

図 2

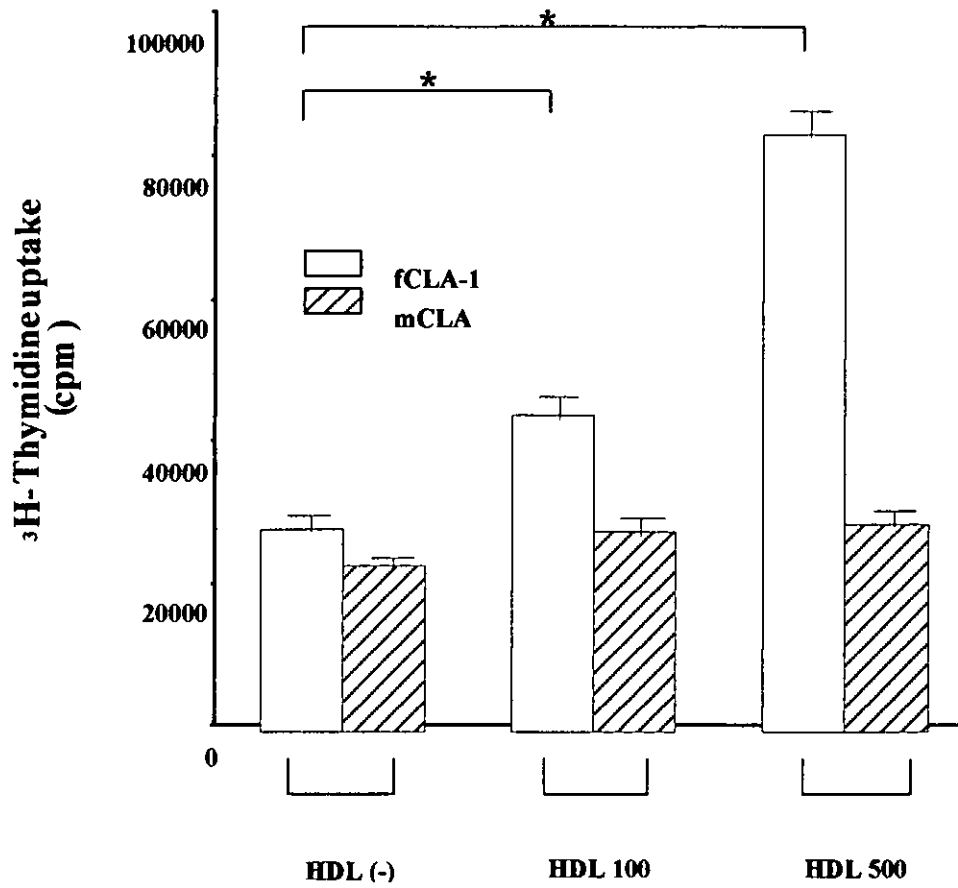
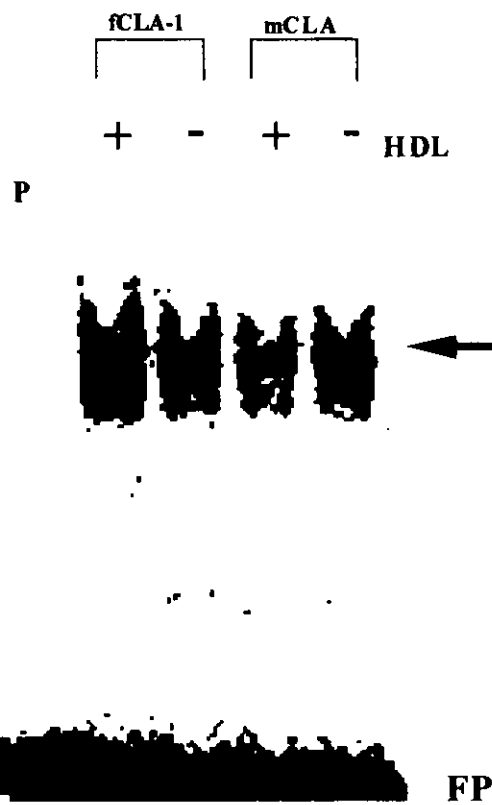
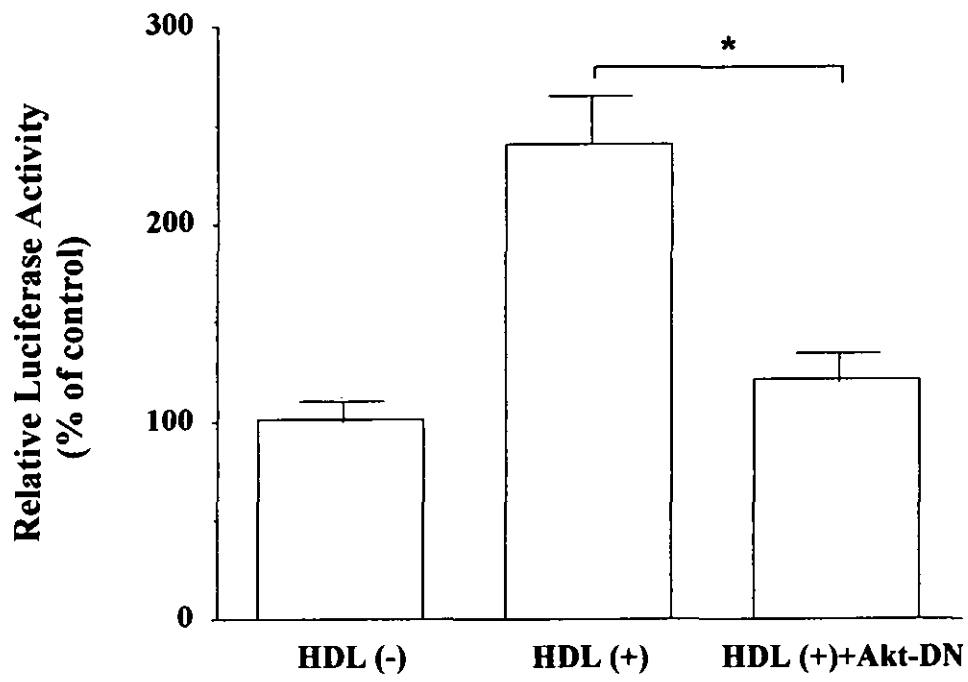


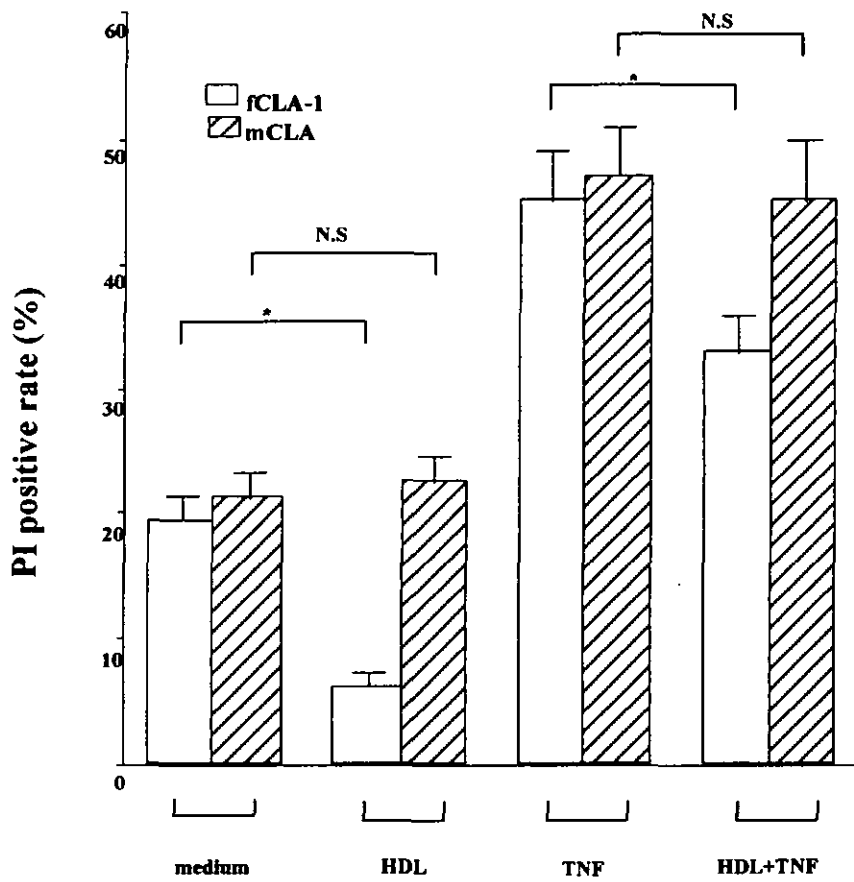
図 3



☒ 4



☒ 5



(2) 原発性アルドステロン症

アルドステロン産生における COUP - TF および SF - 1 / Ad4BP の機能解析

柴田洋孝^{1, 2}、栗原 勲²、小林佐紀子²、須田徳子²、横田健一²、池田やよい³、
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、同医学部内科²、
横浜市立大学大学院医学研究科微細形態学³

研究要旨

ミネラルコルチコイドであるアルドステロンは、アルドステロン合成酵素 P450ald0 (CYP11B2) は副腎皮質球状層に特異的に発現するために、同部位で特異的に産生される。ヒト CYP11B2 遺伝子のプロモーター領域には数カ所の cis-element が見いだされており、中でも -129/-114 (Ad5) 領域には核内受容体 COUP - TF および SF - 1 / Ad4BP が相互拮抗的に結合することを見いだした。ヒト H295R 細胞を用いた Transfection assay では、COUP - TF は用量依存性に CYP11B2 プロモーター活性を増加させ、SF - 1 は反対に減少させた。そこで、COUP - TFI - interacting proteins を副腎皮質腺腫 cDNA ライブラリーより yeast two-hybrid system により SUMO 化酵素 Ubc9 および PIAS 1 の同定に成功した。これらは副腎皮質の球状層および束状層の外層に高発現を認めた。H295R 細胞を用いた Transfection assay では、Ubc9 および PIAS1 は、COUP - TFI による転写を増強する coactivator として機能した。一方、これらの SUMO 化活性欠失変異体を用いた実験では、野生型と同程度に coactivator として機能したことから、SUMO 化活性と COUP - TFI の coactivator 機能は独立した機能であることが示唆された。

A. 研究目的

昨年度までの検討で、核内受容体 COUP - TF は副腎皮質におけるステロイド産生調節に重要な転写因子であり、COUP - TFI - interacting protein として同定された SUMO 化結合酵素 Ubc9 は、CYP17 遺伝子の転写を COUP - TFI と共に抑制する新規 corepressor 蛋白であることを明らかとした。本年度は、スクリーニングで新たに同定した PIAS 1 と Ubc9 が COUP - TFI と共に、副腎ステロイド産生に果たす役割を検討することを目的とした。そこで、まず初めに副腎皮質における Ubc9, PIAS1, COUP - TF の発現を免疫組織化学において解析し、次にそれらの結果に基づいて CYP11B2 遺

伝子の転写調節における機能解析を行った。

B. 研究方法

1) yeast two - hybrid system による Ubc9, PIAS1 のクローニング

COUP - TFI (amino acids 55-423) を Gal4 DNA - binding domain との融合蛋白として、一方副腎皮質腫瘍 cDNA library を Gal5 activation domain との融合蛋白として酵母 AH109 cell に発現させ、アミノ酸要求性を利用して蛋白 - 蛋白相互作用するクローンをスクリーニングする (MatchMaker version 3, Clontech 社)。検出したクローンとの相互作用は、 β - galactosidase liquid assay

により定量的に評価する。

2) 免疫共沈降法

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。

3) 免疫組織化学

ラット副腎と用いて、Ubc9, PIAS1, (Santa Cruz Biotechnology), COUP - TF 抗体(Ming-Jer Tsai教授より供与)を用いて局在を検討した。

4) Transient transfection assay

Human CYP11B2 Ad5 (-1521/+2) -Luc のレポーターを用いて、COUP - TFI, Ubc9, PIAS1や Ubc9(C93S), PIAS1(C351S) を一過性に発現させて、レポーター活性を検討した。

C. 研究結果

1) COUP-TFI-interacting protein としての Ubc9および PIAS1の同定

Yeast two-hybrid system により、副腎皮質腺腫 cDNA ライブラリーから COUP-TFI (aa 55-423) と Ubc9および PIAS1が特異的に蛋白-蛋白相互作用を有することが示された。

2) Ubc9および PIAS1と COUP-TFI の蛋白-蛋白相互作用の確認と細胞内局在の検討

COS -1 cell に COUP - TFI, Ubc9, PIAS1を Transient transfection 法で発現させ、免疫共沈降法により検討した結果、COUP-TFI, Ubc9, PIAS1は複合体を形成していることが示された (図 1)。さらに、EGFP-Ubc9, EGFP-PIAS1, DsRed-COUP-TFI の蛍光色素融合蛋白として発現させたところ、COUP-TFI, Ubc9, PIAS1は核内で共在していること

が示された (図 1)。

3) 副腎における Ubc9, PIAS1, COUP-TF の発現

ラット副腎 (8 週齢、雄 Sprague - Dawley rat) を用いて免疫組織化学にて Ubc9, PIAS1, COUP-TF の発現を検討した結果、Ubc9, PIAS1は球状層に特異的に発現を認めた。一方、COUP-TF は副腎皮質 3 層すべての細胞の核に発現を認めた (図 2)。

4) CYP11B2レポーターアッセイ

ヒト副腎皮質 H295R 細胞に発現プラスミドを導入して、Human CYP11B2 Ad5 (-1320/+2) -Luc 活性を検討した。その結果、COUP-TFI は用量依存性に CYP11B2転写活性を増加させ、Ubc9, PIAS1はそれをさらに増強する coactivator として機能した (図 3)。また、Ubc9+ PIAS1を同時に発現させると相乗的に転写を増強した (図 3)。また、Ubc9, PIAS1の SUMO 化活性欠失変異体である Ubc9(C93S), PIAS1(C351S) を発現させた時は、野生型と同様の coactivation を認めた (data not shown)。

Human CYP11B2 Ad5 - Luc および Ad5 配列のみを変異させた human CYP11B2 mutAd5-Luc の 2 種類のレポーターを用いて、 10^{-6} M angiotensin II や 20mM KCl 処置をしたところ、angiotensin II や KCl 刺激により Ad5 - Luc 活性は著明に増加したが、mutAd5 - Luc 活性は刺激前値が野生型レポーターより低下し、また刺激後も増加を認めなかった。以上の結果より、angiotensin II や K 刺激によるアルドステロン産生には、CYP11B2 遺伝子の Ad5 配列が不可欠であることが示された。

D. 考察

今回の研究結果より、核内受容体 COUP-TFI の新規 coactivator として Ubc9, PIAS1 の同定に成功し、これらの蛋白は COUP-TFI と複合体を形成して、human CYP11B2 遺伝子プロモーターの Ad5(-129/-1144) 配列に結合することにより転写活性化に働いていることが示された。また生理学的なアルドステロン産生刺激である angiotensin II, K などの作用発現には、この cis-element の Ad 5 配列が不可欠であることが示された。

副腎における免疫組織化学の結果より、ラット副腎では、Ubc9, PIAS1 は主に球状層に特異的に発現を認めた。したがって、アルドステロン産生との強い関連が示唆された。しかし、無処置のラット副腎球状層において既に Ubc9, PIAS1 の強い発現が確認されることから、angiotensin II, K 刺激による発現の誘導は否定的と考えられた。

また、Ubc9, PIAS1 は SUMO 化に関わる E2, E2 酵素であることから、SUMO 化活性と COUP-TFI coactivator の関連が示唆されたが、Ubc9, PIAS1 の SUMO 化活性欠失変異体を用いた実験結果より、SUMO 化活性と COUP-TFI coactivator としての機能は独立していることが示された。しかし、COUP-TFI またはそれに結合する蛋白が Ubc9, PIAS1 により SUMO 化修飾される可能性はあり、実際に文献でも HDAC やヒストン蛋白が SUMO 化されるとの報告もあり、今後の検討が必要と考えられた。

さらに、今後は動物種による COUP-TFI, Ubc9, PIAS1 の発現プロファイルや、ヒト副腎皮質腫瘍における発現を明らかにすることが必要と考えられた。

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、アルドステロン合成酵素 CYP11B2 遺伝子の転写を活性化する activator であることが示された。また、SUMO 化酵素 Ubc9 および PIAS1 は COUP-TFI と複合体を形成することにより、CYP11B2 の転写を増強する coactivator であることが示された。さらに、COUP-TFI coactivator 機能と SUMO 化活性とは独立していることも示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) H. Shibata, I. Kurihara, S. Kobayashi, K. Yokota, N. Suda, I. Saito, T. Saruta. Regulation of differential COUP-TF-coregulator interactions in adrenal cortical steroidogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 85: 449-456, 2003.

2) S. Kobayashi, H. Shibata, I. Kurihara, K. Yokota, N. Suda, I. Saito, T. Saruta. Ubc9 interacts with chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I and represses receptor-dependent transcription. *J. Mol. Endocrinol.* 32: 69-86, 2004.

3) 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 17α -水酸化酵素 CYP17 遺伝子転写調節 ホルモンと臨床 51 (増刊号): 192-202, 2003.

4) 柴田洋孝. 11β -HSD と病態—原発性アルドステロン症 ホルモンと臨床 51: 71-77, 2003.

5) 佐藤敦久、柴田洋孝、猿田享男. アルド

ステロンのエスケープを認めた糖尿病性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 ホルモンと臨床 51 (増刊号) : 92-95, 2003.

6) 柴田洋孝、齊藤郁夫. 大規模臨床試験 SCOPE 臨床高血圧 9 : 48-49, 2003.

7) 柴田洋孝、栗原 勲、鈴木利彦、小林佐紀子、横田健一、須田徳子、林 松彦、齊藤郁夫、猿田享男. 原発性アルドステロン症の診断における ACTH 負荷副腎静脈サンプリング法の適応、意義および評価基準 東京女子医科大学雑誌 73 : 463-469, 2003.

8) 柴田洋孝. 内分泌領域の病態モデル—遺伝子操作動物の開発による新展開— 遺伝子改変動物を用いた副腎皮質の発生・増殖 : ステロイド産生因子の機能解析 ホルモンと臨床 51 (10) : 45-51, 2003.

2. 学会発表

1) 第26回日本医学会総会シンポジウム「脂溶性シグナル分子と分子細胞医学」
副腎ステロイド産生における核内オーファン受容体
柴田 洋孝、齊藤 郁夫、猿田 享男

2) 第26回日本医学会総会シンポジウム「内分泌疾患の克服」
内分泌性血圧異常の診断と治療
猿田 享男、柴田 洋孝

3) 第76回日本内分泌学会総会 (2003年、横浜)
SUMO 化酵素 Ubc9 および PIAS-1 の副腎における発現・機能に関する検討
柴田 洋孝、池田やよい、栗原 勲、小林佐紀子、横田 健一、齊藤 郁夫、猿田 享男

4) 第76回日本内分泌学会総会 (2003年、横浜)
核内受容体 COUP-TFI と相互作用する SUMO-1 結合酵素 Ubc 9 の機能解析
小林佐紀子、柴田 洋孝、栗原 勲、横田健一、齊藤 郁夫、猿田 享男

5) 第76回日本内分泌学会総会 (2003年、横

浜)
SUMO-1 リガーゼ PIAS-1 を介した核内受容体 COUP-TFI の転写制御機構
栗原 勲、柴田 洋孝、小林佐紀子、横田健一、齊藤 郁夫、猿田 享男

6) 第76回日本内分泌学会総会 (2003年、横浜)
ユビキチン依存性蛋白質分解によるミネラルコルチコイド受容体の転写制御機構
横田 健一、柴田 洋孝、栗原 勲、小林佐紀子、齊藤 郁夫、猿田 享男

7) 第76回日本内分泌学会総会 (2003年、横浜)
コルチゾールおよびデオキシコルチコステロンの過剰産生を認めた ACTH 非依存性大結節性過形成 (AIMAH) によるクッシング症候群の一例
柴田 洋孝、栗原 勲、小林佐紀子、横田健一、多田由布子、市原淳弘、今福 俊夫、本間 桂子、笹野 公伸、齊藤 郁夫、林松彦、猿田 享男

8) 第46回日本腎臓学会学術総会 (2003年、東京)
プロテアソーム依存性蛋白質分解によるミネラルコルチコイド受容体の転写制御機構
横田 健一、柴田 洋孝、栗原 勲、小林佐紀子、齊藤 郁夫、猿田 享男

9) The Endocrine Society's 85th Annual Meeting (Philadelphia, U. S. A.)
The SUMOylation enzymes Ubc9 and PIAS-1 cooperatively function as coactivators for COUP-TFI-mediated human CYP11B 2 gene transcription.
I. Kurihara, H. Shibata, S. Kobayashi, Y. Ikeda, K. Yokota, I. Saito, W. E. Rainey, P. White, T. Saruta.

10) The Endocrine Society's 85th Annual Meeting (Philadelphia, U. S. A.)
The SUMO-1 conjugating enzyme Ubc 9 can function as a bifunctional COUP-TFI-interacting protein with both coactivator and corepressor functions.
S. Kobayashi, H. Shibata, I. Kurihara, K. Yokota, I. Saito, T. Saruta.

11) The Endocrine Society's 85th Annual Meeting (Philadelphia, U. S. A.)

Proteasome-dependent degradation of the human mineralocorticoid receptor attenuates the transcriptional response to aldosterone.

K. Yokota, H. Shibata, I. Kurihara, S. Kobayashi, I. Saito, T. Saruta.

12) 副腎静脈サンプリング研究会(2003年、東京)

ACTH 負荷副腎静脈サンプリングの経験

柴田洋孝、栗原 勲、鈴木利彦、小林佐紀子、横田健一、須田徳子、齊藤郁夫、林 松彦、猿田享男。

13) Young Endocrinologist Conference (2003年、箱根)

核内受容体 COUP - TF および SF - 1 によるステロイド産生調節機構

柴田洋孝、栗原 勲、小林佐紀子、須田徳子、横田健一、池田やよい、齊藤郁夫、猿田享男。

14) 第4回ホルモンと癌研究会(2003年、筑波)

慶應義塾における血清 PSA を用いた前立腺検診の検討

古平喜一郎、中島 淳、柴田洋孝、齊藤郁夫、村井 勝。

15) 第47回臨床内分泌代謝研究会(2003年、東京)

片側副腎偶発腫瘍で発見され、先天性副腎過形成(21-水酸化酵素欠損症)が疑われた一例

小林佐紀子、柴田洋孝、今福俊夫、栗原 勲、横田健一、須田徳子、市原淳弘、林 松彦、藤枝憲二、齊藤郁夫、猿田享男。

IP: α -COUP-TF, Blot: α -Xpress



IP: α -COUP-TF, Blot: α -Flag



IP: α -COUP-TF, Blot: α -COUP-TF



COUP-TF	+	+	+	+
Xpress-Ubc9		+	+	+
Flag-PIAS1	+	+	+	+

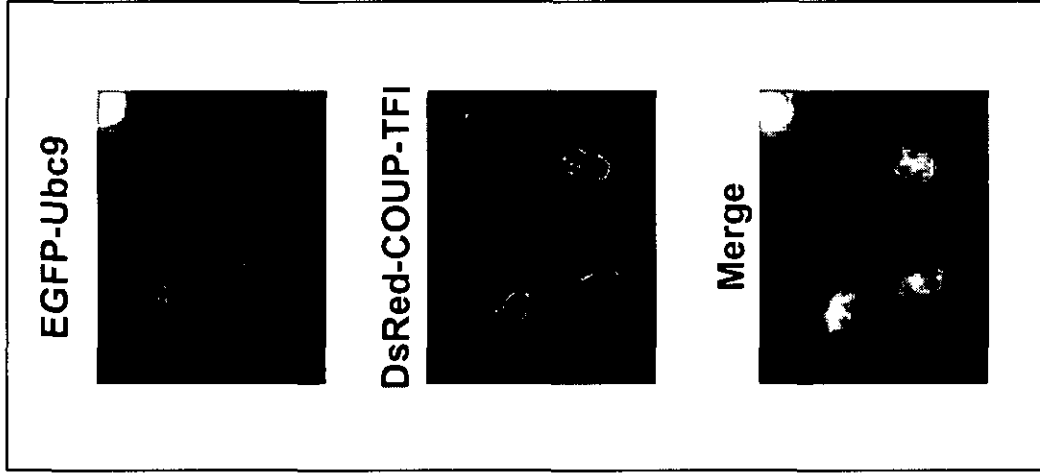
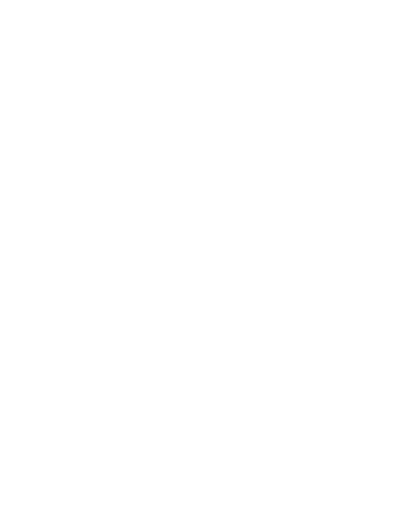
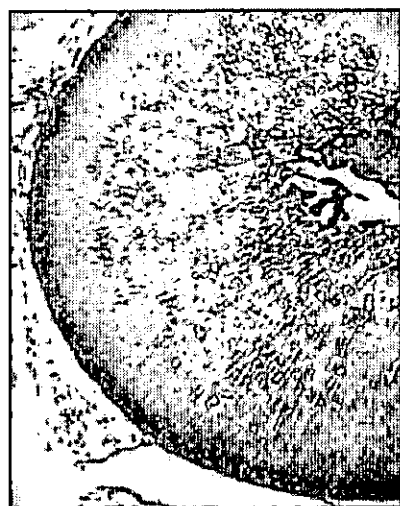
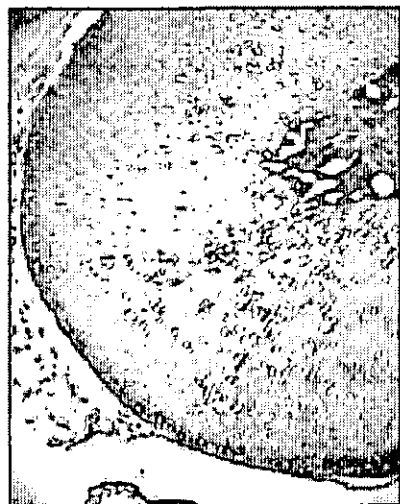


図1 COS-1細胞におけるCOUP-TFI, Ubc9, PIAS1の共在

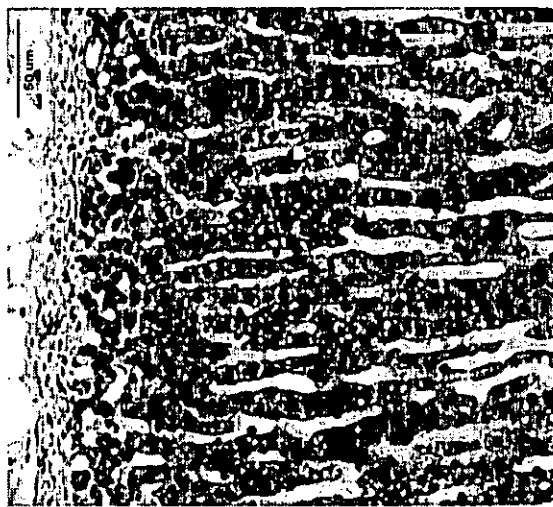


cap

ZG

ZF

ZR



ZG

ZF

ZR

COUP-TF

Ubc9

PIAS1

図2 ラット副腎におけるCOUP-TF, Ubc9, PIAS1の局在

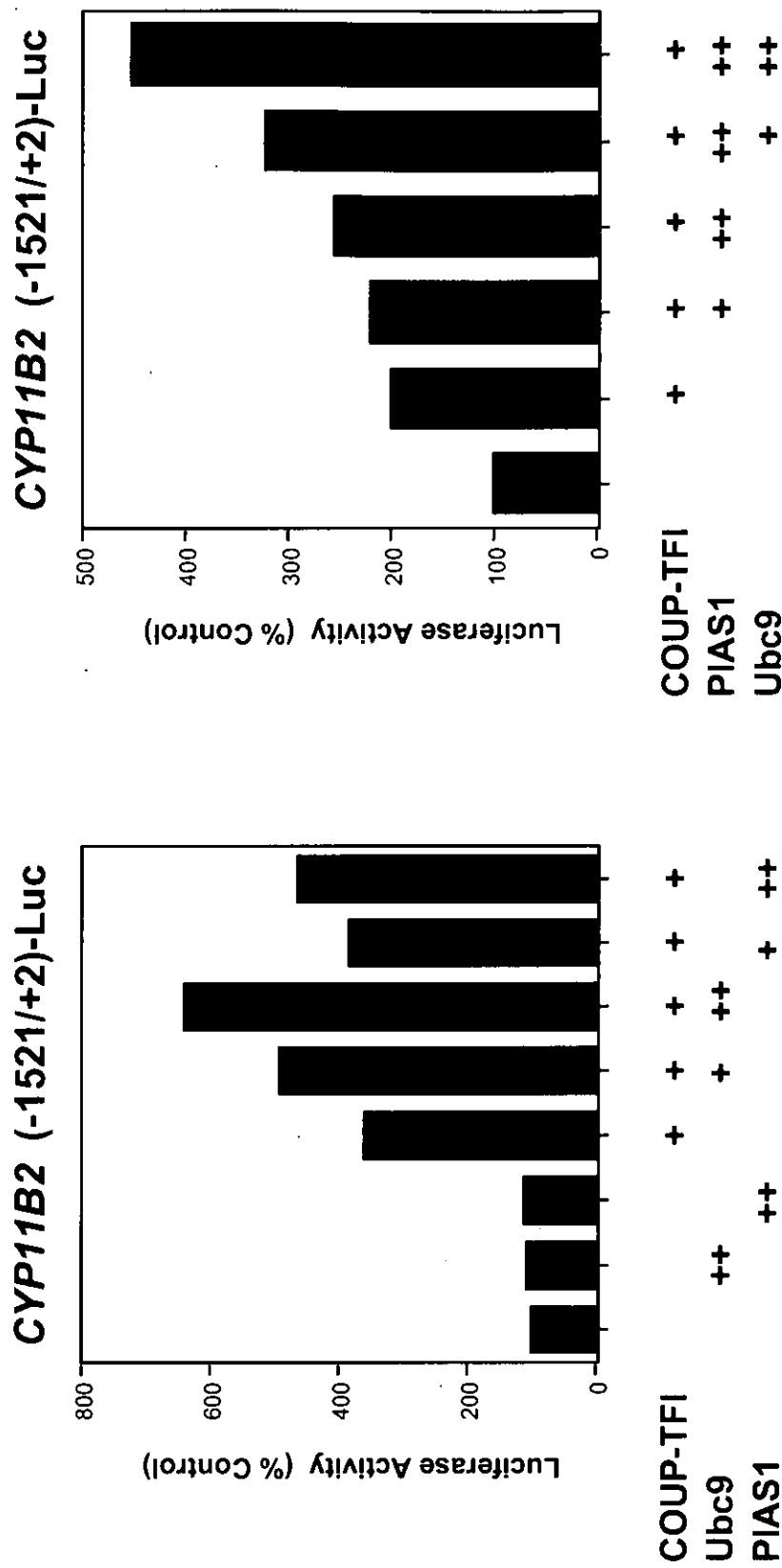


図3 Ubc9およびPIAS1はCOUP-TFIによるCYP11B2プロモーター活性を増強するcoactivatorである

アルドステロン産生腺腫での非腫瘍側正常副腎からの アルドステロン分泌動態に関する研究

西川哲男¹⁾、大村昌夫²⁾、齋藤淳¹⁾、祖山暁子¹⁾、伊藤浩子¹⁾

横浜労災病院内科¹⁾、社会保険中央総合病院内科糖尿病内分泌科²⁾

アルドステロン産生腺腫による原発性アルドステロン症55例で行った ACTH 負荷副腎静脈採血でのアルドステロン産生腺腫非存在健側副腎からのアルドステロン分泌能と術前後の臨床所見を比較検討した。ACTH 刺激後の健側副腎からのアルドステロン分泌能は、術前の原発性アルドステロン症の重症度の判定と術後の血圧正常化の予測因子となりうる事が判明した。

A. 研究目的

高血圧は原因不明の本態性高血圧が大部分をしめ心脳血管合併症の予防のため薬物治療による血圧コントロールを生涯にわたって行う必要がある。一方、原因疾患の適切な診断と治療で治癒が期待できる2次性高血圧の原因疾患のなかで原発性アルドステロン症は、高血圧に占める頻度が近年5~10%と高頻度であることが報告されている。我々も原発性アルドステロン症のスクリーニング法を考案し、一般外来の初診高血圧患者1020例を対象にスクリーニングを行い、その6.0%に原発性アルドステロン症を確定診断している。従って、我々の結果から推測すると日本では原発性アルドステロン症患者が165万人存在することになり、その早期診断と早期治療は患者のQOL改善のみならず、国民医療費の削減のためにも重要である。従来我々は、原発性アルドステロン症の確定診断と切除すべき副腎の部位診断にACTH負荷副腎静脈採血が有用であることを報告してきた。ところが、ACTH刺激30分後の、アルドステロン産生腺腫の存在しない健側副腎からのアルドステロン分泌に症例により差異のあることに気付き、今回健側からのアルドステロン分泌能と術前後の臨床

所見について検討を試みた。

B. 研究方法

ACTH負荷副腎静脈採血で片側副腎からのアルドステロン過剰分泌を確認し片側副腎摘除術を施行、病理検査でアルドステロン産生腺腫の確定診断がされた55例を対象とした。これら症例の、ACTH負荷副腎静脈採血でのACTH 250 μ g静注後30分の健側副腎静脈血中アルドステロン濃度を健側副腎からのアルドステロン分泌能とし、この所見と術前の各種臨床所見、術後の臨床所見と比較検討した。

C. 研究結果

健側副腎からのアルドステロン分泌能と術前の臨床所見の相関関係を検討した結果を表1に示す。

健側副腎からのアルドステロン分泌能は、収縮期血圧、拡張期血圧、末梢血アルドステロン濃度、カプトプリル負荷試験でのカプトプリル投与後90分のアルドステロン-レニン活性比と有意な負の相関関係を示し、また血清カリウム値、血漿レニン活性、フロセミド-立位120分後のレニン活性と正の有意な相関関係を

示した。しかし年齢、高血圧罹病期間、腺腫の直径とは相関関係が認められなかった。このことは健側副腎からのアルドステロン分泌能は原発性アルドステロン症の術前の症状の重さを反映するものと考えられた。

健側副腎からのアルドステロン分泌能と術後臨床所見を比較検討したところ術後血圧とのみ有意な負の相関関係が認められた。健側副腎からのアルドステロン分泌能は術後の血圧を反映することから、術後降圧剤投与無しで収縮期血圧が140mmHg未満かつ拡張期血圧が90mmHg未満と正常化した術後治癒群と、それ以外の非治癒群で術後の各種検査所見を比較検討した所、健側副腎からのアルドステロン分泌能は非治癒群と比較し治癒群で高く ($p < 0.0001$)、また罹病期間は非治癒群で長い ($p < 0.03$) ことが判明した。(図1)

さらにロジスティック回帰分析で術後血圧正常化に寄与する因子を検討したところ、健側副腎からのアルドステロン分泌が良好なこと、高血圧罹病期間が短いことが挙げられた。

D. 考案

今回の検討からアルドステロン産生腺腫による原発性アルドステロン症では、血圧が高く末梢血中アルドステロン濃度が高く、カプトプリル負荷試験やフロセミド立位試験での検査所見が強い程、健側副腎からのアルドステロン分泌能は抑制されていることが判明した。アルドステロン産生腺腫の存在する切除副腎の病理検査では、腺腫付着副腎の球状層は過形成を生じているもののそのホルモン産生活性は低下していることが paradoxical hyperplasia として知られている。今回の結果は、臨床症状の強いア

ルドステロン産生腺腫による原発性アルドステロン症では、アルドステロン産生腺腫が存在しない反対側の健側副腎の球状層にも paradoxical hyperplasia と同様な変化が起こり球状層細胞からの ACTH 刺激によるアルドステロン分泌能が低下しているものと考えられた。

そこで臨床症状の強さを反映する健側副腎からのアルドステロン分泌能が術後の血圧の改善度を予測する因子となる可能性が考えられた。そして今回の検討では、健側副腎からのアルドステロン分泌能は、高血圧の罹病期間とともに、片側副腎切除による原発性アルドステロン症の血圧正常化を予測する重要な因子であった。すなわち健側副腎からのアルドステロン分泌能が良好に保たれ、高血圧罹病期間の短い症例において術後血圧が正常化する可能性が高いことが判明した。従ってアルドステロン産生腺腫による原発性アルドステロン症において良好な術後血圧改善を図るためには、本症の早期発見、早期治療が重要であることが明らかとなった。

E. 結論

ACTH 負荷副腎静脈採血は、アルドステロン産生腺腫の存在する患側副腎の特定による原発性アルドステロン症の正確な病型診断と部位診断に有効であるのみならず、本検査施行時に同時に評価可能な ACTH 刺激後の健側副腎からのアルドステロン分泌能が、原発性アルドステロン症の重症度を反映し術後の血圧正常化を予測する因子となることが判明した。従って ACTH 負荷副腎静脈採血法はアルドステロン産生腺腫による原発性アルドステロン症の診断に必須の検査であることが判明した。しかし、ACTH 負荷副腎静脈採血法は技術的に難しく、施行可

能な施設が限定されている。今後原発性アルドステロン症の潜在患者数が多いこと、本疾患は早期診断早期治療で治癒率が改善することを考慮すると、ACTH負荷副腎静脈採血の普及が急務と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 高野達朗, 祖山暁子, 齋藤淳, 伊藤浩子, 飯塚孝, 西川哲男, 吉田孝雄 オクトレオチド徐放性製剤にて治療中に正常妊娠と分娩に至った末端肥大症の一例. 日本内分泌学会雑誌79:10-12 (2003)
- 2) 山田佳彦, 大村昌夫, 西川哲男, 関原久彦 クッシング症候群を合併した原発性アルドステロン症でのアルドステロン分泌動態についての検討. 日本内分泌学会雑誌79:86-89 (2003)
- 3) 西川哲男, 齋藤淳, 祖山暁子, 大村昌夫 原発性アルドステロン症の確定診断と局在診断のための副腎静脈血サンプリングの有用性. 東京女子医科大学雑誌73:460-462 (2003)
- 4) 西川哲男, 齋藤淳, 祖山暁子, 伊藤浩子, 大村昌夫 【高血圧 エビデンスからみた診療】診断 原発性アルドステロン症の頻度と診断・治療. 日本内科学会雑誌92:208-212 (2003)
- 5) 大村昌夫, 山田佳彦, 伊藤聡, 笹野公伸, 西川哲男, 関原久彦 副腎重複病変の診断法と治療法についての検討. 日本内分泌学会雑誌78:70-72 (2002)
- 6) Nishikawa T, Saito J, Soyama A, Ito H, Omura M [Occurrence and diagnosis of primary aldosteronism and its therapy]. Nippon Naika Gakkai Zasshi 92:208-12 (2003)
- 7) 末松佐知子, 西川哲男, 齋藤淳, 西芳寛, 柳瀬敏彦, 名和田新 【ステロイドホルモン研究の進歩 2002】ステロイド合成 ヒト顆粒膜細胞でのStAR調節機構. ホルモンと臨床51:76-79 (2003)
- 8) Shishiba Y, Ishihara T, Nishikawa T, Okimura Y, Kuwamura N [For more accurate diagnosis of endocrine diseases: discussion]. Nippon Naika Gakkai Zasshi

92:635-51 (2003)

- 9) 齋藤淳, 西川哲男 副腎性高血圧症の頻度と病態. 内分泌・糖尿病科15:601-604 (2002)
- 10) 齋藤淳, 大矢佳寛, 本城聡, 祖山暁子, 伊藤浩子, 角田幸雄, 西川哲男 動眼神経麻痺をきたしたCushing病の一症例. ACTH RELATED PEPTIDES 14:83-86 (2003)
- 11) 齋藤淳, 西川哲男 【内分泌性高血圧の診断と治療 隠された内分泌疾患を見逃さないために】原発性アルドステロン症. Mebio 20:44-48 (2003)
- 12) 齋藤淳, 大村昌夫, 西川哲男 【副腎をめぐる最近の進歩】原発性アルドステロン症診断手技の感度. 内分泌・糖尿病科16:358-361 (2003)
- 13) 齋藤淳, 大村昌夫, 祖山暁子, 飯塚孝, 伊藤浩子, 西川哲男 【ステロイドホルモン研究の進歩 2002】副腎腫瘍 非機能性副腎腫瘍の病型分類とステロイド産生能. ホルモンと臨床51:144-146 (2003)
- 14) Tetsuo Nishikawa: Flexion contractures possibly reflect the existence of hypocortisolism. Intern Med 42:629-31 (2003)

2. 学会発表

- 1) 安藤有希子, 祖山暁子, 伊藤浩子, 齋藤淳, 飯塚孝, 西川哲男, 河村俊治, 角田幸雄, 山口邦雄: 副腎 incidentaloma のコルチゾル産生能と代謝異常. 第76回日本内分泌学会総会 2003年5月9-11日, パシフィコ横浜 (横浜)
- 2) 伊藤譲, 青木明日香, 菊地勘, 齋藤淳, 波多野道康, 西川哲男, 土谷健: 原発性アルドステロン症術後に高K血症を呈した軽度腎機能低下の1症例. 第512回日本内科学会関東地方会 2003年10月11日 全共連ビル (東京)
- 3) 海老澤高憲, 吉原理恵, 西川哲男, 笹野公伸, 東條克能, 田嶋尚子: 両側副腎摘出後に心機能の著明な改善を認めた非虚血性心不全を合併したACTH非依存性大結節性副腎皮質過形成(AIMAH)の一例. 第76回日本内分泌学会総会 2003年5月9-11日, パシフィコ横浜 (横浜)
- 4) 下山立志, 齋藤淳, 伊藤譲, 祖山暁子, 飯塚孝, 伊藤浩子, 西川哲男: 右側副腎全摘及び左側腫瘍核出術を施行した家族性両側

褐色細胞腫の一例. 第513回日本内科学会関東地方会 2003年11月8日 全共連ビル(東京)

5) 高野達朗, 祖山暁子, 齋藤淳, 伊藤浩子, 飯塚孝, 西川哲男, 吉田孝雄: オクトレオチド徐放性製剤投与中に分娩に至った末端肥大症の一例. 第13回臨床内分泌 update 2003年3月16日, 都市センターホテル(東京)

6) 山田佳彦, 大村昌夫, 笹野公伸, 角田幸雄, 西川哲男, 関原久彦: 画像検査上右副腎に2個の腫瘍像を認め右副腎からのコルチゾール過剰分泌と両側副腎からのアルドステロン過剰分泌を示した1例. 第7回日本内分泌病理学会総会2003年10月24日, 全社協・灘尾ホール(東京)

7) 山田佳彦, 大村昌夫, 西川哲男, 関原久彦: Cushing症候群, 原発性アルドステロン症合併例のホルモン動態. 第13回臨床内分泌 update 2003年3月16日, 都市センターホテル(東京)

8) 小澤いぶき, 大村昌夫, 藤林和俊, 齋藤淳, 西川哲男, 齋藤寿一: 低カリウム血症と副腎腫瘍の所見を欠くアルドステロン産生腺腫による原発性アルドステロン症の1例. 第512回日本内科学会関東地方会 2003年10月11日 全共連ビル(東京)

9) 西川哲男, 齋藤淳, 祖山暁子, 伊藤浩子: 副腎偶発腫の診断法. 第13回臨床内分泌 update 2003年3月16日, 都市センターホテル(東京)

10) 太枝徹, 齋藤淳, 時永耕太郎, 大村昌夫, 西川哲男, 松島保久: クッシング症候群と原発性アルドステロン症の合併が考えられた両側副腎腫瘍の一例. 第76回日本内分泌学会総会 2003年5月9-11日, パシフィコ横浜(横浜)

12) 祖山暁子, 高野達朗, 齋藤淳, 伊藤浩子, 飯塚孝, 石塚俊治, 西川哲男: 人間ドック1527例を対象とした経口ブドウ糖負荷試験での各区分におけるインスリン抵抗性, 分泌能の検討. 第46回日本糖尿病学会 2003年5月22-24日, 富山国際会議場(富山)

13) 大村昌夫, 西川哲男, 山田佳彦, 山口邦雄, 角田幸雄, 関原久彦: アルドステロン産生腺腫術後治療予測因子の検討. 第100回日本内科学会講演会 2003年4月1-3日, 福岡国際会議場(福岡)

14) 大矢佳寛, 祖山暁子, 齋藤淳, 伊藤浩子, 飯塚孝, 西川哲男, 河村俊治, 角田幸雄, 山

口邦雄, 前原孝光: 下垂体腫瘍を有するACTH産生胸腺カルチノイドの一例. 第13回臨床内分泌 update 2003年3月16日, 都市センターホテル(東京)

15) 飯塚孝, 高野達朗, 齋藤淳, 祖山暁子, 伊藤浩子, 西川哲男: 2型糖尿病における下部尿道症状と前立腺肥大症合併について. 第46回日本糖尿病学会 2003年5月22-24日, 富山国際会議場(富山)

16) 本城聡, 高野達朗, 祖山暁子, 齋藤淳, 伊藤浩子, 飯塚孝, 西川哲男: 不明熱の検索中にCrohn病が疑われた高齢2型糖尿病の1例. 第40回日本糖尿病学会関東甲信越地方会 2003年1月25日, パシフィコ横浜(横浜)

17) 齋藤淳, 末松佐知子, 祖山暁子, 伊藤浩子, 西川哲男, 鈴木貴, 笹野公伸, KinoTomoshige, ChrousosGeorge: ヒト腎メサンギウム細胞のアルドステロン産生能の検討. 第11回日本ステロイドホルモン学会 2003年11月22日, 長良川国際会議場(岐阜)

18) 齋藤淳, 祖山暁子, 伊藤浩子, 飯塚孝, 大村昌夫, 西川哲男: アルドステロン産生腺腫のステロイド産生能. 第76回日本内分泌学会総会 2003年5月9-11日, パシフィコ横浜(横浜)

19) 齋藤淳, 安藤有希子, 祖山暁子, 伊藤浩子, 飯塚孝, 西川哲男, 角田幸雄, 永田真樹, 山口邦雄: 副腎偶発腫瘍のステロイド産生能と高血圧. 第26回日本高血圧学会総会 2003年11月1日, 宮崎シーガイア(宮崎)

20) 祖山暁子, 齋藤淳, 伊藤浩子, 西川哲男: 空腹時高血糖(IFG)は血圧を上昇させる? -耐糖能異常の血圧への影響-. 第26回日本高血圧学会総会 2003年11月1日, 宮崎シーガイア(宮崎)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許許諾

特になし

2. 実用新案登録

特になし

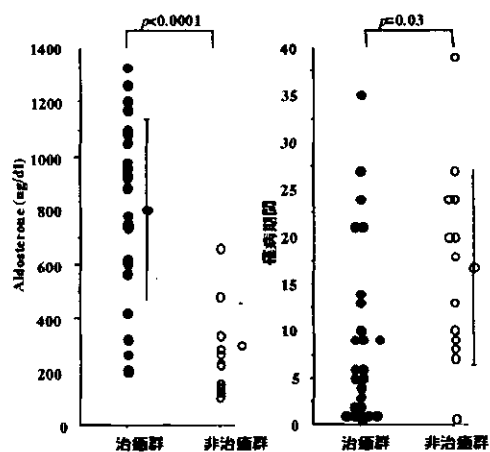
3. その他

特になし

表1. 健側副腎からのアルドステロン分泌能と術前の臨床所見の相関

術前臨床所見	相関係数	p 値
収縮期血圧	0.58	<0.0001
拡張期血圧	0.47	0.002
血清カリウム	0.57	<0.0001
アルドステロン濃度	0.40	0.0088
レニン活性	0.52	0.0005
フロセミド一立位試験	0.46	0.0029
カプトプリル負荷試験	0.64	<0.0001
腺腫の大きさ	0.22	n. s.
高血圧罹病期間	0.14	n. s.

図1. 高血圧治癒群、非治癒群での健側副腎からのアルドステロン分泌能と高血圧罹病期間



内分泌学的負荷試験によるアルドステロン産生腺腫と特発性アルドステロン症の鑑別に関する研究

宮下 和季、伊藤 裕、山原 研一、政次 健、
曾根 正勝、小林（万木）貴美、朴 貴典、中尾 一和
京都大学内分泌代謝内科

研究要旨

本態性高血圧症と診断されていた患者群の中に原発性アルドステロン症が5～10%含まれ、その中には外科的根治が可能であるアルドステロン産生腺腫が半数以上含まれることが明らかとなっている。アルドステロン産生腺腫の診断にはこれまでも内分泌学的負荷試験が用いられているが、定量的な診断基準は存在せず、その有用性は必ずしも確立されていない。そこで我々は当科に入院した、原発性アルドステロン症疑いの23例において①カプトリル負荷試験、②デキサメサゾン1 mg抑制下アンジオテンシンII負荷試験、③迅速ACTH負荷試験、④日内変動および1 mgデキサメサゾン抑制試験を施行し、これら負荷に対するアルドステロンの反応性により、アルドステロン産生腺腫と特発性アルドステロン症ないし本態性高血圧症の鑑別が可能であるかを検討した。その結果、両者を精度よく鑑別するカットオフ値の設定が可能で、カプトリル負荷試験ならびに1 mgデキサメサゾン抑制下アンジオテンシンII負荷試験は正診率90%を超える高い鑑別能を発揮し、迅速ACTH負荷試験においては120分値が高い鑑別能を有した。したがって、これら内分泌学的負荷試験を組み合わせることは、外科的根治が可能であるアルドステロン産生腺腫の外来診療における診断に寄与すると考えられた。

A. 研究目的

最近、本態性高血圧症と診断されていた患者群の中に、5～10%原発性アルドステロン症が含まれ、その中でも画像診断が不可能であるアルドステロン産生マイクロアデノーマが多数存在することが明らかとなっている。原発性アルドステロン症の診断には、血漿アルドステロン濃度（PAC）の絶対値とレニン/アルドステロン比が用いられ、原発性アルドステロン症の中でも外科的根治が可能であるアルドステロン産生腺腫（APA）と内科的治療が原則となる特発性アルドステロン症（IHA）の鑑別には副腎CT、デキサメサゾン抑制下副腎シンチグラフィ、副腎静脈サンプリング等が用いられる。

しかしながら、CTでは検出できないマイクロアデノーマや右副腎静脈の採血困難例があり、APAとIHAの鑑別は必ずしも容易ではない。

APAのアルドステロン分泌はACTH依存性であるのに対し、IHAではアンジオテンシンII依存性が強いことより、これら分泌刺激による内分泌学的負荷試験にて両者を鑑別する試みがなされているが、これまで定量的な診断基準は存在せず、その有用性については必ずしも確立されていない。

そこで我々は本態性高血圧症患者の中で原発性アルドステロン症、特に外科的根治が可能であるAPAを同定するための、外来診療でも施行可能な新しい内分

泌学的負荷試験による診断法の確立を目指している。

B. 研究方法

2000年から2003年に当科に入院した、原発性アルドステロン症疑いの23例において（最終診断はアルドステロン産生腺腫（APA：Aldosterone producing adenoma）14例、特発性アルドステロン症（IHA：Idiopathic hyperaldosteronism）6例、本態性高血圧症（EHT：Essential hypertension 3例））、①カプトリル負荷試験、②デキサメサゾン1 mg 抑制下アンジオテンシンII負荷試験、③迅速ACTH負荷試験、④日内変動および1 mg デキサメサゾン抑制試験を施行し、これら負荷に対するアルドステロンの反応性により、APAとIHA、EHTの鑑別が可能であるかを検討した。IHAとEHTはこれら負荷に対して、同じパターン反応を呈したため、IHA、EHTをまとめた群とAPAの鑑別について検討した。対象には負荷試験の方法、意義と、考えられる危険性を説明し、検査に対する承諾を得た。

C. 研究結果

①カプトリル負荷試験によりアルドステロン分泌のレニンアンジオテンシン依存性を評価した。カプトリル50mg内服前及び内服後30、60、90、120分の血漿アルドステロン濃度（PAC：Plasma aldosterone concentration）を測定した。PAC前値を100%として負荷に対する反応性を比較すると、前値からの減少率はIHAおよびEHTでは60分値で36%、120分値が22%であった。APAでは60分値で減少を認めず、120分値で5%であった。60分値において前値からの減少率20%をカットオフ値とすると、今回の対

象では正診率が90%、APAの診断感度が92%、特異度92%であった。

②デキサメサゾン1 mg抑制下アンジオテンシンII（AII）負荷試験を施行した。AII刺激によるアルドステロン上昇を明瞭にするため、前処置として前日23時にデキサメサゾン1 mgを内服して、PAC前値を抑制した。翌朝8時よりアンジオテンシンIIを0.25ng/kg/minで持続静注開始し、その後15分ごとに投与量を倍増して、収縮期血圧が前値+20mmHgとなるか開始後60分で終了とした。採血は負荷前及び負荷後15、30、45、60分で施行した。PAC前値を100%として、負荷に対する反応性を比較すると、最小値から最大値への増加率がIHAおよびEHTでは124%、APAでは39%であった。最小値から最大値への増加率80%をカットオフ値とすると、今回の対象では正診率が93%、APAの診断感度が89%、特異度100%であった。

③迅速ACTH負荷試験によりアルドステロン分泌のACTH依存性を評価した。合成ACTH250mg静注前及び静注後30、60、90、120分のPACを測定した。PAC前値を100%として、負荷に対する反応性を比較すると、前値からの増加率はIHAおよびEHTでは60分値で133%、120分値で57%であった。APAでは60分値で159%、120分値で113%であった。APAとIHA、EHTの鑑別能は60分値ないし最大値よりも120分値が高く、120分値において前値からの増加率100%をカットオフ値とすると、正診率が67%、APAの診断感度が56%、特異度83%となった。

④PAC日内変動を評価し、1 mg デキサメサゾン抑制試験を施行した。すなわち8、12、16、20時に採血を行い、23時にデキサメサゾン1 mg内服後、翌朝8

時にも PAC を測定した。日内変動で APA と IHA、EHT を鑑別するのは困難であったが、デキサメサゾン 1 mg 内服翌朝 8 時の PAC は APA と IHA、EHT で有意差があった。前日 8 時の PAC を 100 とするとデキサメサゾン 1 mg 内服翌朝 8 時の PAC の減少率は IHA および EHT では 17%、APA では 43% であった。前日 8 時から減少率 30% をカットオフ値とすると、今回の対象では正診率が 73%、APA の診断感度が 77%、特異度 77% となった。

APA と診断された 1 例において、迅速 ACTH 負荷試験の前処置として 1 mg デキサメサゾン内服を試みた。通常迅速 ACTH 負荷試験を施行した後に、23 時にデキサメサゾン 1 mg を内服させ、翌朝 8 時から再度迅速 ACTH 負荷試験を施行した。すると、PAC 前値は有意に抑制されたが、最大値に大きな変化を認めず、ACTH 負荷による前値からの増加率は上昇した。

D. 考察

これまでも内分泌学的負荷試験にて APA と IHA、EHT を鑑別する試みがなされているが、定量的な診断基準を確立するには至っていない。今回我々は内分泌学的負荷試験として、①レニンアンジオテンシン系の抑制、②アンジオテンシン刺激、③ ACTH 刺激、④ ACTH の抑制を試み、APA と IHA、EHT を精度良く鑑別する定量的なカットオフ値を設定した。

一般に APA のアルドステロン分泌は ACTH 依存性であるのに対し、IHA ではアンジオテンシン II 依存性が強いと考えられている。今回の負荷試験においては、レニンアンジオテンシン依存性は IHA、EHT において認められるものの、APA

では消失していた。ACTH 依存性は APA で強いものの、IHA、EHT で消失することはなく、有意な ACTH 依存性を認めた。また、今回の対象での正診率はレニンアンジオテンシン系を修飾する負荷試験 (①、②) において ACTH を修飾する負荷試験 (③、④) よりも高くなった。

迅速 ACTH 負荷試験の正診率を向上させるべく、1 mg デキサメサゾン内服による PAC 前値の抑制を試みた。1 mg デキサメサゾンによる前値抑制作用は IHA、EHT よりも APA で強いので、前値からの増加率は APA で相対的に大きくなり、鑑別能が向上すると考えられた。

E. 結論

APA と IHA、EHT の鑑別診断において、カプトリル負荷試験ならびに 1 mg デキサメサゾン抑制下アンジオテンシン II 負荷試験は正診率 90% を超える高い鑑別能を発揮した。迅速 ACTH 負荷試験においては 120 分値が高い鑑別能を有した。その正診率はカプトリル負荷試験や 1 mg デキサメサゾン抑制下アンジオテンシン II 負荷試験に及ばないものの、1 mg デキサメサゾン抑制下で迅速 ACTH 負荷試験を施行することにより鑑別能が向上する可能性が示唆された。

これら内分泌学的負荷試験を組み合わせ用いることは APA と IHA、EHT の鑑別に有用であり、外科的根治が可能である APA の外来診療における診断に寄与すると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nishizawa K et al : Successful treatment of primary aldosteronism due to computed tomography-negative microadenoma. Int J

Urol. 2003 Oct ; 10 (10) : 544-6.

Yamahara K et al : New diagnostic procedure for primary aldosteronism : adrenal venous sampling under adrenocorticotrophic hormone and angiotensin II receptor blocker--application to a case of bilateral multiple adrenal microadenomas. Hypertens Res. 2002 Mar ; 25 (2) : 145-52.

山原研一 伊藤裕 : 高血圧における原発性アルドステロン症の意義とその診断の重要性 新しい局在診断法の開発 血圧 2002 ; 9 (6) : 57-65.

2. 学会発表

「副腎ホルモン産生異常に関する研究」班
平成15年度研究報告会 平成16年1月 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし