

200834024A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

副腎ホルモン産生異常に関する調査研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤 枝 憲 二

平成21年3月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

副腎ホルモン産生異常に関する調査研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤 枝 憲 二

平成 21 年 3 月

目次

I. 序文	1
II. 研究班構成員名簿	2
III. 総括研究報告書	3
研究代表者 旭川医科大学小児科	藤枝憲二
IV. 分担研究報告書	
(1) 先天性副腎酵素異常症の生化学・遺伝子診断システムの構築と病態の解明	
1. AGA (appropriate for gestational age) および SGA (small for gestational age) の新生児早期副腎ステロイド分泌—在胎週数別評価—	9
慶應義塾大学医学部小児科	長谷川奉延、三輪雅之、池田一成
慶應義塾大学病院中央臨床検査部	本間桂子
慶應義塾大学医学部臨床検査医学	小山雄平
2. 非古典的先天性副腎リポイド過形成症の遺伝学的、内分泌学的検討	16
国立成育医療センター小児思春期発育研究部成長障害研究室	勝又規行
3. 先天性副腎低形成症の成因の解析	20
北海道大学大学院医学研究科生殖発達医学講座小児科学分野	田島敏広
(2) 副腎の発生・分化機構の解明	
4. 副腎皮質の発生初期過程に関する研究	22
九州大学大学院医学研究院分子生命科学系	諸橋憲一郎
5. ヒト副腎網状層の発育についての形態学および免疫組織学的検討	25
東北大学大学院医学系研究科医科学専攻病理病態学講座病理診断学分野	赤平純一、笹野公伸

6. Yeast two-hybrid system を用いた DAX-1 相互作用因子同定の試み	31
旭川医科大学小児科	
藤枝憲二、向井徳男、鈴木 滋、中村英記	
(3) 副腎再生による新しい副腎不全治療法の開発	
7. Ad4BP/SF-1 遺伝子のメチル化制御	34
九州大学大学院医学研究院病態制御内科学	
柳瀬敏彦、田中智子、白水久男、名和田新、高柳涼一	
8. ステロイド産生細胞の分化再生に関する研究	41
福井大学医学部分子生体情報学	
	宮本 薫
(4) 原発性アルドステロン症 (PA) の診断基準の策定と治療法の検討	
9. 超選択的 ACTH 負荷副腎静脈採血による副腎皮質疾患診断の試み	44
横浜労災病院健康診断部	
	大村昌夫
東京北社会保健病院放射線科	
	牧田幸三
横浜労災病院内分泌代謝内科	
	西川哲男
10. 横浜と東京での二次性高血圧頻度調査とスクリーニング法の比較検討	50
横浜労災病院健康診断部	
	大村昌夫
社会保険中央総合病院内科・糖尿病内分泌科	
	齊藤寿一
横浜労災病院内分泌代謝内科	
	西川哲男
11. 原発性アルドステロン症の全国調査と肥満合併アルドステロン患者の検討	56
京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科	
	田村尚久
12. 原発性アルドステロン症における副腎静脈サンプリング時の コルチゾール迅速測定の有用性	64
金沢大学大学院臓器機能制御学(内分泌代謝内科)	
	武田仁勇、米田 隆、唐島成宙

13. 原発性アルドステロン症のスクリーニング法の検討: アルドステロン/レニン比高値の正常血圧者における分布	68
慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科	
	柴田洋孝
14. 副腎腫瘍悪性度診断における PET/CT の有用性と問題点 —副腎ホルモン産生腫瘍における 18F-FDG SUVmax の調査研究—	75
東北大学病院腎高血圧内分泌科	
佐藤文俊、森本 玲、工藤正孝、村上 治、伊藤貞嘉 東北大学病院*放射線部、**泌尿器科、***病理部	
高橋昭喜*、荒井陽一**、笹野公伸***	
15. アルドステロン産生腺腫における トロンボスポンジン発現の検討	79
福井大学医学部病態制御医学講座内科学(3)	
	宮森 勇
(5)ステロイド作用に関わる受容体とその異常の解析	
16. ステロイドホルモンレセプターの転写制御メカニズムの解明に関する研究 ..	84
東京大学分子細胞生物学研究所	
	加藤茂明
17. グルココルチコイド作用調節機構に関する研究 ～組織特異的グルココルチコイド応答性遺伝子発現と HEXIM1	91
東京大学医科学研究所先端医療研究センター	
	田中廣壽、清水宣明
東京大学医科学研究所附属病院	
	吉川賢忠
(6)副腎癌の診断・治療法の検討	
18. 本邦における副腎癌の疫学的検討	98
東邦大学医学部内科学糖尿病・代謝・内分泌科	
	上芝 元、一城貴政
旭川医科大学小児科	
	藤枝憲二、鈴木 滋、向井徳男
V. 会議記録	
平成 20 年度研究報告会プログラム	102
VI. 研究成果の刊行に関する一覧表	117

I. 序 文

I. 序文

厚生労働科学研究費補助金による難治性疾患克服研究事業「副腎ホルモン産生異常に関する調査研究」班の研究代表者として平成17年度から平成19年度までの第1期3年間が無事終了いたしました。さらに本年平成20年度より3年間の予定で本研究班の研究代表者を担当し、研究を継続させていただくこととなりました。

原発性アルドステロン症、副腎低形成症(アジソン病)、グルココルチコイド抵抗症、副腎酵素欠損症、偽性低アルドステロン症を主要対象疾患として副腎ホルモン産生異常に関連する病態を明らかにし、それに基づいた診断法および治療法を開発することを研究目標としております。これまでの3年間の研究成果を基に、新たに研究班を組織し、副腎ホルモン産生異常症の全国疫学調査を実施するとともに前期に引き続いて以下の項目に重点を注いだ研究を16名の研究分担者の方々とともに進めております。

- (1) 先天性副腎酵素異常症の生化学・遺伝子診断システムの構築と病態の解明
- (2) 副腎の発生・分化機構の解明
- (3) 副腎再生による新しい副腎不全治療法の開発
- (4) 原発性アルドステロン症(PA)の診断基準の策定と治療法の検討
- (5) ステロイド作用に関わる受容体とその異常の解析
- (6) 副腎癌の診断・治療法の検討

平成20年度研究報告会を平成20年12月12日(金)に東京で開催し、初年度にもかかわらず多くの成果があげられました。

新たにスタートさせていただいた本研究班の研究目標に向かってご尽力いただきました研究分担者の方々に心から感謝申し上げますとともに、多くのご助言を賜りました厚生労働省健康局疾病対策課難病調査係の方々に厚く御礼申し上げます。

平成21年3月

「副腎ホルモン産生異常に関する調査研究」班
研究代表者 藤 枝 憲 二

II. 研究班構成員名簿

II. 「副腎ホルモン産生異常に関する調査研究」班

構成員名簿

区分	氏名	所属等	職名
研究代表者	藤枝 憲二	旭川医科大学小児科	教授
研究分担者	諸橋 憲一郎	九州大学大学院医学研究院分子生命科学系機能高分子設計学	教授
	宮本 薫	福井大学医学部生命情報医学講座分子生体情報学	教授
	柳瀬 敏彦	九州大学大学院医学研究院病態制御内科学	准教授
	長谷川 奉延	慶應義塾大学医学部小児科	准教授
	田島 敏広	北海道大学大学院医学研究科小児科学	講師
	勝又 規行	国立成育医療センター研究所小児思春期発育研究部成長障害研究室	室長
	加藤 茂明	東京大学分子細胞生物学研究所核内情報研究分野	教授
	田中 廣壽	東京大学医科学研究所先端医療研究センター免疫病態分野	准教授
	西川 哲男	横浜労災病院内分泌代謝内科	副院長
	柴田 洋孝	慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科	講師
	笹野 公伸	東北大学大学院医学系研究科病理診断学	教授
	宮森 勇	福井大学医学部病態制御医学講座内科学(3)	教授
	武田 仁勇	金沢大学大学院医学系研究科臓器機能制御学	准教授
	上芝 元	東邦大学医学部内科学糖尿病代謝内分泌科	講師
	田村 尚久	京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科	講師
佐藤 文俊	東北大学病院腎高血圧内分泌科	助教	
事務局担当	向井 徳男	旭川医科大学小児科 〒078-8510 旭川市緑が丘東2条1丁目1-1 TEL: 0166-68-2481 FAX: 0166-68-2489	助教
経理事務 担当	高橋 秀吉	旭川医科大学総務部会計課出納係 〒078-8510 旭川市緑が丘東2条1丁目1-1 TEL: 0166-68-2154 FAX: 0166-66-1300	係長

III. 総括研究報告書

III. 副腎ホルモン産生異常に関する調査研究

総括研究報告

研究代表者：藤枝 憲二

旭川医科大学小児科

1. 研究目的

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業として「副腎ホルモン産生異常に関する調査研究」班の継続が本年度より認められた。当研究班は副腎の発生・分化、ステロイドホルモン産生、ステロイドホルモン作用に異常を呈する疾患を対象に病因・病態の解明、新しい診断法・治療法の開発、さらには疾患の実態調査を行い、診療ガイドラインを作成することを目標として研究を行っている。

- (1) 先天性副腎酵素異常症の生化学・遺伝子診断システムの構築と病態の解明
- (2) 副腎の発生・分化機構の解明
- (3) 副腎再生による新しい副腎不全治療法の開発
- (4) 原発性アルドステロン症 (PA) の診断基準の策定と治療法の検討
- (5) ステロイド作用に関わる受容体とその異常の解析
- (6) 副腎癌の診断・治療法の検討
- (7) 副腎ホルモン産生異常症の全国疫学調査

2. 研究成果

- (1) 先天性副腎酵素異常症の生化学・遺伝子診断システムの構築と病態の解明

・新生児における尿中ステロイドプロフィールの在胎週数別基準範囲の設定と SGA (small for gestational age) 児と AGA (appropriate for gestational age) 児の新生児早期の副腎皮質機能の特徴を明らかにするために、内分泌学的異常がなく、母児へのステロイド投与

歴のない、生後 3-5 日に採尿した院内出生児 1598 例 (男 811/女 787、AGA 1475/SGA 123) を対象に GCMS により cortisol 代謝物 17 種、aldosterone 代謝物 1 種、胎生皮質ステロイド代謝物 9 種を測定し、SGA と AGA の比較を行った。結果として、1) SGA の cortisol 分泌は早産において AGA より低分泌、正産においてほぼ同等であったことから、SGA における束状層の成長・成熟は、子宮内発育遅延の影響を受け、早産では AGA より低下傾向を示し、正産であれば、catch up できると推測された。2) SGA の aldosterone 分泌は、早産・正産いずれにおいても AGA とほぼ同等であったことから、SGA の球状層の成長・成熟は、少なくとも在胎 35 週以上であれば、子宮内発育遅延の影響はない、と推測された。3) SGA の pregnenolone 分泌は、早産、正産いずれにおいても AGA より低分泌であったことから、SGA の胎生皮質の成長・成熟は、子宮内発育遅延の影響を受け、著明に低下していることが示唆された。以上より SGA における新生児早期副腎皮質機能は、束状層では、早産において AGA より低分泌、球状層では、早産・正産ともに AGA と同等、胎生皮質では、早産・正産ともに AGA より低分泌であることが示された。これにより先天性副腎酵素異常症診断に有用な情報を提供した。(長谷川)

・先天性リポイド過形成症には古典型とともに非古典型が存在することが示唆されているが、その病因の差異については明らかとなっていない。そこで、非古典型先天性副腎リポ

イド過形成症の男子において、STAR 遺伝子解析と性腺機能の検討を行った。対象は同胞発症の2例を含む先天性副腎機能低下症の男子4例。STAR 遺伝子の各エクソンをPCR法で増幅し、PCR産物の塩基配列を直接シーケンス法で決定した。性腺機能については臨床情報を後方視的に解析した。同胞2例はR188C変異とQ258X変異の複合ヘテロ接合体、他の2例はQ258X変異と新規のR272C変異の複合ヘテロ接合体であり、STAR変異による先天性副腎リポイド過形成症の表現型は残存活性の高いアレルに依存すると考えられた。思春期年齢に達している3例すべてで、自然に二次性徴が発来し、進行することを確認した。成人に達した2例で精液検査を行い、造精能の獲得を確認した。以上よりSTAR変異による先天性副腎リポイド過形成症の表現型は残存活性の高いアレルに依存し、非古典型先天性副腎リポイド過形成症の男子では、二次性徴が自然に発来、進行し、造精能を獲得することを明らかにし、先天性リポイド過形成症における遺伝子診断の重要性を示した。(勝又)

・常染色体劣性副腎低形成症の新たな成因为マウスで同定され、ヒトホモログであるACD遺伝子も決定された。そこでACD遺伝子がヒト先天性副腎低形成疾患の成因になりえるか否かについて、患者4例(1同胞例)でヒトACD遺伝子を解析し検討した。その結果ACD遺伝子には変異等を同定できなかった。acdマウスは副腎低形成、性腺低形成を示す。その出生体重は小さく、成長障害を示す。その責任遺伝子のヒトホモログのACD遺伝子も同定されたが、その遺伝子産物はテロメアの構造に必要なPIP1蛋白であった。テロメアの異常による代表的疾患はDyskeratosis congenitalであり、その臨床症状としては、古典的に皮膚の色素沈着、舌病変、骨髄形成不全がある。さらに子宮内発育不全、低身長、性腺形成不全、難聴などが知られている。今回の解析対象は副腎低形成以外にも子宮内発

育不全、成長障害など様々な症状を呈しており、テロメア異常疾患との関連も考えられる。これらがACD遺伝子の異常によるものかさらに検討が必要であるが、ヒトACD遺伝子が副腎低形成を起こす可能性は低いと考えられた。(田島)

(2) 副腎の発生・分化機構の解明

副腎の発生・分化機構に関する研究として以下の3研究を行った。

・転写因子Ad4BP/SF-1は副腎皮質のステロイドホルモン産生能を制御し、同時に副腎皮質の形成過程で重要な役割を担っている。このAd4BP/SF-1遺伝子の胎仔副腎エンハンサーを用い、Ad4BP/SF-1を胎仔副腎で強制的に発現するトランスジェニックマウスを作成し、胎仔副腎皮質の表現型を調べることで、Ad4BP/SF-1の発現量(遺伝子量)と副腎の大きさについて検討した。その結果、このマウスでは本来の副腎より頭部側の腹腔内に、本来の副腎以外に新たな副腎皮質が形成された。従って、胎仔副腎ではAd4BP/SF-1の発現量(遺伝子量)が胎仔副腎皮質を構成する細胞数を決定する因子であることが示された。(諸橋)

・adrenarcheはヒトにのみ特徴的に認められる現象であるが、生後から成人早期までの間における、adrenarche前後の副腎網状層(ZR)の形態変化は未だ解明されていない。ZRの形態学および免疫組織学的変化と年齢の関係を検討することで、ZRのadrenarcheにおける役割を解明しよう。東北大学病院および仙台医療センターにて解剖された計252例(1990-2007年)から適格例44例を選び、副腎皮質全層およびZRの厚さを年齢(0-3, 4-12, 13-20)により3群にわけて形態学的に計測し、3bHSDによる免疫染色とともに評価した。また、Ki67、Bcl2および17bHSD5による免疫染色も施行した。その結果、免疫組織学および形態学的に、ZRが年齢に伴い発育することが判明した。ZRの発育は皮質細胞の増殖とア

ポトシスでバランスされ、また puberty にも関与することが示唆された。(笹野)

・先天性副腎低形成症にはさまざまな原因が同定されているが、最も多く同定される X 連鎖性の主要原因として DAX-1 異常症が知られ、低ゴナドトロピン性性腺機能低下症の合併や、精巣での精子形成が障害される。発症時期の多くは新生児期～乳幼児期であるが、成人になってから発症する例もあり幅広く、また DAX-1 異常症の表現型は臨床的に多様であることが明らかになってきた。DAX-1 は核内ホルモン受容体スーパーファミリーに属する抑制性の転写因子だが、未だ生体内リガンド不明のオーファン受容体に分類される。典型的な Zn フィンガータイプの DNA 結合領域が存在せず、約 3 回の繰り返し配列を有するのが特徴である。遺伝子異常により転写活性に影響を及ぼす、核内移行に影響するなどの機能異常が報告されているが、作成されたノックアウトマウスの表現型はヒトの症状とは一部乖離している。相互作用因子についてもいくつか報告がなされているが、疾患との関連について現在のところ不明である。そこで、DAX-1 の新たな相互作用因子の存在を想定し、その同定を試みるため、作成したヒト副腎由来 cDNA ライブラリーのスクリーニングを yeast two-hybrid 法を用いて行った。その結果、候補因子として約 30 種が同定されてきており、それら候補因子についての結合実験、DAX-1 の転写活性に与える影響などについての検討を行っている。(藤枝)

(3) 副腎再生による新しい副腎不全治療法の開発

効率的なステロイド産生細胞の作成を目指し研究を行った。

・間葉系幹細胞に外因性の Ad4BP/SF-1 を強制発現させることによりステロイド産生細胞を創生させることに成功しているが、エピジェネティックな制御により Ad4BP/SF-1 の遺伝子発現を誘導できれば、発現ベクターによる

遺伝子導入の操作なしに同じ目的を達成できる可能性がある。その観点から骨髄間葉系細胞の脱メチル化剤処理を試みた。予想どおり、元来、Ad4BP/SF-1 の非発現細胞である骨髄間葉系細胞において Ad4BP/SF-1 の約 500 倍の発現誘導を認めたが、その発現量は Y1 細胞の基礎 Ad4BP/SF-1 発現量にははるかに及ばず、ステロイド産生能の獲得には至らなかった。今後、脱メチル化処理以外のエピジェネティックな Ad4BP/SF-1 発現制御機構を模索する必要がある。(柳瀬)

・ヒト骨髄間葉系幹細胞に Ad4BP/SF-1 および LHR-1 を安定導入した後 8Br-cAMP により刺激することで CYP11A1 や CYP17 等のステロイド合成酵素の遺伝子上流に存在する CpG の DNA メチル化状態およびクロマチン構造変化を ChIP アッセイ等により解析した。その結果、CYP17 遺伝子プロモーター領域では LRH-1 の結合に伴いクロマチンの構造変化が生じており、cAMP 刺激をきっかけとして、DNA 脱メチル化反応が速やかに生じることを初めて明らかにした。哺乳動物細胞における DNA 脱メチル化の機構は不明な点が多いが、本研究によりヒト骨髄間葉系幹細胞においても転写の活性化に伴い速やかな脱メチル化が生じることが初めて示された。またその際、LRH-1 の発現が CYP17 遺伝子上流の脱メチル化に必須であることが示唆された。これにより転写因子 Ad4BP/SF-1 および LRH-1 の導入により幹細胞はエピジェネティックな変化を伴ってステロイドホルモン産生細胞へと分化誘導されることが示され、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が示された。(宮本)

(4) 原発性アルドステロン症 (PA) の診断基準の策定と治療法の検討

PA の効率的なスクリーニング法、正確な診断法の確立、また発症頻度などを明らかにするべく研究を行っている。

・副腎皮質機能異常でのホルモン過剰産生評

価のために精緻化した部位診断法が求められている。そこで、超選択的 ACTH 負荷副腎静脈採血 (SS-ACTH-AVS) の有用性を検討した。SS-ACTH-AVS により右副腎外側領域の副腎腫瘍からのアルドステロンとコルチゾールの同時産生と左副腎外側枝領域からのアルドステロン過剰分泌が診断された。右副腎腫瘍の核出術を行い腫瘍からのアルドステロンとコルチゾール産生が病理学的に確認された。従って SS-ACTH-AVS は副腎皮質機能異常症でのホルモン過剰産生の部位診断能を副腎内分枝レベルまで精緻化が可能な有用な検査法であることが示された。(西川)

・東京で 415 例の初診無治療高血圧を対象に二次性高血圧のスクリーニング法と二次性高血圧の頻度を検討し、横浜で行った 1020 例の同様の調査結果と比較した。その結果、PA の一次スクリーニングでは PAC=10.0ng/dl かつ レニン活性=1.0ng/ml/h が最適カットオフ値であり、PA の確認検査として ACTH 負荷試験が優れていること、初診無治療高血圧患者に占める二次性高血圧の頻度は、Yokohama Study で 9.1%、Tokyo Study で 12.3%であり、1435 例全体では 10.0%であった。従って、二次性高血圧を発見するために初診高血圧ではアルドステロン、レニン活性、コルチゾール、カテコールアミン測定と腹部超音波による一次スクリーニング検査、そして ACTH 負荷試験を用いた PA の二次スクリーニング検査が有用な方法であることが示された。また、二次性高血圧の頻度は 10%と推定された。(西川)

・我が国の高血圧患者に占める PA の頻度を明らかにするため、実地医家受診患者の全国調査を継続している。また、PA の臨床所見に与える肥満の影響を検討した。疫学調査にはもう少し時間が必要とされた。PA 30 症例を対象として各検査値への肥満の影響を検討したところ、血漿レニン活性 (PRA) と body mass index (BMI) の間に正相関が認められた。アルドステロン産生腺腫 (APA) 以外の 18 例では、

アルドステロン-レニン比 (ARR) が BMI と負相関する傾向が認められ、肥満者においては ARR の解釈に注意が必要である可能性が示唆された。以上より、肥満に伴い PA 患者で PRA が増加し、非 APA 症例では ARR が低下し、スクリーニングに影響する可能性が示唆された。(田村)

・新しいスクリーニング法としてコルチゾール (F) 迅速測定キットを開発し副腎静脈サンプリング (AVS) 時の F 迅速測定の有用性を検討した。方法として原発性アルドステロン症 (PA) と診断され AVS が行われた 46 例を対象に、19 例は従来どおりの AVS を行い (コントロール群)、27 例に AVS 時に F の迅速測定をし、そのデータをもとに AVS を終了した (迅速測定群)。その結果、コントロール群では 19 例中 15 例が成功 (成功率 79%)、迅速測定群では 27 例中 25 例が成功であった (成功率 93%)。迅速測定群の失敗は副腎静脈の走行異常のため、カテーテルの副腎静脈への選択が困難という理由によるものであった。従って、AVS 時の F 迅速測定は副腎静脈からの検体採取成功率をあげ臨床的に有用であることが示された。(武田)

・PA のスクリーニング指標としてのアルドステロン/レニン比 (ARR) の意義を明らかにするために、正常血圧者と高血圧者における ARR の分布を、健康診断受診者を用いて検討した。ARR 高値は対象の 8.9%であり、高血圧者と女性で高頻度であった。ARR 高値および血漿アルドステロン濃度 >150pg/ml を PA スクリーニング陽性とする、高血圧者における PA スクリーニング陽性者では陰性者と比べて、左室肥大、蛋白尿を多く認めた。一方、正常血圧者における PA スクリーニング陽性者では、陰性者と比べて収縮期血圧、拡張期血圧の高値を認めた。以上より高血圧者における ARR 高値は PA のスクリーニングに有用であり、正常血圧者においても ARR 高値を示す軽症の PA が潜む可能性が示唆された。(柴田)

・副腎の腫瘍性病変での悪性度診断における PET/CT の有用性を検討したところ、PET/CT は副腎の腫瘍性病変の悪性度診断である程度の有用性を示し、SUVmax<3 の場合は皮質腫瘍であれば皮質腺腫の可能性が高いことが示された。(佐藤)

・トロンボスポンジン (TSP) による ACTH を介したアルドステロン産生腺腫 (APA)、非機能性腺腫 (NF) 発生への関与を検討する目的で、副腎腺腫症例 (APA5 例、NF3 例) の ACTH、副腎皮質ホルモン分泌状況を調査した。またそれぞれの摘出標本における TSP1、TSP2 および ACTH 受容体遺伝子発現をノーザンブロット法にて確認し、それぞれの相関関係を統計学的に検討した。その結果、APA 組織では NF および正常副腎組織と比べて TSP1 の減少、TSP2 の増加が確認された。ACTH 受容体は増加していたが、TSP1 および TSP2 の発現とそれぞれ高い負および正の相関が認められた。症例の一日 ACTH 分泌量は各群間で差がないことから、ACTH 依存的とされる APA では ACTH 受容体過剰発現と TSP 制御が同調して腫瘍発生に関与していることが想定された。以上より、組織での腫瘍抑制因子 TSP1 の減少は ACTH 受容体発現増加に同調して APA 発生に関与している可能性が示唆された。(宮森)

(5) ステロイド作用に関わる受容体とその異常の解析

・グルココルチコイドは核内受容体であるグルココルチコイドレセプター (GR) による炎症制御転写因子の活性を抑制することによって炎症抑制作用を発揮することが明らかになっている。これまでの解析から GR の転写制御には、さまざまな炎症シグナルによる GR 自体のタンパク安定化制御が重要であることを明らかにしているが、このようなメカニズムを制御する GR 結合因子群の精製、同定を試み、その同定に成功した。これらの因子は、GR の分解制御に関与することによって GR による炎症性転写因子の転写制御に関与する可能性が

示唆され、今後のさらなる解析に期待がもたれる。(加藤)

・既に新たなグルココルチコイド (GC) 作用調節因子 HEXIM1 を同定しているが、GC 作用の組織特異的調節機構を明らかにすることを目的に、Na⁺K⁺ATPase 遺伝子 atplal、aENaC 遺伝子 scnnla の、肝・腎における GC による制御機構をこの HEXIM1 の関与に焦点をあてて分子生物学的に解析した。その結果、atplal、scnnla は細胞内 HEXIM1 発現量が低い腎において GC 依存性に転写レベルで制御されるが、発現量が高い肝においては抵抗性であった。腎と異なり、肝では HEXIM1 によって GR のこれらの遺伝子のプロモーターへのリクルートが阻害された。また、GR のリクルートの阻害に一致して RNA ポリメラーゼ II のリクルートも低下していた。以上より、HEXIM1 は組織ごとに発現量が異なり、ある種の遺伝子群の GC 応答性を規定していることが示唆された。今後、GC 抵抗性病態の解明や新規 GR 標的治療法開発などへと展開しうることが期待される。(田中)

(6) 副腎癌の診断・治療法の検討

・副腎偶発腫調査 (1999 年から 2003 年) と、2008 年に行なった副腎癌の実診療患者の全数調査から最終的に得られた、それぞれ 50 症例について、これら 2 つの疫学調査から得られた副腎癌の特徴を比較検討した。平均年齢は偶発腫症例 58.8 歳、実診療症例 54.2 歳で、偶発腫症例によるものがやや高かった。平均腫瘍径は偶発腫症例 8.3cm、実診療症例 9.8cm で、実診療症例によるものが大きかった。ホルモン産生性では、血中 DHEA-S 高値症例は両調査ともに 50~56% であった。発見及び診断の契機で両調査とも腹部症状の精査が、最も多く (34~40%)、次いで、無症状 (健康診断) のものが 20~24% であった。以上より、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の重要性が再認識された。

(上芝)

(7) 副腎ホルモン産生異常症の全国疫学調査

・副腎疾患に関する研究班の疫学調査はこれまでに数回行われているものの、平成 9～10 年度に行われた調査が最後であり、既に 10 年が経過していることから改めて現状に即した全国調査を計画した。病床数 200 床以上の病院で内科、小児科、泌尿器を標榜している施設を調査対象とした。2003 年～2007 年の 5 年間における対象疾患(先天性副腎過形成症、POR 異常症、先天性副腎低形成症、偽性低アルドステロン症、11 β -水酸化ステロイド脱水素酵素欠損症、ACTH 不応症、グルココルチコイド抵抗症、原発性アルドステロン症、副腎性 preclinical Cushing 症候群、Addison 病、褐色細胞腫)の患者数について一次調査を行った。回収率が低いため追加調査を継続して行いながら、二次調査についても順次進めている。(藤枝)

3. 結 論

副腎ホルモン産生異常に関連する病因、病態を把握し、それに対する有用な診断法・治療法を確立することを目的に、さまざまな角度から臨床的研究および基礎的研究を行い、初年度としては多くの成果を得ることができた。主な成果として以下のものがあげられる。

- ①新生児尿中ステロイド代謝物の在胎週数別基準範囲を設定した。
- ②新生児早期副腎皮質機能は SGA と AGA において差異が存在することを示した。
- ③先天性リポイド過形成症における病態の多様性を責任遺伝子である STAR の残存活性で説明しうることを示した。
- ④マウス胎仔副腎では Ad4BP/SF-1 の発現量(遺伝子量)が胎仔副腎皮質を構成する細胞数を決定する可能性が強いことを示した。
- ⑤転写因子 Ad4BP/SF-1 および LRH-1 の導入に

より幹細胞がエピジェネティックな変化を伴ってステロイドホルモン産生細胞へと分化誘導でき、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した。

- ⑥超選択的 ACTH 負荷副腎静脈採血は副腎皮質機能異常症でのホルモン過剰産生の部位診断能を副腎内分枝レベルまで精緻化が可能な有用な検査法であることを示した。
- ⑦二次性高血圧を発見するために初診高血圧ではアルドステロン、レニン活性、コルチゾール、カテコールアミン測定と腹部超音波による一次スクリーニング検査、そして ACTH 負荷試験を用いた PA の二次スクリーニング検査が有用であることを示した。
- ⑧コルチゾール迅速測定キットを開発し、副腎静脈サンプリング時の迅速測定が副腎静脈からの検体採取成功率をあげ臨床的に有用であることを示した。
- ⑨初診無治療高血圧患者に占める二次性高血圧の頻度は 10.0%で、極めて高頻度であることを明らかにした。
- ⑩組織での腫瘍抑制因子 TSP1 の減少は ACTH 受容体発現増加に同調してアルドステロン産生腺腫発生に関与している可能性を示唆した。
- ⑪グルココルチコイド(GC)転写制御に関与する GR 結合因子群の同定に成功した。また、GC 作用調節因子 HEXIM1 の役割を明らかにした。これらの研究により、今後 GC 抵抗性病態の解明や新規 GR 標的治療法の開発が期待される。

4. 健康危険情報

なし

5. 知的財産権の出願・登録状況

Split-tip micro catheter の特許出願を準備中である。

IV. 分担研究報告書

(1) 先天性副腎酵素異常症の生化学・遺伝子
診断システムの構築と病態の解明

AGA (appropriate for gestational age) および

SGA (small for gestational age) の新生児早期副腎ステロイド分泌

—在胎週数別評価—

長谷川 奉延、本間 桂子*、小山 雄平**、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

**慶應義塾大学医学部臨床検査医学

【研究要旨】

AGA・SGAの新生児早期尿中ステロイド代謝物について在胎週数別基準範囲を設定し、AGAとSGAの副腎ステロイド分泌を比較した。対象は内分泌学的異常を認めず生後3-5日に採尿できた在胎35-41週の新生児1598名(AGA1475、SGA123)。随時尿について、尿ステロイドプロフィールGCMS法により、cortisol(F)代謝物(17種)、aldosterone(Ald)代謝物(1種)、pregnenolone(P5)代謝物(2種)、D代謝物(6種)を測定(mg/g creatinine)。在胎週数別にAGAとSGAをMann-Whitney testにより有意差検定した。その結果、SGAにおける新生児早期副腎皮質機能は、束状層では、早産においてAGAより低分泌、球状層では、早産・正期産ともにAGAと同等、胎生皮質では、早産・正期産ともにAGAより低分泌であることが示唆された。

【背景】

在胎週数に比して低出生体重であるSGA (small for Gestational age)児の新生児早期副腎皮質機能の詳細は不明である。本検討におけるSGAの定義は、1998年日本新生児学会誌に発表された日本人在胎週数別出生体重基準値の10%ile未満とする(図1:男児▲、女児△の10%ile値より下の体重で出生した児をSGA、10%ile値より上の体重で出生した児をAGA: appropriate for Gestational ageと判定)。SGA児は、発症の原因となる栄養不良や胎内感染などの胎内ストレスにより、副腎機能が成熟しているのではないかという説があるが、証明されていない。

【目的】

SGA児の新生児早期副腎皮質各層のステ

ロイド分泌能を、尿ステロイドプロフィールを指標としてAGA児と比較する。

【対象】

内分泌学的に異常なく、母体および児へのステロイド投与がなく、生後3-5日に採尿出来た当院出生児1598例(男811女787)。表1に各在胎週数(35-41週)における、出生体重(中央値、範囲)、AGAおよびSGAのN数を示す(AGA総数1475、SGA総数123)。

【方法】

GCMSによる尿ステロイドプロフィール分析を行い、新生児・乳児期に測定可能な代謝物のうち、束状層由来の cortisol 代謝物 17 種、球状層由来の aldosterone 代謝物 1 種、胎生皮質由来のステロイド代謝物 9 種(図2)を指

標として、副腎各層のステロイド分泌を解析した。在胎週数別 SGA・AGA の比較は、Mann-Whitney 順位和検定により、行った。

【結果】

- 1) AGA・SGA の新生児早期尿中ステロイド代謝物 在胎週数別基準範囲：表 2 に生後 3-5 日の cortisol 代謝物、aldosterone 代謝物、pregnenolone 代謝物について、AGA は 5%・50%・95%、SGA は min・median・max を示す。
- 2) 出生体重別尿ステロイドの分布：図 3,4 に在胎 39 週、35 週における出生体重別 cortisol 代謝物、aldosterone 代謝物、pregnenolone 代謝物の分布を示す（横軸出生体重、縦軸ステロイド濃度 mg/g creatinine 対数表示。在胎 39 週、35 週における SGA カットオフ値は、各々約 2500g、約 1900g）。在胎 39 週、35 週の SGA は、いずれも cortisol、pregnenolone 代謝物において、AGA より見かけ上低く分布していた。
- 3) SGA・AGA 尿ステロイドの在胎週数別比較：図 5,6,7 に、cortisol 代謝物、aldosterone 代謝物、pregnenolone 代謝物について、SGA・AGA における在胎週数別中央値を示す（横軸は在胎週数、縦軸は cortisol 代謝物と mg/g creatinine の実数表示。SGA 黒 AGA 灰色）。SGA の Cortisol 代謝物は、35,36,39 週において AGA より有意に低値で、特に 35,36 週における低値が著明であった（図 5）。SGA の aldosterone 代謝物は、38 週において AGA より有意に高値であったが、その他の週数では有意差を認めなかった（図 6）。SGA の pregnenolone 代謝物は、35-40 週において AGA より有意に低値であった（図 7）。また、SGA では、AGA において認めるような、35 週で高値、その後 41 週までに激減するパターンを認めず、35 週から 41 週まで低値のままであった。データは示さないが 17OHpregnenolone・DHEA 代謝物も同様の傾向を示した。

【考察】

- 1) SGA の束状層分泌能：SGA の cortisol 分泌は、早産において AGA より低分泌、正期産においてはほぼ同等であったことから、早産 SGA は、cortisol 分泌予備能が低い可能性が示唆された。このことから、SGA における束状層の成長・成熟は、子宮内発育遅延の影響を受け、早産では AGA より低下傾向を示し、正期産であれば、catch up できると推測された。
- 2) SGA の球状層分泌能：SGA の aldosterone 分泌は、早産・正期産いずれにおいても AGA とほぼ同等であった。このことから、SGA の球状層の成長・成熟は、少なくとも在胎 35 週以上であれば、子宮内発育遅延の影響はなく、AGA と変わらない、と推測された。このことは、球状層が出生以降、水・塩類調節を自立して行う環境になって初めて活動し始めることと矛盾しない。
- 3) SGA の胎生皮質分泌能：SGA の pregnenolone 分泌は、早産、正期産いずれにおいても AGA より低分泌であった。また、少なくとも 35 週以降、明らかな高分泌・漸減のパターンを認めなかった。このことから、SGA の胎生皮質の成長・成熟は、子宮内発育遅延の影響を受け、著明に低下していることが示唆された。
- 4) 今後の課題は、①SGA の原因となる、母体低栄養 胎盤機能不全など児への栄養供給低下と染色体異常・胎内感染など児の成長抑制を分けて、ステロイド分泌各層への影響を解析する。②34 週未満の早産児についても検討する。

【結語】

SGA における新生児早期副腎皮質機能は、束状層では、早産において AGA より低分泌球状層では、早産・正期産ともに AGA と同等、胎生皮質では、早産・正期産ともに AGA より低分泌である。