



Title	ニューロメジンB受容体を標的としたACTH産生下垂体腺腫の新規治療法の探索〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	関崎, 知紀
Description	配架番号 : 2767
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15449号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89957
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	SEKIZAKI_Tomonori_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 関崎 知紀

学 位 論 文 題 名

ニューロメジン B 受容体を標的とした ACTH 産生下垂体腺腫の新規治療法の探索
(Exploration of novel treatment for ACTH-producing pituitary adenoma targeting neuromedin B receptor)

【背景と目的】クッシング病は下垂体腺腫からの過剰な副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）分泌により高コルチゾール血症をきたすことで感染症などの合併症を招き、生命予後を悪化させる。治療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約 60%とされ、再発率も高い（Pivonello et al., 2015）。薬剤治療としてはソマトスタチンアナログ製剤であるパシレオチドやコルチゾール合成酵素阻害薬であるメチラポン、オシドロスタットが使用されている。しかし、パシレオチドは奏効率 40%程度と高くなく（Pivonello et al., 2015）、耐糖能悪化等の副作用もある。また、メチラポン、オシドロスタットは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、下垂体腺腫に対する根本的治療とはならず、男性化徴候や色素沈着といった副作用も知られている。以上より、下垂体腫瘍を標的とした有効性の高い新規薬剤が望まれている。ニューロメジン B（NMB）は1983年に発見されたボンベシン様ペプチドファミリーに属する神経ペプチドの1種である。NMB は体温調節や平滑筋収縮に関わるほか、視床下部・下垂体・副腎系の刺激因子であるとされ、我々は以前に副腎不全状態のマウス下垂体において ACTH 産生細胞に発現すると報告した（Kameda et al., 2014）。また、NMB は乳癌などで腫瘍増殖を促進するとの報告もあり、悪性腫瘍の治療ターゲットとして注目されている。そこで本研究では ACTH 産生下垂体腺腫における NMB・NMB 受容体（NMBR）発現、およびクッシング病に対する NMBR 拮抗薬の効果を検討した。

【材料と方法】

- 1) ACTH 産生下垂体腺腫、成長ホルモン産生下垂体腺腫、非機能性下垂体腺腫の患者病理検体を用い定量 PCR 法および免疫蛍光染色で NMB・NMBR 発現を評価した。
- 2) マウス ACTH 産生下垂体腫瘍細胞である AtT-20/D16v-F2 細胞（AtT-20）に NMBR 拮抗薬 PD168368（0.1–100 nM）を投与し、定量リアルタイム PCR 法で遺伝子発現、ウェスタンブロット法で蛋白発現、ELISA 法で培地 ACTH 濃度、water-soluble tetrazolium salt (WST)-1 法で細胞増殖への影響をそれぞれ評価した。また、PD168368 1 μ M を投与した群（PD168368 群）と溶媒を投与した群（control 群）における発現遺伝子を DNA マイクロアレイ法を用いて比較した。
- 3) AtT-20 を背部に皮下接種した BALB/c-nu マウスを PD168368 1.2mg/kg を腹腔内投与する群（PD168368 群）と溶媒を腹腔内投与する群（control 群）の 2 群に分けた。2 週間の薬剤投与後に腫瘍体積、血中 ACTH、コルチコステロン濃度を評価し比較した。
- 4) ACTH 産生下垂体腺腫に対し腺腫摘除術を受けた患者 7 例の初代培養腺腫細胞に PD168368（0.1–10 nM）を投与し、遺伝子発現と培地 ACTH 濃度を評価した。

【結果】

1) 定量 PCR 法では、ACTH 産生下垂体腺腫において成長ホルモン産生下垂体腺腫や非機能性下垂体腺腫に比べ NMB・NMBR 発現が増加していた（それぞれ非機能性腺腫の 19 倍、110 倍、いずれも $p < 0.05$ ）。免疫蛍光染色でも ACTH 産生下垂体腺腫での NMB・NMBR 発現増加が確認された。

2) AtT-20 において、ACTH の前駆体であるプロオピオメラノコルチン（POMC）の遺伝子・蛋白発現は PD168368 投与によりいずれも濃度依存性に低下した（100 nM でそれぞれ 31%、24%低下、いずれも $p < 0.05$ ）。培地 ACTH 濃度も PD168368 の濃度依存性に低下を認め、POMC 発現に関わる転写因子である *cFos*、*Nur77* の遺伝子発現も同様に低下した。また、DNA マイクロアレイでは PD168368 群において細胞周期に関わるサイクリン E1 の発現が 0.76 倍に低下し、リアルタイム PCR 法・ウェスタンブロットで PD168368 投与によるサイクリン E1 およびサイクリン依存性キナーゼ 2（CDK2）の遺伝子・蛋白発現の低下が確認された。また、WST-1 法では PD168368 投与により細胞増殖の抑制も認めた。

3) AtT-20 を皮下接種した BALB/c-nu マウスにおいて、PD168368 群では control 群に比べ腫瘍体積、腫瘍体積増加率がいずれも低値であった（それぞれ $122 \pm 95 \text{ cm}^3$ vs $260 \pm 102 \text{ cm}^3$ 、70% vs 161%、いずれも $p < 0.05$ ）。また、血中 ACTH・コルチコステロンも PD168368 群で control 群に比べいずれも低値を示した（それぞれ 97 vs 180 pg/ml、813 vs 1045 ng/ml、いずれも $p < 0.05$ ）。

4) ACTH 産生下垂体腺腫の初代培養細胞において、PD168368 投与により 7 例中 4 例で *POMC* の遺伝子発現は低下し（12%～31%）、うち 3 例でサイクリン E (*CCNE*) の遺伝子発現が低下した。また、培地 ACTH 濃度を評価し得た 5 例中 2 例で ACTH 濃度低下を認めた（23%～53%）。

【考察】

NMB は視床下部・下垂体・副腎系を含めた内分泌機能の調節に関与している。また、NMB は NMBR とともにヒト大腸癌組織に発現し、自己分泌により腫瘍増殖を促進すると報告されている (Matusiak et al., 2005)。本研究では、ACTH 産生下垂体腺腫において NMB・NMBR がともに発現し、細胞株、マウス、患者由来細胞いずれにおいても NMBR 拮抗薬の投与により ACTH 分泌や細胞増殖が抑制された。以上から NMB は自己分泌や傍分泌により ACTH 分泌・細胞増殖を刺激していると想定され、NMBR 拮抗薬はその経路を遮断することで ACTH 分泌・細胞増殖をともに抑制することができる可能性が考えられた。また、ACTH 産生下垂体腺腫においてはサイクリン E 発現が亢進しており、転写因子 E2F1 の活性化を介して POMC 発現を亢進させているとの報告があり (Liu et al., 2015)、本研究において NMBR 拮抗薬は POMC およびサイクリン E の発現をともに抑制したことから、NMBR 拮抗薬による POMC 発現低下作用はサイクリン E の抑制を介した作用である可能性が示唆された。

【結論】

細胞株、マウス、患者由来腺腫細胞を用い、NMBR 拮抗薬がクッシング病の新規治療薬となる可能性があることを示した。また、その作用はサイクリン E の抑制を介した作用である可能性が考えられた。