

# 論文内容要約

## 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)

Takaya Kodama, Kenji Oki, Yu Otagaki, Ryuta Baba, Akira Okada, Kiyotaka Itcho,  
Kazuhiro Kobuke, Gaku Nagano, Haruya Ohno, Nobuyuki Hinata, Koji Arihiro,  
Celso E Gomez-Sanchez, Masayasu Yoneda, Noboru Hattori

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

### 【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、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。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。CPA は、*PRKACA*、*GNAS*、*CTNNB1* の体細胞変異が原因であることが近年明らかにされた。*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、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、*PRKACA* 変異、つまり、変異型触媒サブユニットは調節サブユニットと結合できないため、PKA シグナルが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などをもたらす。

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として知られている。DNA メチル化は、5-cytosine-guanine-3 dinucleotides (CpG)の配列に集中して発生し、CpG のメチル化および脱メチル化は、遺伝子転写制御に関連し、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。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おり、DNA メチル化が CPA の病態に関係することが示唆されているが、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。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考えられ、CPA における DNA メチル化の評価は極めて重要である。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* 変異を有する CPA と他の変異を有する CPA を鑑別できる可能性を示しており、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、CPA の遺伝子診断の点からも DNA メチル化状態を評価することは重要と考えた。

#### 【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することを目的とした。さらに、DNA メチル化とステロイド合成酵素の遺伝子発現と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 に関しては、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*) 変異検索を行い、各遺伝子変異を同定した。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 メチル化アレイ解析では、*CYP17A1* のいくつかの領域が CPA で有意に低メチル化を示し、*CYP17A1* 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。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】

CPA25 例中 *PRKACA* 変異 15 例、*GNAS* 変異 4 例、*CTNNB1* 変異 1 例、*GNAS* 変異と *CTNNB1* 変異合併例 1 例を認めた。*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、同様に *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。CPA の DNA メチル化を解析した既報は少ない。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、そのメチル化レベルと逆相関する *CYP17A1* 遺伝子発現量の増加は新規の知見である。

我々は以前の研究で、*PRKACA* 変異 CPA は NFA よりも *CYP11A1*、*CYP17A1*、*CYP21A2* の転写量が多く、PKA シグナルを活性化した副腎皮質癌細胞株では、全てのステロイド合成酵素の産生が亢進することを示した。cAMP-PKA シグナルの活性化が、すべての副腎ステロイド合成酵素産生の基本にあり、更にいくつかのエピジェネティックな制御が関与して各遺伝子の転写レベルを決定している可能性がある。*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。

13 例の CPA を解析し、*CYP11B1* 遺伝子のプロモーター領域の低メチル化を報告した既報があるが、本研究では *CYP11B1* 遺伝子のメチル化レベルは、CPA と NFA で有意差はなかった。既報と本研究で解析対象の CpG 領域に違いがあることが相違の一因として挙げられる。我々や他の研究者が、CPA の *CYP11B1* 遺伝子の mRNA 発現量は NFA より低いことを報告している。CPA の *CYP11B1* 遺伝子のメチル化レベルと mRNA 発現量の関連については、更なる研究が望まれる。

CPA において、*CYP17A1* 遺伝子の低メチル化領域は exon、intron 領域に存在し、そのメチル化レベルと mRNA の発現量が逆相関した。プロモーター領域だけでなく、エクソン領域のメチル化レベルも遺伝子の転写調節に重要である事が知られている。ヌクレオソームは exon 上に有意に配置され、exon 領域のメチル化状態が DNA とヌクレオソームの相互作用の安定に寄与する事が分かっている。GC リッチな配列で 145-170nt の exon は、DNA メチル化による転写抑制を受けやすい事が知られており、*CYP17A1* 遺伝子の exon 6 はこの特徴を満たし、メチル化レベルと mRNA 発現量の逆相関が見られた部位を含んでいる。

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。*PRKACA* 変異 CPA では *GNAS* 変異 CPA と比較して有意な *CYP17A1* 遺伝子の低メチル化が認められ、*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。我々は以前、ステロイド合成酵素の遺伝子発現を用いて CPA と NFA を鑑別する方法の可能性を示したが、最も有効な鑑別方法についてはさらなる検討が必要である。

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* 変異を有する CPA の数が少なかった点がある。*GNAS* および *CTNNB1* 変異 CPA のステロイド合成酵素遺伝子のメチル化の特徴を明らかにするには、さらなる研究が必要と考える。第二に、一部の CpG 領域のメチル化は評価できていない点あげられる。しかし、本研究では最先端の技術を使用し、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と考える。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。不顕性 CPA における DNA メチル化とコルチゾール産生の関連は、今後の研究課題である。

#### 【結論】

CPA では、*CYP17A1* 遺伝子の低メチル化が *CYP17A1* 遺伝子の発現を調節し、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。