

思われる。

【文献】

- 1) 飯村 功、鳥本 和明、中橋 泰之、中村 保博、安藤 利昭、村上 弘則、増田 敦：北海道における副腎ホルモン産生異常症の疫学的研究。厚生省特定疾患「副腎ホルモン産生異常症」調査研究班昭和 60 年度研究報告書. 93-106.
- 2) 名和田 新、高柳 涼一、中川 秀昭、三浦 克之：副腎ホルモン産生異常症の全国疫学調査。厚生省特定疾患内分泌系疾患調査研究班「副腎ホルモン産生異常症」調査分科会平成 10 年度報告書. 11-55.

副腎偶発腫全国調査からの副腎癌の解析および 副腎偶発腫の診断・治療指針

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

A. 研究目的

副腎癌は非常にまれな疾患であるが、予後は非常に不良で、発見時には既に根治手術が施行できないことが多い。近年腹部CT・MRI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。

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1014施設に調査表を送付し、副腎偶発腫についての全国疫学調査を行い、診断・治療指針の作成を目的とした。さらに、この5年間に報告を受けた副腎偶発腫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。また、文献的に諸外国での副腎偶発腫における副腎癌の頻度を検索した。

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。しかし、血中DHEA-Sの個々の値をみると（確認できたのは50例中35例）、広範囲に分布しており、10歳ごとの正常域と比較してみると、高値17例（49%）、正常域15例（43%）、低値3例（8%）であった。血中DHEA-S高値の症例は約50%であった。

1990年以降発行された文献から諸外国（米国、ハンガリー、ドイツ、ギリシャ、ポーランド、中国、トルコ、イタリア、フランス、スウェーデンの10か国）での副腎偶発腫における副腎癌の頻度を検索したところ1～12%であり、わが国1.4%は米国（1%）、ハンガリー（1.5%）、ドイツ（2%）、フランス（2%）と同頻度と考えられる。

今回の全国疫学調査を基にして作成した副腎偶発腫の診断・治療指針フローチャートを図に示す。

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、副腎偶発全体と比べて多かったが、これは腫瘍径が大きいいため、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ないと考えられた。

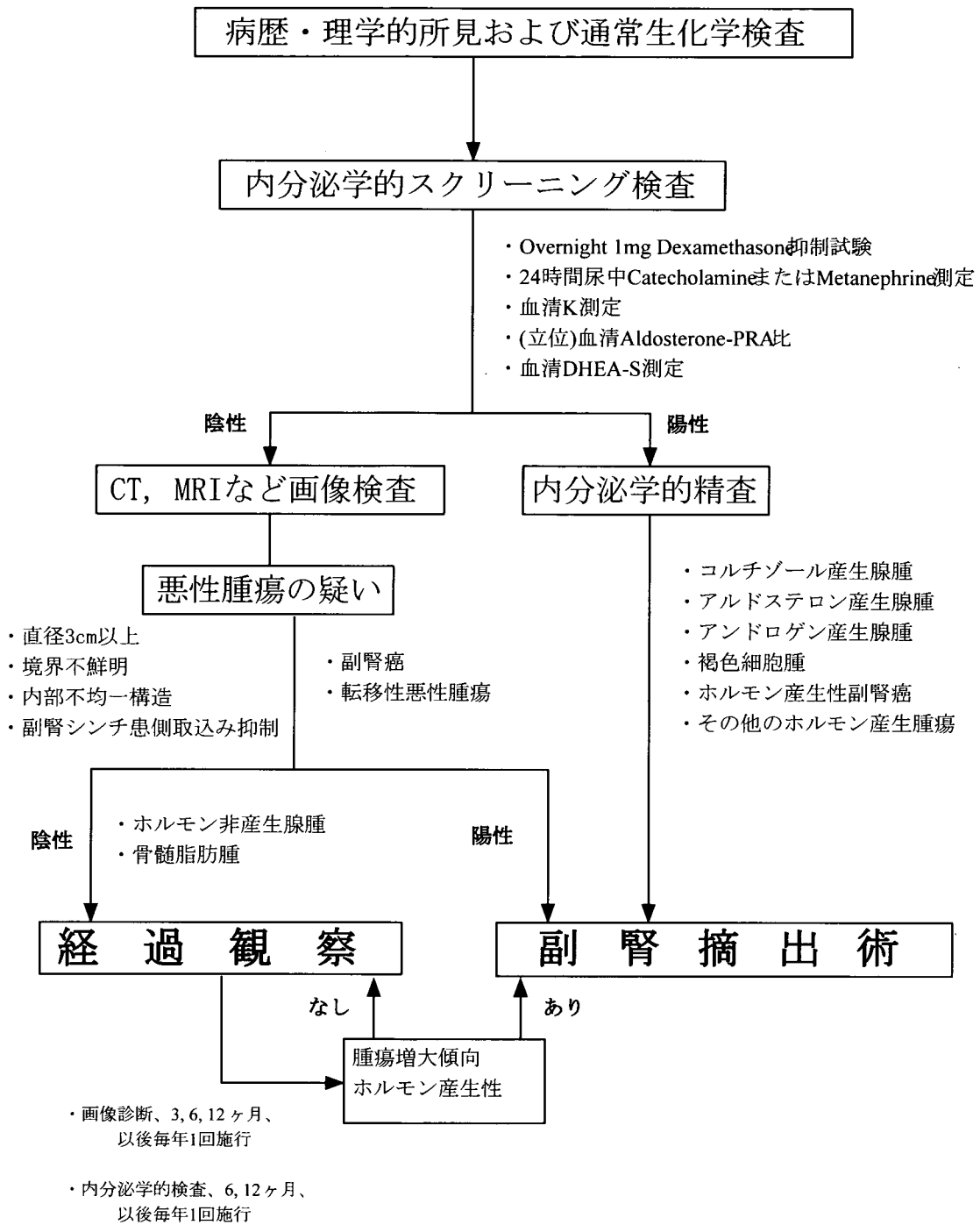
E. 結論

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ないと考えられた。

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

図 副腎偶発腫の診断・治療指針フローチャート



本邦における副腎皮質癌の疫学調査

藤枝憲二、鈴木 滋、向井徳男
旭川医科大学小児科

上芝 元

東邦大学医学部内科学糖尿病・代謝・内分泌科

【方法】

対象患者は、2002年から2006年の5年間における実診療患者とした。調査対象病院は、病床数100床以上の病院全て(5558病院)とし、全数調査とした。それぞれの院長宛に一次調査票を送付し患者数を男女別に調査した。一次調査において、患者ありとの返答のあった施設に対して二次調査を依頼し、二次調査票により患者に関する詳しい情報を得た。

患者数の推定法は、難病の患者数と臨床疫学増は悪のための全国疫学調査マニュアル第2版によった4)。

【結果と考察】

1) 一次および二次調査の回答症例数

5558施設に一次調査票の葉書を送付し、2042施設(回収率36.7%)より返信を受けた。症例ありとの回答のあった施設数は67であり、症例数は男性66例、女性59例の計125例であり、男女比は1.1:1であった。全国の推定患者数は341人と推定された。症例ありと回答のあった67施設に二次調査票を送付し、31施設(回収率46.3%)より回答を受け、二次調査の症例数の内訳は男性25例、女性25例の計50例であった。以下、この50例について、データの集積・解析結果を示す。

2) 二次調査結果の解析

A) 年齢分布

診断時の平均年齢は、男性55歳、女性53歳であり、50~60歳代に患者数のピークを認めたが、患者は全ての年代に及んでいた。これは、島崎らの報告の、10歳以下と40歳代でのピークが認められることとは異なっていた1)。しかしながら、この結果は、本調査では、症例数が少なかったことも関係していると思われる。ホルモン産生症状を有する症例は全体の40%(20/50例)で、その内、

男性は7例、女性は13例と女性の割合が多かった。若年者にホルモン産生症状を有するものが多かったが、この傾向は過去の報告と同様であった1)。ホルモン産生症状あり症例の平均年齢は48歳で、産生症状なし症例平均年齢は59歳であった。

B) 腫瘍診断の契機

最も多いものは、腹部症状の精査であり、34%を占めていた。続いて、偶発腫が24%を占めていた。ホルモン産生症状を有する症例は、20例と上述したが、それが腫瘍発見の契機となるのは6例であり、ホルモン産生症状を有する症例の30%を占めるに過ぎなかった。これは、副腎皮質癌のステロイド合成能は正常副腎より少なく、明らかな臨床症状を呈する量のステロイドが産生されるためには腫瘍がある程度の大きさになる必要があることを反映しているものと思われる。次に高血圧の精査が10%と3番目に続いたが、約半数の症例は、腫瘍診断の契機がそれぞれ異なっていた。

C) ホルモン産生症状の内訳

Cushing症候群が最も多く、約85%に認められた。男性化を示すものは、25%、アルドステロン症を示すものは20%であった。ホルモン産生症状を示す症例の35%は、複数のホルモン産生症状を呈していた。

D) 術前の各種検査施行率

形態学的検査については、CTが最も多く、1例を除く全ての症例で施行されていた。MRI、超音波の施行率はそれぞれ約60%、50%であった。アドステロールシンチ、MIBGシンチは約25%、血管造影は10%であった。空間分解能の点から副腎病変の診断にはCTが有用であると考えられているが、実際に最も使用されていることが分かった。

内分泌学的検査については、ホルモン産生

症状の有無にかかわらず、検査の選択率の高かったものは、血中コルチゾール、アルドステロン、アドレナリン、ノルアドレナリンであり、副腎皮質および髄質ホルモン産生における基本的な測定項目についてよく測定されていた。ホルモン産生症状ありでは、さらに尿ステロイドの測定や、性ステロイドを測定されているものが多かった。一方、副腎皮質癌で増加する傾向にあるといわれているDHEA-Sについては、検査施行率は50%とそれほど高くはなかったが、ホルモン産生症状の有無で検査の施行率に大差はなかった。

E) 手術施行および腫瘍の進展

診断時の腫瘍進展について、転移・腫瘍サイズおよび副腎腫瘍取り扱い規約におけるStage分類から解析した。診断時、遠隔転移を有した症例は16例、32%であった。この分布に、ホルモン産生症状の有無での違いはなかった。手術が可能であった症例は81.6%であった。このうち、完全切除が可能であった症例は77%であった。従って、手術不能例を合わせると完全切除が可能であるものは60%であった。病理組織での腫瘍の最大径は3.5~23.5cmであり、その平均は9.8cmであった。副腎腫瘍取り扱い規約によるstage分類に当てはめると、stageⅡとⅣの割合が高く、ともに約38%であった。遠隔転移と同様、ホルモン産生症状の有無での分布の違いは認められなかった。

前述の、腫瘍診断の契機の上位2項目である腹部症状および無症状（偶発腫）別に腫瘍径ならびにstage分類を集計した。腹部症状で発見された症例の腫瘍径の平均は10.1cmと、全症例のそれとほぼ同様であった。しかしながら、17例中の12例は手術不能であり、それらの症例の腫瘍径は不明であるため実際はより大きい可能性がある。Stage分類においては、stageⅣが53%を占め進行例が多かった。偶発腫においては、腫瘍径の平均は8.5cmであり、全症例と比較すると小さいものであった。Stage分類においても、stageⅣは17%と少なく、stageⅠ、Ⅱで58%を占めた。

F) 各種治療の施行率

手術単独で治療されていた症例は41%、化学療法に関しては、Mitotane 施行例は37%、それ以外の化学療法施行例は14%であった。

放射線療法施行例は10%であり、5例中4例は、転移巣に対する照射であった。これらの治療法別に症例を分けた場合、ホルモン産生症状の有無の違いは認められなかった。手術単独症例では、75%が腫瘍の完全切除を達成されていた。また、Stage分類では、全症例を対象とした場合に比し、stageが低い割合が高かった。Mitotane 施行症例における完全切除の有無、stage分類の内訳は、全症例におけるそれらの分布とほぼ同様であった。一方、化学療法施行症例は、完全切除なしの割合が高く、stageⅢ、Ⅳの症例に適応が限られていた。以上から、完全切除が可能であった場合には、手術単独である場合が多いが、Mitotane が施行されている症例は、完全切除の有無にはよらないようであった。これは、Mitotane は副腎皮質癌特異的な治療法であり、転移例ばかりではなく手術後の補助両方として用いられているものと考えられる。今後、適応症例ならびに投与量の検討が望まれる。

G) 予後

本研究では、2002年から2006年の実診療患者を対象としており、症例の約70%のフォローアップ期間は2年以内と、予後を十分に議論するには不適切なコホートであることは否めず、また症例数も少数であるが、生存曲線の作成を試みた。全症例の5年生存率は、56%であった。ホルモン産生症状の有無で比較すると、ホルモン産生症状ありの5年生存率38%、産生症状なしは76%であった。完全切除の有無による生存曲線では、完全切除ができた場合の5年生存率は88%であったが、切除不能である場合、2年生存率は約40%であった。Stage別の生存曲線では、症例数が少ないため結論づけることはできないが、stageⅣは他の群より予後が不良であった。

以上から、根治手術が可能である場合には、必ずしも予後不良ではない可能性があり、そのためには確実な診断が必要であり、診断指針の作成が望まれる。また、根治術が不能な症例においては、治療プロトコール作成等により、標準的な治療法の開発が望まれる。

【まとめ】

本邦における副腎皮質癌の全国疫学調査を行なった。2002年から2006年の5年間の患者数は341人と推定された。副腎皮質癌診

断の契機として、偶発腫が2番目の原因としてあげられ、24%を占めていた。治癒切除可能例ではこれまでの報告より明らかに予後がよいという結果であった。副腎皮質癌のマーカーとして血中 DHEA-S、尿中 17-OHCS および 17-KS が有用と報告されているが、その施行率は50%と決して高いものではなかった。従って、偶発腫の中から早期の副腎皮質癌を拾い上げて行くことは、非常に重要であり、今後これらの症例における診断指針が求められる。また、予後良好例については、ホルモン補充の有無等を含め QOL がどのようなのかを今後明らかにしていく必要があると思われる。一方、依然として約40%は診断時、治癒切除不能であり、診断および集学的治療の標準化による症例の蓄積が必要である。

【謝辞】

本調査にご協力を賜りました全国病院の諸先生方に深く感謝いたします。

【文献】

- 1) 島崎 淳、市川 智彦、始関 吉生、倉持 宏明：本邦臨床統計集、副腎癌。日本臨床 51 (増刊号)：766-782, 1993.
- 2) 笹野 公伸、鈴木 貴：副腎皮質癌。日本臨床 別冊(内分泌症候群)：720-723, 2006.
- 3) 上芝 元、一城 貴政：副腎偶発腫調査からの副腎癌の解析。厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患対策研究事業) 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・報告書：pp101-104, 2007.
- 4) 難病の患者数と臨床疫学像把握のための全国疫学調査マニュアル第 2 版。
<http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/health/nanbyo/files/manual06.pdf>

(2) 副腎の発生・分化機構の解明、
副腎不全に対する再生医療治療法の確立

副腎皮質の発生初期過程に関する研究

諸橋憲一郎

九州大学大学院医学研究院

A. 研究目的

Ad4BP/SF-1 遺伝子の機能解析ならびに副腎皮質特異的発現を調節するエンハンサーの解析を通じ、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。副腎皮質特異的マーカー遺伝子の発現を *in situ hybridization* ならびに免疫染色法を用いて検討した。Y1 細胞におけるサイクリン遺伝子の転写調節を、*luciferase reporter* 遺伝子アッセイ、ChIP アッセイ、さらに siRNA を用いたアッセイにより検討した。特に G1 サイクリンであるサイクリン D1 と E1 の遺伝子発現に対する Ad4BP/SF-1 の効果を検討した。

(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イントロンに胎仔副腎皮質エンハンサーを同定した。このエンハンサーの構造と機能の解析から、本エンハンサーは Pbx1/Prep/Hox による転写の活性化と、Ad4BP/SF-1 によるエンハンサー機能の自己制御による2ステップの制御を受けていることが明らかになった。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。従って、この結果は Ad4BP/SF-1 の強制発現が異所性副腎皮質の形成に寄与することを示すものであった。そこで、Ad4BP/SF-1 の発現の増加がいかなるメカニズムのもとに異所性副腎皮質の形成をもたらしたかを Y1 細胞を用いて検討した。Y-1 細胞において Ad4BP/SF-1 の発現を siRNA によって減少させると規則的な細胞周期の進行に影響が認められた。また細胞数の減少が認められた。そこで、サイクリン D1 と E1 遺伝子の発現に対する Ad4BP/SF-1 の影響を調べたところ、これら二つの遺伝子プロモーターは Ad4BP/SF-1 によって正に調節されていること、またその上流領域に Ad4BP/SF-1 が結合していることが明らかとなった。

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いたが、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同定した。このエンハンサーは副腎の発生初期に2ステップの制御を受けることを明らかにした。このエンハンサーを用いることで、胎仔副腎皮質細胞で Ad4BP/SF-1 を強制発現させることに成功した。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。次いで、Ad4BP/SF-1 が胎仔副腎の増殖に関与するかについて検討したところ、Ad4BP/SF-1 が細胞周期の制御を介して増殖の亢進に必要であることが示された。Ad4BP/SF-1 遺伝子破壊マウスにおける副腎皮質の消失の原因として、細胞増殖の制御異常を確認した。また、Ad4BP/SF-1 を発現する細胞ではこの因子が細胞増殖を制御していることが示された。

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。Ad4BP/SF-1 を発現する副腎皮質や生殖腺においては、Ad4BP/SF-1 が細胞増殖を制御することでこれらの組織形成に寄与する。

F. 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

SF-1 による間葉系幹細胞のステロイド産生細胞への分化誘導

柳瀬敏彦

九州大学大学院医学研究院病態制御内科

A. 研究目的

- (1) atrazine は米国で最頻用の除草剤であり、おそらく世界中でも最頻用と考えられているが、その使用の是非をめぐり、論争の渦中にある。土壌や表面水の汚染化学物質としてその広範な使用が野生ガエルの世界的な減少を含め、生態系への様々な影響を及ぼす可能性が懸念されている。我々はchloro-s-triazine系の除草剤であるatrazine/shimazineは細胞環境によってはaromataseの活性化を引き起こすこと、すなわちその活性化には、SF-1の高発現が必須であることを見いだしたので、その機序の解析を行なった。
- (2) 副腎不全や性腺機能不全に対する新しい治療法の開発を目的として我々はステロイド産生細胞の再生を試みている。SF-1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明らかにしたが、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、そのプロファイルがBMCのそれと比較検討すると共に、レチノイン酸の影響についても検討した。
- (3) ステロイドホルモン欠損症患者への自己細胞移植療法の臨床応用を考慮した場合、ヒト骨髄由来細胞(BMCs)へのSF-1の効果を調べることは非常に重要である。よってこれまで確立した方法をヒトBMCsに応用し、そのステロイドプロファイルがマウスと比較した。さらに、副腎や性腺の分化に関与することが知られる既知の因子WT1、DAX1、PBX1、CITED2、WNT4をヒトBMCsへ遺伝子導入した場合、ステロイド産生細胞へ分化誘導できるかどうかについても検討した。

B. 研究方法

- (1) NIH3T3細胞にSF-1を遺伝子導入した系においてforskolinはSF-1依存性aromatase promoter II (ArP II)活性を増強

- する56種類の内分泌攪乱候補物質のうち、この系に干渉する化学物質が存在するかどうかを検討した。ArPII活性の測定はルシフェラーゼアッセイによった。同様の検討をヒト卵巣顆粒膜細胞株KGNとヒト副腎皮質細胞癌株H295R細胞を用いて行った。これらの細胞におけるSF-1の内因性の発現レベルはRT-PCRあるいはWestern blottingにより検討した。一方、SF-1の外因性の過剰発現は、アデノウイルスによる発現系を用いて、SAdx-bSF-1とコントロールとしてAdx-LacZをKGN細胞に感染させた。H295R細胞におけるArPIIプロモーターとSF-1の相互作用はSF-1抗体を用いたChromatin Immunoprecipitation assay (ChIP assay)にて行なった。SF-1蛋白の産生と精製は、baculovirusの系を用いて行い、精製SF-1はsensor chipに固定後、Biacore T100 biosensing system (Biacore, Tokyo)による表面プラズモン共鳴(SPR)法を用いて精製SF-1蛋白と内因性リガンド16PC(1,2-dihexadecanoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine)並びに化学物質との結合の有無を検討した。
- (2) 4月齢雄B6マウスより大腿骨及び内臓脂肪を採取し、BMCを調整した。内臓脂肪はコラゲナーゼ処理し、遠沈後のペレットをBMCと同様に培養して、ASCを調整した。BMC、ASC共に付着細胞のみを33°C、5%CO₂の条件下、200-300日間培養し、ウシSF-1 cDNAまたはLacZ cDNA搭載アデノウイルス(Adx-bSF-1またはAdx-LacZ)に感染させた。培養液中に分泌されたステロイドはRIAまたはEIAにて測定し、ステロイド合成酵素の発現定量はリアルタイムPCRにより行った。
 - (3) ヒト骨髄単核球をLonza社より購入し、培養後、接着細胞のみを実験に用いた。Adx-bSF-1またはAdx-LacZの感染実験と同時にヒトSF-1、WT1、DAX-1、PBX-1、CITED2およびWNT4 cDNAは、RT-PCR法にて発現組織のtotal RNAよりクローニ

ングし、レンチウイルスベクタープラスミドへ挿入し、同様に感染実験を行った。ACTH 受容体、LH-R 受容体、SF-1 の染色は各特異抗体を用いて行った。

(倫理面への配慮)

全て in vitro 研究であり、倫理的問題はない。本実験では、試薬メーカーより購入したヒト骨髄由来単核球を用いた。また、遺伝子組換え実験および感染実験は九州大学の実験承認可に行った。

C. 結果

(1) スクリーニングの結果、atrazine/simazine は単独で SF1 依存性に ArPII 転写活性を濃度依存性に増強した。NIH3T3 細胞に SF-1 を発現導入しなければ、このような効果は認められなかった。一方、KGN 細胞では atrazine/simazine による ArPII 活性の増強効果が認められなかったが、H295R (副腎癌細胞) では、atrazine による H295R 細胞の aromatase 活性の上昇を確認した。内因性の SF-1 mRNA の発現量を RT-PCR にて比較検討したところ、H295R では KGN 細胞に比べ、約 60 倍の内因性 SF-1 の高発現を認め蛋白レベルにおける検討でも同様であった。そこで KGN 細胞に Adx-bSF-1 を導入させたところ、atrazine/simazine により P450arom mRNA レベルも、アロマトラーゼ活性レベルも上昇を認めた。すなわち、SF-1 の発現量の増加に伴い atrazine/simazine に対する aromatase 遺伝子の反応性を回復させ得ることが判明した。H295R 細胞を用いた ChIP assay により、 10^{-5} M atrazine/simazine は 10^{-6} M forskolin ほど強力ではなかったものの SF1-ArPII の相互作用を増強することが判明した。また aromatase promoter II 4Kb の欠失変異を用いた検討から、ArPII の -516bp 断片中の SF-1 サイトは atrazine による ArPII の活性化に必須であることが判明した。精製 SF-1 と内因性リガンドである 16PC との結合を SPR 法を用いて検討したところ、強度の結合を認めた。一方、atrazine は弱い SPR であったが、SF-1 との濃度依存性の結合を認め、弱いながらも外因性リガンドである可能性が示唆された。

(2) SF-1 の強制発現により、ASC も BMC と同様にステロイド産生細胞に形質転換された。

しかし、SF-1 の発現が強いほど BMC は性腺ステロイド産生傾向が強まるのに対し、ASC は副腎ステロイド産生傾向が強まったが、その一因として P450c21 の発現強度の違いが考えられた。また、レチノイン酸添加により BMC は更に性腺ステロイド産生傾向が強まるのに対し、ASC は更に副腎ステロイド産生傾向が強まり、その一因として ASC における 17 β -HSD の発現抑制が考えられた。なお、いずれの実験においても、内因性 SF-1/Ad4BP の発現は認められなかった。

(3) Adx-bSF-1 感染ヒト BMCs において培養上清中 (7-11 日) の P4、B、F、アルドステロン、DHEA、T、E2 濃度が増加した。ヒト BMCs はマウス細胞と同様にコルチゾールと性ホルモンの両方を産生し、副腎・性腺混合型のステロイド産生性を示した。P450scc、3 β -HSD、P450c21、P450c11、P450c17、17 β HSD type3、P450arom の mRNA の発現量は Adx-bSF-1 の MOI 依存的に増加したが、Adx-LacZ 感染細胞ではこのような現象は認めなかった。P450c21 の発現誘導はヒトでは明瞭であったがマウスでは検出されなかった。Adx-bSF-1 感染ヒト BMCs はアルドステロン産生性を示したが、P450aldo の発現はリアルタイム PCR 法では検出されなかった。リアルタイム PCR および免疫蛍光細胞染色の結果、ヒト BMCs において SF-1 によって ACTH 受容体および LH 受容体の発現が誘導された。またコルチゾール分泌は 2.4 μ M ACTH および 10 mU/ml hCG によって増加した。同様にテストステロン産生も hCG および ACTH 応答して増加した。次に SF-1 をポジティブコントロール、GFP をネガティブコントロールとして WT1、DAX1、PBX1、CITED2 および WNT4 の発現導入による効果について検討した。WT1 はエクソン 5 の 17 アミノ酸配列の有無とエクソン 9 中の 3 アミノ酸配列 Lys-Thr-Ser (KTS) の有無による 4 種類のアイソフォーム -/-、+/-、-/+、+/+ について検討した。感染細胞の培養上清中 (11-14 日目) のコルチゾールおよびテストステロンを測定し、P450scc の発現レベルをリアルタイム PCR 法にて解析した結果、SF-1 のみがヒト BMCs においてコルチゾールおよびテストステロン産生性を示し、P450scc の発現を誘導した。WT1 (+/+、

+/-, -/+, -/-)、DAX1、PBX1、CITED2、WNT4の単独導入はこのような効果を示さなかった。

D. 考察

(1) ヒトにおいてSF-1高発現という条件下ではaromataseの活性上昇によりatrazineが高エストロゲン環境を作り出す可能性を示唆しており、臨床疫学的に懸念されているエストロゲン依存性癌の乳癌や前立腺癌との関連が示唆される。最近、リン脂質がSF-1の内因性リガンドとして同定された。今回の研究ではその内因性リガンドの一つである16-PCがSF-1と相互結合することをin vitroにおける親和性研究によって初めて示し得た。また、16PCに比べると極めて弱い、atrazineはSF-1に結合することを示し、SF-1の外因性リガンドとして作用する可能性を提示した。

(2) 本実験ではBMCとASC共にマーカー的には極めて類似した間葉系細胞でありながら、MSCはSF-1の発現強度依存性に性腺ステロイド産生傾向が強まる一方、ASCは副腎ステロイド産生傾向が強まった。マウスではSF-1発現が低いと性腺は形成されるが副腎は形成されないことが示唆されている。性腺の再生にはMSCが、副腎の再生にはASCが適しているのかもしれない。一方、組織採取の容易さやより多くの細胞数が採取可能という観点からは、ステロイド産生細胞再生のソースとしてはASCの方がより適しているのかもしれない。

レチノイン酸暴露により、MSCは性腺ステロイド産生傾向が強まる一方、ASCは副腎ステロイド産生傾向が強まった。レチノイン酸は細胞分化に影響を持つと同時に、ステロイド産生細胞のステロイド分泌を刺激する。レチノイン酸投与により、精巣特異的な17 β -HSD type3が発現増強する一方、ASCに於いては発現抑制され、レチノイン酸がステロイド産生細胞の副腎系もしくは性腺系への分化にも影響し得ることが示唆された。

(3) SF-1によるACTH受容体およびLH受容体の発現誘導がみられる点でヒトとマウス細胞とは大きく異なる。マウスBMCsは本来副腎型ACTH受容体よりも脂肪組織型ACTH受容体を優位に発現しており、脂肪組織タイプのACTH受容体のプロモー

ター領域にはSF-1結合部位が存在しないため、SF-1の導入自体はマウスのBMCsにおいてACTH受容体の発現を誘導しないのではないかと考えられる。一方、ヒトACTH受容体は遺伝子構造上、副腎型以外のアイソフォームは無いようであり、SF-1結合部位を持つ副腎型ACTH受容体のみをつくる。同様にLH受容体はヒトBMCsにおいて明瞭に誘導されるが、マウスにおいては誘導されない。ヒトBMCsにおいてACTH受容体とLH受容体が誘導されACTHまたはLH応答性を示すという発現は、将来的にステロイド不全症に対する自己BMC移植療法への臨床応用を考慮した場合、生理的に重要である。これは、ヒト間葉系BMCsからのステロイド産生細胞の創生にとってSF-1がマスターレギュレーターである可能性を示唆している。

E. 結論

- (1) atrazine/simazineによるヒトaromatase遺伝子の転写活性化は、aromatase promoter IIを介して転写レベルで起こり、その転写活性の刺激にはSF-1の高発現が、必須であった。atrazineとSF-1の直接的結合が認められたことから、atrazineはSF-1の外因性リガンドとして作用している可能性が示唆された。
- (2) BMCとASCでは全く異なったステロイド産生プロファイルを示したことから、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示唆され、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示唆された。
- (3) SF-1はヒト骨髄由来間葉系細胞をステロイド産生細胞へ形質転換した。さらにこのステロイド産生細胞はACTHおよびLH応答性を示すことが明らかになった。

F. 知的財産の出願・登録状況 (予定を含む) なし

ステロイド産生細胞の分化再生に関する研究

宮本 薫

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

A. 研究目的

副腎ホルモン産生異常に関連した疾患の治療に、幹細胞を用いた再生医療の応用が期待されている。副腎皮質ホルモン産生異常の治療には、主にホルモン補充療法が用いられているが、より生理的なホルモン動態を考慮すると外部からの投与によるホルモン補充療法にかわる自律的な分泌調節が可能な再生医療の開発が望まれる。私どもはこういった観点に立って、幹細胞からフィードバック機能を備えた副腎皮質ホルモン産生細胞の作製を試みている。幹細胞としては全能性を持つ ES 細胞の利用も考えられるが、倫理的問題や技術的な困難さが伴うため現実的でない。私どもは ES 細胞に代わる幹細胞として骨髄由来の間葉系幹細胞に注目した。骨髄間葉系幹細胞は成体から比較的容易に採取できること、さらに ES 細胞ほどではないにしろ様々な細胞に分化しうることから再生医療への応用に適した幹細胞である。本研究の目的は、骨髄間葉系幹細胞を用いて、フィードバック機能を備えた副腎皮質ホルモン産生細胞を作り出し、副腎ステロイドホルモン産生異常症に対する再生医療への基礎的検討を行うことである。

B. 研究方法

- 1) 全身性に緑色蛍光タンパク質 GFP を発現している green ラットから骨髄を採取し、プラスチックシャーレを用いて付着した細胞のみを培養し、緑色蛍光を発する間葉系幹細胞を採取した。これを同系の 3 週令幼若ラット精巣に移植した。移植数週間後に精巣を摘除して、移植細胞の生着の有無や性腺細胞への分化を、コンフォーカル顕微鏡を用いて組織化学的に解析した。
- 2) マウス骨髄から単離・株化された間葉系幹細胞株 KUM9 (成育医療センター研究所・梅澤明弘先生から供与) を用いてプロモーターソーティング法により、*in vitro* で KUM9 細胞のステロイド産生細胞への分化能を検討した。生殖腺と副腎のステロイドホルモン産生細胞特異的な遺伝子発現を司る CYP11A1 プロモーターを GFP 遺伝子上流に組み込んだレポーターベクターを作製し KUM9 細胞にトランスフェクトした。出現してきた GFP 陽性の細胞をソーティングにより分離し、P450scc 抗体による免疫染色を行った。さらに、さまざまなステロイドホルモン産生細胞のマーカージェノ型の発現を RT-PCR により解析した。
- 3) マウス骨髄間葉系幹細胞株 KUM9 細胞に、転写因子でオーファン核内受容体遺伝子 Ad4BP/SF-1 をトランスフェクトし、SF-1 恒常発現細胞株を樹立した。この SF-1 恒常発現細胞株を dibutyl-cAMP 存在下に 7 日間培養し、分化誘導を行った。分化誘導の検証には、ステロイド産生細胞特異的な分子マーカーである P450scc をはじめとする特異的遺伝子群の発現を RT-PCR により解析した。また、これらのタンパク質としての発現を、それぞれの特異的抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。
- 4) ヒト骨髄間葉系幹細胞株に、同様に転写因子でオーファン核内受容体遺伝子 Ad4BP/SF-1 をトランスフェクトし、SF-1 恒常発現細胞株を樹立した。この SF-1 恒常発現細胞株を dibutyl-cAMP 存在下に 7 日間培養し、分化誘導を行った。分化誘導の検証には、ステロイド産生細胞特異的な分子マーカーである P450scc をはじめとする特異的遺伝子群の発現を RT-PCR により解析した。また、これらのタンパク質としての発現を、それぞれの特異的抗体を用いてウエスタンブロットにより解析した。
- 5) SF-1 と高い相同性を持つ転写因子として LRH-1 が知られているが、私どもは SF-1 に代わって LRH-1 をヒト骨髄間葉系幹細胞株に導入し、LRH-1 恒常発現細胞株を樹立した。同様に、幹細胞への LRH-1 導入が、ステロイドホルモン産生

細胞への分化を誘導できるかどうかを検証した。

C. 研究結果

- 1) 全身性に緑色蛍光タンパク質 GFP を発現する green ラットの骨髄間葉系幹細胞を同系の 3 週令幼若ラット精巣に移植し、3 週間後に精巣を摘出し移植細胞の生着および細胞分化を組織化学的に解析した。その結果、移植した幹細胞は精巣内で間質に生着し、ステロイドホルモン合成の律速酵素である P450_{scc} を発現していた。このことから、移植した幹細胞は精巣内で Leydig 様細胞に分化したことを示唆している。
- 2) マウス骨髄間葉系幹細胞株 KUM9 にヒト CYP11A1 遺伝子プロモーターを GFP 遺伝子の upstream に組み込んだレポーターを導入し、KUM9 細胞が自発的にステロイドホルモン産生細胞に分化しうるかどうかを検証した。その結果、極一部ではあったが、KUM9 細胞は自発的にステロイドホルモン産生細胞へと分化していた。GFP 陽性のこの細胞をソーティングにより分離し、P450_{scc} 抗体により免疫染色を行ったところ、たんぱく質レベルでもこの細胞がステロイドホルモン合成酵素を発現していることが確認された。さらに、この細胞の遺伝子発現を RT-PCR で検証したところ、HSD3b1 や LHR といった Leydig 細胞特異的遺伝子の発現が確認された。このことから、in vivo と同様に間葉系幹細胞はステロイドホルモン産生細胞に分化しうるということが明らかとなった。さらに、この細胞では転写因子でオーファン核内受容体遺伝子 Ad4BP/SF-1 を発現していた。
- 3) マウス骨髄間葉系幹細胞株 KUM9 細胞に、転写因子でオーファン核内受容体遺伝子 Ad4BP/SF-1 をトランスフェクトし、SF-1 恒常発現細胞株を樹立した。この SF-1 恒常発現細胞株を dibutyl-cAMP 存在下に 7 日間培養したところ、全ての細胞が抗 P450_{scc} 抗体で陽性となり、ステロイドホルモン産生細胞へと分化したことが確認された。さらに、様々なステロイドホルモン合成関連遺伝子群の発現を RT-PCR で確認したところ、LH 受容体遺伝子とともに性腺系ステロイドホルモン産生に必要な遺伝子群が発現していた。さ

らに、この細胞株の培養上清中のステロイドホルモン量を ELISA で測定したところ、主としてテストステロンなどのアンドロゲンが多く産生され、副腎皮質ホルモンの産生は確認できなかった。

- 4) ヒト骨髄間葉系幹細胞株に、同様に転写因子でオーファン核内受容体遺伝子 Ad4BP/SF-1 をトランスフェクトし、SF-1 恒常発現細胞株を樹立した。この SF-1 恒常発現細胞株を dibutyl-cAMP 存在下に 7 日間培養して分化誘導を行った。その結果、マウス骨髄間葉系幹細胞株の場合とは異なり、ヒト骨髄間葉系幹細胞株では、ACTH 受容体遺伝子を発現すると共に、主にコーチゾルを産生するステロイドホルモン産生細胞を作り出すことができた。
- 5) SF-1 に代わって LRH-1 をヒト骨髄間葉系幹細胞株に導入し、cAMP 処理を行うことで、SF-1 と同様にヒト骨髄間葉系幹細胞株をステロイドホルモン産生細胞へと分化誘導することができた。

D. 考察

Green ラットを用いた移植実験から、骨髄間葉系幹細胞がステロイドホルモン産生細胞へと分化しうる可能性を示すことができた。しかし、in vivo での移植実験では幹細胞と局所のステロイドホルモン産生細胞とが細胞融合した可能性を否定できない。そこで、in vitro での分化誘導を試みた。マウス骨髄間葉系幹細胞株 KUM9 は、極わずかではあるが自発的にステロイドホルモン産生細胞に分化できることが確認された。そこでさらに効率的に分化誘導を行うため、KUM9 に転写因子でオーファン核内受容体遺伝子 Ad4BP/SF-1 の導入と cAMP による刺激を行ったところ、主にアンドロゲンを産生する細胞を作り出すことが出来た。一方、ヒト骨髄間葉系幹細胞株を用いて同様の処理を行うと、副腎皮質ホルモン、主にコーチゾルを産生する細胞へと分化した。また、SF-1 と同じファミリーを形成する転写因子 LRH-1 の導入によっても、ステロイド産生細胞を得ることができた。これらの結果は、副腎ステロイドホルモン産生異常症に対する再生医療に向けての基礎的な知見を提供するものである。

E. 結論

本研究により、骨髄由来の間葉系幹細胞は *in vivo* ならびに *in vitro* でステロイドホルモン産生細胞に分化する能力を有していることが示された。この知見は、将来的な副腎ホルモン産生異常に関わる疾患への再生医療の可能性を示すものである。

F. 知的財産の出願・登録状況

1) 特許申請

特願 2004-058406 号

間葉系幹細胞をステロイド産生細胞に分化させる方法

国際出願 PCT/JP2005/002548 2005年2月18日

2) 実用新案登録 なし

3) その他 なし

(3) 副腎ホルモン産生異常症の病因・病態の解明を
目的とした基礎的・臨床的研究

Yeast two-hybrid system を用いた StAR および DAX-1 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

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場で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知見を提供することが可能となる。

また、DAX-1 (NROB1) は低ゴナドトロピン性性腺機能低下を合併する X 連鎖性先天性副腎低形成症の原因遺伝子として知られているが、ステロイドホルモン産生に関連する視床下部-下垂体-副腎/性腺の内分泌軸にそった発現からも単に副腎の分化形成に関わるだけではなく、これまで抑制性の転写因子としての機能を有することが報告されているが、結合する転写共役因子などを含めた転写調節機構や、細胞内核移行メカニズムについては不明な点が残されている。このため、

DAX-1 との相互作用因子を同定し、ステロイドホルモン産生の調節機構における新たな知見が得られる可能性がある。

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した。この 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、さらにヒト全長 DAX-1 との相互作用因子のスクリーニングを行う。尚、-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 種類のヒト StAR タンパクおよびヒト DAX-1 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照合することでその因子を同定し、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各タンパクと候補因子タンパクと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などを用いて検討する。

C. 研究結果

StAR タンパクについて 1 次スクリーニングで得られた 295 個の陽性コロニーの確認実験を繰り返し行った結果、最終的に 3 個の候補因子を同定した。現在はこの 3 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行っている。

一方の DAX-1 タンパクについては 1 次スクリーニングの結果 79 個の陽性コロニーを

同定し、現在はさらなる確認実験を実施している。今後は候補因子について StAR タンパクの場合と同様にタンパク-タンパク相互作用の確認を他の方法論を用いて検証していく。既に転写共役因子として報告されている因子が陽性クローンの中に含まれており、有望な因子と考え、その発現様式や DAX-1 の転写調節機能への影響について検討すべく、準備を進めている。

D. 考察

これまでに同定できた StAR 相互作用候補因子 3 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しての検討を加えていく必要がある。また、DAX-1 相互作用候補因子については絞込みを行うと同時に、有望因子についてはその発現様式や転写調節機能に対する効果を

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

機器分析を用いた尿中および血中ステロイドプロファイル分析によるステロイド産生異常症診断法の確立、病態解析、副腎生理機能解析

長谷川奉延、本間桂子*、三輪雅之、池田一成
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

1. 背景

ステロイド産生異常症の診断、病態解析、および副腎生理機能解析には、ステロイドの網羅的分析が欠かせない。しかし汎用されている免疫化学的ステロイド測定法は、簡便かつ高感度である一方、1) 未知のステロイドが大量に共存するステロイド産生異常症や新生児の生体試料においては、交差反応により偽高値を呈すること、2) 1項目1測定法のため検体量を多く必要なこと、などから、診断や解析に支障をきたすため、適用困難であった。GCMSによる尿ステロイドプロファイル、LCMSMSによる血中ステロイドプロファイルは、少量の検体を1回分析するだけで、ステロイド分泌全体を把握出来るので、今回P450 oxidoreductase 異常症、副腎癌、新生児の診断あるいはステロイド動態解析に応用した。

2. 研究目的

機器分析を用いた尿中および血中ステロイドプロファイル分析によるステロイド産生異常症診断法の確立、病態解析、副腎生理機能解析。

【H17】P450 oxidoreductase 異常症のステロイド動態解析と生化学的診断法の確立

【H18】小児副腎癌および成人副腎癌のステロイド分泌動態解析

【H19】胎児期・新生児期特異的男性ホルモン産生経路 (backdoor pathway) の存在の証明

3. 研究方法

<方法>ガスクロマトグラフ質量分析 (GCMS)による尿中ステロイド代謝物一斉分析、および液体クロマトグラフ-タンデム質

量分析 (LCMSMS)による血中ステロイド一斉分析により、患者の随時尿、蓄尿、血清中のステロイドを測定し、ステロイド濃度、ステロイド比について、患者・健常者における年齢別分布、患者群における異常頻度、有意差検定 (Mann-Whitney 順位和検定) 等を検討した。

<対象>

【H17】P450oxidoreductase 異常症：生後10日から29歳、22例、21-hydroxylase 欠損症：生後3日から1歳、117例、一過性高17OHP血症：生後3日から1歳、231例、健常対照：生後3日から50歳、2065例

【H18】副腎癌7ヶ月から73歳、27例、健常対照 生後3日から73歳の2402例。

【H19】早産児(26-35週)：生後3-5日、29例、正期産児(37-41週)：生後3-6日、103例、

(倫理面への配慮)

患者の保護者または本人の同意を得た。

4. 研究結果および考察

【H17】尿ステロイドプロファイルによるP450 oxidoreductase 異常症(PORD)の生化学的診断

尿ステロイドプロファイルにより、PORDにおけるP450c17とP450c21の複合型活性低下を示唆するステロイド産生異常を、PORD22例全例において確認した。診断指標には、6種のステロイド代謝物と2種のステロイド代謝物比が有用であり、これらを総合的に判定した場合の疾患検出感度は、POR遺伝子変異の種類、臨床症状、年齢、性別に関わらず100%であった。新生児・乳児PORDのスクリーニングには、尿pregnanetriolone(図1)、新生児・乳児PORDと21OHDの鑑別診断には、