

明高値、11-deoxycortisol (S), F の低値、E2 低値を認め、17 $\alpha$ -hydroxylase 欠損症と診断した<sup>7)</sup>。

(症例 5) 19 歳女性。原発性無月経の精査目的で日本医科大学来院。現症では乳房發育不良で性毛なし。血圧は一貫して正常で 138/66mmHg。染色体は 46XX、血清 K3.7mEq/L、骨年齢の遅延 (14 歳) を認めた。血中ステロイドプロフィールで DOC 1.07 ng/ml (正常 0.03-0.33), B488 ng/ml (正常 0.21-8.47) と共に著明高値、11-deoxycortisol (S), F の低値、E2 低値を認め、17 $\alpha$ -hydroxylase 欠損症と診断した。

(倫理面への配慮)

患者、家族の同意を得た上で DNA 採取および遺伝子解析を行った。

### C. 研究結果

各患者 CYP17 を解析した結果、症例 1 ではコドン 65 or 66 の G 欠損の homozygous 変異を認めた。その結果、フレームシフトによるコドン 74 における早期終止コドン出現のため、患者 P450c17 は不活性と考えられた。症例 2 では Phe (53 or 54) 欠損を homozygous 変異として認めた<sup>2)</sup>。症例 3 では Phe (53 or 54) 欠損並びに His (CAC)373 の Leu (CTC)への複合ヘテロ接合変異を認めた<sup>6)</sup>。症例 4<sup>7)</sup>、5 はともに共通の変異として翻訳開始 Met (ATG)から ATC への homozygous 変異を認めた。

### D. 考察

17 $\alpha$ -hydroxylase 欠損症の原因酵素である cytochrome P450c17 は 17 $\alpha$ -hydroxylase 活性と 17, 20-lyase 活性の両方を有する事実から本症は 17 $\alpha$ -hydroxylase/17, 20-lyase 複合酵素欠損症と言い換えることができる<sup>1)</sup>。酵素活性の障害程度が強い場合は女性患者では先天的なエストロゲン合成障害のために原発性無月経をはじめとする二次性徴の欠如をきたす。症例 1 はいわゆる完全欠損型で患者 P450c17 は作用發揮に不可欠な部位であるヘム結合システイン (442) より N 端側で早期終止コドンが出現するために 73 アミノ酸からなる短い蛋白しかできない。その

ため P450c17 活性は 0 と予想され、患者の無月経の病態をよく説明し得た。一方、症例 2 では不規則あるいはほぼ正常生理を認め、Phe53 or 54 欠失変異をホモ接合型変異として認めた<sup>2)</sup>。この変異は過去、同様に月経を認めた症例において見いだされた変異とまったく同一であり、発現実験から wild type と比べて 17 $\alpha$ -hydroxylase 活性 20%、17, 20-lyase 活性 5%と部分 P450c17 活性を保持していることが証明されている<sup>3)</sup>。同様に生理を有した症例 3 ではこの Phe (53 or 54) 欠失変異と既に報告されている His (CAC)373 の Leu (CTC)<sup>8)</sup>の複合ヘテロ接合変異を認めた。His373Leu 変異はその発現実験から P450c17 活性は 0 であることが報告されており<sup>8)</sup>、この患者の推定個人活性は 17 $\alpha$ -hydroxylase 活性 10%、17, 20-lyase 活性 2.5%と予想され、生理は予想以上に低い P450c17 活性でも発現し得ることが示唆された。他の報告 1 家系<sup>9)</sup>並びに自験例も含めてこの Phe(53 or 54)欠失変異を有する症例群は本邦では 5 例認められている (表 1)。大変、興味深いことにこの変異を有する女性患者ではいずれも生理を有し、本邦ではこの表現型に共通する変異である可能性が示唆された。また 1 家系の同胞男性例ではこの変異により中間性の外陰部を呈しており<sup>9)</sup>、この変異 P450c17 が部分活性を有することを支持する所見と言える。一般的に CYP17 変異は点突然変異が多く、また比較的 hot spot を認めないのが特徴であるが、この変異は諸外国からは報告されておらず、本邦では東北地方を中心に比較的各地でこの変異が見いだされている点は興味深い。現在までのところ検索し得た範囲内では本邦において 14 種類の CYP17 変異が同定されているが、Phe53 or 54 欠失変異はもっとも多く見いだされている変異である。この変異をもつ患者の性腺機能不全症状は比較的軽度であることから特に女性(46XX)において低レニン性本態性高血圧と診断されている患者群や不妊患者群の中にこの変異の保有者が想像以上に存在している可能性も考えられ、今後の検討課題と言える。

一方、ステロイドマップ上、17 $\alpha$ -

hydroxylase 欠損症では B、DOC の著明高値を呈するために通常、高血圧を呈するが、極めて稀に高血圧を呈さない症例が報告されている。検索した範囲では今回検討した 2 例 (症例 4、5) に加え、文献 1 の 124 例より抽出した 4 例を加えた 6 例のみでその頻度はわずか 4.8 %であった。今回、高血圧を認めない 2 症例においてまったく共通の翻訳開始 Met (ATG) の ATC への homozygous 変異を認めた。この変異のため患者 P450c17 は第 49 コドンの第 2 Met より翻訳が開始されるものと推察された。開始 Met より 16 アミノ酸の部分までは疎水性アミノ酸残着基がクラスターをなす部位で、ミクロソーム型 P450 の P450c17 が小胞体膜へ anchoring する重要なドメインの一つと想定されており、患者 P450c17 ではこのドメインを含め N 端側を 48 アミノ酸が欠失するため、P450c17 活性が消失すると想定された。事実、変異 cDNA の発現実験でも活性を認めなかった。両症例とも B、DOC は著明高値を呈しており、低 K 血症は認めることより腎でのミネラルコルチコイド受容体には異常はないと推定される。ミネラルコルチコイド性高血圧で時々認められる escape 現象もしくは Na 感受性機構の低下等の機序が推定されるが、高血圧を認めない真の原因は不明である。同じ表現型の症例に同一の変異が見い出されたことから、表現型との何らかの因果関係が示唆されるが、偶然の可能性も否定できない。

#### E. 結論

1. CYP17 の Phe53 or 54 欠失変異は本邦 17 $\alpha$ -hydroxylase 欠損症患者でもっとも多く認められる変異であり、この変異をもつ患者の性腺機能不全症状は比較的軽度であることから特に女性(46XX)において低レニン性本態性高血圧と診断されている患者群や不妊患者群の中にこの変異の保有者が想像以上に存在している可能性も考えられる。
2. 高血圧を認めない 17 $\alpha$ -hydroxylase 欠損症患者 2 例においてともに CYP17 の翻訳開始メチオニンの変異を認めた。両患者ステロイドプロフィールや変異解析の結果からは完全欠損型と考えられ、鉍質コルチ

コイド高値にもかかわらず高血圧を呈さない理由については不明であった。

#### F. 参考論文

1. Yanase T, Simpson ER, Waterman MR: 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase deficiency: From clinical investigation to molecular definition. *Endocr Rev* 12: 91-108, 1991.
2. Miura K, Yasuda K, Yanase T, Yamakita N, Sasano H, Nawata H, Inoue M, Fukaya T, Shizuta Y.: Mutation of cytochrome P45017 $\alpha$  gene (CYP17) in a Japanese patient previously reported as having glucocorticoid-responsive hyperaldosteronism; with a review of Japanese patients with mutations of CYP17. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3797-3801, 1996.
3. Yanase T, Kagimoto M, Suzuki S, Hashiba K, Simpson ER, Waterman MR.: Deletion of a phenylalanine in the N-terminal region of human cytochrome P45017 $\alpha$  results in partial combined 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase deficiency. *J Biol Chem* 364: 18076-18082, 1989
4. 江副幸子、松永一美、曲直部仙子、新井武志、金山良男、姫野誠一、岩尾憲人：続発性副甲状腺機能亢進症を合併した 17 $\alpha$ -hydroxylase 欠損症の一例 *Clinical Calcium* 9: 158-162, 1999
5. Miura K, Yoshinaga K, Goto K et al. 1968 A case of glucocorticoid-responsive hyperaldosteronism. *J Clin Endocrinol* 28:1807-1815.
6. Matsuzaki S, Yanase T, Murakami T, Uehara S, Fukaya T, Nawata H, Yajima A: Inductions of endometrial cycles and ovulation in a women with combined 17 $\alpha$ -hydroxylase/17, 20-lyase deficiency due to compound heterozygous mutations on the P450c17 gene. *Fertility Sterility* 73: 1183-1186, 2000

7. Satoh J, Kuroda Y, Nawata H, Yanase T: Molecular basis of hypokalemic myopathy due to 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase deficiency. *Neurology* 51: 301-306, 1998
8. Monno S, Ogawa H, Date T, Fujioka M, Miller WL, Kobayashi M: Mutation of histidine 373 to leucine in cytochrome P450c17 causes 17 $\alpha$ -hydroxylase deficiency. *J Biol Chem* 268: 25811-7, 1993
9. Kaneko E, Kobayashi Y, Yasukochi Y, Kishi Y, Numano F: Genomic analysis of two siblings with 17 $\alpha$ -hydroxylase deficiency and hypertension. *Hypertension Res* 17: 143-147, 1994
5. Mu Y-M, Yanase T, Nishi Y, Hirase N, Goto K, Takayanagi R, Nawata H: A nuclear system constituted by RAR:RXR heterodimer induces aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 166: 137-145, 2000
6. Oba K, Yanase T, Ichino I, Goto K, Takayanagi R, Nawata H: Transcriptional regulation of human *FTZ-F1* gene encoding Ad4BP/SF-1 *J Biochem (Tokyo)* 128: 517-528, 2000
7. Mu Y-M, Yanase T, Nishi Y, Takayanagi R, Goto K, Nawata H: Nuclear receptor system constituted by PPAR $\gamma$ :RXR heterodimers inhibits the expression of cytochrome P450arom in human granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* in press, 2001

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Hirase N, Yanase T, Mu Y-M, Muta K, Umemura T, Takayanagi R, Nawata H: Thiazolidinedione suppresses the expression of erythroid phenotype in erythroleukemia cell line K562. *Leukemia Research* 24: 393-400, 2000.
2. Matsuzaki S, Yanase T, Murakami T, Uehara S, Fukaya T, Nawata H, Yajima A: Inductions of endometrial cycles and ovulation in a women with combined 17 $\alpha$ -hydroxylase/17, 20-lyase deficiency due to compound heterozygous mutations on the P450c17 gene. *Fertility Sterility* 73: 1183-1186, 2000
3. Mu Y-M, Yanase T, Nishi Y, Goto K, Waseda N, Oda T, Takayanagi R, Nawata H: Insulin sensitizer, troglitazone directly inhibit aromatase activity in human ovarian granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 271: 710-713, 2000.
4. Adachi M, Takayanagi R, Tomura A, Imasaki K, Kato S, Goto K, Yanase T, Ikuyama S, Nawata H: Androgen insensitivity syndrome as a possible coactivator disease. *N Engl J Med* 343: 856-862, 2000
8. Kimura R, Yoshii H, Nomura M, Kotomura N, Ishihara S, Oba K, Yanase T, Gotoh K, Nawata H, Morohashi K: Identification of novel first exons in Ad4BP/SF-1(NR5A1) gene and their tissue- and species specific usage. *Biochem Biophys Res Commun* 278: 63-71, 2000.
9. Nishi Y, Yanase T, Mu Y-M, Oba K, Ichino I, Saito M, Nomura M, Mukasa C, Okabe T, Goto K, Takayanagi R, Kashimura Y, Haji M, Nawata H: Establishment and characterization of a steroidogenic human granulosa-like tumor cell line, KGN that expresses functional FSH receptor. *Endocrinology* 14: 437-445, 2001

#### H. 知的所有権の取得状況

- |           |    |
|-----------|----|
| 1. 特許取得   | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |

表 1 17 $\alpha$ -hydroxylase欠損症患者におけるPhe (53 or 54)欠失変異

症例 (報告者)	患者住居	性腺機能	高血圧	変異型
1. 20歳女性 (鈴木ら/1974)	長崎	月経あり(不規則)	あり	ホ毛変異
2. 17歳女性 (Miuraら/1968)	東北	月経あり(regular)	あり	ホ毛変異
3. 26歳女性 (Kanekoら/1994)	東京	月経あり(不規則)	あり	ホ毛変異
4. 20歳男性 (Kanekoら/1994)	東京	Hypospadias, cryptorchidism	あり	ホ毛変異
5. 26歳女性 (Matsuzakiら/2000)	東北	月経あり(regular)	あり	複合ヘテロ変異 (His373Leu)

## 副腎性高血圧における食事性カリウムの効果

高橋克敏、安東克之、藤田敏郎  
東京大学大学院医学研究科内科

### 研究要旨

副腎性高血圧のうち鉍質コルチコイド高血圧における高血圧と高血圧性臓器障害に及ぼす食事性カリウム負荷の効果を明らかにすることを主な目的に、DOCA 食塩高血圧ラットにおいて 8% KCl 食の経口投与の効果を検討した。食事性カリウム負荷は、DOCA 食塩高血圧ラットの血圧値には有意な影響を及ぼさなかったが、軽度の利尿効果を示し、腎障害発現を軽減し、腎臓における内皮型新規酸化 LDL 受容体 LOX-1 の発現増強を軽減した。また、酸化ストレスの指標である血中 8-iso-PGF<sub>2</sub>α 高値を改善した。以上より、食事性カリウム摂取は鉍質コルチコイド高血圧の臓器障害の軽減に有用であることが示唆された。

### A. 研究目的

一般に食事性カリウムは高血圧ならびに心臓血管系臓器障害を軽減する作用を有すると考えられている 1) 2)。ところが、副腎皮質球状層では、カリウムは産生、分泌の両面においてアルドステロン刺激となることが知られている 3)。この点に関連して、進行性腎障害モデルの残存腎ラットでは、内因性アルドステロン分泌が高血圧と高血圧性臓器障害の発現に加担すること 4)、さらに、食事性カリウム摂取はアルドステロン分泌を刺激することにより血圧上昇に寄与すること 5) が近年報告されている。我々が平成 11 年度本研究班分担研究で用いた鉍質コルチコイド高血圧モデルの DOCA 食塩高血圧ラットでは 6)、残存腎ラットと同様に片腎摘出を行うが、外因性に DOCA を投与するために残存腎ラットとは鉍質コルチコイド制御系並びにカリウム代謝系が全く異なる。そこで、鉍質コルチコイド高血圧における高血圧と高血圧性臓器障害に及ぼす食事性カリウムの影響を明らかにすることを主な目的に、DOCA 食塩高血圧ラットを用いて以下の検討を行った。

### B. 研究方法

(1) DOCA 食塩高血圧ラットにおける食事性カリウム負荷の効果：

DOCA 食塩高血圧ラットは、昨年度同様 Sprague-Dawley ラット左腎摘出 1 週後に DOCA 100mg/kg を週 1 回皮下投与し 8%食塩食 (8%NaCl 食) を負荷し作製した。食餌性カリウム負荷は、8%食塩に加えて 8%KCl (8%NaCl+8%KCl 食) を負荷して作製した。作製 2 週目に、(1)血圧値、脈拍数(tail cuff 法)、(2)血液、尿生化学的指標(T.Chol., TG, BS, Cr, Na, K, 尿蛋白)等を検討した。

(2) DOCA 食塩高血圧ラットにおける LOX-1 発現調節：

平成 11 年度分担研究で検討した LOX-1 (Lectin-like oxidized LDL receptor-1)に関して、昨年度研究 (DOCA 食塩処理 4 週目) よりも早期における LOX-1 遺伝子の発現変化を、食餌性カリウム負荷による影響を含めて検討し、同モデルの臓器障害発現における LOX-1 の役割について引き続き検討した。平成 11 年度研究と同様、腎より AGPC 法により total RNA を抽出し、さらに mRNA を精製後、腎臓における LOX-1 遺伝子発現レベルをノザン解析で検討した。

(3) DOCA 食塩高血圧ラットにおける酸化ストレスの変化：

酸化ストレス指標（血中 8-iso-PGF<sub>2</sub> α 値 7）(Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)を ELISA 法で測定し、食事性カリウムの酸化ストレスに及ぼす影響を検討した。  
(4) 酸化ストレス産生に対するカリウムの直接作用：

上記(3)の食事性カリウム負荷の酸化ストレス産生への効果が、カリウム濃度変化による直接作用であるか否かを明らかにするため、カリウム濃度を 3.0mEq/l, 5.3mEq/l, 7.0mEq/l に調整した培養液中における培養ウシ大動脈内皮細胞(BAEC)及び単球マクロファージ系細胞 J774.1 の酸化ストレス産生を coelenterazine 化学蛍光法 8)

(coelenterazine 5 μM 処理後の培養細胞の化学蛍光をアロカ BLR-301 で計測)により検討した。

(倫理面への配慮) 動物愛護に関しては実験終了時の屠殺に際しては麻酔下で苦痛を最小限に行った。

### C. 研究結果

(1) DOCA 食塩高血圧ラットにおける食事性カリウム負荷の効果：

2週間の DOCA 食塩処理により尾動脈収縮期血圧は、170.7±1.7mmHg まで上昇し、これは対照群(133.1±5.3mmHg)より有意に高値であった。今回の検討では食事性カリウムの同時負荷による血圧低下作用は見られなかったが(166.7±3.3mmHg)、我々が以前に報告したように利尿作用が見られた 9)。1週目の時点においても、対照群 118.6±10.7mmHg、8%NaCl 食群 159.5±10.6mmHg、8%NaCl + 8%KCl 食群 158.2±10.2mmHg とやはり食事性カリウム同時負荷には血圧低下作用は見られなかった。なお、DOCA 食塩処理により惹起される低カリウム血症(3.06±0.72mEq/l)を、食事性

カリウム負荷は改善した。(対照群 4.52±0.073mEq/l、8%NaCl+8%KCl 食群 4.34±0.47mEq/l)。腎機能の指標については、血中 Cr 値は、対照群 0.52±0.02mg/dl、DOCA 食塩群 0.67±0.04mg/dl、DOCA 食塩+KCl 食群 0.5±0.03mg/dl と DOCA 食塩群のみが有意に高値であり、尿蛋白排泄量も同様の变化を示した。

(2) DOCA 食塩高血圧ラットにおける LOX-1 発現調節：

DOCA 食塩処理 2 週後の腎臓における LOX-1 発現レベルは、対照群に比べて 4.1 倍に増強しており、食事性カリウム同時負荷は、この増強を抑制した (1.7 倍)。

(3) DOCA 食塩高血圧ラットにおける酸化ストレスの変化：

酸化ストレス指標については、血中 8-iso-PGF<sub>2</sub> α 値が、対照群 39.6±6.2pg/ml、DOCA 食塩群 86.3±12.7pg/ml、DOCA 食塩+KCl 食群 45.5±6.6pg/ml であり、DOCA 食塩処理により酸化ストレスが増加し、食事性カリウム同時負荷はこの増加を抑制した。

(4) 酸化ストレス産生に対するカリウムの直接作用：

培養細胞 BAEC 及び単球マクロファージ系細胞 J774.1 における、coelenterazine 化学蛍光法で計測した酸化ストレスレベルは、培養条件での正常カリウム濃度 5.3mEq/l において TPA30nM 刺激により各々基礎値の 3.2 倍、7.9 倍に増強したが、培養液 DMEM 中のカリウム濃度を 3.0mEq/l, 5.3mEq/l, 7.0mEq/l に変化させても有意な酸化ストレスレベルの変化はみられなかった。

### D. 考察

今回の我々の検討により、鉍質コルチコイド高血圧モデルである DOCA 食塩高血圧ラットにおいては、進行性腎障害モデルの残存腎ラットとは異なり、食事性カリウ

ム負荷は腎障害を軽減しうるということが明らかになった。食事性カリウム負荷は、DOCA食塩による高血圧には影響を与えずに、酸化ストレスの指標を改善し、腎臓における LOX-1 発現亢進を抑制したことから、血圧とは独立した臓器保護作用を有する可能性が示唆された。一般に、食塩感受性高血圧は心血管系合併症の危険度がより強く、食事性カリウムの降圧作用や臓器保護作用も発現しやすいと考えられるが、進行性腎障害モデルでの報告 5) は、内因性鉱質コルチコイド産生系が食事性カリウム量により影響を受ける病態では、食事性カリウムは必ずしも臓器保護的に作用しない可能性を示唆する。一方、今回の我々の結果は、一義的な鉱質コルチコイド作用過剰が病態形成に預かる鉱質コルチコイド高血圧においては食事性カリウムが臓器保護作用を有することを示唆するものである。

食事性カリウム摂取にナトリウム利尿効果や降圧降下があることは我々を含めた複数のグループから報告がなされ 9) 10)、今回の検討でも軽度の利尿効果を認めたが、血圧値には有意な影響はなかった。今回のモデルでは比較的多量の DOCA 投与により尿量がすでに増加していたため、食事性カリウムの利尿作用が軽度となり血圧が低下しなかった可能性がまず考えられる。血圧測定に用いた tail cuff 法は血管障害が著明な場合には測定精度が落ちる可能性があるが、より早期の DOCA 食塩処置 1 週目においても食事性カリウムには降圧効果がなかったことから今回の結果はこの要因では説明しえないと考えられる。また、先に述べた残存腎モデルにおける血圧上昇は相対的なカリウム摂取過多に起因するアルドステロン上昇によるとされているが、我々のモデルでは過剰な鉱質コルチコイド作用が一義的に作用しカリウム欠乏状態をす

で惹起していたために食事性カリウム摂取が全く異なる結果を惹起したと考えられる。

腎臓における LOX-1 の役割に関連して、我々は Dahl 食塩感受性ラットにおいては高血圧による糸球体硬化、腎障害と平行して LOX-1 発現亢進が見られることを報告したが 11)、今回の DOCA 食塩高血圧ラットにおいては昨年度分担研究における検討時期よりも早期の 2 週目においても腎臓における LOX-1 発現亢進が認められた。腎障害の指標の一つである type IV collagen 遺伝子発現は、今年度プロトコルの DOCA 食塩高血圧ラットにおいて 2 週の時点では増強はなく、昨年度研究の 4 週の時点では増強があった。これは腎障害発現の初期過程に LOX-1 が関与する可能性と矛盾しないものである。

今回の検討では、食事性カリウムの酸化ストレス産生に及ぼす影響についても検討し、DOCA 食塩高血圧ラットにおける血中 8-iso-PGF<sub>2</sub>α 値上昇を食事性カリウム摂取が軽減することが明らかになった。腎臓における LOX-1 発現変化と血中 8-iso-PGF<sub>2</sub>α 値変化は平行しており、腎臓における酸化ストレスの変化による LOX-1 発現変化の可能性も考えられるが、この点は抗酸化剤投与の効果を検討するなどして、さらに検証が必要と考えられる。

食事性カリウム摂取による酸化ストレス軽減作用の機序については、DOCA 食塩高血圧ラットの低カリウム血症を食事性カリウム摂取が完全に改善したため、血圧とは独立して細胞外カリウム濃度変化がこれに預かる可能性について検討を加えた。従来報告では、生理的範囲でのカリウム濃度低下 (5.1mmol/l より 3mmol/l) が、培養内皮細胞及び単球マクロファージ系培養細胞でフリーラジカル産生を抑制するとの報告 12) や、逆に高カリウム負荷 (90mM) による脱分極がチロシンキナーゼ並びに Rac 依存

性にスーパーオキシド産生を刺激するとのヒト臍帯静脈内皮細胞での報告があるが13)、今回の培養細胞を用いた化学蛍光法による検討では、3.0~7.0mEq/lの範囲の細胞外カリウム濃度変化によっては酸化ストレス産生に有意な影響は見られず、細胞外カリウム濃度変化が直接作用として酸化ストレス軽減作用を発揮することは示唆されなかった。今回検討したカリウム値以外の生化学的指標では、T.Chol.値がDOCA食塩群のみで高値であったため、この影響について今後検討する必要がある。なお、本研究遂行中に他のグループからDOCA食塩高血圧ラットの血管組織において酸化ストレス産生が増強し血管運動機能が障害されることが報告されたが14)、今後はこのモデルの各臓器に対する食事性カリウムの影響について、特に臓器障害発現との関連を明らかにすることが課題となろう。

#### E. 結論

鉍質コルチコイド高血圧モデルであるDOCA食塩高血圧ラットでは、8% KCl食の経口投与は血圧値には有意な影響を及ぼさなかったが、軽度の利尿効果、腎障害軽減作用、腎臓における内皮型新規酸化LDL受容体LOX-1の発現増強抑制作用、血中8-iso-PGF<sub>2</sub>α低下作用を有した。3.0~7.0mEq/lの細胞外カリウム濃度変化は培養細胞系の酸化ストレス産生に対しては直接的な影響を及ぼさなかった。

#### F. 参考文献

- 1) Tobian L. Dietary sodium chloride and potassium have effects on the pathophysiology of hypertension in humans and animals. *Am J Clin Nutr.* 1997 ;65(2 Suppl):606S-611S.
- 2) Young DB, Lin H, McCabe RD. Potassium's cardiovascular protective mechanisms. *Am J Physiol.* 1995 ;268(4 Pt 2):R825-37.
- 3) Boyd, J., P.J. Mulrow, W.P. Palmore, and P. Silvo. 1973. Importance of potassium in the

regulation of aldosterone production. *Cir. Res. (Suppl)* 32: 139-145.

- 4) Greene EL, Kren S, Hostetter TH. Role of aldosterone in the remnant kidney model in the rat. *J Clin Invest.* 1996 ;98:1063-8
- 5) Ibrahim HN, Hostetter TH. Role of dietary potassium in the hyperaldosteronism and hypertension of the remnant kidney model. *J Am Soc Nephrol.* 2000 ;11:625-31.
- 6) 高橋克敏、安東克之、藤田敏郎. 厚生科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)副腎ホルモン産生異常に関する研究班、平成11年度研究報告書、平成12年3月. 分担研究報告書. DOCA食塩高血圧におけるLOX-1発現調節. P62-65
- 7) Patrono C, Fitzgerald GA: Isoprostanes: Potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc* 17:2309-15, 1997
- 8) Tarpey MM, White CR, Suarez E, Richardson G, Radi R, Freeman BA. Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue. Lucigenin but not coelenterazine enhances superoxide formation. *Circ Res.* 1999 ;84:1203-11.
- 9) Fujita T, Sato Y: Natriuretic and antihypertensive effects of potassium in DOCA-salt hypertensive rats. *Kidney Int* 24 : 731-739, 1983
- 10) Young DB, McCaa RE, Pan YJ, Guyton AC: The natriuretic and hypotensive effects of potassium. *Circ Res* 38 : 84-89, 1976
- 11) Nagase M, Kaname S, Nagase T, Wang G, Ando K, Sawamura T, Fujita T. Expression of LOX-1, an oxidized low-density lipoprotein receptor, in experimental hypertensive glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 2000 ;11:1826-36.
- 12) McCabe RD, Bakarich MA, Srivastava K, Young DB. Potassium inhibits free radical formation. *Hypertension.* 1994 ;24:77-82.
- 13) Sohn HY, Keller M, Gloe T, Morawietz H, Rueckschloss U, Pohl U. The small G-protein Rac mediates depolarization-induced superoxide formation in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 2000 ;275:18745-50.



14) Somers MJ, Mavromatis K, Galis ZS, Harrison DG. Vascular superoxide production and vasomotor function in hypertension induced by deoxycorticosterone acetate-salt. *Circulation*. 2000 ;101:1722-8.

G. 知的所有権の取得状況：  
特になし

(3) 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase

## ストレプトゾトシン糖尿病における 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase の解析

中川祐一、 中西俊樹、 大関武彦  
浜松医科大学小児科

### 研究要旨

糖尿病において高血圧の合併を認めることはよく知られている現象であるが、その発症機序については必ずしも明らかにされていない。我々はいままでにストレプトゾトシン(STZ)病糖尿病(インスリン欠乏性糖尿病)では腎臓において活性型のグルコルチコイドを不活性型に変換する作用をもつ 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2(11HSD2)が遺伝子発現および酵素活性ともに減少しており、高血圧の発症と極めて関連が深いということを報告してきた(副腎ホルモン産生異常症分科会:名和田班)。今回 STZ 糖尿病ラットの腎臓における 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (11HSD) の代謝調節機序を解明するために糖尿病の重症度と 11HSD の関連そして 11HSD の補酵素の前駆体である nicotinamide およびポリオール代謝における主要酵素であるアルドース還元酵素阻害薬 sorbinil の 11HSD に対する影響を検討した。11HSD2 は糖尿病が重症になるにつれ遺伝子発現および酵素活性は低下傾向を認め、11HSD1 は逆に増加傾向を認めた。nicotinamide および sorbinil は 11HSD1 および 11HSD2 に影響を示さなかった。これらのことより STZ 糖尿病では糖尿病の重症度と 11HSD には強い関連を認めることが明らかにされたが、11HSD の補酵素およびポリオール代謝は 11HSD の代謝調節には影響していないことが示唆された。

### A. 研究目的

11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11HSD2) および type 1(11HSD1)は糖質ステロイド代謝にとって重要な酵素であることはよく知られている。特に 11HSD2 は腎臓・胎盤等の様々な組織に存在しており、糖尿病性高血圧の発症には 11HSD2 の異常が関与していることを我々は報告した(1)。今年度の研究においては糖尿病における 11HSD の代謝調節機序を解明するため糖尿病の重症度と 11HSD の関連および 11HSD の補酵素 NAD, NADP の前駆体である nicotinamide および糖尿病の合併症発症において重要な役目を果たすポリオール代謝の主要酵素であるアルドース還元酵素の阻害薬 sorbinil の 11HSD に対する影響を検討した。

### B. 研究方法

#### (対象)

1) 6 週令の雄 Sprague-Dawley(SD)ラットにストレプトゾトシン(STZ)を 25 mg, 50 mg, 60 mg, 投与す

ることにより軽症から重症の糖尿病を作成した。

2) nicotinamide 500 mg/kg を STZ 投与前に投与した群と STZ 投与 3 日後に投与した群を作成した。

3) sorbinil 8 mg/kg/day を STZ 投与 3 日後より 10 日間投与した群を作成した。

#### (方法)

以上の各群につき血糖および血清インスリンの測定を施行した。また腎臓を摘出し、腎臓における 11HSD1 および 11HSD2 の酵素活性および遺伝子発現を検討した。11HSD1 と 11HSD2 の酵素活性はコルチコステロンからデハイドロコルチコステロンへの転換率により算出し、遺伝子発現はノーザンブロット法施行後デンシトメトリーを用いて解析した。

#### (倫理面への配慮)

動物実験は浜松医科大学の倫理規定に基づき施行した。動物に対しては可能なかぎり麻酔等を用いて苦痛を少なくして実験を進めた。

### C. 研究結果

1) STZ の投与量を増加させることにより血糖の上昇および血清インスリンの低下を認めた。nicotinamide を STZ 投与前に投与した場合には血糖および血清インスリンは正常コントロール群と変化しなかったが STZ 投与 3 日後に投与した場合は糖尿病群と同様な変化を示した。sorbiniol 投与群も糖尿病群と同様な変化を示した (表 1)。

2) 11HSD1 の酵素活性はストレプトゾトシン投与量が増加するほど、すなわち血糖が上昇するほど増加する傾向を認めた (図 1)。遺伝子発現も同様な傾向を示した。一方 11HSD2 はストレプトゾトシン投与量が増加するほど低下傾向を認めた (図 2)。

3) 糖尿病状態で増加していた 11HSD1 の酵素活性は nicotinamide および sorbiniol 投与により低下傾向を認めるものの有意差は認めなかった (図 3)。遺伝子発現も同様な傾向を示した。

4) 糖尿病状態で低下していた 11HSD2 の酵素活性は nicotinamide を STZ 投与前に投与した場合には正常コントロールと同様な変化を示したが、STZ 投与後に投与した場合は糖尿病群と同様な変化を示した (図 4)。また sorbiniol 投与群における 11HSD2 の酵素活性は糖尿病群と同様な変化を示した (図 5)。遺伝子発現も同様であった。

### D. 考察

糖尿病の合併症として高血圧の発症はよく知られている現象であるがその発生機序については必ずしも明らかにされてはいない。これまで我々は糖尿病ラット (インスリン依存性糖尿病) を用いた研究により糖尿病性高血圧の発症には腎臓における 11HSD2 の異常が重要な因子となっている可能性を示唆してきた (1)。今年度の研究により糖尿病の重症度と 11HSD2 の関連、すなわち糖尿病が重症になるほど 11HSD2 は低下していることが明らかにされ糖尿病性高血圧発症における 11HSD2 の関与がよりはっきりされたものと思われる。また今年度の研究により 11HSD1 も糖尿病の重症度と関連して変化する傾向

が示された。11HSD1 は今回 dehydrogenase 作用のみの検討であったが 11HSD2 とは逆の変化を示していることから糖尿病における 11HSD1 の作用についても 11HSD2 の作用を緩衝する方向に作用するのか増強する方向に作用するのか興味深いものと考えられる。

また nicotinamide は STZ 糖尿病において STZ 投与前に投与することにより糖尿病の発症を予防することが知られている (2) が 11HSD2 の変化も血糖およびインスリンの変化と同様で、STZ 投与前に nicotinamide を投与した場合には 11HSD2 の変化は正常コントロールと同様であった。しかし nicotinamide を STZ 投与後に投与した場合には血糖およびインスリンと同様に正常化を認めなかった。このことから 11HSD2 の調節には 11HSD2 の補酵素の供給源としての nicotinamide の作用より血糖またはインスリンが重要な作用を示していることが示唆された。

ポリオール代謝は糖尿病の病態との関連が深いことが神経症や網膜症そして腎症との関係について報告されている (3,4) が今回の研究ではポリオール代謝において重要な酵素であるアルドース還元酵素の阻害薬 sorbiniol は 11HSD1 および 11HSD2 に有意な影響を与えなかった。このことは 11HSD を介する糖尿病性高血圧の発症にはポリオール代謝は関与していないことを示唆しているものと思われる。

### E. 結論

今年度の研究により糖尿病の重症度と 11HSD の関連について明らかにでき、糖尿病性高血圧の発症に 11HSD が関与していることがさらに強く示唆された。しかし 11HSD の調節因子については明らかにできず今後の課題であると思われる。

### 文献

1) Liu YJ, Nakagawa Y, Ohzeki T: Gene expression of 11  $\beta$  -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 in the kidneys of insulin-dependent diabetic rats. Hypertension.

1998; 31:

885-889.

2) Masiello P, Bergamini E: Nicotinamide and streptozotocin diabetes in the rat: factors influencing the effectiveness of the protection. *Experientia* 33:1246-1247, 1977.

3) Simmons DA, Kern EFO, Winegrad AI, et al: Basal phosphatidylinositol turnover controls aortic Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity. *J Clin Invest.* 1986; 77:503-513.

4) Goldfarb S, Ziyadeh FN, Kern EFO, et al: Effects of polyol-pathway inhibition and dietary myo-inositol on glomerular hemodynamic function in experimental diabetes mellitus in rats. *Diabetes.* 1991; 40:465-471.

#### F. 研究発表

##### 1. 学会発表

中川祐一、劉雁軍、三枝弘和、遠矢和彦、中西俊樹、李仁善、大関武彦：ストレプトゾトシン糖尿病における 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase の解析-sorbinil および nicotinamide の影響について—第8回日本ステロイドホルモン学会.平成 12 年 11 月 25 日.大阪

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

表 1: 血中グルコースおよびインスリンに及ぼす streptozotocin、nicotinamide、sorbiniil の影響.

Group	N	Glucose(mol/L)	Insulin(pmol/L)
control	8	7.6±0.31	62.0±9.0
D1	6	13.6±0.42	51.0±5.0
D2	6	28.6±0.80	19.8±2.1
D3	6	36.5±1.70	11.4±1.3
D3+N(A)	6	7.8±0.45	59.5±8.2
D3+N(B)	7	31.5±1.80	13.9±1.5
D3+SB	8	33.0±1.60	2.6±1.1

D1:streptozotocin 25 mg, D2:streptozotocin 50 mg, D3:streptozotocin 60 mg, D3+N(A):streptozotocin 60 mg 投与前に nicotinamide 500 mg/kg 投与, D3+N(B): streptozotocin 60 mg 投与 3 日後に nicotinamide 500 mg/kg 投与, D3+SB: streptozotocin 60 mg 投与 3 日後に sorbinil 8 mg/kg を 10 日間投与.

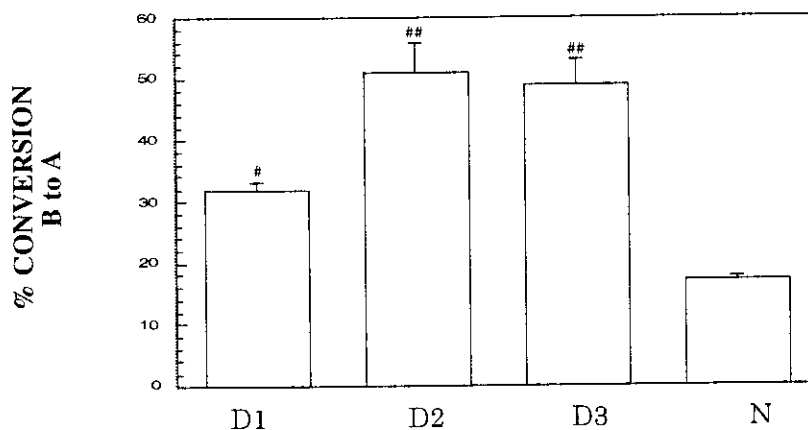


図 1 : ストレプトゾトシン投与量と 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 の関係.

N:正常コントロール, D1: 25 mg, D2: 50 mg, D3:60 mg.

N と D1, D1 と D2 の有意差は P<0.01. D2 と D3 は有意差は認めない.

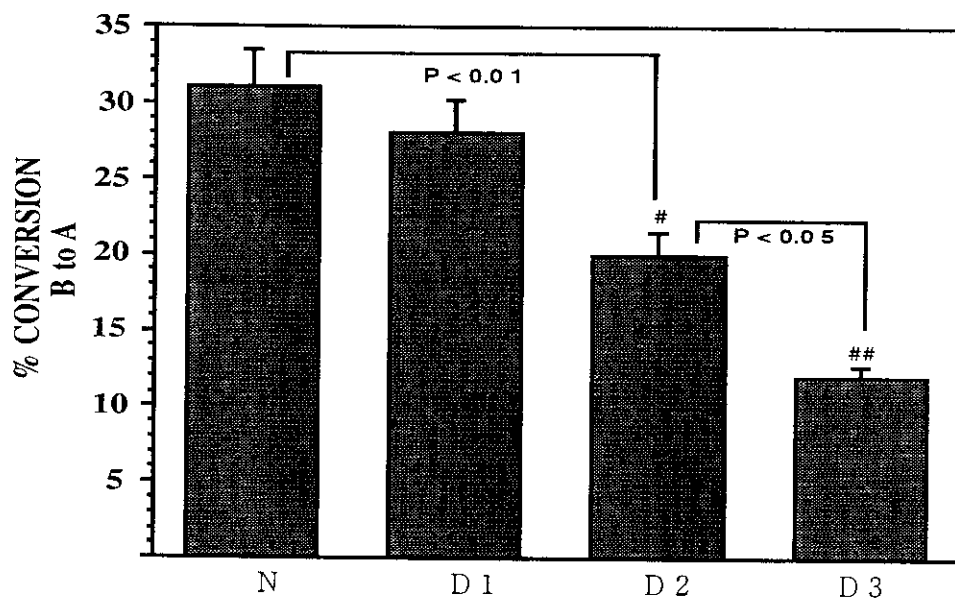


図2：ストレプトゾトシン投与量と  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 との関係。  
 N:正常コントロール, D1: 20 mg, D2: 50 mg, D3: 60 mg.

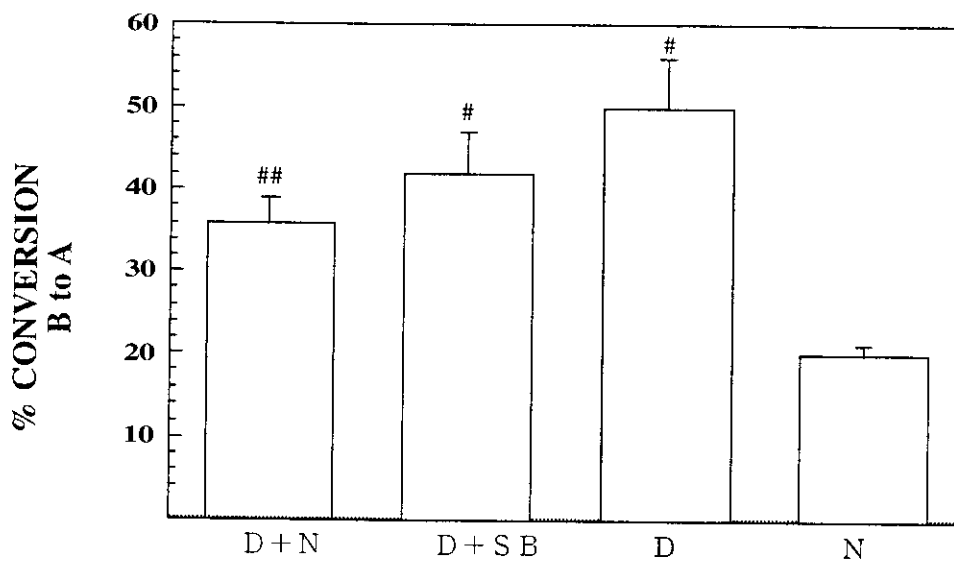


図3： $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 に対する nicotinamide, sorbinil の影響。  
 D+N:ストレプトゾトシン 60 mg 投与 3 日後に nicotinamide 500 mg/kg 投与。  
 D+SB:ストレプトゾトシン 60 mg 投与 3 日後から 10 日間 sorbinil 8mg/kg 投与。  
 D:ストレプトゾトシン 60 mg 投与, N:正常コントロール

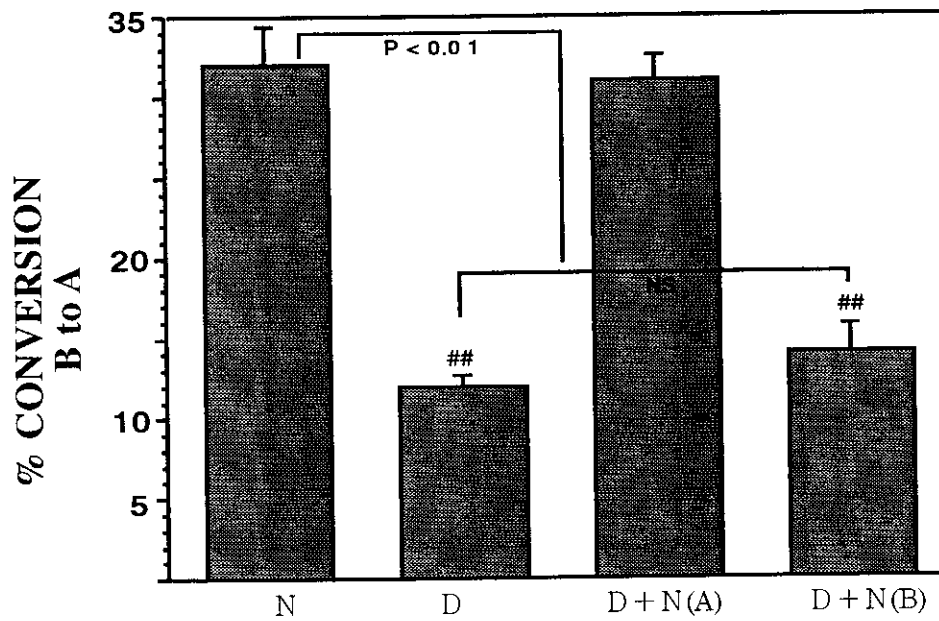


図4 : 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 に対する nicotinamide の影響。  
 N:正常コントロール, D:ストレプトゾトシン 60 mg 投与, D+N(A):ストレプトゾトシン 60 mg 投与前に nicotinamide 500 mg/kg 投与. D+N(B):ストレプトゾトシン 60 mg 投与 3 日後に nicotinamide 500 mg/kg 投与.

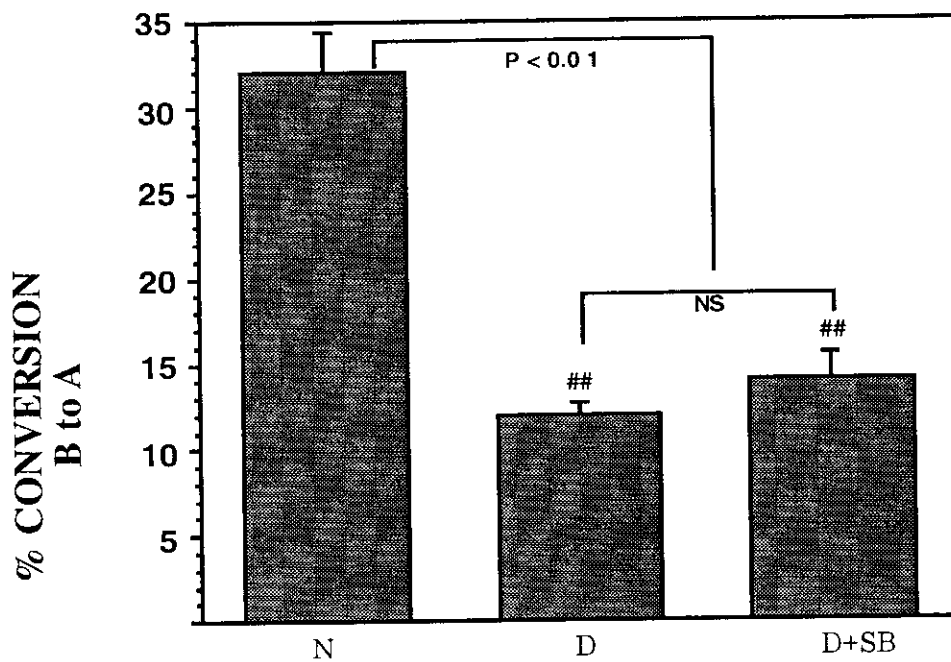


図5 : 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 に対する sorbinil の影響。  
 N:正常コントロール, D:ストレプトゾトシン 60 mg 投与. D+SB:ストレプトゾトシン 60 mg 投与 3 日後より sorbinil 8 mg/kg を 10 日間投与.



## 非機能性・preclinical Cushing症候群副腎腺腫における11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenaseタイプ2の発現増加

安田 圭吾、宗 友厚、棚橋 弘成、磯村 幸範、棚橋 哲也、大洞 尚司、森田 浩之  
岐阜大学第三内科

### 研究要旨

各種副腎皮質腫瘍組織中の11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type1 (HSD1) 及び type 2 (HSD2) mRNA 発現量を competitive-RT PCR 法 (GAPDH 補正) により定量し、血中 cortisone (E) /cortisol (F) 比などの表現型との関連について検討した。正常副腎の HSD1/HSD2 発現量は腎臓の約 15%/5%であった。HSD1 発現量は各腫瘍グループ間で差がなかったが、HSD2 発現量は非機能性 (NF) ・ preclinical Cushing 症候群 (PC) 腺腫で増加していた。さらに NF ・ PC ・ overt Cushing 症候群腺腫の HSD2 発現量は、血中 F と負に相関、血清 K 及び血中 E/F 比と正に相関した。副腎の HSD2 がステロイド合成酵素の一つとして F 分泌を自己制御していること、NF ・ PC では産生場で F が不活化されるため過剰症状が出現しにくくなること、が示唆された。

### A. 研究目的

コーチゾールとコーチゾンとの代謝・転換を担う 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (11 $\beta$ HSD) には、2種類のアイソザイムが確認されている。双方向性酵素とされてきた肝型の 11 $\beta$ HSD タイプ1 (HSD1) も、*in vivo* では reductase 活性がかなり優位となることが種々の組織・細胞で示され、グルココルチコイドの増幅・再活性化機構であることが明らかとなってきた。また逆に、主にミネラルコルチコイド標的臓器に存在する 11 $\beta$ HSD タイプ2 (HSD2) は、特殊な場合を除き dehydrogenase 活性のみを有し、アルドステロンと同等の親和性を持つコーチゾールからミネラルコルチコイドレセプターを防御する機構<sup>1)</sup>と考えられ、その先天的な破綻が Apparent Mineralocorticoid Excess 症候群<sup>2,3)</sup>を来すことも本学会で報告してきた。

広範な組織に発現するとされる HSD1 は、ヒト副腎皮質においても免疫組織学的に網状層>球状層>束状層の順に存在することが報告<sup>4)</sup>された。一方、HSD2 は最初ヒツジ腎からクローニングされた際<sup>5)</sup>に副腎にかなり mRNA が発現していることが判っていたが、その後主に束状層・網状層に存在すること<sup>6)</sup>が示され、ラッ

ト<sup>7,8)</sup>やマウス副腎<sup>9)</sup>でも強く発現していることが報告された。ヒトでは胎児副腎に mRNA 発現<sup>10)</sup>を認めること、免疫組織化学的には胎児層や一部の副腎皮質腺腫・癌に検出<sup>11)</sup>されているが、成人の正常副腎では RT-PCR による検出や酵素活性の存在<sup>12)</sup>が最近報告されたものの、Western blot や免疫組織化学では検出されていない<sup>11)</sup>。ともにその働き・意義に至っては殆ど不明であるが、血中のコーチゾール・コーチゾン濃度の制御に何らかの役割を果たしている可能性、ひいては副腎腫瘍の表現型や腫瘍形成などの病因に関連する可能性も考えられる。

ヒト副腎組織における HSD2 mRNA の発現に関しては H9 年度の本学会で報告<sup>13)</sup>したが、その後症例を重ね、HSD1 についても competitive RT-PCR 法による mRNA 定量を行い、各種臨床データや血中ホルモン、特に血中コーチゾン/コーチゾール比との関連について検討した。

### B. 研究方法

①ヒト副腎組織における HSD2 ・ HSD1 の mRNA 定量

剖検時或いは腎癌手術時に得られた正常副腎組織 (N) 7 例、非機能性副腎腺腫 (NF) 7

例 (うち 4 例で付随副腎; -adj)、Preclinical Cushing 症候群副腎腺腫 (PC) 8 例 (-adj 3 例)、片側副腎腺腫による顕性 Cushing 症候群 (CS) 17 例 (-adj 3 例)、ACTH 非依存性大結節性過形成による Cushing 症候群 (AIMAH) 3 例、PC 合併アルドステロン産生副腎腺腫 (PAPC) 2 例、アルドステロン産生副腎腺腫 (APA) 26 例 (-adj 15 例)、副腎癌 (Ca) 2 例、褐色細胞腫 (Pheo) 2 例、の手術時摘出腫瘍組織、および positive control として腎癌・腎盂腫瘍手術時に得られた腎皮質組織 (Kid) 5 例を対象とした。なお、いずれの患者からも文書で同意を得た。

HSD2・GAPDH mRNA 測定は、以前の本班会議で報告<sup>13)</sup>した通り reverse transcription (RT)~competitive PCR 法により行った。HSD1 に関しても、sense 5'-GAC ATG CTC ATT CTC AA-3', antisense 5'-GCT GTT TCT GTG TCT CTA TGA-3'の gene specific primers を用いて、CLONTECH 社の PCR MIMIC キットに従い competitor を作成、total RNA 0.04  $\mu$ g 相当の RT サンプルを template として、既報<sup>14)</sup>の PCR バッファー (3mM Mg<sup>2+</sup>) と Ex Taq DNA polymerase (TaKaRa) を用い、initial denaturation 96°C 2 分後、96°C 20 秒 - 60.5°C 20 秒 - 72°C 30 秒を 45~50 サイクルにて PCR を行った。2%アガロースゲル泳動~etidum bromide 染色後、Kodak DCI20 digital camera にてコンピューターに取り込み、NIH Image 1.60 (Rasband, W., N.I.H.) と Cricket Graph を用いて内因性シグナルと同等の density を得る competitive template 量を算出し、各 mRNA の発現量とした。また、実際には元の total RNA 量は同じであるにも関わらず、housekeeping gene の一つである GAPDH の発現量にはサンプル間で可成りばらつきが認められたため、GAPDH 発現量に対する比により定量化し、DNase 処理および reverse transcription 時のばらつきを補正した。

②表現型すなわち腫瘍サイズ・生化学検査・ホルモン値などの臨床データとの関連

上記の mRNA 発現量と腫瘍サイズ(腫瘍径より体積を算出)、血圧・BMI 等の身体所見、血

清電解質、血漿 ACTH・コルチゾール濃度 (RIA-F; GammaCoat Cortisol Kit-Baxter により測定)、血漿レニン活性・アルドステロン濃度 (PAC)、24 時間尿中コルチゾール (freeF)・アルドステロン排泄量 (uAld) 等との相関を検討した。

また今回対象とした症例の一部 (NF 6 例、PC 4 例、CS 10 例、APA 15 例) で、血中コルチゾン (E) /コルチゾール (F) 比 (pE/F) を算出した。F と E の測定は、血漿または血清 75~100  $\mu$ l をメチレンクロライドにて抽出、2~10 倍に reconstitute し、H10・11 年度の本班会議で尿中 free F・free E 測定法として報告<sup>15,16)</sup>した ELISA 法に従い測定した。なおメチレンクロライド抽出時の回収率は、F・E ともに 85~90%であった。

データは Mean  $\pm$  SE で表し、発現レベルや pE/F 比などに関する各群間の有意差検定には Mann-Whitney U-test を、腫瘍と付随副腎との有意差検定には Wilcoxon signed rank test を用いた。

### C. 研究結果

①ヒト副腎組織における HSD2 mRNA 発現 (Fig. 1)

HSD2/GAPDH 比は、N 4.2  $\pm$  0.7 ( $\times 10^{-3}$ ) であり positive control である Kid 81.5  $\pm$  7.5 の約 5% 程度の発現量であった。APA では 10.9  $\pm$  2.2、CS では 11.1  $\pm$  2.7、AIMAH では 5.4  $\pm$  3.9 であり、正常副腎と有意差は認めなかった。しかし、NF では 35.0  $\pm$  7.4、PC では 26.1  $\pm$  4.2、といずれも N・APA・CS・AIMAH に比し有意な発現増加を認めた。PAPC では 1.1 & 2.1、Pheo では 5.8 & 9.0、Ca では HSD2 の message は検討感度以下 (nd) であった。また付随副腎に関しては、PC では 3 例とも付随副腎が高値を示したが有意差はなく、APA・CS・NF においても一定の傾向はなかった。

②ヒト副腎組織における HSD1 mRNA 発現

HSD1/GAPDH 比は、N 4.0  $\pm$  1.1 ( $\times 10^{-3}$ ) であり control として用いた Kid 27.2  $\pm$  12.8 の約 15% 程度の発現量であった。APA 3.1  $\pm$  0.9、

CS  $2.9 \pm 0.8$ 、AIMAH  $3.0 \pm 1.0$ 、NF  $2.4 \pm 0.4$ 、PC  $4.6 \pm 2.0$ 、PAPC  $2.0 \pm 0.4$ 、Pheo  $3.1 \pm 0.4$ 、Ca  $8.4 \pm 0.4$ 、といずれも腎臓に比し低値であったが、各副腎腫瘍間に有意な差は見出されなかった。また付随副腎との関連も特に認められなかった。

### ③腫瘍サイズ、血液生化学・血中ホルモン値など臨床データと HSD2・1 発現量との関連

APA の腫瘍サイズは、PAC・uAld と正相関 ( $r=0.52$ ,  $n=25$ ・ $r=0.54$ ,  $n=21$ ,  $P<0.01$ ) したが、HSD2・1 発現量と腫瘍サイズや血清 K など臨床データとの間には有意な相関は見られなかった。CS 群では腫瘍サイズと RIA-F・freeF との間に正相関 ( $r=0.50$ ,  $n=17$ ・ $r=0.54$ ,  $n=17$ ,  $P<0.05$ )、PC 群でも腫瘍サイズと RIA-F との間に正相関 ( $r=0.77$ ,  $n=8$ ,  $P<0.05$ ) が認められたが、NF 群 ( $n=6$ ) では有意な相関はなく (Fig. 2a)、いずれも各群内では腫瘍サイズと HSD2 発現量の間には明らかな相関はなかった。ただ Fig. 2a から明らかなように、腫瘍サイズと RIA-F 間の回帰曲線は、その傾きが異なることが明らかとなった。

また CS・PC・NF 全体で検討すると、RIA-F と血清 K との間に負相関 ( $r=0.60$ ,  $P<0.001$ ; Fig. 2b)、HSD2 発現量と RIA-F の間には負相関 ( $r=0.55$ ,  $P<0.005$ ; Fig. 2c)、HSD2 発現量と血清 K の間に正相関 ( $r=0.53$ ,  $P<0.005$ ; Fig. 2d) が認められた。

### ④血中コルチゾン/コルチゾール比との関係

健常成人男性 (Cont) 52 例の pE/F 値  $0.26 \pm 0.07$  (参考値) に対し、NF  $0.36 \pm 0.05$ 、APA  $0.33 \pm 0.03$ 、PC  $0.29 \pm 0.06$ 、CS  $0.21 \pm 0.02$  であり、NF・CS 群で有意に高値・低値 ( $P<0.05$ ) であった。APA 群では腫瘍内 HSD2 発現量と pE/F の間に有意な相関は検出されなかったが、CS・PC・NF 群では pE/F は腫瘍内 HSD2 発現量に有意に正相関 ( $r=0.71$ ,  $P<0.005$ ; Fig. 3) することが判明した。

## D. 考察

今回、ヒト成人副腎においても腎の 5%程度

の HSD2 mRNA が発現していること、非機能性副腎腺腫と Preclinical Cushing 症候群副腎腺腫では HSD2 mRNA 発現が有意に増加していることが明らかとなった。プレリミナリーな免疫組織化学的検討では、最近の報告<sup>11)</sup>と同じく正常副腎皮質では検出されないが、非機能性副腎腺腫と Preclinical Cushing 症候群副腎腺腫の多くに蛋白発現が検出される (東北大病理、鈴木貴・笹野公伸先生私信)、とのことであり、mRNA 発現と一致する結果である。したがってこれらの腫瘍はコルチゾールのみならずコルチゾンをも産生分泌すると考えられる。実際、今回検討した血中コルチゾン/コルチゾール比は正常者に比べ、非機能性副腎腺腫患者で有意に高く、逆に顕性 Cushing 症候群副腎腺腫患者では有意に低く、Preclinical Cushing 症候群患者ではその中間であった。成人の正常副腎における mRNA 発現量や免疫組織的には検出されないことなどからみて、正常者では恐らく血中レベルに対する影響は少ないものと思われる。しかし非機能性、Preclinical・顕性 Cushing 副腎腺腫全体でみると、腫瘍中発現レベルは血中コルチゾン/コルチゾール比と正相関しており、血中の活性型・非活性型グルココルチコイド濃度に影響しているものと考えられる。すなわち非機能性や Preclinical Cushing 症候群副腎腺腫では、産生場でコルチゾールが不活化される結果、コルチゾール過剰症状が出現しないまま長期間経過することが予想される。腫瘍サイズと血中コルチゾールレベルとの回帰直線の傾きが異なることも、以上の考えを指示するものと考えられる。いずれにせよコルチゾール代謝系としてミネラルコルチコイド標的臓器における防御機構と捉えられてきた HSD2 であるが、今回の結果は、場合によっては HSD2 をステロイド合成酵素の一つと考える必要があることを示唆している。今後、17 $\alpha$ -水酸化酵素などいわゆるステロイド合成酵素との関連など、発現部位・細胞のより詳細な検討、グルココルチコイドレセプターや正常副腎皮質には検出されないといわれるミネラルコルチコイドレセプター

ーとの共存性などについての検討、も必要であろう。

副腎からのコーチゾール分泌が、場合によっては HSD2 により自己制御され、表現型に関与することが示されたわけであるが、生物学的意味合いとして、グルココルチコイドによる副腎自身への toxicity を防御している可能性、なども考えられよう。また HSD2 の発現制御機構に関しては未だ不明な点が多い。今回の副腎腫瘍の検討でも、Preclinical Cushing 症候群副腎腺腫の付随副腎や非機能性副腎腺腫の付随副腎の一部でも HSD2 発現が増加しており、腺腫のみの変化ではないことも判明した。何らかの液性因子が関与している可能性も否定できない。古典的なミネラルコルチコイド標的臓器の HSD2 発現に対して、グルココルチコイドはラットを用いた *in vivo* での検討では腎での活性・蛋白・mRNA 発現を抑制すること (unpublished) が判っている。今回の結果も、見方を変えれば顕性 Cushing 症候群副腎腺腫では高コーチゾール血症により抑制されるが、Preclinical Cushing 症候群副腎腺腫や非機能性副腎腺腫ではそのような影響を受けにくくなるため、とも考えられる。しかし、マウス腎由来培養細胞やヒト癌由来細胞ではグルココルチコイドは逆に HSD2 発現を増加させること (unpublished) も判っており、組織特異的な発現制御機構も含め、今後検討すべき課題は多い。さらに今回対象とした副腎癌 2 例では血中コーチゾン/コーチゾール比は検討していないが、HSD2 mRNA は検討感度以下であった。癌か非機能性かの鑑別に役立つとの考えもあろうが、Coulter らの報告ではむしろ副腎癌で HSD2 が免疫組織学的に検出されており、多数例での検討が必要であろう。

一方 HSD1 mRNA 発現も腎臓の約 15%程度見られることが判った。今後、代表的な HSD1 発現組織である肝臓の発現レベルとの比較も必要であるが、副腎皮質腫瘍疾患群間での差がなく、血中 E/F 比や他の臨床データとの関連も現在の所見出されていないことから、副腎皮質腫瘍での意義はあまりないものと思われる。

## E. 結論

非機能性・Preclinical Cushing 症候群副腎腺腫では副腎 HSD2 発現が増加しており、産生の場でコーチゾールが不活化される結果、その過剰症状が出現しにくくなっていることが示唆された。

## [参考文献]

1. Funder JW, Pearce PT, Smith R, Smith AIX. Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science* 242: 583-585, 1988.
2. Mune T, Rogerson FM, Nikkilä H, Agarwal AK, White PC. Human hypertension caused by mutations in the kidney isozyme of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Nature Genetics* 10: 394-399, 1995.
3. White PC, Mune T, Agarwal AK. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Endocr Rev* 18(1): 135-156, 1997.
4. Ricketts ML, Verhaeg JM, Bujalska I, Howie AJ, Rainey WE, Stewart PM 1998 Immunohistochemical localization of type 1 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1325-1335
5. Agarwal AK, Mune T, Monder C, White PC. NAD<sup>+</sup>-dependent isoform of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: cloning and characterization of cDNA from sheep kidney. *J Biol Chem* 269: 25959-25962, 1994.
6. Yang K, Matthews SG 1995 Cellular localization of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 2 gene expression in the ovine adrenal gland. *Mol Cell Endocrinol* 111: R19-R23
7. Zhou MY, Gomez-Sanchez EP, Cox DL, Cosby D, Gomez-Sanchez C 1995 Cloning,