

600aa)があることが判明した。

HeLa 核抽出液より GST-AF1a に結合する因子をタンパク精製にて取得したところ HAT 活性を有する複合体が認められ、その中に p300/CBP と complex を作るとされている RNA helicase A が認められた。この RHA/CBP complex は ligand として aldosterone selective に MR の target 遺伝子 promoter 上で MR AF1a に recruit され、MR の転写活性を上昇させていることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yanagisawa J., Kitagawa, H., Yanagida, M., Wada, O., Ogawa, S., Nakagomi, M., Oishi, H., Yamamoto, Y., Nagasawa, H., McMahon, S. B., Cole, M. D., Tora, L., Takahashi, N., Kato, S.: Nuclear receptor function requires a TFIIIC-type histone acetyl transferase complex. *Mol. Cell*, 2002 (in press).
2. Matsui, D., Sakari, M., Sato, T., Murayama, A., Takada, I., Kim, M., Takeyama, K., Kato, S.: Transcriptional regulation of the mouse steroid 5 α -reductase type II gene by progesterone in brain. *Nucleic Acids Research*, 2002 (in press).
3. Sawada, N., Sasaki, T., Kitanaka, S., Kato, S., Inouye, K.: Structure-function analysis of CYP27A1. Studies on mutants from patients with vitamin D-dependent rickets type I (VDDR-I) and cerebrotendinous xanthomatosis (CTX). *Eur. J. Biochem.*, 268, 6607-6615, 2001.
4. Mezaki, Y., Yoshida, T., Yanagisawa, J., Kato, S.: N-terminal activation function is dominant in ligand-dependent transactivation of medaka estrogen receptor α in human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 289, 763-768, 2001.
5. Van Cromphaut, S. J., Dewerchin, M., Hoenderop, J. G. J., Stockmans, I., Van Herck, E., Kato, S., Bindels, R. J. M., Collen, D., Carmeliet, P., Bouillon, R., Carmeliet, G.: Doudenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 13324-13329, 2001.
6. Kallay, E., Pietschmann, P., Toyokuni, S., Bajna, E., Hahn, P., Mazzucco, K., Bieglmayer, C., Kato, S., Cross, H. S.: Characterization of a vitamin D receptor knockout mouse as a model of colorectal hyperproliferation and DNA damage. *Carcinogenesis*, 22, 1429-1435, 2001.
7. Yagishita, N., Yoshizawa, T., Yamamoto, Y., Sekine, K., Uematsu, Y., Murayama, H., Nagai, Y., Krezel, W., Chambon, P., Matsumoto, T., Kato, S.: Aberrant growth plate development in VDR/RXR γ double-null mutant mice. *Endocrinology*, 142, 5332-5341, 2001.
8. Yamamoto, Y., Wada, O., Suzawa, M., Yogiashi, Y., Yano, T., Kato, S., Yanagisawa, J.: A tamoxifen responsive estrogen receptor alpha mutant D351Y shows reduced tamoxifen-dependent interaction with corepressor complexes. *J. Biol. Chem.*, 276, 42684-42691, 2001.

9. Yahata, T., Shao, W., Endoh, H., Hur, J., Coser, K. R., Sun, H., Ueda, Y., Kato, S., Isselbacher, K. J., Brown, M., Shioda, T.: Selective coactivation of estrogen-dependent transcription by CITED1 CBP/p300-binding protein. *Genes Dev.*, 15, 2598-2612, 2001.
10. Kitanaka, S., Takeyama, K., Murayama, A., Kato, S.: The molecular basis of vitamin D-dependent rickets type I. *Endocrine J.*, 48, 427-432, 2001.
11. Inui, N., Murayama, A., Sasaki, S., Suda, T., Chida, K., Kato, S., Nakamura, H.: Correlation between 25-hydroxyvitamin D3 1 α -hydroxylase gene expression in alveolar macrophages and the activity of sarcoidosis. *Am. J. Med.*, 110, 687-693, 2001.
12. Watanabe, M., Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Takeyama, K., Arao, Y., Suzawa, M., Kobayashi, Y., Ogawa, S., Yano, T., Yoshikawa, H., Masuhiro, Y., Kato, S.: A subfamily of RNA binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor α coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *EMBO J.*, 20, 1341-1352, 2001.
13. Masuyama, R., Nakaya, Y., Tanaka, S., Tsurukami, H., Nakamura, T., Watanabe, S., Yoshizawa, T., Kato, S., Suzuki, K.: Dietary phosphorus restriction reverses the impaired bone mineralization in vitamin D receptor knockout mice. *Endocrinology*, 142, 494-497, 2001.
14. Sasagawa, S., Kato, S.: A nuclear receptor screening method using a steroid receptor coactivator-1 fragment in a yeast two-hybrid system. *Anal. Biochem.*, 289, 295-297, 2001.
15. Kato, S.: Estrogen receptor-mediated cross-talk with growth factor signaling pathways. *Breast Cancer*, 8, 3-9, 2001.

Fig.1

A RHA/CBP containing HAT complex interacts with MR AF-1a

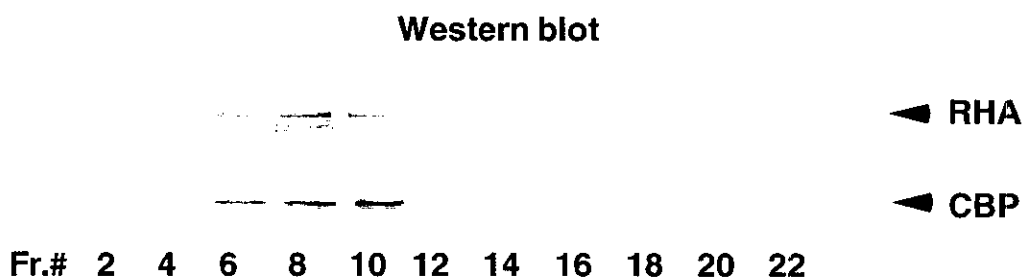
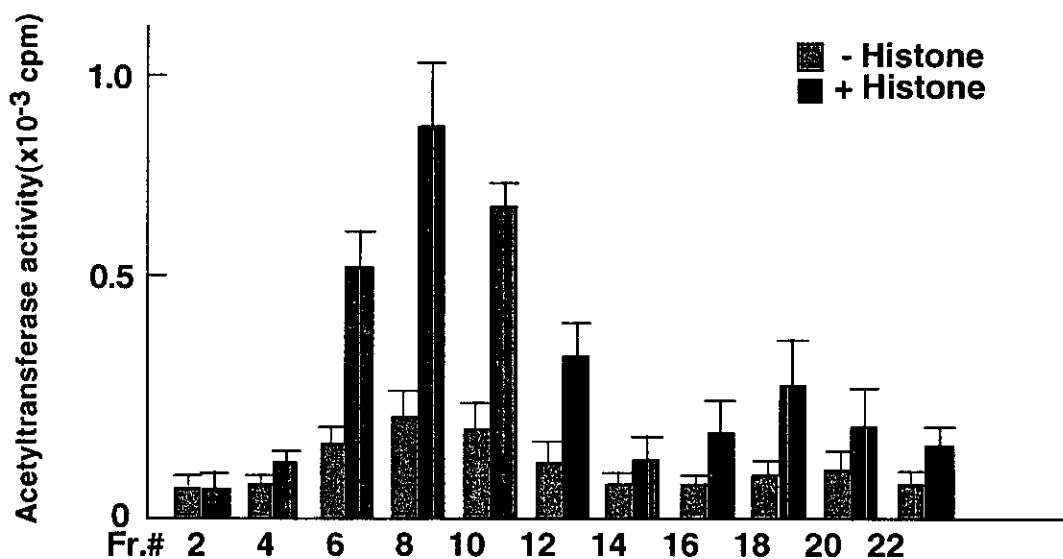
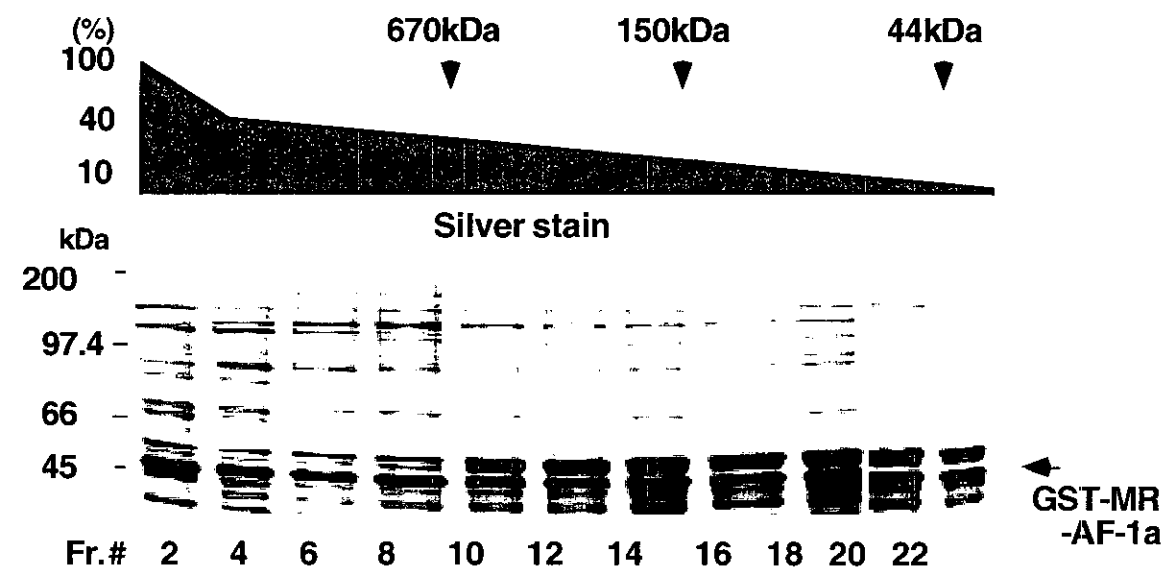


Fig.2

Recruitment of RHA/CBP complex in vivo is ligand(aldosterone) selective

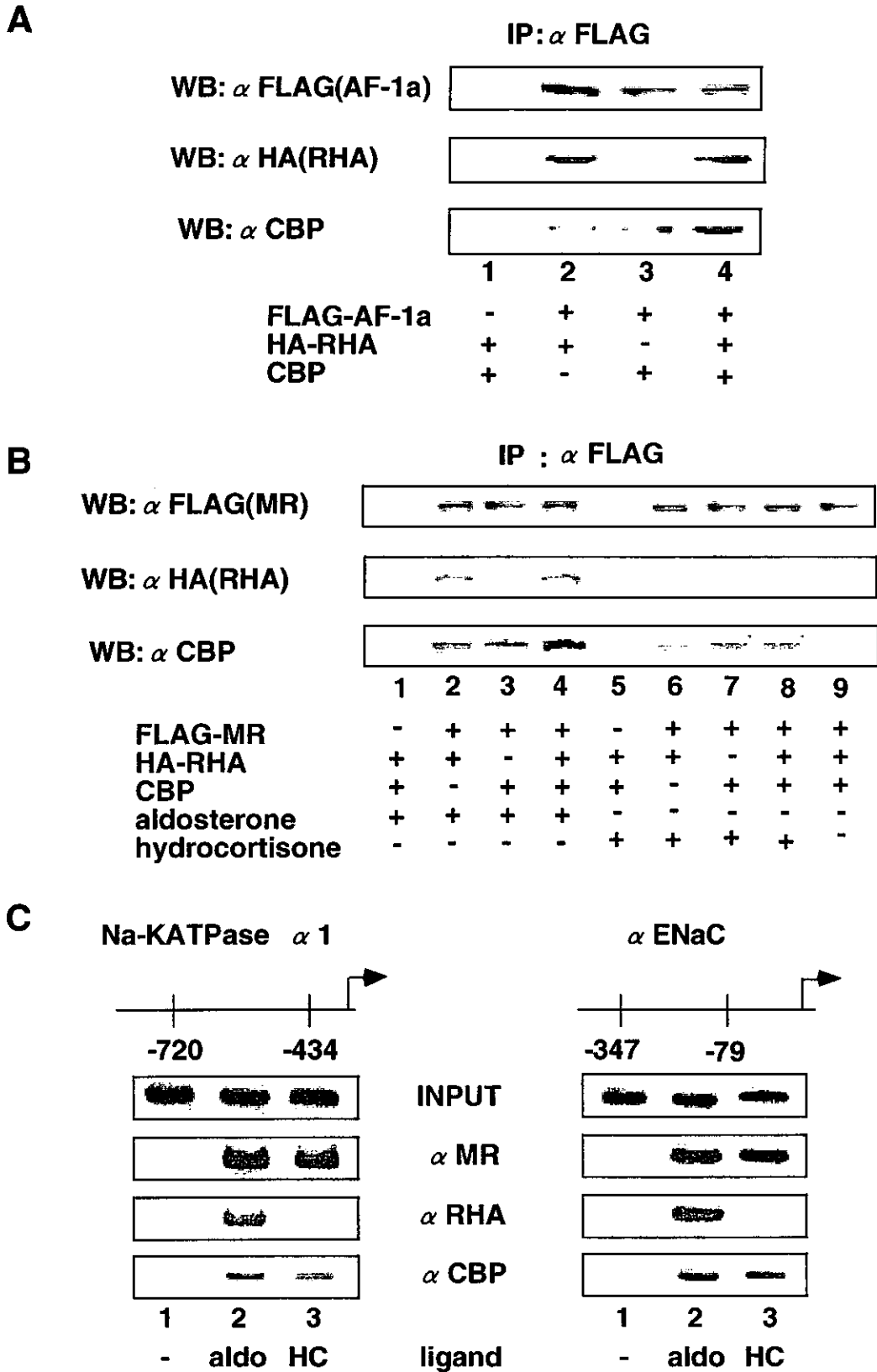


Fig. 3

RHA and CBP can cooperatively enhance AF1a activity

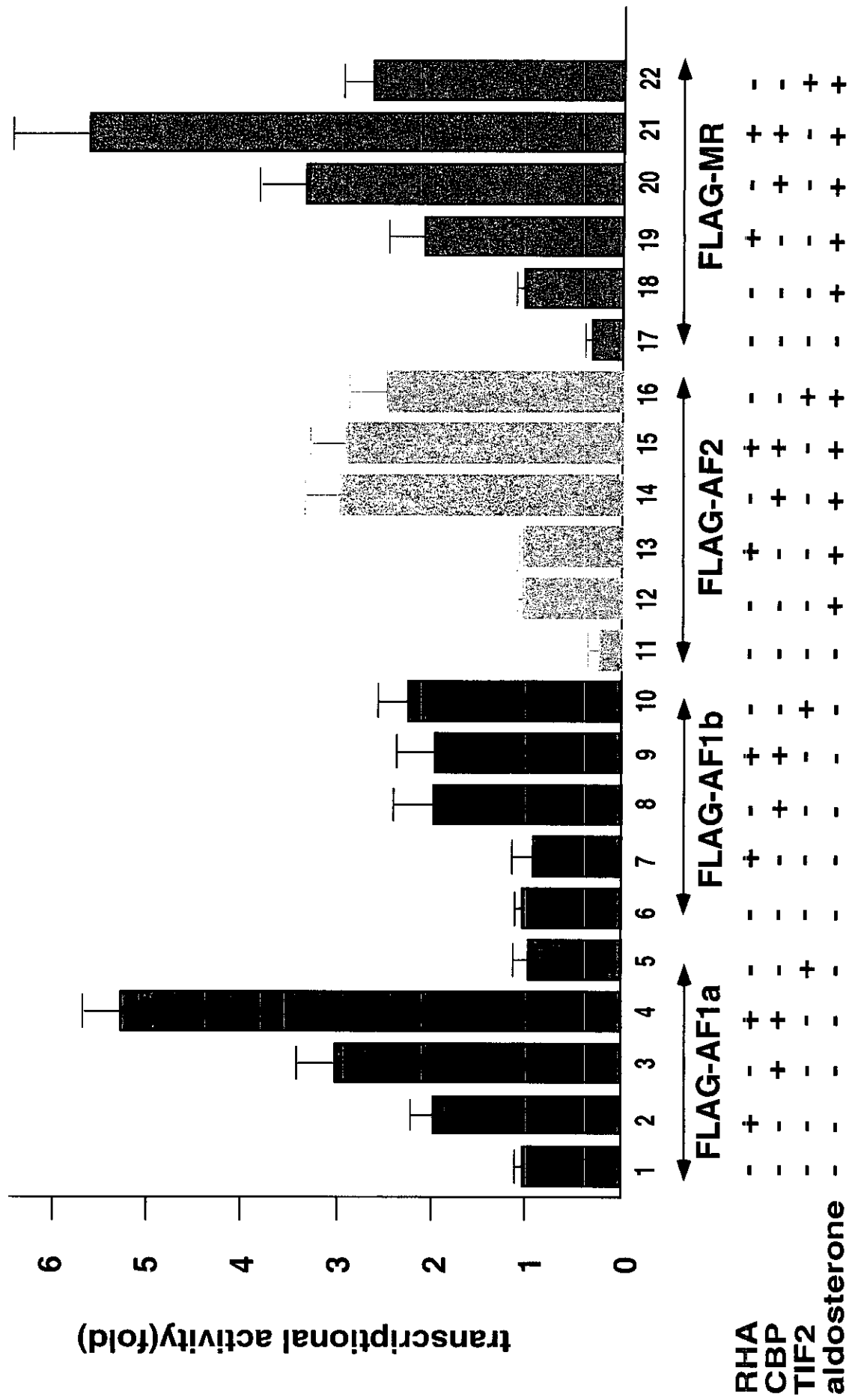
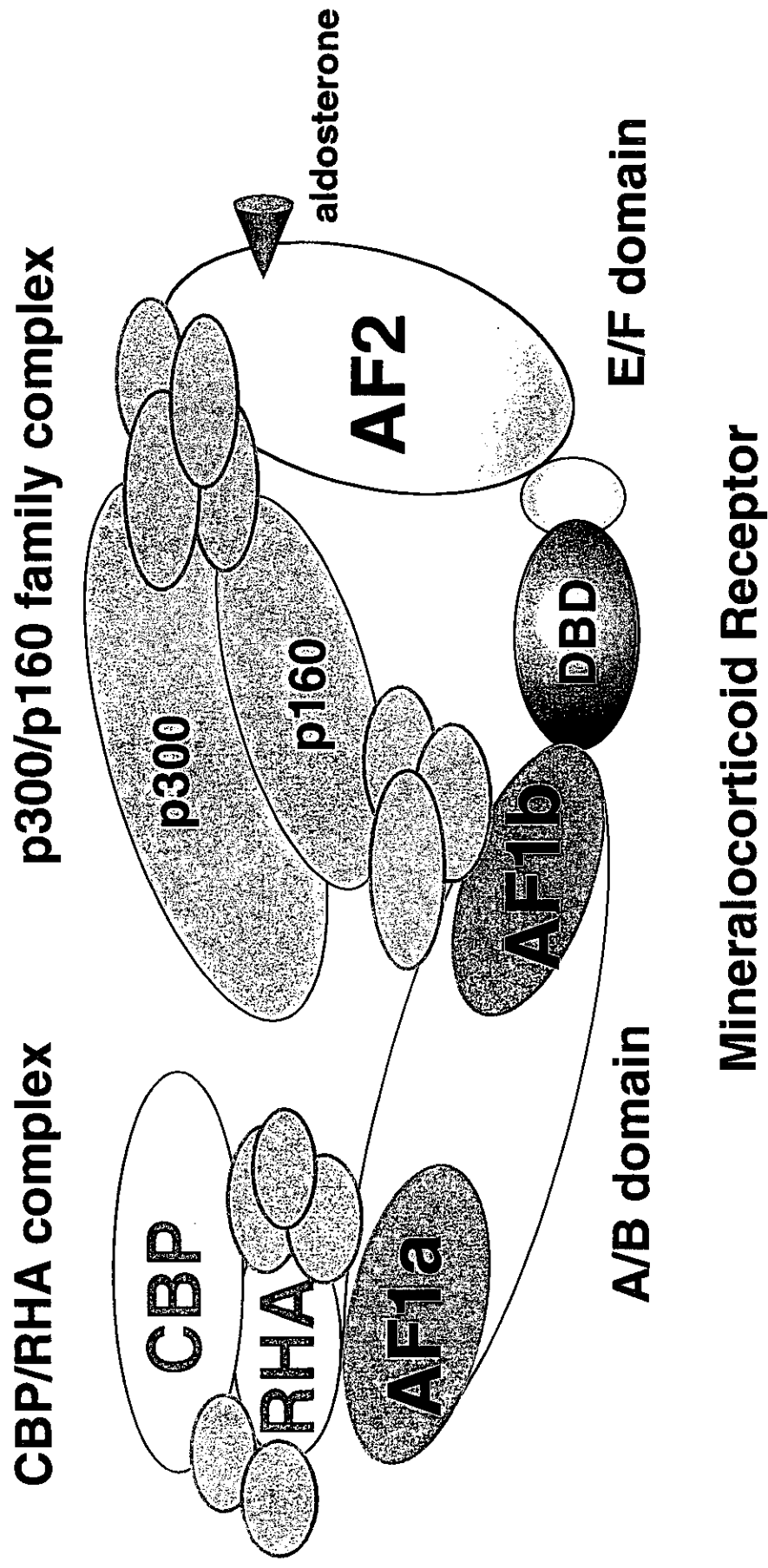


Fig.4

**Activation mechanism of mineralocorticoid receptor
by aldosterone**



ヒト不全心における鉱質コルチコイド受容体の免疫組織学的検討

河合康幸、吉田正博、宮森勇
福井医科大学第三内科

研究要旨

我々はヒト不全心における鉱質コルチコイド受容体 (MR) の発現を剖検左室心筋組織標本を用いて *in situ hybridization* および免疫組織学的に検討した結果、正常心筋に比べ mRNA レベル、蛋白レベルいずれにおいてもより強い染色を認めた。したがって不全心では基礎疾患の如何にかかわらず MR の過剰発現によりアルドステロンの作用が増強される可能性が示唆された。

A. 研究目的

心不全の進展にレニン-アンギオテンシン-アルドステロン系や交感神経系などの神経体液因子が重要な役割を果たしている。近年、その中でもアルドステロンは体液過剰を介して心血管系に負担を来たすのみならず、その直接作用により心肥大や心筋の線維化を促進し、心血管系の独立した危険因子として注目されている。これまで心不全におけるアルドステロンの作用は主として血中濃度によって検討されてきたが、このようなアルドステロンの腎外作用による効果はスピロラク톤により防止、改善されることから MR を介したものであり、アルドステロンの諸臓器への作用、病態形成を解明するためには受容体の動態を含めた解

析が必要である。そこで不全心における MR 発現を正常心と比較する目的でそれぞれのヒト剖検心筋組織標本を用いて *in situ hybridization* および免疫組織染色を行った。

B. 研究方法

対象および患者背景：慢性心不全と診断され心不全で死亡した患者を不全心群 (Failing 群)、心疾患の既往がなく心不全以外の原因で死亡した患者を正常心群 (Nonfailing 群) とした。両群とも 5 例で不全心群は前例男性、死亡時の年齢に有意差はなかった。不全心群の New York Heart Association (NYHA) 心不全重症度分類の平均は 3.2 で、入院時診断は陳旧性心筋梗塞 4 例、拡張型心筋症 1 例であった。心臓超音波検査より算出した左室駆出

率は不全心群で有意に低値であった。また心重量を体表面積で除した心重量係数は不全心群で有意に高値であった (表 1)。不全心群で ANP、血漿レニン活性およびアルドステロンを測定し得た症例はそれらがいずれも高値であった。治療として ACE 阻害剤を投与されていた患者が 1 例、スピロラク톤を投与されていた患者が 2 例であった (表 2)。

方法：心不全患者剖検心の左室非梗塞部心筋をパラフィン包埋し、5 μm の組織標本を作成した。まず MR mRNA に対する RNA プロブを用いて in situ hybridization を行った。次に一次抗体としてモノクローナル抗 MR 抗体 H10E を用い、アビジン-ビオチン複合体免疫ペルオキシダーゼ法により発色基質にジアミノベンジンを用いて免疫染色を行った。核はメチルグリーンで染色した。またアザン-マロリー染色で線維化の程度を検討した。両群の免疫組織標本の染色性を間質を内部コントロールとし、間質と MR の発現が認められる細胞質にそれぞれ関心領域を設け、間質に対する細胞質染色比 (Cytoplasmic interstitial staining ratio: CISR) を NIH イメージソフトで比較検討した。

(倫理面への配慮)
遺族より病理解剖承諾時に剖検組織

から遺伝子解析を含めた研究を行うことに文書にて同意を取得した。

C. 研究結果

アザン-マロリー染色による左室心筋組織標本では正常心群に比べ不全心群で明らかな間質のコラーゲン増加を認めた。in situ hybridization では正常心群に比べ不全心群においてより強いシグナルを認めた (図 2)。免疫組織染色では正常心群および不全心群いずれにおいても MR が検出されたが、その染色性は正常心群に比し不全心群においてより強く認められた (図 1)。半定量的に両群の染色性を比較したところ、正常心群の CISR が 1.25 ± 0.19 、不全心群の CISR が 1.53 ± 0.13 、 $P < 0.05$ と有意に不全心群が高値であった (図 3)。

D. 考察

今回、ヒト不全心における MR の発現を in situ hybridization および免疫組織学的に検討した結果、正常心に比し受容体が左室心筋でより強く染色されており、基礎疾患の如何にかかわらず不全心ではアルドステロンの作用が増強する可能性が示唆された。心不全症例ではレニン-アンジオテンシン系が亢進し、二次性アルドステロン症が存在するにもかかわらず、受容体の down regulation は認められ

ず、むしろ MR の一次的発現亢進が存在する。以上の結果からアルドステロンの心血管組織における病態解明にはアルドステロン合成遺伝子の発現のみならず受容体レベルでの検討が重要であり、抗アルドステロン剤の効果をよりの確に評価しうるものと想定される。

Patient Characteristics 1

表1

	Failing	Nonfailing	P value
Sex, n, M/F	5(5/0)	5(3/2)	
Age, y (mean \pm SD)	74.4 \pm 13.3	70.3 \pm 9.8	0.6
NYHA class	3.2		
Primary diagnosis			
OMI	4	0	
DCM	1	0	
LVEF, % (mean \pm SD)	33.6 \pm 13.8	63.3 \pm 5.5	0.005
HWI, g/cm ²	291.2 \pm 45.2	197.8 \pm 32.9	0.01

Patient Characteristics 2

表2

Case													
No.	Status	Age	Sex	Dx	NYHA	LVEF	HWI	hANP	PRA	ALD	ACEI	diuretics	NTG
1	Failing	55	M	DCM	IV	22	352	485	27.6	88	-	F+S	+
2	Failing	81	M	OMI	III	21	322				+	F	+
3	Failing	67	M	OMI	III	36	254				-		+
4	Failing	81	M	OMI	IV	34	246				-	F+S	+
5	Failing	88	M	OMI	II	55	282	110	5.1	39	-		+
6	NonFailing	66	M	LK		62	165						
7	NonFailing	64	F	COPD		67	223						
8	NonFailing	85	M	COPD		56	229						
9	NonFailing	66	F	LK		68	174						
10	NonFailing	58	M	Trauma									

DCM dilated cardiomyopathy; OMI old myocardial infarction; LK lung cancer; COPD chronic obstructive pulmonary disease; NYHA new york heart association class; LVEF left ventricular ejection fraction (%); HWI heart weight index (g/cm²); hANP human atrial natriuretic polypeptide (pg/ml); PRA plasma renin activity (ng/ml/h); ALD aldosterone (ng/dl); ACEI angiotensin converting enzyme inhibitor; F furosemide; S spironolactone; NTG nitroglycerin

Immunohistochemistry of MR in LV

Case 5
Failing Heart



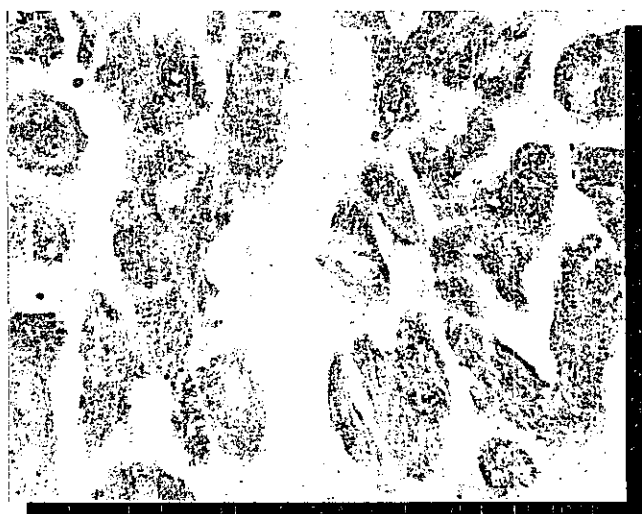
Case 10
NonFailing Heart



図1

In situ hybridization of MR in LV

Case 5
Failing Heart

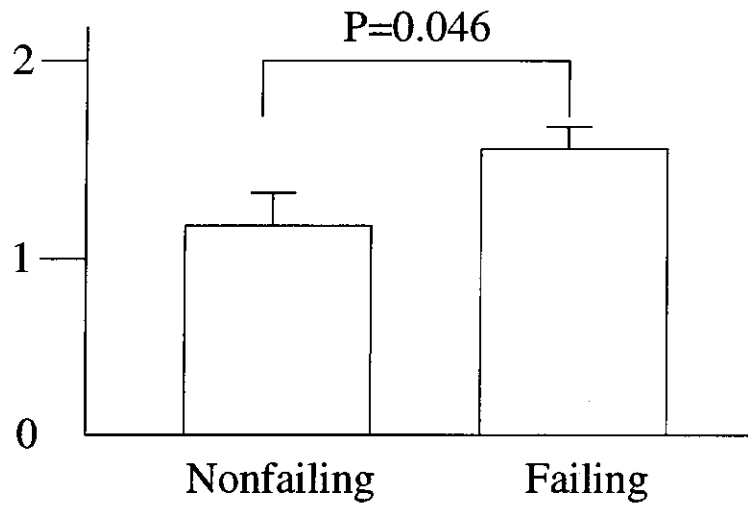


Case 10
NonFailing Heart



図2

Cytoplasmic interstitial staining ratio (CISR)



	Mean CISR	1SD
Nonfailing	1.25	0.19
Failing	1.53	0.13

図3

(2) 副腎腫瘍および副腎性高血圧

副腎皮質腫瘍における核内受容体によるホルモン産生異常機構の検討

柴田洋孝^{1,2}、小林佐紀子²、栗原 勲²、齊藤郁夫¹、猿田享男²
慶應義塾大学保健管理センター¹、慶應義塾大学医学部内科²

研究要旨

我々は、副腎皮質腫瘍におけるホルモン産生異常が、腫瘍部におけるステロイド合成酵素の遺伝子転写レベルにおける発現異常によることを報告した。また、その発現異常において、核内受容体の COUP-TF および DAX-1 が repressor として作用することが重要であることを示した。そこで本年度は、COUP-TF による転写抑制機構に関わる副腎皮質腫瘍に特異的な corepressor をクローニングして、ホルモン産生異常機構を解明することを目的とした。yeast two-hybrid system を用いて、副腎腫瘍 cDNA ライブラリーから COUP-TFI に特異的な蛋白-蛋白相互作用を示す COUP-TFI-interacting protein-1 (CIP-1)のクローニングを行った。CIP-1 は、COUP-TFI, COUP-TFII, SF-1 と特異的な相互作用を示した。また、この相互作用は、*in vitro* glutathione-S-transferase pulldown assay および哺乳類培養細胞においても確認された。さらに、COS-1 細胞において、COUP-TFI による転写抑制を CIP-1 の過剰発現はさらに増強した。CIP-1 は、クッシング症候群副腎腫瘍部において、付随副腎と比べて有意に高発現を認めた。以上の結果から、CIP-1 は副腎腫瘍における COUP-TFI の作用発現に重要な転写共役因子であり、ホルモン産生異常機構に重要な役割をはたしている可能性が示唆された。

A. 研究目的

副腎偶発腫瘍の中で最も多い非機能性副腎皮質腫瘍ではホルモン異常を認めず、その腫瘍部におけるステロイド合成酵素の発現は正常である。一方、機能性副腎腫瘍では、腫瘍部に特異的なステロイド合成酵素の発現異常を認める。これらの結果から、副腎皮質腫瘍におけるホルモン産生異常は、ステロイド合成酵素の発現異常によることが強く示唆された。しかし、現在までに副腎皮質腫瘍において、ステロイド合成酵素の遺伝子異常は見いだされていないことから、その発現異常は遺伝子転写調節異常と考えられる。昨年までの研究により、CYP17 や CYP11B2 遺伝子の転写調節に、核内受容体 COUP-TF が重要な役割をしていることが示唆された。そこで、本年度は副腎腫瘍において COUP-TF 作用発現に重要な転写共役因子をクローニングすることを目的とした。

B. 研究方法

1. Yeast two-hybrid system

MATCHMAKER Two-Hybrid System 3 kit (Clontech)を用いて、COUP-TFI (bait)と蛋白-蛋白相互作用を有する蛋白を、クッシング症候群副腎腫瘍部から作成した cDNA library (prey)からスクリーニングを行った。LacZ, His3, Ade2 の3種類のレポーター遺伝子を用いて、既報の方法にしたがって行う。陽性クローンから酵母 DNA を調製し、library cDNA のみを回収する。再び、酵母細胞に bait と得られた cDNA を形質転換し、蛋白-蛋白相互作用の有無を再度確認する。

2. *in vitro* glutathione-S-transferase (GST) pulldown assay
CIP-1 を、GST-CIP-1 の融合蛋白として大腸菌に産生させ、そのタンパク質を Glutathione Sepharose 4B beads を用いて部分精製する。一方、COUP-TFI 蛋白は、*in vitro* transcription-translation により ³⁵S-methionine 標識して作製する。そして、両者のタンパク質を *in vitro* にて反応させ、Glutathione

Sepharose 4B beads に吸着したタンパク質を SDS-PAGE にて分離して、GST のみと反応させたサンプルと比較する。

3. Co-immunoprecipitation assay

COS-1 細胞に、哺乳類発現ベクターとして pRSV-COUP-TFI および pcDNA3.1/His-CIP-1 を発現させる。その細胞から全細胞抽出物を調製し、まず COUP-TFI 抗体にて COUP-TFI と複合体を形成しているタンパク質を沈降させ、SDS-PAGE 施行後、Nylon membrane に転写し、CIP-1 抗体にて分析し、COUP-TFI と CIP-1 蛋白が、哺乳類細胞内で実際に結合しているか否かを検討する。

4. Transient transfection assay

COS-1 細胞に、各種発現ベクターおよびレポーター遺伝子を transient transfection 法で発現させ、レポーター遺伝子の luciferase を luminometer にて測定し、転写活性を測定する。

5. Western blot

摘出副腎から細胞抽出物を調製し、既報の方法にしたがって、SDS-PAGE の後に Nylon membrane に転写し、CIP-1 抗体を用いて CIP-1 蛋白の発現量を検討する。

C. 研究結果

1. COUP-TFI-interacting protein のスクリーニング

COUP-TFI (amino acid 55-423) を bait に用い、クッシング症候群副腎腫瘍 cDNA library を prey に用いて yeast two-hybrid system により COUP-TFI-interacting protein のスクリーニングを行った。6x10⁶ 個の形質転換クローンをスクリーニングした結果、20 個の陽性クローンを得た。その中の 1 つである CIP-1 は、3 回同一クローンが得られ、1.1 kb cDNA insert を有していた。CIP-

1 と他の核内受容体との相互作用を検討した結果、COUP-TFI, COUP-TFII, SF-1 と有意な相互作用を認めしたが、DAX-1, TRβ とは相互作用を認めなかった (図 1)。

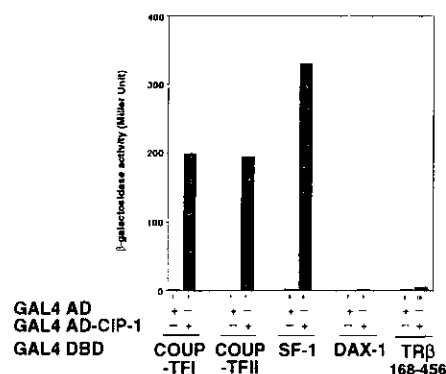


図 1 yeast two-hybrid assay

2. *in vitro* GST-pulldown assay

GST または GST-CIP-1 蛋白と、³⁵S-COUP-TFI 蛋白の相互作用を検討した結果、CIP-1 蛋白と COUP-TFI 蛋白が溶液中で有意な蛋白-蛋白相互作用を有することが示された (図 2)。

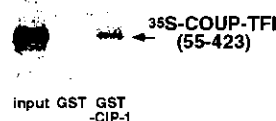


図 2 GST-pulldown assay

3. Co-immunoprecipitation assay

COS-1 細胞に、COUP-TFI および、または CIP-1 の発現ベクターを発現させ、両者の相互作用を Co-immunoprecipitation assay にて検討した結果、COS-1 細胞内においても COUP-TFI と CIP-1 は相互作用を有することが示された。

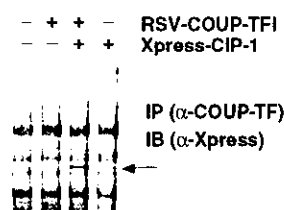


図 3 co-immunoprecipitation assay

4. Transient transfection assay

COS-1 細胞に、Gal4 または Gal4-COUP-TFI を発現させ、CIP-1 の過剰発現による影響を、Gal4-responsive reporter を用いて検討した。その結果、CIP-1 は Gal4 による転写活性に対しては、影響を認めず、Gal4-COUP-TFI による転写抑制を用量依存性に増強した。また、Gal4 結合部位を除いた reporter を用いると、CIP-1 の影響は消失した。したがって、CIP-1 は DNA に結合する COUP-TFI と基本転写因子の間に介在する転写共役因子として機能することが示された (図 4)。

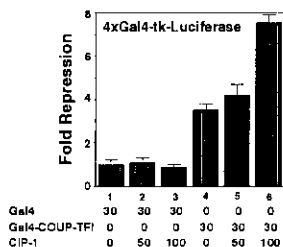


図 4 transient transfection assay

5. Western blot

クッシング症候群患者の摘出副腎を用いて、腫瘍部と付随副腎における CIP-1 の発現を検討したところ、腫瘍部において CIP-1 の有意な高発現を認めた。このことから、CIP-1 はコルチゾール過剰産生または腫瘍化と強い関連があることが示唆された (図 5)。

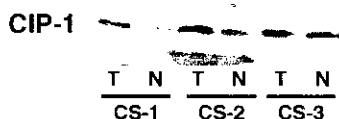


図 5 Western blot

D. 考察

本研究の結果から、CIP-1 は COUP-TFI と特異的な相互作用を示し、COUP-TFI による転写抑制作用

に重要な転写共役因子であることが示された。

COUP-TFI による転写抑制には、転写共役因子の N-CoR, SMRT が重要であることを我々は以前報告している。しかしその後、諸家の報告により COUP-TF と相互作用を示す蛋白として、Alien, CTIP1, CTIP2, FOG-2 などが報告されている。核内受容体 COUP-TFI は、さまざまな組織に発現を認めており、特に我々の検討により、副腎皮質、精巣、卵巣などのステロイド産生組織に比較的高発現を認めることが明らかになった。COUP-TF の作用発現には、各組織において発現しているさまざまな転写共役因子により、組織特異的な作用が規定されている可能性が示唆される。我々は、副腎皮質において COUP-TFI が発現しており、副腎皮質腫瘍においてその発現異常を認めることを見だし、副腎皮質におけるホルモン産生異常に重要な役割をはたしていることが示唆された。そこで、本研究では、副腎皮質腫瘍において COUP-TFI 特異的な転写共役因子をクローニングすることを目的とし、yeast two-hybrid system を用いることにより、副腎皮質腫瘍 cDNA library において COUP-TFI と特異的に蛋白-蛋白相互作用を示すクローンをスクリーニングを行った。

CIP-1 は、酵母、哺乳類細胞および in vitro 溶液中で COUP-TFI と特異的な蛋白-蛋白相互作用を示した。さらに、Gal4 による転写活性には影響を及ぼさずに、Gal4-COUP-TFI による転写抑制を特異的に増強したことから、COUP-TFI の corepressor として機能することが示された。さらに、CIP-1 は Gal4 DNA-binding domain と融合蛋白として発現させると、内因性の転写抑制部位を有していることが示された。これらの結果から、COUP-TFI に比較的特異性の高い corepressor と考えられた。

CIP-1 は従来同定されていた N-CoR, SMRT と比べて異なる特徴があげられる。まず第一に、CIP-1 は COUP-TFI, COUP-TFII, SF-1 と有意な相互作用を示し、一方 DAX-1, TR β とは相互作用を認めない。一方、N-CoR, SMRT は COUP-TFI, COUP-TFII, TR β と有意な相互作用を認めている。すなわち、受容体に対する選択性に相違を認めている。また、機能面について transient transfection assay で検討した結果、N-CoR, SMRT と比べて、COUP-TFI による転写抑制の増強効果は CIP-1 の方が数倍高いことも示された。

興味深いことに、副腎腫瘍における発現を検討した結果、クッシング症候群副腎の腫瘍部で付随正常副腎と比べて明らかに蛋白レベルで高発現を認めた。このことから、CIP-1 は COUP-TFI と協同してクッシング症候群副腎においてホルモン産生異常または副腎腫瘍化の過程に重要な役割をはたしていることが示唆された。

E. 結論

副腎皮質腫瘍において、ホルモン産生異常機構に重要な役割をしている核内受容体 COUP-TFI の作用発現に重要な corepressor 蛋白 CIP-1 を同定した。CIP-1 はクッシング症候群副腎腫瘍部に特異的な高発現を認めており、今後副腎腫瘍における病態生理学的役割の解明が重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

H. Shibata, Y. Ikeda, T. Mukai, K. Morohashi, I. Kurihara, T. Ando, T. Suzuki, S. Kobayashi, M. Murai, I. Saito, T. Saruta. Expression profiles of COUP-TF, DAX-1 and SF-1 in human adrenal gland and adrenocortical tumors: Possible implications in steroidogenesis. *Molecular Genetics and Metabolism* 74: 206-216, 2001.

I. Kurihara, H. Shibata, T. Suzuki, T. Ando, S. Kobayashi, M. Hayashi, I. Saito, T. Saruta. Expression and regulation of

nuclear receptor coactivators in glucocorticoid action. *Molecular and Cellular Endocrinology* (in press), 2002.

T. Araki, M. Hayashi, N. Watanabe, H. Kanuka, J. Yoshino, M. Miura, T. Saruta. Down-regulation of Mcl-1 by inhibition of the PI3-K/Akt pathway is required for cell shrinkage-dependent cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Feb 1;290(4):1275-81.

R. Shimizu-Hirota, H. Sasamura, M. Mifune, H. Nakaya, M. Kuroda, M. Hayashi, T. Saruta. Regulation of vascular proteoglycan synthesis by angiotensin II type 1 and type 2 receptors. *J Am Soc Nephrol.* 2001 Dec;12(12):2609-15.

M. Honda, K. Hayashi, H. Matsuda, E. Kubota, H. Tokuyama, K. Okubo, I. Takamatsu, Y. Ozawa, T. Saruta. Divergent renal vasodilator action of L- and T-type calcium antagonists in vivo. *J Hypertens.* 2001 Nov;19(11):2031-7.

Y. Ozawa, K. Hayashi, T. Nagahama, K. Fujiwara, T. Saruta. Effect of T-type selective calcium antagonist on renal microcirculation: studies in the isolated perfused hydronephrotic kidney. *Hypertension.* 2001 Sep;38(3):343-7.

柴田洋孝, 齊藤郁夫. 副腎皮質機能低下症ホルモンと臨床 49 (特別増刊号): 97-103, 2001.

柴田洋孝, 猿田享男. Cushing 症候群ホルモンと臨床 49 (特別増刊号): 104-108, 2001.

柴田洋孝. DHEA 現在までの研究の経過 高度先進医療 p.145-147, 2001.

栗原 勲, 柴田洋孝, 鈴木利彦, 安藤 孝, 笹野公伸, 藤枝憲二, 林 晃一, 林 松彦, 村井 勝, 齊藤郁夫, 猿田享男. 両側副腎偶発腫瘍で発見された先天性副腎過形成(21-水酸化酵素欠損症)の一例 ホルモンと臨床 (in press), 2001.

柴田洋孝, 猿田享男. 特集 副腎疾患の診断、病態、治療—最近の進歩 特発性アルドステロン症とデキサメサゾン反応性アルドステロン症 内分泌・糖尿病科 12(3): 234-242, 2001.

柴田洋孝, 猿田享男. 原発性アルドステロンとその類似疾患 ホルモンと臨床 49 (6): 11-21, 2001.

柴田洋孝, 本間桂子, 猿田享男. 副腎皮質腫瘍における自律的ホルモン産生能 ホルモンと臨床, 49 (増刊号): 16-22, 2001.

栗原 勲、柴田洋孝、鈴木利彦、安藤 孝、小林佐紀子、林 松彦、齊藤郁夫、猿田享男、グルココルチコイド作用における核内受容体コア
クチベーター SRC-1 の転写調節。
ホルモンと臨床、49 (増刊号) : 48-51, 2001.

柴田洋孝、猿田享男。糖質コルチコイド
Annual Review 内分泌・代謝 2002 中外
医学社、p.239-244, 2001.

柴田洋孝、猿田享男。二次性高血圧
日本臨床 59 (増刊号 8) : 683-692, 2002.

柴田洋孝。内分泌腫瘍における核内受容
体の病態生理学的意義 日本臨床 60 (2):
237-244, 2002.

2. 学会発表

第 98 回日本内科学会講演会 (横浜、2001 年
4 月) 抗アルドステロン薬はコラーゲン代謝
を低下させ心肥大退縮効果を示すーアンジオ
テンシン変換酵素(ACE)阻害薬治療との比較
検討ー 佐藤敦久、柴田洋孝、猿田享男

第 74 回日本内分泌学会学術総会 (横浜、2001
年 6 月) 副腎性プリクリニカル
クッシング症候群における自律性ホルモン産
生能とコルチゾール代謝異常
柴田洋孝、本間桂子、猿田享男

第 74 回日本内分泌学会学術総会 (横浜、2001
年 6 月) cAMP 応答配列を介する
ステロイド合成酵素遺伝子 CYP11B2 および
CYP17 の転写調節ーヒストン脱アセチル酵
素依存性および非依存性コリプレッサーの役
割ー
柴田洋孝、小林佐紀子、栗原 勲、安藤 孝、
鈴木利彦、林 松彦、齊藤郁夫、猿田享男

第 74 回日本内分泌学会学術総会 (横浜、2001
年 6 月) 副腎皮質腫瘍における
核内オーファンレセプター COUP-TF,
DAX-1 およびオーファンレセプター特異的
コリプレッサー CTIPs, Alien の発現
小林佐紀子、柴田洋孝、栗原 勲、安藤 孝、
鈴木利彦、林 松彦、齊藤郁夫、猿田享男

第 74 回日本内分泌学会学術総会 (横浜、2001
年 6 月) 健常成人および副腎
皮質腫瘍患者における 17α -hydroxylase お
よび $17,20$ -lyase 活性の解離の検討
栗原 勲、柴田洋孝、本間桂子、安藤 孝、
小林佐紀子、鈴木利彦、林 松彦、齊藤郁夫、
猿田享男

第 74 回日本内分泌学会学術総会 (横浜、2001
年 6 月) 原発性アルドステロン症
およびクッシング症候群患者における副腎腫
瘍摘出術後の血圧長期予後の比較検討 鈴木
利彦、柴田洋孝、安藤 孝、栗原 勲、小林
佐紀子、林 晃一、林 松彦、
河邊博史、齊藤郁夫、猿田享男

第 74 回日本内分泌学会学術総会 (横浜、2001

年 6 月) 副腎皮質における PPAR γ を介し
たステロイドホルモン合成と細胞増殖の調節
安藤 孝、柴田洋孝、鈴木利彦、栗原 勲、
小林佐紀子、林 晃一、林 松彦、齊藤郁夫、
猿田享男

第 74 回日本内分泌学会学術総会 (横浜、2001
年 6 月) 健常成人における尿中 free
cortisone/free cortisol 比の生理的変動 本
間桂子、竹下栄子、武井 泉、渡辺清明、柴
田洋孝、栗原 勲、佐藤敦久、猿田享男、柴
崎浩美、古田 隆、粕谷泰次

第 24 回日本高血圧学会 (大阪、2001 年 10
月) 高校から大学への血圧変化に及ぼすラ
イフスタイルの影響 河邊博史、齊藤郁夫、
柴田洋孝、広瀬 寛、辻岡三南子、猿田享男

第 9 回日本ステロイドホルモン学会 (東京、
2001 年 11 月) COUP-TFI および
corepressor によるアルドステロン合成酵素
CYP11B2 および 17α -水酸化酵素 CYP17
遺伝子の転写調節 柴田洋孝、小林佐紀子、
栗原 勲、林 松彦、齊藤郁夫、猿田享男

第 9 回日本ステロイドホルモン学会 (東京、
2001 年 11 月) アルドステロンエスケープ
を認めた糖尿病(DM)腎症患者における抗ア
ルドステロン薬投与の臨床的有用性について
佐藤敦久、柴田洋孝、猿田享男

G. 知的所有権の取得状況
特になし。

偶発腫瘍の自律性ステロイド産生の評価ー Dex抑制性と副腎静脈サンプリングとの比較ー ACTH 負荷副腎静脈採血法による副腎疾患鑑別法の検討

西川哲男¹⁾、齋藤 淳¹⁾、大村昌夫²⁾、祖山暁子¹⁾、伊藤浩子¹⁾
横浜労災病院内分泌・代謝内科¹⁾、横浜市立大学第三内科²⁾

研究要旨

偶発腫瘍の自律性ステロイド産生の評価法を検討する目的で、副腎偶発腫瘍 45 例を対象とし、デキサメサゾン(Dex) 1mg 抑制試験にて血中コルチゾール(F)が 5ug/dl 以上をクッシング症候群(CS)、 $5 > F > 2.5$ ug/dl であればプレクリニカルクッシング症候群(PCS)、 $2.5 > F > 1.5$ ug/dl であれば active non-functioning tumor(a-NFT)、 $1.5 > F$ であれば non-functioning tumor(NFT)と 4 群に分類した。その上で、血中・尿中コルチゾール(F)基礎値、CRH test、さらには ACTH 負荷副腎静脈採血法(ACTH-AVS)にて対側副腎機能を検討し、Dex 抑制性と比較し各偶発腫瘍の自律性ステロイド産生能を明らかにした。この結果、

1. ACTH・尿中 17-OHCS・尿中遊離 F の基礎値はデキサメサゾン(Dex) 1mg 抑制後の F と相関を示さなかったが唯一末梢血中の F 基礎値がデキサメサゾン(Dex) 1mg 抑制後の F と有意な相関を示した

2. CRH test による ACTH の反応性は PCS、a-NFT、NFT で差が無く、CS でのみ低下していた。

3. ACTH-AVS での対側副腎の F 産生能は Dex1mg 抑制後の F と逆相関傾向を認め、CS、PCS、a-NFT、NFT の順に対側副腎機能が低下していた。

であることが判明した。

したがって、ACTH 負荷副腎採血法で F 過剰分泌状態か否かを対側副腎機能の低下程度で判定可能であり、偶発腫瘍の自律性ステロイド産生能の評価には Dex1mg 抑制試験は極めて簡便かつ有用であることが判明した。また以上の結果より CS のみならず PCS、a-NFT でも自律性ステロイド産生している可能性があり手術適応の判定の基準になる分類法と考えられた。

A. 研究目的

副腎偶発腫瘍の発見率が高まる中その処置に関する基準は未だ明確にされてない。直径が 5cm 以上であれば悪性疾患を考慮する必要があると大方の意見で一致してる。しかし、コルチゾールの過剰分泌の有無によって手術適応を決める必要性もある。そこで、今回 45 例の副腎偶発腫瘍を対象とし、デキサメサゾン(Dex) 1mg 抑制試験での F 値抑制性で、クッシング症候群(CS)、プレクリニカルクッシング症候群(PCS)、active non-functioning tumor(a-NFT)、

non-functioning tumor(NFT)と 4 群に分類した。その上で、血中・尿中コルチゾール(F)基礎値、CRH test、さらには ACTH 負荷副腎静脈採血法(ACTH-AVS)にて対側副腎機能を検討し、Dex 抑制性と比較し各偶発腫瘍の自律性ステロイド産生能を明らかにしたので報告する。すなわち、偶発腫瘍の自律性ステロイド産生の評価法を明確に検討する目的で本研究を行った。

B. 研究方法

副腎偶発腫瘍 45 例を対象とし、デキサ

メサゾン(Dex) 1mg 抑制試験にて血中 F が 5ug/dl 以上を CS、 $5 > F > 2.5$ ug/dl であれば PCS、 $2.5 > F > 1.5$ ug/dl であれば a-NFT、 $1.5 > F$ であれば NFT と 4 群に分類した。またこれらの症例にて ACTH、血中・尿中 F の各基礎値、CRH test、及び既報の方法で ACTH 負荷副腎静脈採血法(ACTH-AVS)にて腫瘍側・対側副腎機能を検討した。

C. 研究結果

1. デキサメサゾン(Dex) 1mg 抑制後の F 値と各ホルモン基礎値との相関：ACTH・尿中 17-OHCS・尿中遊離 F の基礎値はデキサメサゾン(Dex) 1mg 抑制後の F と相関を示さなかった。一方、血中の F 基礎値がデキサメサゾン(Dex) 1mg 抑制後の F と有意な正の相関を示した。

2. CRH test による ACTH の反応性：PCS、a-NFT、NFT で差が無くほぼ健常者に類似した増加反応を認めた。しかし、CS では ACTH の増加反応は見られなかった。

3. ACTH-AVS での対側副腎の F 産生能の検討：ACTH 負荷後対側副腎静脈中 F 値と Dex1mg 抑制後の F と負の相関傾向を認め、また ACTH 負荷後対側副腎静脈中 F 値/腫瘍静脈 F 値の比と Dex1mg 抑制後の F と負の相関傾向を認めた。CS、PCS、a-NFT、NFT の 4 群で対側副腎機能を検討したところ (図 1) NFT でも Dex 抑制性で更に a-NFT、NFT の 2 群に分類可能であった。

D. 考案

以上の検討からは、デキサメサゾン(Dex) 1mg 抑制後の F と ACTH・尿中 17-OHCS・尿中遊離 F の基礎値は相関を示さなかったが血中 F 基礎値がデキサメサゾン(Dex) 1mg 抑制後の F と有意な相関を示した事より副腎偶発腫瘍のコルチゾール産生能は午前中に採血した際の F 値がその自律性を表現してると考えられた。すなわち、血中 F 基礎値を測定するのみでも CS、

PCS、a-NFT、NFT の鑑別がある程度可能と思われる。さらに、尿中遊離 F 値が CS の確定診断に最も有用とされてるが血中 F 基礎値でも充分診断指標となると考えられた。

CRH test による ACTH の反応性で下垂体へのネガティブフィードバック状態を類推できるとされてる。今回の我々の検討では PCS、a-NFT、NFT で差が無く ACTH の増加反応性は、正常であった。すなわち、デキサメサゾン(Dex) 1mg 抑制後の F 値からは健常者に比較してこれら PCS、a-NFT、NFT ではある程度の過剰 F 産生が認められるにも関わらず CRH test による ACTH の反応性低下は著明でなかった事から偶発腫瘍の自律性ステロイド産生の評価に CRH test は必ずしも鋭敏な負荷試験でないと思われた。一方、CS の確定診断には CRH test による ACTH の反応性が有意に低下していたので極めて診断に有効な負荷試験と考えられた。

次にデキサメサゾン(Dex) 1mg 抑制試験にて、副腎偶発腫瘍のコルチゾール産生能を検討した結果、CS、PCS、a-NFT、NFT と 4 群に分類し種々の検討を行った。同時にこれら 4 群で ACTH-AVS での対側副腎の F 産生能の比較検討を行った。その結果、ACTH 負荷後対側副腎静脈血中 F 値と Dex1mg 抑制後の F と負の相関傾向を認め、また ACTH 負荷後対側副腎静脈中 F 値/腫瘍静脈 F 値の比と Dex1mg 抑制後の F と負の相関傾向を認めた。すなわち、Dex1mg 抑制性が強い程対側副腎機能が正常に近づくものと考えられる。CS、PCS、a-NFT、NFT の 4 群で対側副腎機能を検討したところ、その順に対側副腎機能が低下していた。すなわち NFT でも Dex 抑制性で更に a-NFT、NFT の 2 群に分類可能であり、プレクリニカルクッシング症候群の前駆状態の NFT も存在する可能性が示唆された。以上の検討より、ACTH 負荷副腎採血法で F 過剰分泌状態か否かを対側副