



Responsiveness to DDAVP in Cushing's disease is associated with USP8 mutations through enhancing AVPR1B promoter activity

志智, 大城

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2022-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8404号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100477830>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



学位論文の内容要旨

Responsiveness to DDAVP in Cushing's disease is associated with

USP8 mutations through enhancing *AVPR1B* promoter activity

クッシング病における DDAVP への反応性は、
AVPR1B プロモーター活性の増強を介して *USP8* 変異と関連している

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
糖尿病・内分泌内科学
(指導教員：小川 渉 教授)

志智 大城

Cushing 病は副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)を合成、分泌する下垂体腺腫によって引き起こされる疾患で、ACTH 依存性に高コルチゾール血症を呈し、これが全身性徴候と共に、合併症を引き起こす。満月様顔貌や中心性肥満といった外観の特徴を呈する他、免疫力低下、高血圧、糖尿病などの合併が知られ、無治療では5年生存率50%と報告されていることから適切な診断と治療が必要となる。しかし、Cushing 病の診断過程において、本疾患の原因となる下垂体腺腫が1cm以下と微小な腫瘍が多く、内分泌学的な診断が重要である。しかし、高ACTH血症を呈する疾患として異所性ACTH産生腫瘍や、偽性Cushing症候群(うつ病やアルコール多飲などにより高ACTH血症を呈する疾患群)など、鑑別に苦慮することがある。

Cushing 病の鑑別診断のために行う内分泌学的検査としてDDAVP試験がある。DDAVPはバソプレシン受容体2(AVPR2)に比較的特異的な親和性を持ち、抗利尿作用を呈する薬剤として開発されたバソプレシン類似体であるが、バソプレシン受容体1B(AVPR1B)に対しても弱い親和性をもつ。Cushing 病診断におけるDDAVP試験は、DDAVP静脈注射後ACTH奇異性上昇反応を認めた場合に異所性ACTH産生腫瘍や偽性Cushing症候群とCushing 病の鑑別を行う事ができる検査(感度86.0%、特異度55.6%)である。この機序については、Cushing 病における下垂体腫瘍にAVPR1Bが高発現していることやAVPR2が異所性に発現している事が関連していると報告されているが、未だ不明な点も多い。また、近年DDAVP試験は診断だけでなく予後予測や再発の早期発見マーカーとしてもその有用性が期待されている。一方、Cushing 病の10-20%はDDAVPに対する反応を示さない事も知られており、今回我々はこの点に着目して研究を行った。

近年、次世代シーケンサーを用いた研究によりCushing 病の原因遺伝子として*USP8*、*USP48*、*BRAR*、*TP53*遺伝子変異が同定され、特に*USP8*遺伝子変異はCushing 病の40-60%に認める事が明らかとなった。

今回我々は、Cushing 病におけるDDAVP試験の反応性を規定する因子について、腫瘍の遺伝子解析を含め、その病態を明らかにするために多施設共同で臨床的、基礎的検討を行った。

対象は2012年から2020年に神戸大学医学部附属病院、虎の門病院、森山記念病院で術前にDDAVP試験を施行されたCushing病症例47例(女性41例、平均41歳)である。DDAVP試験はDDAVP(4μg)静脈注射後120分以内にACTH値が前値の1.5倍以上に上昇した症例を「陽性」、1.5倍未満を「陰性」とした。比較項目として性別、年齢、早朝血漿ACTH値、早朝血清コルチゾール値、尿中遊離コルチゾール値、少量デキサメタゾン抑制試験後のコルチゾール値、高用量デキサメタゾン抑制試験後のコルチゾール値、DDAVP試験でのACTH反応性(ACTH:頂値/基礎値)、コルチゾール反応性(コルチゾール:頂値/基礎値)、腫瘍径、Knosp分類、MIB-1 index、海綿静脈洞浸潤の有無、*USP8*変異の有無を用いた。遺伝子解析は上記のうち23例において施行することができた。

47例中32例(68%)がDDAVP試験「陽性」であった。性別では「陽性」群の32例中

31 例(96.9%)が女性で、「陰性」群(66.7%)に比して有意に多かった($P<0.01$)。遺伝子解析できた検体において「陽性」群のうち USP8 変異腫瘍は 12 例(85.7%)であり、「陰性」群で 3 例(33.3%)と有意に多かった($P=0.02$)。この結果から USP8 変異と DDAVP 試験の反応性の関連が示唆された。DDAVP 試験での ACTH 反応性は USP8 野生型で 1.3 倍に対して変異型では 3.0 倍($P<0.01$)、コルチゾール反応性は野生型で 1.1 倍に対し変異型で 1.6 倍($P<0.01$)といずれも USP8 変異例で反応性が高かった。そこで DDAVP 試験により腫瘍の USP8 変異が予測できるかを検討したところ、ACTH 反応性のカットオフを 1.61 倍とすると、それ以上で USP8 変異を予測できた(感度 80%、特異度 100%)。一方、コルチゾール反応性においては、カットオフを 1.41 倍とすると、USP8 変異を予測する事ができた(感度 78.6%、特異度 100%)。

次に「陽性」群と「陰性」群について手術により得られた腫瘍検体を用いて *AVPR1B* 及び *AVPR2* の発現を、qRT-PCR を用いて比較検討した。*AVPR1B* mRNA 発現は DDAVP 試験反応陽性群で 8.5 倍高かった($P=0.01$)が、*AVPR2* mRNA 発現は差を認めなかった($P=0.71$)。この結果から Cushing 病における DDAVP 試験の反応性は *AVPR2* の異所性発現というより *AVPR1B* の高発現を介することが考えられた。さらに *AVPR1B* 蛋白発現の評価として免疫染色を行ったところ、*AVPR1B* 発現と DDAVP 試験におけるコルチゾール反応性に正の相関がみられた($r^2:0.22$, $P=0.04$)。

次に、USP8 変異が *AVPR1B* 発現を転写レベルで促進するかを検討するため *Avpr1b* プロモーターを用いてルシフェラーゼ解析を行った。HEK293T 細胞株に *Avpr1b*-Luc ベクターと野生型 USP8 ないし変異 USP8 (p.Ser718del) 発現ベクターを共発現させ、デュアルルシフェラーゼアッセイを用いて定量化した。*Avpr1b* プロモーター活性は野生型 USP8 発現により 2.3 倍上昇し($P<0.05$)、変異型 USP8 では 4.0 倍($P<0.05$)、野生型に比べ 1.7 倍($P<0.05$)と、さらに上昇を認めた。

これらの結果から Cushing 病において USP8 変異が *AVPR1B* 遺伝子発現を促進し、DDAVP 試験の反応性と関連していることが示唆された。また、DDAVP 試験の反応性が Cushing 病の診断だけでなく比較的非侵襲的な方法で USP8 変異の予測に有用であることが明らかになった。USP8 は脱ユビキチン化酵素の一つであり、Cushing 病における USP8 変異は脱ユビキチン化活性が促進され、上皮成長因子受容体(EGFR)の発現が亢進すること、さらにこの下流シグナルの持続的活性化することにより本疾患の原因である下垂体腫瘍発生やホルモン合成促進の病態に関与していると考えられている。現在、Cushing 病において EGFR チロシンキナーゼ阻害薬であるゲフィチニブや USP8 阻害薬などの治療応用に向けた研究も進められており、USP8 変異を非侵襲的に予測する事は、より適切な治療方針の決定に役立つかもしれない。

今回の結果から DDAVP に対する ACTH の反応性は、Cushing 病の USP8 変異と関連していることを見出した。比較的非侵襲的な内分泌検査により、Cushing 病の診断だけでなく遺伝子変異の状態を予測することに有効であることは、本試験の更なる有用性として考え

られる。さらに、本研究では USP8 変異が *AVPR1B* プロモーター活性を増強すること、DDAVP 試験に反応を示す腫瘍で *AVPR1B* 発現が上昇していることを明らかにした。Cushing 病において DDAVP 試験に対する ACTH 奇異性反応が生じる機序の一端を明らかにすることができた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3195 号	氏 名	志智 大城
論文題目 Title of Dissertation	クッシング病における DDAVP への反応性は、 <i>AVPR1B</i> プロモーター活性の増強を介して <i>USP8</i> 変異と関連している Responsiveness to DDAVP in Cushing's disease is associated with <i>USP8</i> mutations through enhancing <i>AVPR1B</i> promoter activity		
審査委員 Examiner	主 査 児玉 裕三 Chief Examiner 副 査 南 博信 Vice-examiner 副 査 青井 貴之 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

申請者は、Cushing 病における DDAVP 試験の反応性を規定する因子について、その病態を明らかにするために検討を行った。

Cushing 病は近年、次世代シーケンサーを用いた研究により原因遺伝子として *USP8*、*USP48*、*BRAF*、*TP53* 遺伝子変異が同定され、特に *USP8* 遺伝子変異は Cushing 病の 40-60% に認めることが判明した。しかし、本疾患の原因として微小腺腫が多いことから、異所性 ACTH 産生腫瘍、偽性 Cushing 症候群などとの鑑別に苦慮することがある。この鑑別に有用な検査に DDAVP 試験があり、Cushing 病患者における DDAVP 静脈注射による ACTH 奇異性上昇を診断に利用する。しかし機序については、ACTH 産生腫瘍における *AVPR1B* の高発現ないし *AVPR2* の異所性発現が関連しているとの報告があるが、不明な点も多い。今回申請者はこれら点に着目して研究を行った。

対象は 2012 年から 2020 年に神戸大学医学部附属病院、虎の門病院、森山記念病院で術前に DDAVP 試験を施行された Cushing 病症例 47 例である。DDAVP 試験は ACTH 値が前値の 1.5 倍以上に上昇した症例を陽性、1.5 倍未満を陰性とした。

陽性群は陰性群と比較して *USP8* 変異症例が有意に多く ($P=0.02$)、*USP8* 変異と DDAVP 試験の反応性の関連が示唆された。DDAVP 試験での ACTH 反応性は *USP8* 野生型で 1.3 倍に対して変異型では 3.0 倍 ($P<0.01$)、コルチゾール反応性は野生型で 1.1 倍に対し変異型で 1.6 倍 ($P<0.01$) といずれも *USP8* 変異例で高かった。そこで DDAVP 試験により *USP8* 変異が予測できるかを検討したところ、ACTH 反応性のカットオフを 1.61 倍とすると、それ以上で *USP8* 変異を予測できた (感度 80%、特異度 100%)。一方、コルチゾール反応性においてはカットオフを 1.41 倍とすると、*USP8* 変異を予測することができた (感度 78.6%、特異度 100%)。

次に申請者は手術検体を用いて *AVPR1B* 及び *AVPR2* の発現を qRT-PCR を用いて比較した。*AVPR1B* mRNA 発現は陽性群で 8.5 倍高かった ($P=0.01$) が、*AVPR2* mRNA 発現は差を認めなかった ($P=0.71$)。この結果から Cushing 病における DDAVP 試験の反応性は *AVPR1B* の高発現を介することが考えられた。さらに *AVPR1B* 蛋白発現の評価として免疫染色を行ったところ、*AVPR1B* 発現と DDAVP 試験におけるコルチゾール反応性に相関がみられた ($r^2:0.22$, $P=0.04$)。

次に申請者は、*USP8* 変異が *AVPR1B* 発現を転写レベルで促進するかを検討するため *Avpr1b* プロモーターを用いてルシフェラーゼ解析を行った。HEK293T 細胞株に *Avpr1b*-Luc ベクターと野生型 *USP8* ないし変異 *USP8* (p.Ser718del) 発現ベクターを共発現させ、ルシフェラーゼアッセイを用いて定量化した。*Avpr1b* プロモーター活性は野生型 *USP8* 発現により 2.3 倍上昇し ($P<0.05$)、変異型 *USP8* では 4.0 倍 ($P<0.05$)、野生型に比べ 1.7 倍 ($P<0.05$) と、さらに上昇を認めた。

これらの結果から Cushing 病において *USP8* 変異が *AVPR1B* 遺伝子発現を促進し、DDAVP 試験の反応性と関連していることが示唆された。また、DDAVP 試験の反応性が Cushing 病の診断だけでなく比較的侵襲的な方法で *USP8* 変異の予測に有用であることが明らかになった。現在、Cushing 病において *USP8* 阻害薬などの治療応用に向けた研究も進められており、*USP8* 変異を非侵襲的に予測することはより適切な治療方針の決定に役立つかもしれない。申請者は Cushing 病における DDAVP 試験に対する ACTH 奇異性反応が生じる機序の一端を明らかにした。

本研究は、*USP8* 変異が *AVPR1B* 遺伝子の転写を促進することにより、Cushing 病における DDAVP 試験の反応性に影響を及ぼす可能性を示した報告であり、同疾患の診断法および治療開発において重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があるものと認める。