

# Disabled-2 の副腎皮質における機能と副腎腺腫での発現

宗 友厚、諏訪哲也、村松 学、武田 純  
岐阜大学大学院医学系研究科内分泌代謝病態学分野

## 【研究要旨】

近年、抗アルドステロン療法が心不全の予後の改善に有効であることが証明され、心血管病変進展へのアルドステロン関与の重要性が認識された。しかし、アルドステロン産生そのものを持続的に抑制する治療方法は確立されていない。我々はアンジオテンシン II (AII)により発現調節を受ける遺伝子を新しい抗アルドステロン療法のターゲットと考え、低Na食によるラット副腎の遺伝子発現の変化についてDNAオリゴマイクロアレイによる解析を行った。その結果、低Na食により Disabled-2 (Dab2) の発現が増加することを発見した。in situ hybridization ではDab2 mRNA は球状層に限局して発現していた。低Na食により球状層内部のDab2 の発現は増強したが、球状層特異的な分布に変化はなかった。免疫染色でも同様の蛋白発現パターンと低Na食による発現増加を確認した。さらに、Dab2 蛋白はヒト副腎皮質組織においても球状層に強く発現しており、アルドステロン産生腫瘍ではびまん性の発現を認めた。Dab2 は、腫瘍抑制因子、アダプター分子、Wnt シグナル調節因子等としての役割を担う多機能分子と考えられている。副腎皮質においては、Dab2 の発現は球状層特異的に A-II シグナルによって制御され、球状層細胞の分化・増殖に関与している可能性が強く示唆された。

## A. 研究目的

The Randomized Evaluation Study (RALES) と the eplerenone post acute myocardial infarction efficacy and survival study (EPHESUS) の結果から、抗アルドステロン療法が心不全の予後の改善に有効であることが証明され、心血管病変進展へのアルドステロン関与の重要性が認識された。また、いわゆる本態性高血圧症とされてきた症例の中にも相当数の原発性アルドステロン症が含まれている可能性が指摘されている。しかし、アルドステロン産生そのものを持続的に抑制する治療方法は確立されていない。レニン-AII 系は副腎皮質球状層に対し、強いアルドステロン分泌刺激作用や細胞数増加作用を持つ。我々は AII により発現調節を受ける遺伝子

の中に新しい抗アルドステロン療法のターゲットが含まれると考えた。

## B. 研究方法

### 1. 実験動物とヒト副腎腫瘍組織

Wistar ラット (200g、雄) に通常食または低Na食 (日本クレア) を7日間給餌した後、副腎を摘出した。また、1992年から2002年までの間に岐阜大学医学部附属病院および関連病院にて片側副腎摘出術を受けたアルドステロン産生腫瘍 (APA) 患者26例 (男性10例/女性16例、25-58歳) およびコルチゾール産生腫瘍 (CS) 患者22例 (男性1例/女性21例、24-59歳) の腺腫組織を使用した。なお、対象患者からはいずれも予め書面でインフォームドコンセントを得た。Total RNA は RNeasy (Qiagen) により抽出され、2100 bioanalyzer (Agilent

technologies)でインテグリティを確認した。

## 2. DNA オリゴマイクロアレイ

Amino Allyl MessageAmp™ aRNA (Ambion)を用いて合成した5 mgのアミノアリルRNAにCy3あるいはCy5をカップリングさせRat Oligo Microarray (Agilent technologies)に60°Cで17時間ハイブリダイゼーションを行った。アレイの洗浄、乾燥後、ChipReader (BioRad)で蛍光シグナルをコンピューター画像化し、ScanAlyze (Michael Eizen, Stanford)を用いて数値化した。

## 3. リアルタイムPCR

Total RNA からcDNAを合成し、遺伝子特異的なプローブ-プライマーセット (gene expression assay) と7900HT sequence detection system (Applied biosystems)を用いたリアルタイムPCRによりmRNAを定量した。各遺伝子の発現定量にはGAPDHまたは18Sによる補正を行った。

## 4. In situ hybridizationと免疫染色

コントロールおよび低Na食ラットの副腎、ヒト正常副腎および副腎腫瘍を固定後にパラフィンブロックを作製。ラット副腎cDNAを鋳型にラットDab2特異的プライマー5'-CAA GAT TAA TGA ACC ACC AA-3' (センス, nt 2133-2152)、5'-CAA TTA GCT GAG AAA GAC CA-3' (アンチセンス, nt 2859-2878)を用いて増幅したPCR産物をpCR II-TOPO (Invitrogen)にクローニングし、3100 genetic analyzer (Applied biosystems)を用いて塩基配列を確認後、DIG RNA labeling kit (Roche)を使用しアンチセンスとセンスプローブを合成した。ラット副腎パラフィン切片1枚あたり10 ngのプローブを使用しDiscovery (Ventana)によるハイブリダイゼーション、洗浄、Blue Map Kit (Ventana)による発色を行った後、Pixera Penguin 150CL (Leica)

で撮影した。同様に、ラット副腎とヒト副腎・副腎腫瘍パラフィン切片に対し、100倍希釈抗Dab-2抗体(H-110, Santa Cruz)、抗ラット・アルドステロン合成酵素血清(Celso E Gomez Sanchez 教授から提供)、Dab Map Kit (Ventana)を用いて免疫染色を行った。

## 5. 培養細胞

Angiotensin II、BayK8644、(Bu)<sub>2</sub>cAMPはSigmaから、TPAはWakoから購入した。DMEM/F-12 (5%FBS, Insulin-Transferrin-Selenium) (Invitrogen)で培養したH295R細胞を、6ウェルディッシュにサブカルチャー(1X10<sup>6</sup>個/ウェル)し、その24時間後に無血清の培養液に置換、さらに12時間後に各種刺激実験に供した。

## C. 研究結果

DNAオリゴマイクロアレイによる解析の結果、7日間の低Na食により約22000個の遺伝子のうち25個に2倍あるいは1/2の発現変動を認めた。中でもDab2の発現は7日間の低Na食によりコントロールの約4倍にも増加することを発見した。リアルタイムPCRによる定量検証結果も同様であった(図1a)。コントロール副腎のin situ hybridizationではDab2 mRNAは球状層に限局していた。(図1b)免疫染色でもin situ hybridizationと同様に球状層全層に及ぶ蛋白発現パターンを認めた。低Na食により球状層内の蛋白発現はmRNA同様増加した(図2a)。一方、アルドステロン合成酵素は球状層外側の一部の細胞にのみ認められ、Dab2の発現パターンとは一致しなかった(図2b)。さらに、Dab2蛋白はヒト正常副腎皮質組織においても球状層に強く発現しており(図3a)、APAでは腫瘍被膜や非腫瘍部付随副腎に比して明らかなびまん性の高発現を認めた(図3b)。リアルタイムPCRによるmRNA定量では、CSもしくはアルドステロン産生腫瘍の非腫瘍部付随副腎に比

して、アルドステロン産生腫瘍で Dab2 の高発現を認めた (図 4)。AII、高 K 刺激は共に H295R 細胞の CYP11B2 mRNA 発現を増加させたが、Dab2 mRNA 発現は AII では増加したが、高 K 刺激には反応しなかった (図 5a)。また、H295R 細胞の Dab2 mRNA 発現は TPA により増加したが、BayK8644、(Bu)<sub>2</sub> cAMP では増加しなかった (図 5b)。

#### D. 考察

本研究により Dab2 は副腎においては球状層特異的に発現していることが明らかとなった。また、アルドステロン産生腫瘍での Dab2 高発現も見られ、副腎皮質細胞のアルドステロン産生性に対する Dab2 の何らかの役割が示唆された。

H295R を用いた AT1 受容体の下流シグナルの検討では、CYP11B2 発現が細胞内 Ca 濃度上昇に依存するのに対し、Dab2 発現には PKC 活性化が重要であると考えられた。球状層中での Dab2 とアルドステロン合成酵素の発現パターンの差は、こうした違いによるものかもしれない。また、高 K 刺激、PKA 活性化では Dab2 発現増加は起こらず、AII、K、ACTH はいずれもアルドステロン産生刺激であるにもかかわらず、Dab2 増加効果は AII に特異的であると考えられた。

Dab2/DOC-2 はもともと卵巣癌における腫瘍抑制因子候補として同定されたが、現在では、アダプター分子、Wnt シグナル調節因子等としての役割を担う多機能分子と考えられている。また、最近 Dab2 の DVL3 などを介しての Wnt シグナルにおける抑制因子としての役割も提唱されている。我々は、DKK3、WNT4、FZD1、FZD2、DVL3 などの Wnt シグナルを構成する種々の遺伝子がヒト副腎に発現していることを発見しており、その一部は Dab2 同様球状層特異的に発現している。Dab2 が Wnt シグナルを介して球状層細胞の分化、増殖、zonation 等に関わ

っている可能性も考えられる。

#### E. 結論

副腎皮質の Dab2 の発現が AII にコントロールされていることは種を超えて観察された。副腎皮質においては、Dab2 の発現は球状層特異的に AII シグナルによって制御される可能性が強く示唆された。Dab2 の副腎皮質細胞のアルドステロン産生性への意義は、今後の検討課題である。

#### [参考文献]

1. Pitt B et al: The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* 1999; 341(10): 709-17.
2. Pitt B et al: Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2003; 348(14): 1309-21
3. Mok SC et al: Molecular cloning of differentially expressed genes in human epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 1994; 52(2): 247-52.
4. Bassett MH et al: The regulation of aldosterone synthase expression. *Mol Cell Endocrinol.* 2004; 31; 217 (1-2): 67-74.
5. Hocevar BA et al, Regulation of the Wnt signaling pathway by disabled-2 (Dab2). *EMBO J.* 2003; 22(12): 3084-94.
6. Suwa T et al, Zonal expression of dickkopf-3 and components of the Wnt signalling pathways in the human adrenal cortex. *J Endocrinol.* 2003; 178(1): 149-58.

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- 1) Suwa T, Muramatsu M, Mune T, Takeda J: In situ detection of gene regulated by ACTH in rat adrenal. The endocrine society' s 87<sup>th</sup> annual meeting, San Diego, 2005
- 2) Muramatsu M, Suwa T, Mune T, Takeda J: In situ detection of gene regulated by low-sodium diet in rat adrenal. The endocrine society' s 87<sup>th</sup> annual meeting, San Diego, 2005
- 3) Muramatsu M: Specific expression of Disabled-2 in zona glomerulosa and its upregulation by low sodium diet. 31<sup>st</sup> annual meeting of the international aldosterone conference, San Diego, 2005
- 4) 諏訪哲也、村松学、宗友厚、武田純: Disabled-2 の副腎皮質球状層特異的発現とその調節  
第 13 回日本ステロイドホルモン学会、名古屋、2005 年

# 副腎偶発腫瘍の全国調査

## 一 診断・治療指針の作成一

上芝 元、一城 貴政

東邦大学医学部内科学糖尿病・代謝・内分泌科

### 【研究要旨】

近年の画像診断技術の進歩と普及により、副腎偶発腫（副腎インシデンタローマ）が発見される頻度が増加してきている。しかし、わが国における診断・治療指針は未だに確立されていない。そこで、まず継続的な疫学調査を行い、診断・治療指針を作成するための基礎的データを採取した。平成11年度より、病床数が200床以上の大学病院を含む計1014病院に調査表を送付し、継続的な疫学調査を施行してきた。5年間の継続調査で報告を受けた3,678例の集計結果をもとに、わが国における副腎偶発腫の診断・治療指針の一案を示す。

#### A. 研究目的

近年、わが国において副腎偶発腫の発見頻度は増加しているが、その詳細な疫学調査や診断治療指針は未だ確立されていない。従って、当研究班において5年間の継続的な疫学調査を施行し、副腎偶発腫の現状の把握と、診療・治療指針の確立を目的とする。

#### 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、これらの腫瘍を総称して副腎偶発腫という

（その際、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を送付し、副腎偶発腫瘍の継続的な全国調査を開始した。以降5年間で3678例の報告を受け、それをもとに解析を行った。

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。

#### C. 研究結果

##### 1. 患者背景

男性1662例(51.3%)、女性1512例(46.7%)、平均年齢は $58.0 \pm 13.0$ 歳で、50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1134例(44.4%)、左1245例(48.7%)、両側176例(6.9%)で左右差はなかった。腫瘍の診断法は腹部CTが2207例(69.7%)で大多数を占め、腹部超音波が843例(26.6%)、MRIが117例(3.7%)であった。平均腫瘍径は $3.0 \pm 2.2$ cm(0.5–30cm)であったが、症例数では直径1.1–2.0cmのものが最も多く(34.9%)、次いで直径2.1–3.0cmの症例(26.5%)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31.6%で最も多く、腹部症状の精査によって発見される症例が16.2%で次いでいた。副腎癌の症例に限定しても、無症状の症例が20%で最多であった。

## 2. 病因

ホルモン非産生腺腫が50.8%と半数以上を占め、コルチゾール産生腺腫10.5%、褐色細胞腫8.5%、アルドステロン産生腺腫5.1%の順であった。副腎腺腫全体では67.3%に達し、腺腫中ではホルモン非産生腺腫が75.4%を占めた。また副腎癌は50例で全体の1.4%を占めていた。

男性症例で検討した場合では、1662例中ホルモン非産生腺腫は61.3%でやはり半数以上を占め、褐色細胞腫9.7%、コルチゾール産生腺腫6.9%で、アルドステロン産生腺腫4.5%の順であった。また、副腎癌は26例で1.6%であった。一方、女性症例で検討した場合、同様にホルモン非産生腺腫が54.4%と過半数を占めたものの、コルチゾール産生腺腫は17.5%に達し、褐色細胞腫9.5%、アルドステロン産生腺腫7.5%の順で、副腎癌は23例1.5%であった。両者を比較すると、男性に比較してコルチゾールおよびアルドステロン産生腺腫の割合が女性では有意に多かった ( $p < 0.0001$ )。

## 3. 平均年齢

病因別に平均年齢を比較すると、ホルモン非産生腺腫 $60.2 \pm 11.8$ 歳、コルチゾール産生腺腫 $55.4 \pm 12.4$ 歳、アルドステロン産生腺腫 $52.5 \pm 12.9$ 歳、副腎癌 $58.8 \pm 13.3$ 歳、褐色細胞腫 $53.8 \pm 14.7$ 歳、骨髄脂肪腫 $56.3 \pm 13.6$ 歳、転移性悪性腫瘍 $65.1 \pm 10.1$ 歳であった。

以上より、コルチゾール産生腺腫 ( $p < 0.0001$ )、アルドステロン産生腺腫 ( $p < 0.0001$ )、褐色細胞腫 ( $p < 0.0001$ )、骨髄脂肪腫 ( $p < 0.005$ ) はホルモン非産生腺腫に比べ有意に若年症例が多く、逆に転移

性悪性腫瘍は有意に高齢の症例が多かった ( $p < 0.0001$ )。一方、副腎癌では明らかな傾向は認められなかった。以上のことより、褐色細胞腫を含むホルモン産生腫瘍はホルモン非産生腺腫より有意に若年発症の症例が多く、転移性悪性腫瘍は有意に高齢発症の症例が多いといえる。

## 4. 性別

病因別に性差を比較すると、ホルモン非産生腺腫は(男性54.5%、女性44.1%)で、以下同様に、コルチゾール産生腺腫(29.6%、68.8%)、アルドステロン産生腺腫(39.4%、60.1%)、副腎癌(52.0%、46.0%)、褐色細胞腫(51.6%、45.9%)、骨髄脂肪腫(49.6%、48.0%)、転移性悪性腫瘍(69.1%、29.4%)であった。以上よりホルモン産生腺腫は女性に多く、転移性悪性腫瘍は男性に多かった。

## 5. 診断時腫瘍径

病因別に診断時腫瘍径を比較すると、ホルモン非産生腺腫は $2.33 \pm 1.26$ cm、コルチゾール産生腺腫 $2.78 \pm 1.42$ cm、アルドステロン産生腺腫 $1.91 \pm 0.97$ cm、副腎癌 $8.31 \pm 4.51$ cm、褐色細胞腫 $4.54 \pm 2.97$ cm、骨髄脂肪腫 $5.00 \pm 2.78$ cm、転移性悪性腫瘍 $4.22 \pm 2.79$ cmであった。以上より、ホルモン非産生腺腫との比較では、アルドステロン産生腺腫を除く全ての病因が有意に大きく

( $p < 0.05$ )、アルドステロン産生腺腫は有意に小さい ( $p < 0.01$ ) が、大局的に見るとホルモン非産生腺腫 ( $p < 0.0001$ )、コルチゾール産生腺腫 ( $p < 0.0001$ )、アルドステロン産生腺腫 ( $p < 0.0001$ ) では腫瘍径は有意に小さく、副腎癌 ( $p < 0.0001$ )、褐色細胞腫 ( $p < 0.001$ )、骨髄脂肪腫 ( $p < 0.0001$ ) では有意に大きかった。

## 6. 腫瘍径変化

1年以上の経過観察期間があった1311例の腫瘍径変化を検討すると、997例中33.6%が増大し、23.6%が縮小し、42.8%が無変化

でその年間直径増大率は $3.00 \pm 18.94\%$ だった。病因別では、ホルモン非産生腺腫では707例中増大、縮小、無変化症例の割合および年間直径増大率はそれぞれ、34.9%、20.5%、44.6%、 $2.84 \pm 13.66\%$ だった。以下同様に、コルチゾール産生腺腫63例中27.0%、36.5%、36.5%、 $0.43 \pm 12.61\%$ 、アルドステロン産生腺腫18例中11.1%、33.3%、55.6%、 $0.91 \pm 7.09\%$ 、副腎癌6例中50%、0%、50%、 $5.41 \pm 11.35\%$ 、褐色細胞腫26例中46.2%、19.2%、34.6%、 $0.16 \pm 12.03\%$ 、骨髄脂肪腫33例中42.4%、27.3%、30.3%、 $0.53 \pm 10.72\%$ 、転移性悪性腫瘍26例中73.1%、7.7%、19.2%、 $40.84 \pm 76.77\%$ であった。以上より、年間直径増大率をホルモン非産生腺腫と比較すると、転移性悪性腫瘍のみ有意に大きな増大率を示した ( $p < 0.0001$ )。

#### 7. 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様々な腫瘍径カットオフ値を1cm単位で区切り、それぞれのカットオフ値における感度、特異度、陽性適中率および陰性適中率を検討した。これら感度と特異度を表す曲線は腫瘍径が3.7cmの点で交差し、スクリーニング的立場から感度を優先すべきであることを考慮すると、カットオフ値を3cmとするのが適切と考えられた。その場合の陽性または陰性適中率はそれぞれ、3.9%、99.7%となり、腫瘍径が3cm以上の副腎偶発腫の約4%が副腎癌で、腫瘍径がそれ未満の場合は99.7%の確率で副腎癌を否定できると考えられる。

#### 8. 各ホルモン産生腫瘍および副腎癌の内分泌学的検討

コルチゾール産生腺腫とホルモン非産生腺腫を内分泌学的に比較すると、血中コルチゾール、血漿ACTH、コルチゾール日内変動の異常症例、1mgデキサメサゾン抑制試験抑制欠如症例、CRH刺激試験低反応症例において、いずれの検査でもコルチゾール産生

腺腫で有意に異常が認められた (全て  $p < 0.0001$ )。

アルドステロン産生腺腫とホルモン非産生腺腫の比較では、血漿レニン活性、血中アルドステロン、血清K、血清アルドステロン-血漿レニン活性比において、いずれの検査でもアルドステロン産生腺腫で有意な異常が認められた。

褐色細胞腫とホルモン非産生腺腫の比較では、血中アドレナリン、血中ノルアドレナリン、尿中アドレナリン、尿中ノルアドレナリンにおいて、いずれの検査でも褐色細胞腫で有意に高値であった (全て  $p < 0.0001$ )。

副腎癌とホルモン非産生腺腫の比較では、血中DHEA-S、尿中17-OHCSおよび尿中17-KSが副腎癌で有意に高値を示した ( $p < 0.0001$ )。

#### D. 考察

今回の我々の集計による患者背景は、副腎偶発腫の平均年齢は58.1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14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。また、ホルモン非産生腺腫が全副腎偶発腫の半数以上を占め、コルチゾール産生腺腫10.5%、褐色細胞腫8.5%、アルドステロン産生腺腫5.1%の順であった。また、男性ではホルモン非産生腺腫、褐色細胞腫、コルチゾール産生腺腫の順で多かつ

たが、女性ではホルモン非産生腺腫、コルチゾール産生腺腫、褐色細胞腫の順であった。各病因での性差を検討すると、各ホルモン産生腺腫は6割以上が女性で、一方、転移性悪性腫瘍は6割以上が男性例であった。これはホルモン産生腺腫では女性の方が臨床症状が出やすい為に発見されやすいことが一因と考えられ、また悪性腫瘍は比較的男性に多いという潜在的性差が転移性悪性腫瘍が男性に多いことに影響していると考えられる。また各病因での年齢分布をみると、ホルモン非産生腺腫に比較して、褐色細胞腫を含むホルモン産生腫瘍はより若年、転移性悪性腫瘍はより高齢で発見される傾向があり、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。

各病因の診断時腫瘍径の比較では、各腺腫は有意に小さく、副腎癌、副腎髄質腫瘍および骨髄脂肪腫は有意に大きかった。よって大きな副腎偶発腫の場合、副腎癌をより積極的に疑う必要があると考えられる。そこで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腫瘍径のカットオフ値を検討すると、感度および特異度から3cmとするのが最適と考えられ、その場合の陽性・陰性適中率は3.9%および99.7%で3cm以上の腫瘍の約4%が副腎癌で、3cm未満の腫瘍の99%以上が副腎癌ではないと結論づけられる。しかし、腫瘍径が1cmの副腎癌も報告されており、大きさのみならず、画像の性状、内分泌学的データなども含め総合的に判断する必要がある。

コルチゾール産生腺腫、アルドステロン産生腺腫、褐色細胞腫および副腎癌とホルモン非産生腺腫との内分泌学的比較において、これまで各病因の臨床診断として有用とされていた検査法全てが今回の解析でも有意差をもって異常と診断され、これら検

査の有用性が副腎偶発腫においても再確認された。

## E. 結論

これまでの5年間の継続調査を元に解析を行い、わが国における副腎偶発腫の実態を報告すると共に、本研究の目的であった診断・治療指針の一案を示す(図1)。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 上芝 元: アンジオテンシン変換酵素阻害薬ペリンドプリルのインスリン抵抗性改善作用と副腎アンドロジェン増加作用.  
Therapeutic Research 26:499-503, 2005
- 2) 上芝 元, 一城貴政: 日本におけるインシデンタローマ(副腎)の現状.  
医学のあゆみ 213:409-415, 2005
- 3) 上芝 元, 芳野 原: 男性更年期における副腎機能.  
Pharma Medica 23:21-24, 2005
- 4) 上芝 元: 副腎偶発腫に占める内分泌性高血圧の頻度.  
血圧 12:735-738, 2005
- 5) 中野三郎, 森田 宏, 石川真由美, 上芝 元, 坪井久美子, 芳野 原: 当科にて経験した原発性アルドステロン症の1例.  
東京内科医会誌 21:62-64, 2005
- 6) 上芝 元, 一城貴政: 副腎偶発腫瘍.  
ホルモンと臨床 53:1255-1258, 2005

### 2. 学会発表

- 1) 上芝 元, 芳野 原: カルシウム拮抗薬アゼルニジピンのインスリン抵抗性及び副腎アンドロゲンに対する作用.  
第102回日本内科学会, 大阪, 2005, 4
- 2) 上芝 元, 芳野 原: 2型糖尿病におけ



る副腎アンドロゲンと酸化ストレス  
マーカー.

特になし

第48回日本糖尿病学会, 神戸,  
2005, 5

- 3) 上芝 元, 芳野 原: 2型糖尿病における酸化ストレスマーカーとDHEAの関連について—年齢別の検討—. 第5回日本抗加齢医学会, 京都, 2005, 6

- 4) 上芝 元, 山本奈津子, 長澤 薫, 一城 貴政, 土田恭代, 石川真由美, 廣井直樹, 下条正子, 坪井久美子: 副腎偶発腫・非機能性腺腫における18-hydroxycortisol, 18-oxocortisol. 第78回日本内分泌学会学術総会, 東京, 2005, 7

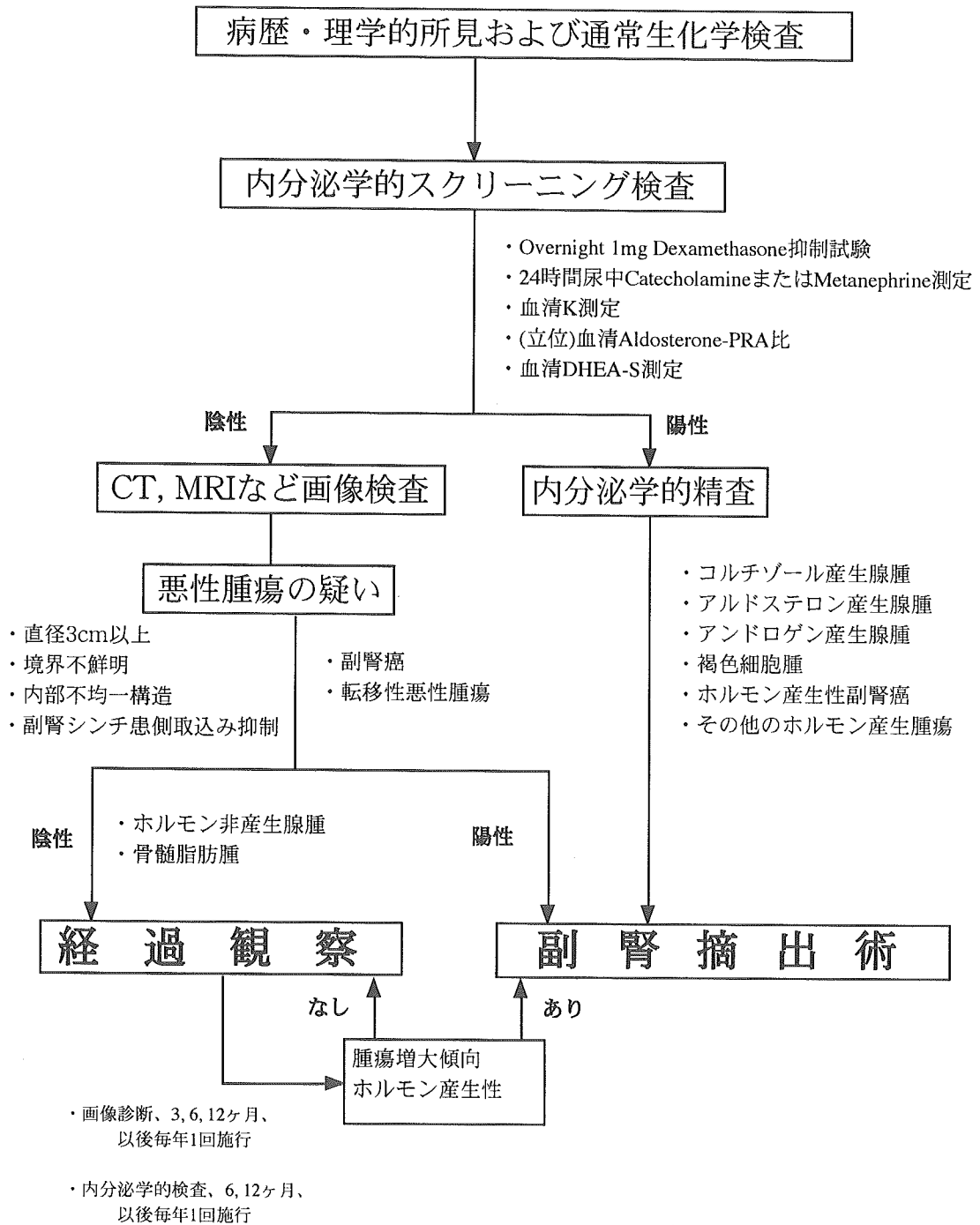
- 5) 土田恭代, 石川真由美, 廣井直樹, 下条正子, 上芝 元, 浜谷茂治, 渋谷和俊, 笹野公伸, 芳野 原: 長期生存している副腎皮質癌の1例. 第2回副腎腫瘍研究会, 東京, 2005, 7

- 6) 上芝 元, 石川真由美, 山本奈津子, 坪井久美子, 芳野 原: 画像診断で腺腫が見つからず、副腎静脈サンプリングが診断に有用であった原発性アルドステロン症の一例. 第51回臨床内分泌代謝研究会, 東京, 2005, 9

- 7) 上芝 元, 一城 貴政, 山本奈津子, 長澤 薫, 土田恭代, 石川真由美, 廣井直樹, 下条正子, 坪井久美子, 芳野 原: 副腎皮質非機能性腺腫における18-hydroxycortisol, 18-oxocortisolの検討.—Preclinical aldosteronismの可能性—. 第13回日本ステロイドホルモン学会, 名古屋, 2005, 11

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

図1 診断・治療指針フローチャート案



# Dehydroepiandrosterone (DHEA) の抗糖尿病作用に関する研究

寺内 康夫、青木 一孝

横浜市立大学大学院医学研究科分子内分泌・糖尿病内科学

## 【研究要旨】

副腎アンドロゲンの Dehydroepiandrosterone (DHEA) は思春期に分泌量が増加し、加齢と共に低下するホルモンである。以前、我々は DHEA には肝臓 glucose-6-phosphatase (G6Pase) を抑制することによりインスリン抵抗性改善作用があることを報告してきた。そこで今回、DHEA の肝臓に対するインスリン抵抗性改善機序について、糖放出の観点から、インスリン抵抗性を示す 2 型糖尿病モデル動物である db/db 及び非糖尿病 db/+m マウスを用いて検討をおこなった。その結果、DHEA は db/db マウスにおいて肝糖放出を抑制し抗糖尿病作用を有しているものと考えられた。この作用は血中インスリンの増加と DHEA(-S) の直接作用によると考えられた。

## A. 研究目的

近年、生活習慣の欧米化や運動不足等により、2 型糖尿病患者数は増加傾向にある。糖尿病の原因としてインスリン分泌の低下とインスリン抵抗性が考えられている。

ヒトの副腎からは、グルココルチコイド、ミネラルコルチコイド、副腎アンドロゲンの 3 種類のホルモンが分泌されている。Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA-Sulphate (DHEA-S) は副腎アンドロゲンに分類される。グルココルチコイドであるコルチゾールの成人の分泌が 1 日約 10mg なのに対して DHEA は約 1.5mg, DHEA-S は約 15-25mg であり、特に DHEA-S は高濃度に血中に存在するホルモンで、思春期に分泌量が増加し以後加齢と共に分泌が減少するユニークな血中動態を示すホルモンである。

1982 年に Coleman らが DHEA にインスリン抵抗性改善作用があることを初めて報告した (Coleman et al. Diabetes, 1982)。肥満と高インスリン血症を示す

2 型糖尿病モデル動物である db/db マウスに DHEA 添加食を投与したところ血糖値が低下し、インスリン抵抗性が改善された。Coleman 以後、同マウスにおいて DHEA のインスリン抵抗性改善機序に関する報告がないので、我々は、DHEA の肝臓糖新生酵素活性に対する影響について検討を行った (Aoki K et al. Diabetes, 1999)。その結果 db/db マウスは、ヘテロ型である非糖尿病 db/+m マウスに比べ高インスリン血症を示しているのに関わらず、肝臓糖新生酵素である glucose-6-phosphatase (G6Pase) 活性と遺伝子発現が上昇していた。DHEA 投与により、この上昇していた肝臓 G6Pase 活性と遺伝子発現は低下した。この酵素活性の抑制は、インスリン抵抗性改善薬であるトログリタゾン投与時にも見られた。以上より、DHEA が上昇した肝臓 G6Pase 活性と遺伝子発現を抑制することにより db/db マウスのインスリン抵抗性を改善することを見出した。

最近ヒトへの DHEA 投与が試験的に行

われており、インスリン感受性を亢進させたとの報告があり、そのメカニズムを調べることは非常に重要である。そこで今回、DHEA の肝糖放出に対する効果を検討した。

## B. 方法

7 週齢の雄性の db/db マウスに

0.4%DHEA 食を 1 週間投与した。コントロール食投与 db/+m 群、コントロール食投与 db/db、0.4%DHEA 添加食投与 db/db 群の 3 群に分けて検討した。

最初に尾静脈より  $\text{NaH}^{14}\text{C}\text{O}_3$  を静注し、hexokinase で処理後、30 分後に total count に対する  $^{14}\text{C}$ -glucose の比を求めた。続いて、同マウスを用いた初代培養肝細胞にて、基質に fructose を加え、30 分後に上清中の glucose 濃度を定量した。

また、培養上清に直接 DHEA と DHEA-S (10nM と  $1\mu\text{M}$ ) を加えて糖新生を測定した。

倫理面への配慮：本研究は横浜市立大学動物実験センターの許可のもと行った。

## C 研究結果.

Table 1 に示したように血糖値は db/db マウスに DHEA を投与すると血糖値は改善した。体重は db/db マウスと DHEA を投与した db/db マウスの間には変化がなかった。また、肝臓重量は DHEA 投与により増加した。血中インスリン値は db/+m に比し db/db マウスで高値を示し、DHEA 投与群でさらに増加した。

$\text{NaH}^{14}\text{C}\text{O}_3$  を用いた検討では、db/+m に比し、db/db マウスで糖放出が亢進しており、DHEA 投与群では糖放出が有意に抑制された(図 1)。初代培養肝細胞の系にても同様に、db/+m に比し db/db マウスで上清中 glucose 濃度が高く、DHEA 投与群では glucose 濃度が低下した(図 2)。また、培養上清に直接 DHEA と DHEA-S を

加えた群でも糖放出が抑制された(図 3)。

## D. 考察

今回の検討において、アイソトープと培養細胞を用いた検討より、DHEA 投与 db/db マウスは肝糖放出抑制作用を持っていることが示された。また直接培養細胞に DHEA と DHEA-S を添加した検討より、DHEA と DHEA-S は直接肝糖放出を抑制させることが示された。また、最近、我々は DHEA の作用を HepG2 細胞を用いて検討した (Yamashita R et al. Endocr J 2005)。その報告によると DHEA は直接同細胞の G6Pase 活性、蛋白、遺伝子発現を抑制していて、さらに、2-DOG の取り込みも増加させるとしている。

一方、インスリン分泌に関して本検討では DHEA 投与によりさらに増加した。Dillon らは、DHEA-S がブドウ糖応答性インスリン分泌を増加させると報告していることより、DHEA が db/db マウスにおけるブドウ糖応答性インスリン分泌を増加させている可能性が考えられた (Dillon et al. Diabetes 2002)。

以上より DHEA は、db/db マウスにおいて肝糖放出を抑制するがこの作用は、インスリン分泌増加によるものと DHEA または DHEA-S の直接作用によると考えられた。

## E. 結論

DHEA (S) は、db/db マウスにおいて肝糖放出を抑制し抗糖尿病作用を有している。今回の結果よりその作用機序は、血中インスリン値の上昇、及び、DHEA (S) の直接作用によるものと考えられた(図 4)。本検討結果は、ヒトへの投与(ホルモン補充療法)にあたり非常に有用な基礎的検討で充分役立つものと思われる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yamashita R, Saito T, Satoh S, Aoki K, Kaburagi Y, Sekihara H: Effects of Dehydroepiandrosterone on Gluconeogenic Enzymes and Glucose Uptake in Human Hepatoma Cell Line, HepG2. *Endocr J.* 2005 52(6): 727-733.
2. Yamashita R, Kikuchi T, Mori Y, Aoki K, Kaburagi Y, Yasuda K, Sekihara H: Aldosterone stimulates gene expression of hepatic gluconeogenic enzymes through the glucocorticoid receptor in a manner independent of the protein kinase B cascade. *Endocr J.* 2004 51(2): 243-251.
3. Aoki K, Taniguchi H, Ito Y, Satoh S, Nakamura S, Muramatsu K, Yamashita R, Ito S, Mori Y, Sekihara H: Dehydroepiandrosterone decreases elevated hepatic glucose production in C57BL/KsJ-db/db mice. *Life Sci.* 2004 : 74(25): 3075-3084.
4. Aoki K, Nakajima A, Mukasa K, Osawa E, Mori Y, Sekihara H: Prevention of diabetes, hepatic injury, and colon cancer with dehydroepiandrosterone. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003 85(2-5): 469-472.
5. Aoki K, Homma M, Hirano T, Oka K, Satoh S, Mukasa K, Ito S, Sekihara H: MRNA and enzyme activity of hepatic 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 are elevated

in C57BL/KsJ-db/db mice.

*Life Sci.* 2001 69(21): 2543-2549.

6. Aoki K, Kikuchi T, Mukasa K, Ito S, Nakajima A, Satoh S, Okamura A, Sekihara H: Dehydroepiandrosterone suppresses elevated hepatic glucose-6-phosphatase mRNA level in C57BL/KsJ-db/db mice: comparison with troglitazone. *Endocr J.* 2000 47(6): 799-804.
7. Aoki K, Saito T, Satoh S, Mukasa K, Kaneshiro M, Kawasaki S, Okamura A, Sekihara H: Dehydroepiandrosterone suppresses the elevated hepatic glucose-6-phosphatase and fructose-1,6-bisphosphatase activities in C57BL/Ksj-db/db mice: comparison with troglitazone. *Diabetes.* 1999 48(8): 1579-1585.
8. Mukasa K, Kaneshiro M, Aoki K, Okamura J, Saito T, Satoh S, Sekihara H: Dehydroepiandrosterone (DHEA) ameliorates the insulin sensitivity in older rats. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1998 67(4): 355-358.

### 2. 学会発表

青木一孝, 谷口英樹, 中村悟, 向笠浩司, 森保道, 星野和彦, 山田佳彦, 関原久彦  
Dehydroepiandrosterone (DHEA) は C57BL/KsJ-db/db マウスの肝糖放出を抑制する  
2003年度日本糖尿病学会年次学術集会

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1

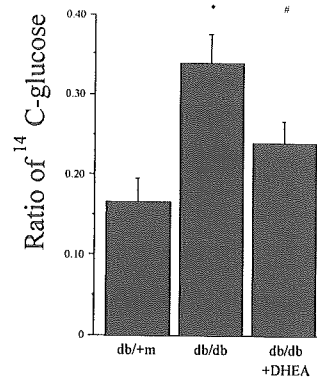


図2

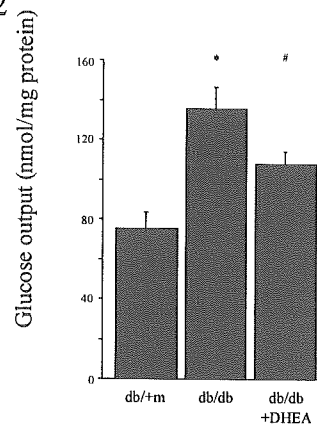
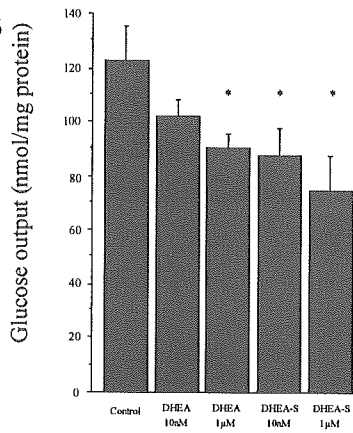


図3



Aoki K et al. Life Sci 2004 より引用

**Table 1. Blood glucose, body and liver weight, and plasma insulin levels**

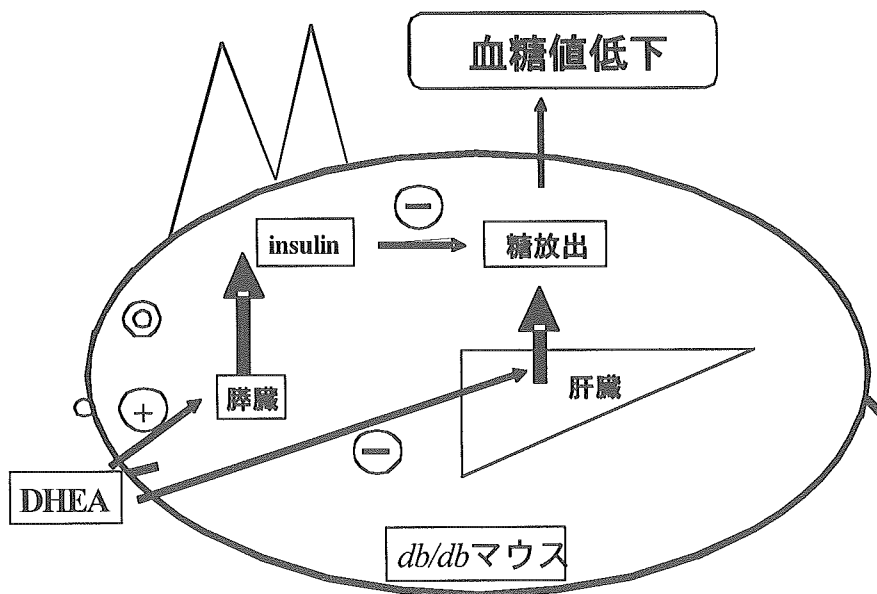
	db/+m	db/db	db/db+DHEA
<i>n</i>	6	6	6
Blood glucose (mg/dl)	114 ± 3	519 ± 22 <sup>*</sup>	421 ± 23 <sup>#</sup>
Initial body weight (g)	25.2 ± 0.3	37.4 ± 0.4	37.7 ± 0.7
Final body weight (g)	26.5 ± 0.7	38.9 ± 0.3 <sup>*</sup>	38.0 ± 0.4
Liver weight (g)	1.03 ± 0.02	2.43 ± 0.12 <sup>*</sup>	2.77 ± 0.89 <sup>#</sup>
Insulin (pg/ml)	2445 ± 335	20969 ± 1071 <sup>*</sup>	46473 ± 2867 <sup>#</sup>

Each value is the mean ± SEM. <sup>\*</sup>*P*<0.05 vs. db/+m mice and <sup>#</sup>*P*<0.05 vs. db/db mice.

db/+m; db/+m mice treated with standard food, db/db; db/db mice treated with standard food and db/db+DHEA; db/db mice treated with DHEA.

(Aoki K et al. Life Sci 2004 より引用)

**図4. DHEAの血糖降下作用**



Aoki K et al. Life Sci 2004 より引用

## (5) 副腎移植・再生



# 副腎皮膜移植による皮質再生のメカニズムの検討に関する研究

田島 敏広

北海道大学大学院医学研究科小児科

## 【研究要旨】

両側副腎摘出したのち、残った副腎皮膜を移植すると副腎皮質が再生し、皮質の三層構造をとることが知られている。さらに皮膜下にすべての副腎皮質細胞に分化可能な前駆細胞の存在が示唆されている。臓器、組織移植が成功するにはいくつかの要素が重要である。そのひとつは、血管増生に重要な血管内皮細胞増生因子（VEGF）である。VEGFにはその働きを制御する二つの受容体Flk-1とFlt-1が知られている。本研究ではラット副腎皮質移植後に副腎が再生するか、さらには再生におけるVEGF、Flk-1とFlt-1の発現の推移を研究し、その役割を検討した。その結果 1. ラット副腎皮質自家移植で副腎の再生がおこること。2. 免疫組織染色でVEGFとFlt-1が副腎皮質細胞に、Flk-1は血管内皮細胞に発現すること。3. 自家副腎移植後VEGFとFlt-1は経時的に増加し、Flk-1は再生早期に強く発現することを見いだした。

従ってVEGFおよびFlk-1、Flt-1は副腎皮質再生過程における血管、類洞の形成、増生、維持に重要であることが示唆された。

## A. 研究目的

成人副腎皮質は球状層、束状層、中間層、網状層よりなり、それぞれ特異的なステロイドホルモンを産生するが、この層状化の分子メカニズムは完全に解明されていない。またげっし類において両側副腎摘出したのち、残った副腎皮膜を移植すると副腎皮質が再生し、三層構造をとることが知られている。さらに皮膜下にすべての副腎皮質細胞に分化しうる前駆細胞の存在が示唆されている。

臓器、組織移植が成功するにはいくつかの要素が重要である。そのひとつは、移植された組織に機能的に血液が供給されることである。特に内分泌器官は体内のホメオスタシスの変化に反応し、産生ホルモンを速やかに循環させるために十分な血流が必要とされ、豊富な血管が必要である。

血管内皮細胞増生因子（VEGF）は強力な血管内皮細胞の分裂増殖因子である。VEGFはその受容体であるFlk-1を介して主要な作用を発揮する。それに対してデコイ受容体であるFlt-1はVEGFの作用を抑制する。内分泌腺の一つである副腎ではVEGFならびにその受容体であるFlk-1とFlt-1の発現が認められている。したがってVEGF-Flk-1/Flt-1のシステムは副腎の血管の発達と維持のため重要である。

そこで今回ラット副腎皮膜を移植し、その再生が得られ、ステロイドホルモンの産生が起こるか。さらに移植の成否に重要な因子の一つであるVEGF-Flk-1/Flt-1の発現、変化を検討した。

## B. 研究方法

### B-1 実験動物および処置

北海道大学動物実験施設で昼夜12時間

交代, 室温  $22 \pm 2$  度の環境で飼育された週齢 8 から 9 週の雄 Wistar ラットを用いた. エーテル吸入と 50 mg/kg ケタラル(三共)の腹腔投与にて麻酔し, 腹部正中切開後実体顕微鏡を用い 10 倍の拡大視野で両側副腎摘出を行った. 摘出副腎は周囲脂肪層をはずし, さらに副腎被膜のみを遊離し, 移植片を作製した. その後腹直筋のポケットに移植した. 手術後 1, 2, 3, 4 週目で頸椎脱臼の後に屠殺し, 直ちに心腔内穿刺にて採血, コルチコステロンを測定した. 以上の処置は北海道大学実験動物取り扱い委員会にて承認されかつ本学の実験動物指針に従った.

**B-2 RNA の抽出と RT-PCR 反応** 摘出した再生副腎より RNA を抽出し, VEGF, Flk-1, Flt-1 の発現の変化を RT-PCR にて観察した. **B-3 組織学的検討** ウサギ抗ラットポリクローナル VEGF, Flk-1, Flt-1 抗体を用いて摘出副腎の免疫染色をおこなった.

### C. 研究結果

**C-1 副腎移植 1 週目で組織の生着が確認された(図 1A).** 副腎皮質球状層および束状層は確認できたが 4 週の時点では網状層は同定できなかった. また, 周囲からの毛細血管の進入が移植片の周囲から侵入し, 副腎の洞部と結合していた(図 1A). 移植後のコルチコステロンは術後, 経時的に上昇し, 4 週目ではコントロールラットの約 7 割のレベルにまで増加した(図 1B).

**C-2 VEGF mRNA, Flk-1 mRNA, Flt-1 mRNA の発現**

再生した副腎組織での VEGF mRNA の発現は RT-PCR で術後 1 週目から認められ, その発現は 4 週目まで徐々に増加した. それに対し VEGF の作用を発現させる Flk-1 は術後早期に強い発現を示した. またデコイ受容体である Flt-1 の発現は VEGF と同様の傾向を示した. 免疫組織染色では VEGF は副腎皮質細胞の細胞質に発現が観察された(図

2A). その発現は 1 週目までは弱かったが 4 週にかけて増加し, コントロールのレベルとほぼ同等になった(図 2A). また, VEGF は束状層より球状層により強く発現した(図 2A). Flk-1 は副腎皮質類洞部血管と栄養血管の内皮細胞に発現した(図 2B, 矢印). 移植後 1 週目では Flk-1 陽性の洞部内皮細胞の数が多かった(図 2B)が 4 週目では減少した(図 2B). Flt-1 は副腎の細胞質に発現していた. 術後 1 週目では弱く, 4 週目では一様に発現し, その発現量はコントロールとほぼ同様であった.

### D. 考案

移植副腎の再生にともない移植片内の血管の VEGF の発現が増加し, それとともに内皮細胞の Flk-1 の発現が一過性に増加した. 低酸素状態が VEGF および Flk-1 を誘導するとの報告があり, 移植片の低酸素状態が移植後 VEGF のシステムの活性化を惹起したと考えられる. 今後副腎移植のモデルに VEGF の局所投与や副腎細胞に強制発現させることによって副腎再生をさらに促進できるかどうか検討する予定である. またデコイ受容体である Flt-1 は本実験では副腎皮質細胞にのみ発現がみられたが, 過去の報告では内皮細胞にも発現が認められるとされている. Flt-1 が副腎皮質細胞に存在する意義は不明であるが, 再生過程での血管の無秩序な新生を制御する働きが想定される.

今回皮膜からの再生において, 皮膜直下の球状層細胞が束状層細胞に変化していったのか, あるいは分化しうる幹細胞が球状層, 束状層細胞に分化増殖したのかは今回不明である. 今後この再生, 球状層, 束状層への増殖分化のメカニズムを解明することが重要である.

### E. 結論

1. ラット副腎皮質自家移植にて副腎皮質

の球状層，束状層の再生が認められた。

2. 免疫組織染色で VEGF と Flt-1 が副腎皮質細胞に，Flk-1 は血管内皮細胞に発現していた。VEGF と Flt-1 は経時的に増加を示し，Flk-1 は再生早期に強く発現した。

3. VEGF および Flk-1, Flt-1 は副腎皮質再生過程における血管，類洞の形成，増生に関与していると考えられた。

## F. 研究発表

### 論文発表

Taniguchi A, Tajima T, Nonomura K, Shinohara N, Mikami A, Koyanagi T. Expression of the vascular endothelial growth factor and its receptors, Flk-1 and Flt-1 during autotransplanted adrenocortical regeneration in adrenalectomized rat.

J Urology 171, 2445-2449, 2004

### 学会発表

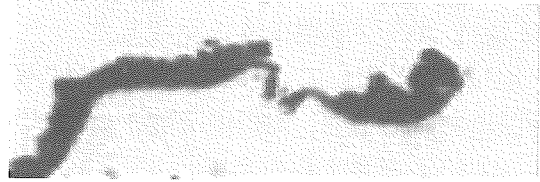
田島 敏広：先天性副腎疾患の病態解明と新しい治療法の開発

第 78 回日本内分泌学会学術総会 東京  
2005 7/1-7/3

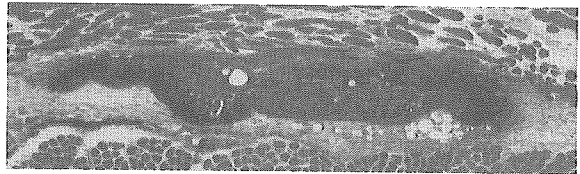
図 1

(A) 組織学的所見

副腎皮質



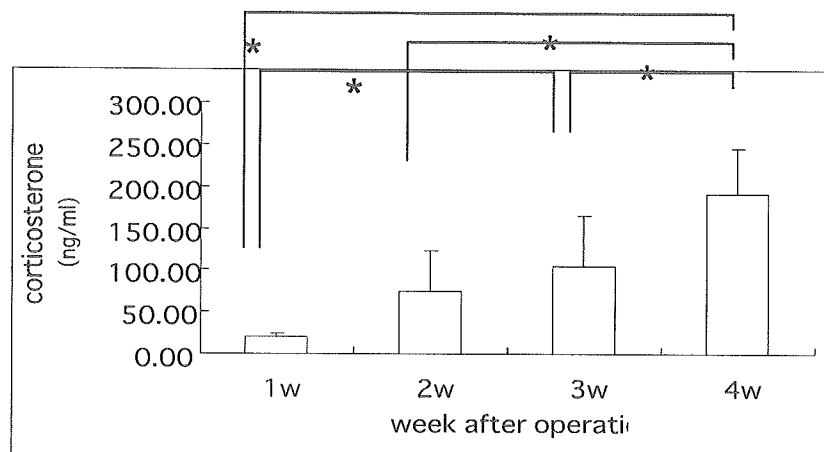
1 週後



4 週後



(B) 血清コルチコステロン



\*Asterisk indicates  $p < 0.01$