

蛋白GST-Ubc9; GST-Ubc9(C93S)として大腸菌に発現させて、glutathione sepharose beads 4Bを用いて精製する。一方、COUP-TFI蛋白は、T7 RNA polymeraseを用いてin vitro transcription-translationにて合成し、両者の結合の有無を上記beadsを用いて検討する。

### 3. Co-immunoprecipitation assay

RSV promoter-driven COUP-TFIとCMV promoter-driven Xpress tagged Ubc9を発現させ、抗COUP-TFI抗体および抗Xpress抗体を用いて免疫共沈降させて結合の有無を検討する。

### 4. transient transfection assay

4xGal4-tk-Luc, CRS2 (bovine CYP17)-SV40-Luc, NHE-1-Lucのレポーターを用いて、COUP-TFI、Ubc9野生型および各種欠失変異体をCOS-1 cellに一過性に発現させて、レポーター活性を検討する。

### 5. Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP assay)

NHE-1 promoterにおいて、COUP-TFI、Ubc9が実際に動員されているか否かをCOS-1 cellを用いたChIP assayにより検討する。

### 6. RT-PCR

NIH3T3 cellにCOUP-TFI、Ubc9、Ubc9(C9S)などを発現させて、内因性のNHE-1 mRNA levelが受ける影響をRT-PCRにより定量測定する。

## C. 研究結果

### 1. COUP-TFI-interacting proteinとしてのUbc9の同定

Yeast two-hybrid systemにより、COUP-TFI(aa 55-423)とUbc9が特異的に蛋白-蛋白相互作用を有することが示された。また、この相互作用はin

vitro GST-pulldown assay, mammalian co-immunoprecipitation assayによっても確認された。

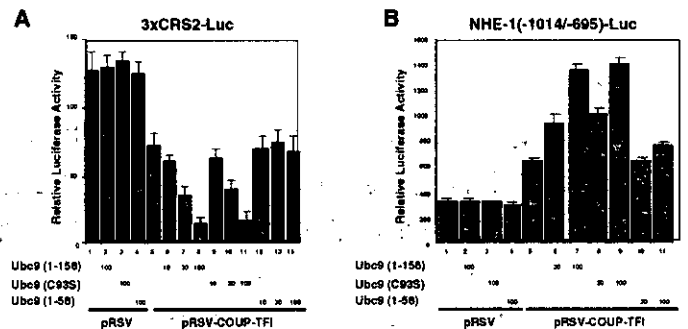


図1 CYP17(A)およびNHE-1遺伝子(B)プロモーター活性に及ぼすCOUP-TFI, Ubc9の役割

Ubc9は、蛋白質モディファイアの1つのSUMO-1 (small ubiquitin-related modifier-1)を基質蛋白に結合する(SUMO化)のに必要なE2 SUMO-1 conjugating enzymeである。Ubc9のSUMO化活性はCys93Serの点突然変異により消失することが報告されていることから、この変異体とCOUP-TFIとの相互作用を検討したところ、Ubc9 (Cys93Ser)も野生型同様に相互作用を示したことから、COUP-TFIとの相互作用はSUMO化活性は不可欠ではないことが示された。

また、GST-pulldown assayにより結合部位を細かく検討した結果、COUP-TFI(amono acids 388-403)にUbc9(59-158)が結合することが示された。

### 2. Ubc9のCOUP-TFI作用に及ぼす影響の検討(レポーターアッセイ)

COS-1 cellを用いたtransfection studyにより、COUP-TFIによる転写抑制に及ぼす影響を検討した。4xGal4-tk-Lucおよび3CRS2-SV40-Lucレポーターを用いて検討したところ、COUP-TFIによるレポーター活性の抑制をUbc9はさらに増強し、COUP-TFI非発現

下ではUbc9はレポーター活性に影響を与えないことから、COUP-TFIのcorepressorとして機能することが示された(図1A)。

一方、NHE-1やNGFI-Aプロモーターは、COUP-TFIによりpositiveに調節されることが示されており、Ubc9はこのCOUP-TFIによる転写活性化をさらに増強することが示され、これらのプロモーター活性に対しては、COUP-TFIのcoactivatorとして機能することが示された(図1B)。

### 3. Ubc9のCOUP-TFI作用に及ぼす影響の検討(内因性遺伝子への影響)

Y-1 cellを用いて、COUP-TFIおよびUbc9を共発現させて、NHE-1遺伝子プロモーターのCOUP-TFI結合が既に報告されている部分に、これらの蛋白質が実際に動員されているか否かをChIP assayにより検討したところ、COUP-TFI, Ubc9ともに動員されていることが示された(図2)。

さらに、外因性に発現させたCOUP-TFIおよびUbc9がNIH3T3 cellにおける内因性のNHE-1 mRNAレベルを協調して増加させることが示された(data not shown)。以上の結果から、レポーターアッセイのみならず、クロマチン環境の内因性遺伝子に対しても、Ubc9はCOUP-TFIの新規転写共役因子であることが明らかとなった。

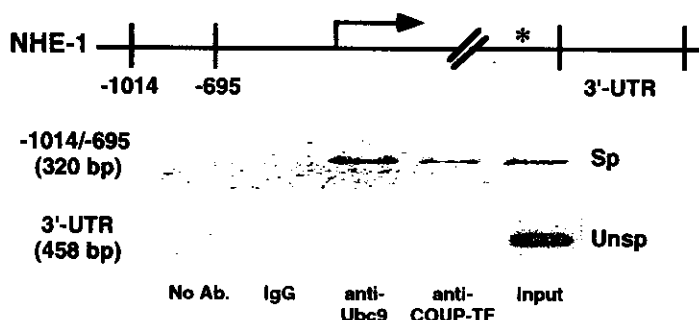


図2 ChIP assay

### D. 考察

今回の研究結果から、E2 SUMO-1 conjugating enzymeであるUbc9がCOUP-TFIの新規転写共役因子であることが示された。COUP-TFIとUbc9との蛋白-蛋白相互作用は、Ubc9の有するSUMO化活性は不可欠ではなく、転写共役因子としてはたらくことが示された。さらに、transfection studyの結果からは、Ubc9がレポーター遺伝子および内因性遺伝子の両標的遺伝子に対しても、共役因子として実際に動員されていることがChIP assayにより示された。そして、COUP-TFI標的遺伝子の一つのNHE-1に対しては、外因性に発現させたCOUP-TFIおよびUbc9が協調して、そのmRNAレベルを増加させることが示された。以上より、Ubc9はCOUP-TFI作用をpositiveまたはnegativeに誘導する新規転写共役因子で、プロモーターによりこのように異なる影響を示す理由としては、プロモーター配列にCOUP-TFIとともに結合する時のallosteric効果や、同時に細胞内から動員されるその他の蛋白質の影響などが推定される。

副腎皮質ステロイド産生に及ぼす影響としては、CYP17遺伝子プロモーターのCRS2配列に対して、COUP-TFIとUbc9は協調して転写抑制にはたらいっていることから、グルココルチコイド系に対しては産生抑制に働く因子であることが推定され、今後、副腎皮質腫瘍に及ぼす影響や、その他のステロイドホルモンの産生に及ぼす影響などを、transfection studyや免疫組織化学分析などを行って明らかにしていく必要があると考えられる。

### E. 結論

核内受容体COUP-TFIは一般にはrepressorとして知られているが、プロモーターによってはactivatorとして機能する。今回我々が同定した新規COUP-TFI-interact-

ing proteinのUbc9は、プロモーターによりcorepressorおよびcoactivatorとしても機能するbifunctionalな転写共役因子であることが明らかとなった。今後は、副腎皮質ステロイド産生におけるUbc9の機能解析を進めることにより、正常副腎皮質や副腎皮質腫瘍における役割を明らかにしていく予定である。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.: *Mol. Cell Endocrinol.* 189: 181-189, 2002.
- 2) I. Saito, H. Kawabe, M. Tsujioka, H. Hirose, H. Shibata.: Trends in pharmacologic management of hypertension in Japan: One year after the publication of the JSH2000 guidelines.: *Hypertens. Res.*, 25: 175-178, 2002.
- 3) H. Shibata, S. Kobayashi, I. Kurihara, I. Saito, T. Saruta.: Nuclear receptors and coregulators in adrenal tumors.: *Horm. Res.* 59(suppl 1): 85-93, 2002.
- 4) H. Shibata, M. Dufau.: Session summary: gene expression.: *Endocr. Res.*, 28(4): 541-544, 2002.
- 5) S. Kobayashi, H. Shibata, I. Kurihara, I. Saito, T. Saruta.: CIP-1 is a novel corepressor for nuclear receptor COUP-TF: a potential negative regulator in adrenal steroidogenesis.: *Endocr. Res.*, 28(4): 579, 2002.
- 6) I. Kurihara, H. Shibata, S. Kobayashi, I. Saito, T. Saruta.: A RING-finger protein CIP-2 is a novel regulator of COUP-TF action in the adrenal cortex.: *Endocr. Res.*, 28(4): 581, 2002.
- 7) 柴田洋孝: 原発性アルドステロン症 今日の治療指針2003年版 p.516-517, 2003.
- 8) 柴田洋孝、猿田享男: 糖質コルチコイド Annual Review内分泌・代謝2003 中外医学社、p.238-246、2003.
- 9) 柴田洋孝、猿田享男: 副腎疾患の診断 *Mebio* 19(8): 63-70、2002.
- 10) 柴田洋孝、齊藤郁夫: エストロゲンと生活習慣病 慶應保健研究 20(1): 1-7、2002.
- 11) 柴田洋孝、本間桂子、栗原 勲、小林佐紀子、千葉仁志、黒澤隆夫、竹下栄子、齊藤郁夫、林 松彦、猿田享男: 原発性アルドステロン症の病型診断における尿中18-hydroxycortisol(18-OH-F)の有用性の検討 日本内科学会誌 91(臨時増刊号): 149、2002.
- 12) 柴田洋孝: 副腎皮質腫瘍におけるステロイド合成酵素の発現 内分泌・糖尿病科 15(3): 216-223、2002.
- 13) 柴田洋孝、小林佐紀子、栗原 勲、齊藤郁夫、猿田享男: COUP-TFおよびcorepressorによるステロイド17 $\alpha$ -水酸化酵素CYP17遺伝子転写調節 ホルモンと臨床(in press)、2002.
- 14) 柴田洋孝: 主な二次性高血圧症の鑑別診断 内科診療Q&A 六法出版、p.40-43、2002.
- 15) 柴田洋孝: 原発性アルドステロン症による高血圧 内科診療Q&A 六法出版、p.44-47、2002.
- 16) 柴田洋孝: クッシング症候群による高血圧 内科診療Q&A 六法出版、p.48-51、2002.
- 17) 柴田洋孝、本間桂子、栗原 勲、小林佐紀子、林 松彦、千葉仁志、黒澤隆夫、竹下栄子、齊藤郁夫、猿田享男: 原発性アルドステロン症における尿中18-ヒドロキシコルチゾール 臨床内分泌代謝Update Proceedings 78 (Suppl): 80-83、2002.

### 2. 学会発表

- 1) 13<sup>th</sup> International Symposium on Growth Hormone and Endocrinology (Budapest, Hungary, April, 2002.), Nuclear receptors and coregulators in adrenal

tumors.: H. Shibata, S. Kobayashi, I. Kurihara, I. Saito, T. Saruta.

2) Keystone Symposia (Snowbird, Utah, April, 2002.), Cloning of a novel COUP-TF-interacting transcriptional coregulator CIP-1 using a yeast two-hybrid system.: S. Kobayashi, H. Shibata, I. Kurihara, I. Saito, T. Saruta.

3) 26<sup>th</sup> International Congress of Internal Medicine (Kyoto, May, 2002.), Urinary 18-hydroxycortisol level may be a useful clinical marker for differential diagnosis between aldosterone-producing adrenocortical adenoma and hyperplasia.: H. Shibata, K. Homma, I. Kurihara, S. Kobayashi, H. Chiba, T. Kurosawa, E. Takeshita, I. Saito, M. Hayashi, T. Saruta.

4) ADRENAL2002 (San Francisco, June, 2002.), CIP-1 is a novel corepressor for nuclear receptor COUP-TF: A potential negative regulator in adrenal steroidogenesis.: S. Kobayashi, H. Shibata, I. Kurihara, I. Saito, T. Saruta.

5) ADRENAL2002 (San Francisco, June, 2002.), A RING-finger protein CIP-2 is a novel regulator of COUP-TF action in the adrenal cortex.: Isao Kurihara, H. Shibata, S. Kobayashi, I. Saito, T. Saruta.

6) 84<sup>th</sup> Annual Meeting of the Endocrine Society (San Francisco, June, 2002.), Role of CIP-1, a novel transcriptional corepressor for COUP-TF in steroidogenesis of adrenal cortical tumors.: S. Kobayashi, H. Shibata, I. Kurihara, M. Hayashi, I. Saito, T. Saruta.

7) 84<sup>th</sup> Annual Meeting of the Endocrine Society (San Francisco, June, 2002.), A novel RING-finger protein CIP-2 interacts with COUP-TF to regulate steroidogenesis in the adrenal glands.: I. Kurihara, H. Shibata, S. Kobayashi, M. Hayashi, I. Saito, T. Saruta.

8) 第75回日本内分泌学会学術総会(大阪、

2002年6月)、副腎腫瘍における核内受容体によるホルモン産生異常機構: COUP-TFおよび新規転写共役因子CIPsの役割: 柴田洋孝、小林佐紀子、栗原 勲、林 松彦、齊藤郁夫、猿田享男。

9) 第75回日本内分泌学会学術総会(大阪、2002年6月)、ステロイド産生組織に高発現を認める新規転写共役因子CIP-2の機能解析: 栗原 勲、柴田洋孝、小林佐紀子、林松彦、齊藤郁夫、猿田享男。

10) 第75回日本内分泌学会学術総会(大阪、2002年6月)、核内受容体COUP-TFに結合する新規転写共役因子CIP-1のクローニング: 小林佐紀子、柴田洋孝、栗原 勲、林松彦、齊藤郁夫、猿田享男

11) 11<sup>th</sup> International Congress on Hormonal Steroids/7<sup>th</sup> International Congress on Hormones and Cancer (Fukuoka, Oct. 2002.), COUP-TF and novel transcriptional corepressors in adrenal cortical steroidogenesis: H. Shibata, S. Kobayashi, I. Kurihara, I. Saito, T. Saruta.

12) 11<sup>th</sup> International Congress on Hormonal Steroids/7<sup>th</sup> International Congress on Hormones and Cancer (Fukuoka, Oct. 2002.), A novel COUP-TF corepressor protein cloned from a cortisol-producing adrenocortical adenoma cDNA library: S. Kobayashi, H. Shibata, I. Kurihara, I. Saito, T. Saruta.

13) 11<sup>th</sup> International Congress on Hormonal Steroids/7<sup>th</sup> International Congress on Hormones and Cancer (Fukuoka, Oct. 2002.), COUP-TF corepressor protein in the steroidogenesis of the adrenal cortex: I. Kurihara, H. Shibata, S. Kobayashi, I. Saito, T. Saruta.

14) 第25回日本高血圧学会(コメデイカルセッション)(東京、2002年10月)、高血圧家族歴を有する正常血圧大学生のライフスタイル調査と保健指導の意義: 藤井 香、広瀬寛、柴田洋孝、和井内由充子、辻岡三南子、河邊博史、齊藤郁夫。

15) 第25回日本高血圧学会(東京、2002年10月)、早期糖尿病性腎症患者のアンジオテン

シン変換酵素阻害薬治療におけるアルドステロンエスケープ現象の臨床的意義と抗アルドステロン薬併用による臓器保護作用：佐藤敦久、林 晃一、柴田洋孝、猿田享男。

16) 第25回日本高血圧学会(東京、2002年10月)、血清アディプネクチン濃度と高血圧の断面調査およびインスリン抵抗性と高血圧の縦断的検討：広瀬 寛、齊藤郁夫、河邊博史、辻岡三南子、柴田洋孝、猿田享男。

17) 第32回東部腎臓学会(東京、2002年10月)、尿中18-hydroxycortisolが診断に有用であった特発性アルドステロン症：西川元、早川 洋、横山啓太郎、山本裕康、貞岡俊一、本間桂子、柴田洋孝。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

# Forkhead transcription factor Foxo1 の副腎および性腺における 発現・機能に関する研究

藤枝 憲二、向井 徳男、中江 淳  
旭川医科大学小児科

## 研究要旨

Forkhead transcription factor Foxo1は*C.elegans*におけるインスリンシグナル伝達経路と相同であるDAF-2経路の抑制性調節因子であるDAF-16の哺乳類での相同遺伝子である。その作用としては細胞の分化や増殖に関与すると報告されており、そのほか代謝やタンパク合成、遺伝子発現などにも関与すると考えられている。Foxo1のマウスにおける発現に関しては脳・心臓・肝臓・腎臓・筋・膵臓・卵巣で発現していることが既に確認されている。加えて、GSTプルダウンアッセイの結果からエストロゲン受容体とエストロゲン依存的に結合することが報告されている。

今回我々はFoxo1のステロイド産生組織における発現およびその機能を明らかにすることを目的に、まずはその発現の有無を検討した。その結果、成獣マウスの副腎・性腺における発現をRT-PCRにより確認することができた。また、成獣マウス副腎におけるFoxo1の発現部位をin situ hybridization法により検討したところ、副腎髄質および副腎皮質球状層において発現が確認された。今後はさらに発現様式を検討し、これら臓器におけるFoxo1の機能解明を追求していきたい。

## A. 研究目的

forkhead型転写因子(またはwinged helix 転写因子)ファミリーの一員であるFoxo1(Fkhr)は*C.elegans*におけるインスリンシグナル伝達経路と相同であるDAF-2経路の抑制性調節因子であるDAF-16の哺乳類での相同遺伝子である。forkhead型転写因子の作用としては細胞の分化や増殖に関与すると報告されており、そのほか代謝やタンパク合成、遺伝子発現などにも関与すると考えられている。さらに、Foxo1はインスリン・IGF-1によりphosphatidylinositol-3(PI3)kinase依存的にAkt/PKBによりリン酸化され、核内から細胞質へ移行し、その転写活性を失うことも報告されている。

Foxo1のマウスにおける発現に関してはこれまでもいくつか報告があり、脳・心

臓・肝臓・腎臓・筋・膵臓・卵巣で発現していることが確認されている。加えて、GSTプルダウンアッセイの結果からエストロゲン受容体とエストロゲン依存的に結合することが報告されている。

また、Foxo1のノックアウトマウスは胎生致死となることから、その生体内機能に関しては限られた報告しかないのが現状である。

今回我々はステロイド産生組織である副腎および性腺におけるFoxo1の機能を解明することを目的に、これらステロイド産生組織におけるFoxo1の発現を検討した。

## B. 研究方法

### 1. real-time RT-PCR

摘出後に冷凍保存した成獣マウスの副腎および性腺からtotal RNAを抽出

した。1  $\mu$ gのtotal RNAをテンプレートとしてLigutCycler-RNA Amplification Kit SYBR Green I(Roche)を用いてLightCycler Systemにより定量的RT-PCRを行った。Foxo1増幅にはイントロンを挟むように設計したプライマーを使用した(図1)。内部標準としてGAPDHについても同様の方法でRT-PCRを行った。

## 2. in situ hybridization

成獣マウスから摘出した副腎を凍結切片にし組織標本を作成した。Foxo1のmRNAに対するDIGラベルRNAプローブを作成し、in situ hybridizationを行った。

### (倫理面への配慮)

用いた実験動物は必要最小限に留めるよう配慮し、解剖を行うに当たっては苦痛を最小限にするため麻酔後に実施し、動物愛護の精神に反することのないように注意を払った。

## C. 研究結果

### 1. RT-PCR(図2)

成獣マウスの副腎、性腺においてはFoxo1のmRNAが発現していることを確認できた。副腎、性腺ともに成獣ではオスよりもメスにおいて発現量が多いことが示された。

### 2. in situ hybridization(図3)

成獣マウス副腎におけるFoxo1の発現部位を同定するためにin situ hybridizationを行った。その結果副腎髄質および副腎皮質球状層においてFoxo1のmRNAが発現していることが示された。

## D. 考察

成獣マウスの副腎・性腺においてはFoxo1が発現していることが明らかとなっ

たことから、何らかの生理的作用を有しているものと推測される。中でも副腎において発現している領域が髄質と皮質球状層であることから、カテコラミンあるいは鉱質コルチコイドの産生に關与する可能性が示唆される。さらには、これらを通じて血圧調節に影響を及ぼしている可能性も考えられる。

また、性腺における発現に関しては興味深いことに性差が存在する。今後は性腺の組織内発現領域についても検討を加えることで、性腺における機能の解明を目指していきたい。

## E. 結論

成獣マウスにおいては副腎、性腺ともにFoxo1が発現していることを確認することができた。さらに、副腎における組織内発現部位は髄質および皮質球状層であることも確認できた。今後はこれら発現の推移を発達段階に応じて検討し、その発現様式を明らかにすること、さらにはステロイド産生組織におけるFoxo1の機能の解明に迫りたい。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

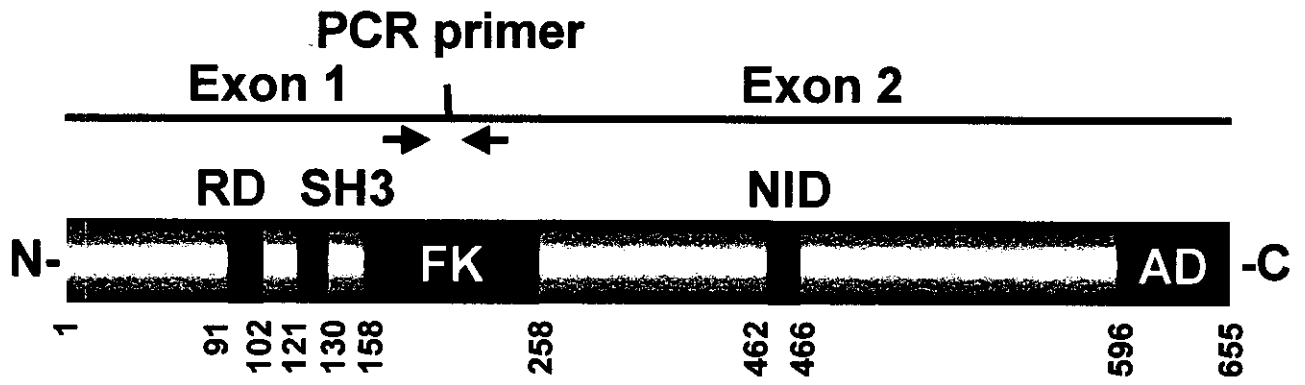
なし

### 3. その他

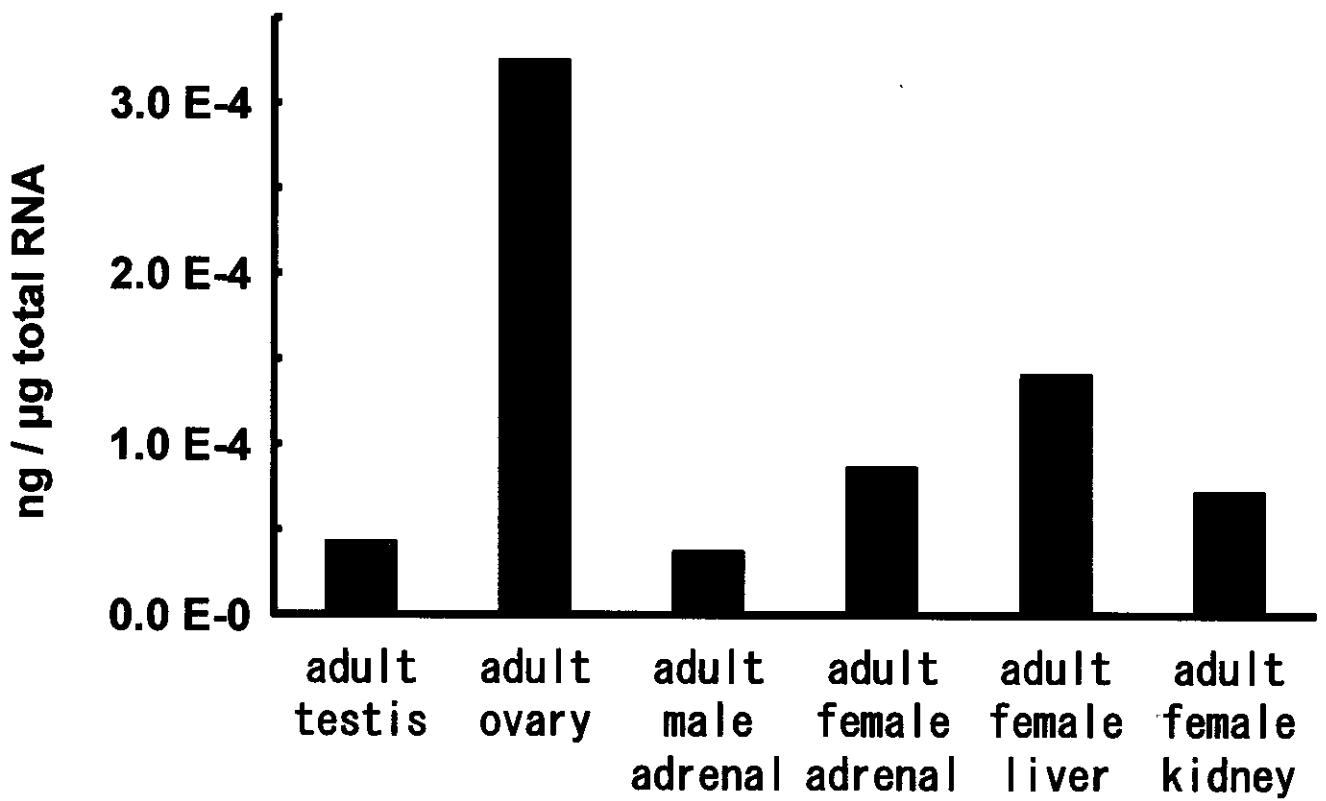
なし

(图 1)

# mouse Foxo1



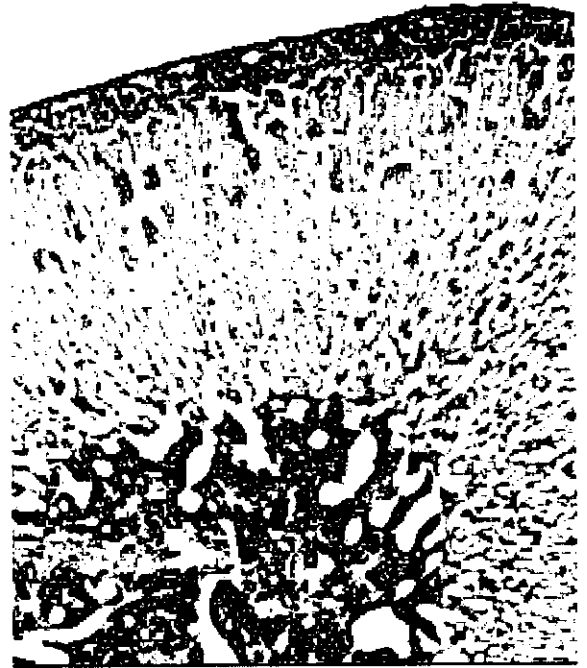
(图 2)





(图 3)

zona glomerulosa  
cortex zona fasciculata  
zona reticularis  
medulla



# HDL受容体CLA-1の遺伝子発現抑制による 副腎ホルモン産生および細胞増殖に与える影響について

村尾 孝児、井町 仁美、曹 聞銘、高原 二郎、石田 俊彦  
香川医科大学第一内科

## 研究要旨

我々はマウスSR-B1相同遺伝子であるCLA-1がヒトHDL受容体であり、副腎で強く発現されていることを報告してきた。今回はヒトHDL受容体CLA-1に変異を導入したDecoy CLA-1を作成し、その機能について解析した。Decoy CLA-1は副腎細胞におけるステロイドホルモン合成の抑制および細胞増殖の抑制、アポトーシスの促進作用を示した。今後このDecoy CLA-1を利用することにより、ステロイドホルモンが過剰に分泌させる副腎腫瘍の新たな治療法につながると考えられた。

## A. 研究の目的

1996年Actonらによりマウスscavenger receptor class B type 1(SR-B1)がHDL受容体であると報告された。我々はマウスSR-B1相同遺伝子であるCLA-1がヒトHDL受容体であり、副腎で強く発現されていることを報告してきた。また副腎におけるステロイド産生の最初の基質はコレステロールであり、副腎にコレステロールを提供するHDL-HDL受容体とステロイドホルモン合成には密接な関係があることも報告してきた。今回の目的は副腎腫瘍細胞によるCLA-1の発現を制御することでステロイドホルモン合成および腫瘍の増殖に与える影響について検討した。

## B. 研究方法

### 1. プラスミドの作成

CLA-1の発現ベクターにランダムなmutationおよびdeletion mutant(C末端欠損)を挿入した。マウス副腎皮質腫瘍由来細胞株(Y-1)はヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入した。mutant CLA-1 cDNAを含む発現ベク

ターをマウス副腎皮質腫瘍由来細胞株(Y-1)にリポソーム法にて遺伝子導入し、CLA-1過剰発現stable cloneをG418の抵抗性にて樹立した。HDL結合性コレステロール非取込みクローンをDiI-HDLの取り込みを指標にして選択した。

### 2. 副腎ステロイドホルモン合成および細胞増殖能

ステロイドホルモン分泌能については、CLA-1過剰発現細胞にHDLを添加後、その培養液中のcorticosterone濃度をAmersham社のRIAキットにて測定した。CLA-1 mutant導入細胞の細胞増殖能について細胞数の測定、 $[^3\text{H}]$ -Thymidine uptake法で評価した。アポトーシスに関しては、annexin-V FITC stainおよびFACSにて検討した。さらにpropidium iodide(PI)法にてアポトーシスについて検討を加えた。

## C. 研究結果

### 1. 遺伝子変異型CLA-1発現副腎細胞の生物学的特性

C端の欠損変異CLA-1をY-1細胞(Decoy CLA-1)に遺伝子導入し、stable transformatを作成した。Decoy CLA-1導入細胞は、HDL結合性はmock細胞と比較して高いが、DiI-HDLからのコレステロールの取り込み能が有意に低下していた。CLA-1過剰発現細胞におけるステロイドホルモン産生能について検討した。遺伝子導入細胞にHDLを0-500  $\mu$ g/ml添加し24時間反応後、その培養液中のcorticosterone濃度をRIAにて測定した。図1に示すように、HDL非存在下ではmock細胞(Mock)と比較してステロイドホルモン産生が有意に低下していた。HDLを添加することによりCLA-1 mutant過剰発現細胞(Decoy CLA-1)の培養液中へのステロイドホルモン分泌はmock細胞と比較して有意に低下していた(図1)。一方、細胞増殖に及ぼす遺伝子変異型CLA-1(Decoy CLA-1)の影響について検討した。Decoy CLA-1発現細胞においては、明らかに細胞数の増加抑制が認められた(図2)。また $[^3\text{H}]$ -Thymidine uptakeで検討するとmock細胞においては、HDLの添加により $[^3\text{H}]$ -Thymidineの取り込みが亢進するが、Decoy CLA-1発現細胞においてはHDLの添加によっても $[^3\text{H}]$ -Thymidineの取り込みの亢進が認められなかった。さらにDecoy CLA-1遺伝子導入によるアポトーシス誘導作用についても検討をおこなった。Mock細胞と比較してDecoy CLA-1発現細胞においては、有意にアポトーシス細胞の割合が上昇していた。TNF- $\alpha$ はアポトーシスを誘導することで知られているが、HDLはTNF- $\alpha$ 作用に拮抗して抗アポトーシス作用があることが報告されている。そこでDecoy CLA-1細胞でのHDLのアポトーシス抑制効果

を検討した。Mock細胞ではTNF- $\alpha$ によりアポトーシスが誘導され、HDLの添加によりアポトーシスが抑制された。一方、Decoy CLA-1発現細胞では、TNF- $\alpha$ によりアポトーシスが誘導されるが、HDLによる抑制効果が認められなかった(図3)。

#### D. 考察

マウスSR-B1およびヒトCLA-1はステロイド産生組織で発現されており、特に副腎において強く発現されている。マウスにおいてはSR-B1のノックアウトマウスが作製されており、SR-B1ノックアウトマウスでは副腎におけるコレステロール含量が72%も低下することが報告された。またSR-B1に対する抗体でHDLとの結合を阻害すると副腎細胞からのステロイドホルモン合成が極端に低下することが報告されている。一方ACTHの投与によりマウス副腎におけるSR-B1の発現が増すことが報告されており、SR-B1およびCLA-1がステロイド合成に関与することが推定された。我々はCLA-1が副腎細胞にコレステロールを供給することにより、ステロイドホルモン合成に寄与することを報告してきた。今回の検討によって、HDLからのコレステロールの取り込みを抑制することにより、ステロイドホルモン合成が低下することからも裏付けられる。ステロイドホルモン合成が亢進している副腎皮質腫瘍でCLA-1の発現が増強されていることより、腫瘍による自立的なステロイドホルモン合成にCLA-1が関与することが考えられる。以前より、HDLの細胞増殖作用が指摘されていた。また最近の報告によるとSR-B1のC末端側に細胞内情報伝達機能が存在することが指摘されている。今回我々が作成したDecoy CLA-1はC-末端を欠いており、細胞内情報伝達を抑制する可能性が考えられた。細胞増殖の抑制、ア

ポトーシスの促進から考えると、C-末端を欠いたdecoy CLA-1は腫瘍の増殖に対しても抑制的に働くことが推定された。今後、このDecoy CLA-1を副腎腫瘍に遺伝子導入することで腫瘍からのステロイドホルモン分泌の抑制および腫瘍増殖の抑制を目的とした遺伝子治療を検討している。

#### E. 結論

ヒトHDL受容体CLA-1に変異を導入したDecoy CLA-1は、副腎細胞におけるステロイドホルモン合成の抑制および細胞増殖の抑制、アポトーシスの促進作用を示した。今後このDecoy CLA-1を遺伝子導入し、副腎腫瘍の新たな治療法を検討したい。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) The multiple endocrine neoplasia type 1 gene product, *menin*, inhibits the human prolactin promoter activity.: Namihira H., Sato M., Murao K., Cao WM., Matsubara S., Imachi H., Niimi M., Dobashi H., Wong NC., Ishida T.: *J Mol Endocrinol* 2002; 29: 297-304.

2) The multiple endocrine neoplasia type 1 gene product, *menin*, inhibits insulin production in rat insulinoma cells.: Sayo Y., Murao K., Imachi H., Cao WM., Sato M., Dobashi H., Wong NC., Ishida T.: *Endocrinology* 2002; 143: 2437-2440.

3) Central administration of neuromedin U activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brainstem.: Niimi M., Murao K., Taminato T.: *Endocrine* 2002; 16: 201-206.

4) Expression of human scavenger receptor BI on and in human platelets: Imachi H., Murao K., Cao WM., Tada S., Taminato T., Wong NCW., Takahara J., Ishida T.:

*Arterioscler Thromb Vasc Biol* (in press)

##### 2. 学会発表

1) PREB Regulates the Insulin Transcription in Response to Glucose.: S. Ohtsuka, K. Murao, WM. Cao, Y. Sayo, H. Imachi, C. Bancroft, T. Ishida.: American Diabetes Association, 62nd Scientific Sessions, 2002, 6; San Francisco, USA.

2) The Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent Kinase Type IV is involved in the glucose-induced glucokinase transcription in INS-1 cells.: Y. Sayo, K. Murao, WM. Cao, S. Ohtsuka, H. Tokumitsu, H. Imachi, H. Hosakawa, M. Sato, T. Ishida.: American Diabetes Association, 62nd Scientific Sessions, 2002, 6, San Francisco, USA.

3) Gas6 Enhance the Transcription of Endothelial Nitric Oxide Synthase via Activation of PI3K-Akt/PKB Pathway.: WM. Cao, K. Murao, H. Imachi, H. Abe, T. Ishida.: 2002, 11. Koushu, China.

#### H. 知的所有権の所得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

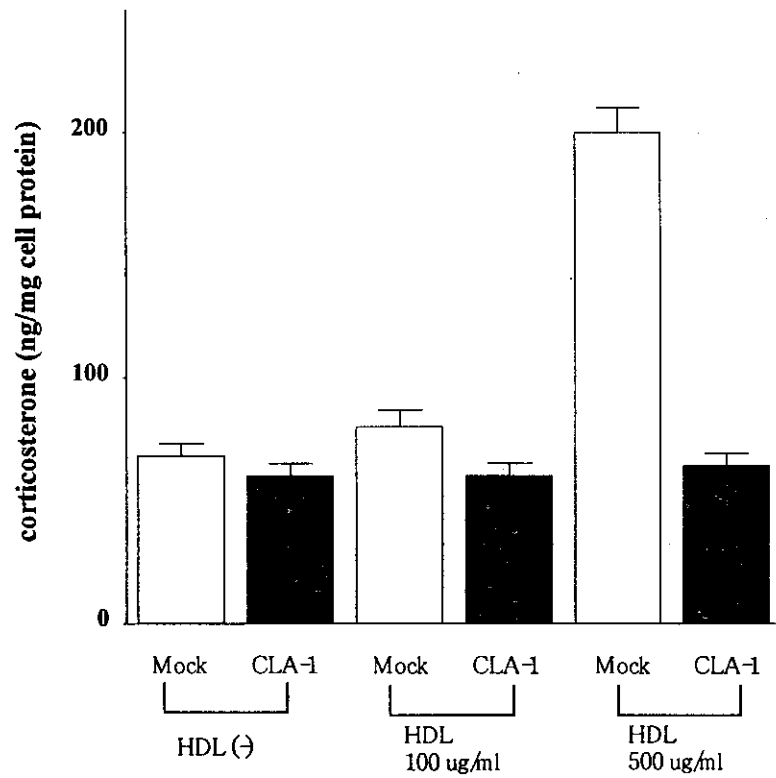


図1 ステロイドホルモン合成に及ぼすDecoy CLA-1の影響  
 mock; mock transfected cells, CLA-1; decoy CLA-1 transfected cells

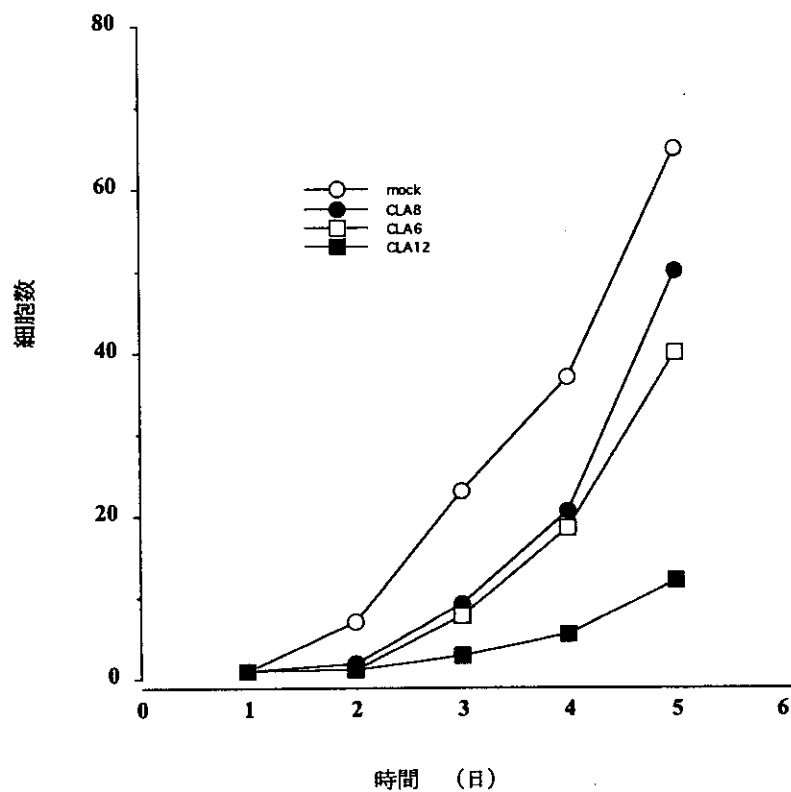


図2 細胞増殖に及ぼすDecoy CLA-1の影響  
 mock: mock transfected cells, CLA8, 6, 12; decoy CLA-1 transfected clones

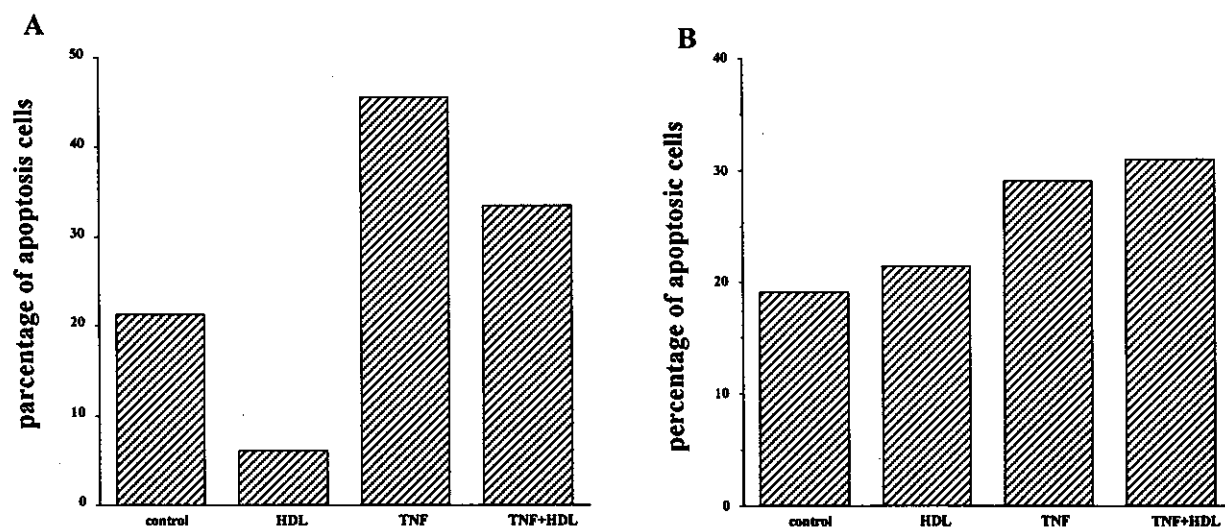


図3 アポトーシスに及ぼすDecoy CLA-1の影響  
 A) mock transfected cells, B) decoy CLA-1 transfected cells  
 TNF; TNF  $\alpha$  10ng/ml, HDL; 500 ug/ml HDL

## 副腎偶発腫の長期疫学調査集計報告

一城 貴政、山本 奈津子、薬師寺 史厚、上芝 元、宮地 幸隆  
東邦大学医学部第一内科

### 研究要旨

副腎偶発腫は副腎疾患の中で最も多い疾患で、近年の健康診断の普及および腹部CTなどの画像診断技術向上により発見されることが多くなってきている。しかしながら、詳細な疫学調査およびそれによる治療指針は未だに確立されていない。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」では、大学病院を含む計1014病院に調査表を送付し、3年間の持続的な疫学調査を施行し、副腎偶発腫の診療指針の確立を目指した。ここに平成11年度から13年度までの3年間に報告を受けた2864例の、副腎偶発腫について年齢、大きさ、診断方法、症状、ホルモンデータ、それらの変化などの解析結果を報告する。

### A. 研究目的

近年、本邦でも副腎偶発腫の発見頻度は確実に増加しているが、その詳細な疫学調査や治療指針は未だ確立されていない。本研究班は、3年間の持続的な疫学調査を施行し、副腎偶発腫の診療指針の確立を検討した。

### B. 研究方法

副腎偶発腫を「副腎に腫瘍が、超音波、CT、MRIなどにより偶然に発見された時、それらの腫瘍を総称して副腎偶発腫という（臨床症状の有無、糖尿病および高血圧の合併の有無は問わない）」と定義し、平成11年度に、全国の大学病院、200床以上の高度専門医療機関および地域中核病院の1014施設にアンケート形式の調査票(図1)を送付し、副腎偶発腫瘍の持続的な全国調査を開始した。初年度に2576例の報告があったが、その中で症状と一般検査より明らかに副腎偶発腫ではないと考えられる470例を除き、2016例について分析を行った。2年目も同様に、この2016例の追跡調査を実施

するとともに、新規症例の報告を受け、新規症例から再度副腎偶発腫と考えられない症例を除き2493例を、更に3年目も2493例の追跡調査とともに新規症例より11症例を除外し最終的に新規症例を含め2864例の報告をもとに、今回の集計解析を行った。

病因についての疫学は、手術症例で病理学的検討が行われているものについてはその所見により、また経過観察症例については臨床所見およびホルモンデータより病因を決定した。

副腎偶発腫の経時的観察データは2年以上の経過観察期間があった786例について解析を行った。

統計学的データは平均±SDで表し、有意差検定はt検定を用いた。

### C. 研究結果

#### 1. 患者背景

報告を受けた2864例の背景は、男性1477例(51.4%)、女性1332例(46.3%)であった。平均年齢は58.0±13.0歳(4~92歳)で、60歳代後半の症例数が最

も多く、性差はなかった。腫瘍側は右973例(45.2%)、左1032例(48.0%)、両側147例(6.8%)で左右差はなかった。腫瘍の診断法は腹部CTが1942例(68.6%)で大多数を占め、腹部超音波765例(27.0%)が次いでいた。平均腫瘍径は $3.0 \pm 2.1$ cm(0.5~20cm)であったが、症例数では直径1.1cm以上2cm未満のものが最も多く、次いで直径2.1cm以上3cm未満の症例であった。

発見の契機としては、無症状でドックなどの検診で発見される症例が40%で最も多く、腹部症状の精査によって発見される症例が23%で次いでいた。

## 2. 病因

病因の報告があった2626例の病因別頻度では、ホルモン非産生腺腫が51.0%と半数以上を占め、subclinical Cushing症候群を含むコルチゾール産生腺腫が8.9%、褐色細胞腫が8.5%であった。次いでアルドステロン産生腺腫が4.2%で、副腎皮質腺腫全体では65.0%に達した。また副腎癌は39例で全体の1.4%を占めていた。

## 3. 平均年齢

前述のごとく、全体の平均年齢は $58.0 \pm 13.0$ 歳であるが、病因と年齢の両方が報告されていた2683例での検討では、コルチゾール産生腺腫( $P < 5 \times 10^{-8}$ )アルドステロン産生腺腫( $P < 5 \times 10^{-11}$ )、アンドロゲン産生腺腫( $P < 0.0001$ )などのホルモン産生腺腫はホルモン非産生腺腫に比べ若年症例が多く、逆に悪性腫瘍の転移はより高齢の症例が多かった( $P < 0.0005$ )。一方、副腎癌では明らかな傾向は認められなかった。

## 4. 性別

上述のごとく全症例中の男女比は性

別の報告があった2808例中、男性51.4%、女性46.3%であった。また各病因別の検討では、ホルモン非産生腺腫(男性54.3%、女性44.4%)、副腎癌(男性48.7%、女性51.3%)および褐色細胞腫(男性53.9%、女性43.7%)とともに男女比はほぼ同じであった。一方、コルチゾール産生腺腫(男性29.4%、女性68.6%)、アルドステロン産生腺腫(男性39.7%、女性59.5%)およびアンドロゲン産生腺腫(男性42.9%、女性57.1%)といったホルモン産生腺腫は女性に多く、逆に嚢胞(男性45.6%、女性26.5%)および悪性腫瘍の転移(男性67.6%、女性30.6%)は男性例に多かった。

## 5. 診断時腫瘍径

腫瘍径の報告があった2527例の検討では、前述のごとく全症例の平均値は $3.0 \pm 2.1$ cm(平均 $\pm$ SD)であった。これと比較すると、ホルモン非産生腺腫では $2.37 \pm 1.19$ cmでアルドステロン産生腺腫では $2.03 \pm 1.02$ cmであり、有意に小さい傾向があった( $P < 0.05$ )。一方、アンドロゲン産生腺腫では $4.83 \pm 4.61$ cm、癌では $8.49 \pm 4.32$ cm、褐色細胞腫では $4.47 \pm 2.42$ cm、骨髓脂肪腫では $5.02 \pm 2.79$ cm、また悪性腫瘍の転移では $4.36 \pm 2.91$ cmで有意に大きい傾向があった( $P < 0.05$ )。

## 6. 腫瘍径変化

1年以上の経過観察期間があった786例の腫瘍径変化の検討では、281例(36.0%)が増大、148例(19.0%)が縮小、352例(45.1%)が変化がなかった。病因別に検討すると、ホルモン非産生腺腫では548例中189例(34.5%)が増大し、94例(17.2%)が縮小し、265例(48.4%)が変化がなかった。コルチゾール産生腺腫ではホルモン非産生腺



腫と類似の傾向が見られたが、アルドステロン産生腺腫では10例中2例(20%)が増大し、2例(20%)が縮小し、6例(60%)が変化を示さなかった。一方、癌では5例中3例が増大、残りの2例が変化なく、縮小を示したものはなかった。また悪性腫瘍の転移では21例中増大したものが15例(71.4%)、縮小したものが2例(9.5%)、変化なかったものが4例(19.0%)であった。

#### 7. 手術率

手術の有無について報告があった2757例中両側または片側の副腎摘除術や腫瘍切除術など何らかの外科的処置を受けた症例は1298例(47.1%)であった。各病因別に検討すると、9例全例が手術を受けたアンドロゲン産生腺腫をはじめ、コルチゾール産生腺腫では253例中183例(72.3%)、アルドステロン産生腺腫では118例中90例(76.3%)、また褐色細胞腫では238例中205例(86.1%)といずれも70%以上の症例が手術を受けていた。また副腎癌では39例中27例(69.2%)が手術を受けていた。一方、ホルモン非産生腺腫では1412例中手術例は422例(29.9%)で、過形成では114例中74例(64.9%)が手術を受けていた。

#### 8. ホルモン非産生腺腫および癌の主要なホルモン値

診断時におけるホルモン非産生腺腫および副腎癌の血清コルチゾール、アルドステロン、DHEA-S、尿中17-OHCS、17-KSについて比較した。血清コルチゾール、アルドステロンについては両者で有意差はなかった。一方、ホルモン非産生腺腫と副腎癌の血清DHEA-Sは $578.8 \pm 483.6 \text{ ng/ml}$ と $2117.0 \pm 2651.1 \text{ ng/ml}$  ( $P < 0.00001$ )、尿中17-OHCSは $6.01 \pm 6.28 \text{ mg/日}$ と $21.30 \pm$

$42.84 \text{ mg/日}$  ( $P < 0.001$ )、尿中17-KSは $4.31 \pm 2.28 \text{ mg/日}$ と $14.69 \pm 16.58 \text{ mg/日}$  ( $P < 0.005$ )で有意差が認められた。

#### 9. ホルモン非産生腺腫患者の主要なホルモン変化

1年以上の経過観察期間があったホルモン非産生腺腫616例のコルチゾール、アルドステロン、DHEA-Sといった副腎皮質ステロイドホルモンにおけるこれらホルモン値の変化について検討を行った。ここでは、基礎値の1.5倍以上の増加を「増加」、基礎値の半分以下の低下を「減少」、それ以外を変化なしと判断した。コルチゾールは302例中増加した症例が12例(4.0%)、減少した症例が3例(1.0%)、変化のなかった症例が246例(95.0%)であった。アルドステロンでは276例中増加した症例が24例(8.7%)、減少した症例が1例(0.4%)、変化のなかった症例が276例(90.9%)であった。DHEA-Sにおいては38例全例で変化がなかった。

#### 10. 腫瘍径カットオフ値による癌の鑑別

副腎偶発腫から副腎癌を鑑別する際の様々な腫瘍径カットオフ値での感度と特異度を検討した。これら感度と特異度を表す曲線は腫瘍径が4.8cmの点で交差した。

#### D. 考察

諸外国の報告によると、一般に臨床的に診断されたホルモン産生性副腎腫瘍は非常に稀であるが、非機能性副腎腫瘍は30人に1人が有しており、剖検例の検討では1.4~8.7%の症例に副腎腫瘍が見つかったと報告されている。さらに腹部CTでは0.6~5.0%の症例に副腎腫瘍が見つかる。また、年齢別に見た副腎偶発腫瘍の有病率は加齢と共に増加している。

今回、我々の集計による2864例の患者背

景は、副腎偶発腫の平均年齢は58.0歳で、性差はなく、また腫瘍側は左右ほぼ同等で、腫瘍径の平均は3.0cmで既報のものとはほぼ同等であった。診断法では、CTでの発見が7割近くを占め、これは本邦では比較的CTが普及していることと、副腎描出には超音波よりもCTの方が手技的に簡便であるためと考えられる。

副腎偶発腫の中で、もっとも鑑別の重要な疾患は副腎癌である。一般人口における発症率は10万人に3人にすぎないが、我々の統計では副腎偶発腫に占める割合は1000人に15人を占め、副腎偶発腫に占める副腎癌の割合は一般人口に占める割合の5000倍となっている。我々の統計では、ホルモン非産生腺腫が全副腎偶発腫の半数以上を占め、subclinical Cushing症候群を含むコルチゾール産生腺腫が8.9%で、腺腫全体では65%に及んだ。また、褐色細胞腫が8.5%で次いだ。各病因での性差を検討すると、ホルモン非産生腺腫および副腎皮質癌は、発症頻度に性差はなかったが、ホルモン産生腺腫は女性に多い傾向が認められた。これは女性の方が男性兆候などの臨床症状が出やすい為に、発見されやすいことも一因と考えられる。また各病因での年齢分布をみると、コルチゾール産生腺腫、アルドステロン産生腺腫およびアンドロゲン産生腺腫はより若年で、悪性腫瘍の転移はより高齢で発見される傾向があった。これは、臨床症状が出やすいものほど若年で発見され、また悪性腫瘍は高齢者に多いことを反映していると考えられる。

1年以上の観察期間があった786例の腫瘍径の変化を検討すると、全症例では半数近くが変化せず、ホルモン非産生腺腫でも約半数が大きさに変化はなかった。さらに、症例数は少ないがアルドステロン産生腺腫では6割が変化を示さなかった。一方、副腎皮質癌では縮小したものはなく、

6割が増大を示した。さらに悪性腫瘍の転移では7割以上が増大傾向を示した。手術率は全体では47.1%であったが、ホルモン非産生腺腫では29.9%と少なく、コルチゾールやアルドステロンといったホルモン産生腫瘍では72%以上、さらに褐色細胞腫では86.1%と高率で、副腎癌は69.2%であった。これはホルモン産生腺腫や褐色細胞腫では臨床症状を呈することが多いために手術率が高値となっていると考えられ、逆に副腎癌では発見時に既に進行癌であることが多く、手術不可能症例が比較的多いため7割程度にとどまっていると考えられる。

ホルモン非産生腺腫と副腎癌の主要なホルモンの比較では、副腎癌において血中DHEA-S、尿中17-OHCSおよび尿中17-KSが有意に高値を示した。DHEA-Sおよび尿中17-KSはアンドロゲン代謝産物であり、副腎癌で高値を示すことは広く知られており、我々の結果もそれを示唆するものであった。しかし、血清コルチゾールに有意差がないにもかかわらず、その代謝産物である尿中17-OHCSのみ有意差が出ることは興味深いことである。これは血清コルチゾール測定の採血は多くの施設で早朝空腹時に施行されており、そのため日内変動のうち比較的高値を示す時間に採血が行われていると考えられ、こういった状況下ではホルモン非産生腺腫と副腎癌の間に有意さはないためと考えられる。一方、尿中17-OHCSは1日蓄尿検体により測定されていることが多いため日内変動は反映されず、1日の総産生量を示す。副腎癌では日内変動が消失しており常にコルチゾール産生が行われているのに対し、ホルモン非産生腺腫では午後から夜間にかけて産生量が低下し、この低下した時間帯の産生量の変化が1日産生量としての差に反映されたための結果と考えられる。

1年以上の経過観察期間があり、コルチゾール、アルドステロン、DHEA-Sの値の報告があったホルモン非産生腺腫におけるホルモン産生能獲得性についての検討では、それぞれコルチゾールが4.0%、アルドステロンで8.7%の症例で増加を示した。コルチゾールは心理的要因での、アルドステロンは安静状態による変動が大きいことから、ここでのデータをそのままホルモン非産生腺腫のホルモン産生能獲得と判断できない。しかしながら、少なくともホルモン非産生腺腫と診断された症例においても、その経過中にコルチゾール産生腺腫コルチゾールやアルドステロン産生腺腫となる可能性が数%の症例であることは留意しておく必要がある。

腫瘍の大きさにより副腎腫瘍の良悪性の鑑別を行うためのカットオフ値の検討では、その感度および特異度が4.8cmの点で交差することより、5cmとするのが最適と考えられた。しかしながら、実際に手術適応を決定するには、腫瘍径が1cmの副腎癌も報告されており、画像所見なども含め総合的に判断する必要があると考えられる。さらに特異度は低くなるが、わずかであっても副腎癌の可能性が存在するのであれば、悪性疾患である以上早期治療は絶対条件であり、積極的に副腎摘出を行うことは必ずしも間違いではなく、この問題に対しては更なる検討が必要である。

副腎偶発腫の中で、もっとも鑑別の重要な疾患は副腎癌である。副腎癌は、平均生存期間が約18ヶ月で5年生存率はわずか15%といわれている。一般人口における発症率は10万人に3人にすぎないが、我々の統計では、副腎偶発腫症例では1.5%を占めている。副腎偶発腫より副腎癌を効率よく鑑別するのが最も重要で、次回3年目の調査によって副腎偶発腫のさらに詳細な実体の判明とそれに基づいた診療・治療指針の

確立を期待する。

## E. 結論

副腎偶発腫の中で、もっとも鑑別の重要な疾患は副腎癌で、この副腎癌を鑑別するために今回の解析により以下の点が重要であることが判明した。

1. 報告を受けた副腎偶発腫患者2864例の男女比はほぼ同等で、平均年齢は58.0歳、腫瘍側も左右ほぼ同率であった。
2. 病因の報告があった2626例の病因別頻度は、ホルモン非産生腺腫が半数以上を占め、コルチゾール産生腺腫および褐色細胞腫がほぼ同等でそれに次ぎ、副腎皮質腺腫全体では65%に達した。一方、副腎癌は1.4%を占めた。
3. 病因と年齢の両方が報告されていた2683例では、副腎癌では年齢分布に明らかな特徴はないが、コルチゾール産生腺腫、アルドステロン産生腺腫およびアンドロゲン産生腺腫はホルモン非産生腺腫より若年発症が多く、悪性腫瘍の転移は逆に高齢症例が多かった。
4. 性別の報告があった2808例での病因ごとの男女比では、コルチゾール産生腺腫、アルドステロン産生腺腫およびアンドロゲン産生腺腫は女性に多く、嚢胞および悪性腫瘍の転移は男性に多かった。
5. 腫瘍径の報告があった2526例では、全症例の腫瘍径の平均値は3.0cmであったが、これに比較してホルモン非産生腺腫およびアルドステロン産生腺腫では小さく、アンドロゲン産生腺腫、副腎癌、褐色細胞腫、骨髄脂肪腫および悪性腫瘍の転移では大きかった。
6. 1年以上の経過観察期間があった786例の腫瘍径の変化は、各病因ごとの増大した症例の割合はそれぞれ、ホルモン非産生腺腫およびコルチゾール産生腺

腫は約3割、アルドステロン産生腺腫は2割、副腎癌では6割、悪性腫瘍の転移では約7割であった。

7. 手術の有無について報告があった2757例の病因ごとの手術率は、コルチゾール産生腺腫、アルドステロン産生腺腫、アンドロゲン産生腺腫、褐色細胞腫および癌では7割以上で、ホルモン非産生腺腫では約3割であった。
8. DHEA-S、尿中17-KSが癌の症例で有意に高値を示しており、またコルチゾールは両者で有意差がないのに対し、尿中17-OHCSは有意に高値を示していた。
9. 主要なホルモン値について1年以上の経過観察期間のあったホルモン非産生腺腫で各ホルモン増加を認めた症例の割合は、コルチゾール4.0%、アルドステロン8.7%であった。DHEA-Sは38例全例で変化がなかった。
10. 平均腫瘍径は3.0cmであったが、腫瘍径による副腎癌鑑別のカットオフ値は5cmとするのが最適であると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 上芝元、薬師寺史厚、宮地幸隆；副腎偶発腫の疫学；厚生労働省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年度報告書、2001年5月。
- 2) 一城貴政、薬師寺史厚、上芝元、宮地幸隆；副腎偶発腫の長期疫学調査集計報告；厚生労働省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12年度報告書、2002年5月。
- 3) 一城貴政、薬師寺史厚、上芝元、宮地幸隆；日本における副腎偶発腫の疫学調査-2年間の調査結果報告-；ホルモンと臨床、2002年12月。
- 4) 一城貴政、山本奈津子、宮地幸隆；高齢期に見られるIncidentalomaの対策-副腎腫

瘍-；総合臨床；2003年2月。

5) 一城貴政；本邦における3年間の継続的副腎偶発腫疫学調査；Medical Tribune；2003年4月。

### 2. 学会発表

- 1) 一城貴政、薬師寺史厚、上芝元、宮地幸隆；日本における副腎偶発腫瘍の疫学と予後；第9回ステロイドホルモン学会、東京、2001年11月。
- 2) 一城貴政、薬師寺史厚、上芝元、宮地幸隆；日本における副腎偶発腫瘍の疫学と予後；厚生労働省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13年度公開講座、東京、2001年11月。
- 3) Miyachi Y., Ichijo T., Yakushiji F., Ueshiba H.: A Survey of Adrenal Incidentaloma in Japan; NIH Consensus Conference, 2002.2.
- 4) Ichijo T., Yakushiji F., Ueshiba H., Miyachi Y.: A Survey of Adrenal Incidentaloma in Japan; 83rd Annual Meeting of Endocrinology, San Francisco CA USA 2002.6.
- 5) 一城貴政、薬師寺史厚、上芝元、宮地幸隆；副腎偶発腫瘍全国調査の報告；厚生労働省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14年度公開講座、東京、2002年12月。
- 6) 一城貴政、山本奈津子、薬師寺史厚、上芝元、宮地幸隆；本邦における3年間の継続的副腎偶発腫疫学調査；第13回臨床内分泌代謝update；東京、2003年3月。

## G. 知的所有権の取得状況

なし