

論 文 内 容 要 旨

Association of DNA methylation with
steroidogenic enzymes in Cushing's adenoma
(クッシング症候群副腎腺腫におけるステロイド合
成酵素 DNA メチル化の解析)

Endocrine-Related Cancer, 29(8):495-502,2022.

主指導教員：服部 登 教授

(医系科学研究科 分子内科学)

副指導教員：濱田 泰伸 教授

(医系科学研究科 生体機能解析制御科学)

副指導教員：浅野 知一郎 教授

(医系科学研究科 医化学)

児玉 堯也

(医系科学研究科 医歯薬学専攻)

【背景】

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、多彩な症状を呈する疾患である。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。コルチゾールは、前駆体のコレステロールを基質に、CYP11A1、CYP17A1、HSD3B2、CYP21A2、CYP11B1 などのステロイド合成酵素により合成される。CPA は、*PRKACA*、*GNAS*、*CTNNB1* の体細胞変異が原因となる。*PRKACA* 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、変異型触媒サブユニットは PKA シグナルを持続的に活性化する。*GNAS* と *CTNNB1* は、それぞれ Gsa と β -Catenin 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をもたらす。

遺伝子の転写は、エピジェネティックな制御を受けており、DNA メチル化はその主たる機構である。DNA メチル化は 5-cytosine-guanine-3 dinucleotides (CpG) の配列に集中して発生し、遺伝子の転写に影響を与える。既報で、コルチゾール生合成に不可欠な *CYP11B1* 遺伝子のプロモーター領域が、CPA では低メチル化状態であることが報告されている。ステロイド合成酵素遺伝子のメチル化が、CPA の病態に関係することが示唆され重要であるが、CPA における全てのステロイド合成酵素遺伝子のメチル化状態を評価した研究はこれまで無かった。

また、我々は以前、ステロイド合成酵素の遺伝子発現状態から *PRKACA* 変異 CPA と他の変異 CPA を鑑別できる可能性を示している。CPA の遺伝子診断の観点から、DNA メチル化レベルから CPA の原因変異遺伝子を鑑別できる可能性があると考えた。

【目的】

CPA において、ステロイド合成酵素をコードする遺伝子の転写が DNA のメチル化状態によって制御されていると仮説し、CPA における全ステロイド合成酵素の DNA メチル化レベルと遺伝子発現レベルを明らかにし、両者の関連を明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】

当院で 2007 年 8 月から 2019 年 5 月までに手術加療を行った CPA 25 例と非機能性副腎皮質腺腫 (NFA) 6 例を対象とした。CPA は、次世代型シーケンサーを用いたターゲットシーケンスにより、既知の原因遺伝子 (*PRKACA*、*GNAS*、*CTNNB1*) 変異検索を行った。DNA メチル化アレイ解析で、全ステロイド合成酵素遺伝子のメチル化レベルを評価した。RNA-sequencing でステロイド合成酵素の mRNA 発現レベルを評価し、DNA メチル化アレイ解析の結果と併せクラスタリング解析と主成分分析を行なった。DNA メチル化解析では、*CYP17A1* のいくつかの領域が CPA で有意に低メチル化を示し、DNA メチル化と mRNA 発現量との関連を各領域で評価した。統計解析は MS Windows の SPSS を使用し、各検定を行った。群間差は $P < 0.05$ で統計的に有意とみなした。

【結果】

CYP17A1 遺伝子は、NFA に比べ CPA で、2 カ所のエクソン領域でメチル化レベルが有意に低かった。また、*CYP17A1* 遺伝子の 3 領域でメチル化レベルと mRNA 発現量が有意な逆相関を示した。*PRKACA* 変異 CPA では、*GNAS* 変異 CPA と比較し、*CYP17A1* 遺伝子の低メチル化傾向を認めた。*CYP17A1* 遺伝子のメチル化レベルと mRNA 発現量を用いたクラスタリング解析で、*PRKACA* 変異 CPA は NFA および *GNAS* 変異 CPA と明確に区別された。

【考察】

我々は全てのステロイド合成酵素遺伝子の CPA におけるメチル化レベルを解析し、*CYP17A1* 遺伝子が低メチル化されていることを明らかにした。当研究は、これまでの研究と比較して CPA のサンプル数が多く、副腎ステロイド合成酵素の CpG 領域を網羅的にメチル化解析した初めての研究である。本研究が見出した *CYP17A1* 遺伝子の低メチル化と、メチル化レベルと逆相関する mRNA 発現量の増加は新規の知見である。*CYP17A1* 遺伝子は、転写因子と DNA メチル化の協働によって制御されていると考えられる。

今後の研究により、CPA の遺伝子型による臨床像の違いが明らかになれば、遺伝子型の診断が CPA の診断や治療に有用となる可能性がある。今回、CPA のメチル化の状態、原因遺伝子型が区別できるかどうかを検討した。*CYP17A1* 遺伝子のメチル化および mRNA 発現レベルを用いた主成分分析やクラスタリング解析では、*PRKACA* 変異 CPA と他の副腎腫瘍が区別された。この方法は *PRKACA* 変異 CPA の病理診断、遺伝子診断に有用であると思われる。

本研究にはいくつかの limitation がある。第一に、CPA の総サンプル数は既報の中で最大であったが、*GNAS* および *CTNNB1* 変異 CPA の数が少なかった。第二に、一部の CpG 領域のメチル化は評価できていない。しかし、本研究では、旧モデル (RefSeq 遺伝子の 99%、および CpG アイランドの 96% をカバー) と比べ、更に 413,743 の CpG を追加解析しており、広範な解析が行われている。第三に、本研究のサンプルは、顕性クッシング症状を持つ患者の CPA であり、クッシング症状が不顕性の軽度の自律性コルチゾール過剰患者のサンプルは対象外としている。

【結論】

CPA では、*CYP17A1* 遺伝子の低メチル化が *CYP17A1* 遺伝子の転写を調節し、コルチゾール合成に関わっていることが示唆された。さらに、*CYP17A1* 遺伝子のメチル化および mRNA 発現レベルの同定は、*PRKACA* 変異の同定に有効となる可能性がある。