

200936017A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤 枝 憲 二

平成22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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤 枝 憲 二

平成22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 教授	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. 早産児の胎生皮質ステロイド分泌動態 —尿ステロイドプロフィルGCMS法による横断的解析—	12
慶應義塾大学医学部小児科	長谷川奉延
2. 優性遺伝形式をとる非古典的StAR欠損症の発症機序の解明	17
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	勝又規行
(2) 副腎の発生・分化機構の解明	
3. 副腎皮質の発生初期過程に関する研究	23
九州大学大学院医学研究院分子生命科学系	諸橋憲一郎
4. Yeast two-hybrid systemを用いたDAX-1相互作用因子同定の試み	27
旭川医科大学小児科	藤枝憲二、向井徳男、鈴木 滋
(3) 副腎再生による新しい副腎不全治療法の開発	
5. ステロイド産生細胞の分化再生に関する研究	30
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

6. 日本内分泌学会 原発性アルドステロン症検討委員会報告 35
横浜労災病院内分泌代謝内科

西川哲男

7. 超選択的 ACTH 負荷副腎静脈採血による原発性アルドステロン症と
コルチゾール産生腺腫合併例の診断法の検討 50

横浜労災病院

*総合診断部、**東京北社会保健病院放射線科、

放射線 IVR 科、*内分泌代謝内科

大村 昌夫*、牧田 幸三**、松井 青史***、西川 哲男****

8. 原発性アルドステロン症の全国調査と
肥満合併原発性アルドステロン症の検討 56

京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科

田村尚久

9. 原発性アルドステロン症患者の薬物治療
: ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬による糖質及び脂質への影響 63

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

10. 原発性アルドステロン症における腎障害 68

慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科

柴田洋孝

11. 原発性アルドステロン症における過形成副腎球状層における
アンギオテンシン II 応答遺伝子発現の検討 75

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

中村保宏、笹野公伸

12. アルドステロン産生腺腫におけるセロトニン受容体 5-HT4R の解析 82

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

13. 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 88

東京大学分子細胞生物学研究所

加藤茂明

14. 骨格筋におけるグルココルチコイド標的遺伝子に関する研究 94
東京大学医科学研究所先端医療研究センター

田中廣壽、吉川賢忠

東京大学医科学研究所附属病院

清水宣明

15. 偽性低アルドステロン症1型(Pseudohypoaldosteronism, PHA 1)10例の
ミネラルコルチコイド受容体遺伝子解析 99

北海道大学大学院医学研究科生殖発達医学分野小児科学講座

田島敏広

(6) 副腎癌の診断・治療法の検討

16. 副腎偶発腫として発見されたコルチゾール産生腺腫の解析 103
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

17. 18F-FDG PET/CT による副腎腫瘍の鑑別診断 107
東北大学病院 腎・高血圧・内分泌科

佐藤文俊

18. 自験の副腎腺腫症例に基づく副腎性サブクリニカルクッシング症候群
診断基準の再評価の試み 113

福岡大学医学部 内分泌・糖尿病内科学

柳瀬敏彦

(7) 副腎ホルモン産生異常症の全国疫学調査

19. 副腎ホルモン産生異常症の全国疫学調査(中間報告) 122
旭川医科大学小児科

藤枝憲二、向井徳男

V. 会議記録

平成21年度研究報告会プログラム 153

VI. 研究成果の刊行に関する一覧表 171

I. 序 文

追 悼



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」班

研究代表者 旭川医科大学小児科

藤枝 憲二 教授

平成 22 年 3 月 19 日午前 1 時 26 分に永眠されました。

本研究班に対し多大なご尽力をいただいた御功績に感謝し、
故人のご冥福を心よりお祈り申し上げます。

研究班構成員一同

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 年間に引き続き、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ております。

本研究班では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。これまでの研究成果を基に、引き続き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 21 年度研究報告会を平成 21 年 12 月 11 日 (金) に東京で開催し、多くの成果について報告がなされました。

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 22 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

「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科学講座分子生体情報学	教 授
	柳瀬 敏彦	福岡大学医学部内分泌・糖尿病内科学	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	佐藤美喜子	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

副腎ホルモン産生異常に関する調査研究

研究代表者 藤枝憲二
旭川医科大学小児科 教授

研究要旨

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

早産児の胎生皮質ステロイド分泌ピークは在胎 33-34 週以下の群に存在し、分泌ピークの時期は生後 4-11 週または修正 35-40 週の間で、分泌ピークの高さは在胎週数が少ないほど高いことがわかった。すなわち、より未熟な早産児において、修正週数依存性の胎生皮質退縮の前に、在胎週数依存性の胎生皮質分泌増加が存在すると考えられた。

非古典型先天性副腎リポイド過形成症の男子において昨年度同定した STAR 遺伝子のヘテロ接合性 IVS1-2A>G 変異が本症を発症する機序は、野生型 StAR のコレステロールとの結合あるいはそのミトコンドリア内膜へ移行を競合阻害して、ステロイド産生能を低下させ、優性遺伝性 StAR 欠損症を発症すると考えられた。ヒトにおいて、StAR のミトコンドリア移行シグナルは *in vivo* の StAR 活性に必須であり、StAR 欠損症には臨床的多様性が認められるばかりでなく、遺伝的にも多様性が認められることが明らかとなった。

(2) 副腎の発生・分化機構の解明

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転写因子 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（胎仔副腎エンハンサー配列）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ところ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検討した結果、この異所性副腎皮質は成獣期にも存在するが、本来の副腎皮質と同様に胎仔（胎児）型から成獣（成人）型へと転換することが分かった。

X 連鎖性先天性副腎低形成症の原因遺伝子として同定されている DAX-1 (NR0B1) と相互作用する因子の同定することを目的に作製したヒト副腎由来 cDNA ライブラリーに対して、yeast two-hybrid system を用いたスクリーニングを行った。その結果、2 種の候補因子を同定し、DAX-1 の転写抑制作用に与える影響などについての検討を行ったがこれまでのところ有意な変化は見出せていない。

(3) 副腎再生による新しい副腎不全治療法の開発

ヒト骨髄間葉系幹細胞に SF-1 および LHR-1 を安定導入することにより生じる、StAR 遺伝子をはじめとするステロイド合成関連遺伝子上でのクロマチン構造変化を、ルシフェラーゼアッセイ、ChIP アッセイ、3 C アッセイ等を用いて解析した。その結果、StAR 遺伝子上流に SF-1 が結合する新たなエンハンサー領域を同定した。このエンハンサー領域は、プロモーター領域とループ構造をとり、プロモーター領域と同様のクロマチン構造変化を伴うエピジェネティックな修飾を受けていることが明らかとなった。

(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のガイドライン作成について討議を重ね、本研究班として最終的なガイドラインを作成した。このガイドラインは日本人の本疾患に関するエビデンスを元に構成されていることが特徴の一つであり、一般医家、さらには内分泌代謝あるいは高血圧循環器領域の専門医師にとっても本疾患の診療の際には直ちに役立つ有益な情報を記したものである。

超選択的ACTH負荷副腎静脈採血(SS-ACTH-AVS)によるPAとコルチゾール産生腺腫(CPA)の診断法を検討した結果、副腎中心静脈および静脈分枝でのACTH刺激後のアルドステロン1400ng/dl、コルチゾール380 μ g/dlをカットオフ値とすることで、PAとCPAの局在診断が可能となった。SS-ACTH-AVSを用いた診断によりCPAとPAの合併例での両側副腎部分切除による治療の可能性が示唆された。

PAの臨床所見に与える肥満の影響を検討する目的で他の内分泌疾患を合併しないPA患者について、各検査値とbody mass index (BMI)の関係を検討した結果、アルドステロン産生腺腫(APA)患者で片側副腎摘除後の高血圧治癒率が高いとされる血漿アルドステロン濃度-血漿レニン活性比と尿中アルドステロン排泄量-血漿レニン活性比は、BMIと有意の負相関を示した。

PA患者での内臓脂肪量を測定し、ミネラルコルチコイド受容体(MR)拮抗薬の治療による血圧、糖質、脂質及び内臓脂肪量及ぼす影響について検討を行った結果、ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬の治療により体重や脂質を介さない内臓脂肪量の減少効果が観察され、今後心血管系の合併症予防の機序との関連が注目された。

PAの手術療法および薬物療法の有用性につき、アルドステロン分泌量により階層化して比較検討した結果、尿中アルドステロン $<20\mu$ g/日の症例では、薬物療法でも手術と同等の治療効果がみられたが、尿中アルドステロン $\geq 20\mu$ g/日の症例では手術療法の方が有効性が高かった。

PAの発症機序は、特発性アルドステロン症(IHA)及びアルドステロン産生性副腎皮質腺腫(APA)を背景としたアルドステロン過剰産生であり、APAとIHAの最終鑑別診断ではIHA球状層(ZG)のhyperplasiaとAPAの付随副腎ZGでのparadoxical hyperplasiaの鑑別が重要であるが、両者でのアルドステロン産生や細胞増殖に関わる因子の発現はほとんど解明されていない。アンギオテンシンII(ATII)の応答遺伝子のうち上記の機能に関与する因子の発現程度を両者で検討することで、組織診断への有用性を模索することを目的として、ATII応答遺伝子EGR1の発現を免疫染色で比較検討した。結果、免疫組織学的にEGR1の発現低下がAPAの付随副腎やIHAのZGでみられており、レニン・アンギオテンシン系抑制の影響である可能性が考えられた。

アルドステロン産生腺腫(APA)へのセロトニン受容体(5-HT₄R)の関与をAPA、非機能性腺腫(NF)、副腎皮質で検討した結果、APAの腺腫発生にもセロトニンが関与する可能性が示され、スクリーニングが困難とされるAPA患者の新たな診断法としてセロトニン受容体刺激試験が有用である可能性も示唆された。

(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レセプター(GR)の抗炎症作用におけるAP-1転写抑制メカニズムを明らかにするため、その主要構成因子であるc-JunとGRの機能制御因子を生化学的手法を用いて解析した結果、AP-1の転写抑制メカニズムは2ステップの制御によって行われており、グルココルチコイド依存性のc-Jun蛋白のSumo化が転写抑制のトリガーとなり、その後ヒストンH3K27のメチル化酵素EZH2を含む複合体がリクルートされることによって、可逆的な転写抑制状態が作られることが明らかとなった。

骨格筋におけるグルココルチコイド(GC)-GR系の標的遺伝子を明確にし、ステロイド筋症の分子機構を詳細に解明することを目的として、ステロイド筋症モデルを作成して解析を

行った。その結果、GCによる筋萎縮はGC-GR系を介した多くの遺伝子の協調的な発現増強によって、mTOR抑制によるタンパク合成の低下とE3リガーゼ活性上昇によるユビキチンプロテアゾーム系の活性化を介しておこることが判明した。

偽性低アルドステロン症 (PHA) 1型は腎尿細管におけるNa再吸収障害がおこる状態で、腎臓型の原因としてミネラルコルチコイド受容体(MR)異常がある。腎臓型のPHA1型の病態と診断された症例についてMR遺伝子の解析を行ったところ、早期産児や尿路感染症の症例ではMR遺伝子変異は同定できなかったが、正常産の2例で変異を同定し、機能解析では両変異とも機能を喪失していた。

(6) 副腎癌の診断・治療法の検討

1999年度より5年間にわたり、副腎偶発腫についての全国疫学調査を行い、報告を受けた偶発腫3,678例のうちSubclinical Cushing症候群を含むCushing症候群386例(10.5%)の集計結果をもとに、副腎偶発腫として発見されたコルチゾール産生腺腫の解析を行なった。平均年齢は 55.4 ± 13.3 歳、男女比3:7で、病側は左右差なく、診断時平均腫瘍径は 2.8 ± 1.4 cmであった。血清コルチゾールは $17.6 \pm 20.1 \mu\text{g/dl}$ 、高値例23%、正常値例76%、低値例1%で、1mgデキサメサゾン抑制試験(243例で施行)では抑制なしが65%、ありが35%であった。一方、血漿ACTHは $29.3 \pm 58.4 \text{pg/ml}$ で低値例26%、正常値例59%、高値例3%、未測定例12%であった。さらにコルチゾールの日内変動(137例で施行)は、ありが29%、なしが71%であった。アドステロールシンチでの病側への集積または健側の取込み低下を示したものは159例であった。また、Subclinical Cushing症候群であったと考えられるのは23%であった。副腎偶発腫が発見された場合、約10%にCushing症候群が認められ、そのうちの約20%がSubclinical Cushing症候群であり、基礎値のみでは診断されない可能性がある。Cushing症候群は、二次性に糖尿病、高血圧症、高脂血症などメタボリックシンドロームを来す代表的疾患であり、その対策の重要性が強調され、早期の的確な診断と治療が必要であると考えられた。

副腎腫瘍の質的診断、特に良悪性の鑑別診断における ^{18}F -FDG/PET-CTの有用性について、病理診断の確定した副腎腫瘍症例を対象として検討した。その結果、SUV maxはアルドステロン産生腺腫と非機能性腺腫において副腎皮質癌に比し有意差を認めた。副腎皮質腫瘍を対象とした検討では、SUV maxと腫瘍径に有意な相関を認めた。加えて、副腎皮質腺腫と副腎皮質癌を対象にROC曲線による解析の結果、SUV max 6.0をカットオフ値とすると、感度99.5%・特異度98.2%であった。以上から ^{18}F -FDG/PET-CTによるSUV maxは副腎腫瘍、特に皮質腫瘍における良悪性の鑑別診断において有用である可能性が示唆された。

副腎性サブクリニカルクッシング症候群(SCS)の新しい診断基準案の作成を試みた。Dex 1mg 負荷後コルチゾール値 $1.8 \mu\text{g/dL}$ 以上をスクリーニング基準として、さらに早朝ACTH値 10.0pg/mL 未満かつ21~23時の血中コルチゾール値 $5.0 \mu\text{g/dL}$ 以上を満たすことを新診断基準の骨子として作成した。さらに例外症例の存在から、CRH負荷におけるACTH反応性の低下もACTH抑制の目安として補足的な意味で重要と考え、確定項目の一つとして採用した。最終的に①早朝ACTH基礎値 10.0pg/mL 未満、②夜間F値 $5.0 \mu\text{g/dL}$ 以上、③CRH負荷でACTHの反応低下のうち、①+②または②+③を満たすものをSCSと診断することとした。また今回、高コルチゾール血症により起こりうる病態との関連性を検討した結果、本診断基準を満たす症例群では耐糖能異常が高率に認められることが明らかとなった。

(7) 副腎ホルモン産生異常症の全国疫学調査

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て、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、 11β -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。しかし、回収率が低いいため追加調査を行い、50%超まで引き上げた。未回答施設に対する追加調査を継続すると同時に二次調査を行っている。

共同研究者

- 諸橋 憲一郎 (九州大学大学院医学研究院分子生命科学機能高分子設計学)
宮本 薫 (福井大学医学部分子生体情報)
柳瀬 敏彦 (福岡大学医学部内分泌糖尿病内科)
長谷川 奉延 (慶應義塾大学医学部小児科)
田島 敏広 (北海道大学大学院医学研究科小児科)
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)
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)
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)
西川 哲男 (横浜労災病院内分泌代謝内科)
柴田 洋孝 (慶應義塾大学医学部内科)
笹野 公伸 (東北大学大学院医学系研究科病理診断学)
宮森 勇 (福井大学医学部第3内科)
武田 仁勇 (金沢大学大学院医学系研究科分子病態内科)
上芝 元 (東邦大学医学部内科学糖尿病代謝内分泌科)
田村 尚久 (京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科)
佐藤 文俊 (東北大学病院腎高血圧内分泌科)

A. 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

・早産児胎生皮質ステロイド分泌ピークの有無・時期・高さが、在胎週数・生後週数・修正週数のいずれに依存するのか明らかにすることを目的に、早産児の胎生皮質ステロイド分泌動態について尿ステロイドプロファイル GCMS 法による横断的解析を行った。その結果、早産児の胎生皮質ステロイド分泌ピークは在胎 33-34 週以下の群に存在し、分泌ピークの時期は生後 4-11 週または修正 35-40 週の間で、分泌ピークの高さは在胎週数が少ないほど高いことがわかった。すなわち、より未熟な早産児において、修正週数依存性の胎生皮質退縮の前に、在胎週数依存性の胎生皮質分泌増

加が存在すると考えられた。(長谷川)

・非古典型先天性副腎リポイド過形成症の男子において昨年度同定した STAR 遺伝子のヘテロ接合性 IVS1-2A>G 変異が、本症を発症する機序について検討した。ノーザンブロット、RT-PCR 解析により、変異 STAR mRNA は、第 2 エクソンをスキップすることが明らかになり、第 2 エクソンがコードするコドン 22 から 59 までを欠失する変異蛋白 ($\Delta E2$ StAR) を生じると予想された。ウエスタンブロット解析により、 $\Delta E2$ StAR は、30 kDa の大きさで、おもにサイトゾルに存在することが明らかになった。野生型 StAR は、ミトコンドリアに移送された後に、プロセッシングを受け、分解される。一方、 $\Delta E2$ StAR は、コレステロール結合能を保持しているが、ミトコンドリア移行シグナルを欠如するため、ミトコンドリアへの移行、分解を免れる。したがって、患者のステロイド産生細胞では、 $\Delta E2$ StAR が大半を占めるようになり、野生型 StAR のコレステロールとの結合あるいはそのミトコンドリア内膜へ移行を競合阻害して、ステロイド産生能を低下させ、優性遺伝性 StAR 欠損症を発症すると考えられた。ヒトにおいて、StAR のミトコンドリア移行シグナルは *in vivo* の StAR 活性に必須であり、StAR 欠損症には臨床的多様性が認められるばかりでなく、遺伝的にも多様性が認められることが明らかとなった。

(勝又)

(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研究を行った。

・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。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 (胎仔副腎エンハンサー配列) 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ところ本来の副腎

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検討した結果、この異所性副腎皮質は成獣期にも存在するが、本来の副腎皮質と同様に胎仔 (胎児) 型から成獣 (成人) 型へと転換した。副腎発生の初期過程における細胞分裂を調べたところ、副腎細胞数の増加を説明するような細胞分裂の増加は観察できなかった。このことは、本研究で調べた時期より更に早い時期に分裂が亢進していたか、もしくは野生型であれば Ad4BP/SF-1 発現量が少ないため副腎皮質として分化しない細胞に Ad4BP/SF-1 を強制発現したために副腎皮質として運命決定された細胞が存在するか、を示唆する。いずれの可能性においても、このトランスジェニックマウスでは副腎皮質の分化の極めて初期に副腎皮質の増大が完了していることが分かった。

(諸橋)

・X 連鎖性先天性副腎低形成症の原因遺伝子として同定されている DAX-1 (NROB1) は、副腎のみならず生殖腺の分化・形成において重要な働きを有する一方、ステロイド産生においても重要な転写因子である。そのため、DAX-1 と相互作用する因子を新たに同定し、疾患との関連や、ステロイド産生における機能について検討することを目的とした。作製したヒト副腎由来 cDNA ライブラリーに対して、yeast two-hybrid system を用いたスクリーニングを行った。その結果、2 種の候補因子を同定し、検証を行った。DAX-1 の転写抑制作用に与える影響などについての検討を行った結果、残念ながらこれまでのところ有意な変化は見出せていない。今後、他のプロモーターを用いた検討を続けるとともに、それらの発現様式などについても検討していきたい。

(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。

・副腎皮質ホルモン産生細胞への分化メカニズムを明らかにし、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目的で、ヒト骨髄間葉系幹細胞に SF-1 および LHR-1 を安定導入することにより生じる、StAR 遺伝子をはじめとするステロイド合成関連遺伝子上でのクロマチン構造変化を、ルシフェラーゼアッセイ、ChIP アッセイ、3C アッセイ等を用いて解析した。その結果、StAR 遺伝子上流に SF-1 が結合する新たなエンハンサー領域を同定した。このエンハンサー領域は、プロモーター領域とループ構造をとり、プロモーター領域と同様のクロマチン構造変化を伴うエピジェネティックな修飾を受けていることが明らかとなった。すなわち、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明らかとなった。(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。日本内分泌学会と合同で診断基準を作成した。

・PA のガイドライン作成について討議を重ね、平成 21 年 6 月～8 月にかけて日本内分泌学会評議員のパブリックコメントを求め、同時に本研究班による査読を経た後、最終的なガイドラインを作成した。このガイドラインは日本人の本疾患に関するエビデンスを元に構成されていることが特徴の一つであり、一般医家、さらには内分泌代謝あるいは高血圧循環器領域の専門医師にとっても本疾患の診療の際には直ちに役立つ有益な情報を記したものである。(西川)

・超選択的 ACTH 負荷副腎静脈採血 (SS-ACTH-AVS) による PA とコルチゾール産生腺腫 (CPA) の診断法を検討した。その結果、副

腎中心静脈および静脈分枝での ACTH 刺激後のアルドステロン 1400ng/dl、コルチゾール 380 μg/dl をカットオフ値とすることで、PA と CPA の局在診断が可能となった。SS-ACTH-AVS を用いた診断により CPA と PA の合併例での両側副腎部分切除による治療の可能性が示唆された。(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する目的で他の内分泌疾患を合併しない PA 患者 36 例について、各検査値と body mass index (BMI) の関係を検討した。結果、アルドステロン産生腺腫 (APA) 患者で片側副腎摘除後の高血圧治癒率が高いとされる血漿アルドステロン濃度-血漿レニン活性比と尿中アルドステロン排泄量-血漿レニン活性比は、BMI と有意の負相関を示した。APA 患者において片側副腎摘除後に高血圧が治癒したのは、非肥満群 12 例中 10 例、肥満群 4 例中 2 例であった。これにより、肥満を伴う APA 患者では片側副腎摘除で高血圧が治癒しにくい可能性が示唆された。(田村)

・PA 患者での内臓脂肪量を測定し、ミネラルコルチコイド受容体 (MR) 拮抗薬の治療による血圧、糖質、脂質及び内臓脂肪量及ぼす影響について検討を行った。スピロノラクトン投与群及びエプレレノン投与群で治療前の血圧、血清カリウム、PRA、PAC に関して有意差を認めなかった。抗アルドステロン薬により収縮血圧、拡張期血圧とも有意に低下した。また血清カリウムは増加したが、正常範囲内であった。2 群間で検討したが薬剤による差異は見られなかった。スピロノラクトンまたはエプレレノン投与により腹囲、皮下脂肪量には有意の変化が見られなかったが、内臓脂肪量は有意に減少した。eGFR には変動なく PRA は有意に増加した。治療により体重、腹囲、BMI、皮下脂肪量、FPG、HbA1c、総コレステロール、中性脂肪、HDL コレステロール、

LDL コレステロール値には有意の変動がなかった。これらの結果から、PA においてはミネラルコルチコイド受容体拮抗薬の治療により体重や脂質を介さない内臓脂肪量の減少効果が観察され、今後心血管系の合併症予防の機序との関連が注目された。(武田)

・PA の手術療法および薬物療法の有用性につき、アルドステロン分泌量により階層化して比較検討した。その結果、尿中アルドステロン $<20\mu\text{g}/\text{日}$ の症例では、両治療法ともに高血圧、低K血症、蛋白尿はほぼ同等の改善効果を認めたが、尿中アルドステロン $\geq 20\mu\text{g}/\text{日}$ の症例では、手術療法の方が効果的であった。eGFR の治療後の低下は、手術療法とスピロラクトン治療で低下したが、エプレレノン治療では低下を認めなかった。一方、蛋白尿はいずれの治療も減少を認めた。結論として尿中アルドステロン $<20\mu\text{g}/\text{日}$ の症例では、薬物療法でも手術と同等の治療効果がみられたが、尿中アルドステロン $\geq 20\mu\text{g}/\text{日}$ の症例では手術療法の方が有効性が高かった。(柴田)

・PA の発症機序は、特発性アルドステロン症 (IHA) 及びアルドステロン産生性副腎皮質腺腫 (APA) を背景としたアルドステロン過剰産生である。APA と IHA の最終鑑別診断では、IHA 球状層 (ZG) の hyperplasia と APA の付随副腎 ZG での paradoxical hyperplasia の鑑別が重要であるが、両者でのアルドステロン産生や細胞増殖に関わる因子の発現はほとんど解明されていない。アンギオテンシン II (ATII) の応答遺伝子のうち上記の機能に関与する因子の発現程度を両者で検討することで、組織診断への有用性を模索することを目的として、ATII 応答遺伝子でアルドステロン合成酵素の発現に関与する NGFIB および細胞増殖を調節する EGR1 の発現を免疫染色で比較検討した。結果、NGFIB は、各群において ZG での発現が ZF に比べ有意に高値であった。APA の付随副腎や IHA の ZG での発現は正常副腎の

ZG に比べ有意に高値であった。また、IHA の ZG での発現は APA の付随副腎 ZG に比べ有意に高値であった。EGR1 は、正常副腎では ZG での発現が ZF に比べ有意に高値であったが、他群では有意差は無かった。APA の付随副腎や IHA の ZG での発現が、正常副腎の ZG に比べ有意に低値であった。これらの結果より、免疫組織学的に EGR1 の発現低下が APA の付随副腎や IHA の ZG でみられており、レニン・アンギオテンシン系抑制の影響である可能性が考えられた。一方で、両者特に IHA の ZG では NGFIB の発現がレニン・アンギオテンシン系の抑制とは別の調節経路により誘導され、アルドステロン合成に関わる HSD3B2 や CYP11B2 の発現調節に関与している可能性が示唆された。(笹野)

・アルドステロン産生腺腫 (APA) へのセロトニン受容体 (5-HT₄R) の関与を APA、非機能性腺腫 (NF)、副腎皮質で検討した。結果として、APA での 5-HT₄R mRNA の発現は NF、正常副腎皮質に比べ有意に高かった。また、GIP 受容体の発現は 3 群間に差異はなかった。副腎皮質ではアルドステロン分泌がセロトニンで刺激されるが、この結果は APA の腺腫発生にもセロトニンが関与する可能性を想定した。スクリーニングが困難とされる APA 患者の新たな診断法としてセロトニン受容体刺激試験が有用である可能性も示唆された。(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レセプター (GR) は炎症反応を制御する主要な核内受容体であり、その主な抗炎症メカニズムは炎症制御転写因子 AP-1 や NF- κ B のリガンド依存性の転写抑制であることが知られている。しかし、抗炎症作用メカニズムの理解には未だにコンセンサスが得られていない。その中の AP-1 転写抑制メカニズムを明らかにするため、マクロファージ由来の細胞 (THP-1, Raw264.7 細胞) を用いて、AP-1 主要構成因子である c-Jun と GR の

機能制御因子を生化学的手法を用いて核内でのエピゲノミックな制御メカニズムについて解析している。AP-1 の転写抑制メカニズムは2ステップの制御によって行われており、1) グルココルチコイド依存性の c-Jun 蛋白の Sumo 化が転写抑制のトリガーとなり、2) その後ヒストン H3K27 のメチル化酵素 EZH2 を含む複合体がリクルートされることによって、可逆的な転写抑制状態が作られることを明らかにした。(加藤)

・骨格筋におけるグルココルチコイド (GC)-GR 系の標的遺伝子を明確にし、ステロイド筋症の分子機構を詳細に解明することを目的として、ラットにデキサメタゾン DEX 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重を腹腔内注射することによりステロイド筋症モデルを作成し、腓腹筋とヒラメ筋を採取し、RNA、タンパク、クロマチン免疫沈降法、組織学的解析を行った。その結果、GR 発現量は1型であるヒラメ筋に比して2型である腓腹筋で有意にかつた。ラット骨格筋における GC-GR 系標的遺伝子として REDD1、KLF15 を新たに同定した。DEX 投与後骨格筋における mTOR 活性は低下していた。外来性 KLF15 導入により、アミノ酸分解の律速段階を規定する BCAT2 の遺伝子発現、酵素活性は増加し、atrogin-1、MuRF1 遺伝子の mRNA 発現も増加していた。これらの結果から GC による筋萎縮は GC-GR 系を介した多くの遺伝子の協調的な発現増強によって、mTOR 抑制によるタンパク合成の低下と E3 リガーゼ活性上昇によるユビキチンプロテアゾーム系の活性化を介しておこることが判明した。(田中)

・偽性低アルドステロン症 (PHA) 1 型は腎尿細管における Na 再吸収障害がおこる状態で、腎臓型の原因としてミネラルコルチコイド受容体 (MR) 異常がある。新生児、未熟児あるいは尿路感染症時に MR 不応を経験することがある。腎臓型の PHA1 型の病態と診断された 10 例について MR 遺伝子の解析を行ったところ、早期産児や尿路感染症の症例では MR 遺伝

子変異は同定できなかったが、正常産の 2 例で、変異を同定し (R651X、R947X)、機能解析では両変異とも機能を喪失していた。ヒト胎児における MR の発現を検討した報告では、24 週令では発現が認められたが、30 週令では発現が低下、出生時には発現は殆ど認めなかった。従って、早産児、未熟児にみられる PHA1 型は MR の発現の減少が根底にあると思われた。(田島)

(6) 副腎癌の診断・治療法の検討

・1999 年度より 5 年間にわたり、副腎偶発腫についての全国疫学調査を行い、報告を受けた偶発腫 3,678 例のうち Subclinical Cushing 症候群を含む Cushing 症候群 386 例 (10.5%) の集計結果をもとに、副腎偶発腫として発見されたコルチゾール産生腺腫の解析を行なった。平均年齢は 55.4 ± 13.3 歳、男女比 3 : 7 で、病側は左右差なく、診断時平均腫瘍径は $2.8 \pm 1.4\text{cm}$ であった。血清コルチゾールは $17.6 \pm 20.1 \mu\text{g}/\text{dl}$ 、高値例 23%、正常値例 76%、低値例 1% で、1mg デキサメサゾン抑制試験 (243 例で施行) では抑制なしが 65%、ありが 35% であった。一方、血漿 ACTH は $29.3 \pm 58.4\text{pg}/\text{ml}$ で低値例 26%、正常値例 59%、高値例 3%、未測定例 12% であった。さらにコルチゾールの日内変動 (137 例で施行) は、ありが 29%、なしが 71% であった。アドステロールシンチでの病側への集積または健側の取込み低下を示したものは 159 例であった。また、Subclinical Cushing 症候群であったと考えられるのは 23% であった。副腎偶発腫が発見された場合、約 10% に Cushing 症候群が認められ、そのうちの約 20% が Subclinical Cushing 症候群であり、基礎値のみでは診断されない可能性がある。Cushing 症候群は、二次性に糖尿病、高血圧症、高脂血症などメタボリックシンドロームを来す代表的疾患であり、その対策の重要性が強調され、早期の的確な診断と治療が必要であると考えられた。(上芝)

・副腎腫瘍の質的診断、特に良悪性の鑑別診断における 18F-FDG/PET-CT の有用性について、病理診断の確定した副腎腫瘍 62 症例を対象として検討した。その結果、SUV max はアルドステロン産生腺腫と非機能性腺腫において副腎皮質癌に比し有意差を認めた。副腎皮質腫瘍を対象とした検討では、SUV max と腫瘍径に有意な相関を認めた。加えて、副腎皮質腺腫と副腎皮質癌を対象に ROC 曲線による解析の結果、SUV max 6.0 をカットオフ値とすると、感度 99.5%・特異度 98.2% であった。以上から 18F-FDG/PET-CT による SUV max は副腎腫瘍、特に皮質腫瘍における良悪性の鑑別診断において有用である可能性が示唆された。

(佐藤)

・症例群の解析から、副腎性サブクリニカルクッシング症候群 (SCS) の新しい診断基準案の作成を試みた。Dex 1 mg 負荷後コルチゾール値 1.8 μ g/dL 以上をスクリーニング基準として、さらに早朝 ACTH 値 10.0pg/mL 未満かつ 21~23 時の血中コルチゾール値 5.0 μ g/dL 以上を満たすことを新診断基準の骨子として作成した。さらに例外症例の存在から、CRH 負荷における ACTH 反応性の低下も ACTH 抑制の目安として補足的な意味で重要と考え、確定項目の一つとして採用した。最終的に①早朝 ACTH 基礎値 10.0pg/mL 未満、②夜間 F 値 5.0 μ g/dL 以上、③CRH 負荷で ACTH の反応低下のうち、①+②または②+③を満たすものを SCS と診断することとした。また今回、高コルチゾール血症により起こりうる病態との関連性を検討した結果、本診断基準を満たす症例群では耐糖能異常が高率に認められることが明らかとなった。(柳瀬)

(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 年間に於ける対象疾患(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。しかし、回収率が低いため追加調査を行い、50%超まで引き上げたが、未回答施設に対する追加調査を継続すると同時に二次調査を行っている。平成 22 年度には解析を終了する計画である。

E. 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った。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし