

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

副腎ホルモン産生異常に関する調査研究

# 平成 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 藤 枝 憲 二

平成 19 年 3 月

# 目次

I. 序文 .....	1
II. 研究班構成員名簿 .....	3
III. 総括研究報告書 .....	4
主任研究者 旭川医科大学小児科	藤枝憲二
IV. 分担研究報告書	
(1) 副腎の発生・分化・再生に関する研究	
1. 副腎皮質の発生初期過程に関する研究 .....	10
自然科学研究機構基礎生物学研究所性差生物学	諸橋憲一郎
2. 脂肪組織由来間葉系幹細胞からのステロイド産生細胞の創出 .....	14
九州大学大学院医学研究院病態制御内科 柳瀬 敏彦、權藤 重喜、田中智子、高柳涼一 九州大学大学院医学研究院	名和田新
3. ステロイド産生細胞の分化再生に関する研究 .....	23
福井大学医学部医学科生命情報医科学講座分子生体情報学領域	宮本 薫
4. NR5A1 遺伝子異常 (Ad4BP/SF-1) による精巢形成不全の 1 例 .....	27
北海道大学大学院医学研究科生殖発達医学講座小児科学分野	田島敏広
5. 先天性副腎低形成症の診断基準 (1 次案) .....	32
旭川医科大学小児科	藤枝憲二、向井徳男
北海道大学大学院医学研究科小児科	田島敏広

(2) 副腎ホルモン産生異常に関する研究

6. 塩誘導性キナーゼ (SIK) による

アルドステロン合成酵素遺伝子の発現調節に関する研究 …… 36  
帝塚山大学

岡本光弘

7. コレステロール硫酸のステロイドホルモン産生におよぼす影響 …… 42  
北海道大学大学院医学研究科分子医科学

菅原照夫

8. Yeast two-hybrid system を用いた StAR タンパク相互作用因子同定の試み … 48  
旭川医科大学小児科

藤枝憲二、向井徳男、鈴木 滋  
北海道大学大学院医学研究科小児科

田島敏広

9. 少量 ACTH 試験による薬剤性副腎皮質機能低下症の評価の意義 …… 50  
大阪大学大学院医学系研究科内分泌・代謝内科学

笠山宗正、大月道夫、森田真也、和泉真紀  
医療法人宮武内科

宮武明彦

10. 北海道におけるステロイドホルモン産生異常症登録患者の解析 …… 56  
旭川医科大学小児科

藤枝憲二、鈴木 滋、向井徳男

11. 降圧剤内服中でも ARR で

原発性アルドステロン症のスクリーニングが可能か? …… 67  
横浜労災病院内分泌代謝内科

西川哲男、齋藤 淳、正路由紀、吉村公一郎  
砂川一郎、松澤陽子、伊藤 譲、伊藤浩子

12. 原発性アルドステロン症の診断基準 (その1) …… 74  
日本内分泌学会 原発性アルドステロン症検討委員会

西川哲男、大村昌夫、佐藤文俊、柴田洋孝  
高橋克敏、田辺晶代、田村尚久、齋藤 淳

13. 副腎性プレクリニカルクッシング症候群 (PCS) の診断基準の見直し …… 84  
九州大学大学院医学研究院病態制御内科

柳瀬敏彦、高柳涼一

### (3) 副腎腫瘍・癌に関する研究

14. 副腎皮質癌における特異的標的治療対象の発現  
～免疫組織化学的検索～ ..... 89  
東北大学大学院医学系研究科医科学専攻病理病態学講座病理診断学分野  
中村恵美、笹野公伸
15. 小児副腎癌と成人副腎癌の尿ステロイドプロファイル ..... 97  
慶應義塾大学医学部小児科  
長谷川奉延  
慶應義塾大学病院中央臨床検査部  
本間桂子
16. 副腎偶発腫瘍調査からの副腎癌の解析 ..... 101  
東邦大学医学部内科学糖尿病・代謝・内分泌科  
上芝 元、一城貴政

### (4) ステロイドホルモン作用機構に関する研究

17. リガンド依存性に相互作用する転写共役因子 Ubc9 による  
ミネラルコルチコイド受容体 (NR3C2) の転写制御機構 ..... 105  
慶應義塾大学保健管理センター  
柴田洋孝
18. アルドステロンによる NOX1 発現誘導に関する研究 ..... 112  
福井大学医学部第三内科  
宮森 勇、稲葉 聡、范 春元、河合康幸
19. 血管内皮細胞における HDL 依存性 NOS 活性におよぼす  
アルドステロンの影響について ..... 122  
香川大学医学部内分泌代謝・血液・免疫・呼吸器内科  
村尾孝児、井町仁美、曹 聞銘、郁 暁、石田俊彦
20. 脂肪組織におけるステロイドホルモン合成酵素及び  
レセプターの遺伝子発現 ..... 129  
金沢大学大学院臓器機能制御学 (内分泌代謝内科)  
武田仁勇、米田 隆、朱 傲霜
21. ステロイドホルモンレセプターの  
転写制御メカニズムの解明に関する研究 ..... 136  
東京大学分子細胞生物学研究所  
加藤茂明

22. グルココルチコイド作用調節機構に関する研究 .....	143
東京大学医科学研究所先端医療研究センター	
田中廣壽、吉川賢忠、清水宣明	
23. グルココルチコイド受容体の核内 foci 形成および 転写活性化に対する転写制御因子の影響 .....	150
九州大学医学研究院病態制御内科学	
高柳涼一	
24. グルココルチコイドホルモンによる 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1 の調節機構 .....	155
浜松医科大学小児科	
齋 秀二、中川祐一、大関武彦	
Endocrinology Unit, Edinburgh University	
Jonathan R Seckl, Karen E Chapman	
25. 11 $\beta$ HSD タイプ 1・H6PD 遺伝子多型と内臓脂肪蓄積 .....	159
岐阜大学大学院医学系研究科内分泌代謝病態学分野	
宗 友厚、山田亘子、村松 学、諏訪哲也、武田 純	
V. 会議記録	
平成 18 年度研究報告会プログラム .....	168
VI. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	
	175

# I. 序 文

厚生労働省科学研究費補助金による難治性疾患克服研究事業の「副腎ホルモン産生異常に関する調査研究」班におきまして、昨年度より3年間の予定で主任研究者を担当し、研究を継続させて頂くこととなり、今年度が2年目となります。

副腎ホルモン産生異常に関連する病態を明らかにし、それに基づいて診断法ならびに治療法を開発することを研究目標とし、昨年度までの研究成果を基に、今年度からは以下の項目に対してより重点を注いだ研究体制に移行しました。

- (A) 副腎の発生・分化・再生に関する研究
- (B) 副腎ホルモン産生異常に関する基礎的・臨床的研究
- (C) 副腎腫瘍・癌に関する研究
- (D) ステロイドホルモン作用機構に関する研究

平成18年12月15日(金)に「副腎ホルモン産生異常に関する調査研究」班の研究報告会を東京で開催いたしました。昨年に引き続いて多くの成果があげられました。特に今年度は副腎ホルモン産生異常症の全国疫学調査をさらに推し進めると同時に、診療ガイドライン作成にも取り組みました。また、幹細胞からのステロイド産生細胞への分化に関しましては独創的で将来の発展につながる研究が着々と進んでおります。以下に本年度の研究班の成果について要約します。

(1) 原発性アルドステロン症(一般医家向け、専門医療機関向け)と、先天性副腎低形成症についての診断基準(案)の策定、および副腎性プレクリニカルクッシング症候群の診断基準に対する見直しを行いました。副腎偶発腫瘍・副腎癌および先天性副腎過形成症の出生前診断・出生前治療に関するアンケート調査票を全国規模で行い、現在解析中です。また、北海道におけるステロイドホルモン産生異常症登録患者の解析を行いました。

(2) マウス骨髄間葉系細胞株および様々なヒト間葉系細胞株からAd4BP/SF1導入、cAMP処理により様々なステロイドホルモン産生パターンを有する細胞株の樹立、また、マウス初代培養脂肪由来間葉系幹細胞についてもマウス初代培養骨髄由来間葉系幹細胞と同様にACTH依存性に各種ステロイドを産生する細胞に形質転換されることを見出しましたが、異なったステロイド産生プロフィールを示しました。これらの研究は本研究班においてなされた極めて独創性の高い成果であり、世界の最先端を担っている状況といえます。

(3) Ad4BP/SF1の胎仔副腎皮質特異的エンハンサーの研究、StARタンパクとの相互作用因子の探索、StARタンパクの発現調節機構に関する研究が行われました。副腎癌に対する治療法の検討や、小児と成人における生化学的相違点について検討され

ました。また、アルドステロン作用と心血管障害との関連、原発性アルドステロン症の臨床的診断法の検討がなされ、ステロイド合成酵素の活性に影響する因子の解析も多方面から進んでいます。グルココルチコイド受容体を中心にステロイドホルモン受容体の発現や機能に関する調節機構についても進展が認められステロイドホルモンの作用機構についての新たな知見を得ることができました。

研究班の目標に向かってご尽力いただきました分担研究者の方々に心から感謝申し上げますとともに、多くのご助言を賜りました厚生労働省健康局疾病対策課難病調査係の方々に厚く御礼申し上げます。

平成19年3月

「副腎ホルモン産生異常に関する調査研究」班

主任研究者 藤 枝 憲 二

## II. 研究班構成員名簿



## II. 「副腎ホルモン産生異常に関する調査研究」班

### 構成員名簿

区分	氏名	所属等	職名
主任研究者	藤枝 憲二	旭川医科大学医学部小児科	教授
分担研究者	岡本 光弘	帝塚山大学現代生活学部	教授
	諸橋 憲一郎	自然科学研究機構基礎生物学研究所性差生物学研究部門	教授
	加藤 茂明	東京大学分子細胞生物学研究所核内情報研究分野	教授
	柳瀬 敏彦	九州大学大学院医学研究院病態制御内科	助教授
	田中 廣壽	東京大学医科学研究所先端医療研究センター免疫病態分野	助教授
	柴田 洋孝	慶應義塾大学 保健管理センター	講師
	笹野 公伸	東北大学大学院医学系研究科病理診断学	教授
	宮森 勇	福井大学医学部第3内科	教授
	宮本 薫	福井大学医学部生命情報医科学講座分子生体情報学	教授
	大関 武彦	浜松医科大学小児科	教授
	高柳 涼一	九州大学大学院医学研究院病態制御内科	教授
	笠山 宗正	大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科	助教授
	宗 友厚	岐阜大学大学院医学研究科内分泌代謝病態学	助教授
	長谷川 奉延	慶應義塾大学医学部小児科	助教授
	上芝 元	東邦大学医学部内科学糖尿病代謝内分泌科	講師
	武田 仁勇	金沢大学大学院医学系研究科分子病態内科 (第2内科)	講師
	村尾 孝児	香川大学医学部第1内科	講師
	田島 敏広	北海道大学大学院医学研究科小児科	講師
	菅原 照夫	北海道大学大学院医学研究科分子生化学	助手
	田村 尚久	京都大学大学院医学研究科内分泌代謝科	助手
西川 哲男	横浜労災病院内分泌代謝内科	副院長	
事務局担当	向井 徳男	旭川医科大学医学部小児科 〒078-8510 旭川市緑が丘東2条1丁目1-1 TEL: 0166-68-2481 FAX: 0166-68-2489	助手
経理事務担当	大関 高志	旭川医科大学総務部会計課出納係 〒078-8510 旭川市緑が丘東2条1丁目1-1 TEL: 0166-68-2154 FAX: 0166-66-1300	係長

### Ⅲ. 総括研究報告書

# III. 副腎ホルモン産生異常に関する調査研究

## 総括研究報告

主任研究者  
藤枝 憲二  
旭川医科大学小児科

### 1. 研究目的

厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「副腎ホルモン産生異常に関する調査研究」班は平成17年度に発足した。当研究班は副腎の発生・分化、ステロイド産生、その作用に異常を呈する疾患を対象に病因・病態の解明、新しい診断法・治療法の開発、さらには疾患の実態調査を行い、診療ガイドラインを作成することを研究目標として、2年目の研究を継続させた。

- (1) 副腎発生・分化・再生に関する研究
- (2) 副腎ホルモン産生異常に関する研究
- (3) 副腎腫瘍・癌に関する研究
- (4) ステロイドホルモン作用機構に関する研究

### 2. 研究成果

#### (1) 副腎発生・分化・再生に関する研究

副腎皮質はステロイドホルモン産生組織として重要な役割を担っているが、この組織の発生メカニズムは不明である。副腎皮質の形成過程を明らかにすることは副腎形成異常の病因・病態の理解に極めて重要である。そこで、副腎皮質形成に重要な役割を果たす転写因子 Ad4BP/SF-1 を用いて検討した。副腎皮質での発現を制御するエンハンサーを第4イントロン内に同定し、この胎仔副腎皮質特異的エンハンサーを用い、胎仔副腎において Ad4BP/SF-1 を強制発現させたところ、本来の副腎の他に、より頭部側、腹腔内に複数の副腎様細胞集団(異所性副腎)が確認された。実際にこれらの細胞は副腎皮質のみに発現する P450c21 遺伝子を発現していたことから、副腎皮質としての性格を有する細胞であった。Ad4BP/SF-1 が胎仔副腎の細胞増殖に関与することを初めて明らかにした意義は大きい。今後、このエンハンサー異常によるヒト副腎低形成症が同定されることが期待される。(諸橋)

ステロイドホルモン補充療法は一定の効果を示しているが、必ずしも理想的な治療法ではない。再生副腎細胞移植療法は補充療法の欠点を補う治療法になり得ると考えられる。Ad4BP/SF-1 はステロイド合成及び副腎・性腺分化に必須の核内レセプターである。Ad4BP/SF-1 の強制発現により、マウス初代培養骨髄由来間葉系幹細胞(BMC)が ACTH 依存性に各種ステロイドを産生する細胞に形質転換されることを既に報告している。しかし、この細胞は副腎系・性腺系両方のステロイドを同時に産生していることから臨床応用のためには副腎・性腺特異的ステロイド産生細胞

へとさらに分化させる必要がある。一方、脂肪組織にも間葉系幹細胞が存在することが知られている。マウス初代培養脂肪由来間葉系幹細胞(ASC)のステロイド産生能を検証し、そのプロフィールを同一個体由来 BMC のそれと比較検討したところ、ASC も BMC 同様、ステロイド産生細胞へ形質転換されたが、Ad4BP/SF-1 発現の強弱・レチノイン酸の有無の影響により、BMC と ASC では全く異なったステロイド産生プロフィールを示すことが明らかとなった。このことは、間葉系幹細胞のステロイド産生細胞への分化形質はかなり早期にコミットされている可能性があること、間葉系幹細胞の調整には用途に応じた組織選択の必要性があることが示唆された。(柳瀬)

また、間葉系幹細胞からステロイド産生細胞を作製し、ステロイドホルモン産生異常症などに対する再生治療の開発を目指して研究を進め、プロモーターソーティングにより、マウス骨髄間葉系幹細胞株 KUM9 から自発的にステロイドホルモン産生細胞に分化した細胞株を樹立することに成功した。これは間葉系幹細胞から特別な操作を行わずにステロイド産生細胞を作り出すことができることを示した点で画期的である。また、様々なヒト間葉系幹細胞株から転写因子 Ad4BP/SF-1 導入及び cAMP 処理により、ヒト骨髄間葉系幹細胞から様々なステロイドホルモン産生パターンを持った細胞株を樹立した。これらの成果により、副腎ホルモン産生異常症に対する再生医療に向けての重要な知見を提供することができた。(宮本)

Ad4BP/SF-1 異常を有する症例は現在 7 例が報告されている。そのうち精巣形成不全は共通所見としてあるが、副腎不全に関しては異常を示すものと、正常なものがあることが明らかにされている。田島は副腎不全が認められず、精巣の形成障害を起こした 46, XY 性分化異常症の患者において Ad4BP/SF1 遺伝子を解析した。その結果エクソン 2 で T 塩基から G 塩基への置換をヘテロで同定した。この置換により 41 番目の Val が Gly へと変異するものであった。この変異は DNA 結合に重要な第 1 番目の Zn フィンガー領域、P-Box 近傍に位置し、またマウス、ラット、牛、ヒトで保存されているアミノ酸である。このことからこのアミノ酸置換は DNA 結合に影響を与えると推察される。現在この変異体を構築し、その機能について検討を行っている。(田島)

これまでのところ先天性副腎低形成症候群(AHC)の診断基準は存在せず、病因遺伝子が同定され、その病態も明らかとなってきたことから AHC の診断基準の 1 次案の策定を行った。今後はこの 1 次案の臨床的検証を行い、より有効性のある診断基準を決定していく予定である。(藤枝)

## (2) 副腎ホルモン産生異常に関する研究

### 1) 基礎的検討

アルドステロン合成酵素(CYP11B2)遺伝子の発現はアンギオテンシン II や K イオンにによって調節されるが、本遺伝子における Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達の時間依存的調節機構における塩誘導性キナーゼ(SIK1)とその基質 TORC の役割について検討した。その結果カルシニューリンは Ca<sup>2+</sup>依存的 CYP11B2 遺伝子の発現に必須であり、カルモジュリン依存的プロテインキナーゼキナーゼ(CaMKK)は遺伝子発現を抑制し、カルシニューリンと CaMKK が SIK1-TORC 経路を修飾することにより時間依

存的な遺伝子発現の調節を行っていることを見出した。(岡本)

Steroidogenic acute regulatory protein (StAR)蛋白質はコレステロールがミトコンドリア内に移動する際に重要な役割を演ずる。コレステロール硫酸 (CS) は硫酸ステロイドの前駆物質だけではなく、de novoのコレステロール生合成の抑制物質である。本研究はステロイドホルモン産生細胞におけるCSの役割を調べた。その結果、CSはStAR蛋白質のmRNA量を低下させてStAR蛋白質を減少させ、細胞におけるステロイドホルモンの産生を調節することを明らかにした。今後、CSによるStARプロモーター領域の解析によりStAR遺伝子発現制御機構が明らかになることが期待される。(菅原)

先天性副腎リポイド過形成症は日本人に比較的多く発症し、その病因は多様性に富むことが知られている。その多くはStARタンパクの異常が、一部にコレステロール側鎖切断酵素(P450<sub>sc</sub>)の異常が原因となる。しかしながら、リポイド過形成症の症例においてこのどちらにも異常が認められないケースがあるため、リポイドCAHの新たな病因候補としてStARタンパクと相互作用する因子を新たに探索・同定し、疾患との関連や、ステロイド産生・コレステロール輸送に関連した機能について検討する意義はある。現在、ヒト副腎由来cDNAライブラリーを作製し、yeast two-hybrid systemを用いてスクリーニングを行った結果、13個の陽性クローンを同定しており、さらなる検証を行っている。(藤枝)

## 2) 診断法の開発と診療ガイドライン作成

少量ACTH試験の診断的意義を明らかにするため、グルココルチコイド (GC) 治療に伴う続発性副腎皮質機能低下症の診断法として適切か、またGC薬の下垂体-副腎皮質系以外の組織への影響を反映するか否かを検討した。その結果、少量ACTH試験は潜在性副腎皮質機能低下症のみならず、骨代謝・動脈に与える吸入ステロイド薬の影響を鋭敏に反映することを明らかにした。(笠山)

先天性副腎過形成症 (CAH) の出生前診断・出生前治療に関する本邦における実態を把握し、統一的な診療ガイドラインの作成を試みるために第1次の全国調査を日本小児内分泌学会と連携して実施することとなり、本研究班から内科(内分泌科)、産婦人科へ調査票を送付し、現在解析中である。(田島、藤枝)

北海道ではステロイドホルモン産生異常症が特定疾患治療研究事業の対象疾患の一つに位置づけられている。患者登録データベースを用いて最近10年間のステロイドホルモン産生異常症の発症頻度とその実態および変遷について検討した。新規登録患者数は原発性アルドステロン症 (PA)、副腎性クッシング症候群、副腎皮質酵素欠損症、アジソン病の順に多く、これらで92%を占めていることが明らかにされた。(藤枝)

適切な治療で治癒が期待できる二次性高血圧であるPAの初期診療におけるスクリーニングは重要である。PAC/PRA比 (ARR) >20とするPAスクリーニング基準は薬物治療の影響が乏しく正診率も高く、スクリーニングに極めて有用であることを明らかにした。(西川)

PAは適切な治療で治癒が期待できる代表的な二次性高血圧であり、高血圧に占める頻度は決して少なくない。しかし、PA診断ガイドラインは本邦では確立して

いない。このため、日本内分泌学会と合同で「原発性アルドステロン症検討委員会」が平成 18 年 4 月に設立され、2 年間の予定で一般医家向けガイドラインの検討を開始した。その中で、PA のスクリーニング法に関して以下の提案を行った。①プライマリースクリーニングを行うことが重要であるので、対象は高血圧患者全例とする。②方法は座位にて血漿レニン活性 (PRA : ng/ml/hr) ・血中アルドステロン濃度 (PAC : ng/dl) を同時測定する。③PA のスクリーニング基準 (カットオフ値) は PAC/PRA 比 (ARR) > 20 とする。④治療中症例では、降圧剤の変更 (2 週間 Ca 拮抗薬 (+ $\alpha$  遮断薬) のみ) を行い、同様の診断基準を用いる。これらの内容に、専門医療機関への紹介・PA 暫定診断までの検査法を含めた診断の手引きとしてホームページ上に公開し更に追加修正を行っていく予定である。(西川)

副腎性プレクリニカルクッシング症候群 (PCS) の診断基準は使用する dexamethasone (DEX) の量に関して本研究班と間脳下垂体研究班 (プレクリニカルクッシング病 (PCD)) との間で相違がみられ、使用量の統一が望まれる。検討の結果、DEX 投与量 1mg が適当であると考えられた。しかし、今後 PCS 症例での EBM の蓄積による検証が必要と考えられ、また、より明確な診断基準作りのためにはコルチゾール測定値の標準化を行なう必要があるとされた。(柳瀬、高柳)

### (3) 副腎腫瘍・癌に関する研究

副腎皮質癌は発生頻度の低い腫瘍であるが、生物学的悪性度が高く予後が不良な症例も少なくない。最も効果的な治療法は外科的に完全摘出することであり、また術後療法が重要な役割を果たす。副腎皮質癌において標的治療の有用性を判定するため、標的因子を同定することには意義がある。そこで、摘出された副腎皮質癌および副腎皮質腺腫の検体の 10%ホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いて、現在及び近い将来に標的治療の対象となり得る特異的因子の発現を免疫組織化学にて検討した。その結果、今回検討した因子の中で唯一、副腎皮質癌において Cetuximab 等の標的因子である EGFR が有意に高発現を示した。Bevacizumab の標的因子である VEGFA や Trastuzumab の標的因子である HER2/neu は有意な発現の差を認めなかった。これらの結果より副腎皮質癌では Cetuximab 等の EGFR に対する標的治療薬が有効である可能性が示唆された。Bevacizumab や Trastuzumab の有用性は低いと考えられた。(笹野)

小児副腎癌と成人副腎癌の尿ステロイドプロファイルを解析し、ステロイドホルモン合成酵素活性について、小児副腎癌と成人副腎癌を比較した。対象は、病理診断された副腎癌患者 7 ヶ月から 73 歳 27 例 (男 11、女 16) と、健常対照生後 3 日から 73 歳の 2402 例で、蓄尿あるいは随時尿について、GCMS-SIM による尿ステロイドプロファイル (63 種) を解析した。その結果、副腎癌においては、 $3\beta$ HSD 活性は小児・成人共通に低下し、小児副腎癌においてより高頻度に低下、 $11\beta$ -hydroxylase 活性は、小児・成人共通に低下し、成人副腎癌においてより高頻度に低下、 $17,20$ -lyase 活性は、小児副腎癌で亢進、成人副腎癌で低下傾向、 $21$ -hydroxylase 活性は、小児副腎癌で低下、成人副腎癌で亢進傾向を示した。これより、小児副腎癌は、1) 成人副腎癌と同様  $11\beta$ -hydroxylase 活性低下を示す、2) 成人副腎癌より高頻度に  $3\beta$ HSD 活性低下、 $17,20$ -lyase 活性亢進を示すことが明らかになっ

た。(長谷川)

副腎癌は予後不良であり、副腎偶発腫として発見された腫瘍が副腎癌かどうかの鑑別を早期に行い、副腎癌であれば直ちに治療することが重要である。このため、副腎偶発腫瘍の疫学調査から5年間で報告を受けた3678例のうち、副腎癌として報告された50例の集計結果を基に副腎癌の疫学像を解析した。副腎癌の割合は1.4%で、平均年齢は58.8歳であり、性差はなかった。平均腫瘍径は8.3cmであり、副腎偶発腫全体平均腫瘍径3.0cmより明らかに大きかった。副腎癌のホルモン産生性をみたところ、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。鑑別には、腫瘍径とともに、従来から有用とされてきたマーカー(血中DHEA-S、尿中17-OHCSおよび尿中17-KS)、画像的特徴を含めて、総合的な判断が必要であることが示唆された。(上芝)

#### (4) ステロイドホルモン作用機構に関する研究

##### 1) アルドステロンの作用機構

アルドステロンの作用を仲介するMRによる遺伝子転写調節機構を明らかにするためにタンパク質のSUMO化修飾酵素のUbc9のミネラルコルチコイド受容体(MR)作用への関与を検討した。その結果、MRをSUMO化すると転写抑制に働き、一方、MRとのタンパク-タンパク相互作用により転写コアクチベーターとしても機能することを明らかにした。(柴田)

アルドステロンは心血管に直接作用して心筋の線維化、平滑筋の肥大や増殖、動脈硬化の進展に関与する。その分子機構を明らかにするために細胞内酸化ストレス発生の主要な酵素系であるNADPHオキシダーゼ構成分子であるNOX1に注目して検討した。その結果、アルドステロンは高食塩下でNOX1発現誘導を介して酸化ストレスを刺激し細胞障害をもたらすことを明らかにした。(宮森)

ヒトHDL受容体CLA-1は血管内皮細胞に発現しており、HDLによる血管内皮細胞型NOSの活性化に重要な役割を演じている。このCLA-1の発現はアルドステロンによって抑制され、NO産生を抑制することが示唆された。(村尾)

脂肪組織はエネルギー代謝以外に、ホルモン産生臓器として重要である。脂肪組織とミネラルコルチコイドホルモンに関しては、近年脂肪組織からアルドステロン分泌刺激物質が産生されることが報告されている以外にはなく、アルドステロンの脂肪組織における役割は不明である。今回ヒト及びラットにおける脂肪組織のステロイドホルモン産生の有無及びレセプター発現に関して検討を行い、脂肪組織にはステロイド合成酵素やステロイドホルモンレセプターが存在することを明らかにした。脂肪組織におけるアルドステロンの作用に関してはさらに検討が必要と思われる。(武田)

##### 2) グルココルチコイドの作用機構

GC分泌調節におけるアンドロゲン受容体(AR)の機能を明らかにするため、AR遺伝子欠損(ARKO)マウスを用いて解析し、ARは下垂体でのグルココルチコイド受容体(GR)遺伝子発現を正に制御することにより、GC分泌調節における視床下部-下垂体-副腎系のネガティブフィードバック機構を調節していることを明らかにした。(加藤)

GC作用調節機構を解明し、GC異常症の病態解明とGC療法を改良する事に役立つ研究である。新たなGC作用調節因子として同定したHEXIM1は、GRに直接結合し、GR応答性遺伝子発現を負に制御する。その分子機構を検討し、細胞内HEXIM1発現量は細胞のGC応答性を規定し、HEXIM1によるGR応答性遺伝子発現の抑制機構は、P-TEFb抑制、GRとの直接相互作用、という、少なくとも二つの異なった経路によることを明らかにした。(田中)

ステロイドホルモン受容体はリガンド依存性に核内に均一な細かいFociを形成する。その生理学的意義について検討し、このfoci形成は転写コアクチベーターとコリプレッサーの発現量の比に依存すること、また転写を阻害することによりfoci形成も阻害されることを明らかにした。その結果、ステロイドホルモン受容体のfociは、転写活性化を行う受容体とコアクチベーターの複合体が一時的に貯蔵される場所であることが推測された。(高柳)

GCの11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1 (11HSD1)に対する作用を検討し、GCが、11HSD1プロモーターに作用し、C/EBP $\alpha$ と協調的に11HSD1プロモーター活性を上昇させることを明らかにした。(大関)

非活性型のコーチゾンを活性型のコルチゾールに再活性化する、11 $\beta$ 水酸化ステロイド脱水素酵素タイプ1 (HSD11B1)・ヘキサース6リン酸脱水素酵素 (H6PD) 両遺伝子と内臓肥満との関連について検討した結果、内臓脂肪蓄積やHDL、高血圧等のいわゆるメタボリック症候群構成因子と関連することが示唆された。(宗)

### 3. 結論

副腎ホルモン産生異常に関連する病因、病態を把握し、その有用な診断・治療法を確立することを目的に、さまざまな臨床的研究および基礎的研究が行われ、多くの成果を得ることができた。成果の主なものは、

- (1) 胎仔副腎皮質特異的エンハンサーの同定と細胞増殖への関与を証明した、
- (2) ステロイドホルモン産生異常症に対する再生医療の開発を行った、
- (3) グルココルチコイド作用調節機構に関与するHEXIM1の役割を明らかにした、
- (4) 副腎癌の内分泌学的特徴を明らかにした、
- (5) 北海道におけるステロイドホルモン産生異常症の発症頻度とその実態について明らかにした、
- (6) 一般医家向け及び専門医療機関向けの原発性アルドステロン症の診療ガイドラインを作成した、

などである。

### 4. 健康危険情報

なし

### 5. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし



#### IV. 分担研究報告書

## (1) 副腎の発生・分化・再生に関する研究

# 副腎皮質の発生初期過程に関する研究

諸橋 憲一郎

自然科学研究機構 基礎生物学研究所

## 【研究要旨】

副腎皮質と生殖腺はステロイドホルモン産生能を有し、両者は初期発生から密接な関係を保っている。Ad4BP/SF-1 の遺伝子破壊マウスでは副腎と生殖腺が形成されないことから、本遺伝子がこれらの組織形成過程で重要な役割を担っていることが示唆された。そこで、トランスジェニックマウスの作製を通じ、Ad4BP/SF-1 遺伝子の副腎皮質での発現を制御するエンハンサーの検索を行ったところ、第4イントロンにエンハンサー領域を確定した。このエンハンサー配列を用い、Ad4BP/SF-1 を強制的に発現させることで異所性副腎の形成が可能となった。

## A. 研究目的

Ad4BP/SF-1 遺伝子の副腎皮質特異的発現を調節するエンハンサーを用い、副腎皮質の形成過程を理解することを目的とする。

## B. 研究方法

Ad4BP/SF-1 遺伝子の胎仔副腎皮質エンハンサーの制御下に Ad4BP/SF-1 自身を発現するプラスミドを作製した。このプラスミドを用いてトランスジェニックマウスを作製し、胎仔副腎皮質で Ad4BP/SF-1 を強制発現するマウスをえた。また、このプラスミドの Ad4BP/SF-1 を lacZ 遺伝子で置換したプラスミドを作製し、同様にトランスジェニックマウスを作製した。このマウスは胎仔副腎皮質原基で lacZ を発現するので、胎仔副腎皮質原基をブルーに染めることが可能である。これらの2種のマウスを交配し、胎仔副腎皮質における Ad4BP/SF-1 の強制発現の影響を検討した。

## (倫理面への配慮)

本実験にはトランスジェニックマウスを用いるが、全ての動物実験は自然科学研究機構動物実験指針に従って行なわれた。なお本研究は自然科学研究機構実験動物委員会の承認を得たものである。同様に DNA 組み替え実験については、組み替え DNA 実験員会の承認を得たものである。

## C. 研究成果

本研究では、Ad4BP/SF-1 の第4イントロンに同定された胎仔副腎皮質エンハンサーの制御下に Ad4BP/SF-1 自身を発現させるマウスを作製した。同様に、このエンハンサーの制御下に lacZ をレポーター遺伝子として挿入し、内在性の Ad4BP/SF-1 の発現を再現するトランスジェニックマウスを得た。これらの2種のマウスを交配し、胎仔副腎皮質における Ad4BP/SF-1 の強制発現の影響を調べ

たところ、正常の副腎皮質以外に、より頭部側に lacZ を発現する細胞集団を検出した。これらの細胞は副腎皮質特異的に発現する P450C21 を発現しており、副腎皮質としての性格を獲得しているものと思われた。

#### D. 考察

遺伝子破壊マウスの表現型の解析から Ad4BP/SF-1 遺伝子は副腎皮質の形成には必須の転写因子であることが明らかになってきたが、そのメカニズムは不明であった。本研究では胎仔副腎皮質特異的エンハンサーを用い、胎仔副腎の細胞で Ad4BP/SF-1 を強制発現させることで、Ad4BP/SF-1 の副腎皮質形成における影響を検討した。その結果、正常の副腎以外に異所性の副腎形成を確認した。これらの結果から Ad4BP/SF-1 が胎仔副腎の増殖に関与することが示された。一つの可能性としては、細胞周期の制御を介した増殖の亢進であり、もう一つの可能性は細胞死の制御を介した細胞数の上昇である。これらの点は今後検討すべき課題である。

#### E. 結論

Ad4BP/SF-1 遺伝子の発現増加は異所性の副腎皮質の形成を可能とした。

#### F. 研究発表

論文発表

1, Fatchiyah, M. Zubair, Y. Shima, S. Oka, S. Ishihara, Y. Fukui-Katoh, and K. Morohashi. Differential gene dosage effects of

Ad4BP/SF-1 on target tissue development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341, 1036-1045, 2006

2, M. Zubair, S. Ishihara, S. Oka, K. Okumura and K. Morohashi. Two-step regulation of Ad4BP/SF-1 gene transcription during fetal adrenal development; initiation by a Hox-Pbx1-Prep1 complex and maintenance via autoregulation by Ad4BP/SF-1. *Mol. Cell. Biol.* 26, 4111-4121, 2006

3, Y. Kojima, S. Sakaki, Y. Hayashi, Y. Umemoto, K. Morohashi, and K. Kohri. Role of transcription factors Ad4BP/SF-1 and DAX-1 in steroidogenesis and spermatogenesis in human testicular development and idiopathic azospermia. *Int. J. Urol.* 13, 785-793, 2006

4, M. Fukami, Y. Wada, K. Miyabayashi, I. Nishino, T. Hasegawa, G. Camerino, C. Kretz, A. Buj-Bello, J. Laporte, Gen Yamada, K. Morohashi, and T. Ogata. CXorf6 is a causative gene for hypospadias. *Nature Genetics* 38, 1369-1371, 2006

5, N. Sato, Y. Kamachi, H. Kondoh, Y. Shima, K. Morohashi, R. Horikawa and T. Ogata. Hypogonadotropic hypogonadism in an adult female with a heterozygous hypomorphic mutation of SOX2. *Eur. J. Endocrinol.* 156, 169-173, 2007

6, D-S. Wang, T. Kobayashi, L-Y. Shou, Y. Ohmuro-Matsuyama, G-J. Guan,