

【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

【研究発表】

論文発表

なし

学会発表

- 1) 丹羽房子、松倉崇、水本洋、河井昌彦、中畑龍俊、本間桂子、長谷川奉延. 第44回日本周産期・新生児医学会(口演). 横浜.2008.7.13-15
- 2) 三輪雅之、有光威志、松崎陽平、栗原伸芳、北東功、池田一成、本間桂子、長谷川奉延. 血中ステロイドホルモン一斉測定による早産SGA・AGA児の副腎機能評価. 第44回日本周産期・新生児医学会(口演). 横浜.2008.7.13-15
- 3) Masayuki Miwa, Takeshi Arimitsu, Yohei Matsuzaki, Nobuyoshi Kurihara, Isamu Hokuto, Kazushige Ikeda, Tomonobu Hasegawa. SERUM STEROID PROFILE IN NEWBORN: COMPARISON BETWEEN TERM AND PRETERM INFANT BY USING LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY. 2nd Congress of European Academy of Paediatrics. Nice. 2008.10.24-28
- 4) 本間桂子. 尿ステロイドプロフィールによる新生児副腎性腺機能へのアプローチ. 第2回新生児内分泌研究会.京都.2008.9.12
- 5) 飛弾麻里子、島袋林秀、城裕之、本間桂子、長谷川奉延. 新生児副腎機能 -新生児・乳児の永久皮質ステロイド分泌に日内変動は

あるか? - 第2回新生児内分泌研究会.京都.2008.9.12

【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

図1 SGA(small for gestational age)の定義

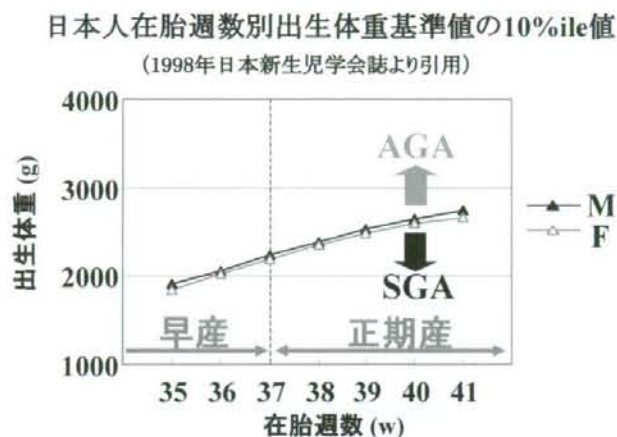


表1 対象新生児

在胎週数	出生体重 (g)		N数	
	中央値	(範囲)	AGA	SGA
35	2233	(1200-3730)	47	20
36	2371	(1275-3464)	101	23
37	2691	(1371-3776)	203	22
38	2882	(1666-3946)	317	22
39	3002	(1889-4148)	335	21
40	3162	(2250-4200)	317	8
41	3226	(1788-4248)	155	7

図2 ステロイド代謝マップ

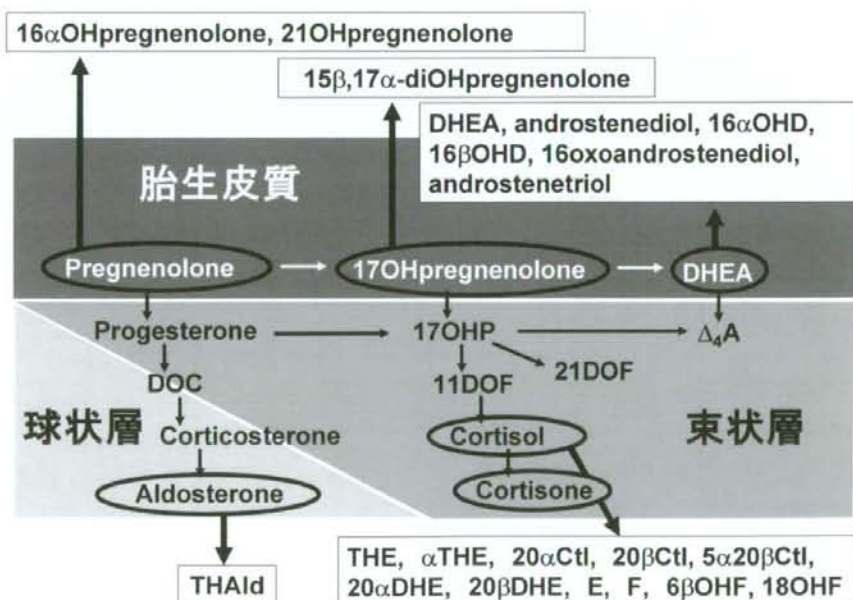


表2 AGA・SGAの新生児早期尿中ステロイド代謝物在胎週数別基準範囲

1) cortisol 代謝物

	SGA				AGA			
	N	min	median	max	N	5%ile	50%ile	95%ile
35w	19	2.7	4.6	10.8	40	3.4	6.6	13.1
36w	19	3.3	4.3	13.5	95	2.9	6.5	15.0
37w	17	3.4	6.7	13.4	191	3.3	5.9	11.6
38w	22	3.1	7.1	32.5	289	3.3	5.9	12.1
39w	20	3.5	6.0	9.5	313	3.7	6.7	13.8
40w	7	4.9	6.8	13.5	299	4.0	7.5	14.4
41w	6	2.2	7.6	20.1	146	3.8	7.5	14.9

2) aldosterone 代謝物

	SGA				AGA			
	N	min	median	max	N	5%ile	50%ile	95%ile
35w	20	0.03	0.15	1.57	47	0.03	0.15	0.51
36w	23	0.02	0.13	0.35	101	0.04	0.15	0.57
37w	22	0.03	0.20	2.06	203	0.04	0.14	0.57
38w	22	0.03	0.27	1.35	315	0.03	0.16	0.55
39w	21	0.07	0.21	1.19	335	0.05	0.22	0.84
40w	8	0.08	0.34	1.05	317	0.07	0.28	0.99
41w	7	0.11	0.43	3.76	155	0.09	0.36	1.08

3) pregnenolone 代謝物

	SGA				AGA			
	N	min	median	max	N	5%ile	50%ile	95%ile
35w	20	1.3	15.3	118.9	47	10.0	57.8	139.5
36w	23	3.4	10.7	161.2	101	12.0	43.1	140.3
37w	22	3.8	10.8	167.1	203	8.1	36.2	104.1
38w	22	3.1	15.0	54.9	317	5.7	21.5	83.4
39w	21	1.5	6.7	28.5	335	4.2	12.9	57.2
40w	8	2.3	5.0	9.7	317	3.4	10.2	46.7
41w	7	2.9	6.6	20.0	155	2.9	8.4	30.1

図3 出生体重別尿ステロイドの分布 (在胎39週)

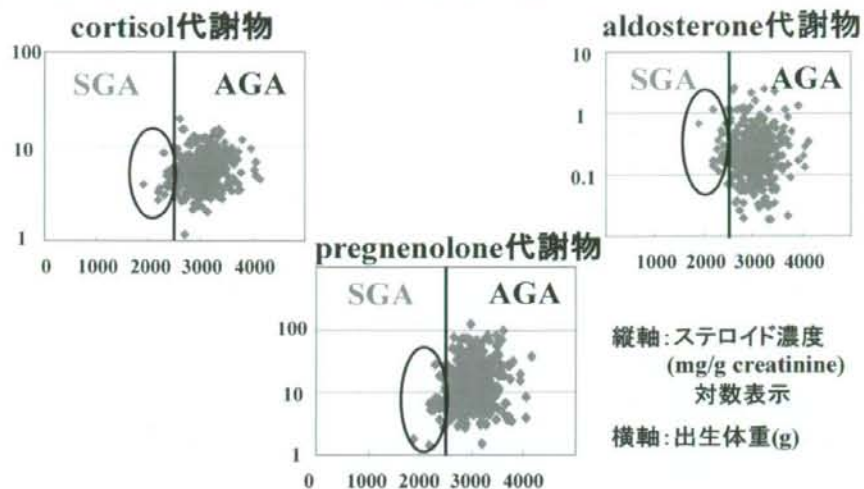


図4 出生体重別尿ステロイドの分布 (在胎35週)

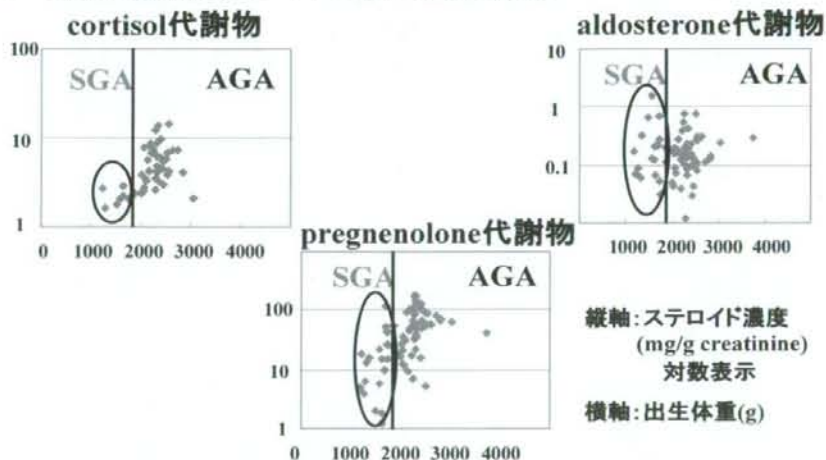


図5 SGA と AGA の比較：束状層

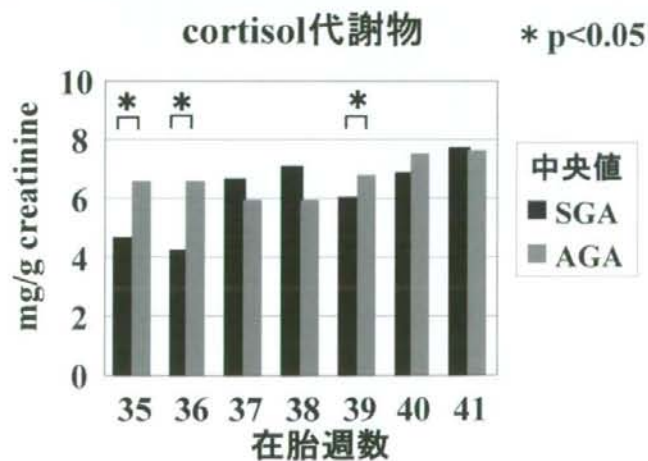


図6 SGA と AGA の比較 : 球状層

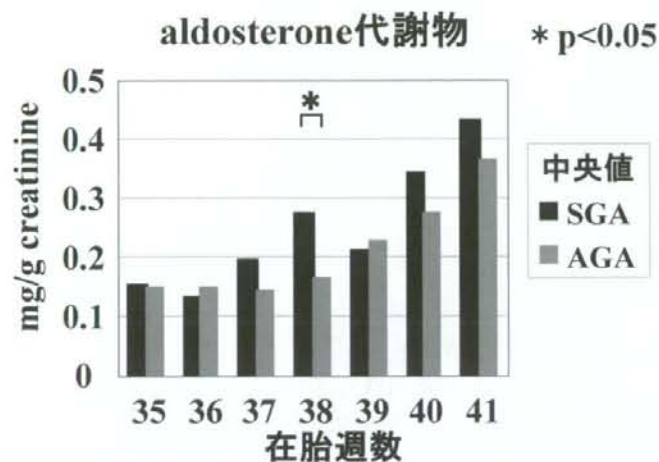
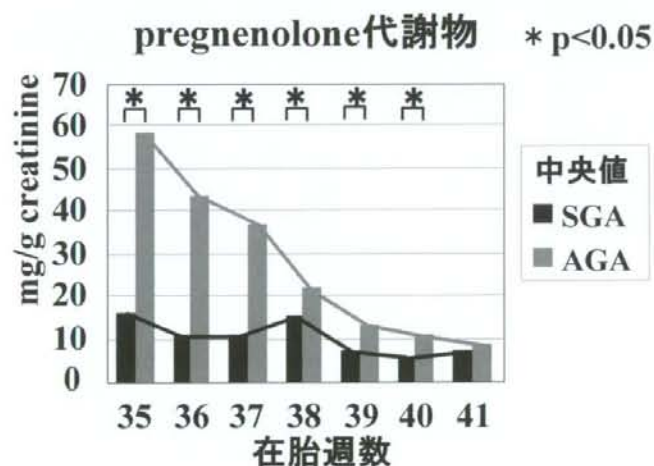


図7 SGA と AGA の比較 : 胎生皮質



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

勝又 規行

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

【研究要旨】

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、非古典的先天性副腎リポイド過形成症の男子においては、二次性徴が自然に発来、進行し、造精能を獲得することが明らかになった。

A. 研究目的

Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) をコードする STAR 遺伝子異常は先天性副腎リポイド過形成症の原因であり、本症患者は、通常、生後早期からの副腎不全症状に加え、46,XY 個体でも女性型の外性器を呈する。2006 年に Baker らは幼児期に発症する副腎不全と正常男性型の外性器を呈する男児で STAR 遺伝子異常を同定し、非古典的先天性副腎リポイド過形成症として報告した (Baker BY, et al. J Clin Endocrinol Metab, 91:4781-4785, 2006)。しかし、これら男児症例の二次性徴の発来、進行、造精能の獲得などの性腺機能については明らかにされていない。本研究では、非古典的先天性副腎リポイド過形成症の男子で、STAR 遺伝子、性腺機能の解析を行った。

B. 研究方法

対象：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 (表 1)。

症例 1 は現在 15 歳の男子。生後 6 ヶ月から下痢、体重増加不良、全身皮膚色素沈着を認め、9 ヶ月のとき副腎不全と診断。

症例 2 は現在 10 歳の男子。症例 1 の弟で、双胎第 2 子。双胎第 1 子は正常。家族歴と症

例 2 のみ皮膚色素沈着を認めたため、新生児期に精査され、副腎不全と診断。

症例 3 は現在 30 歳の男子。幼少時から皮膚色素沈着あり、4 歳時に副腎不全と診断。6 歳時に左停留精巣固定術。

症例 4 は 36 歳の男子。幼少時から皮膚色素沈着あり、4 歳時に副腎不全と診断。

STAR 遺伝子の解析：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。

機能解析：同定した新規 STAR 変異を野生型 STAR cDNA に組換え PCR 法で導入した後に、野生型および変異 StAR 発現プラスミドを F2 プラスミド (コレステロール側鎖切断酵素・アドレノドキシン還元酵素・アドレノドキシン・融合蛋白発現プラスミド) と共に COS-1 細胞にトランスフェクションし、培養液中のプレグネノロンを測定した。

性腺機能：臨床情報を後方視的に解析した。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析研究は、施設の倫理審査委員会にて承認された説明書・同意書を用いて同意を得た後に行った。

C. 研究成果

STAR 遺伝子解析: 症例 1、2 は R188C 変異と Q258X 変異の複合ヘテロ接合体であった。症例 3 は Q258X 変異と R272C 変異の複合ヘテロ接合体であった。症例 4 も Q258X 変異と R272C 変異の複合ヘテロ接合体であった。R272C 変異はこれまでに報告のない変異であった。

機能解析: R272C 変異 StAR の活性は野生型 StAR の 35.0%であった。

性腺機能 (表 2): 症例 1 (15 歳) の外性器は Tanner 5、精巣容積 18 ml であった。血清 FSH、テストステロンは正常であったが、血清 LH は上昇していた。

症例 2 (10 歳) の外性器は Tanner 1 (前思春期) であった。血清 LH、FSH、テストステロンも前思春期レベルであった。

症例 3 (30 歳) の外性器は Tanner 5、右精巣容積は 20 ml、左精巣容積は 12 ml であった。血清 FSH、テストステロンは正常であったが、血清 LH は上昇していた。精液検査で精液量、精子数は正常、精子濃度は軽度低下していた。症例 4 (36 歳) の外性器は Tanner 5、精巣容積は 20-25ml であった。血清 LH、FSH、テストステロンは正常であった。精液検査で精液量、精子濃度、精子数は正常であった。

D. 考察

今回、非古典的先天性副腎リポイド過形成症の男子 4 例のすべてで同定した Q258X 変異は、本邦の古典的先天性副腎リポイド過形成症の半数以上のアレルで見られる変異であり、活性を完全に損なうことが知られている。症例 1、2 で同定した R188C 変異は、非古典的症例で既に報告されており、活性を野生型の 22.3%に低下させることが示されている (Baker BY, et al. *J Clin Endocrinol Metab*, 91:4781-4785, 2006)。症例 3、4 で同定した R272C 変異は、これまでに報告のない新規変異であり、機能解析により活性を野生型の 35.0%に低下させることが明らかになった。したがって、R188C 変異および R272C 変異

が、今回報告した男子 4 例の非古典的表現型の原因であり、STAR 変異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る。

今回報告した非古典的先天性副腎リポイド過形成症の男子 4 例のうち、思春期年齢に達している 3 例すべて (症例 1、3、4) で、自然に二次性徴が発来し、進行することを確認した。成人に達した症例 3、4 で精液検査を行い、造精能の獲得を確認した。症例 4 では精液検査は正常であったのに対して、症例 3 では精子濃度が軽度低下していた。これは、症例 3 では左停留精巣の手術年齢が遅かったために、左精巣が障害を受けたためと考えられる。以上の所見から、非古典的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し、進行し、造精能を獲得すると考えられる。

E. 結論

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、非古典的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。

F. 研究発表

学会発表

- 1) Katsumata N, Horikawa R, Tanaka T. Novel missense mutation in the P-box of androgen receptor in a patient with androgen insensitivity syndrome. 90th Annual Meeting of the Endocrine Society, San Francisco, CA, USA, June 15-18, 2008.
- 2) Mori J, Matsuo K, Nakajima H, Kosaka K, Kinugasa A, Katsumata N, Amano N, Ishii T, Hasegawa T. Successful pregnancy and delivery in a 46,XX lipoid congenital adrenal hyperplasia (lipoid CAH); the first case report. 90th Annual Meeting of the Endocrine Society, San Francisco, CA, USA, June 15-18, 2008.

- 3) 勝又規行, 望月弘. 非古典的 StAR 欠損症の 2 家系. 第 81 回日本内分泌学会学術総会、青森、5 月 16-18 日、2008.
- 4) 後藤正博, 勝又規行. 特発性高 Ca 尿症による腎結石を合併した先天性リポイド副腎過形成症の 1 例. 第 81 回日本内分泌学会学術総会、青森、5 月 16-18 日、2008.
- 5) 勝又規行, 田苗綾子, 小笠原敦子, 望月弘, 倉本崇, 堀川玲子. マスクリーニングで発見された非古典的 21 水酸化酵素欠損症の遺伝子解析. 第 42 回日本小児内分泌学会、米子、10 月 2-4 日、2008.

G. 謝 辞

本研究にご協力いただいた、福井大学医学部小児科・中井昭夫先生、慶應義塾大学医学部小児科・長谷川奉延先生、慶應義塾大学医学部同腎臓内分泌代謝内科・柴田洋孝先生に感謝いたします。

表 1. 非古典的先天性副腎リポイド過形成症患者の副腎不全発症時の臨床所見

	症例 1	症例 2	症例 3	症例 4
性別	男	男	男	男
発症年齢	8 ヶ月	12 日	4 歳	4 歳
初発症状	色素沈着、下痢	色素沈着	色素沈着	色素沈着
ACTH (pg/ml)	1900	300	4600	>6000
Cortisol (μ g/dl)	1.7	6.6	2.4	1.7
Aldosterone (pg/ml)	52	410	59	64
PRA (ng/ml/h)	42.7	n. d.	3.9	24
Na (mEq/l)	138	127	135	142
K (mEq/l)	5.2	5.5	4.1	4.1
Cl (mEq/l)	98	95	106	109

n. d.: not determined.

表 2. 非古典的先天性副腎リポイド過形成症患者の最近の性腺機能

	症例 1	症例 2	症例 3	症例 4
評価時年齢	15 歳	10 歳	30 歳	36 歳
Tanner Stage	5	1	5	5
LH (mIU/ml)	11.2 (2.2-8.4)*	0.4 (<1.8)*	9.8 (2.2-8.4)*	4.5 (2.2-8.4)*
FSH (mIU/ml)	7.9 (1.8-12.0)*	2.0 (0.95-3.57)*	6.4 (1.8-12.0)*	4.0 (1.8-12.0)*
Testosterone (ng/ml)	3.6 (2.01-7.50)*	<0.1 (<0.1)*	4.5 (2.01-7.50)*	6.7 (2.01-7.50)*
精液量 (ml)	n. d.	n. d.	6 (>2)*	4 (>2)*
精子濃度 ($\times 10^6$ /ml)	n. d.	n. d.	14 (>20)*	120 (>20)*
精子数 ($\times 10^6$)	n. d.	n. d.	84 (>40)*	480 (>40)*

n. d.: not determined; ()*: normal range.

先天性副腎低形成症の成因の解析

田島 敏広

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

【研究要旨】

〈目的〉常染色体劣性副腎低形成症の成因がマウスで同定され、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を検討した。

〈研究方法〉先天性の副腎低形成と診断された患者 4 例(1 同胞例)でヒト ACD 遺伝子を解析した。
〈結果と考案〉今回の検討では ACD 遺伝子を解析したが、変異等同定できなかった。acd マウスは副腎低形成、性腺の低形成を示す。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 P I P 1 蛋白であった。テロメアの異常による代表的疾患は *Dyskeratosis congenital* である。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。

〈結論〉ヒト ACD 遺伝子が副腎低形成を起こす可能性は低い。

A. 研究目的

先天性副腎低形成症は X-連鎖性、常染色体劣性の二つに分類される。X-連鎖性は皮質永久層の脱落、胎児層に類似した細胞が存在するタイプであり、その成因は DAX-1 異常による。常染色体劣性副腎低形成症は皮質が低形成、胎児層の消失を認め *miniature form* とも呼ばれるが、その成因は不明である。近年マウスの常染色体劣性形式をとる先天性副腎低形成症の責任遺伝子が同定された。そこでそのヒトホモログである 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を検討した。

B. 研究方法

先天性の副腎低形成と診断された患者で StAR, Ad4BP, DAX-1, SCC, MRAP, ACTH-R, POR 遺伝子がすべて正常であった 4 例(1 同胞例)について白血球よりゲノム DNA を抽出し、

PCR 法を用いてヒト ACD 遺伝子を解析した。

先天性副腎疾患の遺伝子診断は北海道大学倫理委員会の承認を得て、ご両親に説明し、書面にて同意を得た。

C. 研究結果

症例 1 は現在 12 歳女子。原因不明の子宮内発育不全があり、出生後、色素沈着、低血糖、低ナトリウム血症、副腎エコーにて両側副腎描出悪く、先天性副腎低形成症の診断で、ステロイド開始。出生後も著名な原因不明の低身長(-4SD)を呈している。舌の白板症、厚ぼったい皮膚、脂肪組織の萎縮を認める。また両側感音性難聴も認める。家族歴では兄が生後 2 週で突然死がり、色素沈着が著名であった。

症例 2 は現在 10 歳男子。原因不明の子宮内発育不全を認めた。1 歳ごろより低血糖発作おこし、徐々に色素沈着が進行。精査にて軽度副

腎皮質機能低下症と診断した。症例3,4は同胞例で、同じく原因不明の子宮内発育不全、低血糖、低ナトリウム血症を示し、副腎の腫大なく、先天性副腎低形成症の診断。第1子の男児には2分陰囊、陰茎低形成も認めた。その後著名な低身長を示している。第2子は骨髄異形成症候群を発症し、移植を行っている。

これらの患者よりDNAを抽出し、ACD遺伝子を解析したが、変異等同定できなかった。

D. 考案

Adrenocortical dysplasia(acd)マウスは先天性の副腎低形成、性腺の低形成を示す。その出生体重は野性型マウスに比べ小さく、出生後も野性型に比べ、著しい成長障害を示す。その責任遺伝子としてacd遺伝子がクローニングされた。ヒトホモログであるACD遺伝子は16q21.1に存在し、その遺伝子産物は染色体テロメアに結合し、構造維持に必須なPIP1蛋白質であった。テロメアの構造を維持にはたらく蛋白質の異常による代表的疾患はDyskeratosis congenital(DC)である。その臨床症状としては、古典的には皮膚の色素沈着、爪形成不全、舌病変、骨髄形成不全がある。その他精神発達遅延、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、特に症例1は舌病変を、症例4は骨髄病変、性腺機能不全を伴い、テロメア異常疾患との関連も考えられた。しかし、今回の検討では変異を同定することはできなかった。これらの症状がACD遺伝子・PIP1蛋白質の異常によるものかどうかはいまのところ不明である。過去の報告では性腺以外の組織として副腎皮質はテロメラーゼ活性が生後しばらく残存する特異的臓器であることが報告されており、副腎の発生・分化とテロメアとが何らか密接なかわり存在する可能性もある。今後さらなる検討が必要である。

E. 結論

ヒトACD遺伝子が副腎低形成を起こす可能

性は少なくとも今回の研究では低いと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Okuhara K, Abe S, Kondo T, Fujita K, Koda N, Mochizuki H, Fujieda K, Tajima T. Four Japanese patients with adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism caused by DAX-1 gene mutations: mutant DAX-1 failed to repress steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and luteinizing hormone beta-subunit gene promoter activity. *Endocr J.* 55:97-103 2008.

(2) 副腎の発生・分化機構の解明

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分子生命科学系

【研究要旨】

転写因子 Ad4BP/SF-1 は副腎皮質におけるステロイドホルモン産生能を制御し、同時に副腎形成過程で重要な役割を担っている。これまでに我々は Ad4BP/SF-1 遺伝子の胎仔副腎皮質における発現を誘導する塩基配列として、胎仔副腎エンハンサー配列を同定した。そして、この配列を用いることで、Ad4BP/SF-1 を胎仔副腎において強制的に発現するトランスジェニックマウスを作成した。内在性の Ad4BP/SF-1 遺伝子も存在することから、このトランスジェニックマウスの副腎皮質では正常の発現量以上の Ad4BP/SF-1 遺伝子の発現が期待できる。興味深いことに、このマウスに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。この異所性副腎皮質形成のメカニズムについて、Ad4BP/SF-1 の発現量（遺伝子量）と胎仔副腎の大きさの観点から検討した。その結果、Ad4BP/SF-1 の発現量（遺伝子量）に応じて胎仔副腎の増大が観察された。このことは、胎仔副腎においては、Ad4BP/SF-1 の発現量が胎仔副腎皮質を構成する細胞数を決定することを示すものであった。

A. 研究目的

体を構成するすべての組織と同じように、副腎もまた一定の大きさを保っている。本研究では Ad4BP/SF-1 遺伝子の発現量（遺伝子量）が副腎皮質の大きさに与える影響を検討した。

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。このマウスには異所性に副腎皮質様の組織の形成が認められたので、副腎皮質のマーカー遺伝子として一連のステロイドホルモン産生関連遺伝子の発現を *in situ hybridization* と免疫染色にて検討した。また、Ad4BP/SF-1 の遺伝子破壊マウスならびに M33 遺伝子破壊マウスを用い、Ad4BP/SF-1 の発現量に差がある場合の副腎の形成を検討した。

(倫理面への配慮)

本実験にはトランスジェニックマウスならびに遺伝子破壊マウスを用いるが、全ての動物実験は九州大学動物実験指針に従って行なわれた。なお本研究は九州大学実験動物委員会の承認を得たものである。同様に組み替え DNA 実験については、組み替え DNA 実験委員会の承認を得たものである。

C. 研究成果

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、より頭部側に副腎皮質様の細胞集団を検出した。副腎ステロイドホルモン産生に不可欠な P450C21 の発現を *in situ hybridization* にて検討したところ、この細胞に発現が検出された。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。一方、我々は Ad4BP/SF-1 が

サイクリン D1 と E1 遺伝子の発現を介して細胞増殖を活性化することを示していた。そこで、本実験では異所性の副腎皮質の形成が、Ad4BP/SF-1 の発現量 (遺伝子量) に依存するかどうかを検討した。

まず、Ad4BP/SF-1 遺伝子破壊マウスを用い、ホモ欠損 (遺伝子量=0)、ヘテロ欠損 (遺伝子量=1)、野生型 (遺伝子量=2) について、胎仔副腎を比較したところ、ホモ欠損マウスでは消失し、ヘテロ欠損マウスでは矮小化していた。また、M33 遺伝子破壊マウスにおいては、副腎皮質における Ad4BP/SF-1 の発現量がほぼ半分減少するとともに、副腎皮質も小型化していた。そこで、Ad4BP/SF-1 遺伝子破壊マウスのヘテロ欠損において Ad4BP/SF-1 遺伝子を過剰発現させたところ、この個体の副腎には顕著な大きさの異常は認められなかった。

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必須の転写因子であることが明らかになっていた。しかしながら、Ad4BP/SF-1 がどのような機能を発揮することで副腎皮質の形成を制御しているかは不明であった。

本研究では胎仔副腎皮質特異的エンハンサーを用い、胎仔副腎の細胞で Ad4BP/SF-1 を強制発現させることで、Ad4BP/SF-1 の副腎皮質形成における影響を検討した。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 の発現量 (遺伝子量) と副腎皮質の大きさの関係を検討したところ、発現量 (遺伝子量) に応じて副腎皮質の大きさが変化することが明らかになった。以前、我々は Ad4BP/SF-1 が細胞増殖に制御に関わるサイクリン D1 と E1 遺伝子の発現を制御することを明らかにしていたが、今回の結果は Ad4BP/SF-1 の発現量がサイクリン D1 と E1 の発現を量依存的に活性化することで、最終的に細胞増殖を活性化することを示唆するものであった。一方、このような可能性の他に、Ad4BP/SF-1 の発現量の上昇が、本来は

Ad4BP/SF-1 の発現が低いため副腎皮質に成り得ない細胞が Ad4BP/SF-1 の強制発現のために副腎皮質へと分化した可能性も考えなければ成らない。

E. 結論

Ad4BP/SF-1 遺伝子の発現増加は異所性の副腎皮質形成を誘導した。Ad4BP/SF-1 を発現する副腎皮質においては、Ad4BP/SF-1 が発現量 (遺伝子量) 依存的に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. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zubair M, Parker KL, Morohashi K: Developmental links between fetal and adult adrenal cortex revealed by lineage tracing. *Mol. Cell. Biol.* 28, 7030-7040, 2008
- 2) Sakai N, Terami H, Suzuki S, Haga M, Nomoto K, Tsuchida N, Morohashi K, Saito N, Asada M, Hashimoto M, Harada D, Asahara H, Ishikawa T, Shimada F, Sakurada K: Identification of NR5A1 (SF-1/AD4BP) gene expression modulators by large-scale gain and loss of function studies. *J. Endocrinol.* 198, 489-497, 2008
- 3) Shima Y, Zubair M, Komatsu T, Oka S, Yokoyama C, Tachibana T, Hjalt TA, Morohashi K: Pitx2 directly regulates Ad4BP/SF-1 gene transcription in the pituitary gonadotrope via interaction with the intronic enhancer. *Mol. Endocrinol.* 22, 1633-1646, 2008
- 4) Sato Y, Baba T, Zubair M, Miyabayashi M, Toyama Y, Maekawa M, Owaki A, Mizusaki H, Sawamura T, Toshimori K, Morohashi K, Katoh-Fukui Y: Importance of forkhead transcription factor Fkhl18 for development of testicular vasculature. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 1361-1371, 2008
- 5) Baba T, Shima Y, Mimura J, Oshima M,

Fujii-Kuriyama Y, Morohashi K: Disruption of aryl hydrocarbon receptor (AhR) induces regression of the seminal vesicle in aged male mice. *Sex. Dev.* 2, 1-11, 2008

- 6) Ishimaru Y, Komatsu T, Kasahara M, Katoh-Fukui Y, Toyama Y, Maekawa M, Toshimori K, Chandraratna RAS, Morohashi K, Yoshioka H: Mechanism of asymmetric ovarian development in chick embryos. *Development* 135, 677-685, 2008
- 7) Kojima Y, Hayashi Y, Mizuno K, Sasaki S, Fukui F, Koopman P, Morohashi K, Kohri K: Up-regulation of SOX9 in human sex-determining region on the Y chromosome (SRY)-negative XX males. *Clin. Endocrinol.* 68, 791-799, 2008

2. 学会発表

(招待講演)

- 1) Zubair M, Parker KL, Morohashi K: Cell lineage analysis demonstrates a developmental link between mouse fetal and adult adrenal cells. 13th International Congress of Endocrinology 2008, Rio de Janeiro, Brazil Nov 9-12.
- 2) Shima Y, Miyabayashi K, Zubair M, Morohashi K: From tissue specific enhancers to mechanism of tissue differentiation. International Symposium for Sex Differentiation, Fukuoka, Japan. Sep 14-16.
- 3) Morohashi K: Purification and analysis of a factor interacting with SUMOylated Ad4BP/SF-1. 13th Adrenal Cortex Conference, San Francisco. June 11-14.

G. 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

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

赤平 純一、笹野 公伸

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

【研究要旨】

〈目的〉 Adrenarche は人類に特徴的に認められる変化であるが、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。本研究では、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することを目的とした。

〈対象と方法〉 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 例を選び検討した。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、3 β HSD による免疫染色とともに評価した。また、Ki67、Bcl2 および 17 β HSD5 による免疫染色を施行した。

〈結果〉 ZR は形態学的に 4 歳から認められはじめ、年齢増加に伴い厚くなった。男女ともに、13-20 歳の群では、4-12 歳より著しく増加した ($p < 0.01$)。また、副腎全体に占める ZR の割合は、男女共に 13-20 歳の群が 4-12 歳より高値であった ($p < 0.01$)。男女間には差はみられなかった。Ki67 陽性細胞は男性では、13-20 歳と比べ、他の二群の Labeling index (LI) が高かった ($p < 0.05$)。一方で女性は、4-12 歳の LI と比較して他の二群の LI が高かった ($P < 0.05$)。Bcl-2 陽性細胞は、年齢に関わらず束状層の外側に高頻度に認められた。HSD17B5 は、男女ともに 9 歳頃から ZR に認められ、ZR の厚さと正の相関が認められた。

〈考察〉 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ー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。

A. 研究目的

Adrenarche はホルモン動態からは副腎由来の dehydroepiandrosterone (DHEA) および DHEA-sulfate (DHEAS) の増加で特徴づけられる変化である。Adrenarche はヒトでは 6-8 歳前後で起こるとされており、DHEA の増加には副腎の三層 (球状層 [ZG]、束状層 [ZF]、網状層 [ZR]) のうち ZR が関連するとされている。そのため、adrenarche には ZR の形態を含めた変化が推定されているが、これまでに出生前の胎児の状態からその形態像について経時的に観察した報告はみられない。一方で、adrenarche

について性差が存在するかどうかについても十分に検討はされてはいない。本研究では、ZR の形態学的変化と年齢・性差を検討することで、ZR の adrenarche における役割を解明することを目的とした。またこれらの変化が生じる過程において、アポトーシスおよび細胞の増殖のバランスがどのように関わっているかについて、免疫組織学的に検討を行い、考察した。

B. 研究方法

1990 年から 2007 年までに東北大学病院および国立仙台医療センターにおいて施行された

20歳以下の剖検例 252 例のうち、死亡後 3 時間以内に解剖された症例、ステロイド剤を施用されていない症例、副腎に病変がない症例を選別し、44 例について検討した。

上記 44 例を 0-3 歳、4-12 歳、13-20 歳の 3 群に分けて、HE 標本上における ZR の厚さをマイクロメーターにより測定し、各群における差違、性別による差違について検討した。この際に、ZR の判別のため DHEA-ST (ZR に陽性) および 3β HSD (ZG, ZF に陽性) に対する抗体 (条件は以下) を用いた免疫染色を併用した (図 1)。

アポトーシスおよび細胞増殖について検討するために、それぞれ Bcl-2, Ki67 を用いた免疫染色を施行した。Ki67 の評価にはラベリングインデックス (LI) を、Bcl-2 の評価には染色陽性の範囲を Allred score に準じた 6 段階にわけて評価した。

(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

免疫染色を併用して形態学的に測定した ZR の厚さは、0-3 歳では男女ともに認められなかったが、その後男女とも 20 歳まではほぼ直線的に厚さが増加した。男女差は明確にはみられなかった (図 2)。

Ki67 による免疫染色では、男女ともに 4-12 歳の群で ZR に高発現が認められた (図 3)。

Bcl-2 の発現は、男女ともに、4-12 歳では ZF に高値で、13-20 歳では ZR に有意に高値に認められた (図 4)。

D. 考察

形態学的には、ZR の厚さは 4~6 歳ころより始まることから、ZR の肥厚開始が adrenarche の開始にはほぼ一致するものと推察された。Ki67 の結果より、年齢により副腎皮質の各層の増殖する層が異なることが示唆された。

特に 4-12 歳では ZR の増殖が盛んであると考えられた。一方で Bcl-2 の発現より、4-12 歳の群では ZR がアポトーシスに抵抗を有することが示唆され、細胞の増殖との相乗効果により、ZR の発育が促進されるものと考えられた。

以上の結果には男女差は明確には認められず、同様の傾向が認められた。

E. 結語

いわゆる adrenarche の開始前後には副腎皮質網状層が形態学的に肥厚することが確認された。

この肥厚は網状層細胞の増殖と、アポトーシス抵抗性による相乗的変化であることが免疫組織学的に裏付けられた。

F. 研究発表

・論文発表

- 1) Satoh F, Abe T, Tanemoto M, Nakamura M, Abe M, Uruno A, Morimoto R, Sato A, Takase K, Ishidoya S, Arai Y, Suzuki T, Sasano H, Ishibashi T, Ito S: Localization of aldosterone-producing adrenocortical adenomas: significance of adrenal venous sampling. *Hypertens Res*; 30: 1083-1095. 2007
- 2) Tamura Y, Adachi J, Chiba Y, Mori S, Takeda K, Kasuya Y, Murayama T, Sawabe M, Sasano H, Araki A, Ito H, Horiuchi T: Primary aldosteronism due to unilateral adrenal microadenoma in an elderly patient: efficacy of selective adrenal venous sampling. *Intern Med*; 47:37-42. 2008
- 3) Leung AM, Sasano H, Nishikawa T, McAneny DB, Malabanan AO: Multiple unilateral adrenal adenomas in a patient with primary hyperaldosteronism. *Endocr Pract*; 14:76-79. 2008
- 4) Nigawara T, Kageyama K, Sakihara S, Takayasu S, Kawahara M, Imai A, Ohyama C, Usui T, Sasano H, Suda T: A

- male case of nonclassical 21-hydroxylase deficiency first manifested in his sixties with adrenocortical incidentaloma. *Endocr J.* 55:291-297. 2008
- 5) Morimoto R, Satoh F, Murakami O, Hirose T, Totsune K, Imai Y, Arai Y, Suzuki T, Sasano H, Ito S, Takahashi K: Expression of adrenomedullin 2/intermedin in human adrenal tumors and attached non-neoplastic adrenal tissues. *J Endocrinol.* 198,175-183. 2008
- 6) Oki K, Yamane K, Sakashita Y, Kamei N, Watanabe H, Toyota N, Shigeta M, Sasano H, Kohno N: Primary aldosteronism and hypercortisolism due to bilateral functioning adrenocortical adenomas. *Clin Exp Nephrol.* 12:382-7. 2008
- 7) Baba Y, Beppu T, Imai K, Masuda T, Iyama KI, Sasano H, Baba H: A case of adrenal rest tumor of the liver: Radiological imaging and immunohistochemical study of steroidogenic enzymes. *Hepatol Res.*38:1154-1158. 2008
- 8) Murakami M, Ohba T, Xu F, Satoh E, Miyoshi I, Suzuki T, Takahashi Y, Takahashi E, Watanabe H, Ono K, Sasano H, Kasai N, Ito H, Iijima T: Modified sympathetic nerve system activity with over-expression of the voltage-dependent calcium channel beta 3 subunit. *J Biol Chem.*283:24554-24560. 2008
- 9) Morimoto R, Satoh F, Murakami O, Totsune K, Saruta M, Suzuki T, Sasano H, Ito S, Takahashi K: Expression of peptide YY in human brain and pituitary tissues. *Nutrition.* 24:878-884.2008
- 10) Nakamura Y, Gang HX, Suzuki T, Sasano H, Rainey WE: Adrenal changes associated with adrenarcho. *Rev Endocr Metab Disord.* 2008 Sep 27. [Epub ahead of print]
- 11) Nakamura Y, Suzuki T, Arai Y, Sasano H: Nuclear Receptor DAX1 in Human Prostate Cancer: A Novel Independent Biological Modulator. *Endocr J.* 2008 Oct 1. [Epub ahead of print]
- 12) Sakamoto N, Tojo K, Saito T, Fujimoto K, Isaka T, Tajima N, Ikeda K, Yamada H, Furuta N, Sasano H: Coexistence of Aldosterone-Producing Adrenocortical Adenoma and Pheochromocytoma in an Ipsilateral Adrenal Gland. *Endocr J.* 2008 Nov 20. [Epub ahead of print]
- 13) Ye P, Yamashita T, Pollock DM, Sasano H, Rainey WE: Contrasting Effects of Eplerenone and Spironolactone on Adrenal Cell Steroidogenesis. *Horm Metab Res.*41:35-39. 2009
- 14) Nakamura Y, Vargas Morris C, Sasano H, Rainey WE: DAX-1A (NR0B1A) Expression Levels are Extremely Low Compared to DAX-1 (NR0B1) in Human Steroidogenic Tissues. *Horm Metab Res.*41:30-34.2009
- 15) Sone M, Shibata H, Homma K, Tamura N, Akahira J, Hamada S, Yahata M, Fukui N, Itoh H, Sasano H, Nakao K. Close examination of steroidogenesis disorders in a DOC- and progesterone-producing adrenocortical carcinoma. *Endocrine J.* 35:25-33. 2009
- 16) Ebisawa T, Tojo K, Tajima N, Kamio M, Oki Y, Ono K, Sasano H: Immunohistochemical Analysis of 11-beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 and Glucocorticoid Receptor in Subclinical Cushing's Disease due to Pituitary Macroadenoma. *Endocr Pathol.*19:252-260. 2009
- G. 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

図1 副腎皮質網状層の形態学的測定方法

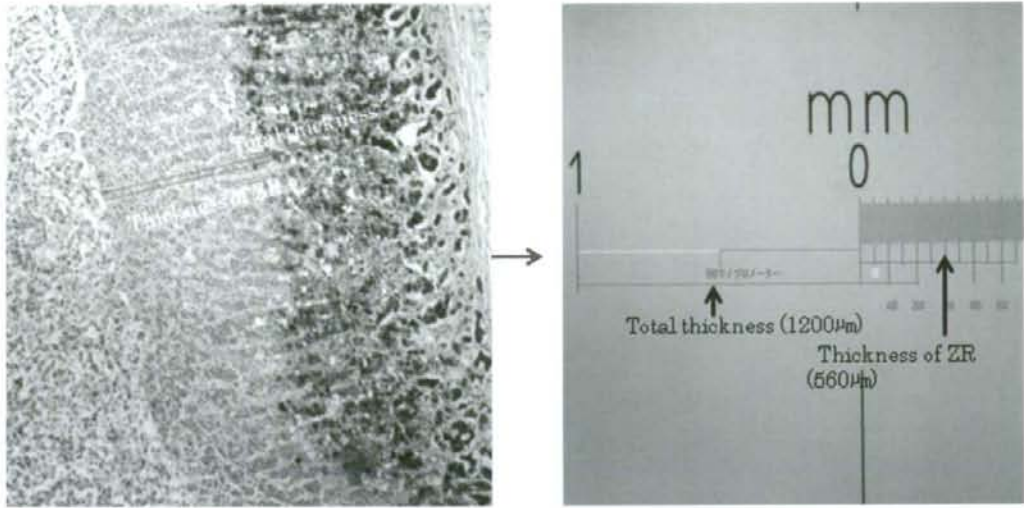


図2

