遺伝子発現の低下、3 例でサイクリン E の低下、上清中 ACTH 濃度の低下を認めた (図 6、図 7)。

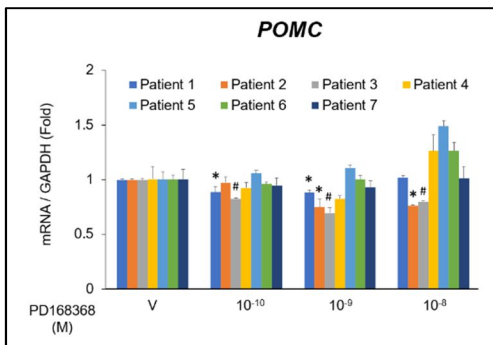


図6 リアルタイム PCR

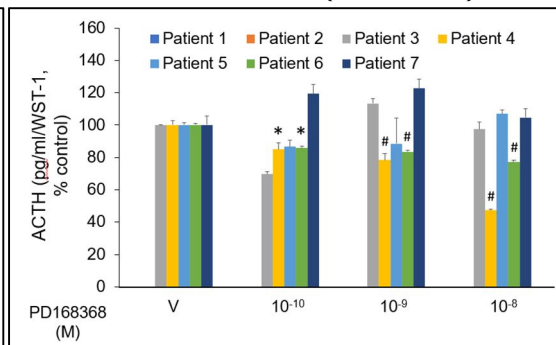


図7 上清中 ACTH 濃度

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Handa T, Nakamura A, Miya A, Nomoto H, Kameda H, Cho KY, Nagai S, Yoshioka N, Miyoshi H, Atsumi T.	4. 巻 1
2. 論文標題 The association between hypoglycemia and glycemic variability in elderly patients with type 2 diabetes: a prospective observational study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetol Metab Syndr	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13098-021-00656-1	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 -
1. 著者名 Yamauchi Yuki, Kameda Hiraku, Omori Kazuno, Tani Michio, Cho Kyu Yong, Nakamura Akinobu, Miyoshi Hideaki, Tanaka Shinya, Atsumi Tatsuya	4. 巻 21
2. 論文標題 Severe infection including disseminated herpes zoster triggered by subclinical Cushing's disease: a case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Endocrine Disorders	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12902-021-00757-y	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 Miya Aika, Nakamura Akinobu, Handa Takahisa, Nomoto Hiroshi, Kameda Hiraku, Cho Kyu Yong, Nagai So, Ito Yoichi M., Miyoshi Hideaki, Atsumi Tatsuya	4. 巻 11
2. 論文標題 Log-linear relationship between endogenous insulin secretion and glycemic variability in patients with type 2 diabetes on continuous glucose monitoring	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-88749-9	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 Sekizaki Tomonori, Kameda Hiraku, Nomoto Hiroshi, Cho Kyu Yong, Nakamura Akinobu, Takahashi Kiyohiko, Miyoshi Arina, Wada Norio, Takeuchi Jun, Nagai So, Miyoshi Hideaki, Atsumi Tatsuya	4. 巻 12
2. 論文標題 Dipeptidyl peptidase 4 inhibitor might exacerbate Graves' disease: A multicenter observational case control study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 1978-1982
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13578	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 POMC 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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Oba-Yamamoto Chiho, Kameda Hiraku, Miyoshi Hideaki, Sekizaki Tomonori, Takase Takahiro, Yanagimachi Tsuyoshi, Fujita Yukihiko, Nomoto Hiroshi, Cho Kyu Yong, Nakamura Akinobu, Nagai So, Atsumi Tatsuya	4. 巻 60
2. 論文標題 Acromegaly Cases Exhibiting Increased Growth Hormone Levels during Oral Glucose Loading with Preadministration of Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 2375-2383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.4755-20	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 Hashimoto-Kameda Reina, Cho Kyu Yong, Nomoto Hiroshi, Nakamura Akinobu, Omori Kazuno, Nagai So, Edagawa Sachiko, Kawata Shinichiro, Takeuchi Jun, Kameda Hiraku, Kurihara Yoshio, Aoki Shin, Atsumi Tatsuya, Miyoshi Hideaki	4. 巻 180
2. 論文標題 Lowering of blood pressure and pulse rate by switching from DPP-4 inhibitor to luseogliflozin in patients with type 2 diabetes complicated with hypertension: A multicenter, prospective, randomized, open-label, parallel-group comparison trial (LUNA study)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetes Research and Clinical Practice	6. 最初と最後の頁 109069-109069
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.diabres.2021.109069	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 Chiba Koki, Kameda Hiraku, Miya Aika, Nomoto Hiroshi, Cho Kyu Yong, Nakamura Akinobu, Jin Shigeki, Matoba Kotaro, Miyoshi Hideaki, Atsumi Tatsuya	4. 巻 32
2. 論文標題 False Hypercortisolemia Due to Abnormal Albumin-Cortisol Binding in a Patient with Familial Dysalbuminemic Hyperthyroxinemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Thyroid	6. 最初と最後の頁 219-220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/thy.2021.0460	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 Kawata Shinichiro, Nakamura Akinobu, Miyoshi Hideaki, Yang Kelaier, Shigesawa Ikumi, Yamauchi Yuki, Tsuchida Kazuhisa, Omori Kazuno, Takahashi Kiyohiko, Nomoto Hiroshi, Kameda Hiraku, Cho Kyu Yong, Terauchi Yasuo, Atsumi Tatsuya	4. 巻 24
2. 論文標題 Glucokinase activation leads to an unsustained hypoglycaemic effect with hepatic triglyceride accumulation in db/db mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetes, Obesity and Metabolism	6. 最初と最後の頁 391-401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dom.14586	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 Oe Yuki, Kameda Hiraku, Nomoto Hiroshi, Sakamoto Keita, Soyama Takeshi, Cho Kyu Yong, Nakamura Akinobu, Iwasaki Koji, Abo Daisuke, Kudo Kohsuke, Miyoshi Hideaki, Atsumi Tatsuya	4. 巻 100
2. 論文標題 Favorable effects of burosumab on tumor-induced osteomalacia caused by an undetectable tumor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e27895-e27895
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000027895	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 Takahashi Yuka, Kameda Hiraku, Miya Aika, Nomoto Hiroshi, Cho Kyu Yong, Nakamura Akinobu, Nishimura Hiroki, Kimura Hirokazu, Suzuki Masaru, Konno Satoshi, Shimizu Ai, Matsuno Yoshihiro, Okamoto Michinari, Motegi Hiroaki, Iwata Naoko, Fujisawa Haruki, Suzuki Atsushi, Sugimura Yoshihisa, Miyoshi Hideaki, Atsumi Tatsuya	4. 巻 25
2. 論文標題 Lymphocytic panhypophysitis and anti-rabphilin-3A antibody with pulmonary sarcoidosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pituitary	6. 最初と最後の頁 321-327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11102-021-01200-0	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 Tokairin Kikutaro, Osanai Toshiya, Fujima Noriyuki, Ishizaka Kinya, Motegi Hiroaki, Ishi Yukitomo, Kameda Hiraku, Sugiyama Taku, Kazumata Ken, Nakayama Naoki	4. 巻 2021 Feb 24
2. 論文標題 Use of magnetic resonance venography for inferior petrosal sinus sampling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Vascular Access	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1129729821997263	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 Yuno Akiko, Kenmotsu Yoshiyuki, Takahashi Yuka, Nomoto Hiroshi, Kameda Hiraku, Cho Kyu Yong, Nakamura Akinobu, Yamashita Yu, Nakamura Junichi, Nakakubo Sho, Kamada Keisuke, Suzuki Masaru, Sugino Hirokazu, Inoshita Naoko, Konno Satoshi, Miyoshi Hideaki, Atsumi Tatsuya, Sawamura Yutaka, Shimatsu Akira	4. 巻 2020 Dec 24
2. 論文標題 Successful management of a patient with active Cushing's disease complicated with coronavirus disease 2019 (COVID-19) pneumonia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ20-0613	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 Baba Natsuki, Kameda Hiraku, Nakamura Akinobu, Yong Cho Kyu, Nomoto Hiroshi, Mitsuhashi Tomoko, Miyoshi Hideaki, Atsumi Tatsuya	4. 巻 68
2. 論文標題 Silent pituitary adenoma and metabolic disorders: obesity, abnormal glucose tolerance, hypertension and dyslipidemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 195 ~ 200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ20-0185	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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