

先天性副腎低形成症の診断基準（1次案）

藤枝 憲二、向井 徳男
旭川医科大学小児科

田島 敏広
北海道大学大学院医学研究科小児科

【研究要旨】

副腎不全を呈する病態の原因の一つとして副腎皮質の形成異常があげられる。この中で先天性副腎低形成症（AHC）はおよそ 1/10,000～1/15,000 出生の頻度とされる先天性の比較的稀な疾患であり、遺伝形式から X連鎖性のもの [OMIM 300200] と常染色体劣性のもの [OMIM 240200] とに大きく分けることができる。両者においては副腎の組織像が異なっており、X連鎖性の場合には皮質永久層の欠落と胎児層に類似した細胞が存在する cytomegalic pattern が、常染色体劣性の場合にはいわゆる miniature-type cell の存在が特徴としてあげられる。X連鎖性 AHC に低ゴナドトロピン性性腺機能低下 hypogonadotropic hypogonadism (HHG) を合併する症例の多くで *DAX-1/AHC* 遺伝子の異常が報告され、原因遺伝子と考えられている。また、常染色体劣性を示す症例の一部には *SF-1/Ad4BP* 遺伝子異常の存在が報告されている。さらには AHC を合併する IMAGE association (syndrome) [MIM 300290]（子宮内発育不全（IUGR）、骨幹端異形成症（metaphyseal dysplasia）、AHC、外性器異常（genital anomalies）を主要症状とする症候群）が 1999 年に報告され、常染色体劣性遺伝形式の可能性が指摘されているものの、*DAX-1* 遺伝子、*SF-1* 遺伝子の異常はなく、また glycerol kinase 欠損も認められず、現在のところ病因は全く不明である。

臨床症状としては嘔吐、色素沈着、低血圧、ショック症状などの副腎皮質機能不全症状が認められるが、その発症時期に関しては新生児早期に発症するものから乳児期あるいは小児期になって発症するものまで幅広い。検査所見においては通常の副腎不全の場合と同様の特徴が認められるが、画像診断にて副腎が描出されないことが他の副腎不全を来す疾患、特に先天性副腎過形成症 congenital adrenal hyperplasia (CAH) との鑑別には重要な所見となる。

糖質コルチコイド、鉱質コルチコイドおよび副腎アンドロゲンの総合的な脱落を来すため、副腎ステロイドの早期補充をしない限り、塩喪失症状による hypovolemic shock により死亡する。ステロイド補充により生存できた場合に、思春期以降明らかとなる HHG に対しては必要に応じ hCG-hMG 療法や GnRH パルス

療法などが試みられている。

このように症例数こそ少ないものの、診断の遅れが死に直結する疾患である AHC についてはこれまでのところ世界的に見てもその診断基準が提唱されていないため、本研究班として診断基準案の作製を試みた。診断基準が策定されることにより稀少疾患である本疾患の診断精度が向上することが期待されるとともに、疫学調査等を行う際にも大変有用と考えられる。

先天性副腎低形成症の診断基準（1次案）

I. 主症候（次の症候のいくつかがみられる）

1. 哺乳不良・食欲不振
2. 体重増加不良
3. 全身倦怠感
4. 易疲労感
5. 脱力感
6. 嘔吐
7. 痙攣
8. 皮膚色素沈着
9. 停留精巣
10. 二次性徴発達不全（年長児）
11. ミオパチー（筋力低下）
12. 精神遅滞
13. 成長障害
14. 骨幹端異形成症
15. 外性器異常
16. ショック
17. 低血糖
18. 低血圧
19. 不整脈

II. 検査所見

1. 全ての副腎皮質ホルモンの低下
 - (1) 血中コルチゾールの低値
 - (2) 血中アルドステロンの低値
 - (3) 血中副腎性アンドロゲンの低値
 - (4) 尿中 17-OHCS/コルチゾール, 17-KS の低値
 - (5) ACTH 負荷試験で全ての副腎皮質ホルモンの分泌低下
2. 血中 ACTH の高値
3. 画像診断による副腎低形成の証明

III. 参考所見

遺伝子診断で DAX-1 遺伝子または SF-1 遺伝子の変異の証明

IV. 除外規定

ACTH 不応症（コルチゾール低値、アルドステロン正常）は除く

[診断基準]

確実例：I, II, III および IV を満たすもの

ほぼ確実例：I, II および IV を満たすもの

疑い例：I, IV および II の一部を満たすもの

(2) 副腎ホルモン産生異常に関する研究

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

岡本 光弘
帝塚山大学

【研究要旨】

アルドステロン合成酵素 (CYP11B2) の遺伝子の発現はアンギオテンシン II や K イオンにより制御されている。アンギオテンシン II や K は Ca^{2+} や PKC シグナルを活性化させ、CYP11B2 の遺伝子発現には Ca^{2+} が特に重要であり、 Ca^{2+} で活性化された CaMK1 とその下流転写因子 CREB が関与すると報告されている。しかしながら、その詳細な制御や時間依存的活性化の機構には不明な点が多い。本研究においては、CYP11B2 の mRNA 発現を指標に Ca^{2+} シグナル伝達の時間依存的な調節を検討した。さらに Ca^{2+} シグナルの調節に関与する塩誘導性キナーゼ (SIK1) とその基質 TORC の役割をヒト副腎皮質球状層由来細胞 (H295R) を用いて明らかにすることを目的とした。その結果、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いだした。

A. 研究目的

アルドステロンは、副腎皮質球状層から分泌されるステロイドホルモンで、その作用としては腎臓の尿細管から Na^+ / H_2O の再吸収、 K^+ の排泄を促進する。そのため、アルドステロンは血中の Na^+ や K^+ の電解質を一定に保ち、生体内の体液量の調節において重要なバランスを保つ役割を担っている。

アルドステロンはコレステロールを原料として合成され、CYP11B2 がミトコンドリアにおいてその合成の律速かつ最終のステップを触媒する。したがって、アルドステロン合成量とアルドステロ

ン合成酵素である CYP11B2 の mRNA の発現量 (転写量) には相関関係があると考えられている。以上の観点から、CYP11B2 遺伝子の発現調節機構を明らかにすることは、アルドステロン合成及びアルドステロンの作用である血圧の維持との関係解明に重要であると考えられる。

生体において CYP 11B2 の遺伝子発現の促進は、様々なシグナルによる遺伝子プロモーターの活性化によって起こる。CYP 11B2 の遺伝子発現は、アンギオテンシン II や K^+ によってシグナル伝達物質 (因子) が活性化されることによって起こるとされている。中でも細胞質内 Ca^{2+}

+増加が重要なセカンドメッセンジャーとして機能する。

これまでのCa²⁺依存的なCYP 11B2の遺伝子発現調節機構の研究により、カルモジュリン依存的プロテインキナーゼI (CaMK I) が重要な役割を演じていることが明らかにされている。しかしCYP11B2の遺伝子の発現におけるCa²⁺のシグナル伝達経路の貢献の全体像については不明な点が多い。そこで今回の研究では、CYP11B2の遺伝子発現における他のCa²⁺のシグナル伝達経路としてカルモジュリン依存的プロテインキナーゼキナーゼ(CaMKK)とカルシニューリンを介した経路についてその重要性を検討した。さらに、cAMPシグナルによって誘導されるCYP11B2遺伝子の発現調節に関わるSIK1-TORCシグナルについても検討を行った。

B. 研究方法

細胞の培養およびCa²⁺シグナルの誘導

ヒト副腎球状層由来細胞(H295R)はOpiti-MEM I Reduced-Serum Medium / 2% NuSerum1で培養した。RNAの解析には6穴プレートで培養し、約48時間後にsemi-confluentに達した状態でBayK8644 10 μM処理した。処理は2時間、6時間、16時間を行った。

RNA抽出及び逆転写

処理後のH295R細胞から、RNAを抽出した。抽出方法は、Qiasol Lysis 溶液 800 μlで細胞を完全に溶解し、400 μlのクロロホルムを加え、攪拌後に12000rpm、5分間遠心分離し上清の回収

を行った。上清350 μlを別のチューブに移し、EZ1RNA Universal Tissue Kit (Qiagen)を用いて、BioRobot EZ2(Qiagen社)によってRNAの抽出を行った。得られたRNA1 μgを、トランスクリプター ファーストストランド cDNA 合成キット (Roshe)を用いて逆転写反応を行った。

リアルタイムPCR

逆転写後のcDNAからシトクロムP450 11B2のmRNAの発現レベルをリアルタイムPCRによって測定した。サンプルcDNAは5倍積を5 μl、MastarMixを20 μlの全量25 μlで測定を行い、PCRの条件として、ステップ1を94°Cの30秒、ステップ2を94°Cの20秒、60°Cの20秒、72°Cの20秒を42サイクル行った。シトクロムP450 11B2のプラスミドDNAを検量線(1pg/μl、0.1pg/μl、0.01pg/μl、0.001pg/μl、0.0001pg/μl)作成に利用した。また、18SリボソームRNAの増幅率も測定し、サンプルmRNAの増幅率を18SリボソームRNAの相対量として表すことにした。

C. 研究結果

Ca²⁺シグナル伝達経路によるCYP11B2のmRNA発現制御におけるCaMKK及びカルシニューリンの重要性を明らかにするために、CaMKK及びカルシニューリンの特異的阻害剤を用いてCYP11B2発現細胞H295RでのmRNA発現の解析を行った。CaMKKの阻害剤STO-609(20 μM)、カルシニューリン阻害剤シクロスフォリンA(10nM)を加えて30分処理した後、それぞれCa²⁺の刺激を行った。Ca²⁺刺激には

K⁺チャンネルアゴニストの BayK8644 (10 μM) を利用した。

図 1 に示す様に、Ca²⁺誘導時間が 2 時間の場合では、コントロールに比べて BayK8644 のみではシトクロム P450 11B2 の mRNA レベルは変化していないが、STO-609 処理した H295R 細胞のシトクロム P450 11B2 の mRNA 発現は増加した。次に Ca²⁺誘導時間が 6 時間の場合では、コントロールに比べて BayK8644 のみによる CYP11B2 の相対的 mRNA 量は増加し、それ以上に STO-609 処理した H295R 細胞では相対的 mRNA 量は増加した。また、16 時間の場合では、コントロールに比べて BayK8644 のみによる CYP11B2 の相対的 mRNA 量は増加し、STO-609 処理した H295R 細胞では、BayK8644 のみによるシトクロム P450 11B2 の mRNA の相対的増加をやや阻害した。これらの結果より、CYP 11B2 の mRNA 発現は Ca²⁺誘導の初期段階では CaMKK によって阻害され、後期では亢進されることが示唆された。一方、シクロスポリン A 処理した H295R 細胞では、CYP11B2 の mRNA の発現誘導は完全に阻害された。すなわち、カルシニューリンは Ca²⁺依存的 CYP11B2 の発現に必須であることが明らかとなった。

Ca²⁺シグナルが活性化すると、CaMKK とその下流の CaMK1 の活性化が起こる。CaMK1 は CYP11B2 の遺伝子発現を促進するから、CaMKK 阻害による CYP11B2 の発現促進現象には、CaMK1 以外の分子が関与する。

SIK1 は副腎皮質において高 Na 食や高 K 食を与えたラットで誘導されたリン酸化酵素、塩誘導性キナーゼとして単離した

ものである。ACTH シグナル伝達経路の研究から、SIK1 は CYP11B2 を含む多くの PKA 依存的遺伝子発現を抑制することが明らかとなった。その作用は転写因子 CREB であり、CREB 特異的転写共役因子 TORC をリン酸化することで、CRE 活性を抑制している。Ca²⁺シグナル依存的な CaMK1 を介した CYP11B2 の発現にも CREB が重要な役割を演じており、SIK1 の関与が示唆される。そこで、アデノウイルスにより SIK1 を強制発現することで、Ca²⁺依存的 CYP11B2 の遺伝子発現における SIK1 の関与を検討した。

図 2 に示す様に、SIK1 を強制発現下では Ca²⁺依存的 CYP11B2 の発現は観察されなかった。このことから、SIK1 は Ca²⁺依存的 CYP11B2 の発現にも関与することが明らかとなった。

SIK1 の Thr182 がリン酸化されると活性化型に変換する。そこで、試験管内で CaMKK が SIK1 をリン酸化し得るかどうかを Western blot 法で検討した。GST 融合 CaMKKa と b を COS 細胞を利用して発現後、精製し、SIK1 の Thr182 を含む部分を基質として ATP と反応させた。反応後に SDS-PAGE で分離し、Western blot を行った。その結果、図 3 に示すように CaMKKa も b もともに、SIK1 を直接的にリン酸化することができることが明らかとなった。

D. 考察及び結論

本研究により Ca²⁺依存的 CYP11B2 遺伝子の発現調節機構において次の事実が明らかになった。1) カルシニューリンが遺伝子発現に誘導に必須である。2) CaMK1 上流の CaMKK はむしろ遺伝子発現

を抑制する。3) CaMKK による抑制には SIK1-TORC 経路の関与が示唆される。

さらに、カルシニューリンの作用機作の1つはTORCの脱リン酸化であることが考えられるから、CYP11B2 遺伝子の発現調節にはやはり SIK-TORC 経路が重要な役割を演じているものと考えられる。

副腎皮質における SIK1 の誘導には ACTH と高塩ストレスの2種類が存在するが、双方において SIK1 は抑制的に機能することが考えられる。すなわち、SIK1 はステロイド合成系の細胞内フィードバック分子として機能しているものと考えられる。今後、SIK1 の異常に伴う病態がいかなるものか検討する必要がある。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Takemori H, Kanematsu M, Kajimura J, Hatano O, Katoh Y, Lin XZ, Min L, Yamazaki T, Doi J, Okamoto M.

Dephosphorylation of TORC initiates expression of the StAR gene. *Mol Cell Endocrinol* 2007 in press

2) Katoh Y, Takemori H, Lin XZ, Tamura M, Muraoka M, Satoh T, Tsuchiya Y, Min L, Doi J, Miyauchi A, Witters LA, Nakamura H, Okamoto M.

Silencing the constitutive active transcription factor CREB by the LKB1-SIK signaling cascade. *FEBS J.* 273, 2730-2748 2006

図 1 : Ca²⁺依存的 CYP11B2 の mRNA 発現

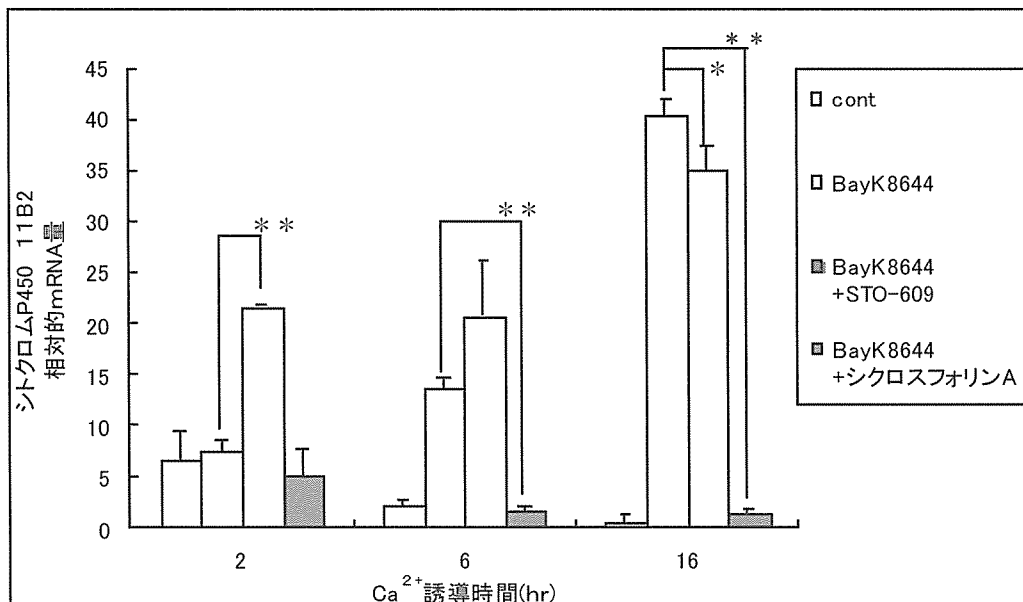


図 2 SIK1 による CYP11B2 発現抑制

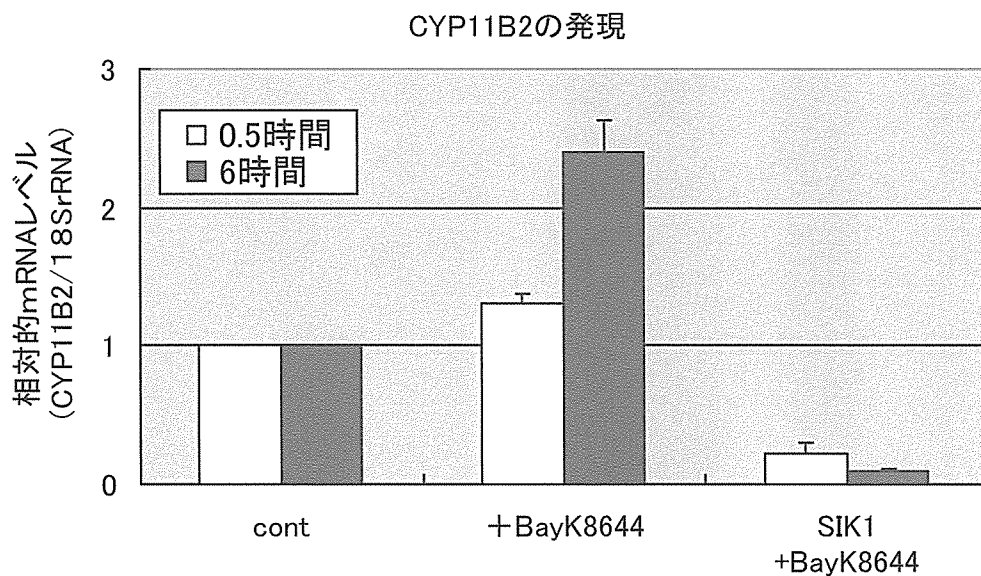
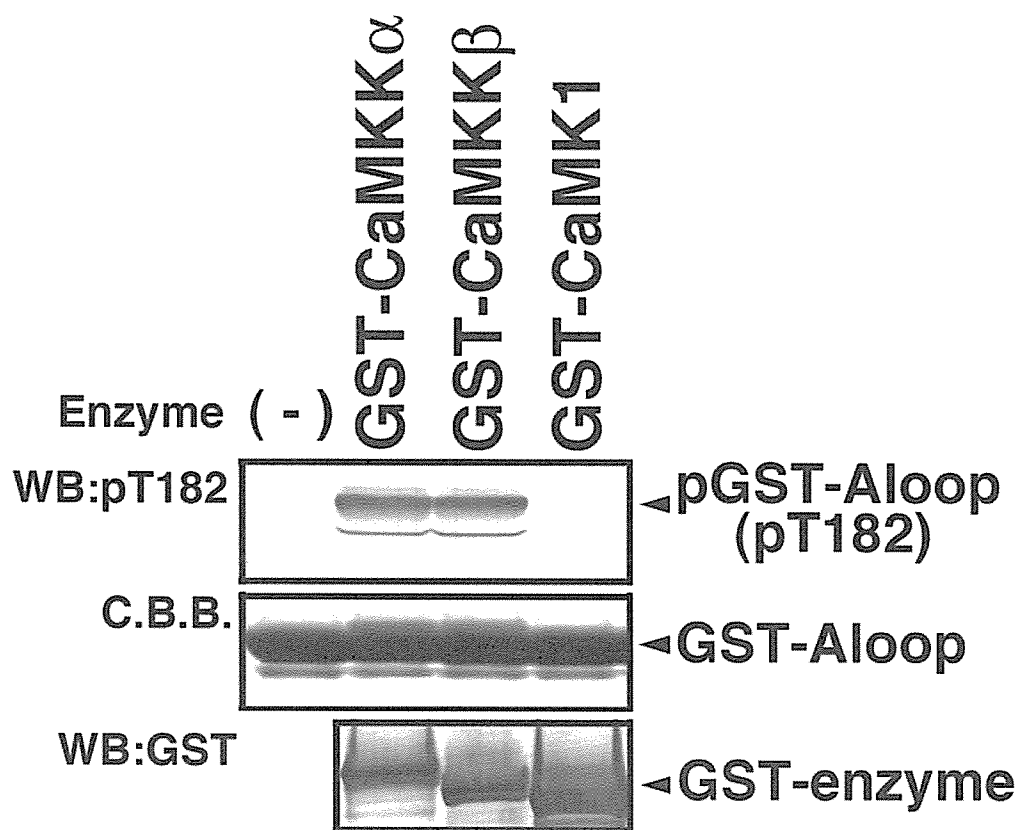


図3 CaMKKによるSIK1のリン酸化



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

菅原 照夫

北海道大学大学院医学研究科分子医科学

【研究要旨】

Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) 蛋白質はコレステロールが P450scc の存在する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) は哺乳動物の組織に存在しており、副腎では DHES などの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 の役割を調べるよう意図された。ヒト副腎癌細胞である H295R 細胞とヒト卵巣顆粒膜細胞 KGN 細胞に種々の量の CS を添加して培養した。ステロイドホルモンの合成能を評価するために、培養液中のプレグネノロン生産量を測定した。CS を 100 μ g/ml を加えた培養液の H295R 細胞が生産したプレグネノロンの量は添加しない群に比べて有意に減少した。細胞の抽出液を用いたウエスタンブロットで StAR 蛋白質レベルの解析をした。CS を 100 μ g/ml を加えた培養液では StAR 蛋白質レベルが減少したのに対して、GAPDH の蛋白質レベルは変化がなかった。StAR 蛋白質レベルが低下する機序を調べるために、RT-PCR を行い、StAR の mRNA の発現を調べた。StAR の mRNA 量は CS を添加した細胞では低下した。StAR 蛋白質レベルの減少は StAR mRNA の減少によることが明らかとなった。結論として、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。

A. 研究目的

コレステロールからのステロイドホルモン合成にはいくつかの段階を必要とする。合成の第一ステップはミトコンドリア内膜にあるチトクローム P450 側鎖切断酵素 (P450scc) によってコレステロールからプレグネノロンの変換である。StAR 蛋白質はコレステロールをミトコンドリア内膜の移行に関与している。StAR 蛋白質は先天性リポイド副腎過形

成の原因因子のひとつであり、StAR 蛋白質がステロイドホルモンの合成律速因子であることは明らかになっている。StAR 蛋白質は 37 kDa の前駆体で合成され、ミトコンドリアに輸送されて 30 kDa の成熟蛋白質になる。

コレステロール硫酸 (CS) は哺乳動物の組織に存在しており、副腎ではプレグネノロン硫酸、デヒドロエピアンドロステロン硫酸とエストロン硫酸などのステ

ロール硫酸などの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。脱硫酸化酵素であるステロイドスルファターゼ (STS) ステロイドホルモン産生臓器である卵巣、精巣、副腎に発現している。STSはCSを脱硫酸化して遊離のコレステロールを産生し、StAR蛋白質は脱硫酸化したコレステロールをミトコンドリアに輸送する。本研究はステロイドホルモン産生細胞におけるCSの役割を調べるよう意図された。

B. 研究方法

細胞培養

ヒトサル副腎癌細胞 H295R 細胞およびヒト卵巣顆粒膜細胞を用いた。

プレグネノロンの測定

培養液中のプレグネノロンはELISAで測定の測定した。

ウェスタンブロット解析

細胞から抽出した蛋白質をもちいて、ウェスタンブロット解析した。抗StAR抗体をもちいて解析した。

RT-PCR 解析

細胞から抽出したmRNAをもちいて、逆転写反応をし、その後PCR反応により遺伝子を増幅した。

C. 研究結果

ステロイドホルモン生産に対するCSの効果

H295細胞およびKGN細胞培養液中にCSを添加した。ステロイドホルモンの産生性を評価するために、プレグネノロン量を測定した。CSを添加するとプレグ

ネノロン産生

はH295R細胞およびKGN細胞においては有意に低下した。H295R細胞ではCSを加えると44.6%に、またcAMP添加した状態では44.8%のプレグネノロン量となった。

CSの容量依存性

添加するCS量を変化させるとH295R細胞で産生されたプレグネノロンは容量依存性に減少した。

StAR蛋白質発現に対するCSの効果

StAR蛋白質レベルに対するCSの効果を知るために、培養液細胞解中にCSを添加したH295R細胞からRIPA bufferで細胞内蛋白質を抽出した。CSが添加するとStAR蛋白質の前駆体蛋白質(37kDa)と成熟体(30kDa)の蛋白質レベルは低下した(図1)。

StAR遺伝子発現に対するCSの効果

StAR蛋白質レベルが低下する機序を知るために、RT-PCRを行い、StARのmRNAの発現を調べた。StARのmRNA量はCSを添加した細胞では低下した。CSによるStAR蛋白質レベルの減少はStAR mRNAの減少によることが明らかとなった(図2)。

D. 考察

ステロイドホルモン産生細胞では、LDLから供給されたコレステロールがステロイドホルモンの前駆体となる。また、小胞体では遊離のコレステロールを供給するためにSTSがCSを脱硫酸化する。STSによって産生されたコレステロールの輸送経路はLDLとなっている。CSを含んだ培養液でのステロイド産生細胞である

H295R 細胞および KGN 細胞におけるプレグネロン生産は CS が関与し、ステロイドホルモンの産生を低下させる。CS は細胞のステロイドホルモンの生産に関与する。

細胞内コレステロールの移動についての詳細な解析は少ないが、StAR 蛋白質の発現の機構は明らかになりつつある。StAR 遺伝子のプロモーター領域はステロイドホルモン産生細胞では STS によりコレステロールが増加する。増加した細胞内のコレステロールが StAR 蛋白質の産生を調節することが考えられる。ステロイドホルモン産生細胞における StAR 蛋白質の発現レベルの調節機構を明らかにするために、CS による StAR プロモーター領域の解析をし、StAR 遺伝子発現の制御機構を明らかにする必要があると思われる。

E. 結論

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。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Teruo Sugawara: Development of a recombinant yeast assay to detect Ah-receptor ligands. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 16 (5) 287-294 2006.
2. Teruo Sugawara, Eiji Nomura and Nobuhiko Hoshi: Both N-terminal and C-terminal regions of steroid

sulphatase are important for enzyme activity. *J Endocrinology* 188(2):365-74, 2006

3. Teruo Sugawara, Noriaki Sakuragi, Hisanori Minakami: CREM confers cAMP responsiveness in human steroidogenic acute regulatory protein expression in NCI-H295R cells rather than SF-1/Ad4BP. *J Endocrinology*. 191(1):339-348, 2006
4. Katsuhiko Warita, Teruo Sugawara, Zhan-Peng Yue, Shinji Tsukahara, Ken-ichiro Mutoh, Yoshihisa Hasegawa, Hiroshi Kitagawa, Chisato Mori and Nobuhiko Hoshi: Progression of the Dose-Related Effects of Estrogenic Endocrine Disruptors, an Important Factor in Declining Fertility, Differs between the Hypothalamo-Pituitary Axis and Reproductive Organs of Male Mice. *J of Vet MedSci* 68(12): 125-67, 2006
5. Ishihara, K., Warita, K., Tanida, T., Sugawara, T., Kitagawa, H., Hoshi, N.: Does paternal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) affect the sex ratio of offspring? *J of Vet MedSci*, 2007 accepted

2. 学会発表

1. Teruo Sugawara, Eiji Nomura: Endometrial carcinoma cells express enzymes associated with steroidogenesis and locally produce steroid hormones. 17th International symposium of the

journal of steroid biochemistry
and molecular biology. Seefeld,
Tyrol, Austria May 31-June 3,
2006

September 13-16, 2006

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

2. Teruo Sugawara, Yoshio Makita,
Kenji Fujieda: Association of
Spermatogenesis with Ser164Arg and
Arg417Trp Polymorphism in the Gene
of Steroidogenic Acute Regulatory
Protein-Binding Protein. The
Endocrine Society' s 88th Annual
Meeting ENDO 06 Boston, MA June
24-27, 2006
3. Teruo Sugawara, Noriaki Sakuragi,
Nobuhiko
Hoshi: Immunohistochemical Study
of Steroidogenic Acute Regulatory
(StAR) Protein in Ovarian
Tumors. 6th Sapporo International
Symposium on Ovarian Function.
(Oral), Otaru, Japan, August 4-6,
2006
4. Teruo Sugawara, Eiji Nomura,
Tadashi Sagawa, Noriaki Sakuragi,
Seiichiro Fujimoto: CYP11A1
Polymorphism and Risk of
Gynecological Malignancy in Japan.
6th Sapporo International
Symposium on Ovarian Function.
(Poster), Otaru, Japan August 4-6,
2006
5. Teruo Sugawara: Steroid sulfatase
increases steroidogenic acute
regulatory protein level and
stimulates steroid production.
(Poster), Athens, Greece.

☒ 1

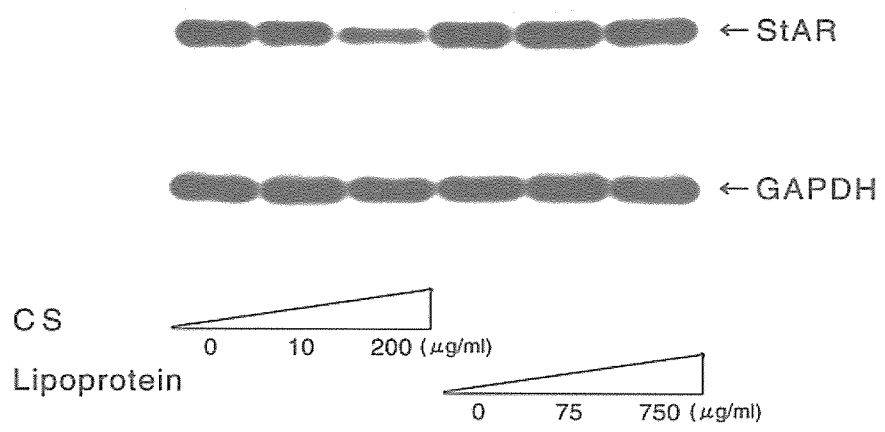
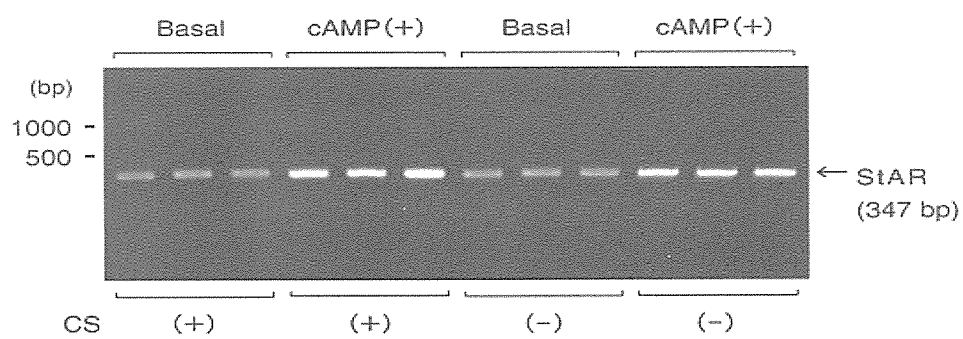


图 2



Yeast two-hybrid system を用いた StAR タンパク相互作用因子同定の試み

藤枝 憲二、向井 徳男、鈴木 滋
旭川医科大学小児科

【研究要旨】

先天性副腎過形成症 (CAH) の中でも重症型を呈するリポイド CAH は日本人に比較的多く発症することが知られており、多くは StAR タンパク (steroidogenic acute regulatory protein) の異常が、一部にコレステロール側鎖切断酵素 (P450_{scc}) の異常が原因となることが報告されている。しかしながら、リポイド CAH 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ことを目的とした。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。その結果、13 個の陽性クローンを同定し、現在さらなる検証を行っている。

A. 研究目的

先天性副腎過形成症 (CAH) の中でもコルチゾール、アルドステロン、性ステロイドホルモンすべてが欠乏し、重症型を呈するリポイド CAH は日本人に比較的多く発症することが知られており (日本人 CAH の約 5%)、StAR タンパクの異常が原因となることが報告されている。その後、コレステロールからプレグネノロンへのステロイド合成過程の律速段階に関わるコレステロール側鎖切断酵素 (P450_{scc}) の異常症を Tajima らが同定している。しかしながら、リポイド CAH の症例において StAR にも P450_{scc} 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、疾患との関連や機能について検討することを目的として研究を進める。StAR タンパクは、LDL 受容体を介してステロイド産生細胞内に取り込まれたステロイド合成の基質であるコレステロールをミトコンドリア外膜からステロイド合成のある内膜へと移送する機構に関係していることが示されているが、その詳細なメカニズムについては未だ不明な点が多い。このことから StAR タンパクとの相互作用因子を同定することができれば、ステロイドホルモン産生に関連した細胞内コレステロール移送機構についても新たな

な知見を提供することが可能となる。

B. 研究方法

ヒト副腎組織から抽出された RNA (total RNA および mRNA) を購入し、それらを鋳型として cDNA 合成を行って、ヒト副腎由来の cDNA ライブラリーを作製する。作製した cDNA ライブラリーを yeast two-hybrid system を用いて、全長および N 末端 62 アミノ酸を欠く (-N62) ヒト StAR との相互作用因子のスクリーニングを行う。この -N62 ヒト StAR タンパクは既にコレステロール輸送において十分な機能を有することが証明されている。これら 2 種類の StAR タンパクと相互作用すると考えられる陽性コロニーからライブラリープラスミドを抽出し、塩基配列を同定してデータベースとの照合することで、因子を同定し、これまでに蓄積されている発現様式や機能についての情報を収集する。さらに、候補因子同定後には StAR タンパクと候補因子タンパクを *in vitro* translation で作成し、それらのタンパク間相互作用の有無について特異的抗体を用いた免疫沈降法の手法を用いて検討する。

C. 研究結果

1 次スクリーニングを計 3 回行い、295 個の陽性コロニーを同定した。さらに相互作用の確認実験を繰り返し行った結果、最終的に 13 個の候補因子を同定した。現在はこの 13 個の候補因子についてそれぞれ全長および -N62 の StAR とのタンパク-タンパク相互作用の確認を *in vitro* translation で作成したタンパ

クについて特異的抗体を用いた免疫沈降法で検証することを継続して行っている。

D. 考察

これまでに同定できた相互作用候補因子 13 個についてこれまでに得られている情報を検索した結果、ステロイド産生もしくはコレステロール輸送に関連した機能に関する情報は無い。このため、タンパク間相互作用が確かめられた場合にはこれらの機能に関する検討を加えていく必要がある。

E. 結論

ヒト副腎由来の RNA から合成した cDNA ライブラリーについて StAR タンパクとの相互作用因子の同定を目指し、yeast two-hybrid system を用いたスクリーニングを行ったところ、13 個の陽性クローンを同定したため、現在免疫沈降法を用いてのタンパク-タンパク相互作用の検証・確認を進めているところである。

F. 知的財産の出願・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

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

笠山 宗正、大月 道夫、森田 真也、和泉 真紀、宮武 明彦*

大阪大学大学院医学系研究科 内分泌・代謝内科学

医療法人宮武内科*

【研究要旨】

少量 ACTH 試験が、グルココルチコイド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であるか、またその結果がグルココルチコイド薬の下垂体-副腎皮質系以外の組織への影響を反映するかを明らかにするために、吸入ステロイド薬で治療中の喘息患者 56 例を対象として少量 (1 μ g) ACTH 試験を実施した。14 例 (25%) において血清コルチゾール値は低反応を示したが、250 μ g ACTH 試験を実施した 12 例では全例が正常反応と判定された。少量 ACTH 試験で低反応を示した症例は、正常反応例に比して骨密度 (Z スコア) が低く、頸動脈硬化の頻度が少ない傾向を認めた。培養血管内皮細胞を TNF α で刺激したときの IL-6 産生を、フルチカゾンにデキサメサゾンより低濃度で抑制した。以上の結果より、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が示唆された。

A. 研究目的

関節リウマチや SLE などの疾患では、比較的少量のグルココルチコイド (GC) 薬が継続投与される場合が多い。これら GC 薬の継続投与により発症する薬剤性 (続発性) 副腎皮質機能低下症は最も高頻度に認められる副腎皮質機能低下症である。薬剤性副腎皮質機能低下症患者では、GC 薬の減量・中止を行う場合や身体ストレス時の GC 補充療法の必要性の有無を判断するために、内因性副腎皮質機能を適切に評価することが必要である。しかし、これら薬剤性副腎皮質機能低下症患者の管理方法についてはガイドラインがなく、その対応は医師によってまちまち

である。

続発性副腎皮質機能低下症を診断・評価する方法として、ACTH 試験や CRH 試験が用いられている。迅速 ACTH 試験は外来診療においても実施可能な簡便な検査法であり、わが国では 250 μ g の合成 ACTH (酢酸テトラコサクトド) を用いた試験が標準法として用いられてきた。一方、海外では 1990 年代から 1 μ g の少量の ACTH を用いる方が潜在性の副腎皮質機能評価法の判定に望ましいとの意見も出されている。

喘息患者の標準的治療薬である吸入ステロイド薬 (ICS) は全身への影響が少なく、糖尿病・高血圧・肥満などの代謝異