論　文　の　内　容　の　要　旨

１ 背景と目的

Glucose-dependent insulinotropic peptide, gastric inhibitory polypeptide(GIP)は食事摂取により小腸から分泌され，GIP 受容体(GIP-R)と結合し cAMP の産生を介して作用を引き起こす。副腎皮質でのステロイド合成は，ACTH と ACTH 受容体の結合により誘導された cAMP や，タンパクキナーゼ A(PKA)の活性化，ステロイド合成の転写制御因子や合成酵素の作用によって起こる。ヒトにおいて，GIP-R が副腎皮質に異所性に発現し，食事刺激によりコルチゾールの過剰分泌をもたらす食事（依存）性クッシング症候群(Food-dependent Cushing's syndrome, FD-CS)がある。諸家により GIP-GIPR 経路の活性化がコルチゾール合成を起こすことが報告されているが, 細胞レベルにおける詳細なメカニズムは明らかにはされていない。

本研究では，GIP-R の活性化によるステロイド合成誘導の直接的な証拠を，GIP-R を強制発現させた副腎皮質の細胞培養系，および，FD-CS 患者の摘出副腎組織を用いて細胞レベルで解析し，さらにその分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

２ 方　法

ヒト副腎皮質腫瘍細胞株の H295R 細胞を用いた。cAMP 活性化刺激の目的で cAMP アナログの 8Bromo-cAMP(8Br)またはアデニル酸シクラーゼ活性化因子の forskolin(FK)を，GIP-R 経路の活性化の目的で GIP を使った。さらに，pcDNA3.1Zeo（+）に flag タグを付加したヒト GIP-R を挿入したベクターを H295R 細胞に一過性に導入し，GIP-R 発現 H295R 細胞(H295R-GIPR)を作成した。H295R 細胞または H295R-GIPR 細胞におけるステロイド合成系の活性化について，（1）転写制御因子(SF1, NGFI-B)，ステロイド合成酵素群(StAR, HSD3β2, CYP17A1, CYP21A2)の遺伝子発現レベルを定量性 RT-PCR にて解析，（2）GIP-R(H295R-GIPR)と CYP17A1, CYP21A2 の発現を免疫組織学的手法にて解析，（3）細胞培養液中のコルチゾールとアルドステロン濃度を測定し，検討した。

さらに FD-CS 患者の副腎組織の GIP-R と CYP21A2 の共発現を共焦点蛍光顕微鏡下で解析した。これらの実験は全て，当該施設の倫理委員会承認の下で行った。

３　結　果

8Br(500 μM)または FK(10 μM)で処理した H295R 細胞では，未処理の細胞に比べて，（1）SF1, StAR, HSD3β2, CYP17A1, CYP21A2 の mRNA レベルは，8Br 処理では 1.1, 2.6，1.6，1.7，1.7 倍，FK 処理では 1.4，2.1，1.5，1.9，1.9 倍になり，8Br 投与後の SF1 以外は，有意な変化であった（$p<0.05$）。（2）CYP17A1, CYP21A2 蛋白の発現誘導が観察された。（3）細胞培養液中のコルチゾールおよびアルドステロン濃度は，4-8 倍に有意に増加した（$p<0.05$）。

GIP(100 nM)で処理した H295R-GIPR 細胞では，（1）SF1, NGFI-B, StAR, HSD3β2,

CYP17A1, CYP21A2 の mRNA レベルは，GIP 未処理の細胞に比べて 1.2，1.4，2.1，1.2，1.4，1.2 倍に有意に変化した（$p<0.05$）。（2）Flag 陽性細胞特異的に CYP17A1, CYP21A2 の細胞内発現が観察された。GIP 未処理の細胞では flag の発現は認めるが，CYP17A1, CYP21A2 ともに観察されなかった。（3）細胞培養液中のコルチゾールおよびアルドステロン濃度は，GIP 未処理の細胞に比べてそれぞれ 1.5 倍，1.5 倍に有意に増加した（$p<0.05$）。

FD-CS 患者の副腎標本での蛍光免疫染色では，多くの細胞で GIP-R と CYP21A2 の共発現が観察された。

４　考　察

本研究において, GIP-R の活性化がステロイド合成関連因子の遺伝子発現, 蛋白発現, ステロイドホルモン産生を促進することが確認され, 特に GIP-R 発現細胞特異的にステロイド合成酵素である CYP17A1 および CYP21A2 の発現が認められ，GIP-R とステロイド合成系の活性化が同一細胞内で起こることが示された。

FD-CS 患者の副腎腫瘍組織においても，GIP-R と CYP21A2 蛋白が同一細胞上に共発現することが示され，GIP-R の活性化とステロイド合成系の活性化の直接的な関連性が証明された。単一細胞レベルでの報告はこれまで見られておらず，今回の我々の知見は非常に意義深いと考えられる。

５　結　論

GIP-R の発現とステロイド合成の直接的な連関が明らかになり，副腎組織に異所性に発現する GIP-R が FD-CS の病態の病因であることを細胞レベルで確認することができた。