

表1 症例

年齢	診断	腹部CT	PRA ng/ml/h	PAC pg/ml	尿中アルドステロン μg/day
H.H. ♂ 58	APA	右副腎腫瘍(径9×6mm)	0.1>	182	9.6~10.9
K.K. ♀ 68	APA	右副腎腫瘍(径5mm)	0.2	184	6.0~8.0
T.F. ♂ 60	APA	右副腎腫瘍(径15mm)	0.3	334	10.6~11.9
K.Y. ♀ 58	APA	右副腎腫瘍(径10mm)	0.1>	220	5.3~8.2
T.H. ♂ 65	IHA	左副腎腫瘍(径2cm弱)の疑い	0.48	236	8.6~14.1
Y.H. ♂ 60	IHA	異常認めず	0.23	125	7.2~8.5
Y.K. ♀ 51	本態性高血圧症、 腎血管筋脂肪腫	左腎上極に径5cmの腫瘍	0.1>	84	3.1~7.8
S.M. ♂ 72	Cushing症候群	左副腎腫瘍(径2cm弱)	外来時 0.1> 入院時 0.54	77 68	5.8~6.9
T.H. ♀ 64	本態性高血圧症、 低K血症	施行せず	外来時 0.7 入院時 1.9	155 60	5.9~6.7

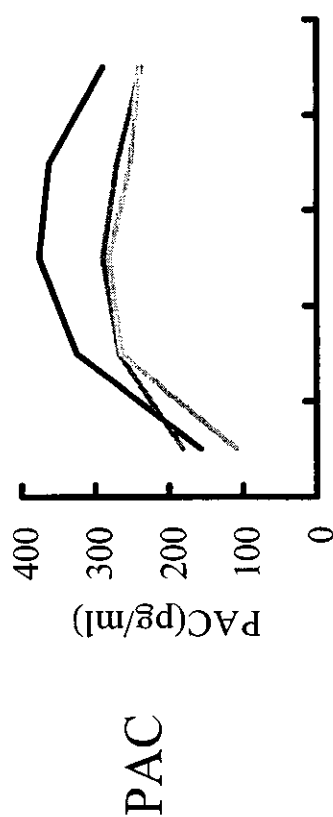
図1 ACTH連続負荷・アンジオテンシン受容体拮抗薬(ARB)投与下 副腎静脈サンプリング

1. 検査当日午前6時にアンジオテンシン受容体拮抗薬(ARB)
(Candesartan 12mg)を内服する。
2. 午前9時より通常のサンプリングを施行。右副腎静脈のサンプリングを最後に行い、カテーテルを右副腎静脈に軽くwedgeさせた状態とする。
3. 合成ACTH(Cortrosyn) 0.25mg(25IU)をbolusで静注。
4. 引き続き、合成ACTH(Cortrosyn) 0.25mgを生理食塩水100mlで溶解し、100ml/h (=0.25mg/h)で持続点滴する。
5. 合成ACTH(Cortrosyn) 持続静注開始15分後より2回目のサンプリングを右副腎静脈より施行する。

図2 APA症例におけるACTH負荷試験

ACTH bolus 投与

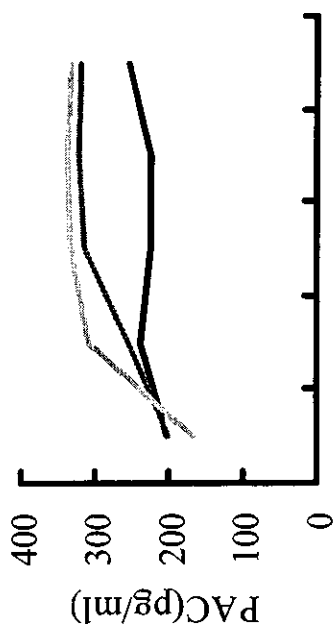
Cortrosyn 0.25mg iv



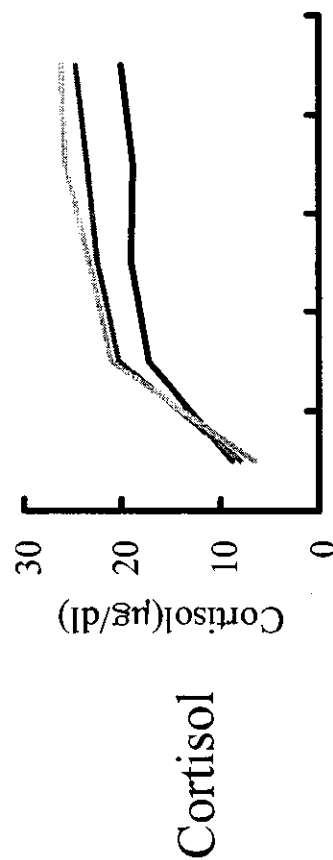
Time(min)

ACTH 連続投与

Cortrosyn 0.25mg iv + 0.25mg/hr div



Time(min)



Time(min)

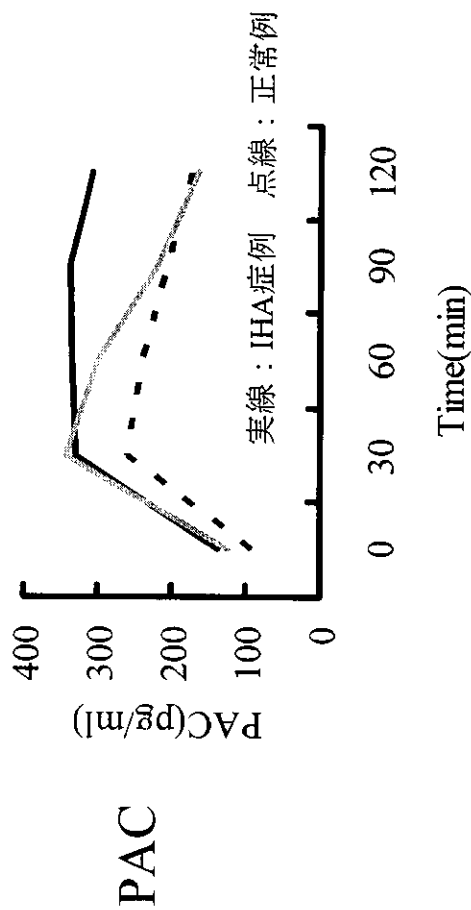


Time(min)

図3 IHA症例・正常例におけるACTH負荷試験

ACTH bolus 投与

Cortrosyn 0.25mg iv



ACTH 連続投与

Cortrosyn 0.25mg iv + 0.25mg/hr div

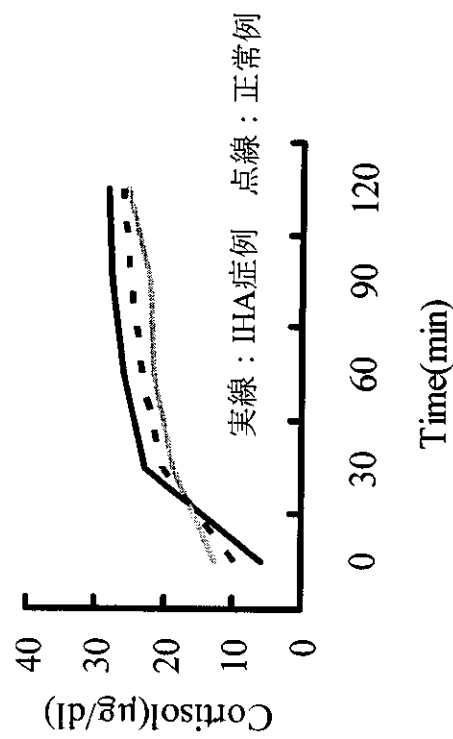
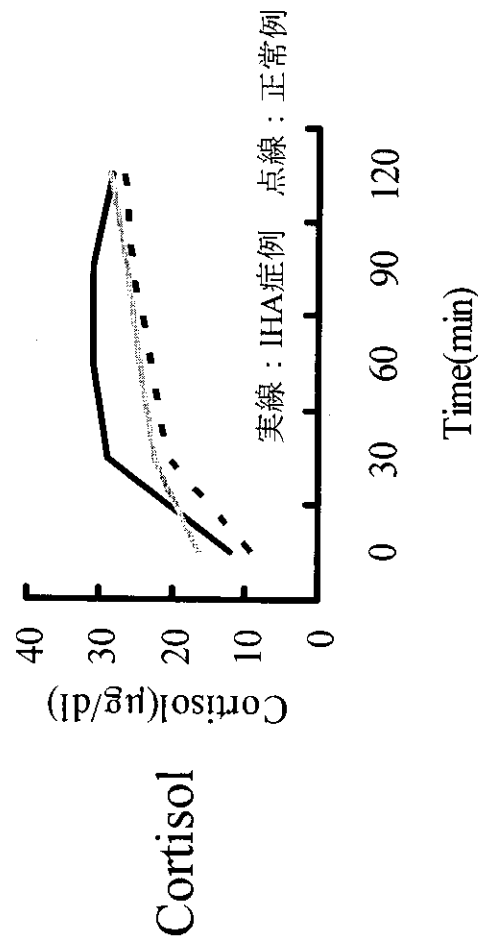
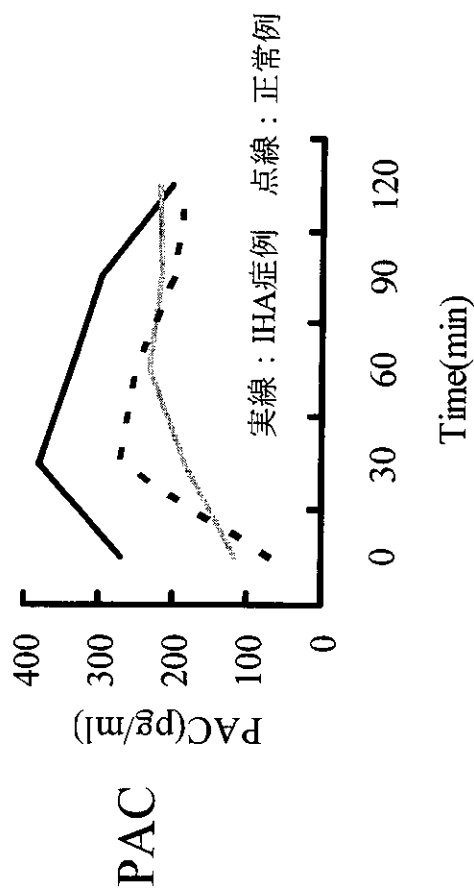
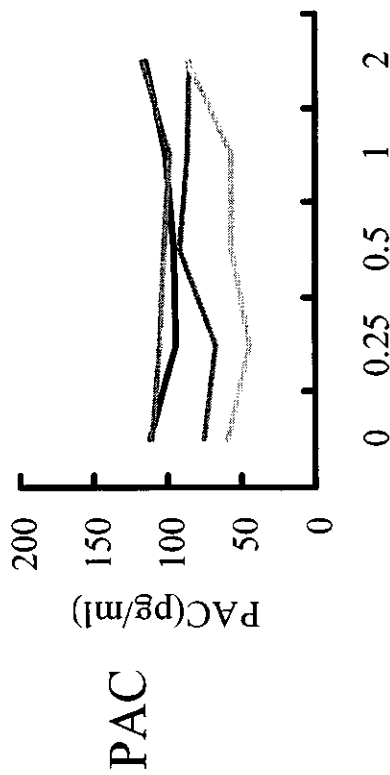


図4 APA症例におけるAII負荷試験 (Dexamethasone1mg前投与下)

AII 負荷

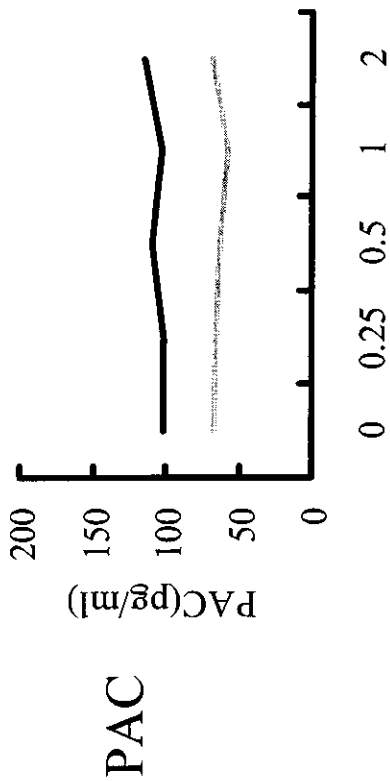
AII 0~2ng/kg/min div



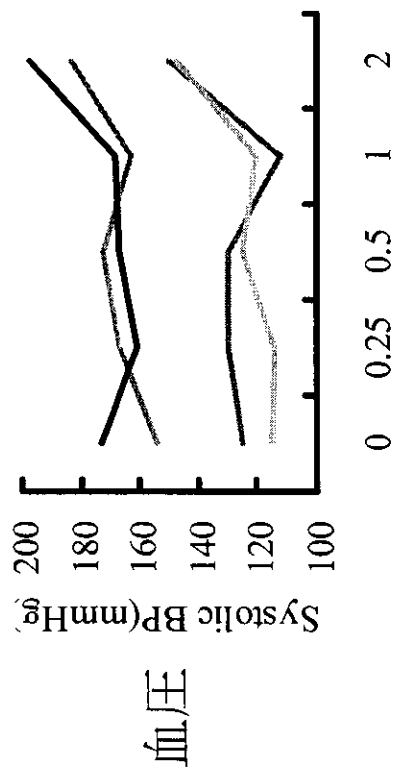
AII(ng/kg/min)

ARB前投与下AII 負荷

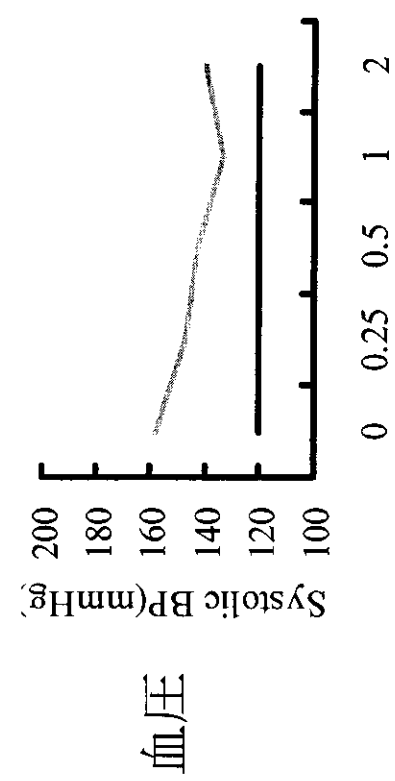
Candesartan 12mg + AII 0~2ng/kg/min div



AII(ng/kg/min)



AII(ng/kg/min)

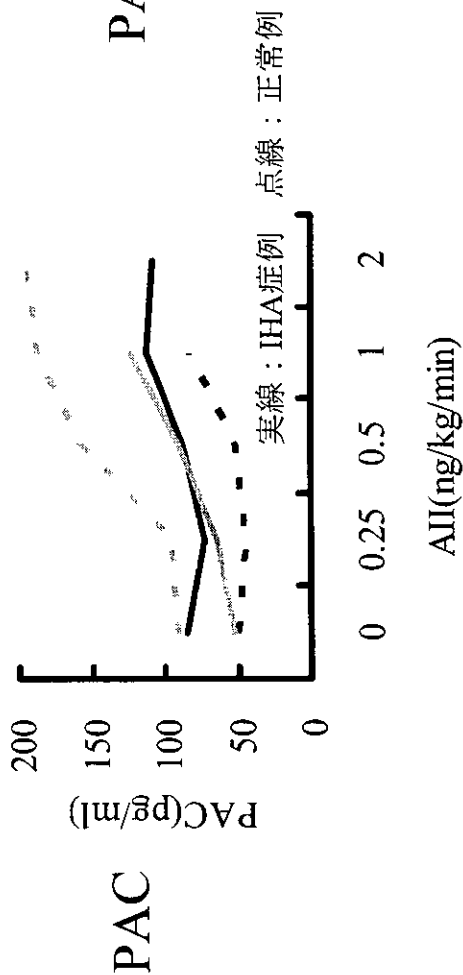


AII(ng/kg/min)

図5 IHA症例・正常例におけるAII負荷試験 (Dexamethasone1mg前投与下)

AII 負荷

AII 0~2ng/kg/min div



ARB前投与下AII 負荷

Candesartan 12mg + AII 0~2ng/kg/min div

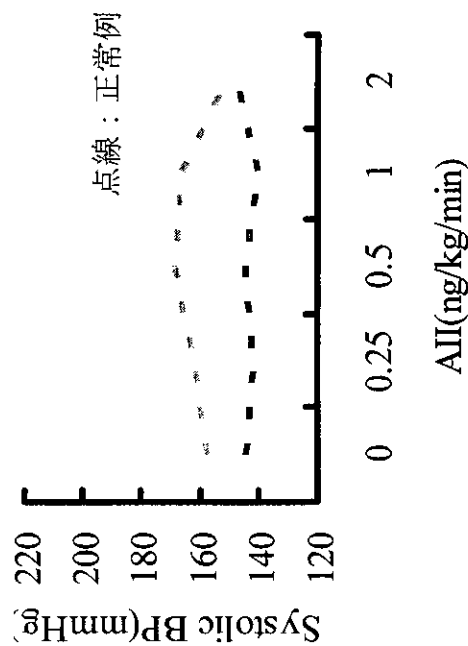
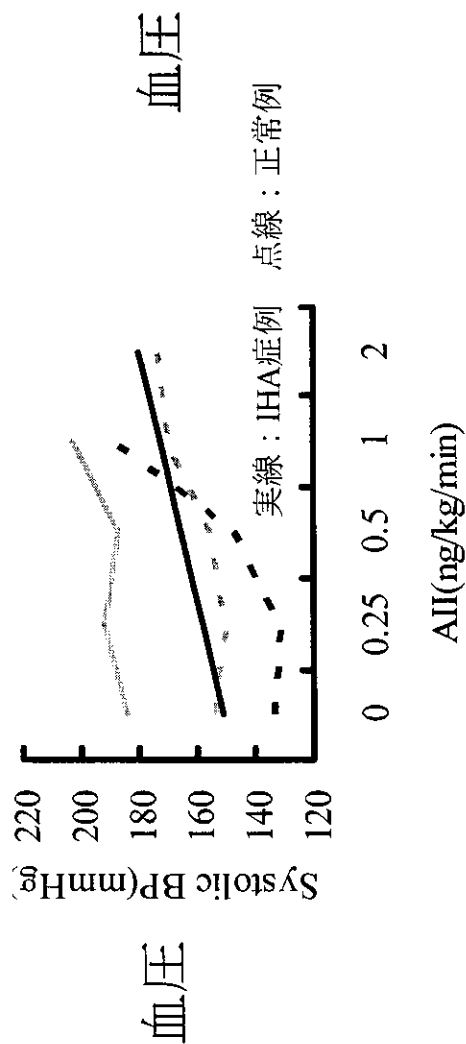
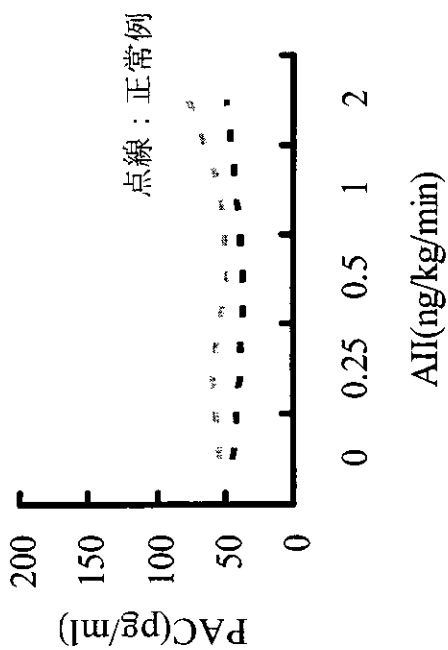
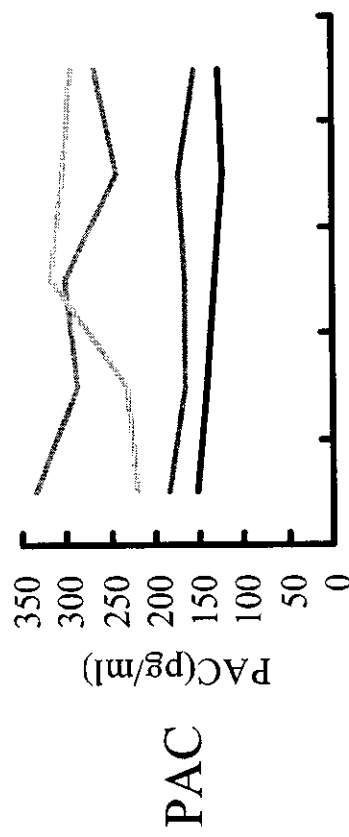


図6 カプトプリル負荷試験

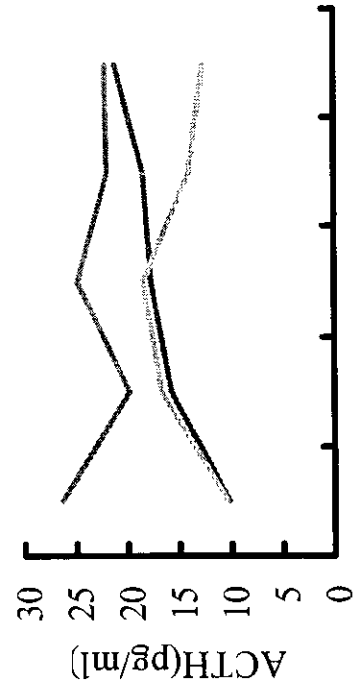
APA症例



PAC

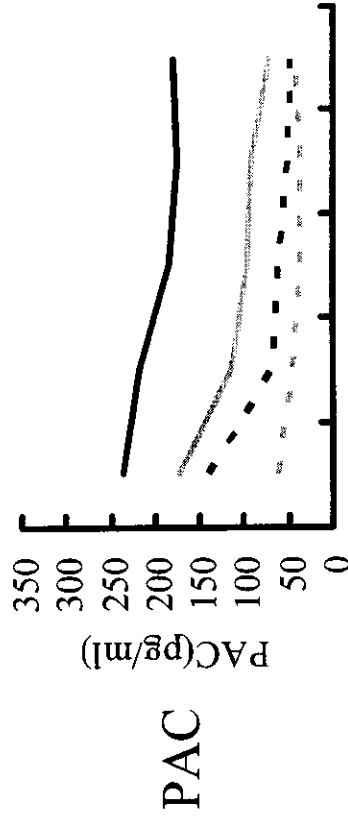
Time(min)

ACTH



Time(min)

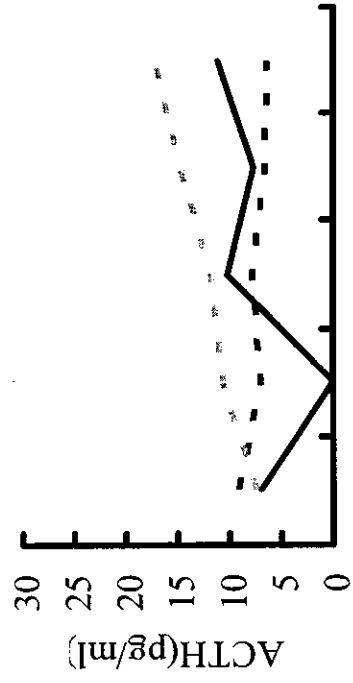
IHA症例・正常例



PAC

Time(min)

ACTH



Time(min)

鉍質コルチコイドの非古典的標的組織における Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase の発現調節

東京大学大学院医学研究科内科
高橋克敏、安東克之、藤田敏郎

研究要旨

鉍質コルチコイドの非古典的標的組織における Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase(SGK)の発現調節について検討した。ラット大動脈平滑筋細胞及び糸球体内皮細胞において、SGKはAldosterone(ALDO)及びcortisolにより特異的に発現誘導された。近年、ALDOによりnon-genomic作用として様々な細胞内情報伝達分子の動員が報告されているが、今回の実験系ではmitogen-activated protein kinase経路の関与は示唆されず、ALDOによるSGK発現は、HSP90依存性の古典的鉍質コルチコイド受容体経路を介することが示唆された。

A. 研究目的

代表的な鉍質コルチコイド作用である腎Na再吸収には、腎皮質集合管における上皮型Naチャンネル(ENaC)の発現並びに活性制御が関与する。従来よりENaC量が増加するよりも早期に鉍質コルチコイドによりNa再吸収が生じることが知られていたが1)、近年、鉍質コルチコイドにより誘導されたSerum and Glucocorticoid-regulated Kinase(SGK)によるENaC制御がその分子基盤となる可能性が示唆されている2)3)4)。SGKは1993年にクローニングされた血清や糖質コルチコイドにより誘導されるセリン・スレオニンリン酸化酵素で5)、血管機能制御に重要な役割を担うAkt/PKBの触媒部位とは約45-55%の同一性を有し、基質特異性にも類似点が存在し、過剰発現によってAkt/PKB機能を一部相補しうることも示されている6)。このAkt/PKBは血管の新生、アポトーシス抑制、NO産生など血管機能に深く関与することが示唆されていることから7)8)、近年注目される鉍質コルチコイド高血圧による心臓血管系合併症の病態の理解という観点からも、心臓血管系等の鉍質コルチコイドの非古典的標的組織におけるSGKの調節機構とその機能については興味を持たれる。そこで、鉍質コルチコイドの非古典的標的組織におけるSGKの発現調節について検討した。

B. 研究方法

(1) 鉍質コルチコイドの非古典的標的組織におけるSGK発現:

鉍質コルチコイドの非古典的標的組織由来細胞としては、8週齢雄性Sprague Dawleyラット胸部大動脈よりexplant法で採取した平滑筋細胞(VSMC)、ラット糸球体内皮細胞(GEN)9)、ラット肝上皮細胞(ARLJ301-3TR1。理研細胞バンク)を準備し主に前二者について検討した。これらの細胞におけるSGK発現はノザン解析とウエスタン解析で検討した。ノザン解析用probeは、同ラット腎よりAGPC法で抽出したtotal RNA100ngを鋳型としたRT-PCR法でrat SGK1 cDNA断片を増幅後、pCR2.1ベクターにクローニングし、EcoR1切断断片をラベルして用いた。ウエスタン解析用抗SGK1抗体は、Upstate Biotechnology社より購入した。発現刺激としては、Aldosterone(ALDO)、cortisol、DHEA等について検討した。

(2) 鉍質コルチコイドの非古典的標的組織におけるSGK発現調節機構:

ALDOによるSGK発現誘導の機序に関して、1) mitogen-activated protein (MAP) kinase経路の関与について、ERKはMEK1阻害薬PD98059 (30 μ M, 30min) 前処置により、p38MAPKはSB203580 (20 μ M, 30min) 前処置により、さらに、2)古典的鉍質コルチコイド受容体(MR)経路の関与は、MR拮抗薬spironolactone(SPI:ALDOの10倍濃度, 1h)とHSP90結合阻害薬Geldanamycin(GA: 5 μ

g/ml, 30min, Calbiochem)10)11)の前処置によって薬理的に検討した。また、HSP70の関与についても HSP70 阻害薬 15-deoxyspergualin (DSG: 20 µg/ml, 1h, 日本化薬)12)の前処置によって検討した。

(3) 鉱質コルチコイドの非古典的標的組織 (血管平滑筋細胞)における鉱質コルチコイドの MAP kinase 活性制御:

VSMC の MAP kinase 経路への ALDO の影響に関しては、ALDO(10^{-9} ~ 10^{-6} M)単独および Angiotensin II (All: 10^{-11} ~ 10^{-7} M)との共刺激後 1, 5, 15 分の各時点における ERK, JNK, p38MAPK 活性を、刺激後の細胞より調整した抽出液をウエスタン解析し、各々に対する特異的抗リン酸化酵素抗体(Cell Signaling 社)を用いて検討した。

(倫理面への配慮) 実験における動物屠殺は麻酔下で苦痛を最小限に行った。

C. 研究結果:

(1) 鉱質コルチコイドの非古典的標的組織における SGK 発現:

今回検討した三種類の細胞のいずれにおいても、約 2.4 kb の SGK 遺伝子発現が認められ、発現量は GEN, ARLJ301-3TR1, VSMC の順に多かった。刺激後4時間の時点では(図 1A)、VSMC において対照に比べて 10%血清により約 3 倍、 10^{-7} M ALDO により約 2.5 倍に、各々発現が増加した。一方、cortisolも VSMC および GEN において SGK 発現を誘導したが、DHEA はこれらの細胞では 10^{-6} M の濃度でも SGK 遺伝子発現を誘導しなかった。従って、鉱質コルチコイドの非古典的標的組織由来細胞において、SGK は副腎皮質ステロイドの中でも特異的に ALDO と cortisol により誘導されることが明らかになった。また、ウエスタン解析からは、VSMC では ALDO(10^{-6} M)刺激後 1 時間以内に約 50kDa の SGK 発現が確認された(図 1B)。

(2) 鉱質コルチコイドの非古典的標的組織における SGK 発現調節機構:

MAP kinase 経路を阻害する PD98059 及び SB203580 前処理は、ALDO による SGK 遺伝子発現を抑制しなかったが、MR 経路を遮断す

る SP ないし GA 前処理は、ALDO による SGK 遺伝子発現を、VSMC、GEN の両細胞において抑制した(図 2)。一方、DSG 前処置はこれを抑制しなかった。従って、非古典的標的組織における ALDO による SGK 発現は、古典的 MR 経路を介するものであることが示唆された。

(3) 鉱質コルチコイドの非古典的標的組織 (VSMC)における ALDO による MAP kinase 活性制御:

VSMC において All は 10^{-11} M より濃度依存性に、ERK, JNK, p38MAPK を活性化したが、ALDO の共刺激はこれに影響を及ぼさず、また ALDO 単独刺激もこれらを活性化することはなかった。

D. 考察:

今回の我々の検討により、鉱質コルチコイドの非古典的標的組織由来細胞においても、ALDO は特異的に古典的 MR を介して SGK 発現を誘導しうることが明らかになった。DHEA が SGK 発現を誘導しなかったことは我々の実験系における ALDO 作用の特異性を示すものである。これらの結果は、VSMC, GEN 等の鉱質コルチコイドの非古典的標的組織由来細胞にも、HSP90 依存性に機能しうる MR が存在することを示唆するもので、これまでに報告されたウサギ大動脈の MR に関する免疫組織学的検討やリガンド結合実験と合致するものである 13)。

ALDO の細胞内情報伝達については、古典的な MR を介する経路に加えて、近年、non-genomic 経路の存在や様々な情報伝達分子の動員が報告されている。今回我々が用いたラット VSMC では ALDO 刺激時に IP3 産生や細胞内 Ca 上昇が報告されており 14)、細胞内 Ca 上昇は MAP kinase 活性化に繋がる可能性がある。一方、SGK の発現調節に預かる細胞内情報伝達分子に関して、ステロイドホルモン受容体以外にも、繊維芽細胞(NIH3T3)では増殖因子刺激時には ERK MAP kinase15)が、乳腺上皮細胞(NmuMg)では浸透圧(0.3M ソルビトール)刺激時に p38 MAP kinase16)が各々示唆されている。そこで、我々は、VSMC における ALDO による SGK

発現に MAP kinase (ERK 及び P38MAPK)が関与するか否か、また ALDO が MAP kinase 制御に預かりうるかという点を検討したが、これらは否定的であった。

ALDO により誘導された SGK の心血管系における役割は現時点では全く明らかでない。SGK の磷酸化酵素としての基質特異性に関する報告によると SGK と Akt/PKB には重なりがあるため 17)、Akt/PKB の構成的活性化型変異体の過剰発現実験で得られた生物現象は、本来は SGK の担う機能である可能性が考えられる。従って、心血管系において Akt が担うと考えられている多面的機能についても、(ALDO 等により誘導された)SGK の関与がないかという観点での検討があらためて必要となる可能性が考えられる。

E. 結論:

鉍質コルチコイドの非古典的標的組織における SGK の発現調節について検討した。ラット大動脈平滑筋細胞及び糸球体内皮細胞において、SGK は ALDO 及び cortisol により特異的に発現誘導された。ALDO による SGK 発現誘導は、HSP90 依存性の古典的鉍質コルチコイド受容体経路を介することが明らかになった。

F. 参考文献:

- 1) Verrey F. Early aldosterone action: toward filling the gap between transcription and transport. *Am J Physiol* 1999;277(3 Pt 2):F319-27
- 2) Chen SY, Bhargava A, Mastroberardino L, Meijer OC, Wang J, Buse P, Firestone GL, Verrey F, Pearce D. Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein SGK. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 ;96:2514-9.
- 3) Naray-Fejes-Toth A, Canessa C, Cleaveland ES, Aldrich G, Fejes-Toth G. Sgk is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial Na⁺ channels. *J Biol Chem*. 1999 ;274:16973-8.
- 4) Alvarez de la Rosa D, Zhang P, Naray-Fejes-Toth A, Fejes-Toth G, Canessa CM. The serum and glucocorticoid kinase SGK increases the abundance of epithelial sodium channels in the plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*. 1999 ;274:37834-9.
- 5) Webster MK, Goya L, Ge Y, Maiyar AC, Firestone GL. Characterization of SGK, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Mol Cell Biol*. 1993;13:2031-40.
- 6) Brunet A, Park J, Tran H, Hu LS, Hemmings BA, Greenberg ME. Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FOXO3a. *Mol Cell Biol*. 2001;21:952-65.
- 7) Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med*. 2000;6:1004-10.
- 8) Luo Z, Fujio Y, Kureishi Y, Rudic RD, Daumerie G, Fulton D, Sessa WC, Walsh K. Acute modulation of endothelial Akt/PKB activity alters nitric oxide-dependent vasomotor activity in vivo. *J Clin Invest*. 2000 ;106:493-9.
- 9) Adler S, Eng B. Integrin receptors and function on cultured glomerular endothelial cells. *Kidney Int*. 1993;44:278-84.
- 10) Bamberger CM, Wald M, Bamberger AM, Schulte HM. Inhibition of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor function by the heat shock protein 90-binding agent geldanamycin. *Mol Cell Endocrinol*. 1997 Aug 8;131(2):233-40.
- 11) Segnitz B, Gehring U. The function of steroid hormone receptors is inhibited by the hsp90-specific compound geldanamycin. *J Biol Chem*. 1997 Jul 25;272(30):18694-701.
- 12) Nadler SG, Tepper MA, Schacter B, Mazzucco CE. Interaction of the immunosuppressant deoxyspergualin with a member of the Hsp70 family of heat shock proteins. *Science*. 1992;258:484-6.
- 13) Lombes M, Oblin ME, Gasc JM, Baulieu EE, Farman N, Bonvalet JP. Immunohistochemical and biochemical

evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. *Circ Res.* 1992 ; 71: 503-10.

14) Wehling M, Neylon CB, Fullerton M, Bobik A, Funder JW. Nongenomic effects of aldosterone on intracellular Ca²⁺ in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1995;76: 973-9.

15) Mizuno H, Nishida E. The ERK MAP kinase pathway mediates induction of SGK (serum- and glucocorticoid-inducible kinase) by growth factors. *Genes Cells.* 2001; 6:261-8.

16) Bell LM, Leong ML, Kim B, Wang E, Park J, Hemmings BA, Firestone GL. Hyperosmotic stress stimulates promoter activity and regulates cellular utilization of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase (Sgk) by a p38

MAPK-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2000;275:25262-72.

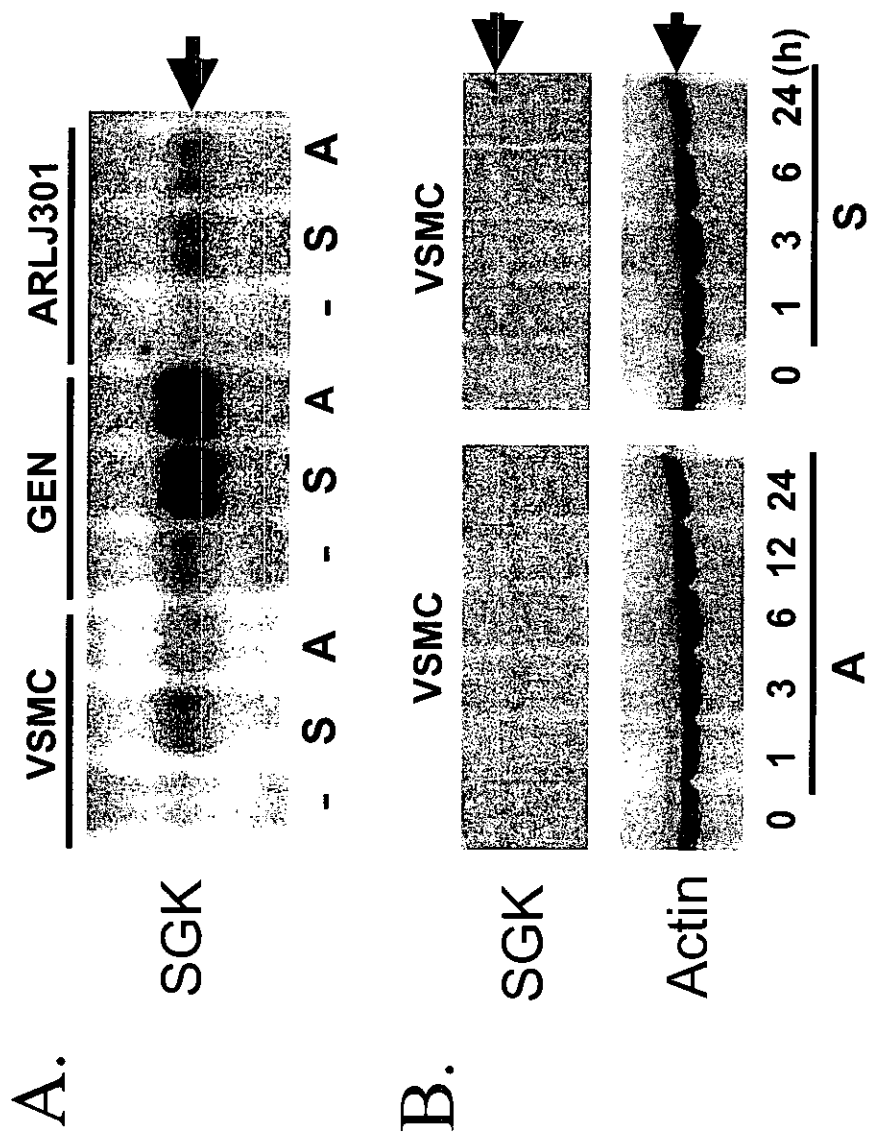
17) Kobayashi T, Cohen P Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositide 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochem J.* 1999;339 (Pt 2):319-28.

G. 知的所有権の取得状況:
特になし

H. 謝辞:

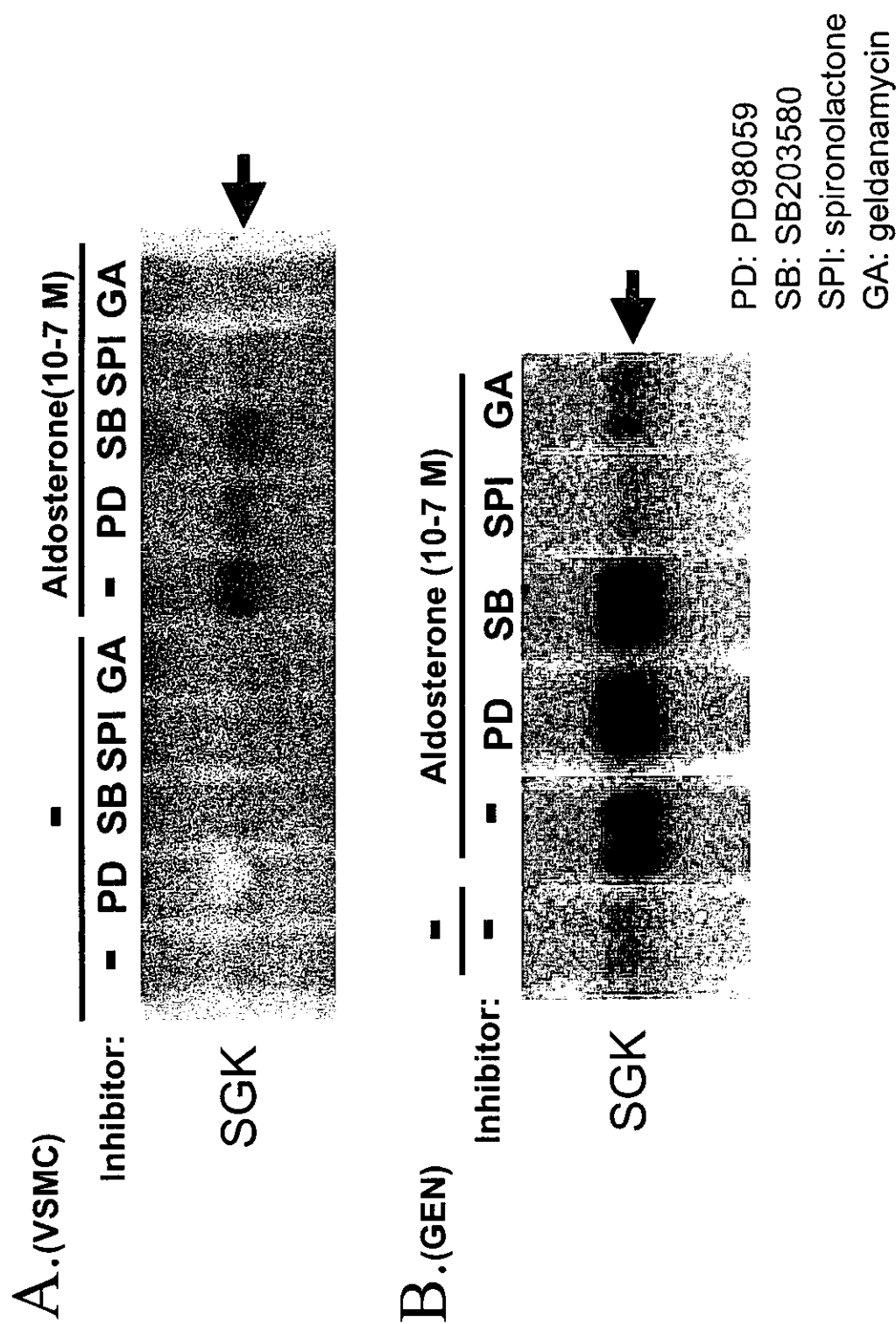
GEN 細胞を御供与頂いた Adler S 博士(ニューヨーク医科大学)並びに研究の初期段階で実験材料に御協力頂いた今泉和則博士(奈良先端科学技術大学院大学)に感謝致します。

図1、aldosteroneによるSGKの発現調節



A: Aldosterone (10⁻⁷ M) S: Serum (10%)

図2、aldosteroneによるSGKの発現調節機序



(3) 11 β -HSDおよびDHEA

血漿コルチゾール・コルチゾン測定の有用性

安田圭吾 (岐阜大学医学部第3内科)
森田浩之 (岐阜大学医学部総合診療部)
宗友厚 (岐阜大学医学部第3内科)
磯村幸範 (同 上)
棚橋哲也 (同 上)
棚橋弘成 (同 上)
大洞尚司 (同 上)
伊藤 勇 (同 上)

研究要旨

ヒトでの血漿コルチゾール (F)・コルチゾン (E) を測定し、肝・腎での相互変換と、末梢静脈血漿中での両者の平衡状態について検討した。腎では、1回の血流通過によって、約10%の血漿FがEへ転換すると考えられた。肝では、EからFへの転換の他に、それぞれ他の代謝産物への転換があると考えられ、Eは約75%、Fも約15%減少した。それぞれの静脈での血漿F・E濃度やF/E比を比較すると、末梢静脈血漿F・E濃度は、肝よりも腎により強く影響を受けていると考えられた。また、早朝空腹時の末梢静脈血漿F・E濃度は、1/Fと1/Eとの間に強い正相関がみられ、健常者も各種副腎皮質患者もほぼ同一直線上に存在したことから、両群での末梢静脈血漿F・E平衡状態には差がないと考えられた。

A. 研究目的

ヒトでは、グルココルチコイドとして活性型であるコルチゾール (F) と不活性型であるコルチゾン (E) は、 11β 水酸化ステロイド脱水素酵素 (11β -hydroxysteroid dehydrogenase: 11-HSD) の2つのアイソザイムによって相互変換されている。すなわち、タイプ1である11-HSD1は、双方向性の酵素であるが、生体内ではもっぱら reductase として働き、EをFへ変換する。肝、生殖腺、小脳、下垂体、脂肪組織などのグルココルチコイド標的細胞に存在し、局所でのグルココルチコイド活性の調節に関与していると考えられている。一方、タイプ2である11-HSD2は、一方向性の酵素で dehydrogenase として働き、FをEへ変換する。腎・大腸・唾液腺・皮膚などのミネラルコルチコイド標的細胞に存在し、Fのミネラルコルチコイド作用を不活化し、アルドステロンに結合特異性を与える役割を担っている。

したがって、腹部臓器においては、主と

して肝の11-HSD1によってEからFへ、逆に主として腎の11-HSD2によってFからEへ相互変換されていると考えられる。しかし、こうした主要臓器において、それぞれの程度の変換がなされているのかは不明である。今回、副腎もしくは腎血管疾患が疑われる患者で施行した副腎もしくは腎静脈血採血の際に得られた肝・腎静脈血を用いて、これについて検討した。また、末梢静脈血中では、この2つのアイソザイムによって、両者はある一定の平衡状態で存在すると考えられる。そのFとEの平衡状態がどういったものであるのか、また健常者および副腎皮質疾患患者で差があるかについても検討した。

B. 研究方法

副腎もしくは腎静脈血採血を行った疾患の内訳は、特発性アルドステロン症2例、アルドステロン産生腺腫10例、コルチゾール自律産生を伴うアルドステロン産生腺腫2例、プレクリニカルCushing症候群1例、

Cushing 症候群 2 例、腎血管性高血圧症 2 例、高レニン性本態性高血圧症 3 例、副腎近傍後腹膜神経節神経腫 2 例の計 24 例 (男性 6 例、女性 18 例、平均年齢 45 ± 13 歳) である。

採血は、すべての症例において、疾患の診断確定もしくは laterality の確定目的に行ったものであり、本研究はその残りの血漿を用いて retrospective に行った。書面によるインフォームドコンセント取得後、午後 2 時から 4 時の間に大腿静脈からカテーテルを挿入し、ACTH 非投与下で副腎・肝・腎・末梢静脈から採血したが、腎血管疾患疑いの症例では、肝静脈や副腎静脈の採血は行わなかった。確実にサンプリングできたのは、24 例中、副腎静脈 17 例 (そのうち 3 例は両側)、肝静脈 14 例、腎静脈 (右側のみ) 22 例であった。末梢静脈 24 例と合わせて、それぞれにおける血漿 E・F 濃度を ELISA で測定した。

一方、末梢静脈での血漿 E・F 濃度平衡状態の検討のために、健常者 98 例 (健常群、男性 90 例、女性 8 例、平均年齢 50 ± 10 歳) と副腎皮質疾患患者 66 例 (副腎皮質疾患群、男性 20 例、女性 46 例、平均年齢 49 ± 14 歳、非機能性副腎皮質腺腫 11 例、特発性アルドステロン症 4 例、アルドステロン産生腺腫 16 例、コルチゾール自律産生を伴うアルドステロン産生腺腫 4 例、プレクリニカル Cushing 症候群 6 例、Cushing 症候群 11 例、ACTH 非依存性両側大結節性副腎皮質過形成 2 例、Cushing 病 12 例) から、午前 8 時に空腹安静時に肘静脈から採血し、同様に血漿 E・F 濃度を ELISA で測定した。

血漿 F・E 濃度は、それぞれの ELISA で測定した。ELISA は、血漿 $100 \mu\text{l}$ に $2,000 \text{ dpm}$ の ^3H F を添加し、methylene chloride 3 ml で抽出し、10 倍に希釈後、 $10 \mu\text{l}$ を triplicate で測定に使用した。 ^3H F と ^3H E の methylene chloride による抽出率はほぼ同等であったため、それぞれの ELISA で得た値を ^3H F の抽出率で補正した。使用した抗 F・抗 E 抗体は、いずれもラビットポリクローナル抗体で、ミシシッピ大学 Dr Gomez-Sanchez から提供を受けた。抗 F 抗体の E への交差反応と抗 E 抗体の F への交

差反応は、それぞれ 4.2% と 3.4% であった。その他の主なステロイドに対する交差反応は両抗体とも 2% 以下であった。ELISA の intra-・inter-assay coefficient of variation は、それぞれ F は 8.7%・12.5%、E は 6.9%・14.9% であった。

結果は、すべて平均 \pm SD で示した。各静脈間の F・E 濃度の比較では Mann-Whitney U 検定もしくは Wilcoxon 符号順位検定を、血漿 F・E 濃度の相関には Spearman 順位相関を用いた。

C. 研究結果 副腎・腎・肝・末梢静脈血漿中の平均 F 濃度は、それぞれ $80.1 \pm 75.6 \mu\text{g/dl}$ (末梢静脈の値と比較して $P < 0.0001$)、 $8.4 \pm 5.6 \mu\text{g/dl}$ 、 $7.6 \pm 3.9 \mu\text{g/dl}$ 、 $9.6 \pm 5.7 \mu\text{g/dl}$ 、また平均 E 濃度は、それぞれ $9.4 \pm 6.5 \mu\text{g/dl}$ ($P < 0.0001$)、 $3.0 \pm 1.2 \mu\text{g/dl}$ ($P < 0.005$)、 $0.5 \pm 0.2 \mu\text{g/dl}$ ($P < 0.0001$)、 $2.0 \pm 0.7 \mu\text{g/dl}$ であった。平均 F/E 比は、それぞれ 8.0 ± 3.5 ($P < 0.001$)、 2.6 ± 1.2 ($P < 0.001$)、 15.1 ± 3.8 ($P < 0.0001$)、 4.5 ± 1.8 であった。

次に、末梢静脈血漿 F・E 濃度と腎静脈血漿 E・F 濃度をその両方を採取できた 22 例で比較した (図 1)。腎静脈の F は、末梢静脈の F に比較し約 12% 低く、逆に腎静脈の E は、末梢静脈の E に比較し、F の減少分程度の増加がみられた。さらに、末梢静脈血漿 F・E 濃度と肝静脈血漿 E・F 濃度をその両方を採取できた 14 例で比較した (図 2)。肝静脈の E は、末梢静脈の E の約 27% にまで低下し、肝静脈の F も、末梢静脈の F の約 85% にまで減少した。

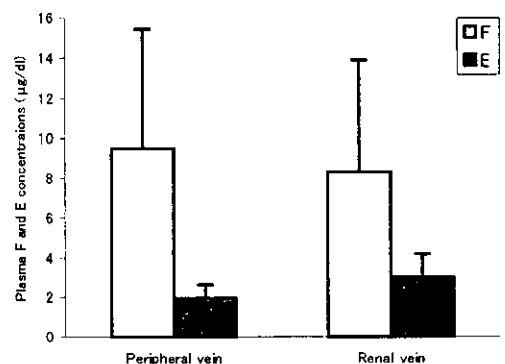


図 1

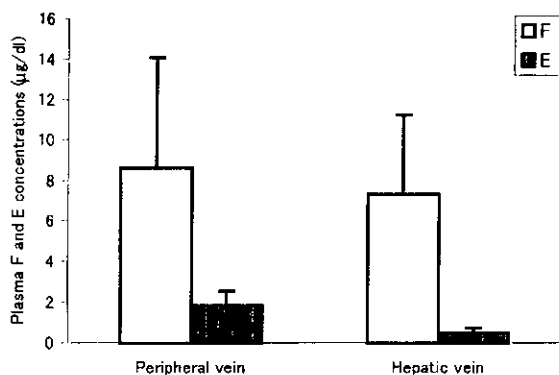


図 2

血漿 F と血漿 E の関係を double reciprocal plots で検討した。横軸に末梢静脈 F の逆数を、縦軸に肝・腎・末梢静脈 E の逆数をプロット (図 3) すると、いずれにも強い相関がみられた (肝静脈: $p=0.886$, $P<0.005$ 、腎静脈: $p=0.699$, $P<0.005$ 、末梢静脈: $p=0.784$, $P<0.0005$)。末梢静脈 F と末梢静脈 E とのプロットは、末梢静脈 F と腎静脈 E とのプロットとほぼ一致したが、末梢静脈 F と肝静脈 E とのプロットとはかなり異なっていた。

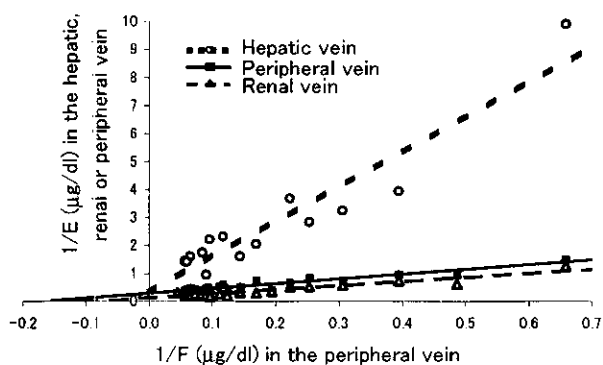


図 3

健常群と副腎皮質疾患群の空腹安静時の末梢静脈血漿 F・E 濃度を、同様に double reciprocal plots で検討した (図 4)。健常群 ($p=0.662$, $P<0.0001$)、副腎皮質疾患群 ($p=0.694$, $P<0.0001$) とともに強い相関がみられ、かつ非常に近似した直線上に分布した。なお、健常群での平均 F/E 比は 4.0 ± 1.2 であったことから、末梢静脈での E 濃度は F 濃度の約 1/4 であった。

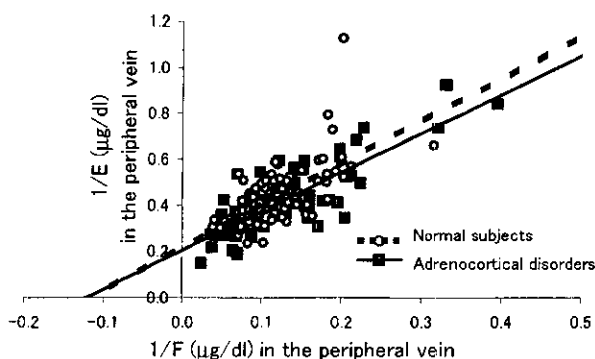


図 4

D. 考察

F は副腎皮質束状層で産生され、副腎静脈へ分泌され全身循環へ回る。このため、副腎静脈血漿 F 濃度が他の静脈より高値であるのは当然であるが、血漿 E 濃度も他の静脈に比較し高値であった。このことは、副腎から有意な E 分泌が行われていることを意味する。ヒト副腎にも 11-HSD1¹⁾ や 11-HSD2²⁾ が存在することが知られており、特に 11-HSD2 によって、産生された F の一部が E へ転換された結果と考えられる。

この副腎静脈を除き、腎静脈、肝静脈、末梢静脈血漿 F 濃度には、ほとんど差がみられなかったが、血漿 E 濃度には各静脈間で明らかな差がみられた。F/E 比は高い順に、肝静脈、副腎静脈、末梢静脈、腎静脈であったが、この差を規定している因子として、血漿 E 濃度が血漿 F 濃度より大きいと考えられた。末梢静脈血漿濃度は、F も E も肝静脈のそれらより腎静脈のそれらに近く、末梢静脈の F/E 比が副腎静脈のそれと腎静脈のそれの間であったことも合わせると、末梢静脈 F/E 比は、肝・腎両方の影響を受けているが、腎の影響をより強く受けていると考えられる。また、図 3 で示した末梢静脈の血漿 F 濃度と肝静脈・腎静脈・末梢静脈の血漿 E 濃度とによる double reciprocal plots での後 2 者の直線の近似性は、それぞれの血漿 E 濃度が末梢静脈と腎静脈でかなり近く、末梢静脈と肝静脈ではかなり異なっていることを意味している。このことから、末梢静脈血漿 E 濃度も、肝より腎の影響をより強く受けていると考えられる。

末梢静脈血漿 F・E 濃度と大動脈血漿 F・E 濃度には差がないことが知られている³⁾。したがって、末梢静脈と腎静脈での血漿 F・E 濃度差は、腎での F と E の変換をかなり表していると考えられる。図 1 の結果から、腎を 1 回血液が通過すると、11-HSD2 によって F の約 10% が E へ転換すると考えられた。一方、肝は腎と異なり、約 20% が肝動脈から、約 80% が門脈から血流を受けている。門脈の血漿 F・E 濃度は不明であり、肝動脈血と、11-HSD2 が多い大腸や 11-HSD1 が多い腹腔内脂肪組織を通過してきた門脈血とでは、血漿 F・E 濃度が異なる可能性を否定できない。しかし、ここではそれがほぼ同等であると仮定し、肝には 11-HSD1 のみ存在することを考慮して図 2 の結果を判断すると、肝を 1 回血液が通過すると、E から F への転換も起こるが、F も E も THF や THE などの他の代謝産物へ 15% 程度が転換されると考えられた。尿中 THF と THE 排泄量はほぼ 1 対 1 であると言われていることから、肝での E から F への転換は比較的少ないことが予測される。

空腹安静時の末梢静脈血漿 F・E 濃度を double reciprocal plots で検討したところ、健常者群および副腎皮質疾患群のいずれにおいても、ほぼ同一直線状に分布してみられた。このことから、末梢静脈血漿中の F・E 平衡状態には、かなり一定の関係があること、また両群で平衡状態には差はないと考えられた。すなわち、たとえアルドステロン過剰や F 過剰があっても、この平衡状態には影響しないことを意味する。

E. 結論

ELISA を用いて、腹部静脈と末梢静脈血漿中の F・E 濃度を測定し、両者の関係を検討した。末梢静脈血漿中の F・E 濃度は、肝よりも腎の影響をより強く受けており、また両者の末梢静脈血漿中の平衡状態は健常者でも副腎皮質疾患患者でも差はみられないことが判明した。

F. 研究発表

1. 学会発表

森田浩之、磯村幸範、宗友厚、棚橋哲也、大洞尚司、安田圭吾. 第 74 回日本内分泌学会学術総会、横浜、2001、ヒト 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 活性：腎・肝・副腎静脈採血による検討。

G. 参考文献

- 1) Ricketts ML, Verhaeg JM, Bujalska I et al. Immunohistochemical localization of type 1 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in human tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1325-1335, 1998.
- 2) Hirasawa G, Sasano H, Suzuki T, et al. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor in human fetal development. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1453-1458, 1999.
- 3) Walker BR, Campbell JC, Fraser R et al. Mineralocorticoid excess and inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in patients with ectopic ACTH syndrome. *Clin Endocrinol* 37:483-492, 1992.

肥満におけるグルココルチコイド代謝の解析

—レプチン欠損肥満マウス (C57BL/6J ob/ob) における11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1およびグルココルチコイド受容体の検討—

中川祐一、中西俊樹、藤澤泰子、大関武彦
浜松医科大学小児科

研究要旨

肥満やインスリン抵抗性の発症に及ぼすグルココルチコイドとレプチンの関連を検討するため、グルココルチコイド代謝のキーエンザイムである11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type1(11HSD1)およびグルココルチコイド受容体(GR)に及ぼすレプチンの作用につきレプチン欠損肥満マウス C57BL/6J ob/obマウスを用いた解析を行なった。C57BL/6J ob/obマウスをレプチン投与群、生食水投与群に分け、肝臓における11HSD1の酵素活性および遺伝子発現そしてGRの遺伝子発現につき検討した。また体重、血中インスリン、コルチコステロン、グルコースの測定も行なった。C57BL/6J ob/obマウスの生食水投与群では正常対照群に比べ、不活性型のグルココルチコイドを活性型に転換させる11HSD1のreductase活性は増加し、活性型のグルココルチコイドを不活性型に転換させるdehydrogenase活性および遺伝子発現は低下していた。レプチン投与群では正常対照群とほぼ同様の結果を示した。またGRの遺伝子発現はC57BL/6J ob/obマウスの生食水投与群では正常対照群に比べ増加を認め、レプチン投与群では正常対照群とほぼ同様の結果を示した。体重、血中のインスリン、コルチコステロン、グルコースはC57BL/6J ob/obマウスの生食水投与群では正常対照群に比べ高値を示し、レプチン投与群では正常対照群とほぼ同様の傾向を示した。これらの結果よりレプチン欠損性の肥満においてはグルココルチコイドの過剰分泌のみでなく末梢における代謝も活性型のグルココルチコイドを増加させるように調節されていることが明らかになった。またレプチンが副腎からのグルココルチコイドの分泌を抑制するだけでなく、末梢においては11HSD1の調節に直接作用することによりグルココルチコイド代謝にも関与している可能性も示唆された。

A. 研究目的

肥満とグルココルチコイドの関連については臨床的にはクッシング症候群やグルココルチコイド療法における肥満の発生等の現象にて明らかである1),2)。また基礎的研究によりグルココルチコイドが脂肪細胞の分化に必要であることなどが報告されている3),4)。このようにグルココルチコイドの過剰状態が肥満発症に影響を与えるということはよく知られている事実であるが末梢におけるグルココルチコイド代謝が肥満ではどのようなようになって肥満発症に関与しているのかについては不明な点が多い。

現在グルココルチコイド代謝において重要な役割を果たすものとして11 β -hydroxysteroid dehydrogenase(11HSD)の存在が知られている。11HSDにはtype 1とtype 2のふたつのアイソザイムが存在しており、type 1は主に肝臓、脂肪等で作用し活性型のグルココルチコイド(人ではコルチゾール、ラット・マウスではコルチコステロン)を不活性型(人ではコルチゾン、ラット・マウスではデハイドロコルチコステロン)に転換するdehydrogenase作用と逆に不活性型のグルココルチコイドを活性型に転換

するreductase作用の両方向性の作用を示す。またtype 2は腎臓、大腸に主に存在し活性型を不活性型に転換するdehydrogenase作用のみを示す。近年11HSDの研究がすすみグルココルチコイドが関与する様々な病態に関連している可能性があることが我々を含むいくつかのグループから報告されている5),6),7),8)。

また肥満発症に関与する因子としてよく知られているレプチン9)とグルココルチコイドとの関連についてグルココルチコイドがレプチン産生を刺激すること10)やレプチンがグルココルチコイド産生を抑制すること11)などが報告されているがその作用調節機序については不明な点が多い。

今回肥満およびインスリン抵抗性におけるグルココルチコイドの作用を解明することを目的としレプチン欠損性肥満のモデル動物であるC57BL/6J ob/obマウスを用い、肝臓における11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1(11HSD1)およびグルココルチコイド受容体(GR)とレプチンとの関係を中心に解析を行った。

B. 研究方法

レプチン欠損モデルである4週令の雌 C57BL/6J ob/ob マウスをレプチン投与群と生食水投与群の2群にわけた。レプチンは1 mg/kgを1日2回の腹腔内投与を3週間施行した。生食水投与群は生食水投与を1日2回、3週間施行した。対照として非肥満マウスに生食水の1日2回投与を3週間施行した。各群において体重測定を毎日行い、薬物投与開始3週目に肝臓における11HSD1の活性および遺伝子発現につき既報の方法5),6)にて解析した。またGRの遺伝子発現についても解析を行い、血中のグルコース、コルチコステロンおよびインスリンの測定も施行した。

(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

肥満マウスでは血中コルチコステロン、インスリンおよびグルコースは対照マウスと比較し有意に増加していた。またレプチン投与により血中コルチコステロン、インスリンおよびグルコースは有意に低下を認めた(表)。体重は肥満マウスでは対照マウスと比較し有意な増加を認め、レプチン投与により体重の増加は抑制された(図1)。肥満マウスの肝臓における11HSD1のdehydrogenase活性および遺伝子発現は対照マウスに比べ有意に低下していた。また一方肝臓におけるreductase活性は有意に増加していた。レプチン投与によりdehydrogenase活性および遺伝子発現は増加し、reductase活性は低下した(図2,3,4)。

また肝臓におけるGRの遺伝子発現は肥満マウスでは増加し、レプチン投与により減少した(図5)。

D. 考察

従来よりグルココルチコイドの過剰状態が肥満の発症に関与しているという研究がなされてきた1)。今回の結果にてレプチン欠損肥満マウスの肝臓では11HSD1のdehydrogenase活性が低下し、reductase活性が増加していることから肥満では副腎よりのグルココルチコイド分泌の増加のみでなく末梢においても活性型のグルココルチコイドが増加するように代謝状態が変化していることが明らかになった。肥満と11HSD1の関係については近年人の内臓脂肪において11HSD1のreductase活性が増加しているという報告がされており12)、11HSD1の脂肪細胞における代謝作用が注目されている。また肥満ラットを用いた研究では肝臓のdehydrogenase活性は低下しているという報告がなされており13)、我々の結果と同様であることから末梢組織におけるグルココルチコイド活性の増強が肥満の病態と深く関連していることが示唆された。

近年脂肪細胞より分泌される肥満遺伝子産物であるレプチンが副腎におけるグルココルチコイドの産生を抑制するという報告がなされており10)肥満におけるレプチンとグルココルチコイドの関連が注目されてい

る。我々の今回の研究ではレプチンの投与により従来報告されているようにレプチン欠損肥満マウスの体重および血中コルチコステロンの低下が認められる14)とともに肝臓における11HSD1のdehydrogenase活性の増加とreductase活性の低下が示されたことにより、代謝レベルにおいても活性型のグルココルチコイドを減少するようにレプチンが作用していることが明らかにされた。このことはレプチンが肥満の改善に対して視床下部を介した摂食抑制作用のみでなく末梢組織に対する直接作用によっても機能していることが示唆された。

さらに高コルチコステロン血症を認める肥満マウスにおいてGR遺伝子の発現の増加を認めたことは従来ラットで行なわれた研究を支持するものであり15)肥満マウスでは受容体レベルにおいてもグルココルチコイド作用増強に代謝調節が傾いていることが示唆された。

また我々の結果および従来の報告16),17)よりレプチン投与により血中インスリンの低下とともにグルコースの低下も認められることから肥満やインスリン抵抗性におけるレプチン・グルココルチコイド・インスリン間の相互作用については11HSD1およびGRとの関連を含め非常に興味のあることと思われた。

E. 結論

レプチン欠損性の肥満ではグルココルチコイド過剰のみでなく末梢組織において活性型のグルココルチコイドが増加するように代謝が変化していることが示された。またレプチンが末梢組織にて直接的にグルココルチコイド代謝に関与していることも明らかにされた。

文献

- 1)Rebuffe-Scrive M, Krotkiewski M, Elfverson J, et al. : Muscle and adipose tissue morphology and metabolism in Cushing's syndrome. J Clin Endocrinol Metab 1988, 67: 1122-1128.
- 2)Mayo-Smith W, Hayes CW, Biller BMK, et al. : Body fat distribution measured with CT : correlation in healthy subjects, patients with anorexia nervosa, and patients with Cushing's syndrome. Radiology 1989, 170: 515-518.
- 3)Hauner H, Schmid P, Pfeiffer EF : Glucocorticoids and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells. J Clin Endocrinol Metab 1987, 64: 832-835.
- 4)Gaillard D, Wabitsch M, Pipy B, et al. : Control of terminal differentiation of adipose precursor cells by glucocorticoid. J Lipid Res 1991, 32: 569-579.
- 5)Liu YJ, Nakagawa Y, Ohzeki T, et al. : Gene expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 in the kidneys of insulin-dependent diabetic rats. Hypertension 1998, 31: 885-889.