

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	児玉 堯也
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 ① 2 項該当		
論文題目 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)			
論文審査担当者			
主 査	教授	大上 直秀	印
審査委員	教授	檜井 孝夫	
審査委員	准教授	谷本 圭司	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>副腎皮質で合成されるステロイドホルモンであるコルチゾールは、前駆体である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。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、水牛様脂肪沈着などのクッシング徴候や、糖尿病、高血圧症、骨粗鬆症など多彩な症候が見られる。クッシング症候群は、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副腎皮質腺腫（CPA）が主要な原因となる。CPA は、<i>PRKACA</i>、<i>GNAS</i>、<i>CTNNB1</i> の体細胞変異が原因であることが近年明らかにされた。<i>PRKACA</i> 変異は、PKA の触媒サブユニットに機能獲得型の変異を起こし、PKA シグナルが持続的に活性化する。<i>GNAS</i> と <i>CTNNB1</i> は、それぞれ Gsα 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合成をもたらす。</p> <p>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として知られている。DNA メチル化は、腫瘍の進行・抑制、DNA 損傷・修復、およびホルモン合成などに影響を与える。副腎では、胎児期の副腎発生、副腎皮質癌の進行、アルドステロンの産生が DNA メチル化と関連することが報告されている。DNA メチル化は CPA の病態にも関係することが示唆されるが、CPA でコルチゾール合成に関わ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に全く報告されていない。</p> <p>筆者らは CPA において、ステロイド合成酵素をコードする遺伝子の発現が DNA のメチル化によって制御されていると仮説を立て、CPA の全副腎ステロイド合成酵素の DNA メチル化レベルと mRNA 発現レベルを比較することにより、DNA メチル化が病態に与える影響を解析する事を目的とした。</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 に関しては、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。DNA メチル化アレイ解析により、ステロイド合成酵素遺伝子の DNA メチル化レベルを評価した。RNA-sequencing 解析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 メチル化アレイ解析では、<i>CYP17A1</i> のいくつかの領域が CPA で有意に低メチル化を示し、<i>CYP17A1</i> の mRNA 発現量と各メチル化領域の DNA メチル化レベルとの相関性を評価した。</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。NFA と比較し CPA では、<i>CYP17A1</i> 遺伝子の 4 カ所の領域で、DNA メチル化レベルが有意に低かった。前述の低メチル化領域のうち 3 ヶ所で</p>			

は、DNA 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* 遺伝子の各メチル化領域のメチル化レベルと mRNA 発現量を用いた主成分分析で CPA と NFA が分離され、クラスタリング解析では、*PRKACA* 変異 CPA は NFA および *GNAS* 変異 CPA と明確に層別された。

CPA において、*CYP17A1* 遺伝子の低メチル化、そのメチル化レベルと *CYP17A1* 遺伝子発現量の逆相関を認め、これは本研究による新規の知見であった。また、*CYP17A1* 遺伝子の広範な低メチル化と mRNA の発現量増加は、NFA や *GNAS* 変異 CPA と比較し、*PRKACA* 変異 CPA で特に顕著な特徴であった。

以上の結果から、本論文は CPA のコルチゾール過剰合成の病態解析において、ステロイド合成酵素遺伝子のエピジェネティックな調節機構を解明した重要な結果であり、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。