

では外科的に完全切除することが最も効果的な治療法とされているが<sup>2) 3)</sup>、先に述べたような進行例では完全切除は困難なものとなる上、病理組織学的にも良性・悪性の鑑別が困難なことが多く、腫瘍を全摘され良性と診断されたにも関わらず再発を認めた症例も報告されている<sup>4)</sup>。こうした腫瘍の特性を見ても術後療法が重要な役割を果たす事が決して少なくはないと考えられる。しかしながら、副腎皮質癌は、放射線療法や通常の悪性腫瘍に用いられる化学療法には抵抗性を示すことが多いのが現状である<sup>24)</sup>。そこで現在では副腎皮質に特異的な治療薬である mitotane が広く使用され、25%～61%の患者で効果が認められている<sup>2)</sup>。しかしながら腫瘍を完全切除できず、mitotane などによる術後療法が奏効しなかった場合は残念ながら予後不良となる。また mitotane は、健側副腎破壊による副腎不全や、痴呆・妄想といった中枢神経系の障害、消化管出血など、副作用が顕著であるという副作用も問題となっている。

近年、腫瘍分子生物学の進歩により、腫瘍細胞の分子レベルでの増殖・転移・浸潤機構が明らかにされてきており、増殖因子や受容体とその下流の細胞内情報伝達経路の異常などの関与が報告されてきている。そして多くのヒト悪性腫瘍においてこの機序に関わる分子に着目し、これを標的とする治療薬(分子標的治療薬)の開発が進められてきている。

従来の抗癌薬は、主として細胞分裂や細胞増殖といったDNAの複製や代謝経路など細胞の生命活動の基本となる機能に

作用することで細胞分裂や増殖を阻害するものであり、癌細胞だけでなく、分裂・増殖を盛んに行っている正常の細胞に対しても非選択的に毒性を呈することは避けられない現象であった。その一方で、分子標的治療薬は、細胞内情報伝達物質や細胞周期に関わる蛋白など、特定の機能を持つ分子のうち、悪性腫瘍に過剰発現するものを狙って作用することで全身の正常組織への副作用を最小限にして抗腫瘍効果の向上と副作用の軽減が期待されている薬剤であり、今後、抗癌治療の主流となる可能性を秘めている<sup>5)</sup>。

しかしこれら分子標的治療薬はその作用が特異的であることから、腫瘍細胞にその薬剤の標的因子が発現していなければまったく臨床効果が認められない。このような理由から生検あるいは手術で摘出した腫瘍の標本を用いてこれらの標的因子が発現しているか否か、発現しているのであればどの程度発現しているのかといった検討が、治療効果を得るにあたっては極めて重要である。

現在、分子標的治療としては、Trastuzumab、Rituximab、Bevacizumab、Imatinib、Erlotinib といった薬剤が実際に臨床の場で用いられており、更に多くの同様な薬剤の開発・治療が行われている。これら標的治療薬は乳癌・大腸癌などの悪性腫瘍に対する単独療法または併用療法において、従来の標準治療と比べ有意な生存延長を示したとする報告もなされている<sup>6)7)</sup>。

そこで今回、難治性である副腎皮質癌に対し、何らかの特異的標的治療が成立するかどうかを検討するために最初に重要

となる標的因子の発現を、良性腫瘍と比較して検索した。

## B. 研究方法

症例は1998年から2005年の期間に切除された副腎皮質癌 (ACC)7例(Table.1)と、1998年から2003年の期間に切除された副腎皮質腺腫(ACA)16例(Table.2)を対象とした。

今回検討した標的因子(Fig.1-1,2)は、現在標的治療の因子として挙げられるリガンドおよび受容体であるBevacizumabの標的因子 VEGFA (vascular endothelial growth factor A)と、その受容体 VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2), Cetuximabの標的受容体 EGFR (epidermal growth factor receptor), Trastumabの標的受容体 HER2/neu (human EGF receptor type 2), これら受容体の下流に存在する細胞内情報伝達経路の因子として p-ERK1/2 (extracellular signal regulated kinase 1/2), p-AKT, mTOR (mammalian target of Rapamycin), p-p70S6K (p70 S6 kinase), p-S6RP (S6 ribosomal protein), p-4EBP (4E binding protein)、中心体構成蛋白としてNPM (Nucleophosmin)を対象とした。

今後の広範な普及を図るために標本はホルマリン固定パラフィン包埋標本を使用した。

抗体は特殊なものは用いず汎用性の高いCell Signaling社、abcam社、SIGMA社、Santa Cruz社より購入したものを使用した。

免疫組織化学の手順は従来通りの

avidin-biotin signaling systemもしくはpolymer signaling amplification systemに従って行った。(Table.3)

染色した標本は半定量的に解析し、染色陽性細胞の割合に応じて0=0%, 1=1-5%, 2=6-25%, 3=26-50%, 4=51-75%, 5=76-100%と分類した。

結果は0~5に分類した値の腫瘍ごとの平均値の差の検定(t検定もしくはWelchの方法)を行い、良性腫瘍と比較して悪性腫瘍で過剰発現の見られた因子を検討した。

(倫理面への配慮)

症例はすべて匿名化して検索しており、研究計画は東北大学医学部倫理委員会に提出済みである。

## C. 研究結果

染色した病理組織標本の写真を(Fig.2)に示す。

最初に腫瘍ごとの平均値の差の検定を行った(Fig.3)。EGFRは副腎皮質癌(平均値 3.43)の方が、副腎皮質腺腫(平均値 1.38)よりも有意に高発現であった(p=0.042)。

VEGFR2は副腎皮質癌(平均値 2.00)の方が副腎皮質腺腫(平均値 0.94)よりも発現が高い傾向にあったが、有意差は認めなかった(p=0.122)。更にVEGFAは副腎皮質癌(平均値 2.57)と副腎皮質腺腫(平均値 2.63)でほとんど差がない結果となった(p=0.905)。

HER2/neuは今回、副腎皮質癌、副腎皮質腺腫とも発現は認められなかった。

Rapamycinの標的でもあるmTORの

発現動態であるが、これも副腎皮質癌(平均値 4.29)と副腎皮質腺腫(平均値 4.50)で差は認められなかった( $p=0.561$ )。

他の分子についても発現に有意差は認められなかった。また、高発現となった EGFR と VEGFR2 に関しては、Weiss' criteria との相関についても平均値の差の検定(Fig.6)を行ったが、いずれも相関関係は認められなかった。

#### D. 考察

今回の検討で副腎皮質癌において、異常増殖に関わる治療標的の対象となる因子の候補としてまずは EGFR が考えられた。EGFR に対しては Cetuximab、Gefitinib、Erlotinib といった標的治療薬が大腸癌や非小細胞肺癌などで使用されてきており、特に EGFR の抗原発現と密接な関連性がある Cetuximab (Erbix<sup>TM</sup>)は有望視され<sup>67)</sup>、副腎皮質癌でもこれらの薬剤が有効である可能性が考えられた。

VEGFR2に関しては、副腎皮質癌と副腎皮質腺腫で有意差は認められなかったものの、癌の方が発現が高い傾向にあり、副腎腫瘍が血管の豊富な内分泌組織から生じてきた腫瘍ということ考えると、その血管合成を阻害するVEGF拮抗薬が有効である可能性も示唆される。しかし、VEGFAの染色結果を見ると(Fig.3)、癌と腺腫で発現に差は認められず( $p=0.905$ )、VEGFR2とVEGFAの発現(Fig.4)に相関関係も得られなかった。すなわち、癌においてVEGFAが必ずしも過剰発現しているとは限らず、VEGFを標的とした薬剤である。Bevacizumab(Avastin<sup>®</sup>)によ

る標的治療の有効性は低いと考えられた。

また、乳癌ではTrastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>)による標的治療が効果を上げているが、今回、副腎皮質癌では HER2/neuは発現が認められず臨床応用の可能性は低いと考えられた。

RapamycinはmTORの特異的阻害薬として知られているが、今回の結果では mTORは癌、腺腫ともに高発現となり、異常増殖に関与している可能性は低く、Rapamycinの有効性は低いと考えられた。

他の分子についても、副腎皮質癌と腺腫で発現に差は認められず、副腎皮質癌における異常増殖に関与している可能性は低いと考えられた。

また、癌で高発現となった EGFR と VEGFR2 に関しては、Weiss' criteria との相関についても平均値の差の検定(Fig.5)を行ったが、いずれも相関関係は認められなかった。このことは、単純に Weiss' criteria の項目によって、標的治療の有効性が判定できるわけではなく、標的分子を直接検討して初めて治療の有効性を評価できる可能性が高く、検体に対する免疫組織化学の重要性を支持する結果と考えられた。

#### E. 結論

副腎皮質癌は進行した状態で発見される症例もみられ、術後療法が重要な役割を果たすことが少なくないと考えられるが、最近、注目されている分子標的治療のような新たな治療法の有効性については、ほとんど検討されていないのが現状である。そこで今回、分子標的治療の可

能性を検討するため、摘出組織のホルマリン固定パラフィン包埋標本を使用して免疫組織化学的に標的分子が発現しているか否かを検討した。

副腎皮質良性腫瘍である副腎皮質腺腫と比較して検討した結果、副腎皮質癌ではEGFRが高発現であり、これをターゲットとした標的治療の可能性が示唆された。今後は少なくとも進行した症例などの治療にあたり、大腸癌や肺癌などでの導入が考えられているCetuximab (Erbix<sup>TM</sup>)の使用を考慮してみる価値はあるのではないかと考えられた。

一方、現在行われているHER2/neu、VEGFをターゲットとした標的治療の有効性は低いと示唆された。

尚、今後症例数を増やした更なる検討も必要であると考えられる。

#### F. 参考文献

- 1) Wagner,A.S. et al : Pediatric adrenal cortical carcinoma: brain metastases and relationship to NF-1, case reports and review of the literature. *J Neurooncol*, 75, 127 - 33, 2005
- 2) Frederick,J.R. : Malignant adrenal tumors. *Semin Pediatr Surg.* 15, 48 - 56, 2006
- 3) Hovi,L. et al : Adrenocortical carcinoma in children: a role for etoposide and cisplatin. *Med Pediatr Oncol.* 40, 324 - 26, 2003
- 4) Michal,K.E. et al : Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: a report from the International Pediatric Adrenocortical tumor registry. *J Clin Oncol.* 22, 838 - 45, 2004
- 5) 上原至雅 : 分子標的治療の標的分子. *日本臨床*, 62, 1206 - 08, 2004
- 6) Slamon,D.J. et al : Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*, 344, 783 - 92, 2001
- 7) Rogerio,C.L. : The evolving role of Cetuximab in non-small cell lung cancer. *Clin Can Res*, 12, 4432s - 35s, 2006
- 8) Takahashi,K. et al : Expression of urocortin 3/stresscopin in human adrenal glands and adrenal tumors. *Peptides*, 27, 178-182, 2006
- 9) Miki,Y. et al : Expression of the steroid and xenobiotic receptor and its possible target gene, organic anion transporting polypeptide-A, in human breast carcinoma. *Cancer Research*, 66, 535-542, 2006
- 10) Suzuki,T. et al : Analysis for localization of steroid sulfatase in human tissues. *Methods in Enzymology*, 400, 303-316, 2005
- 11) Miki,Y. et al : Immunolocalization of liver receptor homologue-1 (LRH-1) in human breast carcinoma: Possible regulator of in situ steroidogenesis. *Cancer Letters*, 244, 24-33, 2006
- 12) Ito,O. et al : Expression of cytochrome P-450 4 enzymes in the kidney and liver: Regulation by

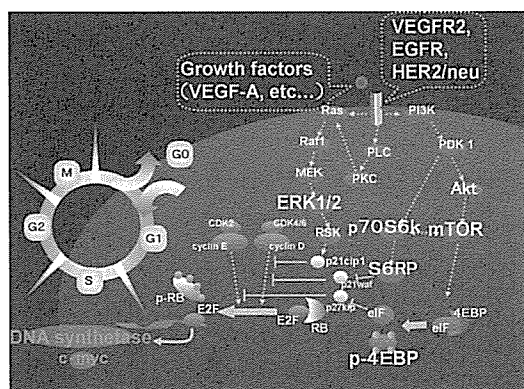
- PPAR and species-difference between rat and human. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 284, 141-148, 2006
- 13) Suzuki, T. et al : Peroxisome proliferator-activated receptor {gamma} in human breast carcinoma: a modulator of estrogenic actions. *Endocrine Related Cancer*, 13, 233-250, 2006
- 14) Fukai, N. et al : A Case of Estrogen-secreting Adrenocortical Carcinoma with Subclinical Cushing's Syndrome. *Endocrine Journal*, 53, 237-245, 2006
- 15) Sakurai, N. et al : Systemic distribution and tissue localizations of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 12. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 99, 174-181, 2006
- 16) Nakamura, Y. et al : PTOV1: a novel testosterone-induced atherogenic gene in human aorta. *Journal of Pathology*, 209, 522-531, 2006
- 17) Uno, K. et al : Neuronal pathway from the liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity. *Science*, 312, 1656-1659, 2006
- 18) Okura, T. et al : Coexistence of three distinct adrenal tumors in the same adrenal gland in a patient with primary aldosteronism and preclinical Cushing's syndrome. *Clinical and Experimental Nephrology*, 10, 127-130, 2006
- G. 研究発表
1. 論文発表  
(なし)
  2. 学会発表  
(なし)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
(なし)
  2. 実用新案登録  
(なし)
  3. その他  
(なし)

ACC					
No.	date	age	sex	symptoms	Weiss' criteria
ACC-1	99.12.03	11	F	body hair, voice change, hyper tension	v(-), s(+), ca(+), ne(+), ar(+), cy(+), nu(+), m(-), at(-)
ACC-2	01.02.14	0.07	F	fetal cyst	v(-), s(+), ca(-), ne(+), ar(+), cy(+), nu(+), m(+), at(-)
ACC-3	03.05.28	1	F	?	v(-), s(-), ca(-), ne(-), ar(+), cy(+), nu(+), m(-), at(-)
ACC-4	99.12.08	42	F	hyper tension	v(-), s(+), ca(+), ne(+), ar(+), cy(+), nu(+), m(+), at(-)
ACC-5	01.08.03	?	F	?	v(-), s(+), ca(+), ne(+), ar(+), cy(+), nu(+), m(+), at(-)
ACC-6	00.04.08	46	M	?	v(-), s(+), ca(-), ne(+), ar(+), cy(-), nu(-), m(-), at(-)
ACC-7	98.02.23	52	F	?	v(-), s(-), ca(-), ne(+), ar(+), cy(+), nu(+), m(-), at(-)

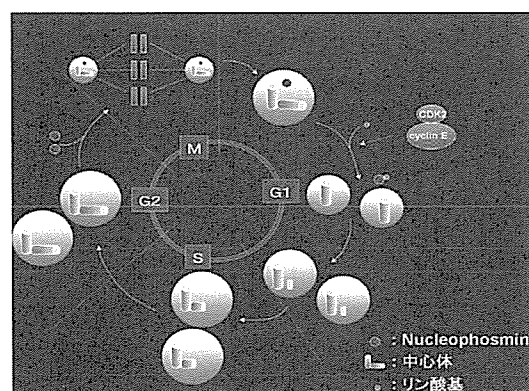
(Table.1) 副腎皮質がん 7 症例 v= venous invasion, s= sinusoidal invasion, ca= capsular invasion, ne= necrosis, ar= diffuse architecture, cy= eosinophilic tumor cell cytoplasm, nu= high nuclear grade, m= mitosis, at= atypical mitosis, □= high grade carcinoma

adrenal adenoma							
	age	sex	histology		age	sex	histology
adeno-1	46	F	Cushing	adeno-9	71	M	Preclinical Cushing
adeno-2	21	F	Cushing	adeno-10	37	F	Preclinical Cushing
adeno-3	22	M	Cushing	adeno-11	?	M	Preclinical Cushing
adeno-4	52	F	Cushing	adeno-12	64	M	Preclinical Cushing
adeno-5	38	F	Cushing	adeno-13	58	F	Preclinical Cushing
adeno-6	65	M	Preclinical Cushing	adeno-14	83	F	aldosteronoma
adeno-7	76	F	Preclinical Cushing	adeno-15	64	M	aldosteronoma
adeno-8	32	F	Preclinical Cushing	adeno-16	69	F	Non function

(Table.2) 副腎皮質腺腫 16 症例



(Fig.1-1)



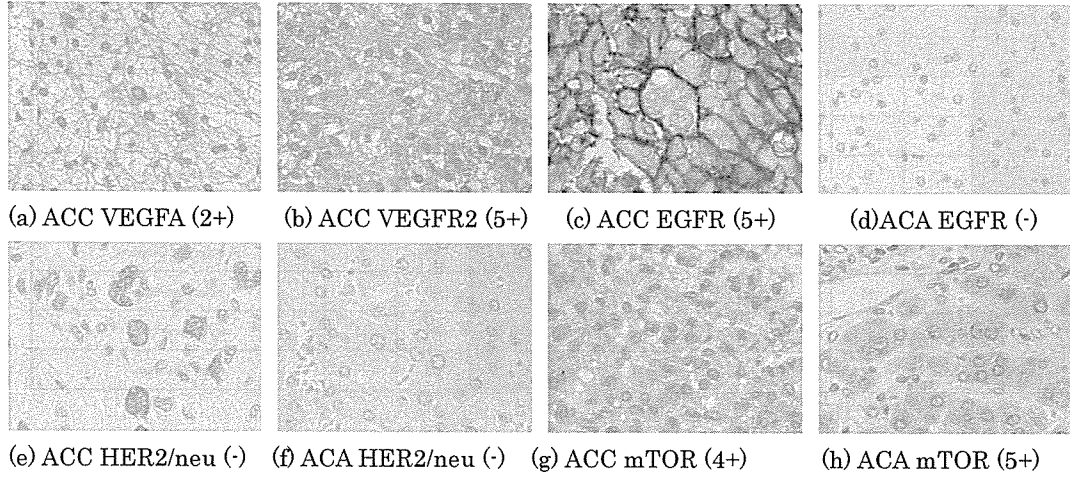
(Fig.1-1) 標的治療の因子として挙げられるリガンドおよび受容体とその下流に存在するシグナル伝達系の因子： Bevacizumab の標的因子で VEGFA と、その受容体である VEGFR2、Cetuximab の標的受容体である EGFR、Trastuzumab の標的受容体である HER2/neu を対象とした。これら受容体からのシグナルは PI3k/Akt 系や Ras/ERK 系を活性化し、cyclin dependent kinase inhibitor の発現を制御する。cyclin/cyclin dependent kinase は癌抑制遺伝子産物である RB 蛋白がリン酸化するのを促進させ、RB 蛋白が結合することで不活性化されていた E2F が離脱し活性化される。活性化された E2F は S 期に必要な遺伝子の転写を促進し、これにより細胞周期が進行する。今回はこのシグナル伝達系のうち、ERK1/2、p42,44-MAPK、Akt、Rapamycin の標的である mTOR、p70S6k、S6RP、4EBP を対象とした。

(Fig.1-2) 中心体複製に関わる因子：細胞周期の G1/S 移行期に CDK2/cyclinE が活性化されると、Nucleophosmin(NPM)がリン酸化され中心体から離脱する。これによって中心体の解離および複製が開始する。分裂期には NPM は紡錘体極に再局在する。

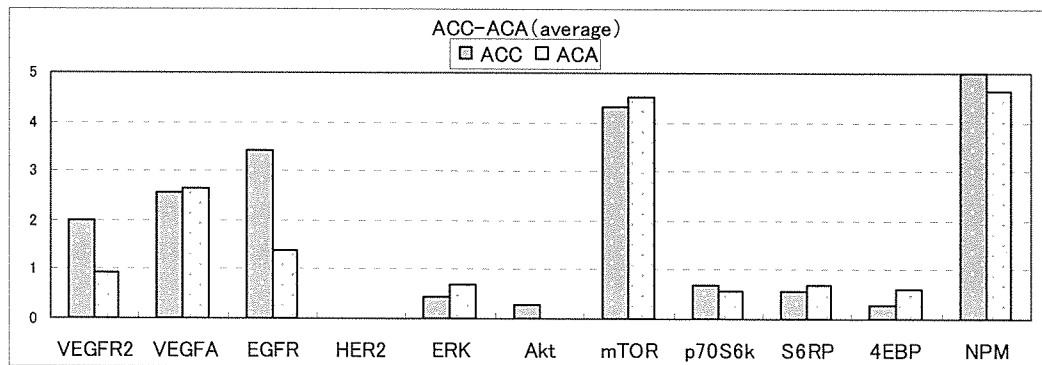
Antibody	方法	キット	バッファー	抗原賦活化処理	ブロッキング
VEGFA	avidin-biotin signaling system	Histofine kit (Nichirei)	-	-	1% normal goat serum
VEGF-R2	avidin-biotin signaling system	Histofine kit (Nichirei)	citric acid buffer	microwave	1% normal goat serum
EGFR	polymer signal amplification system	EGFR pharmDx kit (Dako)	citric acid buffer	proteinase	peroxidase
HER2/neu	avidin-biotin signaling system	Histofine kit (Nichirei)	-	-	1% normal goat serum
phospho-p44/42MAPK	avidin-biotin signaling system	Histofine kit (Nichirei)	citric acid buffer	microwave	1% normal goat serum
phospho-Akt	avidin-biotin signaling system	Histofine kit (Nichirei)	citric acid buffer	microwave	1% normal rabbit serum
Mtor	polymer signal amplification system	EnVision kit (Dako)	citric acid buffer	microwave	1% normal goat serum
phospho-p70S6K	avidin-biotin signaling system	Histofine kit (Nichirei)	EDTA	microwave	1% normal rabbit serum
phospho-S6RP	avidin-biotin signaling system	Histofine kit (Nichirei)	citric acid buffer	microwave	1% normal goat serum
phospho-4EBP1	avidin-biotin signaling system	Histofine kit (Nichirei)	citric acid buffer	autoclave	1% normal goat serum
Nucleophosmin	avidin-biotin signaling system	Histofine kit (Nichirei)	citric acid buffer	microwave	1% normal rabbit serum

(Fig.1-2)

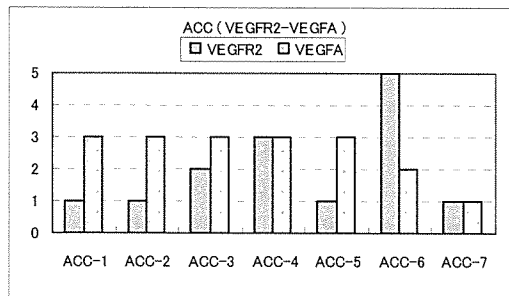
(Table.3) 抗体および免疫組織化学の方法



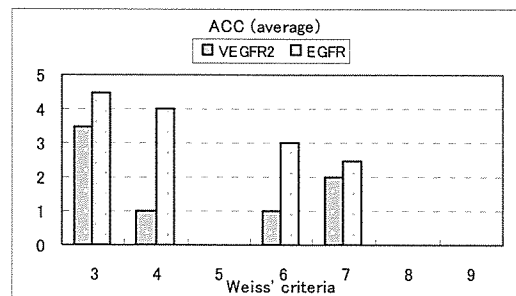
(Fig.2) 免疫組織化学 (400x) : (a) VEGFA, (b) VEGFR2, (c),(d) EGFR は細胞膜と細胞質に発現を認めた. (e),(f)HER2/neu は発現を認めなかった. (g),(h) mTOR は細胞質と核に発現を認めた.



(Fig.3) 標的因子ごとの発現 (平均値)



(Fig.4)ACCにおける VEGFR2 と VEGFA の発現



(Fig.5) ACCにおける Weiss' criteria との相関 (平均値)

## 小児副腎癌と成人副腎癌の尿ステロイドプロフィール

長谷川 奉延、本間桂子\*

慶應義塾大学医学部小児科

\* 慶應義塾大学病院中央臨床検査部

### 研究協力施設

慶大内科・泌尿器科、国立成育医療センター、北大小児科・泌尿器科、  
東京医科歯科大内科、島根大小児科、東北大小児科、北里大小児科、  
秋田大小児科、長崎大小児科、国立栃木小児科

### 【研究要旨】

小児副腎癌と成人副腎癌の尿ステロイドプロフィールを解析し、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ィール(63 種)を解析した。その結果、副腎癌においては、3bHSD 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、11b-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 11b-hydroxylase 活性低下を示す、2) 成人副腎癌より高頻度に 3bHSD 活性低下、17,20-lyase 活性亢進を示すことが明らかになった。

**【背景】** 小児副腎癌の頻度は少なく、100 万人に 0.3 人とされている。小児副腎癌は、成人副腎癌に比し、DHEAS 産生性で男性化をきたす症例においても予後がよいことが知られているが、小児副腎癌のステロイド動態の詳細は不明である。

**【目的】** 副腎癌の尿ステロイドプロフィールを解析し、副腎癌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する。

**【対象】** 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。患者の症状と転帰を表 1, 2 に示す。

**【方法】** 蓄尿または随時尿 0.5ml につい



て、酵素水解、有機溶媒抽出、誘導化処理後、ガスクロマトグラフ質量分析—選択的イオンモニタリング法<sup>1)</sup>により、尿ステロイド代謝物 63 種を測定した。3bHSD、17a-hydroxylase、17, 20lyase、21-hydroxylase、11b-hydroxylase の5種の酵素について、生成ステロイド/基質ステロイド代謝物比を指標に、副腎癌におけるステロイドホルモン合成酵素活性を検討した。

### 【結果】

- 1) cortisol 代謝物：小児 6/12 (12 例中 6 例)、成人 6/15 において対照より高値。
- 2) aldosterone 代謝物：小児 4/12、成人 1/15 において対照より高値、成人 6/15 において検出感度以下。
- 3) DHEA 代謝物：小児 12/12、成人 6/15 において高値。
- 4) etiocholanolone (androstenedione 代謝物)：小児 12/12、成人 8/15 において高値。
- 5) 11-deoxycortisol 代謝物：小児では測定不能であった 1 例を除く 10/11、成人 12/15 例において高値
- 6) 3bHSD 活性指標 (17OHP/17OHPregnenolone 代謝物比)：小児 11/12、成人 6/15 において低値 (図 1)。
- 7) 17a-hydroxylase 活性 (17OHP/progesterone 代謝物比)：小児 6/12、成人 2/15 例において低値 (図 2)。
- 8) 17, 20-lyase 活性 (androstenedione/17OHP 代謝物

比)：小児 9/12 において高値、成人 6/15 例において低値 (図 3)。

- 9) 21-hydroxylase 活性指標 (11-deoxycortisol/17OHP 代謝物比)：小児 4/12 において低値、成人 7/15 において高値 (図 4)。
- 10) 11b-hydroxylase 活性指標 (cortisol/ 11-deoxycortisol 代謝物比)：の小児 8/11、成人 13/15 について低値 (図 5)。

### 【考察】

- 1) 酵素活性のまとめ：副腎癌においては、3bHSD 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、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、11b-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傾向を示した。このように複数の酵素活性の変動が同時発生したようにみえるステロイドホルモン合成上の病態は、副腎癌が、腺腫と異なり、細胞内ステロイド酵素発現にムラのある細胞群の集まりであるという病理報告<sup>2)</sup>と矛盾しない。
- 2) 小児副腎癌における 3bHSD 低下は、女兒の男性化 7 例、男児の思春期早発 2 症例だけでなく、Cushing のみ 2 例と無症状 1 例においても、観察された。小児副腎癌において 3bHSD 低下が普遍的な現象か否かは、さらに症例数を重ねてから判断する必要が

あるが、17, 20-lyase 活性亢進傾向とあわせて、DHEA 産生性の一因である可能性が示唆された。

#### 【結語】

小児副腎癌は、1) 成人副腎癌と同様 11 $\beta$ -hydroxylase 活性低下を示し、2) 成人副腎癌より高頻度に 3 $\beta$ HSD 活性低下、17, 20-lyase 活性亢進を示す傾向を認めた。

#### 【参考文献】

- 1) Homma K, Hasegawa T, Masumoto M, Takeshita E, Watanabe K, Chiba H, Kurosawa T, Takahashi T, Matsuo T. Reference Values for Urinary Steroids in Japanese Newborn Infants: Gas Chromatography / Mass Spectrometry in Selected Ion Monitoring. *Endocrine Journal* 2003; 50: 783-792
- 2) 笹野公伸、鈴木貢。副腎皮質癌。別冊日本臨床、新領域別症候群シリーズ No. 1 内分泌症候群 I p720-723、2006

表 1 患者情報(男性)

性別	年齢(歳)	症状	転移/再発	転帰
M1	0.7	思春期早発		
M2	1.1	思春期早発		
M3	2.8	Cushing 徴候	あり	死亡
M4	12.0	なし	あり	
M5	26.0	女性化乳房	あり	
M6	27.7	なし		
M7	33.8	女性化乳房		
M8	41.2	なし		
M9	50.8	Cushing 徴候	あり	死亡
M10	54.0	女性化乳房	あり	死亡
M11	73.6	なし		

表 2 患者情報(女性)

性別	年齢(歳)	症状	転移/再発	転帰
F1	0.8	男性化, Cushing 徴候		
F2	1.0	男性化, Cushing 徴候		
F3	1.6	男性化		
F4	3.6	男性化, Cushing 徴候	あり	死亡
F5	4.0	男性化	あり	
F6	5.0	男性化, Cushing 徴候		
F7	7.3	Cushing 徴候	あり	
F8	11.0	男性化, Cushing 徴候		
F9	21.4	男性化		
F10	30.0	なし	あり	死亡
F11	35.4	なし		
F12	37.0	Cushing 徴候	あり	死亡
F13	45.0	なし		
F14	46.5	Cushing 徴候	あり	死亡
F15	49.2	男性化	あり	
F16	58.7	なし		

図中記号 ● 男性化徴候                      基準範囲  
           ● 男性化+Cushing  
           △ Cushing  
           ▲ 無症状

図 1

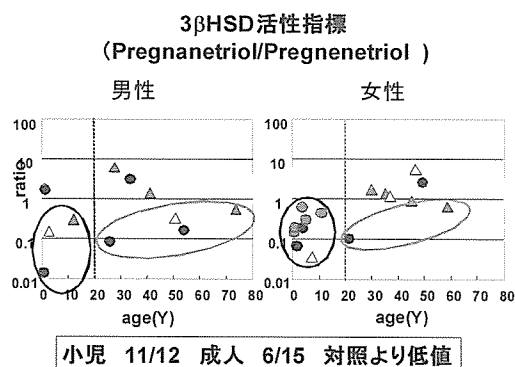


図 2

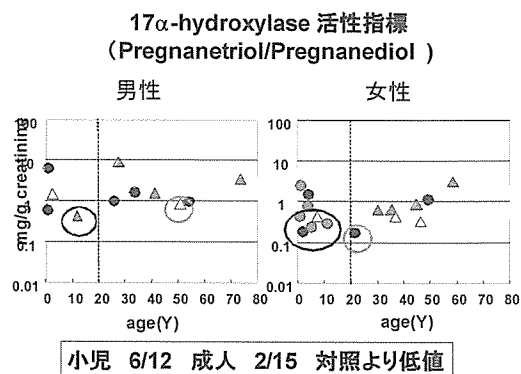


図 3

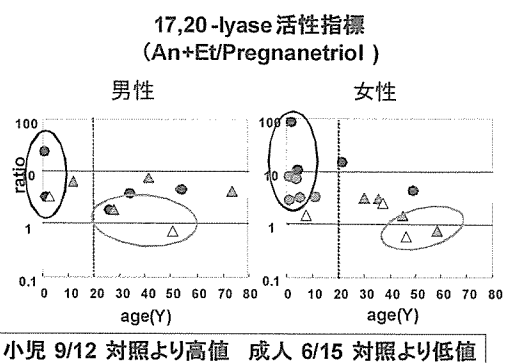


図 4

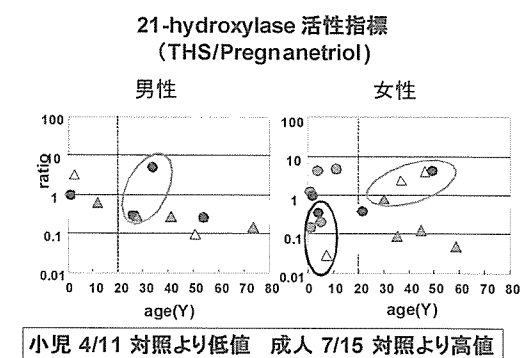
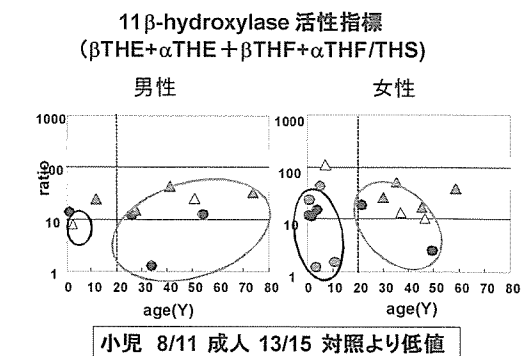


図 5



## 副腎偶発腫調査からの副腎癌の解析

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】

副腎偶発腫の疫学調査から、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例の集計結果をもとに、本邦における副腎癌の疫学像を解析した。副腎偶発腫全体に占める副腎癌の割合は1.4%であった。平均年齢は58.8歳で、性差はなかった。平均腫瘍径は8.3cmであり、副腎偶発腫全体の平均腫瘍径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、従来より診断に有用とされてきたものの有用性が再確認された。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。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、総合的に判断しなければならないと考えられた。

### A. 研究目的

副腎癌は非常にまれな疾患ではあるが、近年腹部CTや超音波などの画像診断の進歩と、検診（人間ドック）が普及した結果、副腎偶発腫として発見される副腎癌が多くなってきている。また、副腎癌は非常に予後が不良で、発見時には既に根治術が施行できないことも多い。平成11年度より5年間にわたり、厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業として、全国の医療施設計1014施設に調査表を送付し、副腎偶発腫についての疫学調査を行った。この5年間に報告を受けた3678例のうち副腎癌として報告された50例の集計結果をもとに、本邦における副腎癌の疫学像を解析することを目的

とした。

### 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、そ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、その中で副腎癌として報告を受けた50例をもとに解析を行った。

### C. 研究結果

副腎偶発腫全体に占める副腎癌の割合は1.4% (3678例中50例)であった。50例のうち、男性26例(52%)、女性23例(46%)、性別不明が1例で、性差はなかった。平均年齢は全症例 58.8±13.3歳で、男性57.6±13.0歳、女性61.0±13.6歳であった。腫瘍側は右21例(42%)、左23例(46%)、両側2例(4%)で、左右差はなかった。腫瘍の診断法は腹部CTが26例(52%)で、腹部超音波が22例(44%)、MRIが1例(2%)であった。副腎偶発腫全体では、腹部CTが2495例(70.0%)、腹部超音波が937例(26.3%)、MRIが130例(3.6%)であった。平均腫瘍径は8.3±4.5cm(0.8-20cm)であり、中央値は8.5cm 症例数であった。副腎偶発腫全体の平均腫瘍径3.0cmより明らかに大きかった。5歳ごとに区切って年齢分布をみたところ、56~60歳と61~65歳で各7例と最多であった。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( $p<0.0001$ )、従来より診断に有用とされてきたものの有用性が再確認された。副腎癌は70%の症例で手術が施行され、14%が化学療法などその他の治療がされていた。

### D. 考察

今回の集計によると、副腎偶発腫からみた副腎癌は、平均年齢は58.8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8.3cmであった。副腎偶発腫全体からみると、大きさは明らかに違っていたが、平均年齢、性差、腫瘍側

の左右差は同じであった。診断法で、副腎癌では腹部超音波の割合が、副腎偶発腫全体と比べて多かったが、これは腫瘍径が大きいため、超音波でも容易に検出されるからと推定された。副腎癌の画像的特徴として、CTでは辺縁が不整で内部が不均一、造影効果も顕著で不均一に造影され、周辺臓器の圧迫像および局所浸潤を認める。またMRIでは内部が不均一で、肝臓に比べてT1強調画像で低信号、T2強調画像で高信号となることが多く、ガドリニウム造影にて洗い出しの遅い強い造影効果が見られるといった画像的特徴がある。

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。副腎癌の平均生存期間は18カ月、5年生存率は16%と予後不良であることを考えると、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。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、総合的に判断しなければならぬと考えられた。

### E. 結論

これまでの副腎偶発腫の5年間の継続調査を元に副腎癌の解析を行った。副腎癌の鑑別には、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、総合的に判断しなければならぬと考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 上芝 元：ホルモン年齢. アンチ・エイジング医学 2(1) : 38-42, 2006
- 2) 上芝 元, 芳野 原：アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬カンデサルタンのインスリン抵抗性および副腎アンドロゲンに対する作用. Progress in Medicine 26(3) : 651-655, 2006
- 3) 上芝 元：アンチエイジング医学における内分泌測定. Medical Science Digest 32(5) : 184-187, 2006
- 4) 上芝 元：副腎偶発腫 —頻度と治療—ホルモンと臨床（増刊号：臨床に役立つ内分泌疾患診療マニュアル 2006）54 : 204-207, 2006
- 5) 上芝 元：副腎偶発腫に占める副腎性高血圧の頻度. 日本内科学会雑誌 95(4) : 629-633, 2006
- 6) 上芝 元：副腎外褐色細胞腫（パラングリオーマ）. 別冊日本臨床 内分泌症候群（第2版）: 735-738, 2006
- 7) 坪井久美子, 上芝 元：粘液水腫性昏睡. 別冊日本臨床 内分泌症候群（第2版）: 344-347, 2006
- 8) 上芝 元, 芳野 原：2次性（続発性）高脂血症とは？ 肥満と糖尿病 5(3) : 425-426, 2006
- 9) 上芝 元, 芳野 原：加齢と脂質. 内分泌・糖尿病科 23(4) : 377-380, 2006
- 10) 上芝 元：副腎疾患. 診断と治療

95(2) : 287-292, 2007

11) 上芝 元 (分担) : 先天性副腎皮質過形成症 —成人期におけるステロイド補充 ステロイドの使い方 コツと落とし穴 (水島 裕 編集). p. 984-985, 中山書店, 東京, 2006

### 2. 学会発表

- 1) ○土田恭代, 田中祝江, 上芝 元, 森田あやこ, 渋谷和俊, 笹野公伸, 芳野原：一側副腎の double adenoma によるクッシング症候群の一例. 第16回臨床内分泌代謝 Update, 金沢, 2006, 3
- 2) ○上芝 元, 芳野 原：カルシウム拮抗薬アゼルニジピン長期投与における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103回日本内科学会, 横浜, 2006, 4
- 3) ○上芝 元：副腎腫の診断・治療指針—偶発腫を中心として— 第79回日本内分泌学会学術総会 厚生労働省難治性疾患克服研究事業関連4班シンポジウム, 神戸, 2006, 5
- 4) ○上芝 元, 一城貴政：副腎偶発腫瘍の疫学. クリニカルアワー. 79回日本内分泌学会学術総会, 神戸, 2006, 5
- 5) ○上芝 元, 清水雄介, 芳野 原：副腎アンドロゲン DHEA-S の耐糖能改作用. 第49回日本糖尿病学会, 東京, 2006, 5
- 6) ○Ueshiba H, Kuboki K, Murakami E, Abe S, Araki E, Yoshino G : Effect of Valsartan on adhesion molecules and oxidative stress markers in type2 diabetes. 21st Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Fukuoka, 2006, 10

- 7) ○Ueshiba H, Yoshino G : The association of IGFBP-3 with HOMA-R in patients with impaired glucose tolerance and mild diabetes mellitus. 3<sup>rd</sup> International Congress of the GRS and the IGF Society. Kobe, 2006, 11
- 8) ○上芝 元, 中野三郎, 芳野 原: メタボリックシンドロームにおけるフリーテストステロンとインスリン抵抗性の検討. 第6回日本 Men' s Health 医学会, 東京, 2006, 11

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

#### (4) ステロイドホルモン作用機構に関する研究



# 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

柴田 洋孝

慶應義塾大学保健管理センター

## 【研究要旨】

アルドステロンの作用を仲介するミネラルコルチコイド受容体(MR)による遺伝子転写調節は不明の点が多い。多くの転写因子は翻訳後蛋白修飾の一つのSUMO (small ubiquitin-related modifier-1) 化を受ける。本研究では、SUMO-conjugating enzyme である Ubc9 の MR 作用への関与を検討した。酵母、GST-pulldown、免疫共沈降法により、MR と Ubc9 は蛋白-蛋白相互作用を認めた。COS-1 細胞における transient transfection 法において、MR によるレポーター活性の転写活性化を Ubc9 は増強し、siRNA により内因性 Ubc9 レベルを減少させると MR 転写は減弱したことから、Ubc9 は MR のコアクチベーターとして機能することが示された。Ubc9 の SUMO 化酵素活性を消失させる変異体 Ubc9 (C93S) でも、野生型と同様に MR 転写活性化を示した。マウス腎臓の皮質集合管細胞の核内で、MR と Ubc9 の共局在を認めたことから、Ubc9 の生理学的な MR コアクチベーターとしての機能が示唆された。

## A. 研究目的

アルドステロンは、核内受容体ミネラルコルチコイド受容体(MR, NR3C2)を介して作用する。最近の大規模臨床研究の RALES (Randomized Aldactone Evaluation Study) や EPHEsus (Eplerenone Post-acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study) では、MT 拮抗薬の spironolactone や eplerenone 治療によりうっ血性心不全患者の死亡率が有意に低下したことから、心血管病において MR は重要な標的分子であることが示された。

MR は、N 末端に AF-1、C 末端に AF-2 の2種類の転写活性化部位を有し、ホルモンが結合すると、AF-2 にリガンド依存性に多様なコアクチベーターが動員されて作用が発現する。P160 ファミリーの SRC-1, SRC-2, SRC-3 は広範な組織に分布し、ヒストンアセチル化酵素活性を有する。その他のコアクチベーターも多様な酵素活性を有しているものがあり、SUMO (small ubiquitin-related modifier) 化も翻訳後修飾の一つである。SUMO 化は、E1 (SUMO activating enzyme) として、SAE1/SAE2、E2 (SUMO conjugating

enzyme)として、Ubc9、E3 (SUMO ligase)として、PIAS ファミリー、RanBP2、Pc2などが知られている。多くの核内受容体はSUMO化修飾を受けることが報告されており、多くの場合SUMO化により転写活性が減弱する。本研究では、SUMO E2 酵素Ubc9がMRをSUMO化することにより転写を減弱するが、一方で、MRと蛋白-蛋白相互作用によりコアクチベーターとして転写活性化にもはたらくことを見いだした。

## B. 研究方法

酵母 two-hybrid 法、GST-pulldown 法、免疫共沈降法、Western blot、RNA 干渉法、クロマチン免疫沈降法、免疫組織化学、real time RT-PCR 法などは既報の方法で行った。

## C. 研究結果

1. Ubc9 と MR の蛋白-蛋白相互作用  
HEK293 細胞に外因性に MR、Ubc9 を発現させて行った免疫共沈降法により、Ubc9 およびその SUMO 化酵素活性を消失させた変異体Ubc9 (C93S)はMRと結合した(図1)。

2. Ubc9 の MR 転写活性に対する影響

Transient transfection 法により、COS-1 細胞に MR、Ubc9 を共発現させた結果、10<sup>-8</sup>M aldosterone による MR 転写活性化を Ubc9 の共発現は増強した。また、内因性Ubc9発現量を siRNA により減少させると、内因性 Sgk mRNA 量が減少したことから、Ubc9 は MR の転写コアクチベーターとして機能することが示された(図2)。

さらに、Ubc9 (C93S) も野生型 Ubc9 と同等に MR 転写を増強したことから、SUMO 化酵素活性とは独立して、MR コアクチベーターとして機能した(図3)。一方、MR の SUMO 化モチーフのリジンをアルギニ

ンに変異させた KRmutMR は、レポーター活性がほぼ4倍に増強され、Ubc9 または Ubc9 (C93S) の共発現はその活性をさらに3倍に増強した(図3)。このことから、Ubc9 はMRのSUMO化とは独立してその転写増強作用が示された。

## 3. 腎臓における MR、Ubc9 の発現

マウス腎臓の皮質集合管細胞の核において、MR、Ubc9 の共局在を認めた (data not shown)。

## D. 考察

酵母 two-hybrid 法、GST-pulldown 法、

免疫共沈降法において、MR と Ubc9 の蛋白-蛋白相互作用を認めた。また、transient transfection によるレポーターアッセイでは、aldosterone による MR 転写活性化を Ubc9 は増強するコアクチベーターとして機能することが示された。さらに、Ubc9 はその SUMO 化酵素活性とは独立してコアクチベーターとして機能することが示された。さらに、免疫組織化学により、マウス腎臓の皮質集合管細胞において、MR Ubc9 が共局在を示された。

アルドステロンは、腎臓における Na、K の調節や、心血管細胞での炎症、線維化などをきたす心血管リスクホルモンである。本研究の結果より、Ubc9 は MR 作用を SUMO 化により減弱する一方、MR と蛋白-蛋白相互作用により作用を増強するコアクチベーターとしても作用する、2元的機能が示された。今後、この2元的機能がいかに調節されるのかを解明することが重要と考えられた。

## E. 結論

Ubc9 は蛋白の SUMO 化酵素であり、MR を SUMO 化すると転写抑制にはたらく、一方、MR と蛋白-蛋白相互作用により転

写コアクチベーターとしても機能することが示された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. K. Yokota, H. Shibata, I. Kurihara, S. Kobayashi, N. Suda, A. Murai-Takeda, I. Saito, H. Kitagawa, S. Kato, T. Saruta, H. Itoh. Coactivation of the N-terminal transactivation of mineralocorticoid receptor by Ubc9. J Biol Chem 282:1998-2010, 2007
2. N. Fukai N, Y. Hirono, T. Yoshimoto, M. Doi, Y. Ohtsuka, K. Homma, H. Shibata, H. Sasano, Y. Hirata. A case of estrogen-secreting adrenocortical carcinoma with subclinical Cushing's syndrome. Endocr J 53:237-245, 2006.
3. K. Homma, K. Hayashi, S. Wakino, R. Shibata, M. Mukai, H. Kumagai, H. Shibata, T. Saruta. Primary malignant hepatic pheochromocytoma with negative adrenal scintigraphy. Hypertens Res 29:551-554, 2006.
4. 柴田洋孝. 副腎一機能検査. 内分泌外科標準テキスト p. 202-210, 2006.
5. 柴田洋孝. クッシング症候群 ホルモンと臨床「臨床に役立つ内分泌疾患診療マニュアル 2006」 54 (増刊号) : 158-164, 2006.
6. 柴田洋孝、鈴木洋通. 副腎腫瘍の画像診断 ホルモンと臨床「臨床に役立つ内分泌疾患診療マニュアル 2006」 54 (増刊号) : 323-329, 2006.
7. 柴田洋孝. 原発性アルドステロン症 内科研修マニュアル (. 改訂第2版)、南江堂、p. 364-365, 2006.
8. 柴田洋孝. Cushing 症候群 内科研修マニュアル (改訂第2版)、南江堂、p. 366-367, 2006.
9. 柴田洋孝. 副腎皮質機能低下症 内科研修マニュアル (改訂第2版)、南江堂、p. 368-369, 2006.
10. 柴田洋孝. 褐色細胞腫 内科研修マニュアル (改訂第2版)、南江堂、369-370, 2006.
11. 柴田洋孝. 原発性アルドステロン症の診断におけるアルドステロン/レニン比の意義 ホルモンと臨床 54: 17-22, 2006.
12. 柴田洋孝. 副腎偶発腫瘍 内分泌症候群 (第2版) 日本臨床、714-716, 2006
13. 柴田洋孝. デオキシコルチコステロン産生腫瘍 内分泌症候群 (第2版) 日本臨床、641-644, 2006.
14. 柴田洋孝. コルチコステロン産生腫瘍 内分泌症候群 (第2版) 日本臨床、638-640, 2006
15. 柴田洋孝、齊藤郁夫. 経口避妊薬とRAS Angiotensin Research, 3(2): 33-37, 2006
16. 柴田洋孝. 偽性アルドステロン症 日本内科学会誌, 95(4): 671-676, 2006.
17. 柴田洋孝、村井彩乃、小林佐紀子、横田健一、須田徳子、本間桂子、太田敦美、林 晃一、猿田享男、齊藤郁夫、伊藤 裕. 原発性アルドステロン症の診断における経口食塩負荷試験の有用性 東京女子医科大学雑誌 76(7): 262-264, 2006
18. 成瀬光荣、柴田洋孝、田辺晶代、高橋克敏、西川哲男、宮森 勇. パネルディスカッション 原発性アルドステロン症の診断と治療—標準化に向けて 東京女子医科大学雑誌 76(7): 277-289, 2006
19. 柴田洋孝. アジソン病、急性副腎不全 (副腎クリーゼ) 今日の治療指針 p. 548-549, 2007

20. 柴田洋孝. Cushing 症候群 内科 97(6):1396-1397, 2006
  21. 柴田洋孝. 原発性アルドステロン症 内科 97(6):1398-1399, 2006
  22. 柴田洋孝. 褐色細胞腫 内科 97(6):1400-1401, 2006
  23. 柴田洋孝. ミネラルコルチコイド受容体研究の最前線 治療学 40(8):69, 2006.
  24. 柴田洋孝. 画像検査からの診断へのアプローチ 副腎 診断と治療 95:258-264, 2007.
  25. 柴田洋孝. 内分泌疾患の診断のコツ ドクターサロン 50(7):45-49, 2006.
  26. 柴田洋孝. アルドステロンの再評価 ドクターサロン 50(8):58-62, 2006
  27. 柴田洋孝、齊藤郁夫. 原発性アルドステロン症における腎障害. 血圧, 13(10):18-19, 2006.
  28. 柴田洋孝、横田健一、武田彩乃、須田徳子、伊藤 裕. ミネラルコルチコイド受容体と転写共役因子のリガンド依存的相互作用 内分泌・糖尿病科 23:566-574, 2006
  29. 武田彩乃、柴田洋孝、横田健一、須田徳子、伊藤 裕. 心臓におけるミネラルコルチコイド受容体のシグナル伝達機構 内分泌・糖尿病科 23:617-623, 2006
  30. 中川 健、柴田洋孝、猿田享男、村井 勝. 原発性アルドステロン症における静脈サンプリングの現状 内分泌外科 22(3):150-154, 2006.
2. 学会発表
    1. 柴田洋孝、村井彩乃、横田健一、須田徳子、小林佐紀子、林 晃一、村井勝、齊藤郁夫、猿田享男、伊藤 裕：原発性アルドステロン症の局在診断における画像診断の有用性 第 103 回日本内科学会講演会、横浜、2006 年
    2. 柴田洋孝、太田敦美、武井 泉、村田満、伊藤 裕、河邊博史、齊藤郁夫. 血漿レニン活性および活性レニン濃度を用いたアルドステロン/レニン比：高血圧者および正常血圧者における比較検討 第 79 回日本内分泌学会学術総会、神戸
    3. 村井彩乃、柴田洋孝、小林佐紀子、横田健一、齊藤郁夫、猿田享男、伊藤 裕 心臓におけるアルドステロン作用の新規調節因子 NF- $\kappa$ C の同定：Yeast two-hybrid system を用いたミネラルコルチコイド受容体結合蛋白のクローニング 第 79 回日本内分泌学会学術総会、神戸
    4. 村井彩乃、柴田洋孝、小林佐紀子、横田健一、栗原 勲、須田徳子、齊藤郁夫、猿田享男、伊藤 裕 副腎腫瘍の局在診断における  $^{131}$ I-アドステロール副腎シンチグラム：ファントム実験による吸収係数およびバックグラウンド補正の適用による定量的解析 第 79 回日本内分泌学会学術総会、神戸
    5. 須田徳子、柴田洋孝、本間桂子、小林佐紀子、横田健一、村井彩乃、林 晃一、齊藤郁夫、猿田享男、伊藤 裕 副腎腫瘍患者におけるコルチゾール産生量の再評価：尿中 17-OHCS、遊離コルチゾールおよびテトラヒドロコルチゾールの比較検討 第 79 回日本内分泌学会学術総会、神戸
    6. 横田健一、柴田洋孝、本間桂子、小林佐紀子、須田徳子、村井彩乃、林 晃一、齊藤郁夫、猿田享男、伊藤 裕 副腎皮質癌 10 例におけるステロイド産生の検討：尿中ステロイド一斉分析の有用性 第 79 回日本内分泌学会学術総会、神戸
    7. 柴田洋孝、須田徳子、小林佐紀子、横田健一、村井彩乃、林 晃一、猿田享男、齊藤郁夫、伊藤 裕 副腎偶発腫瘍の診断 第 79 回日本内分泌学会学術総会、神戸