

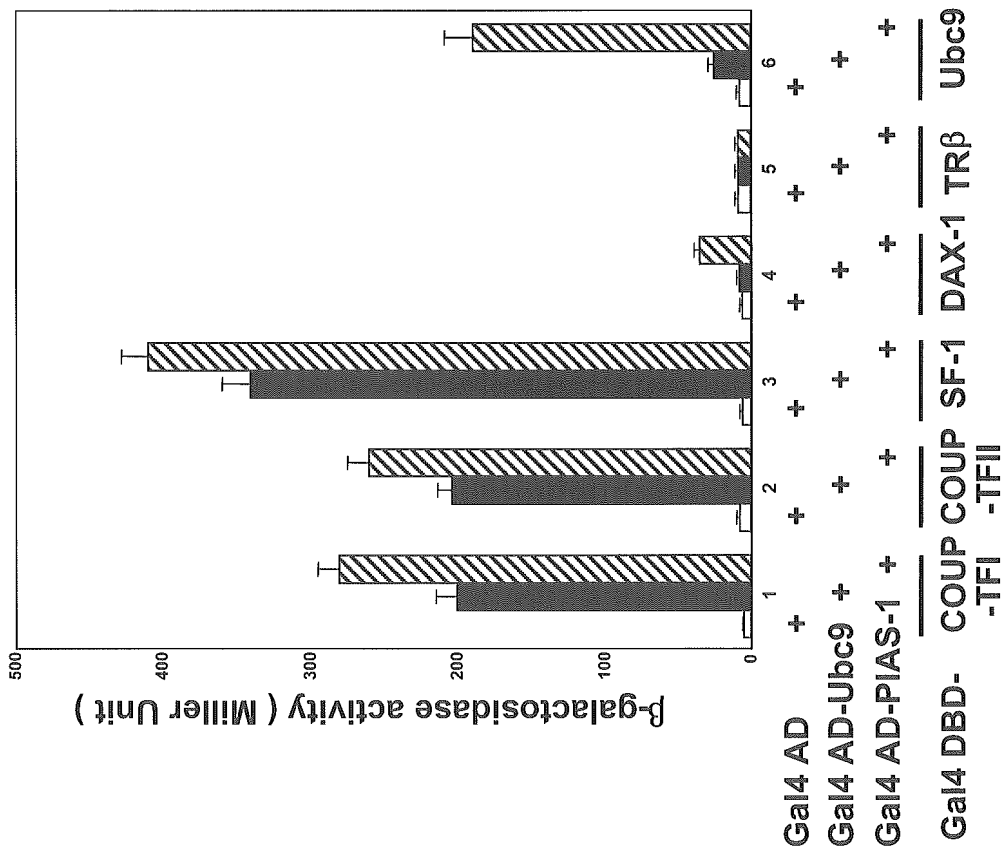
- 第 14 回臨床内分泌代謝 Update Proceedings. 80 (Suppl) : 35 - 38, 2004.
17. 須田徳子、柴田洋孝、栗原 勲、小林佐紀子、横田健一、小西孝之助、林 晃一、本間桂子、中川 健、村井 勝、笹野公伸、齊藤郁夫、猿田享男.
アルドステロン分泌過剰を認めたクッシング症候群の一例
第 14 回臨床内分泌代謝 Update Proceedings. 80 (Suppl) : 44 - 48, 2004.
- ## 2. 学会発表
1. 平成 15 年度日本学術振興会日米がん研究協力事情セミナー (2004 年、ハワイ)
Role of COUP - TF and SUMOylation enzymes in the adrenal cortex and adrenocortical tumors. H. Shibata, I. Kurihara, S. Kobayashi, N. Suda, I. Ikeda, K. Yokota, W. E. Rainey, P. C. White, I. Saito, T. Saruta.
 2. 第 2 回副腎静脈サンプリング研究会 (2004 年、東京)
原発性アルドステロン症診断のクリニカルパスと ACTH 負荷副腎静脈サンプリングの意義
柴田洋孝、小林佐紀子、須田徳子、横田健一、栗原 勲、鈴木利彦、安藤 孝、齊藤郁夫、林 晃一、猿田享男
 3. Keystone Symposia (2004 年、Keystone)
Ubc9 and PIAS1 function as novel coactivators for the COUP-TFI - mediated aldosterone synthase (CYP11B2) gene transcription in the adrenal zona glomerulosa cells.
S. Kobayashi, H. Shibata, I. Kurihara, N. Suda, K. Yokota, Y. Ikeda, W. E. Rainey, P. C. White, I. Saito, T. Saruta.
 4. 第 14 回臨床内分泌代謝 Update (2004 年、岐阜) アルドステロン症における血漿アルドステロン / 活性レニン濃度比
柴田洋孝、横田健一、栗原 勲、須田徳子、小林佐紀子、齊藤郁夫、猿田享男
 5. 第 14 回臨床内分泌代謝 Update (2004 年、岐阜) アルドステロン分泌過剰を認めたクッシング症候群の一例
須田徳子、柴田洋孝、栗原 勲、小林佐紀子、横田健一、小西孝之助、笹野公伸、齊藤郁夫、猿田享男
 6. 第 101 回日本内科学会講演会 (2004 年、東京)
アルドステロンとコルチゾールの分泌過剰を認めた副腎腫瘍の検討
須田徳子、柴田洋孝、栗原 勲、小林佐紀子、横田健一、小西孝之助、笹野公伸、齊藤郁夫、猿田享男
 7. XIth Conference on the Adrenal Cortex (New Orleans, 2004) COUP - TF and transcriptional co - regulators in adrenal steroidogenesis
H. Shibata, I. Kurihara, S. Kobayashi, N. Suda, K. Yokota, A. Murai, Y. Ikeda, I. Saito, W. E. Rainey, T. Saruta.
 8. XIth Conference on the Adrenal Cortex (New Orleans, 2004) Ubc9 and PIAS1 are novel regulators of estrogen receptor α
S. Kobayashi, H. Shibata, K. Yokota, N. Suda, I. Kurihara, A. Murai, I. Saito, T. Saruta.
 9. XIth Conference on the Adrenal Cortex (New Orleans, 2004)
Proteasome - mediated degradation and its transcriptional regulation of the human mineralocorticoid receptor
K. Yokota, H. Shibata, S. Kobayashi, N. Suda, I. Kurihara, A. Murai, I. Saito, T. Saruta.
 10. The Endocrine Society's 86th Annual Meeting (New Orleans, U. S. A.)
Ubc9 and PIAS1 regulate adrenal cortisol production mediated by SF-1 in human adrenocortical H295R cells and cortisol-producing adenomas.
N. Suda, H. Shibata, I. Kurihara, Y. Ikeda, S. Kobayashi, K. Yokota, I. Saito, M. Murai, W. E. Rainey, T. Saruta.
 11. 第 77 回日本内分泌学会総会 (2004 年、京都)
ステロイド産生における Ubc9 および PIAS1 の機能解析と副腎皮質腺腫における役割
須田徳子、柴田洋孝、栗原 勲、小林佐紀子、池田やよい、横田健一、齊藤郁夫、猿田享男
 12. 第 77 回日本内分泌学会総会 (2004 年、京都)
リガンド依存性にミネラルコルチコイド受容体の転写活性を増強する新規 coactivator の機能解析
横田健一、柴田洋孝、栗原 勲、小林佐紀子、須田徳子、齊藤郁夫、猿田享男
 13. 第 77 回日本内分泌学会総会 (2004 年、京都)
抗アルドステロン薬による早期の抗蛋白尿作用は血圧値、炎症反応、コラーゲン合成には依存しない

- 佐藤敦久、林 晃一、神田武志、柴田洋孝、猿田享男
14. 第 77 回日本内分泌学会総会 (2004 年、京都)
Preclinical Cushing 症候群 (PreCS) の診断基準に関する多施設共同研究：デキサメサゾン (Dex) 抑制試験の判定基準に関する検討
成瀬光栄、大村昌夫、沖 隆、小田桐恵美、方波美卓行、齊藤 淳、柴田洋孝、田辺晶代、土井 賢、西川哲男
14. 第 77 回日本内分泌学会総会 (2004 年、京都) シンポジウム
核内受容体によるステロイドホルモン産生および作用調節：転写共役因子の重要性
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
16. 第 77 回日本内分泌学会総会 (2004 年、京都) イブニングセミナー
アルドステロン産生に関わる転写因子 柴田洋孝、猿田享男
17. 第 2 回 Young Endocrinologist Conference (2004 年、淡路島)
副腎皮質ステロイド産生における核内受容体・転写共役因子複合体の機能解析
柴田洋孝、栗原 勲、小林佐紀子、須田徳子、横田健一、村井彩乃、池田やよい、William E.Rainey、齊藤郁夫、猿田享男
18. International Congress of Endocrinology 2004 (Lisbon)
Adrenal nuclear receptors and co-regulators. H.Shibata, I.Kurihara, S.Kobayashi, N.Suda, K.Yokota, A. Murai, I.Saito, Y.Ikeda, W.E.Rainey, T.Saruta.
19. 第 49 回臨床内分泌代謝研究会 (2004 年、東京)
男性化を主症状とし、子宮嚢胞状腫瘍、下垂体卒中を合併したアンドロゲン産生副腎腫瘍の一例
横田健一、柴田洋孝、中原 仁、篠村裕之、小林佐紀子、須田徳子、村井彩乃、齊藤郁夫、林 晃一、猿田 享男
20. 第 12 回日本ステロイドホルモン学会 (2004 年、大阪)
ステロイド産生シグナルの調節機構。
柴田洋孝、栗原 勲、小林佐紀子、須田徳子、横田健一、村井彩乃、齊藤郁夫、猿田享男
21. 第 8 回心血管内分泌代謝学会イブニングセミナー (2004 年、宮崎)
原発性アルドステロン症の診断法と問題点。
柴田洋孝、猿田享男
22. 第 27 回日本分子生物学会年会ワークショップ (2004 年、神戸)
Ubc9 によるミネラルコルチコイド受容体 (MR) の転写制御機構
柴田洋孝、横田健一、小林佐紀子、須田徳子、村井彩乃、栗原 勲、齊藤郁夫、加藤茂明、猿田享男

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特になし。
2. 実用新案登録 特になし。
3. その他 特になし。

A



B

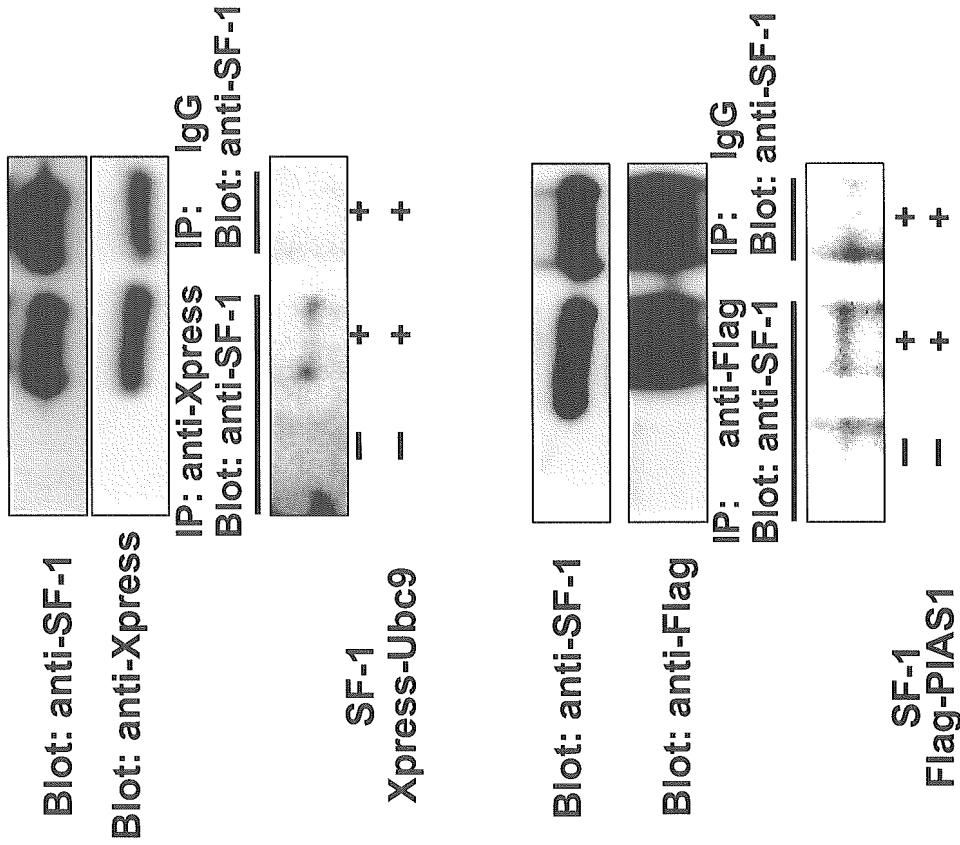


図1 Ubc9およびPIAS1とSF-1の蛋白-蛋白相互作用 A: Yeast two-hybrid assay. B: 免疫共沈降法

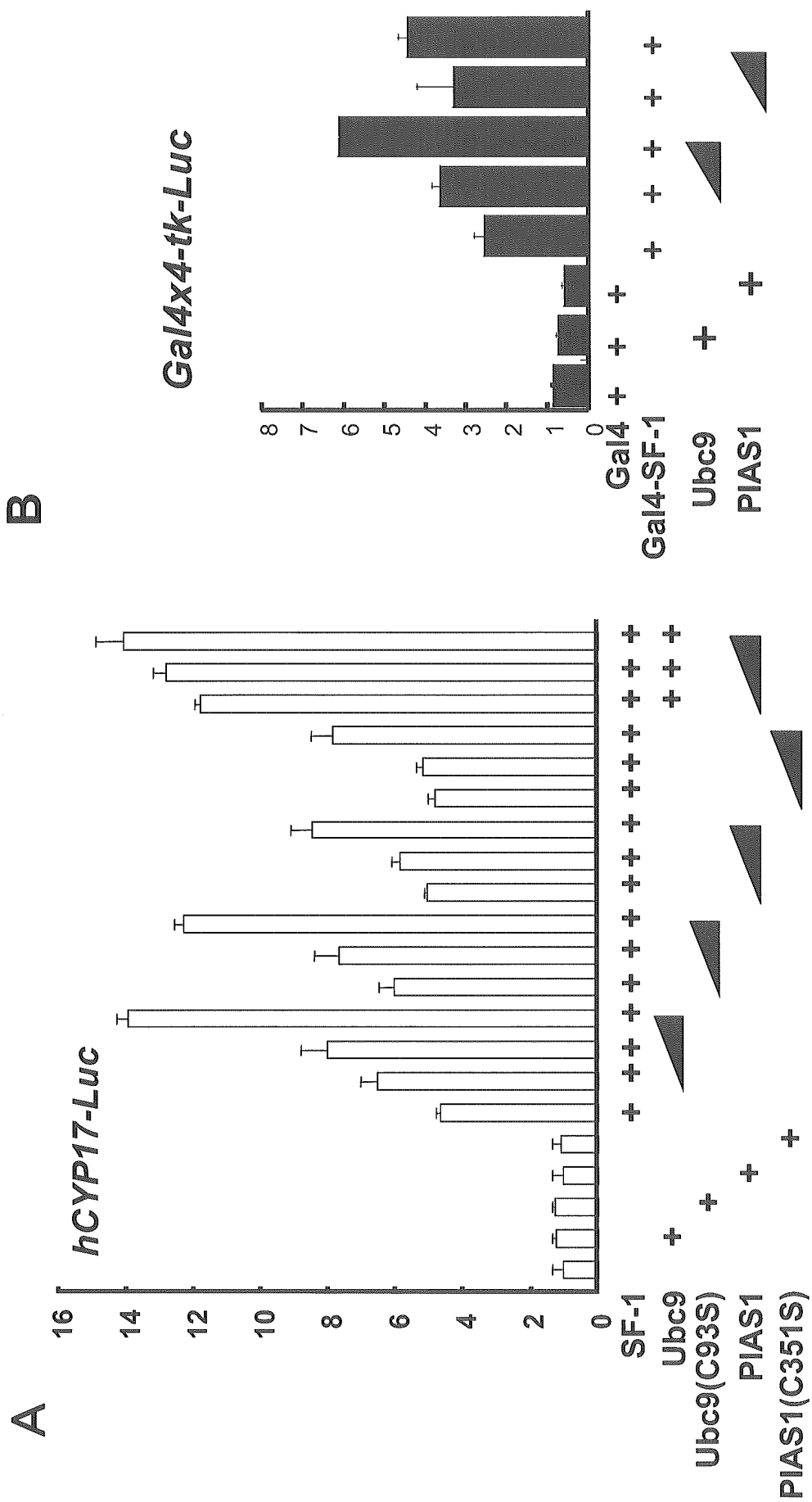


図2 Ubc9およびPIAS1によるSF-1応答性レポーター遺伝子の転写活性化

A: hCYP17-Luc, B: Gal4x4-tk-Lucの2種類のレポーター遺伝子において、Ubc9, PIAS1はSF-1のcoactivatorとして機能する。

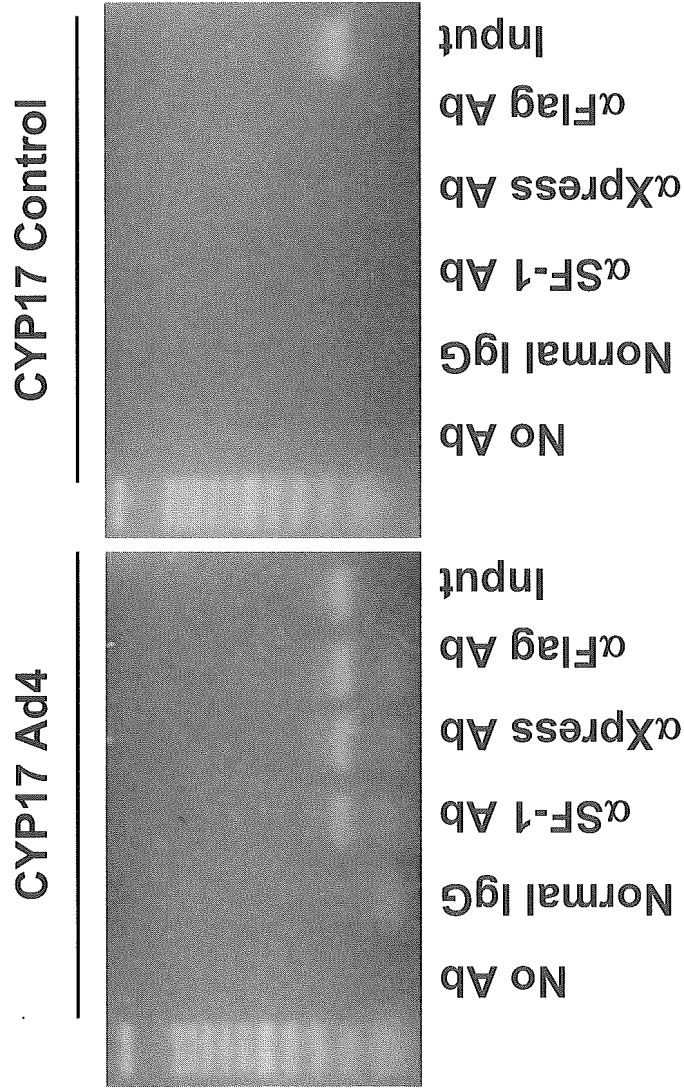
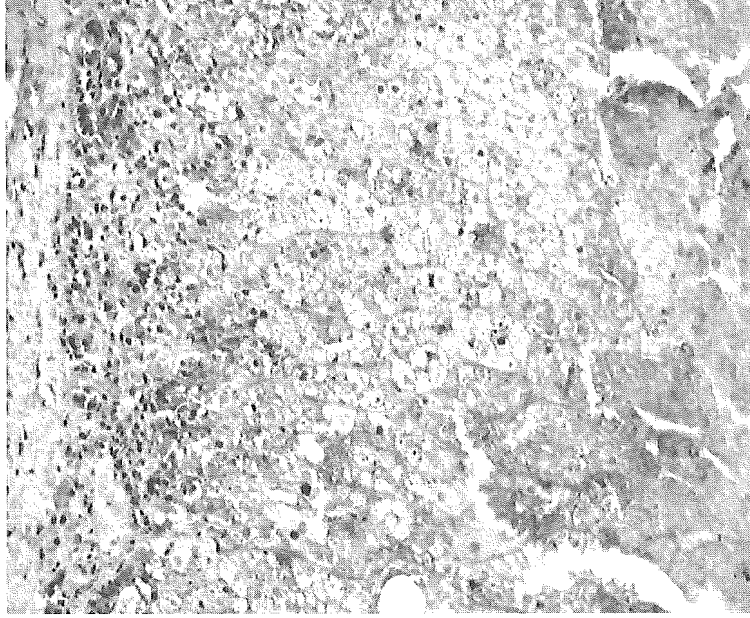


図3 クロマチン免疫沈降法

内因性ヒトCYP17遺伝子プロモーター領域のAd4配列に、SF-1, Ubc9, PIAS1が特異的に動員されていることが示された。



PIAS1



Ubc9

ZG

ZF

ZR

図4 正常ヒト副腎におけるUbc9およびPIAS1の発現(免疫組織化学)

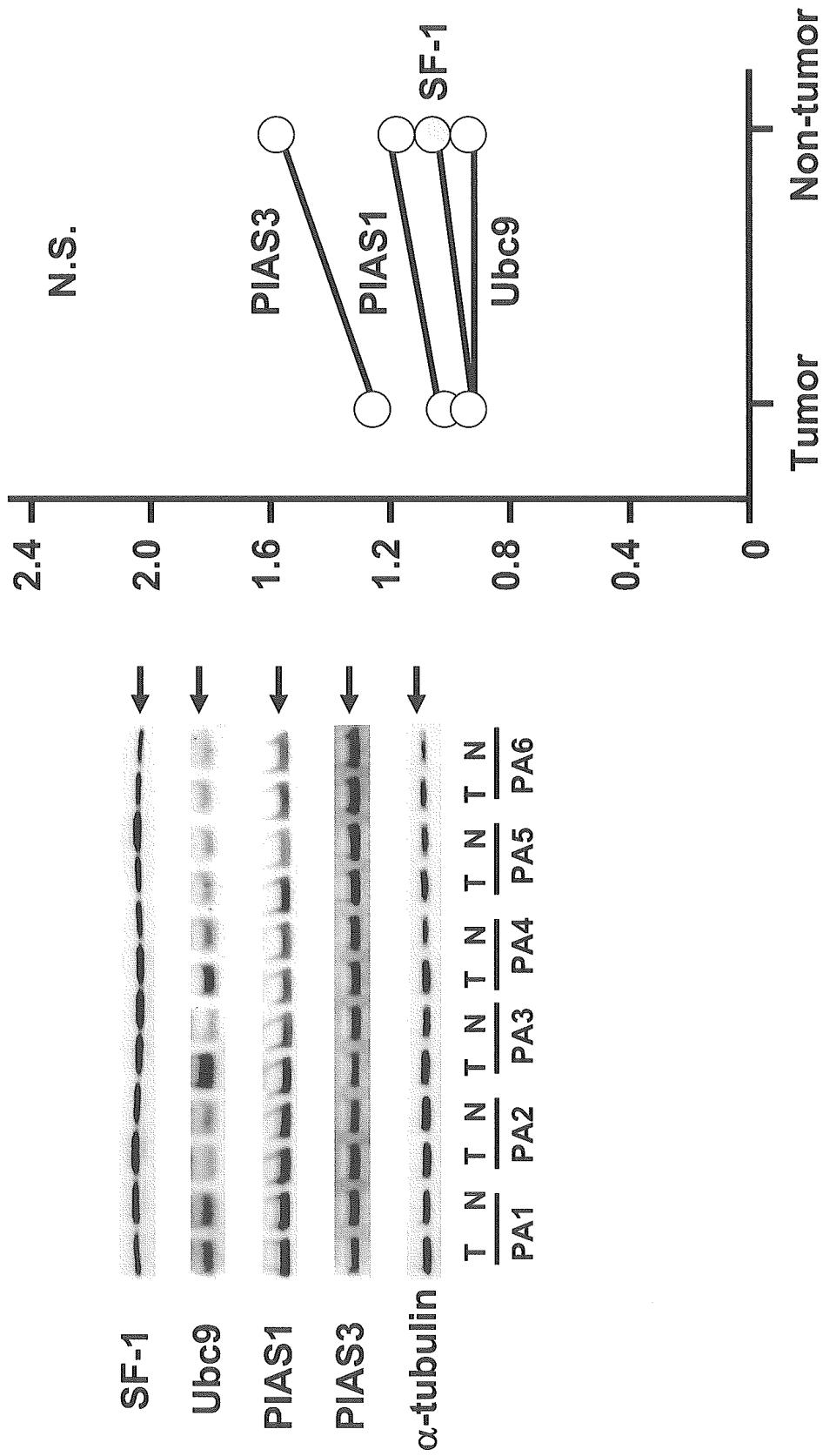


図5 原発性アルドステロン症(PA)副腎におけるUbc9およびPIAS1の発現

T: 腫瘍部、N:非腫瘍部

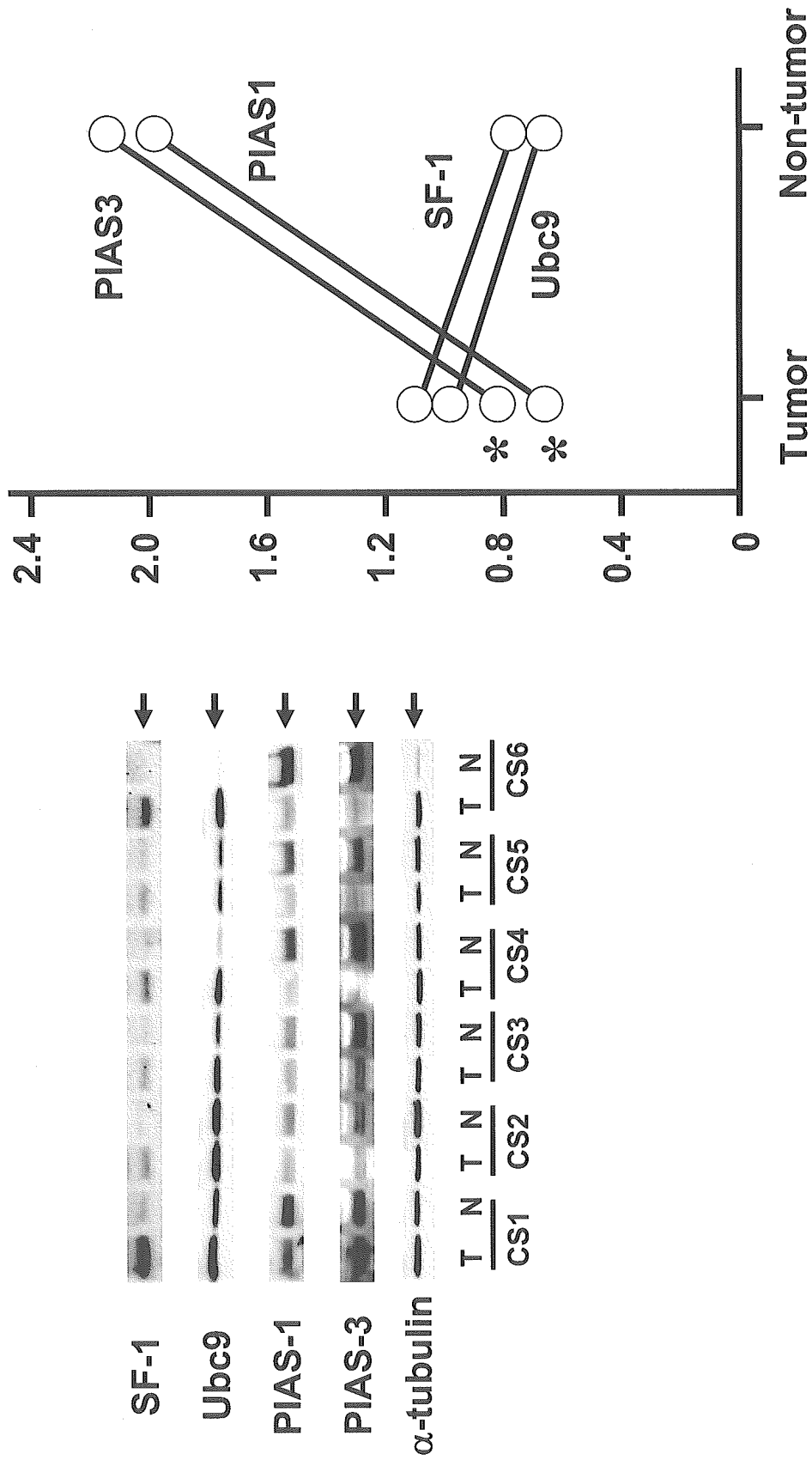


図6 クッシング症候群(CS)副腎におけるUbc9およびPIAS1の発現

T: 腫瘍部、N:非腫瘍部

副腎細胞再生に関する研究

権藤重喜、柳瀬敏彦、岡部泰二郎、田中智子、森永秀孝、野村政壽、後藤公宣、
名和田 新

九州大学大学院医学研究院病態制御内科

研究要旨

副腎不全に対してはステロイドホルモン補充療法が確立されてはいるが、一生涯続けなければならない、また、感染や創傷等に起因した急性副腎不全に対応することはしばしば困難を伴う。このため我々は、再生副腎細胞移植の確立を目指し、副腎細胞の再生を試みている。今回、間葉系骨髄細胞に大変近いと考えられるマウス長期培養骨髄細胞に SF-1 を強制発現することにより、多種ステロイドを ACTH 反応性に長期間産生する細胞の分化に成功した。さらに、この細胞を副腎不全モデル免疫不全マウスに移植することにより、急性副腎不全のレスキュー効果とその後の延命効果を確認した。更なる研究が求められるが、SF-1 誘導ステロイド産生骨髄細胞の自己細胞移植が副腎不全に対するもう一つの治療可能性を提供するかもしれない。

A. 研究目的

副腎不全や性腺機能不全に対しては、ステロイドホルモン補充療法が確立されており、これらの患者に多くの利益をもたらしている。しかし、これらの治療は、特に副腎不全の場合、一生涯続けなければならない、また、感染や創傷等に起因した急性副腎不全に対応することは、患者にとってしばしば困難を伴う。このため我々は、再生副腎細胞移植の確立を目指し、副腎細胞の再生を試みることにした。

SF-1/Ad4BP は、殆どのステロイド産生組織に特異的な転写因子として同定され、核内レセプタースーパーファミリーに属する (Omura & Morohashi 1995; Parker & Schimmer 1997)。SF-1/Ad4BP の破壊は副腎と性腺の欠如をもたらす (Ingraham et al. 1994; Luo et al. 1994; Morohashi & Omura 1996) ことから、SF-1 はステロイド合成及びステロイド産生組織の発達に重要である。恒常的な SF-1 発現により、ES 細胞はステロイド産生能を獲得し、cAMP 及びレ

チノイン酸依存性に P450_{scc} が誘導され、プロゲステロンを産生する (Crawford et al. 1997)。しかし、このステロイド産生能はプロゲステロンの合成段階に限定されており、また、ミトコンドリア外膜透過性外来基質である 20 α -hydroxycholesterol の添加が必要なため *de novo* のステロイド合成ではない。

骨髄細胞移植により、骨髄細胞はいくつかの臓器において、造血系リネージ、間葉系リネージの再生に寄与することが最近の多くの研究から示唆されている (Petersen et al. 1999; Brazelton et al. 2000; Lagasse et al. 2000; Mezey et al. 2000; Orlic et al. 2001)。これらの能力はレシピエント細胞との自然発生的な細胞融合に一部起因しているかもしれない (Terada et al. 2002; Ying et al. 2002) が、骨髄細胞には様々な臓器に分化する多能性前駆細胞が確かに含まれている。

骨髄幹細胞がステロイド産生細胞へ分化するかどうかは明らかにされていない。このため、我々は、SF-1 の骨髄細胞へ

の導入により、ステロイド産生細胞が創生されるか否かを検討した。

B. 研究方法

1. ウシ SF-1/Ad4BP 発現アデノウイルスベクター作成

adenovirus expression vector kit (タカラ) と諸橋教授 (岡崎国立基礎生物研究所) より提供していただいたウシ SF-1/Ad4BP cDNA (Honda et al. 1993) を使用し、ウシ SF-1 発現アデノウイルスベクター (Adx-bSF-1) を作製した。

2. 長期骨髄培養及びアデノウイルス処理

3月齢雄 B6-GFP マウス {C57/6Tg14 (act-EGFP) osbY01、山田先生 (京都大学) より提供いただいた} もしくは 4月齢 雄 129SVJ マウスより採取した骨髄細胞を、前述の方法 (Dexter et al. 1977) に修正を加え、33°C、5% CO² の条件下、付着細胞のみを数週間培養した。120-180 日間前培養後、60mm dish (Nunc) に播き、コンフルエントになってから約 10 PFU/cell のアデノウイルスに感染させ、37°C、5% CO² の条件下、培養した。実験の対照として、 β -galactosidase を発現する遺伝子改変アデノウイルス (Adx-LacZ) を骨髄細胞に感染させた。

3. 培養液中に骨髄細胞より分泌されたステロイドの測定

SRL の協力により、RIA kits (Diagnostic Products Corp., LA) 及び SRL にて確立された RIA システム (Den et al. 1978) を用い、培養液中のステロイドホルモンを測定した。

4. 定量的リアルタイム PCR

培養骨髄細胞と Y-1 細胞では RNeasy mini kit (Qiagen) を、また、マウス精巣と副腎では Isogen (和光純薬)

を使用して、RNA を抽出後、total RNA 5mg より一本鎖 DNA を合成した。Light Cycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) で前述の方法 (Mukasa et al. 2003) を用いて、StAR、ACTH 受容体 (ACTH-R) 及び各種ステロイド合成関連酵素等の mRNA 発現を定量的に解析した。相対発現レベルは β -Actin で補正された。

5. フローサイトメトリー

骨髄細胞 3 × 10⁵ 個を PE (phycoerythrin) が結合した各種モノクローナル抗体 (BD Biosciences, Japan) もしくはアイソタイプ適合 PE 結合ラット IgG (BD Biosciences) で 4°C、30 分処理し、FACScan flow cytometer (Becton Dickinson) で解析した。

6. 免疫染色

Zenon Rabbit IgG labeling kits (Molecular probes, Inc., OR) で標識したウサギ抗 P450scc 抗体 (RDI, NJ) もしくは免疫前血清を用いて免疫染色を行った。35mm ディッシュのコラーゲン I ゲル薄膜 (アサヒテクノグラス) に播かれた細胞を 4% paraformaldehyde で 4°C、1 時間固定し、プロトコールに従い染色後、蛍光顕微鏡 (BX-51; オリンパス) で観察した。

7. ウイルス感染長期培養骨髄細胞の副腎不全モデル免疫不全マウスへの移植

ホストには免疫不全マウス (SCID mouse) を用いた。両側副腎摘出を day 0 とし、day -10 に長期培養骨髄細胞にウシ SF-1 発現ウイルスを感染させ、day -3 に片側副腎切除を行うとともに、ウイルス感染細胞を腎被膜下に投与した。

8. 解析

One-factor ANOVA を用いた。P < 0.05 を統計的有意とした。

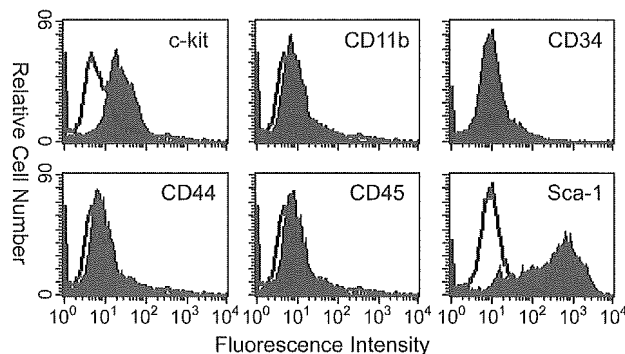
C. 研究結果

長期培養骨髄細胞に Adx-bSF-1 感染後 7 日間培養し、その後の 4 日間に蓄積した培養液中のステロイド含量を測定したところ、この細胞は有意な量の多種ステロイドを産生することが明らかになった。Adx-LacZ 感染の対照細胞培養液では、S を除きステロイドは全て検出されなかった。対照培養液中に検出された微量の S は、恐らく、S 抗体の hydrocortisone への交差反応 (9.5%) のためであり、有意のステロイド前駆体生成はないと考えられる (Fig. 1A)。この実験で用いられた、アデノウイルス感染 11 日目の細胞の定量的リアルタイム PCR により、StAR 及び各種ステロイド合成関連酵素の mRNA 発現が Adx-SF-1 感染骨髄細胞で認められたが、Adx-LacZ 感染細胞では認められなかった。P450ald の mRNA 発現は証明出来なかった。ACTH-R は Adx-LacZ 感染細胞でも発現していたが、その発現レベルはとも低かった (副腎発現の 2/1000) (Fig. 1B)。我々は全く同様の骨髄細胞におけ

るステロイドプロフィールを 129SVJ マウスでも観察しており、ストレインによる骨髄細胞のステロイド産生能の差はほとんど無いと思われる。Adx-bSF-1 感染 4 日目の長期培養骨髄細胞の P450scc 抗体による免疫染色により P450scc の発現が確認された (Fig. 1C)。

上記実験で用いた骨髄細胞の表面マーカーをフローサイトメトリーで解析した (Fig. 2)。造血細胞特異的な CD45 が陰性であった。単球、マクロファージのマーカーである CD11b もまた陰性であった。マウス間葉系幹細胞のマーカーは完全には明らかにされておらず、また、議論の余地もあるが (Jiang et al. 2002; Sun et al. 2003)、このような潜在的マーカーの一つである CD44 は我々の骨髄細胞では陰性であった。加えて、造血系および間葉系の幹細胞・前駆細胞マーカーである c-kit と Sca-1 が陽性であった。これらの結果により、ステロイド産生細胞は多能性を持つ未熟な幹細胞に起原すると思われる。

Fig. 2



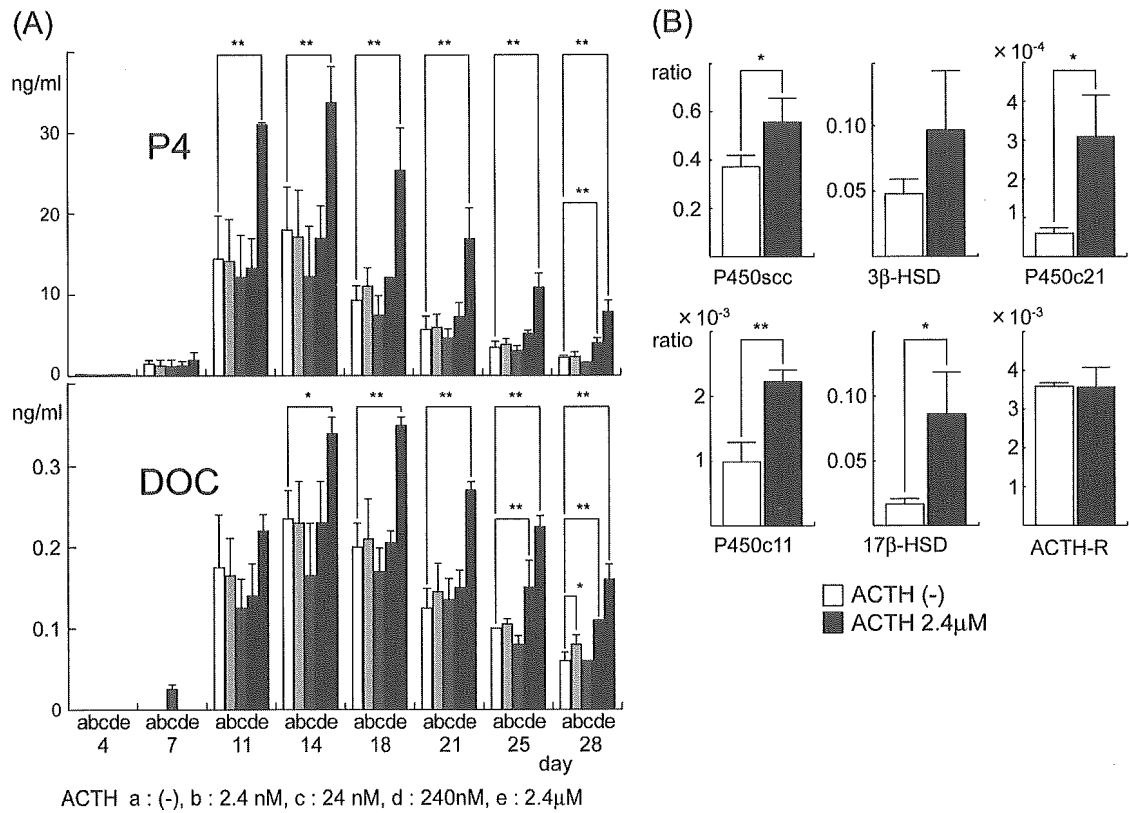
ACTH-R の発現が確認されたため、次に、我々は ACTH 反応性を P4、DOC を測定することにより検討した。ACTH は Adx-bSF-1 感染骨髄細胞からのこれらステロイドの産生を用量依存性に刺激

した (Fig. 3A) が、Adx-LacZ 感染細胞では刺激されなかった。2.4 μ M の ACTH によるステロイド産生関連酵素、つまり、P450scc、3 β -HSD、P450c21、P450c11 及び 17 β -HSD の mRNA 誘導

も real time RT-PCR により確認された (Fig. 3B)。17 β -HSD type 3 の ACTH によるユニークな誘導は、胎児及び新生

児マウス精巣での ACTH による T 産生直接刺激 (O'shaughnessy et al. 2003) の傍証となるかもしれない。

Fig. 3

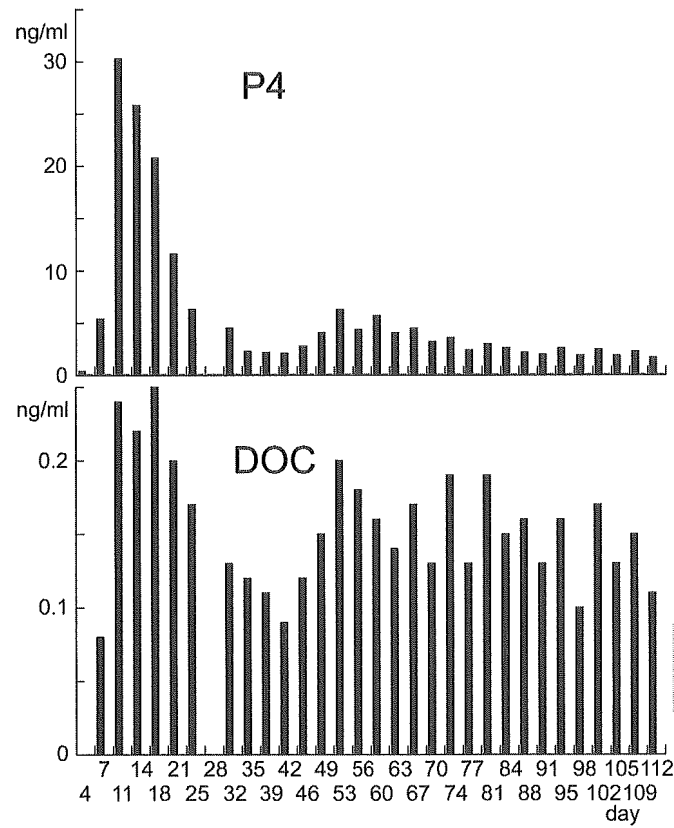


Adx - bSF - 1 感染により、どの程度の期間、骨髄細胞のステロイド産生が続くかを検討したところ、有意な P4 及び DOC の産生が少なくとも 112 日間続いた (Fig. 4A)。アデノウイルスの半減期 (2-3 週) から、この長期ステロイド産

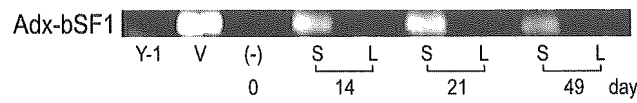
生は予想外であり内因性 SF - 1 の誘導を疑ったが、感染後 49 日後まで、RT-PCR にて内因性マウス SF - 1 の発現を確認することが出来ず、アデノウイルス由来のウシ SF - 1 を検出した (Fig. 4B)。

Fig. 4

(A)



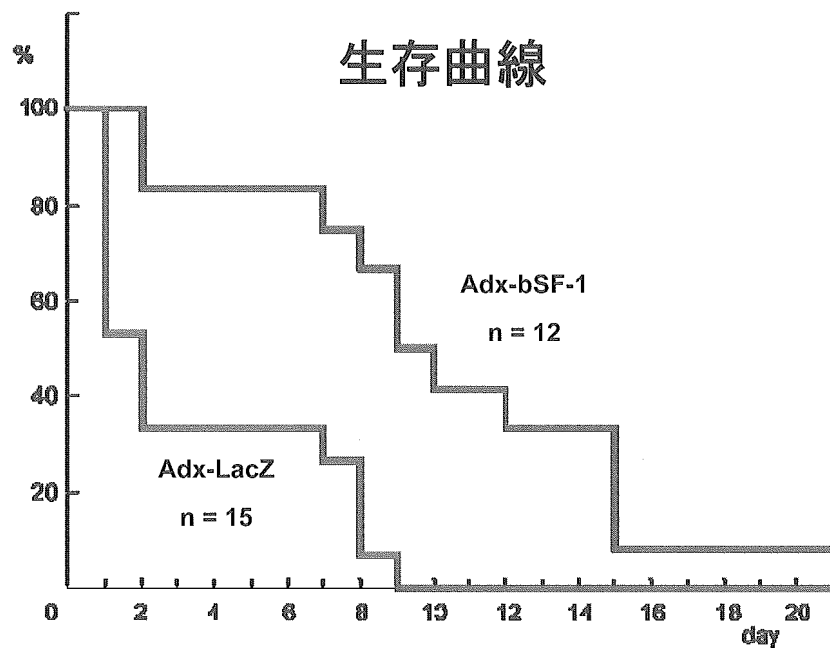
(B)



最後に、Adx - SF1 感染長期培養骨髄細胞を両側副腎摘出副腎不全モデル免疫不全マウスの腎被膜下に移植したところ、副腎不全急性期の rescue 効果と、その後の延命効果を認めた (Fig. 5)。移植方法、

ベクター、栄養血管等々について更なる検討が必要ではあるが、SF - 1 誘導ステロイド産生骨髄細胞の自己細胞移植の可能性を示唆していると思われる。

fig. 5



D. 考察

本研究において、我々は、アデノウイルスによる SF-1 の強制発現により骨髄細胞が ACTH 反応性ステロイド産生細胞に分化し、さらにこの細胞が副腎不全をレスキューすることを初めて示した。

Adx-bSF-1 感染長期培養骨髄細胞は、副腎と性腺のステロイド産生パターンが混合したプロフィールを呈す。P450c17 はヒトの副腎に発現しているがマウス副腎では発現していないため、骨髄細胞での P450c17 の発現と 17α -水酸化ステロイド、S の有意な産生は、種を越えたステロイド産生プロフィールを示唆している。これらの発見はステロイド産生細胞分化における骨髄細胞の多能性や、ステロイド産生組織の共通起原、つまり、幹細胞の可能性を示唆している。これらの幹細胞の起原についてはほとんど解明されていないが、SF-1 発現プロフィールの研究により胎児の未分化副腎皮質と性腺は副腎性腺共通源基を起原とすることが示されている (Hatano et al. 1996)。

驚くべきことに、Adx-bSF-1 感染長期培養骨髄細胞の P4・DOC 産生は少なくとも 112 日間続いた。興味深いことに、

DOC 産生は比較的持続したが、P4 産生は 18-25 日目頃から急激に減少した (Fig. 5A)。この、ステロイド産生状況の時間依存的変化は骨髄細胞の分化課程を反映しているのか、もしくは、単にステロイド産生酵素の安定性の差を反映しているだけなのか、将来、解明する必要がある。アデノウイルスの半減期は 2-3 週であり、我々は内因性 SF-1 の発現誘導は検出できなかったが、ステロイド産生は我々の予測より遥かに長い期間続いた。アデノウイルスによる bSF-1 の持続的発現は、たとえそれが低レベルであっても、骨髄の長期かつ多様なステロイド産生には充分なのかもしれない。もう一つの可能性として、SF-1 はステロイド産生の開始には必要であるが維持にはそれほど重要でないのかもしれない。

骨髄細胞の副腎もしくは性腺ステロイド産生細胞への多分化能は、将来、副腎・性腺細胞分化の組織・部位・細胞特異的機序を解明する重要なモデルとなるかもしれない。球状・束状層間の未分化層が副腎幹細胞層と推測されており、SF-1 を発現している (Mitani et al. 2003)。免疫不全マウスにおける、ウシ副腎細胞

による異種副腎組織形成の成功により、副腎内幹細胞の存在も推測されている (Thomas et al. 1997, 2000)。仮説だが、骨髄由来幹細胞が副腎幹細胞層に定着し、SF-1 発現が可能になるのかもしれない。

本研究において、120-180 日間 (12-18 継代) 培養することにより、我々は比較的純化された骨髄細胞群を増幅し、それらに Adx-bSF-1 を感染させてステロイド産生特性をみる実験に用いた。この骨髄細胞は依然混合性の細胞群を成しているものの、細胞表面マーカーの分析は、ステロイド産生細胞が多能性でかつ未熟な幹細胞を起源とする事を強く示唆している。重要なことに、我々はこの長期培養骨髄細胞がアルカリフォスファターゼに染まる骨芽細胞様に分化することを確認しており、このことは本ステロイド産生細胞の特性が間葉系骨髄細胞に大変近い事を示唆している。しかし、これらのステロイド産生細胞の正確な起原は不明であり、更なる研究が望まれる。

ステロイドホルモン補充療法が確立され、副腎不全患者や性腺機能不全患者に多くの利益を供与している。しかし、このような治療は、特に副腎不全の場合、一生継続しなければならない。このため、遺伝子治療や、ステロイド産生細胞移植といった新たな治療法が有効なのかもしれない。上記異種副腎細胞移植 (Thomas et al. 1997, 2000) に加え、先天性副腎過形成に対する遺伝子治療の可能性が示された。すなわち、21-hydroxylase 欠損マウスに CYP21 をコードしたアデノウイルスベクターを副腎内注入することにより、薬品・ホルモンの代替治療となり得る可能性が示された (Tajima et al. 1999)。更なる研究が求められるが、本研究における SF-1 誘導

ステロイド産生骨髄細胞の自己細胞移植は副腎不全に対するもう一つの治療可能性を提供するかもしれない。治療適応の可否を決定するためには、これらの骨髄由来細胞の限界と生物学的重要性が更に検討される必要がある。

E. 結論

間葉系骨髄細胞に大変近いと考えられるマウス長期培養骨髄細胞にアデノウイルスを用いて SF-1 を強制発現することにより、多種ステロイドを ACTH 反応性に長期間産生する細胞の分化に成功した。さらに、この細胞を副腎不全モデル免疫不全マウスに移植することにより、急性副腎不全のレスキュー効果とその後の延命効果を確認した。我々は、副腎再生への第一歩を踏み出すことができた。更なる可能性に向け、この歩みを続けていくつもりである。

F. 研究発表

1. 論文発表

Gondo, S., Yanase, T., Okabe, T., Tanaka, T., Morinaga, H., Nomura, M., Goto, K., Nawata, H.

SF-1/Ad4BP Transforms primary long-term cultured bone marrow cells into ACTH-responsive steroidogenic cells. *Genes Cells* 9:1239-1247, 2004

Chu, S., Nishi, Y., Yanase, T., Nawata, H., Fuller, P.J.

Transrepression of Estrogen Receptor β Signaling by Nuclear Factor- κ B in Ovarian Granulosa Cells *Molecular Endocrinology* 18:1919-1928, 2004

Kubo, M., Nakamura, M., Tasaki, A., Yamanaka, N., Nakashima, H., Nomura, M., Kuroki, S., Katano, M.

Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer

Cancer Research 64 : 6071-6074, 2004

Morinaga, H., Yanase, T., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Harada, N., Nawata, H.
A Benzimidazole fungicide, benomyl, and its metabolite, carbendazim, induce aromatase activity in a human ovarian granulosa-like tumor cell line (KGN).

Endocrinology 145 : 1860-1869, 2004

Fukuda, T., Uchida, H., Suzuki, M., Miyamoto, H., Morinaga, H., Nawata, H., Uwajima, T.

Transformation products of bisphenol A by a recombinant *Trametes villosa* laccase and their estrogenic activity

J Chem Technol Biotechnol 79 : 1212-1218, 2004

Ohno, K., Araki, N., Yanase, T., Nawata, H., Iida, M.

A novel nonradioactive method for measuring aromatase activity using a human ovarian granulosa-like tumor cell line and an estrone ELISA

Toxicol Sci. 82 : 443-450, 2004

Fan, W., Yanase, T., Wu, Y., Kawate, H., Saitoh, M., Oba, K., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Yanagisawa, J., Kato, S., Takayanagi, R., Nawata, H.

Protein kinase A potentiates adrenal 4 binding protein/steroidogenic factor 1 Transactivation by reintegrating the subcellular dynamic interactions of the nuclear receptor with its cofactors, general control nonderepressed-5 / transformation /transcription domain-associated protein, and suppressor, dosage-sensitive sex reversal-1 : a laser confocal imaging study in living KGN cells.

Molecular Endocrinology 18 : 127-141, 2004

Liu, W., Fan, WQ., Yanase, T., Saitoh, M., Wu, Y.

Activation of protein kinase A alters subnuclear distribution pattern of human steroidogenic factor 1 in living cells.

Chin Med J (Engl) 117 : 1017-1022, 2004

Taniyama, M., Tanabe, M., Saito, H., Ban, Y., Nawata, H., Yanase, T.

Subtle 17 α -hydroxylase/17, 20-lyase deficiency with homozygous Y201N mutation in an infertile women

J. Clin. Endocrinol. Metab. 90 : 2508-2511, 2005

Wu, Y., Ghosh, S., Nishi, Y., Yanase, T., Nawata, H., Hu, Y.

The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFIB modulate aromatase gene expression in ovarian granulosa cells: A possible mechanism for repression of aromatase expression upon luteinizing hormone surge.

Endocrinology 146 : 237-246, 2005

Nishi, Y., Hosoda, H., Mori, K., Kaiya, H., Sato, T., Fukue, Y., Fukushima, N., Yanase, T., Nawata, H., Kangawa, K., Kojima, M.

Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl modification of ghrelin

Endocrinology 146 : 2255-2264, 2005

Ashida, K., Goto, K., Zhao, Y., Okabe, T., Yanase, T., Takayanagi, R., Nomura, M., Nawata, H.

Dehydroepiandrosterone negatively regulates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase.

Biochem. Biophys. Acta 1728 : 84-94, 2005

Fan, W., Yanase, T., Wei, L., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Harada, N., Nawata, H.

Activation of peroxisome proliferator activated receptor γ and retinoid X receptor inhibits aromatase transcription via nuclear factor- κ B

Endocrinology 146 : 85-92, 2005

Fan, W., Yanase, T., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Sato, T., Kawano, H., Kato, S., Nawata, H.

Androgen receptor null male mice develop late-onset obesity caused by decreased energy expenditure and lipolytic activity

but show normal insulin sensitivity with high adiponectin secretion. Diabetes 54 : 1000-1008, 2005

柳瀬敏彦、名和田 新
急性副腎不全
救急マニュアル 2004 総合臨床(増刊号)53: 1187-1189, 2004

柳瀬敏彦
副腎インシデンタローマ
今日の治療指針 2004 P544, 2004

柳瀬敏彦
特集 どう読むか臨床検査値 内分泌検査
—副腎皮質・性腺ホルモン
臨床と研究 81 : 612-618, 2004

柳瀬敏彦
副腎低形成 (アジソン病)
特定疾患ハンドブック P131, 2004

柳瀬敏彦
副腎酵素欠損症
特定疾患ハンドブック P130, 2004

柳瀬敏彦
11.1 副腎皮質ホルモンコルチゾール
ホルモンの事典 416-424, 2004

柳瀬敏彦
プレクリニカルクッシング症候群って何?
—副腎インシデンタローマの考え方—
内分泌疾患のとらえかた 眼でみるベッド
サイドの病態生理 163-167, 2004

柳瀬敏彦
二次性高血圧 副腎酵素欠損症
日本臨床増刊号 高血圧と高血圧性臓器障
害—臓器障害の予防と管理— 62 : 531-535,
2004

後藤公宣
副腎アンドロゲンと骨代謝
Osteoporosis 12 : 15-19, 2004

岡部泰二郎、名和田 新
Addison 病、急性副腎不全
今日の治療と看護 590-593, 2004

柳瀬敏彦、名和田 新
知っておくべき高血圧の知識 7. 私の処方
箋 副腎酵素異常高血圧
腎と透析 57 : 337-338, 2005

柳瀬敏彦
副腎性器症候群
今日の治療指針 2005 P548, 2005

柳瀬敏彦
内分泌疾患 Update 副腎の発生分化と再生
医学のあゆみ 213 : 397-400, 2005

渡辺哲博、柳瀬敏彦
特集:内科疾患の診断基準 14. 副腎皮質機能
不全の診断基準、病型分類
内科 95 : 1826-1830, 2005

2. 学会発表

クリニカルアワー 2 先天性副腎皮質ステ
ロイド合成異常症の臨床
17 α -水酸化酵素 /17, 20- リアーゼ欠損症の
臨床と遺伝学
柳瀬敏彦、名和田 新
第 77 回日本内分泌学会学術総会 (平成 16 年
6 月 24 日~ 26 日 京都)

巨大副甲状腺腫瘍と、副腎結節性過形成を合
併した一例
後藤公宣、野村政壽、岡部泰二郎、柳瀬敏彦、
名和田 新
第 77 回日本内分泌学会学術総会 (平成 16 年
6 月 24 日~ 26 日 京都)

第 4 回 日本再生医療学会総会
ワークショップ 11 「幹細胞・ES 細胞- 2」
SF-1/Ad4BP の発現導入はマウス初代培養骨
髄細胞を ACTH 応答性ステロイドホルモン
産生細胞に形質転換する
第 4 回 日本再生医療学会総会 (平成 17 年 3
月 1 日~ 2 日 大阪)
権藤重喜、岡部泰二郎、柳瀬敏彦、名和田
新

G. 知的財産権の出願・登録状況

1) 特許取得
出願番号: 特願 2004-289709

出願日：平成 16 年 10 月 1 日
発明の名称：新規ステロイド産生細胞
発明者；権藤重喜、柳瀬敏彦、岡部泰二郎、名
和田 新

2) United States Patent

Patent No : US 6,803,206 B2

Date of Patent : Oct 12, 2004

Method for identifying endocrine disruptors
and kit for carrying out the same.

Innovators : Hajime Nawata, Toshihiko
Yanase

Assignee : Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.,
Osaka (JP)

(2) ミネラルコルチコイド、MR、
原発性アルドステロン症

副腎静脈血サンプリングによる局在診断法－その有用性と問題点

西川哲男、齋藤 淳、伊藤浩子、伊藤 譲、大村昌夫*

横浜労災病院内分泌・代謝内科、社会保険総合中央病院糖尿病・内分泌内科*

研究要旨：

2次性高血圧症である原発性アルドステロン症（PA）は、高血圧症の約6%を占めると我々は報告してきた。PAは手術にて高血圧治療が可能で根治するにはその病変部位を的確に診断する技術の開発が重要である。そこで、機能的局在診断法として選択的副腎静脈採血（adrenal venous sampling：AVS）にて、ACTH負荷を行う事により、よりの確な診断法が確立された。本法にて微小病変の特定も可能となり手術にて完治し得る疾患の正確な診断が可能となった。

A. 研究目的

2次性高血圧症である原発性アルドステロン症（PA）は、高血圧症の約6%を占めると我々は報告してきた。PAは低レニン性高アルドステロン血症を確認することでスクリーニングが可能である。確定診断の為に各種負荷試験を行うが、特に直接副腎静脈血中アルドステロン濃度（PAC）の過剰分泌を証明する事が確定診断となる。一方、PAの副腎病変の画像診断は他の副腎疾患に比較して難しい。すなわち、微小副腎病変の局在診断（例えば6mm以下の腫瘍）を行う上では、CT、¹³¹I-アドステロールシンチグラムでは正常所見を示し易く、その病変側の確定が困難である。一方、選択的副腎静脈採血（adrenal venous sampling：AVS）にて、各種ステロイドホルモンを測定して確定診断並びに病変側の局在診断に用いようとする手技は古くから行われてきた。例えば、副腎腺腫によるPAと副腎皮質過形成によるPA（idiopathic hyperaldosteronism：IHA、特発性アルドステロン症）は、生化学的に鑑別することが困難である。そこで、AVSの手技、診断基準並びにそれらの問題点について検討を行った。

B. 研究方法

1) 対象

過去5年間に於て当院にて精査を行ったPA疑い症例74例、並びに他の副腎疾患56例の合計130例を対象に以下に示したACTH負荷前後のAVSを行った（図1）。事前に対象症例に対して本検査の手技内容と副作用等の起こりうる事故に関して充分説明し文書にて同意を取得した後検査を行った。

2) 方法

本検査施行当日の午前中は出来るだけ身体的負荷を掛けないよう配慮し軽歩行とベッド安静のみ許可しストレスを避けるようにする。昼食は絶食として、午後1～2時にカテーテル室に移動し出来るだけ静かに安静を保つようにする。鼠径部よりセルジンガー針を用いて大腿静脈に刺入する。通常は、右鼠径部を刺入点としてカテーテルを挿入した。ガイドワイヤーをカテーテルに交換し、副腎の中心静脈に挿入する。カテーテルの先端が正確に位置するか否かは造影剤を注入して確認した。カテーテルの挿入は左副腎静脈の方が右副腎静脈より簡単である為、先に左からサンプリングして、右に移行して採血後はその位置にウェッジして0.