

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 ( 医学 )	氏名	馬場 隆太
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 ①・2 項該当		
論文題目 Genotype-specific cortisol production associated with Cushing's syndrome adenoma with <i>PRKACA</i> mutations ( <i>PRKACA</i> 遺伝子変異を有するクッシング症候群における遺伝子変異特異的コルチゾール合成機構の解明)			
論文審査担当者			
主査	教授	今泉 和則	印
審査委員	教授	日向 信之	
審査委員	講師	沖 健司	
<p>〔論文審査の結果の要旨〕</p> <p>クッシング症候群は、副腎から過剰かつ持続的にコルチゾールが分泌されることにより多彩な症状を呈する疾患である。ステロイドホルモンの一つであるコルチゾールは生命活動の維持に必須であるが、クッシング症候群では過剰なコルチゾール分泌により、中心性肥満、満月様顔貌、水牛様脂肪沈着などのクッシング徴候や、糖尿病、高血圧、動脈硬化症、骨粗鬆症、精神障害などを合併する。ACTH 非依存性と ACTH 依存性のクッシング症候群に分類され、ACTH 非依存性クッシング症候群は片側のコルチゾール産生腺腫 (CPA) が主要な原因となる。CPA は、<i>PRKACA</i>、<i>GNAS</i>、<i>CTNNB1</i> の体細胞変異が主な原因であることが近年明らかにされている。<i>PRKACA</i> は、プロテインキナーゼ A (PKA) の触媒サブユニットをコードしており、cAMP が存在しない場合は調節サブユニットと結合して不活性となるが、<i>PRKACA</i> 変異では、触媒サブユニットと調節サブユニットが結合せず、PKA シグナル伝達を持続的に活性化させる。<i>GNAS</i> と <i>CTNNB1</i> は、それぞれ Gsa と <math>\beta</math>-カテニンをコードし、これらの変異はそれぞれ異なった細胞内シグナル伝達経路を刺激し、腫瘍形成やコルチゾール過剰産生などをもたらす。また、cAMP-PKA シグナル伝達はステロイド合成酵素発現を促進するが、ステロイド合成に不可欠である ferredoxin 1 をコードする <i>FDX1</i> 発現も促進する。筆者らは、<i>PRKACA</i> 変異が CPA で最も頻度の高い遺伝子変異であることから、<i>PRKACA</i> 変異を介した分子メカニズムに注目した。<i>PRKACA</i> 変異 CPA と他の遺伝子変異 CPA とのステロイド合成酵素や <i>FDX1</i> 発現の違いに関しては、未だ十分に検討されていない。さらに、<i>in vitro</i> において、<i>PRKACA</i> 変異によるステロイド合成酵素や <i>FDX1</i> を介したコルチゾール合成機構は報告されていない。</p> <p>筆者らは、CPA の遺伝子変異に基づく cAMP-PKA シグナルの細胞内分子機構およびステロイド合成機構を明らかにすることを目的とし、さらに、<i>PRKACA</i> 変異を導入した細胞株におけるステロイド合成酵素発現を評価することを目的とした。</p> <p>広島大学病院で 2007 年 8 月から 2019 年 5 月までに手術加療を行った CPA25 例と非機能性副腎皮質腺腫 (NFA) 6 例を対象とした。CPA に関して、ターゲットシーケンスを用いて既知の原因遺伝子 (<i>PRKACA</i>、<i>GNAS</i>、<i>CTNNB1</i>) 変異検索を行った。RNA-sequencing による遺伝子発現解析を行い、ステロイド合成酵素、<i>FDX1</i> 発現の評価をした。CPA と NFA で有意差のあった遺伝子群を用いてクラスタリング解析を行った。<i>PRKACA</i> 変異 CPA と <i>GNAS</i> 変異または <i>CTNNB1</i> 変異 CPA とで有意差のあった cAMP 関連遺伝子を用いてクラスタリング解析を行い、さらに転写因子予測解析を行った。<i>PRKACA</i> 変異 CPA と <i>GNAS</i> 変異 CPA で腫瘍最大面積当たりのコルチゾール産生能を評価した。また、ヒト副腎皮質癌細胞株 (HAC15) に <i>PRKACA</i> 変異を導入し、コルチゾール分泌能、ステロイド合成酵素と <i>FDX1</i> 発現を評価し、forskolin 投与によるコルチゾール分泌能の変化を評価した。</p> <p>CPA25 例中 <i>PRKACA</i> 変異 15 例、<i>GNAS</i> 変異 4 例、<i>CTNNB1</i> 変異 1 例、<i>GNAS</i> 変異と <i>CTNNB1</i> 変異合併例 1 例を認めた。<i>PRKACA</i> 変異 CPA は <i>GNAS</i> 変異 CPA と比較し、ステロイド合成酵素の <i>STAR</i>、<i>CYP11A1</i>、<i>CYP17A1</i>、<i>CYP21A2</i> や <i>FDX1</i> の mRNA 発現量が有意に高値であった。CPA と NFA で有意差のあった遺伝子群を用いたクラスタ</p>			

リング解析では、CPA と NFA は明らかに区別され、*PRKACA* 変異 CPA と *GNAS* 変異 CPA は別のクラスターに分類された。cAMP-PKA シグナル応答に関連する遺伝子群を用いたクラスタリング解析において、*PRKACA* 変異は *GNAS* 変異と明確に区別され、*GNAS* 変異と *CTNNB1* 変異は類似していた。転写因子予測解析で *PRKACA* 変異では cAMP-PKA シグナル伝達で活性化される ATF3、CREB1 が上位に検出されたが、*GNAS* 変異では cAMP-PKA シグナルに関連する転写因子は検出されなかった。腫瘍最大面積当たりのコルチゾール産生能は、*PRKACA* 変異 CPA は *GNAS* 変異 CPA と比較し有意に高値であった。HAC15 細胞に *PRKACA* 変異を過剰発現させると、コルチゾール分泌能とステロイド合成酵素や *FDX1* の mRNA 発現量が有意に増加し、forskolin を投与してもコルチゾール分泌能は増加しなかった。

*PRKACA* 変異と *GNAS* 変異では、cAMP-PKA シグナルの活性化に関連した遺伝子群、ステロイド合成能に違いを認めた。cAMP-PKA シグナルの活性化は、主に *PRKACA* 変異 CPA で認め、筆者らは、コルチゾール産生に関わっている可能性がある」と結論づけた。

以上の結果から、本論文は副腎性クッシング症候群における *PRKACA* 変異の分子機序解明に重要な情報であり高く評価される。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。