ホルモン受容体異所性発現症の病態解明
～食事性クッシング症候群及び受容体強制発現系でのGIP依存的ステロイド合成～

ふ じ い ひ ろ こ
藤 井 博 子

（内分泌・代謝病学専攻）

防 衛 医 科 大 学 校

平成２５年度

目次

第1章　緒言	1 頁
第2章　方法	4 頁
第3章　結果	10 頁
第4章　考察	15 頁
謝辞	19 頁
略語一覧	20 頁
引用文献	21 頁
図表	26 頁

第1章　緒言

グルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド（glucose-dependent insulinotropic polypeptide, Gastric inhibitory polypeptide, GIP）は、食事摂取後、小腸から分泌される42個のアミノ酸からなるペプチドホルモンである。経口的に体内に入ったブドウ糖が経腸的に吸収された後、GIPは小腸K細胞から分泌され、G蛋白共役型受容体（GPCR）であるGIP受容体(GIP-R)と結合し、cAMP産生を介して、膵臓のβ細胞において、インスリン産生や分泌、細胞増殖や抗アポトーシス作用などの多様な生理作用をもたらす[1-5]。

副腎皮質は、血中のコレステロールを取り込み、各層（球状層、束状層と網状層）特異的に産生される酵素によって、鉱質コルチコイド、糖質コルチコイド、性ステロイドの3系統のホルモンを合成し血中に分泌する。ACTHが、副腎皮質に存在する、ACTH受容体（MC2R）に結合すると、引き続くcAMPの産生に依存的に タンパクキナーゼA (PKA)が活性化され、ステロイド合成関連酵素遺伝子群の転写制御因子であるSF1やNGFI-Bがリン酸化を受け、ステロイド合成が展開される[6-8]。

ステロイド合成は、細胞質に取り込まれたコレステロールを、ミトコンドリアの外膜から内膜へ輸送する蛋白、streroidogenic acute regulatory protein（StAR）によって厳格に制御されている。そして、ミトコンドリアの中に入ったコレステロールは、まずステロイド合成の律速段階にあるコレステロール側鎖切断酵素、CYP11Aによってpregnenoloneが合成された後、3β-ヒドロ

キシステロイド脱水素酵素（HSD3β）によって共通前駆体が生成され、これが、副腎皮質部位特異的な、17α-水酸化酵素（CYP17）、21-水酸化酵素（CYP21）、11 β-水酸化酵素 (CYP11B) の個々の作用によって、独自の生理作用を持つ数種類のステロイドホルモンが生合成される[9-12]。

一方、ひとたび、GPCR が、本来発現するはずのない副腎皮質に異所性に発現されると、それぞれの独自のリガンドであるカテコーラミンや他のホルモン（アンジオテンシン II、グルカゴンなど）とそれぞれ機能的に結合して、ACTH-MC2R と無関係にステロイド合成、特に糖質コルチコイドの過剰発現を引き起こすことで惹起されるクッシング症候群様の病態が知られている[8] [13] [14]。その中で、ヒト副腎皮質に GIP-R が発現することにより、食事摂取後に顕著な高コルチゾール血症が引き起こされ、食事依存性クッシング症候群（Food-dependent Cushing's syndrome、FD-CS）が発症することがある[7] [15-20]。

我々は、GIP-R が副腎皮質に異所性に発現したことにより、三度の食事ごとに周期的にコルチゾール過剰分泌を起こすことによってクッシング症候群を呈するようになったと考えられた一症例 (FD-CS) が副腎摘出によって治癒したことを経験した[21]。

Mazzuco らは、ウシの培養副腎皮質細胞に GIP-R を強制発現させて安定細胞株を作製し、それをマウスの腎被膜下に移植することにより、副腎皮質の過形成および高コルチゾール血症が引き起こされることを報告した[22]。さらに、Drucker らは、マウスの培養副腎皮質 Y1 細胞株に GIP-R を安定発現させ、GIP 刺激により、cAMP の産生と、いくつかのステロイド産生関連因子の遺伝子の発現が上昇することを報告した[23]。以上のように、間接的には副腎皮質において

GIP-GIPR 経路の活性化によりステロイド合成が起こることが示唆されているが、GIP-R によるステロイド合成経路のメカニズムの細胞レベルでの詳細はこれまで明らかにされて来なかった。

そこで本研究では、GIP-R の活性化によるステロイド合成の直接的な証拠を *in vivo* および *in vitro* の系で確認し、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。

副腎皮質細胞株としては、Y1 細胞などのマウスの細胞株など、数種類知られているが、特にヒト由来の副腎皮質細胞株としては、H295R 細胞（human adrenocortical carcinoma cells）がよく知られている。H295R 細胞は、Cushing 症候群の 48 歳のアフリカ系アメリカ人女性の摘出副腎皮質より細胞株化された[(12) (24)]。

まず、この H295R 細胞に、ヒト *GIP-R* 遺伝子を一過性導入し、GIP 処理後、ステロイド合成系の活性化の解析を行った。ステロイド合成系については、(1) SF1、NGFI-B などの転写制御因子、StAR やステロイド合成酵素群の遺伝子発現レベルについて、定量性 RT-PCR、および、(2) 免疫組織学的実験を行い、蛋白レベルで、GIP-R と合成酵素の単一細胞レベルの発現解析、(3) コルチゾールとアルドステロンの培養液中の濃度測定を行った。さらに FD-CS での GIP-R 発現とステロイド合成酵素の詳細な関連を明確にするために、(4) 上述の FD-CS 患者[(21)]の副腎組織の GIP-R とステロイド合成酵素の共発現を、共焦点蛍光顕微鏡下での単一細胞レベルで解析した。これらの解析の結果、GIP-R の発現とステロイド合成の直接的な関連が明らかになり、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。

第 2 章　方法

自験例患者病歴、摘出標本と初代培養

病歴：症例は満月様顔貌・体重増加・高血圧を主訴に、防衛医科大学校病院内分泌代謝内科を受診した44歳（初診時、2002年）の女性である。クッシング徴候、尿中遊離コルチゾール（F）の増加、血中F値の日内変動消失、1 mgおよび8 mgデキサメタゾン抑制試験で血中F値が抑制されないこと、腹部CTで両側副腎に30 mm大の結節の所見を認めたため、副腎性クッシング症候群と診断した。さらに、この症例は、早朝空腹時の血中F値が4.7～7.6 mg/dlと比較的低値であったにも関わらず、食事摂取に連動して、血中F値と血糖値の異常高値を示したが、経静脈的ブドウ糖負荷時には血糖値の上昇のみで血中F値は変動しなかった。以上から食事依存性クッシング症候群（FD-CS）と診断した。同年に同院泌尿器科で腹腔鏡下右副腎摘出術を施行し、臨床症状および検査所見上の改善を認めた。しかし、2005年から徐々にクッシング徴候やCT検査で副腎の更なる腫大を確認するようになり、2009年に同泌尿器科で腹腔鏡下左副腎亜全摘術を施行した。摘出が功を奏して2013年となる現時点においてもクッシング徴候の再出現を認めることなく順調な経過をたどっている。

標本：2009年時に摘出された副腎組織の一部を迅速に液体窒素内に保管し、他の一部を初代培養に用いた。対照群として、防衛医科大学校内分泌代謝内科・泌尿器科で精査、手術を行った、食事性非依存性と判断した副腎性クッシング症候群患者1例の副腎腫瘍組織、アルドステロン産生副腎皮質腺腫患者1例の腺腫近傍副腎組織を用いた。本研究は防衛医科大学校倫理委員会の承認（承認番

号773）を受け、患者からはインフォームドコンセントを得た。

初代培養：自験例摘出副腎標本の一部を細かく切り刻み、collagenase (type I; Sigma Chemical社, St. Louis, MO, USA) 処理した後、0.1% BSA を含むDMEM (low glucose) (Gibco, Grand Island, NY, USA) の中に細胞を1.1 x 10^6 cells/mlに調整して播種し、5% CO_2、37 ℃条件下のインキュベーター内で培養した。0 nM, 0.2 nM, 2 nM, 20 nM human GIP（GIP）（ペプチド研究所, 大阪, 日本）を添加後3時間培養した。培養液中のコルチゾール濃度をELISA kit（Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA）を用いて測定した。それぞれn=4で行った。

材料

Eight-bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate（8-Br-cAMP、以下 8Br）と folskolin (以下 FK) は Sigma-Aldrich 社（St. Louis, MO, USA）より、human GIP（GIP）はペプチド研究所（大阪、日本）よりそれぞれ購入した。

hGIPR 発現ベクター：ヒト GIPR cDNA（Clone ID: #7939568）は Thermo Scientific Open Biosystems 社（USA）より購入し、以下のプライマーを用いて、C 端に flag タグを付けたヒト GIPR を PCR 法で増幅させた。PCR 産物を pcDNA3.1Zeo(+) の EcoRV サイトに挿入した。作成ベクター（hGIPR-flag）はシークエンス解析（Operon 社に依頼）を行い配列に異常がないことを確認した。

(forward)

5'-ATACTCGAGGCCACCATGACTACCTCTCCGATCCTGCAGCTGC-3'

(reverse)

5'-ATACTCGAGCTACTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCGCAGTAACTTTCCA

ACTCCCGGCT-3'

一次抗体：抗 GIPR 抗体 (rabbit monoclonal anti-Gastric Inhibitory Polypeptide Receptor, ab124939, abcam)、抗 flag 抗体 (mouse monoclonal anti-FLAG M2, F1804, SIGMA-ALDRICH)、抗 CYP17A1 抗体 (rabbit polyclonal anti-Cytochrome P450 17A1, ab80286, abcam)、抗 CYP21A2 抗体 (goat anti-CYP21A2 (C-17), sc-48466, Santa Cruz)

二次抗体：Alexa Fluor 647 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (A-21245, Molecular Probes)、Alexa Fluor 647 Donkey Anti-Goat IgG (H+L) (A-21447, Molecular Probes)、Alexa Fluor 546 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (A-11030, Molecular Probes)、Alexa Fluor 546 Donkey Anti-Rabbit / mouse IgG (A-10040 / A10036, Molecular Probes)

細胞培養（H295R 細胞）

ヒト副腎皮質腫瘍細胞株（NCI-H295R pluripotent adrenocortical carcinoma cell line（H295R細胞））は、American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) より購入した。H295R細胞は、DMEM:F-12K (1:1) (ATCC, Manassas, VA, USA) に 1 % ITS^{+}Premix (BD Biosciences, Bedford, MA, UK) (最終濃度：0.00625 mg/ml insulin, 0.00625 mg/ml transferrin, 6.25 ng/ml selenium, 1.25 mg/ml bovine serum albumin, 0.00535 mg/ml linoleic acid)、2.5 % NuSerum (BD Biosciences, Bedford, MA, UK) (25% New born Calf Serum含有)、 1 % Penicillin-Streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA) (最終濃度：50 U/ml penicillin, 50μg/ml streptomycin) を含

有させた培地中で、5 % CO_2、37 °C条件下のインキュベーター内で培養した。無血清培地は、DMEM/Ham's F-12培地に1 %　Penicillin-Streptomycinのみ含有させた[25]。

8-Br-cAMPおよびforskolin処理

6穴プレートに播種したH295R細胞を血清培地または無血清培地で24時間培養した後、8Br (終濃度 500 μM) またはFK (終濃度 10 μM) を添加し、6~48時間培養した。

H295R細胞における一過性外来発現とhGIPRのGIP処理

血清を含むDMEM:F-12K (1:1) 培地内で3.0 × 10^5 cells/mlに調整したH295R細胞を6穴プレートに播種し、24時間後に、Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) を用いてhGIPR-c'flagまたはpcDNA3.1Zeo(+) のベクター（empty vector）をトランスフェクションした。24時間後に血清培地または無血清培地に置き換えて、さらに24時間培養した。ヒトGIPの最終濃度が0 nM, 100 nMになるように、それぞれの培地に添加し、さらに6時間、24時間または48時間培養した。

コルチゾール濃度の測定

6穴プレートに播種したH295R細胞培養液内のコルチゾール濃度は、化学発光酵素免疫測定法(ELISA)(Beckman Coulter社, Brea, CA, USA) を用いて測定した。

*逆転写反応および定量性 **real-time RT-PCR** 法*

自験例および対照として用いた副腎標本は摘出後速やかに液体窒素で凍結し本研究開始まで保存した。この凍結組織およびを H295R 細胞から、RNA iso-Plus (タカラバイオ社、滋賀、日本) を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA の一部を PrimeScript RT reagent kit (Perfect Real Time) (タカラバイオ社、滋賀、日本)を用いて逆転写反応させた。プライマーに Random 9 mer を用い、30 ℃ 10 分、42 ℃ 60 分、70 ℃ 15 分で 1 サイクルの反応を行い、cDNA を合成した。

定量性 real-time RT-PCR 法は、SYBR Green II (タカラバイオ社、滋賀、日本) を用い、タカラバイオ社推奨のプロトコールで 20 μL 反応用に調整し、Thermal Cycler Dice Real Time System II (タカラバイオ社、滋賀、日本) で反応および解析を行った。mRNA 転写物の相対値は 2-ΔΔCt 法で測定し、内因性コントロール遺伝子として GAPDH を用いた。95 °C 30 秒の初期変性後、95 ℃ 5 秒、60 ℃ 60 秒を 1 サイクルとして 40 サイクルの反応を行った。プライマーは Primer3Plus をもとに設計した（表 1）[26]。

組織標本作製

副腎標本は、Tissue-Tek O.C.T. Compound (サクラファインテック社、東京、日本)に包埋、液体窒素で凍結後、本研究開始まで-80 ℃に保存した。-21℃に設定したLeica CM3050S microtome/cryostat (Leica, Bannockburn, IL)を使用して、各ブロックを7 μm厚に薄切した切片を作成した。

蛍光免疫染色

H295R細胞：6穴プラートに、滅菌カバーガラスを入れて、その上に細胞を播種して培養し、試薬の添加やトランスフェクション等の処理を行い培養した後、15分間固定した。

組織標本：スライドガラスに貼付けた標本を、室温15分間固定した。

固定液は、細胞も組織標本も4%パラホルムアルデヒドと4%ショ糖を含むphosphate-buffered saline (PBS)を用いた。

以下、細胞および組織標本とも、同一のプロトコールで行った。

固定後、0. 25 % TritonX-100含有PBSにて細胞の透過性を上昇させた後、10%ウシ血清アルブミン（BSA）にて、37℃、30分間ブロッキングを行い、3% BSAで希釈した一次抗体を37℃、2時間反応させた。PBSで洗浄後、3% BSAで希釈した二次抗体を37℃、45分間反応させ、PBSで洗浄後、1 μg/ml DAPI (4'6-Diamidine-2'-phenylindole dihdrochloride) (Roche, Mannheim, Germany) で15分間インキュベートして核染色を行い、Fluorescence Mounting Medium (Dako, California, USA)で封入した。laser-scanning confocal image system (A1R-A1 Confocal Microscope Syste) (Nikon社, 東京, 日本)にて観察し、画像解析を行った。

統計解析

定量的な結果は平均値±標準誤差として示した。2 群間の比較については Student's *t* test, Dunnett's test による検定を用い、P 値＜0.05 をもって有意差と判断した。

第3章　結果

3-1. H295R 細胞における 8-Br-cAMP、forskolin のステロイド合成系に対する効果

GPCR 活性化によって、アデニル酸シクラーゼが刺激され、cAMP の合成が促される。cAMP はタンパクキナーゼ A (PKA)を活性化し、その結果、ステロイド合成関連酵素の転写が促進される。そこでわれわれは、cAMP のアナログである 8-Br-cAMP (8Br)と、アデニル酸シクラーゼを直接的に活性化する forskolin (FK)が、H295R 細胞において予想通りステロイド合成系を促進するかについて解析した。血清非存在下で 24 時間培養した後、6 時間 8Br、または、FK で処理した H295R 細胞から RNA を抽出し、定量性 RT-PCR を行った。8Br 刺激では、StAR、HSD3β2、CYP21A2、CYP17A1 の mRNA レベルはそれぞれ 2.6 倍、1.6 倍、1.7 倍、1.7 倍と有意に増加したが、SF1 mRNA 量には明らかな変化が認められなかった (図 1a)。FK 処理では、SF1、StAR、HSD3β2、CYP21A2、CYP17A1 の mRNA レベルは、1.4 倍、2.1 倍、1.5 倍、1.9 倍、1.9 倍にそれぞれ有意に増加した (図 1b)。次に蛍光免疫染色を行い、CYP17A1 と CYP21A2 の蛋白質レベルの発現について検証した。8Br、または、FK で処理した内の多くの細胞で、CYP17A1 および CYP21A2 蛋白が、細胞質に集積することが観察された (図 2-5)。細胞を無血清条件下で培養した場合は、8Br と FK のいずれの刺激でも、24 時間投与後の発現が最大であった。一方で、血清存在下で培養した際には、その最

大発現に 48 時間が必要だった。無血清条件下と血清存在下で、発現している細胞数の割合や、発現のレベルに差は認められなかった（図 2-5)。8Br と FK のいずれも投与しなかったコントロールの細胞では、血清の有無にかかわらず CYP17A1、CYP21A2 蛋白ともに全く発現していなかった(図 2-5)。さらに H295R 細胞における、8Br と FK 刺激によるステロイドホルモンの合成および分泌を解析するために、培養液中のコルチゾールとアルドステロンの濃度を測定した。血清存在下における実験データを図 6 に示す。コルチゾール濃度は、8Br 刺激により約 5 倍、FK 刺激により約 4 倍増加した（図 6a, b)。また同様の 8Br と FK 刺激によるアルドステロン濃度には、それぞれ約 8 倍と 4 倍の増加を認めた（図 7a, b)。無血清条件下でも、培養液中のコルチゾールとアルドステロンの 8Br と FK 刺激による有意な増加を認めた（結果は不掲載)。

3-2. GIP-R 発現によるステロイド合成系に対する効果

前項で、cAMP 活性化がステロイド産生を促すことを確認したことに引き続いて、GIP-R について検討した。哺乳動物発現ベクターpcDNA3.1 に、C 末端に flag タグを付加したヒト GIP-R (hGIP-R)をコードする cDNA を組み込んで作製した発現ベクターを、H295R 細胞に導入し、GIP-R 蛋白の一過性発現を試みた。導入 48 時間後にこの細胞を固定して、抗 flag 抗体と抗 GIP-R 抗体により二重免疫染色を行ったところ、全細胞中の約 5%の導入効率で、細胞内の flag および GIP-R 蛋白の発現が観察され（結果は不掲載)、さらに flag 発現陽性細胞と GIP-R 発現陽性細胞はすべて一致していた（図 8)。また flag および GIP-R 蛋白の両者とも

に、細胞質に限局した局在が認められた(図 8)。GIP で刺激した後も上記の GIP-R 発現率に変化が見られないことを確認した（結果は不掲載）後、われわれは、この細胞を用いて、GIP によるステロイド合成系タンパク質の遺伝子発現調節を定量性 RT-PCR 実験によって検討した。その結果、hGIP-R-flag 発現 H295R 細胞（以下 H295R-GIPR 細胞）では、6 時間の GIP 投与により、非投与コントロール同細胞と比較して、SF1、 NGF-1B、StAR、HSD3β2、CYP21A2、CYP17A1 の mRNA レベルが、それぞれ 1.2、1.4、2.1、1.2、1.2、1.4 倍と、程度こそ高くないものが含まれるものの、いずれも統計学的に明らかな有意差を持って増加していた (図 9)。上述の 5%という GIP-R 導入効率を考慮すると、ここに記した 1.2 〜2.1 倍という違いは、おのおの 20 倍とまではいかないにしても、明らかに過小評価された数字である可能性が高い。次に flag タグ抗体と、CYP17A1 または CYP21A2 に対する抗体を使用して、蛍光二重免疫染色を行い、共焦点顕微鏡下で詳細な観察を行った。無血清条件下では 24 時間、血清存在下では 48 時間という GIP 処理時間を設定した。コントロールとして用いた empty ベクターを導入した細胞（H295R-empty 細胞）では、GIP 処理の有無に関わらず、flag 陽性細胞も、CYP17A1-または CYP21A2-陽性細胞のいずれも認めなかった。GIP 処理していない H295R-GIPR 細胞では、flag 陽性細胞を検出したが、CYP17A1 (Fig. 10 a, b 下段)、または、CYP21A2 (Fig. 11 a, b 下段)を発現する細胞は認められなかった。GIP 処理した H295R-GIPR 細胞では、CYP17A1 (図 10 a, b 上段)、または、CYP21A2 (図 11 a, b 上段)を発現する flag 陽性細胞を検出したが、flag 陰性細胞では、CYP17A1 または CYP21A2 を発現する細胞は認めなかった(図 10, 11, a, b 上段)。これらの結果は、血清存在下および無血清条件下のいずれの条件でも同

様に認められた(図 10, 11)。以上の結果から、GIP-R 導入細胞特異的に、GIP 特異的な、CYP17A1 および CYP21A2 蛋白の発現誘導が惹起されることが明らかになった。さらに、H295R-GIP-R 細胞の培養液中のコルチゾール濃度、またはアルドステロン濃度の測定を行ったところ、48 時間の GIP 刺激により非刺激細胞と比べて、ともに約 1.5 倍の増加を認め、GIP-GIP-R により、ステロイド合成が促進されることが確認された（図 12)。

3-3. FD-CS 組織の解析

前項までの解析により、副腎皮質細胞レベルで、異所性に発現活性化されたGIP-Rがステロイド合成に直接的に関与することが強く支持されたため、*in vivo*の系でのGIP-Rとステロイド合成の関連性について、以前報告したFD-CSの副腎皮質組織を用いて検討した。単離したこの副腎皮質の初代培養細胞に、20 nMのGIPを投与し3時間培養すると、GIPを投与しない細胞に比べて、コルチゾール分泌量が約3倍増えた（図13)。次に、この組織におけるGIP-Rの発現を、定量的RT-PCR法を用いて解析した。コントロール組織標本としてアルドステロン産生腺腫の別人患者の腫瘍近傍の、正常に近いと考えられる副腎皮質組織を用いた。その結果、コントロール組織に比べてFD-CSの副腎病変組織では、*GIPR* mRNAは約80倍に高発現していた。一方、*MC2R*の遺伝子発現はほとんど同じレベルに留まっていた（図14)。さらに、GIP-Rの抗体とCYP21A2の抗体を用いた組織切片の二重免疫染色では、CYP21A2陽性のほとんど全ての細胞がGIP-Rを共発現していることが示された（図15)。しかし、コントロールとして用いたGIP非依存

性CSの副腎組織の細胞では、多くのCYP21A2陽性細胞に、GIP-Rの発現は全く検出されなかった。

以上のことから、われわれの経験した FD-CS において、GIP-R の発現とステロイド合成系の活性化が、同一の副腎皮質細胞内で起こっていることが証明され、FD-CS の病態における GIP-R の直接的な関連性が強く示唆された。

第4章　考察

本研究では、GIP-Rとステロイド合成との直接的な関連性について、細胞レベルで*in vitro*と*in vivo*における解析をおこなった。まず、培養細胞レベルで、GIP-Rの活性化とステロイド合成の直接的な関連性について解析した。本研究で用いたH295R細胞は、ACTHへの反応性が非常に低く、ACTH受容体(MC2R)の発現が低レベルであると考えられている副腎皮質由来の細胞である[12]。またGIPRもほとんど発現していない(結果不掲載)。まず、GIP-Rシグナル細胞内セカンドメッセンジャー、cAMPのアナログである8-Br-cAMP(8Br)、および、アデニル酸シクラーゼの活性化剤であるforskolin(FK)が、ともにH295R細胞のステロイド合成系を促進することを示した(図6)。ちなみに、Udhaneらは8BrによるH295R細胞でのHSD3β2の発現誘導を報告している[25]。そしてわれわれは、CYP17A1とCYP21A2について、定量性RT-PCRを用いてこれらのmRNA量が8Br、FKのいずれの投与後にも1.8倍程度上昇すること(図1)、蛍光免疫染色法を用いて、H295R細胞の30%以上の数の細胞に発現誘導された両酵素の蛋白が、細胞質に集積していること、さらにコルチゾールとアルドステロンの明らかな産生誘導も確認した。

次に、一過性にflagタグ付きGIP-Rを発現させたH295R細胞に対して、100 nMのGIPを投与した後のステロイド合成経路の変化について解析した。Flag(またはGIP-R)と、CYP17A1もしくはCYP21A2とによる二重免疫染色像の結果から、GIP投与によって、CYP17A1やCYP21A2の発現が、flag

陽性細胞特異的に起こることが認められた。すなわち、GIP-Rの発現誘導が惹起された細胞に特異的に、ステロイド合成系が機能することが証明された。単一細胞レベルで、GIP-Rとステロイド合成酵素の共発現を確認した報告は今回の報告が初めてであり、非常に意義深いと考えられる。一方、結果の項にも述べたように、今回のGIP-Rの細胞導入効率が、約5%と低い数値でありながら定量性RT-PCR法によるステロイド合成系に関わる多くの遺伝子の発現が、小幅ながらも有意に上昇した。このことは、たとえば、1.2倍増加しているSF1は、もし導入効率が100%になったら単純に計算して24倍に増加していることを意味する。その一方で、この数字が、8BrやFKによる刺激による増加と比較して非常に高いことから、ベクターが導入された細胞では、大過剰にGIP-Rが発現していることも考えられる。したがって、GIP-Rの発現レベルが非生理的な過剰量であることが原因で、ステロイド合成系の活性化を誘導した可能性は否定できない。しかし、flagの発現レベルの程度に関わらずCYP17A1およびCYP21A2の発現が同レベルに観察されたことは注目に値する。すなわちflagがわずかしか発現していない細胞でもCYP21AおよびCYP17Aの発現が認められていたのである。またFD-CSの副腎皮質においても、GIP-RとCYP21A2の二重免疫染色像から、同一の細胞におけるGIP-RとCYP21A2の共発現を示している(図15)。これらのことは、生理的な状態でもGIP-R発現とステロイド合成系の活性化が、一つ一つの細胞において共存していたことを強く支持している。

以上のことから、*in vivo*でも*in vitro*でも、単一の同じ細胞において、GIP-Rとステロイド合成関連酵素の蛋白が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。

1987年にHametらによって食事依存的にステロイドホルモンの血中濃度が高くなるCushing症候群を報告した[27]。さらにFD-CSとしては、1992年にLacroixらによって、はじめて報告された[15-17]。最も新しい報告の一つとして、Druckerらの、GIP-Rとステロイド合成系の関連性を示唆する論文が出されて来たが[23]、単一細胞レベルでの解析はこれまでにない。Mazzucoらは、ウシの培養副腎皮質細胞にGIP-Rを発現させた安定細胞株を、マウスの腎被膜下に移植することにより、副腎皮質の過形成および高コルチゾール血症が引き起こされることを報告した[22]。この論文では、腎被膜下の過形成を来した副腎皮質細胞におけるCYP17A1の発現と、GIP-Rの発現についての免疫組織学的解析を行っているが、二重染色は含まれておらず、同一細胞における共発現は確認していない。本研究が、単一細胞レベルでの解析を行ったユニークな報告であることをここに強調したい。

副腎皮質に異所性にGPCRが発現された結果、発症するクッシング症候群はよく知られるようになり、中でもFD-CSは、GIP-Rを発現することにより、それなりの頻度で起こる病態で、さほど希少なものではない。しかし、基盤となる病態生理は未解明な部分が多く、GPCR/cAMPからステロイド生合成までのメカニズムについてもまだ十分に明らかにされていない。MAPK/ERKや他の情報伝達系が関与する可能性についても示唆されている[22] [23]。また、FD-CSは、GIP-Rが異所性に発現する副腎皮質細胞が増殖し、過形成が起こり、良性の副腎皮質腫瘍を呈する病態でもある[6] [28]。GIP-Rの発現によるステロイド合成系機構と同様に、副腎皮質細胞の過形成のメカニズムについて精力的な

研究が進んでおり、その中には、GIP-R による直接的な経路とともに、血管内皮細胞等の他の細胞からのパラクリン効果の関与を提唱しているものもある[29]。最近は、GIP 依存的 Cushing 症候群のより詳細な病態解明のために、特異的に発現する遺伝子群の探索も行われている[30][31]。本研究で示した共焦点顕微鏡下での単一細胞の解析を応用することにより、GIP-R のステロイド合成系の詳細な分子機構とともに、この FD-CS における副腎皮質細胞の過形成のメカニズムへのアプローチも、より詳細な解析が可能になることが予想される。

さらに、GIP-R 以外の受容体異所性発現の分子機構の研究においても、今回われわれが行った、単一細胞レベルの解析を応用することによって、その本質が解明されることが強く期待され、それによって、新しい診断法および治療法の開発が、大きく前進するであろう。

謝辞

本研究の実施、完成にあたり、直接ご指導いただきました防衛医科大学校総合臨床部　田中　裕司　教授、内科学講座（内科 3）　木村　文彦　教授に深く感謝いたします。また副腎検体につき、ご協力いただいた泌尿器科学講座、伊藤敬一　准教授に深謝いたします。また「他大学院等における研究指導」受講において多大なるご指導をいただいた帝京大学医学部生化学講座　岡崎　具樹　教授、安達　三美　准教授に深謝いたします。本研究を支えて下さった全てのスタッフの方々にもお礼を申し上げます。

略語一覧

GIP	glucose-dependent insulinotropic polypeptide,
	Gastric inhibitory polypeptide
GIP-R	GIP receptor
GPCR	G-protein coupled receptor
cAMP	adenosine 3’, 5’-cyclic monophosphate
ACTH	adrenocorticotropic hormone
MC2R	melanocortin receptor type 2
PKA	protein kinase A
StAR	streroidogenic acute regulatory protein
CYP17A1	Cytochrome P450 17
CYP21A2	Cytochrome P450 21
CYP11	Cytochrome P450 11
HSD3 β2	3β-hydroxysteroid dehydrogenases
FD-CS	Food-dependent Cushing’s syndrome
H295R	human adrenocortical carcinoma cells
8Br	eight-bromoadenosine 3’,5’-cyclic monophosphate
FK	folskolin
RT-PCR	reverse transcription-polymelase chain reaction
PBS	phosphate-buffered saline
DAPI	4’6-Diamidine-2’-phenylindole dihdrochloride

引用文献

1. Fahrenkrug G: Vasoactive intestinal peptide. ***Handbook Physiology (Sect 6): Gastrointestinal system 2,*** 691-702, 1989

2. Lu M, Wheeler MB, Leng XH, Boyd 3rd AE: The role of the free cytosolic calcium level in b-cell signal transduction by gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide I(7-37). ***Endocrinology*** 132, 94-100, 1993

3. Voltz A, Goke R, Lankat-Buttgereit B, Fehmann HC, Bode HP, Goke B: Molecular cloning, functional expression, and signal transduction of the GIP-receptor cloned from a human insulinoma a. ***FEBS Letter*** 373, 23-29, 1995

4. Wilding JPH, Ghatei MA, Bloom SA: Hormones of the gastrointestinal tract. In: De Groot LJ, ***Ed. Endocrinology, vol. 3. W. B. Saunders: Philadelphia,*** 2870-2894, 1995

5. Yasuda K, Seino Y: Gastric inhibitory polypeptide (GIP) and GIP receptor. ***Japanese Journal of Clinical Medicine*** 54, 1078-1082, 1996

6. Chambre O, Liakos P, Vivier J, Bachelot I, Chambaz EM, Feige JJ, Defaye G: Gastric inhibitory polypeptide (GIP) stimulates cortisol secretion, cAMP production and DNA synthesis in an adrenal adenoma responsible for food-dependent Cushing's syndrome. ***Endocrine Reviews*** 24, 851-856, 1998

7. Mazzocchi G, Rebuffat P, Meneghelli V, Malendowicz LK, Tortorella C, Gottardo G, Nussdorfer GG: Gastric inhibitory polypeptide stimulates glucocorticoid secretion on rats, acting through specific receptors, coupled with the adenylate cyclase-dependent signaling pathway. ***Peptides*** 20 589-594, 1999

8. Lacroix A, Boudeau I, Lampron, Mazzuco TL, Tremblay J, Hamet P: Aberrant G-protein coupled receptor expression in relation to adrenocortical overfunction. ***Clinical Endocrinology*** 73, 1-15, 2010

9. Arnold J: Ein Beitrag zu der feiner Struktur und dem Chemismus der Nebennieren. ***Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.*** 35, 64-107, 1866

10. Simpson ER, Waterman MR: Regulation of expression of adrenocortical enzymes. In: James, ***V. H. T. (Ed.), The adrenal Gland Second Edition. Raven Press, New York,*** pp 191-208, 1992

11. McNicol AM: The human adrenal gland: Aspects of Structure, Function, and Pathology. In: James, ***V. H. T. (Ed.), The adrenal Gland Second Edition. Raven Press, New York,*** pp 1-42, 1992

12. Rainey WE, Saner K, Schimmer BP: Adrenocortical cell lines. ***Molecular Cellular Endocrinology*** 228, 23-38, 2004

13. Lacroix A, Nidiaye N, Trembly J, Haet P: Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. ***Endocrine Reviews*** 22, 75-110, 2001

14. Lacroix A, Baldacchino V, Bourdeau I, Hamet P, Tremlay J: Cushing's syndrome variants secondary to aberrant hormone receptors. ***Trends in Endocrinology & Metabolism*** 15, 375-382, 2004

15. Lacroix A, Bolte E, Tremblay J, Dupre J, Poitras P, Founier H, Garon J, Garrel D, Bayard F, Taillefer R, Flaganan RJ, Hamet P: Gastric inhibitory polypeptide-dependent cortisol hypersecretion. A new cause of Cushing's syndrome. ***New England Journal of Medicine*** 327, 974-980, 1992

16. Bertagna X: New causes of Cushing's syndrome. ***New England Journal of Medicine*** 327, 1024-1025, 1992

17. Reznik Y, Allali-Zerah V, Chayvialle JA, Leroyer R, Leymarie P, Travert G, Lebrethon MC, Budi I, Balliere AM, Mahoudeau J: Food-dependent Cushing's syndrome mediated by aberrant adrenal sensitivity to gastric inhibitory polypeptide.

New England Journal of Medicine 327, 981-986, 1992

18. De Herder TI, Hofland LJ, Usdin TB, De Jong FH, Uitterlinder P, Van Koetsveld P, Mezey E, Bonner TI, Bonjer HJ, Lambets SW: Food-dependent Cushing syndrome resulting from abundant expression of gastric inhibitory polypeptide receptors in adrenal adenoma cells. ***Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*** 81, 3168-3172, 1996

19. Metejka G, Verges B, Vaillant G, Petit JM, Pacaud A, Brun JM: Food-dependent Cushing syndrome: a new entity of organic hypercorticism. ***Revue Medecine Interne*** 17, 461-466, 1996

20. N'diaye, Tremblay J, Hamet P, De Herder WW, Lacroix A: Adrenocortical overexpression of gastric inhibitory polypeptide receptor underlies food-dependent cushing's syndrome. ***Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*** 83, 2781-2785, 1998

21. Ito K, Yoshii Takahiro, Shinmoto H, Kanbara T, Sumitomo M, Kaji T, Tanaka Y, Asano T: Laparoscopic enucleation of macronodules in a patient with ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia 7 years after unilateral adrenalectomy: consideration of operative procedure. ***Urologica Internationals*** 90, 253-258, 2013

22. Mazzuco TL, Chabre O, Sturm N, Feige JJ, Thomas M: Ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene is a sufficient genetic event to induce benign adrenocortical tumor in a xenotransplantation model. ***Endocrinology*** 147, 782-790, 2006

23. Bates HE, Campbell JE, Ussher JR, Baggio LL, Maida A, Seino Y, Drucker DJ: *Gipr* is essential for adrenocortical steroidogenesis; however, corticosterone deficiency does not mediate the favorable metabolic of *Gipr*$^{-/-}$ mice. ***Diabetes*** 61, 40-48, 2013

24. Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, Chen IR, Triche TJ, Myers CE, Chrousos GP, Brennan MF, Stein CA, La Rocca RV: Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. ***Cancer Reserch*** 50, 5488-5496, 1990

25. Udhane S, Kempna P, Hofer G, Mullis, PE, Fluck CE: Differential regulation of human 3β-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 for steroid hormone biosynthesis by starvation and cyclic amp stimulation: studies in the human adrenal NCI-H295R cell model. ***PLos One*** 8, e68691, 2013

26. Kajitani T, Tamamori-Adachi M, Okinaga H, Chikamori M, Iizuka M, Okazaki T: Nagative regulation of parathyroid hormine-related protein expression by steroid hormones. ***Biochem. Biophys. Res. Commun.*** 407: 472-8, 2011

27. Hamet P, Larochelle P, Franks DJ, Cartier P, Bolte E: Cushing syndrome with food-dependent periodic hormonogenesis. ***Clinical Investigative Medicine*** 10, 530-533, 1987

28. Mazzuco TL, Chabre O, Freige JJ, Thomas M: Aberrant GPCR expression is a sufficient genetic event to trigger adrenocortical tumorigenesis. ***Molecular Cellular Endocrinology*** 265-266, 23-28, 2007

29. Thomas M, Keramidas M, Monchaux E, Feige JJ: Dual Hormonal regulation of endocrine tissue mass and vasculature by adrenocorticotropin in the adrenal cortex. ***Endocrinology*** 145, 4320-4329, 2004

30. Antonini SR, Baldacchino V, Tremblay J, Hamet P, Lacroix A: Expression of ACTH receptor pathway genes in glucose-dependent insulinotrophic peptide (GIP)-dependent Cushing's syndrome. ***Clinical Endocrinology*** 64, 29-36, 2006

31. Lampron A, Bourdeau I, Hamet P, Tremblay J, Lacroix A: Whole genome expression profiling of glucose-dependent insulinotrophic peptide (GIP)- and adrenocorticotropin-dependent adrenal hyperplasias reveals novel targets for the

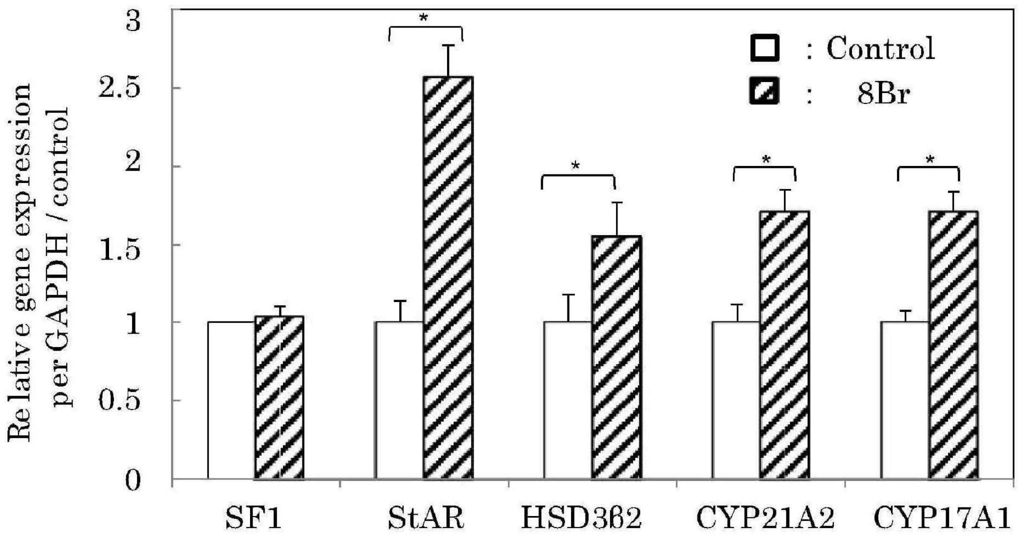
study of GIP-dependent cushing's syndrome. ***Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*** 91, 3611-3618, 2006

図表

表1. 定量性RT-PCR用のprimer（ヒト）

Gene			primer sequence	
SF-1	Forward	5'	aaggtgtccggctaccacta	3'
	Reverse	5'	cttgtacatcggcccaaact	3'
NGFI-B	Forward	5'	ggcatggtgaaggaagttgt	3'
	Reverse	5'	cggagagcaggtcgtagaac	3'
StAR	Forward	5'	gattcaagaaacgctcagc	3'
	Reverse	5'	ggacaccttgcccacatct	3'
HSD3β2	Forward	5'	gcctgttggtggaagagaag	3'
	Reverse	5'	atgatacaggcggtgtggat	3'
CYP21A2	Forward	5'	Aactacccggacctgtcctt	3'
	Reverse	5'	Tctcaygcgctcacagaact	3'
CYP17A1	Forward	5'	gcatcggtgagtttgctgtg	3'
	Reverse	5'	gattcaagaaacgctcagc	3'
GIPR	Forward	5'	caatggggactttggagaga	3'
	Reverse	5'	atgtagccgcctgaacaaac	3'
MC2R	Forward	5'	gctgaaggtgattgggagat	3'
	Reverse	5'	atatctcctccggcaaaacc	3'

a



b

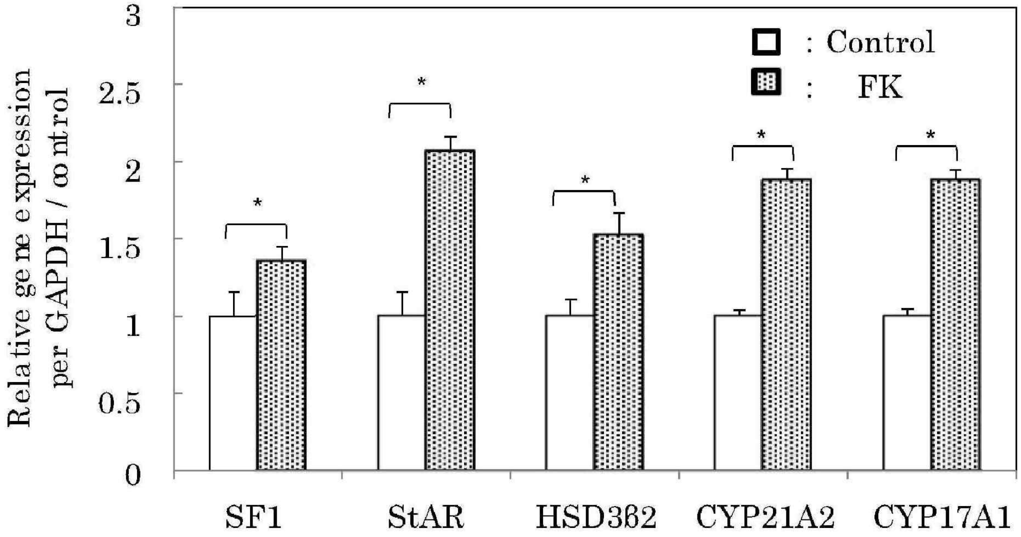


図1. 8BrおよびFK刺激によるステロイド合成系因子の遺伝子発現

H295R細胞を無血清状態で培養。8Br (500 μM) (a)、およびFK (10 μM) (b)を添加し、6時間後にステロイド合成系に関与する因子の遺伝子発現レベルを、定量性RT-PCRで解析した。（n=3, *p<0.05）

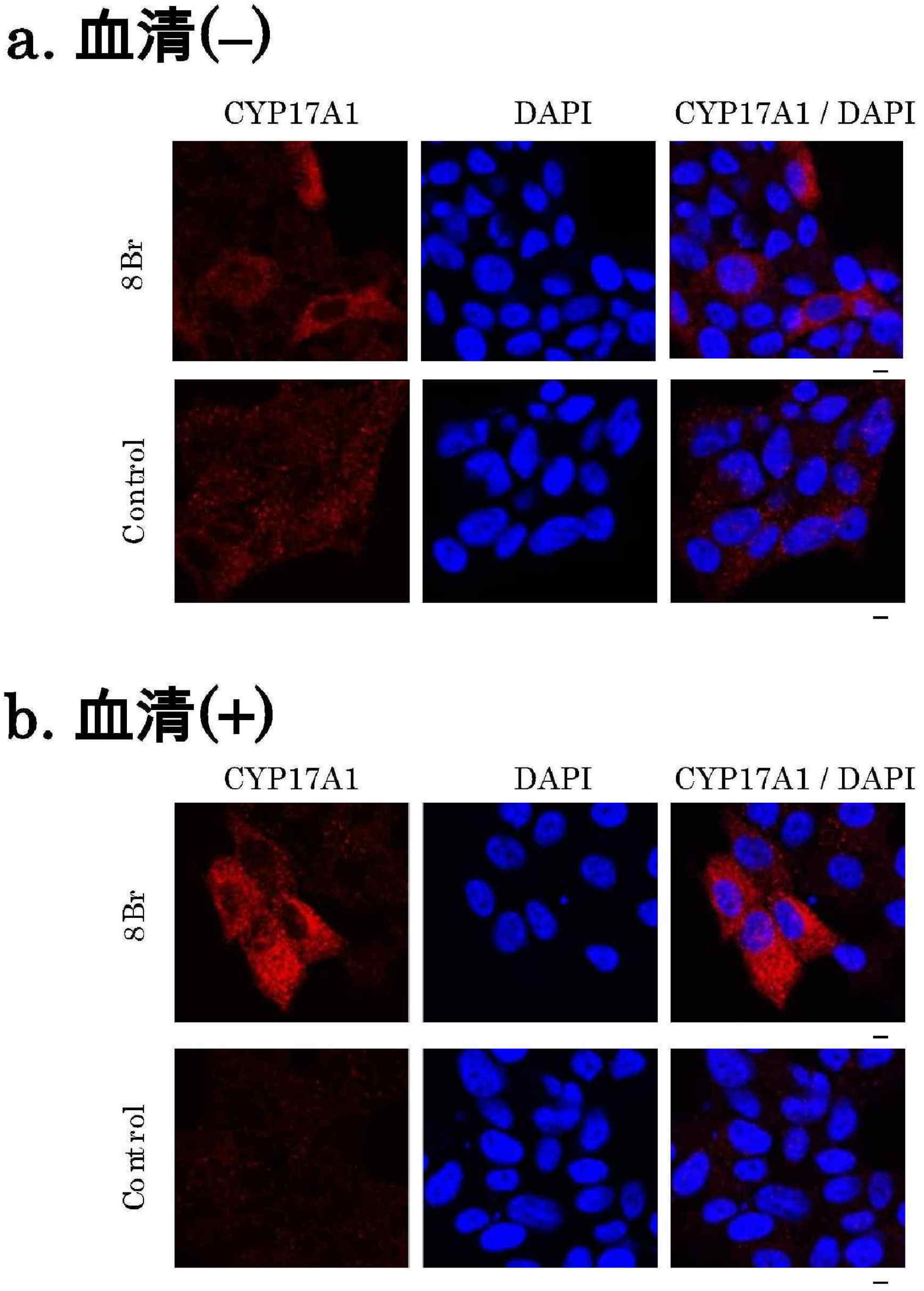


図2. 8BrによるCYP17A1の発現誘導

H295R細胞を無血清状態 (a)、または血清状態 (b) で培養。8Br (500 μM)添加24時間後 (a)、48時間後 (b) に、細胞を固定し抗CYP17A1抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、共焦点顕微鏡下で観察した。

赤色：CYP17A1、青色：核－DAPI、x600水浸、黒棒線＝10μm

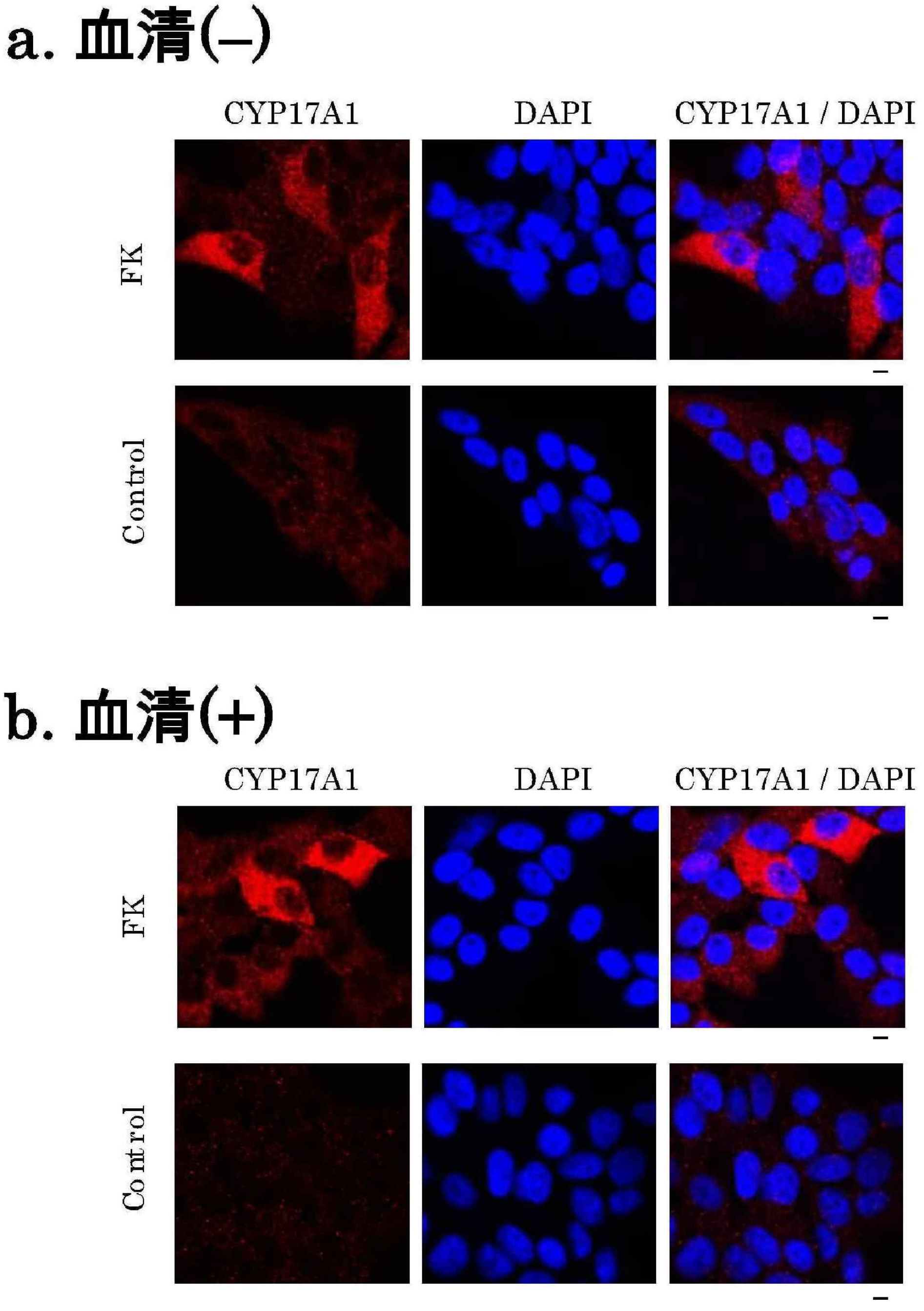


図3. FKによるCYP17A1の発現誘導

H295R細胞を無血清状態 (a)、または血清状態 (b) で培養。FK (10 μM)添加24時間後 (a)、または48時間後 (b) に、細胞を固定し抗CYP17A1抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、共焦点顕微鏡下で観察した。

赤色：CYP17A1、青色：核－DAPI、x600水浸、黒棒線＝10μm

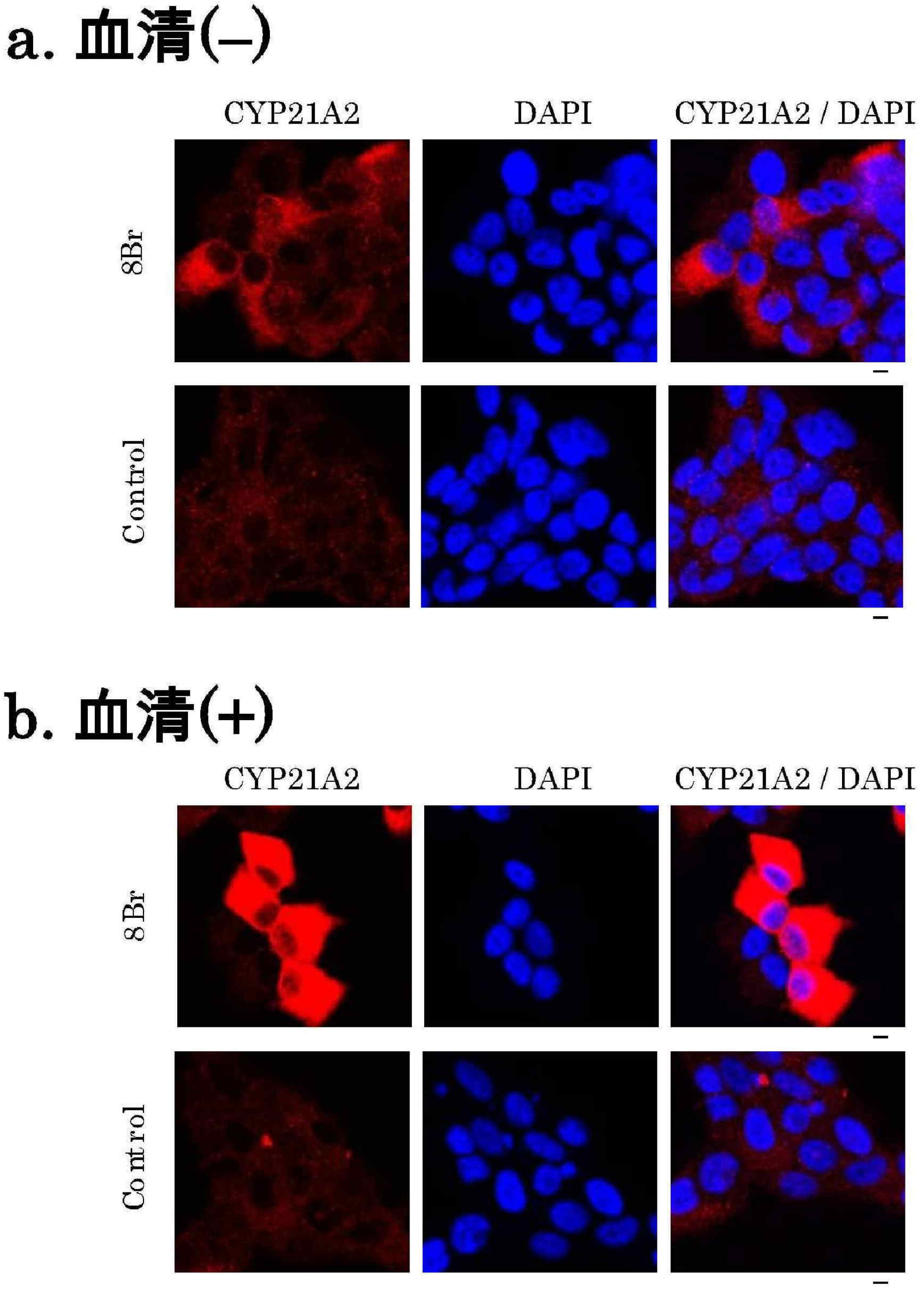


図4. 8BrによるCYP21A2の発現誘導

H295R細胞を無血清状態 (a)、または血清状態 (b) で培養。8Br (500 μM)添加24時間後 (a)、または48時間後 (b) に、細胞を固定し抗CYP21A2抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、共焦点蛍光顕微鏡下で観察した。

赤色：CYP21A2、青色：核－DAPI、x600水浸、黒棒線＝10μm

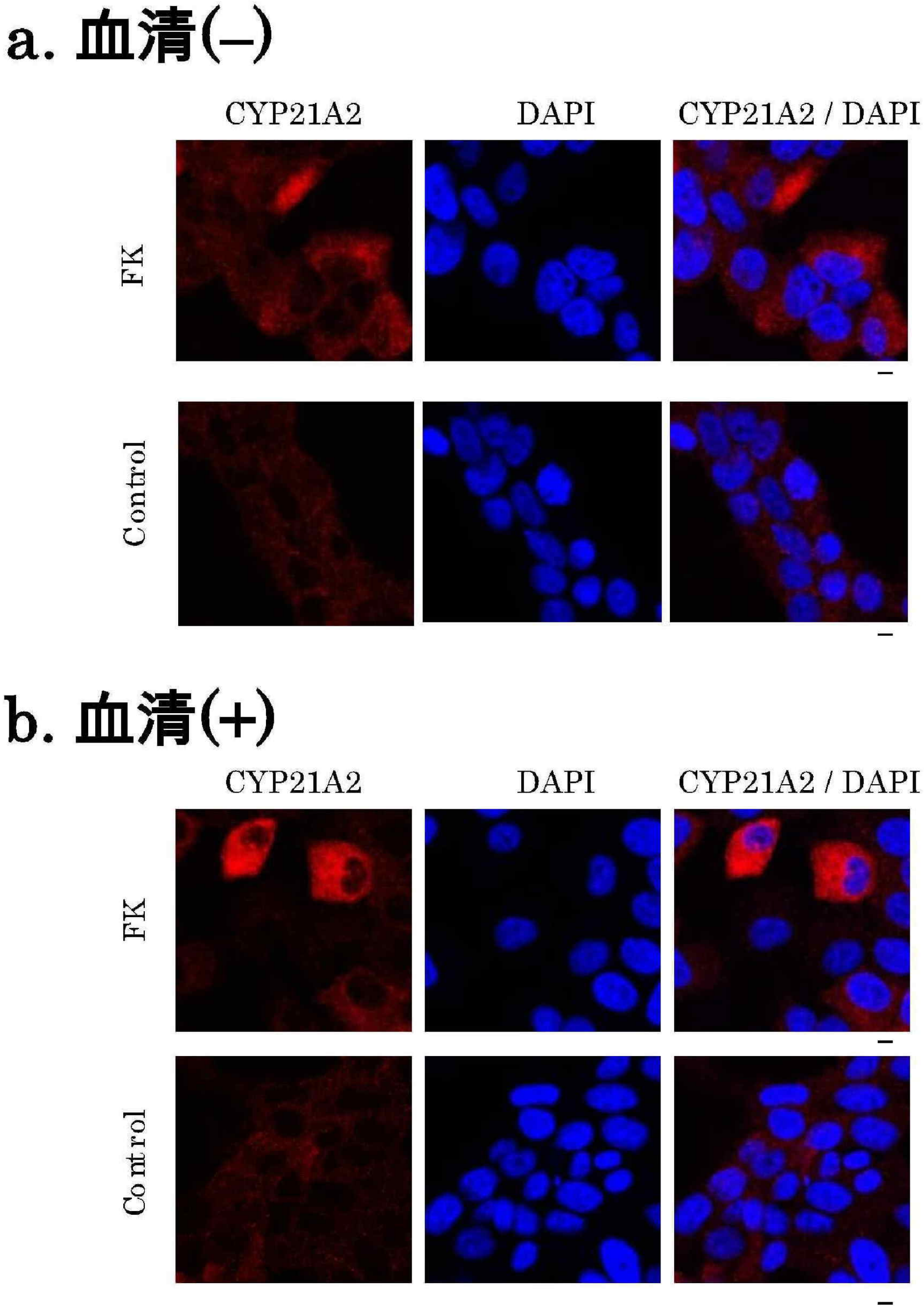


図5. FKによるCYP21A2の発現誘導

H295R細胞を無血清状態 (a)、または血清状態 (b) で培養。FK (10 μM)添加24時間後 (a)、または48時間後 (b) に、細胞を固定し抗CYP21A2抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、共焦点顕微鏡下で観察した。

赤色：CYP21A2、青色：核－DAPI、x600水浸、黒棒線＝10μm

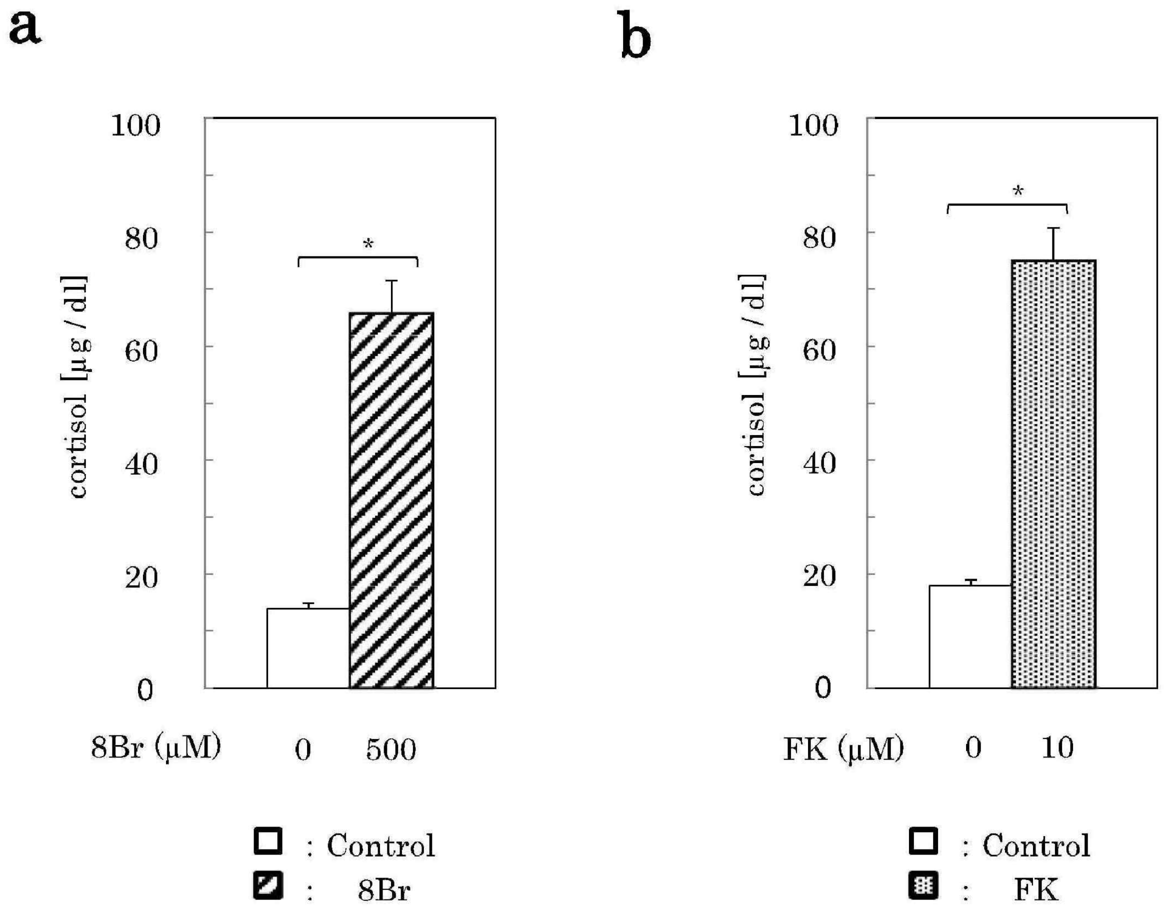


図6. 8BrおよびFKによるコルチゾール産生

H295R細胞を血清状態で培養。8Br (500 μM) (a)、およびFK (10 μM) (b)を添加し、48時間後に 培養液中のコルチゾール濃度を測定した。（n=6, *p<0.05）

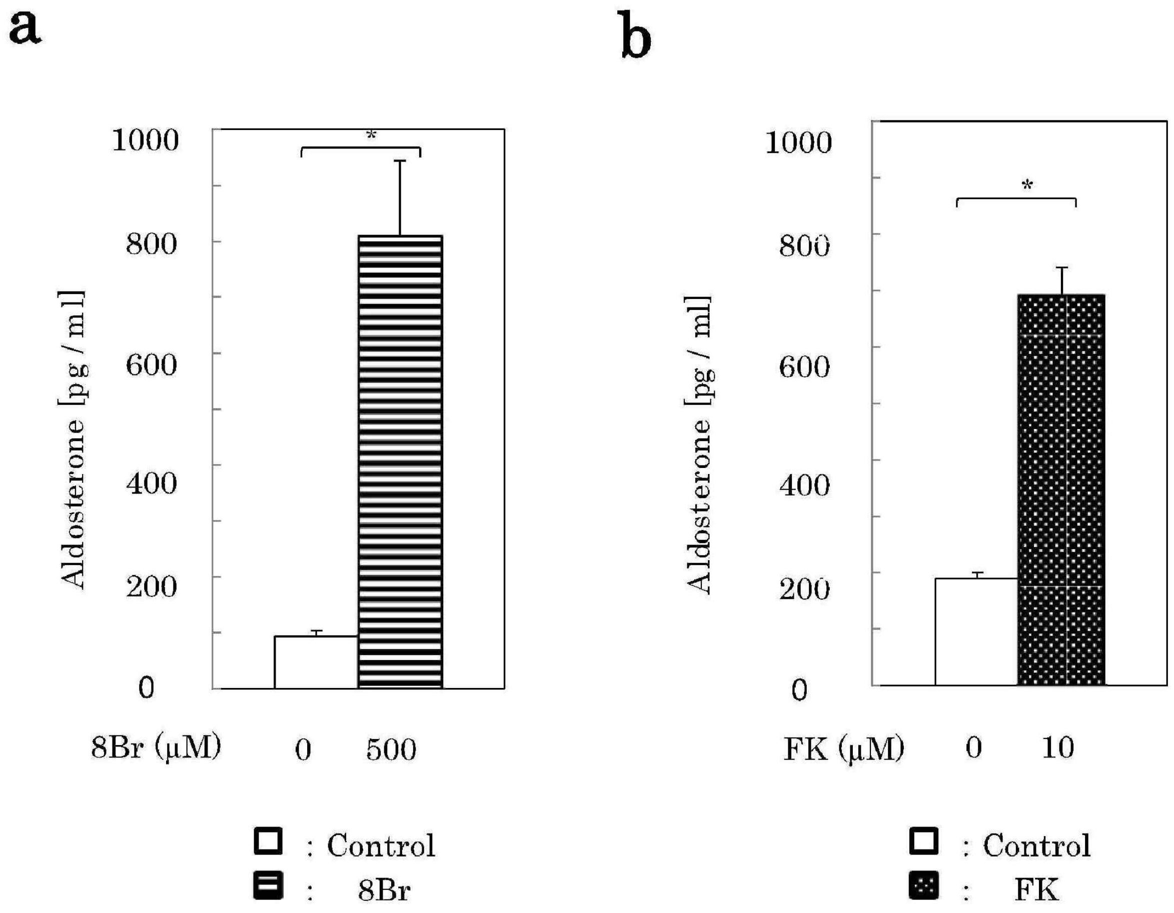


図7. 8BrおよびFKによるアルドステロン産生

H295R細胞を血清状態で培養。8Br (500 μM) (a)、およびFK (10 μM) (b)を添加し、48時間後に 培養液中のアルドステロン濃度を測定した。 (n=6, *p<0.05)

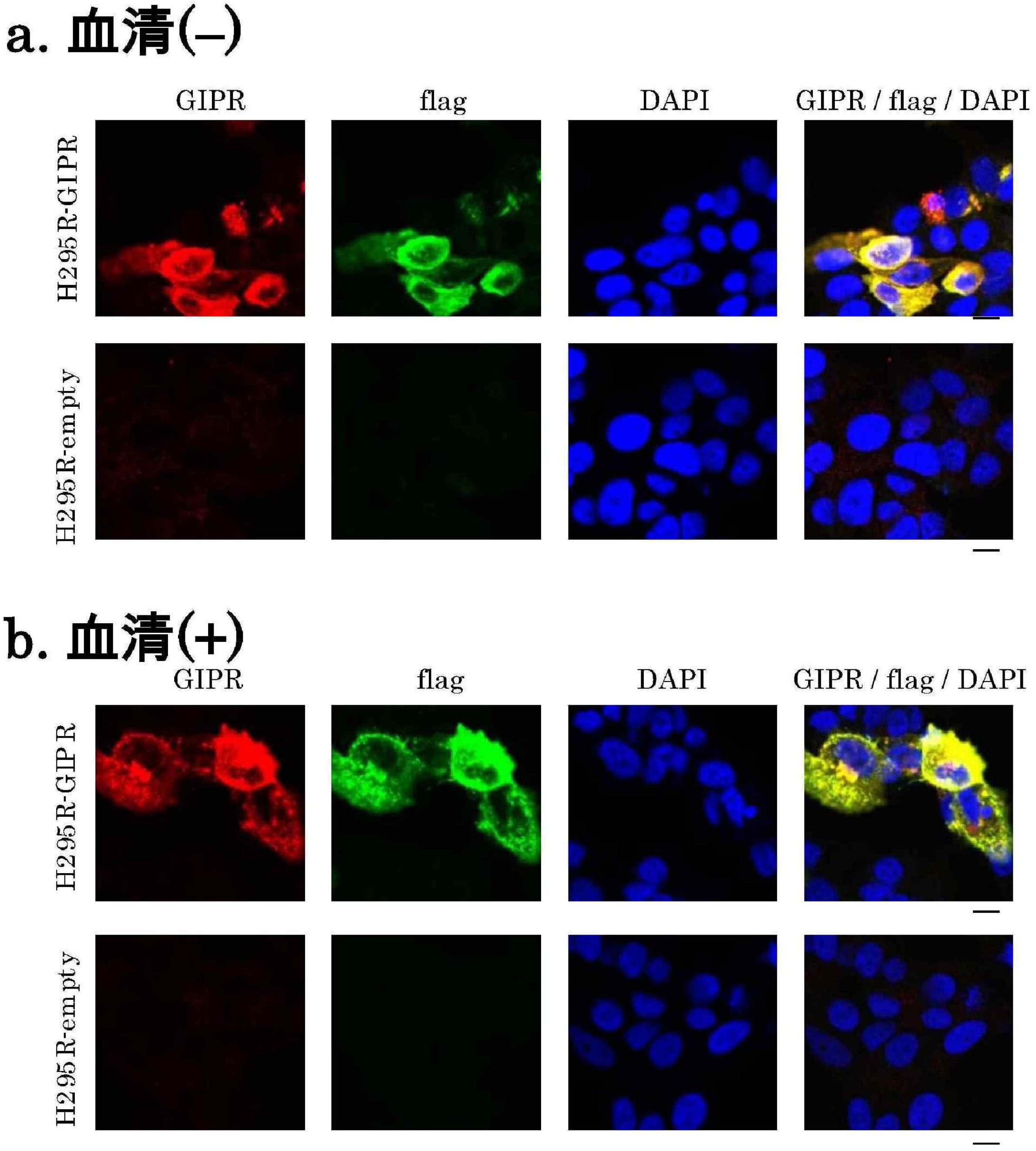


図8. H295R-GIPR細胞におけるGIPRとflagの発現

H295R細胞に、pcDNA3.1 hGIPR-flag発現ベクター、またはコントロールのemptyベクターを導入し、24時間後に無血清(a)、または血清を含む(b)培地に交換し、さらに24時間後に固定し、抗GIPR抗体と抗flag抗体で蛍光二重染色を行い、共焦点蛍光顕微鏡下で観察した。

赤色：GIPR、緑色：flag、青色：核ーDAPI、x600水浸、黒棒線＝10μm

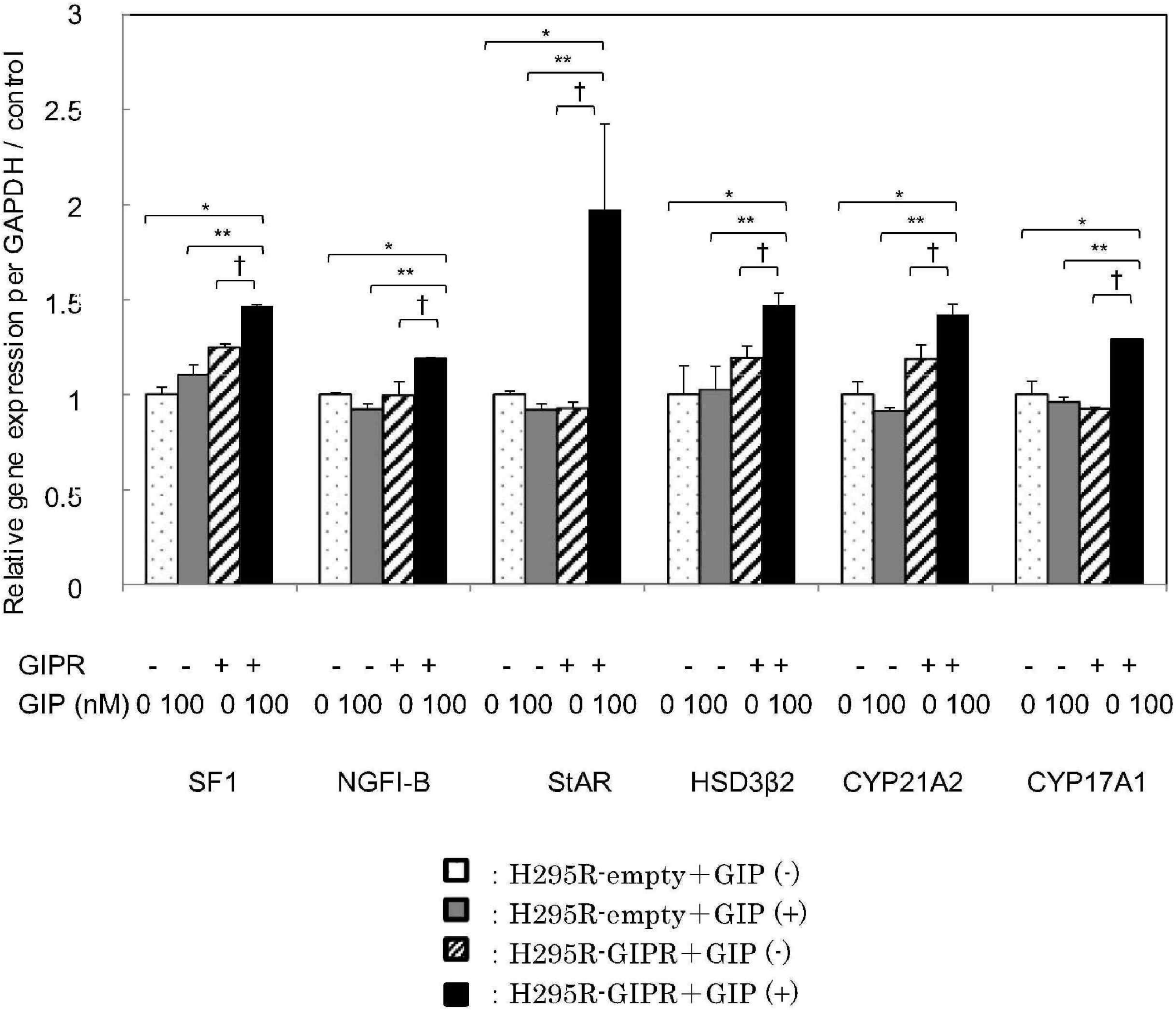


図9. H295R-GIPR細胞におけるGIP刺激によるステロイド合成系因子の遺伝子発現

H295R-hGIPR細胞、またはH295R-empty細胞を無血清培地で24 時間培養後、GIP 100 nM添加し、6時間後にステロイド合成に関与する因子の遺伝子発現レベルを、定量性RT-PCR法で解析した。（n=3, * / ** / † $p<0.05$）

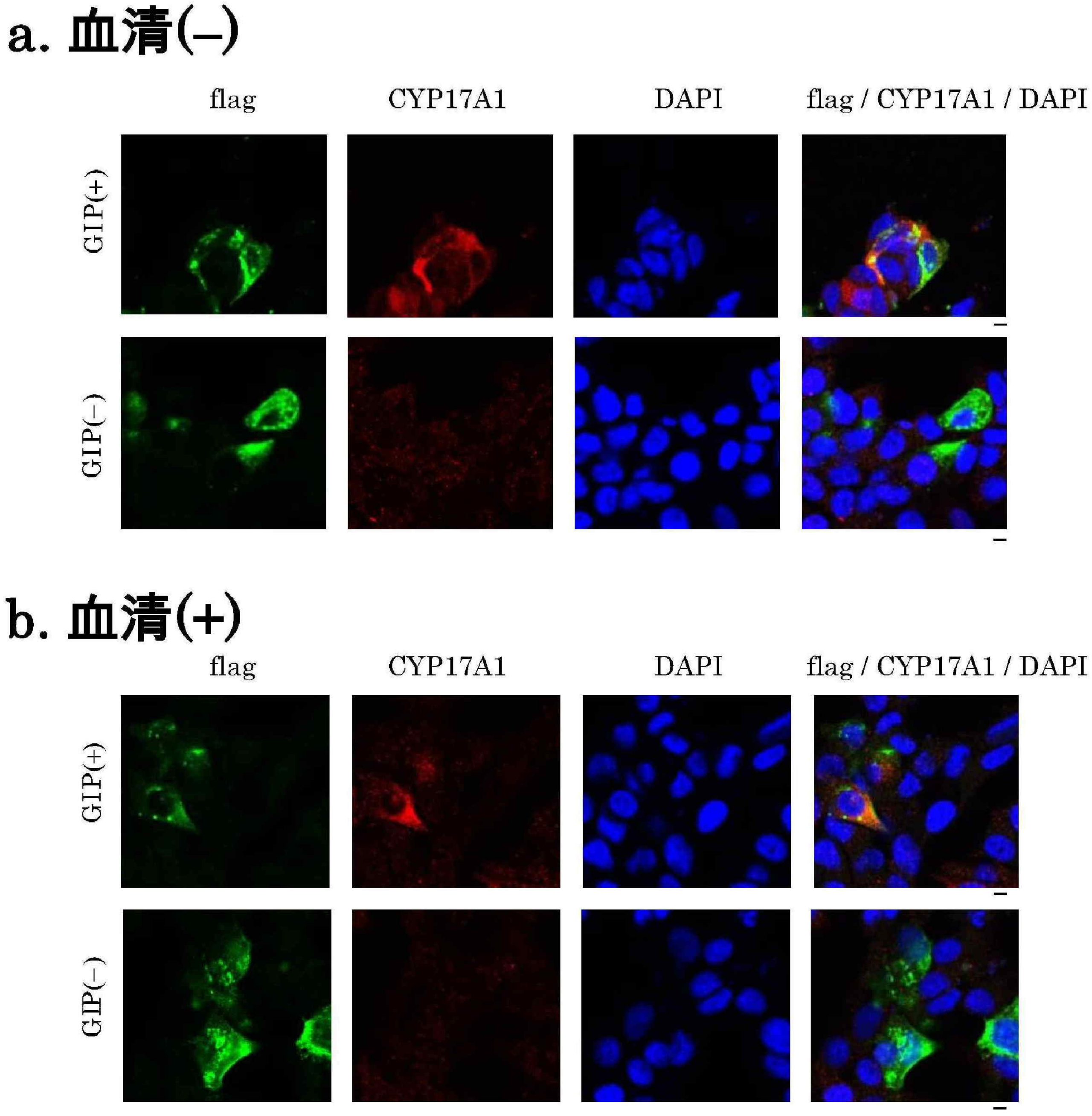


図10. H295R-GIPR細胞におけるGIP刺激によるCYP17A1の発現誘導

H295R-hGIPR細胞を無血清状態 (a)、または血清状態 (b) で24 時間培養後、GIP 100 nM添加し、24時間後 (a)、または48時間後 (b) にそれぞれ細胞を固定した。抗CYP17A1抗体と抗flag抗体を用いて蛍光二重免疫染色を行い、共焦点蛍光顕微鏡下で観察した。

緑色：flag、赤色：CYP17A1、青色：核－DAPIx600水浸、黒棒線＝10µm

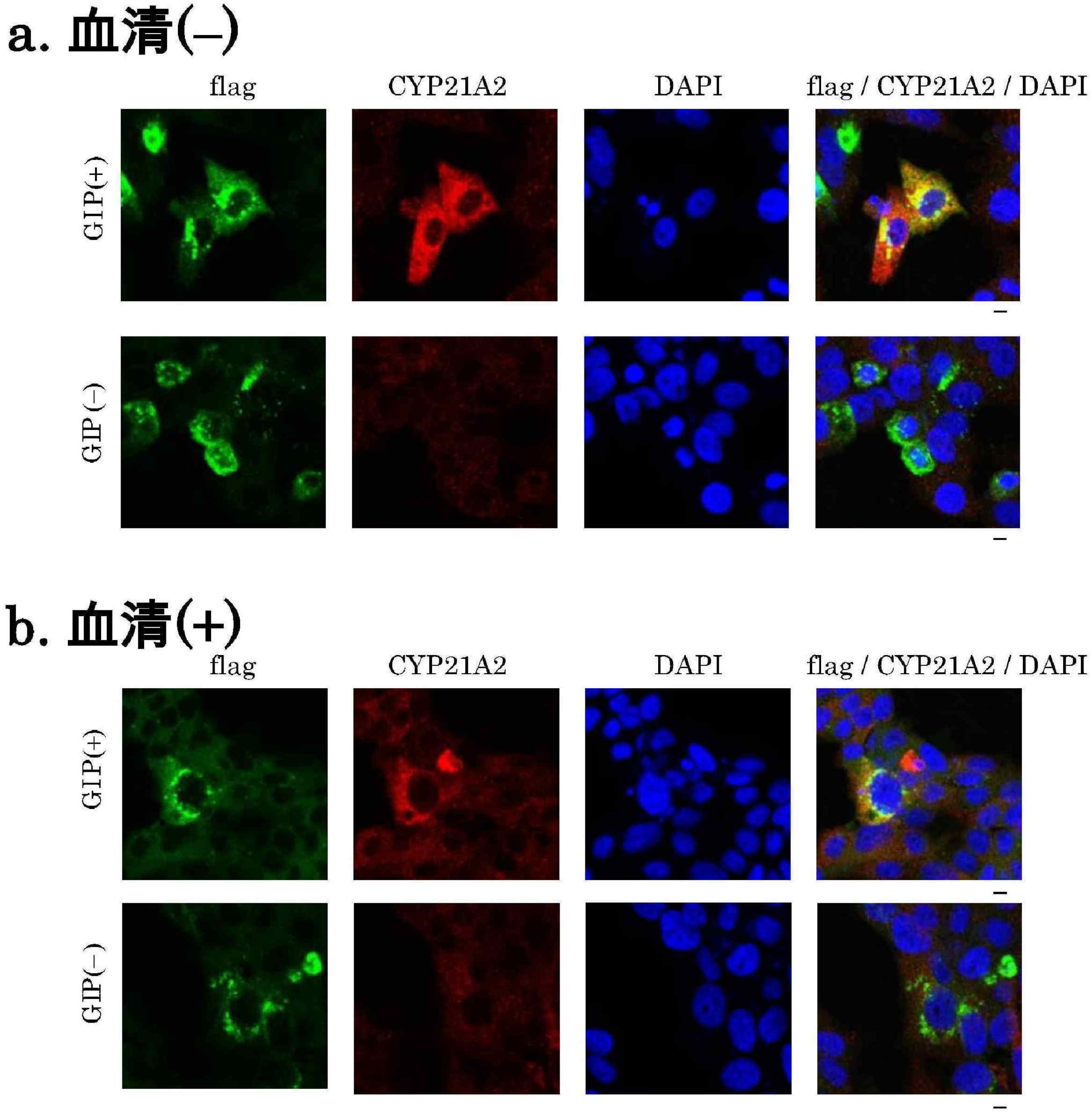


図11. H295R-GIPR細胞におけるGIP刺激によるCYP21A2の発現誘導

H295R-hGIPR細胞を無血清状態 (a)、または血清状態 (b) で24 時間培養後、GIP (100 nM) 添加し、24時間後 (a)、または48時間後 (b) にそれぞれ細胞を固定した。抗CYP21A2抗体と抗flag抗体を用いて蛍光二重免疫染色を行い、共焦点蛍光顕微鏡下で観察した。

緑色：flag、赤色：CYP21A2、青色：核—DAPI、x600水浸、黒棒線＝10μm

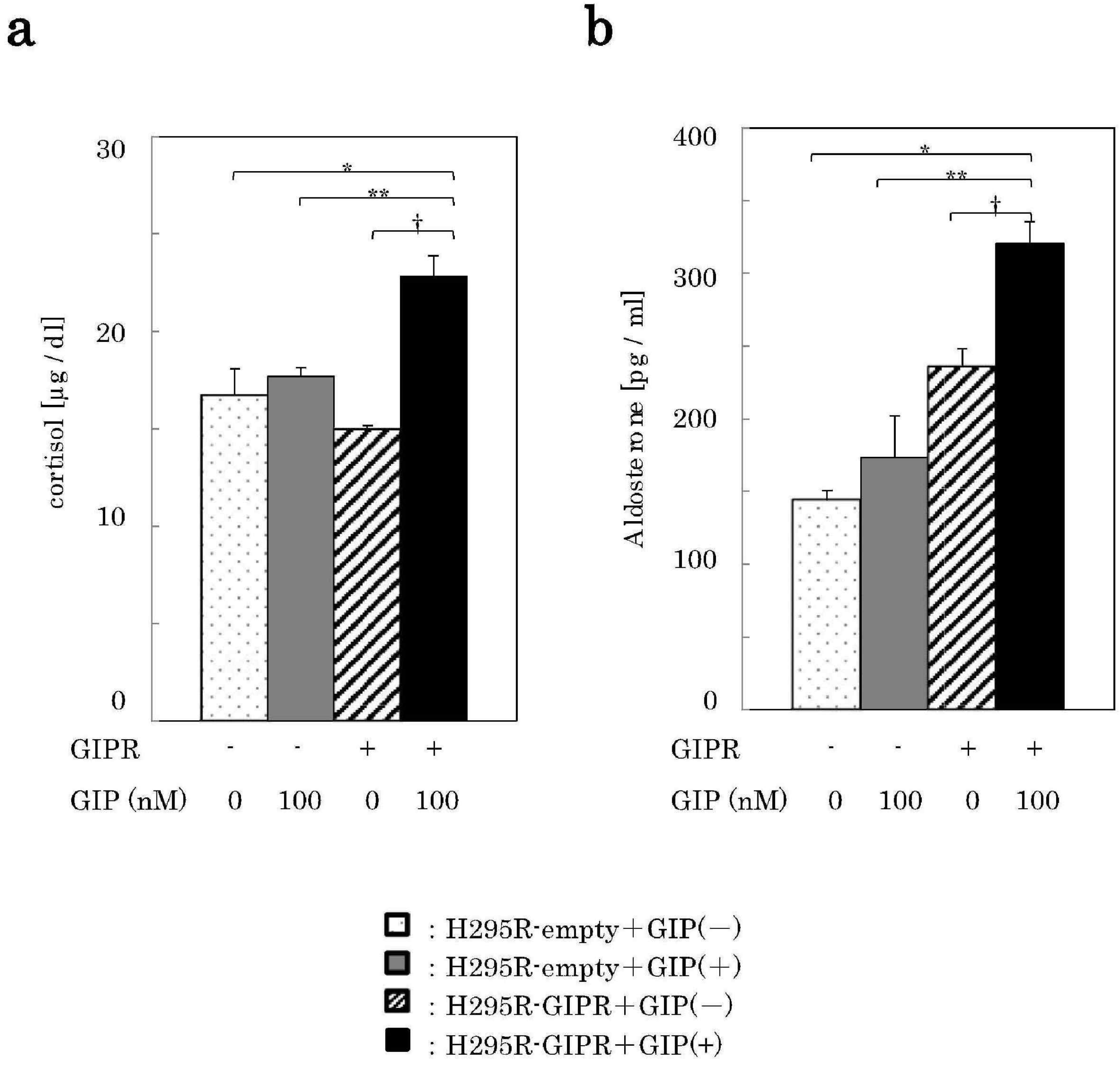


図12. H295R-GIPR細胞におけるGIP刺激によるステロイド産生

H295R細胞を血清状態で培養した。GIP (100 nM)を添加し、48時間後に 培養液中のコルチゾール (a) およびアルドステロン (b) 濃度を測定した。
(n=3, * / ** / † p<0.05)

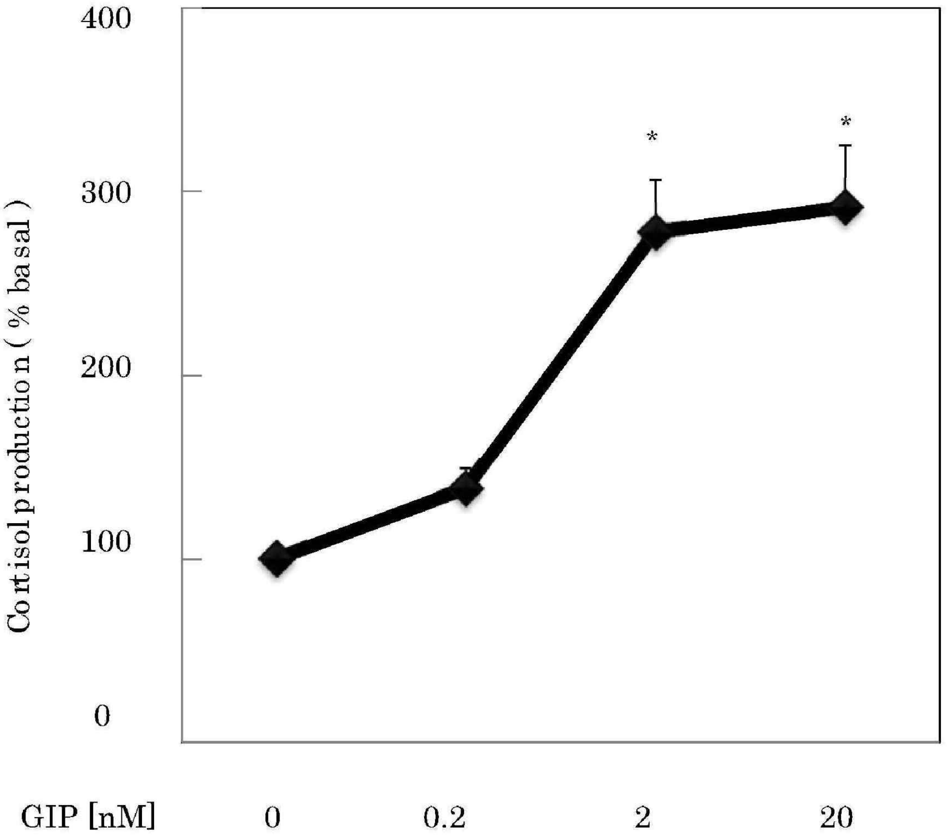


図13. FD-CS副腎の初代培養細胞におけるGIPによるコルチゾール産生

FD-CS患者の摘出副腎の初代培養細胞に、GIP（0, 0.2, 2, 20 n M）を添加し、3時間後に培養液中のコルチゾール濃度を測定した。（n=4, Dunnett's test, * $p<0.05$）

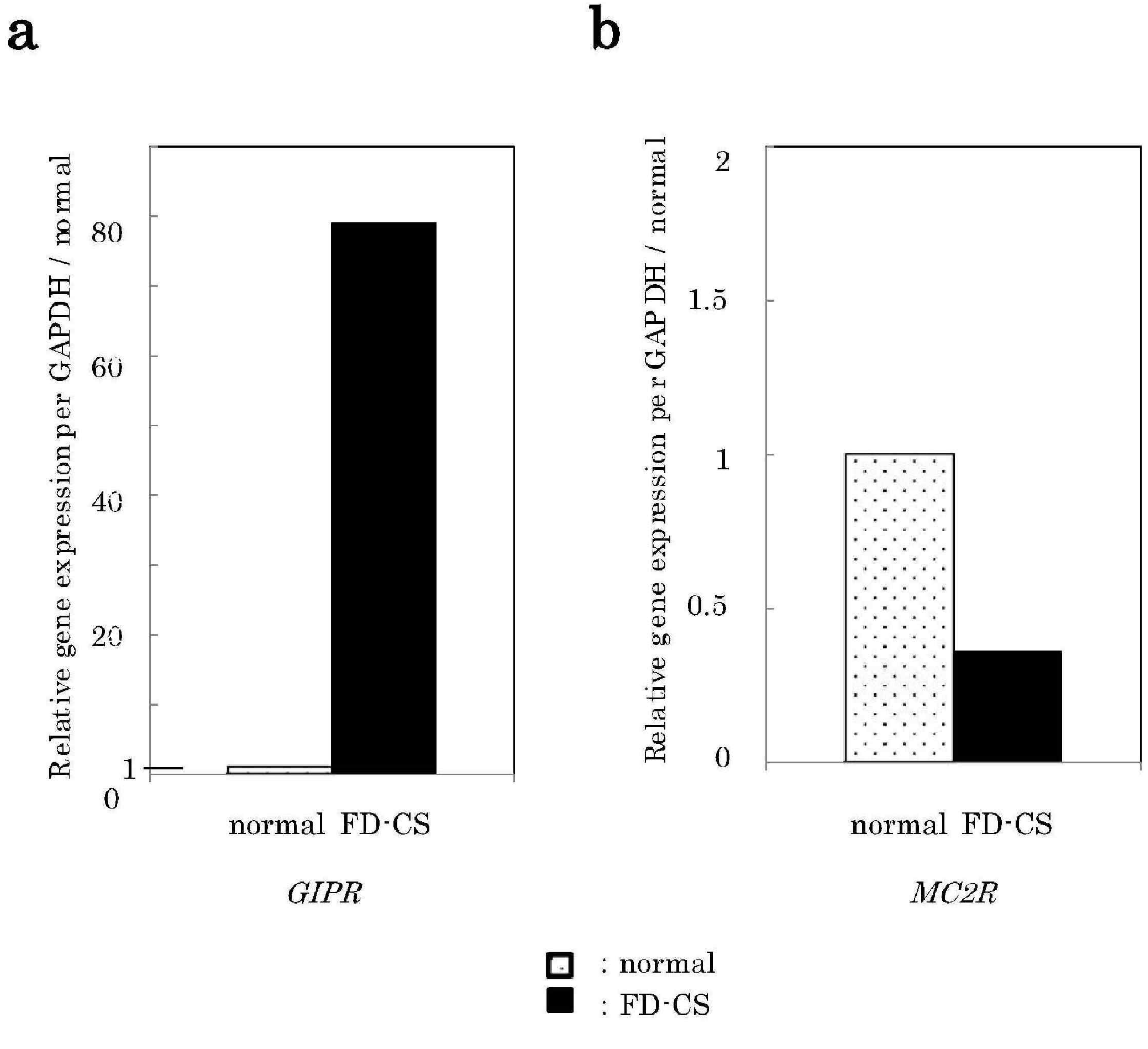


図14. FD-CS副腎組織における*GIPR*および*MC2R*の遺伝子発現

FD-CS患者の摘出副腎とアルドステロン産生腺腫の腫瘍近傍組織（normal）における*GIPR*および*MC2R*の遺伝子発現を定量性RT-PCR法で解析した。

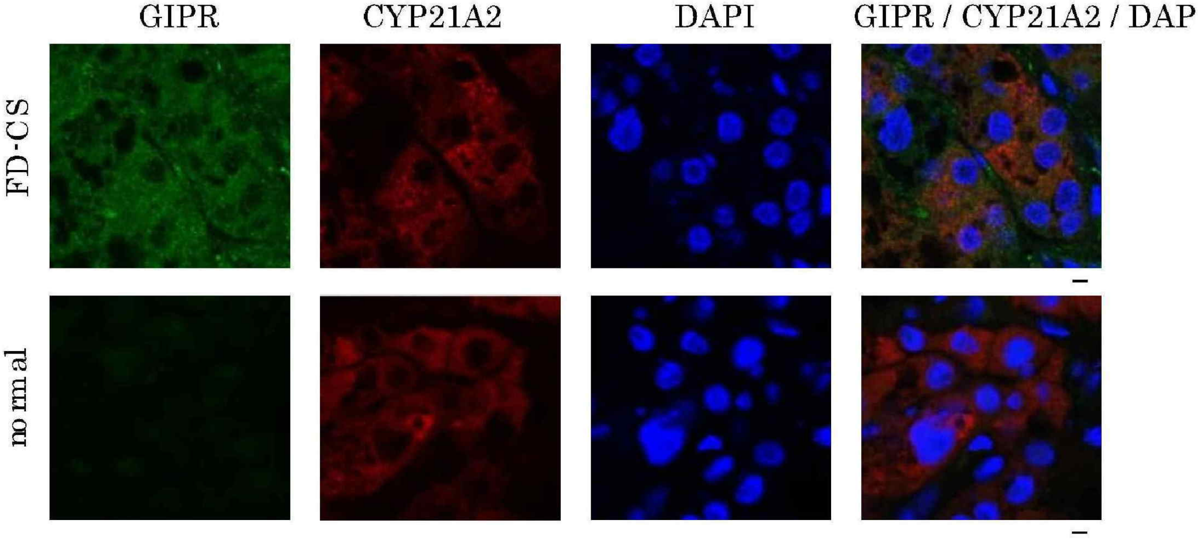


図15. FD-CS副腎組織におけるGIPRとCYP17A1の発現

FD-CS患者の摘出副腎とGIP非依存性クッシング症候群の副腎組織（normal）を、抗GIPR抗体と抗CYP21A2抗体で蛍光二重染色を行い、共焦点蛍光顕微鏡下で観察した。

緑色：GIPR、赤色：CYP21A2、青色：核－DAPI、x600水浸、黒棒線＝10μm