

# 原発性アルドステロン症の診断とアルドステロン作用の調節因子の検討

柴田洋孝

慶應義塾大学医学部内科

## A. 研究目的

近年、二次性高血圧の中で頻度が多い原発性アルドステロン症の有効な診断方法の検討を行う。また、原発性アルドステロン症の治療は、副腎摘出術またはミネラルコルチコイド受容体(MR)拮抗薬を中心とした薬物療法が行われるが、MRの転写共役因子を新たに探索して、アルドステロン作用の調節因子を明らかにする。

## B. 研究方法

平成17年度： 原発性アルドステロン症の有効な診断方法の検討：経口食塩負荷試験の有用性

副腎腫瘍と高血圧を有する140症例を対象とした。

1日あたり食塩10-12g/日を含む食事を3日間摂取後の24時間尿中アルドステロン排泄( $\mu\text{g}/\text{日}$ )をRIA法、テトラヒドロアルドステロン排泄( $\text{mg}/\text{gCr}$ )をGC/MS法で測定した。最終的な原発性アルドステロン症の診断は、手術例は病理診断で行った。同時に、立位フロセミド負荷試験として、フロセミド40mg静注後120分後の血中活性レニン濃度(ARC)とアルドステロン濃度を測定した。

平成18年度： 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

MRとリガンド依存性に相互作用を有するUbc9につき、その蛋白-蛋白相互作用、MR転写活性への影響、SUMO化酵素活性の関与につき検討し、細胞内局在、マウス腎臓組織における発現を免疫組織化学により解析した。

平成19年度： アルドステロン作用の抑制因子としてのNF-YCの役割

MRと相互作用する新規結合蛋白を酵母two-hybrid法を用いて、ヒト心臓cDNAライブラリーよりスクリーニングを行い、得られたクローンの機能解析を行った。

## C. 研究結果および考察

<平成17年度>

原発性アルドステロン症の確定診断法として、

経口食塩負荷試験と立位フロセミド負荷試験の比較検討を行った結果、経口食塩負荷試験では、24時間尿中アルドステロン排泄のカットオフを $8.4\mu\text{g}/\text{日}$ 以上とした時に、感度88.6%、特異度91.3%、陽性的中率91.2%、陰性的中率88.7%、正の尤度比10.2であった。一方、立位フロセミド負荷ではARC120分値のカットオフ値が $7.6\text{pg}/\text{ml}$ 未満とした時に、感度88.3%、特異度82.4%、陽性的中率95.8%、陰性的中率60.9%、正の尤度比5.0であった。これらの検討結果からは、原発性アルドステロン症は、高血圧を示す例を対象にして、血中アルドステロンレニン比の高値により一次スクリーニングを行い、二次スクリーニング(確定診断)としては、経口食塩負荷尿中アルドステロン排泄が非常に有用性が高いことが示された。

原発性アルドステロン症は、副腎から自律的にアルドステロンが過剰産生されることから、アルドステロン分泌抑制試験である経口食塩負荷試験は病態生理学的にも有用性が期待され、実際の症例においてもその有用性が証明された。局在診断として行う副腎静脈サンプリングは、これらの一次・二次スクリーニング共に陽性を示した例に対して行うべきと考えられた。

<平成18年度>

MRなどの核内受容体の作用調節には、MRの蛋白修飾を介するエピジェネティックな調節機構も示唆される。平成18年度は、MRのSUMO化修飾に関わるSUMO化酵素Ubc9につき検討を行った。Ubc9はMRのN末端と結合して、MRのSUMO化修飾により転写抑制に導くことが示された。一方、Ubc9はその酵素活性とは独立して、MRのN末端にSRC-1を動員して蛋白-蛋白相互作用により複合体を形成して、MR転写を活性化する新たな機能を見いだした。したがって、Ubc9はMRのジェネティックな転写活性化作用とエピジェネティックな転写抑制作用の二元的機能が証明された。

<平成19年度>

MRの新規転写共役因子として、NF-YCを同定した。NF-YCはMRのN末端に結合して、

アルドステロン依存性の転写活性化を抑制するコリプレッサーである。NF-YC は哺乳類の遺伝子の約 30%にある CCAAT 配列に結合する転写因子 NF-Y の3つのサブユニットの一つであり、MR を介するアルドステロン作用を抑制する。同濃度のコルチゾールと比べて、有意にアルドステロンの作用を抑制し、そのメカニズムとしては、アルドステロンが結合した時の MR の N 端・C 端結合を抑制することが想定される。マウス腎臓の皮質集合管細胞の核で MR, NF-YC は共在しており、生理学的役割が示唆された。

#### D. 結論

＜原発性アルドステロン症の確定診断＞

副腎腫瘍を伴う高血圧、難治性高血圧、低カリウム血症を伴う高血圧などを対象にして、血中アルドステロン/レニン比を指標に一次スクリーニングを行い、アルドステロン(ng/dl)/レニン活性(ng/ml/hr) > 20 で陽性とし、それらに対して二次スクリーニングとして、経口食塩負荷尿中アルドステロン排泄、立位フロセミド負荷試験などにより確定診断を行い、ここでの陽性例に対して、副腎静脈サンプリングによる局在診断を行うべきである。

＜アルドステロン作用の調節因子＞

Ubc9, NF-YC は MR 作用を正または負に調節するが、ジェネティックおよびエピジェネティックな MR 作用調節が示唆された。

E. 知的所有権の出願・取得状況について  
特になし。

## グルココルチコイド作用強度の組織特異性とその判定法の検討

笠山宗正、森田真也\*、大月道夫\*、浅沼伸行、佐藤文三

日本生命済生会附属日生病院総合内科

\*大阪大学大学院医学系研究科内分泌・代謝内科学

### A. 研究目的

グルココルチコイド (GC) 薬の抗炎症作用が投与初期には顕著に認められても継続投与に伴って減弱する場合がある (GC 抵抗性)。また、GC 薬の継続投与に伴い、抗炎症作用に比べ副作用の方がより強く出現することもしばしば経験するところである。

GC 抵抗性を示す分子機構として、グルココルチコイド受容体 (GR) の発現量の低下や GR  $\beta$  による GR 活性の阻害・炎症性転写因子による GR 機能の低下などが想定されているが、詳細は不明であった。GC の抗炎症作用の多くは、炎症細胞に発現する GR を介した炎症性遺伝子の転写抑制 (trans-repression) 作用によるものであり、一方、GC の副作用の多くは非炎症性細胞に発現する GR を介した標的遺伝子の転写促進 (trans-activation) 作用によると考えられている。

GC 薬の継続投与に伴い GC 薬の抗炎症作用と副作用が乖離する分子機構を明らかにすることができれば、より副作用の少ない GC 療法の開発につながると考え、血管内皮細胞における GC 処理による GR 発現量の変化と GC 処理による GC の抗炎症作用の変化について解析した。

さらに、臨床的な問題点として、GC 薬投与時にみられる続発性 (薬剤性) 副腎皮質機能低下症の診断・評価方法として用いられる少量 ( $1 \mu\text{g}$ ) ACTH 試験の意義について検討した。同時に、続発性副腎皮質機能低下症患者にみられる低血圧やショックなどの循環器系の症候が副腎髄質機能低下に基づく可能性を想定し、続発性副腎皮質機能低下症患者の副腎髄質機能に関する評価を行った。

### B. 研究方法

#### 1. GR 発現量と GR 抵抗性との関連についての解析

ヒト臍帯静脈由来内皮細胞 (HUVEC) およびヒト肺胞上皮細胞株 (A549) を、種々の濃度のデキサメサゾン (DEX) で処理後 GR 発現量の変化をウェスタンブロット法で解析した。

HUVEC および A549 細胞を DEX ( $10^{-7}\text{M}$ ) で前処理 (24h) した後培養液を洗浄し、種々の濃度の DEX 存在下で TNF  $\alpha$  (20ng/ml) で刺激し培養液中の IL-6 濃度を ELISA で測定した。

#### 2. 続発性副腎皮質機能低下症診断における少量 ACTH 試験の意義

吸入ステロイド薬 (ICS) 治療中の喘息患者のうち試験実施前 1 年間に GC 薬の経口・静脈内投与がなされていない患者のうち、同意が得られた 56 名を対象とした。ACTH (コートロシン<sup>®</sup>)  $1 \mu\text{g}$  を静脈内投与し、投与前・投与後 30 分・60 分の血清コルチゾールを測定した。既報に基づき、コルチゾール前値  $< 11 \mu\text{g/dl}$  かつ 30 分値  $< 18 \mu\text{g/dl}$  を低反応と判定した。

また、DXA 法により骨密度の測定を実施し得た閉経後女性 31 例について、腰椎 (L2-L4) および大腿骨頸部の骨密度と少量 ACTH 試験による副腎皮質機能の判定との関連を検討した。

HUVEC を種々の濃度のフルチカゾン (FP) で処理した後 TNF  $\alpha$  (20ng/ml) で刺激し培養中の IL-6 濃度を測定した。

#### 3. 続発性副腎皮質機能低下症患者の副腎髄質機能評価

ACTH 産生腺腫、GH 産生腺腫、TSH 産生腺腫を除く下垂体腺腫患者のうち、本試験に同意が得られた患者 23 例 (非機能性腺腫 18 例、プロラクチノーマ 5 例、男性/女性 7 例/16 例) を対象に、インスリン低血糖試験を実施した。注射前および注射後 15, 30, 60, 90, 120 分に採血し、エピネフリン、ノルエピネフリン、ACTH、GH、コルチゾールを測定した。

(倫理面への配慮)

臨床研究においては、対象患者に対して本研究についての説明を行いその同意を得て実施した。

## C. 研究成果

### 1. GC 投与による GR 発現量の低下は GR 抵抗性をもたらす

HUVEC において、DEX 処理 4~48 時間にわたって GR 発現量の低下が認められた。一方、A549 細胞では、GR 発現量は DEX 処理 5 時間後に一過性に低下したが、24 時間後にはほぼ元のレベルに回復した。

HUVEC において TNF $\alpha$  誘導性 IL-6 産生を DEX は濃度依存性に抑制したが、DEX の前処理により DEX の IL-6 産生抑制作用が減弱した。A549 細胞においても、TNF $\alpha$  誘導性 IL-6 産生を DEX は抑制したが、DEX の前処理によってもその IL-6 産生抑制作用は減弱しなかった。

GR 発現アデノウイルスベクターを感染させた HUVEC では、DEX 処理時の GR 発現量の低下はみられず、DEX の前処理によってもその IL-6 産生抑制作用は減弱しなかった。

### 2. 少量 ACTH 試験は副腎皮質機能低下症の診断に有効である

ICS 治療中の喘息患者に対して、標準量 (250  $\mu$ g) の ACTH 試験を実施すると、血清コルチゾール値は 60 分後に頂値となり、全例において  $\geq 20$   $\mu$ g/dl と正常反応を示した。一方、1  $\mu$ g ACTH 試験では血清コルチゾールは 30 分後に頂値となり、対象患者 56 例中 14 例 (25%) が低反応と判定された。正常反応例と低反応例との間には、年齢・性別・喘息罹病期間・ICS 投与量・ICS の種類に有意差を認めなかった。

骨密度測定を実施した閉経後女性 31 例のうち、少量 ACTH 試験にてコルチゾール低反応と判定した 7 例では、正常反応例 (24 例) に比べて腰椎骨密度・大腿骨骨密度 (Z スコア) が低い傾向を示した。

HUVEC において、TNF $\alpha$  刺激時の IL-6 産生に対して FP は Dex より低濃度 ( $10^{-9}$ M vs.  $10^{-7}$ M) で最大抑制を示した。

### 3. 続発性副腎皮質機能低下症患者では副腎髄質機能低下を認める

下垂体腺腫患者 23 例において、インスリン低血糖ストレスに対する血漿エピネフリンとノルエピネフリンの反応性を検討した。血漿エピネフリンの基礎値は健常対象者の基準値 (<170pg/ml) 内であったが、インスリン低血糖刺激に対する反応は、全例において低下していた。一方、血漿ノルエピネフリンの基礎値は、23 例中 5 例において基準値 (150-570pg/ml) より低値であったが、他の 18 例では基準値内であった。インスリン低血糖時のノルエピネフリンの反応は正常例・低下例さまざまであった。

インスリン低血糖試験時のエピネフリン頂値 <400pg/ml をエピネフリン分泌低下症 (重症型) と定義し、下垂体機能低下症との関連について検討したところ、続発性副腎皮質機能低下症患者では、副腎皮質機能低下症を有さない患者に比べてエピネフリン分泌低下症 (重症型) と判定される患者が多かった。一方、続発性甲状腺機能低下症、続発性性腺機能低下症、成長ホルモン分泌低下症、中枢性尿崩症を有する患者では、エピネフリン分泌低下症 (重症型) と判定される頻度は、これら下垂体機能低下症のない患者と同等であった。

インスリン低血糖試験時のエピネフリン頂値とコルチゾール頂値は正相関を示した ( $R=0.506$ ,  $P=0.014$ )。一方、エピネフリン頂値と成長ホルモン頂値 ( $R=0.072$ ,  $P=0.745$ )、血糖底値 ( $R=-0.147$ ,  $P=0.503$ ) には相関を認めなかった。

## D. 考察

HUVEC と A549 細胞における GC による GR 発現低下のパターンの差異が GC の抗炎症作用の強度と密接に関連することは、GC 処理により GC 抵抗性を生じやすい細胞とそうでない細胞があることを示唆するものである。HUVEC における GC による GR 発現量の低下は GC 抵抗性の獲得に密接に関連すると考えられた。この結果は、標的細胞における GR 発現量を調節することによって、GC 抵抗性を改善し、一方で GC の副作用を減弱させる可能性を示唆している。

従来の 250  $\mu$ g ACTH 試験による評価では、ICS で治療中の喘息患者全例が正常と判定されたのに対して、少量 (1  $\mu$ g) ACTH 試験による評価では 25% の症例が下垂体-副腎皮質機能低下症と判定された。この結果は、250  $\mu$ g の大量刺激試験では ICS 治療に伴う軽微な副腎皮質

機能低下症(潜在型)を見落としてしまう可能性が高いことを示すものと考えられた。少量 ACTH 試験での副腎皮質機能低下症(潜在型)判定症例では腰椎骨密度・大腿骨頸部骨密度が低値傾向であったことより、ICS 治療が下垂体-副腎皮質機能抑制と骨密度低下を示す作用に関連を認めることが示唆された。ICS の血中濃度は極めて軽微であるが、血管内皮細胞において抗炎症作用を発揮する FP の濃度は DEX の 100 倍以上であり、標的細胞によっては、FP は DEX に比べて低用量で強い作用を示す GC 薬として位置付けられるかも知れない。

続発性副腎皮質機能低下症患者ではインスリン低血糖刺激に対するエピネフリン分泌低下を認めることが判明した。現在のところ、「副腎髓質機能低下症」の疾患概念は提唱されていないが、副腎皮質機能低下症患者における起立時のふらつきや低血圧、ショックなどの循環器系の症状の少なくとも一部は、副腎皮質機能低下症に合併した「副腎髓質機能低下」によるものであることを示唆する成績である。

## E. 結論

グルココルチコイドの作用発現は標的細胞により異なる。血管内皮細胞では GC 処理後の GR 発現量低下が、GC による GC 抵抗性獲得の分子機構を説明するものと考えられる。下垂体-副腎系や骨においては、微量の吸入ステロイド薬の影響も認められ、少量 ACTH 試験は吸入ステロイド薬の影響を判定するために有効である。さらに、続発性副腎皮質機能低下症患者では、インスリン低血糖に対する防御反応が低下しており、副腎皮質機能低下症でみられる症状の少なくとも一部は副腎髓質機能低下によるものと考えられた。

## F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

# アルドステロンによる MDM2 遺伝子を介するヒト血管平滑筋細胞の増殖とその臨床的意義に関する研究

笹野公伸

東北大学大学院病理学診断学分野

## A. 研究目的

アルドステロン(aldo)は、ミネラルコルチコイド受容体(MR)を介して直接心血管障害を引き起こす事が知られている。その機序の一つとして血管平滑筋細胞を増殖させ血管壁肥厚や血管のリモデリングを生じさせる事があげられている。一方原発性アルドステロン症(PA)患者の小血管では血管壁肥厚が顕著であり、比較的低濃度のaldoによる血管平滑筋増殖作用も想定されている。そこで今回、アルドステロンによって誘導される細胞増殖関連遺伝子を検索し、さらに生体でのその発現状態を検討した。

## B. 研究方法

### (1) 培養ヒト血管平滑筋細胞

ヒト大動脈由来の血管平滑筋細胞(HASMC)を用いた。その際、PCRやimmunoblottingにてMRおよび11 $\beta$ -HSD type 2の発現を確認した。

### (2) マイクロアレイ

培養ヒト血管平滑筋細胞でaldo(10nM)添加8時間後に誘導される細胞増殖関連の遺伝子をマイクロアレイ解析(Agilent)で網羅的に検索し、過去の文献上最も可能性が高いと思われる1つを標的遺伝子と決定した。

### (3) 定量RT-PCR

決定した標的遺伝子について、aldoによるその遺伝子発現を定量PCR(LightCycler)にて確認した。

### (4) Immunoblotting および免疫細胞化学的検索

標的遺伝子が蛋白レベルでも誘導されるか否かについて確認した。

### (5) small interfering RNA(siRNA) transfection による細胞増殖能解析

標的遺伝子をsiRNAで選択的に阻害し、それによるaldoでの細胞増殖誘導について検討した。

### (6) ヒト小血管での発現解析

標的遺伝子発現を実際のPA患者とaldo濃度が正常である高血圧患者の副腎腫瘍摘出

標本近傍の血管壁を用いて比較検討した。

(倫理面への配慮)

東北大学医学部倫理委員会の承認済(2001-014)。

## C. 研究結果

マイクロアレイ解析では、細胞増殖に関与すると考えられるMDM2がaldoで特異的に誘導された。その結果は定量RT-PCR、immunoblotting、免疫細胞染色でも確認された(図1)。更にMDM2に対してのsiRNAを用いた細胞増殖能解析で、MDM2がaldoによる平滑筋細胞増殖に特異的に関与することも示された。また免疫組織化学的には、MDM2はPA患者の小血管平滑筋でその発現が有意に亢進していた(図2)。一方、選択的MRブロックであるeplerenoneの投与により、そのmRNAおよび蛋白発現が培養細胞で有意に抑制された(図1)。

## D. 考察

Aldoは、心血管障害をもたらすステロイドホルモンとして近年注目されている。ヒト血管平滑筋細胞では、炎症や線維化に関する遺伝子の発現を誘導することが報告されている。また、アンギオテンシンIIの存在下で、平滑筋細胞の増殖能が亢進することも知られている。今回の検討では、aldo単独でMDM2の誘導が確認された。MDM2は、細胞増殖を促進することやアポトーシスを抑制することが知られており、またヒト動脈の動脈硬化巣での発現も報告されている。またsiRNAでの検討から、aldo単独による細胞増殖能も有る程度存在し、それにMDM2が関与している可能性が示唆された。今後は、MDM2が他の経路とどのように関与するかを検討する必要があるものと思われる。PA症で腫瘍切除後も高血圧が改善しない症例も知られているが、今回のヒト小動脈での検討からはMDM2がそれに関与している可能性も示唆された。また、eplerenoneがMDM2誘導を抑制することが確認されたが、過去の文献と同様aldoによる血

管障害抑制効果機序の1つとして重要であると考えられた。

## E. 評価

### (1) 達成度に関して

血管への副腎皮質ホルモンであるアルドステロンの直截作用を明らかにするという目的に対して、*in vitro* の検索を培養細胞を用いて行ないその成果を実際のアルドステロン産生異常症の患者の血管平滑筋において確認したという実験的知見を実際の臨床検体に応用して確認するというアプローチから十分に目的は達したものと判断される。

### (2) 研究成果の学術的／国際的／社会的意義に関して

ヒト血管への副腎皮質ホルモンであるアルドステロンの直截作用を分子レベルを含めて始めて明らかにしたこの研究報告は病理学の領域で国際的にもっとも高い評価を得ている *American Journal of Pathology* に発表されたように、非常に斬新で独創性の高い研究内容となっていて国際的にも高い評価を受けた。又現在高血圧患者の10%前後を占めるとも考えられておる原発性アルドステロン症の患者では血圧が高い事に加えて過剰なアルドステロンが直接作用として血管平滑筋の増殖を促進して種々の臓器障害が起きる現象をはじめて明らかにした。この事は原発性アルドステロン患者の治療方針において出来るだけ早期に病変を摘出する、あるいはアルドステロンの特異的阻害薬によりその作用を抑制させる必要性を明確に示しており社会的にも極めて大きな *impact* があるものと考えられる。

### (3) 今後の展望について

今回の検討でアルドステロンの血管平滑筋を増殖させる分子生物学的機構も含めてその機序が明らかにされた。アルドステロンは血管平滑筋以外にも中枢神経系、心筋などで広範な作用を有している事から、アルドステロン過剰症による傷害を受けるこれら組織、細胞における機序を今回と同様な方法で明らかに出来る可能性が高く、原発性アルドステロン症患者の病態の解明が益々進む事が期待される。

### (4) 研究内容の効率性について

培養細胞を用いた検討結果を原発性アルドステロン症を含む副腎皮質ホルモン異常症の患者の解析に応用した本研究の効率性

は極めて高かったものと考えられる。

## F. 結論

MDM2 は血管平滑筋細胞の *aldo* 応答遺伝子の1つであり、*aldo* による重要な心血管障害の一つである血管壁肥厚や血管のリモデリングに関与すると考えられた。加えて *eplerenone* は MDM2 を介した *aldo* の血管障害の抑制にも有効である可能性も示唆された。

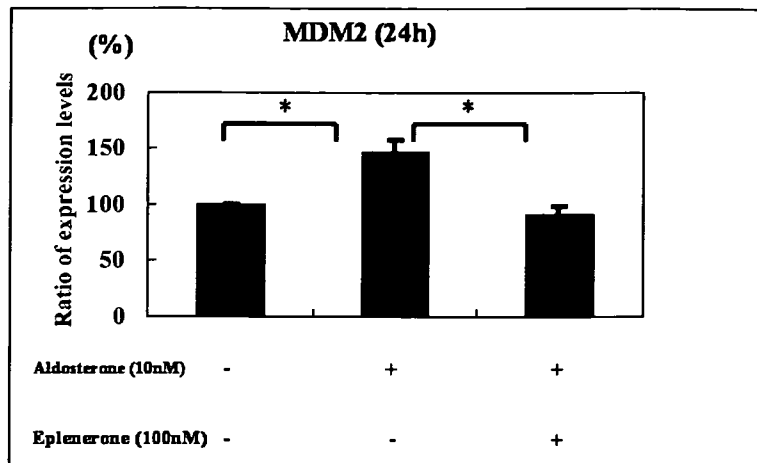


図1: aldosterone 10nM及び選択的MRブロッカーであるeplerenone 100nMを24時間ヒト大動脈由来の血管平滑筋細胞 (HASMC) に投与した時の標的遺伝子MDM2の発現の変化を定量RT-PCRで検討した結果。aldosterone 10nMの投与でMDM2遺伝子はその発現が有意に増加し、eplerenone 100nMの投与でこの発現亢進は有意に抑制される事が分かる。

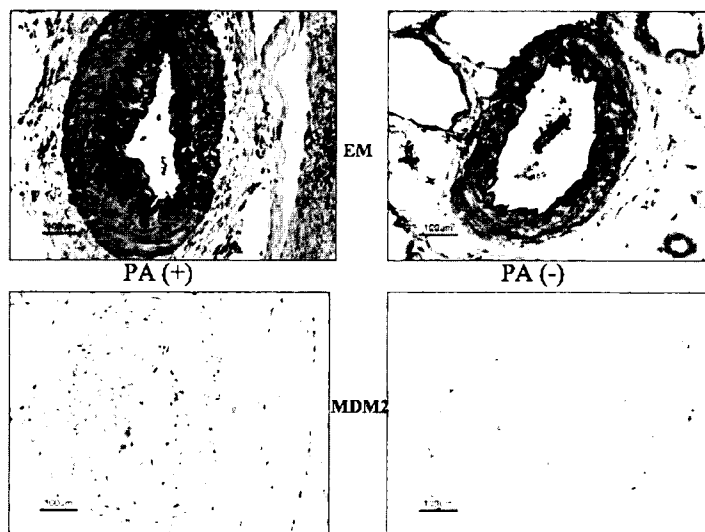


図2: Aldosteronoma周囲 (PA (+))及び高血圧を伴うが血液中のaldosterone濃度が正常な非機能性副腎皮質腺腫周囲 (PA (-)) のmedium sized arteryの血管壁平滑筋細胞でのaldosteroneの標的遺伝子であるMDM2の免疫組織化学を用いた発現動態の検討。両者とも血管平滑筋は肥厚が見られるがPA周囲の血管壁でMDM2の発現亢進が認められる。



# 原発性アルドステロン症の病態生理及び脂肪細胞における アルドステロンの役割に関する検討

武田仁勇、米田隆、織田展成、朱傲霜  
金沢大学大学院臓器機能制御学（第2内科）

## 【緒言】

- 1) 原発性アルドステロン症(PA)はアルドステロン(aldo)の過剰産生から起こるがその病態は未だ明らかではなく、PAはaldo産生腺腫(APA)と特発性aldo症に大別され、APAにおけるaldo分泌にはアンジオテンシンII(AngII)反応性と不応性があるが、その理由は明らかではない。APAにおける腫瘍内RASの病態生理学的役割を検討するために、1) APA組織における各RAS因子mRNAの発現を測定し、クッシング腺腫や非機能性副腎腺腫、正常副腎組織と比較検討した。2) APA組織におけるaldo分泌調節を検討するために、フロセミド立位試験にて血漿aldoの反応性を検討し、増加群(AngII反応群)と非増加群(AngII不応群)に分け、各組織におけるRAS及びステロイドホルモン分泌調節因子について検討した。
- 2) PAは10%-50%の割合で耐糖能異常(IGT)または糖尿病を合併することが明らかにされている。PAにおけるIGTの成因の一つに低カリウム(K)血症が上げられるが、低K血症はPA患者の約20%にしか認められないため、Kを介さないaldoの血糖調節に対する何らかの作用が想定される。我々は正K血症性PAにおいてスピロノラクトン(SP)を投与しその前後で糖代謝異常及びインスリン抵抗性を評価した。
- 3) PAにおけるIGTには内臓脂肪の関与が考えられるがaldo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った。

## 【研究方法】

- 1) 手術により診断が確定したAPA16例(血圧、 $165 \pm 6/100 \pm 3$  mmHg; 血清K、 $2.7 \pm 0.1$  mmol/L; p-aldo、 $958 \pm 106$  pmol/L; PRA、 $0.49 \pm 0.16$  ng/ml/hr)を対象とした。APA患者においてAngII刺激試験である

フロセミド80mg経口投与+2時間立位試験を施行しその前後でp-aldo, PRAを測定した。APA, Cushing症候群(CS), 非機能性腺腫(NF)及び正常副腎組織(AT)からRNAを抽出し、RAS因子であるレニン、アンジオテンシノーゲン(Antgen)、I型AngIIレセプター(AT1R)、II型AngIIレセプター(AT2R)及びaldo合成酵素遺伝子CYP11B2、コルチゾール合成酵素遺伝子CYP11B1の各mRNAをそれぞれ特異的なプライマーを作製し、Real time PCR法にて検討した。

- 2) 正K血症性PA患者25例(特発性アルドステロン症(IHA)21例、APA4例)を対象とした。Ca拮抗薬にて血圧のコントロールを計った後、SP25mgを3ヶ月投与しその前後で空腹時血糖(FBS)、インスリン(F-IRI), HOMA-Rを検討した。また75gブドウ糖負荷試験を行いΣBS, ΣIRIを計算した。なおPAの診断は高血圧症患者に対し降圧薬非服用下で血漿aldo(PAC)(pg/mL)/PRAを測定し200以上を示した症例にカプトプリル負荷及びフロセミド立位負荷試験を行い、厚労省の診断基準に従い診断した。
- 3) 肥満にて入院した患者皮下脂肪生検組織(n=6)及びウイスターラット(n=6)腎周囲脂肪組織からRNAを抽出し、ミネラルコルチコイドレセプター(MR)、グルココルチコイドレセプター(GR)、AT1R、21水酸化酵素遺伝子、CYP21, aldo合成酵素遺伝子CYP11B2、コルチゾール合成酵素遺伝子CYP11B1、及び11β-HSD1, 2の各メッセンジャーRNA(mRNA)をそれぞれ特異的なプライマーを作製し、Real time PCR法にて検討した<sup>6)</sup>対照として副腎非機能腺腫随伴副腎組織及びラット腎を用いて比較検討した。

## 【結果】

- 1) APAにおいてAngII刺激によりp-aldoの増加を示した群をAngII反応群(AT-R),

不変または減少した群を Ang II 非反応群 (AT-NR)とした。Table 1 に AT-R 群と AT-NR 群の臨床データを示す。APA, CS, NF, AT において各 RAS 因子 mRNA, CYP11B1 の発現には差を認めなかったが、CYP11B2 mRNA は APA に老いて有意に高値であった ( $p < 0.05$ )。Fig. 1 に 2 群間の AT1R, AT2R mRNA の発現の結果を示す。AT1R mRNA は 2 群間で有意の差を認めなかったが、AT2R mRNA は AT-R 群で有意に高値を示した ( $p < 0.05$ )。

- 2) Table 2 に年齢、血圧、血清 K 値、腎機能、PAC、PRA、空腹時血糖、IRI, HbA1c、HOMA-R の結果を示す。年齢、HOMA-R は IHA で高値であり、PAC は APA で高値であった。SP 投与前後で血圧、血清 K 値に有意の変動を認めなかった。空腹時血糖は SP 投与前後で差がなかったが、IRI 及び HOMA-R は SP 投与により有意に低下した (Fig. 2) ( $p < 0.05$ )。75g プトウ糖負荷試験時の  $\Sigma$ BS,  $\Sigma$ IRI の結果を Fig. 2 に示す。SP 投与により両指標が有意に低下した ( $p < 0.05$ )
- 3) Fig.3 にヒト脂肪組織における MRmRNA の発現を示す。副腎に比して約 5 倍の発現高値であった。ラット脂肪組織における GRmRNA 発現量は腎臓に比して多かったが、MRmRNA は腎と同程度の発現を認めた。ヒト脂肪組織における CYP21mRNA 及びラット脂肪組織における CYP11B1, B2 mRNA 発現量に関し、副腎に比して発現量は少ないが、脂肪組織における aldo の産生の可能性が示唆された。

#### 【考案】

- 1) 今回我々の検討では Ang II 反応性の APA も半数に見られた。正常副腎では Ang II の作用は AT1R を介して行われる事が、培養実験などで明らかにされているが(1)、AT2R も心、血管系に比べると副腎ではその発現量が多く、何らかの生理学的役割を果たしていることが考えられる。事実 AT1R ノックアウトマウスでは、aldo の分泌異常は観察されず(2)、AT1R 以外のレセプターが Ang II による刺激を介在している可能性が考えられるが、未だ明らかではない。今回我々の成績では Ang II 反応性 APA では AT2R mRNA の発現が増加しており、AT2R を介する aldo の過剰分泌が想定された。しかし、AT2R 以降のシグナル

など不明な点が多くさらなる検討が必要である。

- 2) 今回の検討で PA において血圧及び K を介さない aldo の糖代謝に対する作用が臨床的に明らかにされた。Campion ら(3)は aldo が脂肪細胞のインスリンレセプターに作用し、遺伝子発現を抑制し、インスリンとの結合能力を低下させたと報告している。aldo は K を介して膵臓からのインスリン分泌に関与していることも考えられるが、PA 患者においてカリウムを補充することによりインスリン抵抗性が改善されるかあきらかではない。Aldo が膵臓や肝臓、骨格筋組織においても線維化を促進しインスリン抵抗性や耐糖能異常を引き起こしている可能性が考えられる。臨床的にも PA において aldo と膵  $\beta$  細胞機能が負の相関を示したという報告(4)がなされている。PA では耐糖能異常だけでなく脂質代謝異常や内臓脂肪増加などメタボリックシンドロームの合併も多いことが Fallo ら(5)により報告され、脂肪組織における aldo の作用も重要であると考えられる。我々は脂肪組織にはミネラルコルチコイドレセプターが存在することを前年の班会議で報告した。Kraus ら(6)は aldo は脂肪細胞において uncoupling protein-1 を抑制しインスリンによる糖の取り込みを抑制したと報告している。また Hitomi ら(7)は、平滑筋細胞を用いた検討であるが、aldo により insulin receptor substrate-1 が抑制的に調節され、インスリンによる糖の取り込みが抑制されたと報告している。Aldo の心血管組織における臓器傷害は確立された概念であるが、臓器に対する直接作用以外に aldo の脂肪組織からのアディポサイトカインの分泌やインスリン抵抗性なども関与していることが考えられる。
- 3) 今回の実験結果から脂肪組織において MR mRNA が腎と同程度に発現していたことは、脂肪組織において aldo が病態生理学的に重要な役割を果たしていることが強く示唆される。副腎に比して発現量は弱い、aldo に到るまでステロイド合成酵素遺伝子が存在していたことは、ステロイドホルモンのパラクリン、オートクリンの作用も示唆される。

#### 【結語】

- 1) APA における aldo 分泌には副腎内 RAS

の関与は少ないものと考えられた。しかし APA における aldo 産生過剰の機序に一部 AT2R が関与している可能性が示唆された。

- 2) PA においてカリウム及び血圧を介さない IGT の存在が示唆された。アルドステロンの脂肪細胞における直接作用が想定される。
- 3) 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が明らかになった。脂肪組織におけるミネラルコルチコイド受容体の強い発現はアルドステロンの脂肪細胞に対する直接作用が想定される。

#### 【文献】

- 1) Takeda Y, Usukura M, Yoneda T et al: The expression of messenger RNA for ADP-ribosyl cyclase in aldosterone-producing adenomas. (2005) Clin Endocrinol 62, 504-508.
- 2) Chen X, Li W, Yoshida H, et al. Targeting deletion of angiotensin 1B receptor gene in the mouse. (1997) Am J Physiol 272, F299-F304.
- 3) Campión B, Maestro S, Molero N et al. Aldosterone impairs insulin responsiveness in U-937 human promonocytic cells via the downregulation of its own receptor. Cell Biochem Funct.20: 237-245, 2002.
- 4) Mosso LM, Carvajal CA, Maiz A et al. A possible association between primary aldosteronism and a lower  $\beta$ -cell function. J Hypertens 25: 2125-2130, 2007
- 5) Fallo F, Veglio F, Bertello C et al. Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in primary aldosteronism. J Clin Endocrinol Metab 91: 454-459, 2006.
- 6) Kraus D, Jäger J, Meier B et al. Aldosterone Inhibits Uncoupling Protein-1, Induces Insulin Resistance, and Stimulates Proinflammatory Adipokines in Adipocytes. Horm Metab Res 37:455-459, 2005.
- 7) Hitomi H, Kiyomoto H, Nishiyama A et al. Aldosterone suppresses insulin signaling via the downregulation of insulin receptor substrate-1 in vascular smooth muscle cells. Hypertension. 50:750-5. 2007.

Table 1. The clinical and hormonal data of AII-R APA and AII-U APA

	AII-R APA (n=8)	AII-U APA (n=8)
Age (yr)	45.1 ± 4.5	46.8 ± 4.5
Male / Female	3 / 5	3 / 5
Systolic BP (mmHg)	164.0 ± 9.7	167.0 ± 8.2
Diastole BP (mmHg)	99.5 ± 4.3	101.6 ± 4.4
s-K (mmol/L)	2.8 ± 0.1	2.6 ± 0.3
PRA (ng/ml/hr)	0.65 ± 0.30	0.30 ± 0.05
PAC (pmol/ml)	1041.2 ± 183.4	875.0 ± 108.9

Data are the mean ± SEM. AII-R APA, Angiotensin II responsible aldosterone producing adenoma; AII-U APA, Angiotensin II unresponsive aldosterone producing adenoma; BP, blood-pressure; s-K, serum potassium; PRA, plasma renin activity; PAC plasma aldosterone concentration

Table 2. Clinical characteristics of patients with APA and IHA

	ALL	APA	IHA
No (men/women)	25(11/14)	4(1/3)	21(10/11)
Age (y)	59 ± 10	45 ± 9	63 ± 10 *
Systolic BP (mmHg)	126 ± 6	134 ± 5	124 ± 4
Diastolic BP (mmHg)	83 ± 8	83 ± 8	70 ± 8*
s-K (mEq/L)	4.1 ± 0.3	4.1 ± 0.4	4.2 ± 0.3
BUN (mg/dL)	16 ± 2.8	16 ± 2.1	17 ± 2.7
s-Cr (mg/dL)	0.8 ± 0.7	0.8 ± 0.3	0.9 ± 0.3
PAC (pg/mL)	143 ± 20	169 ± 18	139 ± 18*
PRA (ng/mL·h)	<0.2	<0.2	<0.2
FPG (mg/dL)	109 ± 14	109 ± 11	110 ± 9
F-IRI (m U/L)	9.2 ± 3.5	6.8 ± 2.2	10.0 ± 3.5
HbA1C (%)	5.9 ± 0.8	6.0 ± 0.5	5.9 ± 0.7
HOMA-R	2.8 ± 1.0	2.2 ± 0.4	2.9 ± 1.0*

All values are mean ±SD. APA, aldosterone-producing adenoma; IHA, idiopathic hyperaldosteronism; BP, blood pressure; s-K, serum potassium; s-Cr, serum creatinine; PAC, plasma aldosterone concentration; PRA, plasma renin activity; FPG, fasting plasma glucose; \*:p<0.05 vs APA.

# アルドステロンの血管内皮細胞への影響について ～特に HDL 受容体を介した一酸化窒素産生への作用～

村尾孝児、井町仁美、村岡都美江、石田俊彦  
香川大学医学部内分泌代謝・血液・免疫・呼吸器内科

## A. 研究の目的

我々はマウス SR-BI 相同遺伝子である CLA-1 がヒト HDL 受容体であり、副腎で強く発現されていることを報告してきた。一方、SR-BI/CLA-1 は血管内皮細胞に発現され、血管弛緩因子 (NO) の産生を調節することが報告されている。今回の研究目的は、アルドステロンによる HDL 受容体依存性 NO 産生への影響について検討する。

## B. 研究方法

SR-BI/CLA-1 の promoter を挿入した luciferase reporter gene を構築した。ヒト血管内皮細胞は既報の方法にて作製し培養した。SR-BI/CLA-1 の蛋白, mRNA は既報の Western blot および Real-time PCR 法にて定量した。NOS の活性は既報の automated NO detector-high-performance liquid chromatography system (ENO-20, Eicom Co, Ltd., Kyoto, Japan)にて測定した。アルドステロンによる刺激方法に関しては、アルドステロンの濃度依存性、および6時間のパルス状の刺激をおこなった。原発性アルドステロン症における NO 産生に関しては、手術前後においてプレチスモグラフィにて計測した。

(倫理面への配慮)

本実験に関与する人権の保護に関しては、香川大学倫理委員会へ申請をおこない承諾をえた。また患者さんには、インフォームドコンセントをおこない、承諾書をえた。さらに個人情報保護法の観点から、患者個人情報に関しては、厳密に保存し、情報が漏洩することがないように遵守する。

## C. 研究結果

原発性アルドステロン症の手術前における NO 産生 (血管弛緩反応) は低下していた。

手術後、アルドステロン濃度の低下により、NO 産生能は回復した (図 1)。In vitro において、血管内皮細胞にアルドステロンを添加することにより、HDL 依存性 NO 産生が低下した。血管内皮細胞における SR-BI/CLA-1 の発現低下は細胞内情報伝達系 PI3-K/Akt/FoxO1 を介するものであった。

## D. 考察

原発性アルドステロン症において高血圧だけでなく動脈硬化性疾患の発症および合併が高頻度有ることが指摘されている。我々の検討では、アルドステロンは、血管内皮細胞における SR-BI/CLA-1 の発現を抑制し、HDL により誘導される NOS の活性を抑制することを明らかにした。またこの作用は、細胞内情報伝達系 PI3-K/Akt/FoxO1 の経路を介することも明らかにした。過剰に存在するアルドステロンは血管内皮細胞における SR-BI/CLA-1 発現を抑制し、eNOS の活性を抑制する可能性が示唆された。

## E. 結論

ヒト HDL 受容体 hSR-BI/CLA-1 は血管内皮細胞に発現して発現しており、HDL による内皮型 NOS の活性化に重要な役割を演じている。アルドステロンは、血管内皮細胞の hSR-BI/CLA-1 発現を抑制し、NO 産生を抑制する可能性が示唆され、高血圧、動脈硬化に重要な役割を演じることが推定された。

## F. 知的所有権の所得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

図 1 : ストレンゲージプレチスモグラフによる原発性アルドステロン症患者における NO 産生能について

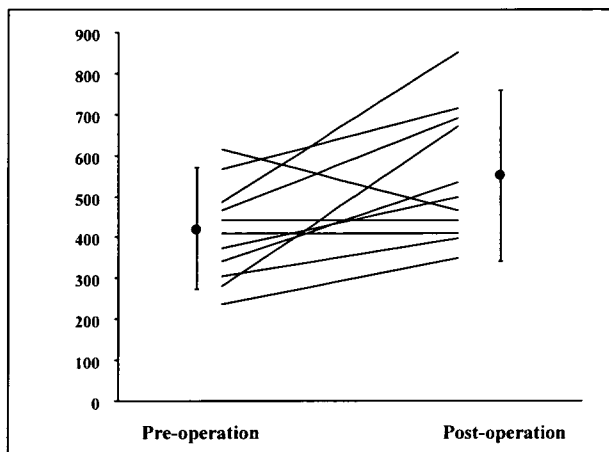
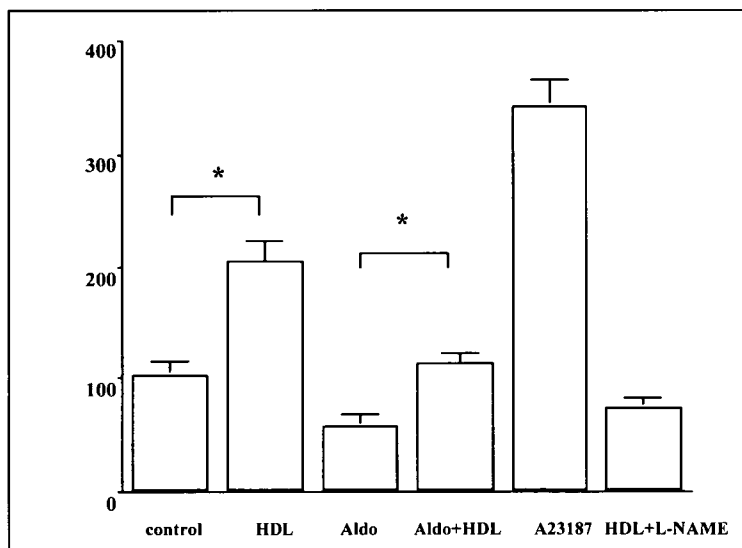


図 2 : CLA-1 を介する HDL による NOS 活性化へのアルドステロンの影響



# アルドステロンの血管障害の発生機構についての研究

宮森 勇、藤井美紀、居軒 功、稲葉 聡  
福井大学医学部第3内科

## 研究目的

アルドステロンの血管障害の発生機構を明らかにする目的で培養血管細胞を用いて研究を行なった。17年度は不全心の心筋細胞を用いMRの発現を蛋白および遺伝子発現レベルで解析しアルドステロン作用の増強に標的組織におけるMRの発現亢進が関与する可能性を検討した。平成18年度はアルドステロンの酸化ストレス誘導作用を明らかにする目的でNADPHオキシダーゼ構成分子であるNOX1発現誘導を介して心血管障害を促進する可能性を検討した。

## 方法

### 1) 心筋細胞におけるアルドステロン受容体の検出

アルドステロンの特異抗体であるP10Eを用いて免疫染色を行い不全心筋と対照心筋とで比較した。細胞質内の染色性と間質の染色性をCSIR(細胞質間質染色濃度比)として定量的に評価した。MR受容体の遺伝子発現はin situ hybridizationによって確認した。

### 2) 酸化ストレスの評価

培養平滑筋細胞にアルドステロンを添加し細胞内活性酸素( $O_2^-$ )の測定とDHE染色を行い酸化ストレス反応を調べた。平滑筋細胞の肥大は標識phenylalanineの取り込みで評価した。同様の実験を高食塩下およびNOX1mRNAノックダウン細胞において検討した。

### 3) アルドステロンの管腔形成能

EGM-2MV培地で培養したHUVEC(Lonza社製)を0.1%BSA含有MCDB131培地で24時間処理した後、アルドステロン( $10^{-9}$ ~ $10^{-7}$ M)またはアルドステロン $10^{-8}$ M+エプレレノン $10^{-5}$ Mを添加し一晩培養した。マトリゲルをゲル化させておいた24wellプレートにHUVECsを $5 \times 10^4$ 個の濃度で播き、VEGF 20ng/mlの存在下、非存在下で培養し、4時間後に形成された管腔を撮影し、管腔長を比較した。

## 結果と考察

- 1) アルドステロンの血中濃度のみならず受容体レベルの発現異常がアルドステロン症の病態形成に関与する可能性が示された。
- 2) 高食塩下においてアルドステロンはNADPHオキシダーゼ系の構成蛋白分子であるNOX1の発現を特異的に刺激した。アルドステロンと高食塩は標識phenylalanineの細胞内取り込みを有意に増加した。これらの作用は抗アルドステロン薬や抗酸化剤で有意に抑制された。Nox1mRNAをノックダウンした細胞ではアルドステロン作用は減弱していた。アルドステロンはNOX1発現誘導を介して細胞障害をきたすと考えられる。
- 3) アルドステロンは血管新生に対して抑制的に作用することが細胞レベルで明らかとなり、アルドステロン過剰状態における虚血の一因と想定された。

## 結論

本研究によりアルドステロン過剰は心血管細胞に対して酸化ストレスを誘導し細胞渉外的に作用することが明らかになった。またこの様な状態が慢性的に経過することにより受容体の発現亢進を来し、さらにアルドステロン作用が増強することが示された(悪循環)。特に今回の成績は食塩過剰の生活環境を改善しアルドステロン作用を効果的に抑制することが心血管障害の防止に有効な手段となることを示唆する。



# 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

中村恵美、笹野公伸  
東北大学大学院病理学診断学分野

## A. 研究目的

副腎皮質癌は副腎皮質から発生する上皮性悪性腫瘍であり、発症頻度は0.5～2人と頻度の低い腫瘍である。好発年齢は二峰性を示し、1歳から10歳の小児期にも1つのピークが認められる。小児の副腎皮質癌では、その80%から95%が機能性腫瘍であると報告されているが、症状が緩慢に出現してきた場合や、非機能性腫瘍である場合は診断までに時間を要し、進行した状態で発見される症例も見られ治療に難渋する。副腎皮質癌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、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。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。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。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。現在では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。

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、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。

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1976年から2007年の期間に切除された副腎皮質癌(ACC)41例と、1987年から2007年の期間に切除された副腎皮質腺腫(ACA)54例を対象とした(Table. 2)。

今回検討した標的因子(Fig. 1)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, p-mTOR (mammalian target of Rapamycin), p-p70S6K (p70 S6 kinase), p-S6RP (S6 ribosomal protein), p-4EBP (4E binding protein) 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いずれ汎用性の高い 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. 2)

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 2.44) の方が、副腎皮質腺腫 (平均値 1.43) よりも有意に高発現であった ( $p=0.002$ )。

VEGFA およびその受容体である VEGFR2 は副腎皮質癌 (平均値 2.05、0.39) と副腎皮質腺腫 (平均値 2.15、0.57) で差は認められな

かった。

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 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. 4) を行ったが、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™) は有望視され、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。

VEGFA、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。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期待されたが、今回の結果では、VEGF を標的とした薬剤である Bevacizumab (Avastin®) による標的治療の有効性は低いと考えられた。

他の分子については、副腎皮質癌と副腎皮質腺腫で発現に差は認められず、副腎腫瘍において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、乳癌では Trastuzumab (Herceptin®) 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 の発現に差は認められず、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、高発現となった EGFR 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. 4) を行ったが、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. 図の説明

(Fig. 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. 2) 免疫組織化学 (40x): (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。

## F. 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 (Erbiximab) 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。

## G. 研究評価

### 1. 研究の達成度

難治性の悪性腫瘍である副腎皮質癌に対しての効果的な治療の第一歩として現在他の悪性腫瘍で臨床的効果が上がっている標的治療薬が効果があるかどうかを検討する目的の第一歩としてこれらの薬剤の特異的治療標的が腫瘍細胞で発現しているかどうかをある程度の症例数の副腎皮質癌症例を用いて良性の副腎皮質腺腫を対照にして汎用性の高い免疫組織化学で検討するという当初の研究目的は達せられたと考えられる。

### 2. 研究成果の学術的/国際的/社会的意義

難治性の副腎皮質癌に対して系統的に標的治療の特異的 targets を検討した報告は国際的にもほとんど報告されてはおらず、独創的な研究内容と考えられる。又副腎皮質癌患者はミトタンや化学療法を含めた抗がん剤治療、放射線照射にも抵抗性を示す場合には替わりうる治療法が事実上ない訳であり、この点からもある種の標的治療薬の効果の可能性を示した本研究はこれらの患者に対してもある種の pathways を示した事になり社会的意義も極めて大きいと判断される。

### 3. 今後の展望について

今回の検討で現在の標的治療薬の特異的標的の中では EGFR の発現が癌で特異的に高い事が始めて示された。この事は本邦でも来春には臨床現場で使用が可能となる可能性が高い EGFR の特異的抗体療法を試みる価値がある可能性を示すものであり、今後の臨床応用が期待される。

#### 4. 研究内容の効率性

極めて稀ではあるがその生物学的悪性度が極めて高い悪性腫瘍である副腎皮質癌症例を40例以上対象として、汎用性が高い免疫組織化学で現時点で検索が可能な治療標的を検討した今回の研究は効率性が高いものと判断される。

#### H. 知的所有権の出願、取得状況

- 1) 特許取得  
特になし
- 2) 実用新案登録  
特になし
- 3) その他  
特になし