

201024009A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 梶野浩樹

平成23(2011)年4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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 梶野浩樹

平成23(2011)年4月

目次

I. 研究班構成員名簿	1
II. 総括研究報告書	2
研究代表者：旭川医科大学小児科 准教授 梶野浩樹	
III. 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. 液体クロマトグラフータンデム型質量分析計を用いた 新生児血清 testosterone, dihydrotestosterone 基準範囲設定	13
慶應義塾大学医学部小児科 准教授 長谷川奉延	
2. 非古典的 StAR 欠損症の新規 2 家系の分子遺伝学的、臨床的解析	18
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	
3. 21-水酸化酵素欠損症の成長予後に関する検討	23
北海道大学大学院医学研究科小児科学分野 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	25
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. 原発性アルドステロン症での過形成副腎球状層における HSD3B2 の転写調節因子発現の検討	27
東北大学大学院医学系研究科病理病態学 中村 保宏、笹野 公伸	
(3) 副腎再生による新しい副腎不全治療法の開発	
6. 副腎皮質の再生機構の分子基盤の解明	33
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

7. 原発性アルドステロン症の診断治療ガイドライン-2009- 37

日本内分泌学会 原発性アルドステロン症検討委員会

西川哲男、大村昌夫、佐藤文俊、柴田洋孝、高橋克敏、田辺晶代、田村尚久、齋藤淳

8. 日本内分泌学会「原発性アルドステロン症の診断治療ガイドライン-2009-」の原発性アルドステロン症診断基準の当院患者における検討 43

京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科

田村尚久

9. アルドステロン産生のエピジェネティクス-アルドステロン産生腺腫での検討 49

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

10. 原発性アルドステロン症の病型診断における副腎静脈血中
18-水酸化ステロイドの役割 52

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の局在診断における副腎静脈サンプリング血中の
18 - oxocortisol 濃度測定の臨床的意義と課題 57

東北大学病院腎高血圧内分泌科

佐藤文俊

12. アルドステロン産生腺腫患者の内臓脂肪におけるグルコ及び
ミネラルコルチコイドホルモン受容体, 11 β -HSD1, 2 遺伝子発現 59

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 64

東京大学分子細胞生物学研究所

加藤茂明

14. グルココルチコイド作用調節機構に関する研究
~骨格筋におけるグルココルチコイド標的遺伝子の同定とその機能の解明 70

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、清水宣明

(6) 副腎癌の診断・治療法の検討

15. 副腎偶発腫として発見された褐色細胞腫の解析 76
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
東邦大学医学部健康推進センター
齋藤毅寧
16. 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
—デキサメタゾン抑制試験0.5mgと1.0mg 負荷の比較検討— 81
福岡大学医学部 内分泌・糖尿病内科学
柳瀬敏彦、明比祐子
九州大学医学部医学研究院 病態制御内科学
高柳涼一

(7) 副腎ホルモン産生異常症の全国疫学調査

17. 副腎ホルモン産生異常症の全国疫学調査 89
旭川医科大学小児科
藤枝憲二、梶野浩樹、棚橋祐典、鈴木滋
旭川医科大学健康科学講座
西條泰明
旭川厚生病院小児科
向井徳男
18. 原発性アルドステロン症の全国における実態調査 103
横浜労災病院内分泌・代謝内科
西川哲男
京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科
田村尚久
東北大学病院腎高血圧内分泌科
佐藤文俊
慶応義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科
柴田洋考
金沢大学大学院医学系研究科臓器機能制御学
武田仁勇
福井大学医学部病態制御医学講座内科学
宮森 勇
19. アジソン病、副腎性サブクリニカルクッシング症候群の全国における実態調査 117
福岡大学医学部 内分泌・糖尿病内科学
柳瀬敏彦

旭川医科大学小児科

藤枝憲二、梶野浩樹、棚橋祐典、鈴木滋

旭川厚生病院小児科

向井徳男

20. 副腎ホルモン産生異常に関する調査研究班による褐色細胞腫の疫学調査
..... 125

国立病院機構 京都医療センター 内分泌代謝高血圧研究部

成瀬 光栄

21. 先天性副腎酵素異常症、先天性副腎低形成症の全国における実態調査 127

旭川医科大学小児科

藤枝憲二、梶野浩樹、棚橋祐典、鈴木滋

旭川厚生病院小児科

向井徳男

IV. 会議記録

- 平成 22 年度研究報告会プログラム 134

- V. 研究成果の刊行に関する一覧表 153

I. 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 梶野 浩樹	旭川医科大学小児科	教 授 准教授
研究分担者	諸橋憲一郎 宮本 薫 柳瀬 敏彦 長谷川奉延 田島 敏広 勝又 規行 加藤 茂明 田中 廣壽 西川 哲男 柴田 洋孝 笹野 公伸 宮森 勇 武田 仁勇 上芝 元 田村 尚久 佐藤 文俊 成瀬 光荣 西條 泰明	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 福井大学医学部生命情報医科学講座分子生体情報学 福岡大学医学部内分泌・糖尿病内科学 慶應義塾大学医学部小児科 北海道大学大学院医学研究科小児科学 国立成育医療研究センター研究所分子内分泌研究部基礎内分泌研究室 東京大学分子細胞生物学研究所核内情報研究分野 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 横浜労災病院内分泌代謝内科 慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 東北大学大学院医学系研究科病理診断学 福井大学医学部病態制御医学講座内科学(3) 金沢大学大学院医学系研究科臓器機能制御学 東邦大学医学部内科学糖尿病代謝内分泌科 京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科 東北大学病院腎高血圧内分泌科 国立病院機構京都医療センター内分泌代謝高血圧研究部 旭川医科大学健康科学講座 地域保健疫学分野	教 授 教 授 教 授 准教授 講 師 室 長 教 授 准教授 院 長 講 師 教 授 教 授 准教授 講 師 講 師 講 師 部 長 教 授
事務局担当	棚橋 祐典	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

II. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
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 梶野浩樹
旭川医科大学小児科 准教授

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継続させ、3年間の総括を行った。

(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

LC-MS/MS を用いた新生児血清 T・DHT・T/DHT 比の基準範囲を設定した。既報より高特異性・高感度かつ多数例での検討により、生後 4-6 日の女児 DHT、男女 T/DHT の基準範囲を世界で始めて設定し、また DHT・T/DHT の性差を初めて証明した。

非古典的 StAR 欠損症の遺伝学的、臨床学的解析により、本症では、アルドステロンの分泌が保持されており、臨床所見のみでは ACTH 不応症との鑑別が困難な症例があり、その確定診断には遺伝子解析が必須であることを提唱した。

21-水酸化酵素欠損症患者の成長、ステロイド投与量などの関連を 1 施設、14 名（男性 3 名、女子 11 名）で検討した。成人身長は、男子で身長は $-1.26SD$ 、女子では $-0.78SD$ であり、出生後半年までに身長 SD スコアは $-0.75SD$ 、1 歳までに $-1.5SD$ まで低下することが判明した。

(2) 副腎の発生・分化機構の解明

Ad4BP/SF-1 は核内受容体型転写因子であり、副腎皮質細胞において種々の遺伝子の転写を制御している。Ad4BP/SF-1 が制御する標的遺伝子の全体像を明らかにするため、次世代シーケンサーとクロマチン免疫沈降法による解析の系を確立した。今後、Ad4BP/SF-1 を中心とする副腎皮質の機能獲得の過程（分化の過程）の解明を進めていく。

特発性アルドステロン症 (IHA) およびアルドステロン産生副腎腫瘍 (APA) 付随副腎の球状層 (ZG) で、アンギオテンシン II 応答遺伝子や HSD3B2 発現関連の転写因子の発現状況を検討した結果、IHA の ZG や APA の付随副腎 ZG では、NGFIB、GATA-6、SF-1、DAX1 の発現が病態の修飾因子となっている可能性が示唆された。一方、EGR1 の発現低下はアルドステロン過剰産生に伴うレニン・アンギオテンシン系抑制の影響による可能性が考えられた。

(3) 副腎再生による新しい副腎不全治療法の開発

間葉系幹細胞からステロイド産生細胞への分化誘導における、核内 SF-1 転写複合体の解析を行った。新たな核内複合体抽出法を開発し、SF-1 転写複合体をインタクトな状態で単離精製することに成功した。LC-MS/MS による解析で、30 種あまりに上る SF-1 複合体構成タンパク質を同定した。これらのうち、C/EBP β に注目し、ChIP-on-Chip アッセイなどにより、ステロイドホルモン合成関連遺伝子群の上流では、SF-1 と C/EBP β がともに結合して転写調節に関わっていることを明らかにした。

(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、本研究班および日本内分泌学会と共同で最終的なガイドラインを作成し公表した。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。

「PA の診断治療ガイドライン-2009-」の妥当性を検討した。血漿アルドステロン濃度(PAC)/血漿レニン活性比 >200 pg/mL per ng/mL/h を用いたスクリーニングは感度 85.1%、特異度 64.7%であり、PAC >120 pg/mL の併用は特異度を 73.5%に上昇させたが、感度を 67.6%まで低下させた。機能確認試験の感度/特異度は、カプトプリル負荷試験 80.6%/97.1%、生理食塩水負荷試験 71.4%/78.9%、フロセミド立位負荷試験 73.3%/94.1%で概ね良好であった。CT で片側副腎腫瘍を認めた症例の 7%で PA 病変が対側副腎片側性に存在し、CT のみで PA 病変の左右局在を決定すべきではないと考えられた。

アルドステロン産生腺腫におけるアルドステロン産生調節機構をエピジェネティクスの観点から検討した。Aldo 産生副腎腫瘍(APA)でのメチル化率はnon-APAの約半分程度であり、CpGメチル化率とCYP11B2 mRNA レベルは統計学的に有意な逆相関を示した($p<0.05$)。副腎皮質癌由来H295R細胞を用いたLuciferase reporter assay では、20%程度のCpG1,2のメチル化は、非刺激、刺激下(Ang II, KCL, cAMP)のプロモーター活性を有意に減弱した。これらの結果はCYP11B2がDNAメチル化依存性に発現調節されていることを示唆している。

副腎静脈血中において18-水酸化ステロイドの測定系を用いて、PAの局在診断における有用性を検討した。アルドステロン産生腺腫の局在診断には、アルドステロン/コルチゾール比の左右比 >4 、18-oxocortisol/cortisol 比の左右比 >2 および18-hydroxycorticosterone/aldosterone 比の左右比 <0.5 が有用であった。

病理で確定診断のついたAPA症例と特発性アルドステロン症(IHA)症例の副腎静脈血(AVS)での検討ではAPA側AVS血中のms/msで測定した18-oxocortisol(18-oxoF)血中濃度は、IHA両側と非腫瘍側のAVS血中濃度に比較して有意に高く、18-oxoF絶対値及び18-oxoF/Fともに鑑別に有用であり、AVSでのAPAの局在診断に大きな一助となる可能性が示唆された。

PA患者[(APA)12例、クッシング腺腫(Cu)4例、非機能性副腎腺腫(NF)5例]の内臓脂肪組織におけるミネラルコルチコイド受容体(MR)発現に関して検討した。APA患者内臓脂肪におけるMR発現は高値、11 β -HSD2の低値であり、APAにおいては局所でのアルドステロンの作用発現の増加も示唆された。

(5) ステロイド作用に関わる受容体とその異常の解析

MRの分子レベルでの作用メカニズムを解明するため、MRの転写制御因子であるp120の機能解析を進めたところ、p120はNSD1のアダプターとして機能することが判明した。そしてBRD1のノックダウンではNSD1のDNAへの動員も減少し、H3K36me3レベルも減少することを明らかにした。さらに今回MR結合因子として新たにp130、p140を生化学的に同定することに成功した。p130はMRの転写を増強するco-activatorとして機能し、一方p140はMRの転写を減弱させるco-repressorとして機能することが明らかとなった。

グルココルチコイドによる筋萎縮の病態は不明であり治療法も存在しない。そこで、すでに確立したグルココルチコイドレセプター標的遺伝子同定法を骨格筋に応用し、グルココルチコイドレセプターの標的遺伝子を同定した。Myostatinに加え、新規にREDD1とKLF15を標的遺伝子として明らかにした。これらの遺伝子産物により、mTOR活性抑制、atrogin-1、MuRF1などのユビキチンリガーゼ遺伝子発現亢進、などによって骨格筋が起こることが示された。

(6) 副腎癌の診断・治療法の検討

副腎偶発腫瘍調査(1999年から2003年)から報告された褐色細胞腫314例(偶発腫全体の8.5%)について解析を行った。平均年齢は53.8歳、男女差や病側の左右差はなく、診断時平均腫瘍径は4.5cmであった。血圧正常例が50.3%と半数であった。内分泌学的検討では、

褐色細胞腫とホルモン非産生腺腫の比較で、血中アドレナリン、血中ノルアドレナリン、尿中アドレナリン、尿中ノルアドレナリンにおいて、いずれの検査でも褐色細胞腫で有意に高値であった。副腎偶発腫として発見された褐色細胞腫においても、尿中及び血中カテコールアミン検査の有用性が再確認され、初診時正常範囲でも、経過観察していく中で、繰り返しの測定が重要と考えられた。

昨年より、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、最終的に Dex 1 mg 負荷後の血中コルチゾール値 $1.8 \mu\text{g/dL}$ 以上をスクリーニングとして①早朝 ACTH 基礎値 $< 10.0 \text{pg/mL}$ ②夜間コルチゾール値 $> 5.0 \mu\text{g/dL}$ ③ACTH 分泌刺激試験 (CRH 負荷) の低反応のうち、②を必須項目とし、①または③を満たすものを SCS と診断することとした。今回は症例数を増やし再検討したが、矛盾症例はなく、同基準案の変更はなかった。また 0.5 mg と 1 mg DST の両者を施行した症例で、血中コルチゾール値を比較した結果、1 mg DST のコルチゾール値 $1.8 \mu\text{g/dL}$ は 0.5 mg DST の $2.8 \mu\text{g/dL}$ に相当することが明らかになった。下垂体性 SCS の 0.5 mg DST カットオフ値 $3.0 \mu\text{g/dL}$ に近似していることから、DST のスクリーニングを統一できる可能性が示唆された。

(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 年間に於ける対象疾患 (先天性副腎酵素欠損症、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 SCS、アジソン病、褐色細胞腫) の患者数について全国疫学調査を行った。5 年間の全国推定患者数は、先天性副腎酵素欠損症 1791 例、POR 異常症 44 例、先天性副腎低形成症 100 例、偽性低アルドステロン症 258 例、 11β 水酸化ステロイド脱水素酵素欠損症 27 例、原発性アルドステロン症 7487 例、副腎性 SCS 1829 例、アジソン病 911 例、褐色細胞腫 3537 例であった。

PA の二次調査、1284 例を対象に臨床像を検討した。確定診断は、50 歳代でされていたことから必ずしも早期診断がなされていなかった。APA の方が IHA よりも若年性に発症しているため、発見しやすい病型とも考えられた。男女差はない疾患であることが確認された。

アジソン病の二次調査、132 例を対象に臨床像を検討した。平均年齢は男性 63.2 ± 21.5 歳、女性 65.6 ± 18.3 歳であった。男女とも中高年以上で患者数が増加し、70 歳以上が多かった。病因は、特発性 (自己免疫性) が 49%、感染性が 27% であった。副腎クリーゼの発症は 31.4% であり決して稀ではなかった。

副腎性 SCS の二次調査、395 例を対象に臨床像を検討した。平均年齢は男性 62.2 ± 10.9 歳、女性 61.7 ± 12.9 歳であった。男性では 60～64 歳にピークがあり、女性では 65～79 歳にピークがあった。治療開始前の症候として、高血圧の頻度が最も高く 63% に認め、糖尿病、肥満は 30% 前後に合併していた。

褐色細胞腫の二次調査、284 例を対象に臨床像を検討した。その結果、無症候性が多く、高血圧も発作型が多いことから、早期診断が困難で、その可能性を考慮した日常診療が必須であると考えられた。また機能診断法と手術方法は施設毎で差を認めることから、今後、標準的診療の普及と長期にわたる追跡調査が必要である。

先天性副腎酵素欠損症の二次調査、700 例を対象に臨床像を検討した。原因として、POR 異常症が 21 水酸化酵素欠損症、リポイド過形成症に続く頻度であることが明らかとなった。新生児マススクリーニング開始後、副腎不全症例は減少し、死亡の報告は 1 例だけであった。平均成人身長は男性 -1.69SD 、女性 -1.40SD であり、未だ良好とは言えなかった。

先天性副腎低形成の二次調査、57 例を対象に臨床像を検討した。DAX1 遺伝子以外の SF1、MC2R、MRAP 遺伝子異常の頻度を初めて示した。死亡例の報告はなく、前回調査よりさらに予

後の改善が得られていた。

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)
成瀬 光荣 (国立病院機構京都医療センター内分泌代謝高血圧研究部)
西條 泰明 (旭川医科大学健康科学講座 地域保健疫学分野)

研究協力者

向井 徳男 (旭川医科大学小児科)

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継続させ、3年間の総括を行った。

- (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

・ 新生児期の血中 testosterone (T)、dihydrotestosterone (DHT) は、大量に共存する胎生皮質ステロイドとの交差反応により偽高値を呈し、国内で汎用されている免疫化学的測定法 (RIA、CLIEA など) による新生児期血中 T、DHT 値は信頼性に乏しい。今回、近年、ステロイドホルモン測定 Gold standard 法である液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS) を用い、これらの基準値設

定を行った。その結果、日齢4~6の男子においては、T 0.13-0.91ng/ml、DHT 0.01-0.24ng/ml、T/DHT比 2.7-9.4、女兒においては、T 0.03-0.18ng/ml、DHT 0.01-0.24ng/ml、T/DHT比 2.4-17.2であった。生後4-6日の女兒DHT、男女T/DHTの基準範囲を世界で始めて設定し、またDHT・T/DHTの性差を初めて証明した。(長谷川)

・非古典的StAR欠損症の新たな2家系3症例で分子遺伝学的、臨床的解析を行った。副腎不全はいずれも幼児期に発症し、色素沈着が、先行して認められていた。副腎画像所見は正常であった。鉱質コルチコイドの分泌は保持されており、臨床所見のみではACTH不応症との鑑別はきわめて困難であった。いずれの症例も複合ヘテロ接合変異を有しており、症例1で同定したL158P変異、症例2、3で同定したQ258X変異は、古典的先天性副腎リポイド過形成症で見られる変異であり、活性を完全に損なう。一方、症例1で同定したR188H変異および症例2、3で同定したR272H変異は、新規変異であり、StAR活性を低下させるが、残存活性が約30%認められた。したがって、R188H変異およびR272H変異が、今回報告した2家系3例の非古典的表現型の原因であると考えられ、診断には遺伝子解析が重要であることが明らかとなった。(勝又)

・21-水酸化酵素欠損症の成長は目標身長よりも低くなるとする報告が多い。今回、北海道大学病院での本疾患患者14名(男性3名、女子11名)の成長、ステロイド投与量などの関連を検討した。その結果成人身長に到達した男子で身長は-1.26SD、女子では-0.78SDであり、出生後半年までに身長SDスコアは-0.75SD、1歳までに-1.5SDまで低下することが判明した。さらに、思春期の発来時期は女子で平均10歳、男子で平均11歳であった。その間の獲得身長は女子で18.3±5.2cm、男子で19.0±4.31cmで、男女とも思春期の身長の伸びは正常日本人に比較し少なかった。ハイドロコルチゾン投与量は年齢経過を通じ

て日本小児内分泌学会の推奨量範囲内であった。今後多数例での検討が必要である(田島)。

(2) 副腎の発生・分化機構の解明

・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。本研究ではAd4BP/SF-1が制御する標的遺伝子の全体像を明らかにするため、次世代シーケンサーとクロマチン免疫沈降法による解析の系を確立した。すなわち、免疫沈降には副腎皮質由来のY1細胞を用いて緩衝液、精製抗体濃度、固定核のソニケーション等の条件を決定した。得られた塩基配列は膨大な情報量よりなるが、全てのDNA断片がゲノム中のどの領域に相当するのか、またどの領域に集積しているのかなどについて自動的に処理するシステムを構築した。これら、予備的な実験結果からは、Ad4BP/SF-1抗体を用いて回収したDNA断片にはAd4BP/SF-1の結合サイトが存在した。これらのデータをもとにAd4BP/SF-1と副腎皮質細胞の増殖の関係に限らず、Ad4BP/SF-1を中心とする副腎皮質の機能獲得の過程(分化の過程)を明らかにすることができると思われる。(諸橋)

・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でのアルドステロン合成に関与する酵素の1つであるHSD3B2の発現度の鑑別が重要であるが、その発現を調節する転写因子の発現パターンについて十分解明されていない。これらのZGにおいて、HSD3B2の転写を調節する代表的な4調節因子である、GFIB、GATA-6、SF-1、DAX1の発現度を検討することで、PAの病態への関与を検討した。結果、IHAの球状層では、NGFI-B、GATA-6、SF-1の発現上昇が、HSD3B2発現に関わっている可能性、およびこれらの因子の発現をDAX-1が制御している可能性が示唆された。APA付随副腎球

状層では、NGFI-B, GATA-6 の発現が上昇して、HSD3B2 の発現低下の抑制に抗する可能性が示唆された。(笹野)

(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。

・骨髄間葉系幹細胞を用いて副腎皮質ホルモン産生細胞を創り出すと同時に、その分化メカニズムを分子レベルで明らかにすることで、骨髄間葉系幹細胞からステロイドホルモン産生細胞への分化誘導過程における SF-1 転写複合体の性質を明らかにすることで、分化誘導メカニズムの解明を目指した。まず、生理的イオン強度の抽出液に DNA 分解酵素を加えることで、インタクトな状態で SF-1 転写複合体を取り出す方法を開発した。また抽出物をそのまま続いて affinity chromatography にかき、精製することで細胞内での状態をそのまま維持した複合体の単離精製に成功した。また、実際の分化誘導が起きている細胞から複合体を単離に成功した。SF-1 複合体には、転写共役因子、DNA 及び RNA 結合タンパク質、リモデリング因子や他の転写因子など、様々なタンパク質が含まれており SF-1 複合体も非常に大きな構造を取っていることが明らかとなった。これらの構成タンパク質のうち、C/EBP β に着目し、ステロイドホルモン合成における役割を検討した結果、C/EBP β は SF-1 と協調的にステロイドホルモン合成関連遺伝子の転写を活性化してい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、本年度日本内分泌学会誌にて公表した。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)

・日本内分泌学会「原発性アルドステロン症 (PA) の診断治療ガイドライン-2009-」の妥当性を検証するため、京都大学内分泌代謝内科に PA の診断で、入院精査を行った 108 症例の成績を用いて、スクリーニング基準、確定診断に用いる機能確認試験、局在診断法の有用性を検討した。スクリーニング基準の検討では、ARR 基礎値によるスクリーニングの ROC 曲線の曲線下面積 (AUC) は 0.84 であった。ARR 基礎値 >200 pg/mL per ng/mL/h をスクリーニング基準とした場合、PA 症例を検出する感度は 85.1%、特異度は 64.7% であった。機能確認試験の検討では、カプトプリル負荷試験は実施率が 98.1% で、負荷 60 分後 ARR >200 をカットオフとした場合、感度 77.8%、特異度 97.1% であった。生理食塩水負荷試験は実施率 56.5% で、負荷後 PAC >60 pg/mL をカットオフとした場合、感度 71.4%、特異度 83.3% であった。フロセミド立位負荷試験は実施率 43.5% で、有用性が最高のカットオフは PRA <1.9 ng/mL/h で、本研究班 GL のカットオフである PRA <2 ng/mL/h とほぼ一致していて、感度 73.3%、特異度 94.1% であった。局在診断では、AVS と上腹部 CT が施行された症例は 60 例あり、47% で AVS により決定したアルドステロン過剰分泌の左右局在と CT で検出された副腎腺腫の左右局在が一致していたが、3% で左右逆であった (表 1)。AVS とデキサメタゾン抑制アドステロール副腎シンチが施行された症例は 25 例あり、48% で両者によるアルドステロン過剰分泌の左右局在の判定が一致し、4% で左右逆であった (表 1)。一方、APA で手術

を行った症例で、CT、シンチ、AVSによるPA病変の左右局在判定と手術により確定した左右局在の一致率は、75~79%でほぼ同等であったが、左右副腎静脈ともに成功した症例に限れば、AVSの一致率が91%と高かった。実際の局在とAVSで判定した左右局在の一致不一致を、ACTH負荷前と負荷後に分けて検討したところ、両側副腎静脈血採取の成功率と左右局在の一致率がACTH負荷後で高かった。「原発性アルドステロン症(PA)の診断治療ガイドライン-2009-」はスクリーニング基準、機能確認試験の判定基準、局在診断において概ね妥当であると考えられた。(田村)

・PAは治療抵抗性の高血圧を呈し心血管系の合併症が多い疾患であるが、アルドステロン(aldo)過剰産生の機序は明らかではない。これまでに、aldo合成酵素遺伝子(CYP11B2)プロモーターにDNAメチル化標的的部位であるCpGジヌクレオチド(CpG1(-68/-67), CpG2(-112/-111), CpG3(-219/-218))が散在することが明らかにされており、PAの病態を説明する因子であるかを解明するため、Aldo産生副腎腫瘍(APA)(n=9)と非Aldo産生組織(non-APA)(n=8; クッシング副腎腫瘍(Cu)(n=2)、非機能性副腎腫瘍(NF)(n=3)、腎動脈(RA)(n=3))を用い、CpG1, 2, 3のメチル化率を比較した。さらに、副腎皮質癌由来H295R細胞を用いてCpG1, 2のメチル化とアンジオテンシンII(Ang II), KCl, cAMPの刺激によるCYP11B2プロモーター活性に対する影響を検討した。結果、CYP11B2遺伝子発現がメチレーションにより制御されていること、組織発現の差異はメチレーションの程度と相関することが明らかとなった。さらにCYP11B2遺伝子発現の調節因子であるAng II, KCl, cAMPによる刺激がメチル化によりコントロールされることが副腎培養細胞を用いた実験から明らかになった。これらの事実はアルドステロンの過剰産生にメチル化が一部関与している可能性を示唆している。(武田)

・PAの局在診断は副腎静脈サンプリングにて

行われ、結果の解釈には、副腎静脈血中のアルドステロン/コルチゾール比を用いて、片側性または両側性病変の判定が行われている。一方、アルドステロン産生腺腫では、24時間蓄尿中18-hydroxycortisolや18-oxocortisolが高値となることが示されている。今回、副腎静脈血中においてこれらの18-水酸化ステロイドの測定系を用いて、PAの局在診断における有用性を検討した。その結果、アルドステロン産生腺腫の局在診断には、アルドステロン/コルチゾール比の左右比 >4 、18-oxocortisol/cortisol比の左右比 >2 および18-hydroxycorticosterone/aldosterone比の左右比 <0.5 が有用であった。(柴田)

・術後組織学的診断とステロイド合成酵素の免疫組織化学的診断にて確定診断された、片側APA 11症例とIHA 5症例、それぞれACTH負荷前後での両側のAVS血漿中アルドステロン、コルチゾール18-oxoFをms/msで測定し比較検討した。その結果、APA側副腎静脈血中の18-oxoFは、IHAと非腫瘍側に比較して有意に高く、AVSでのAPAの局在診断に大きな一助となる可能性がある。さらに今後末梢血中18-oxoFの高感度測定法が確立した場合、AVS適応にはAPAの可能性が高いPA症例群の選別が可能となり、より効率のいい手術適応の選別がなされる可能性も推定される(佐藤)。

・PA患者にミネラルコルチコイド受容体(MR)ブロッカーを長期投与すると、内臓脂肪量が減少することを報告され、臨床的に内臓脂肪組織におけるMRの重要性が明らかにされた。今回PA患者における内臓脂肪組織におけるMR発現に関して検討し、分子病態の解明を試みた。APA 12例、クッシング腺腫(Cu) 4例、非機能性副腎腺腫(NF) 5例から腺腫摘出時の副腎隣接脂肪組織を採取し、RNAを抽出しreal time PCR法にて各因子のmRNAを定量化した。内臓脂肪におけるGR mRNA発現はCuにおいてAPAより低値、MR mRNA発現はAPAにおいてNFより有意に高値($p < 0.05$)を示した。11 β -HSD1 mRNAは3群間で有意の変動を示さなか

ったが、11 β -HSD2 mRNA 発現は APA において有意に低値であった(p<0.05)。従って、APA 患者内臓脂肪における MR 発現の高値及び 11 β -HSD2 の低値は APA において循環血中のアルドステロンの高値に加え、局所でのアルドステロンの作用発現の増加が示唆され、APA における心血管系の合併症や代謝異常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

・ミネラルコイドは核内受容体の一つである MR を介してその生理機能が発揮される。今回、MR の転写制御メカニズムを解明すべく、生化学的手法を用いて MR 転写共役因子の精製を世界で始めて試みた。FLAG-MR 安定発現細胞を用いた精製により、p130 および p140 を同定した。これらの因子の発現ベクターを作成し、ルシフェラーゼアッセイを行った結果、p120 および p130 は MR のリガンド依存的な転写を増強する co-activator、p140 は MR のリガンド依存的な転写を抑制する co-repressor として機能することが判明した。さらに、これらの因子を RNAi によりノックダウンした時の、MR 標的遺伝子の変化を観察したリアルタイム PCR 法の結果、これらの因子はルシフェラーゼアッセイの結果同様に MR 転写活性を制御することが明らかとなった。これらの因子は、免疫沈降法により MR と結合することが示された。一方、以前に同定した MR 結合因子 p120 の FLAG タグ付き p120 安定発現 HEK293 細胞を樹立し、大量培養を行ったうえ、核抽出液を取得し、p120 を含む蛋白質複合体の精製を行ったところ、ヒストン H3K36 のメチルトランスフェラーゼである NSD1 が同定された。そこで MR 標的遺伝子 ENaC プロモーターに存在する MR response element に着目した ChIP アッセイを行った。すると、p120 は NSD1 を動員するアダプターとして機能し、p120 のノックダウン条件下では、NSD1 の動員も減少し、H3K36me3 レベルも減少していることが観察された。これら分子メカニズムの解明は、将

来的には、高血圧発症の抑制に役立つと考えられる。(加藤)

・グルココルチコイド (GC) による筋萎縮の病態は不明であり治療法も存在しない。そこで、GC 筋萎縮モデルをラットにデキサメタゾン DEX 600 μ g/kg 体重を腹腔内注射することにより作成し、腓腹筋、ヒラメ筋を採取し、RNA、タンパク、クロマチン免疫沈降法、組織学的解析に用い、さらに標的遺伝子の同定を行った。標的遺伝子として、既知の標的遺伝子である MuRF1、myostatin とともに、REDD1、KLF15 を新たに GC-GR 系標的遺伝子として同定した。REDD1 は mTOR 抑制作用を有することが知られており、実際に DEX 投与後骨格筋における mTOR 活性は低下していた。KLF15 は、アミノ酸分解の律速段階を規定する BCAT2 の遺伝子発現ならびに酵素活性の増加を上昇させ、KLF15 の発現により、筋萎縮関連遺伝子 atrogenes である atrogen-1、MuRF1 遺伝子の mRNA 発現も増加していた。これらの atrogenes のプロモーター領域に KLF15 が結合することが確認された。KLF15 の転写活性は GR、FoxO と協調的であった。すなわち、GC-GR 系は KLF15 とその下流の標的遺伝子の発現を、とくに atrogenes に関してはドミノ式に誘導し、筋萎縮に向かわせることが伺えた。以上から、GC-GR 系は多くの標的遺伝子発現を介して、mTOR 抑制とプロテアソーム依存性タンパク分解により筋萎縮を招来することが示唆された。ラットにおいて、外来性 KLF15 の前頸骨筋筋肉内注射によって筋萎縮がおこった。その機序として、BCAT2 発現増加による分岐鎖アミノ酸 BCAA 分解亢進による mTOR 活性低下と atrogen-1、MuRF1 発現の増加の関与が示された。以上より、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起こるものと考えられる。それらの遺伝子産物は、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ソーム系の活性化を介して筋萎縮に至るらしい。(田中)

(6) 副腎癌の診断・治療法の検討

・平成11年度(1999年)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例のうち褐色細胞腫314例(8.5%)の集計結果をもとに、副腎偶発腫として発見された褐色細胞腫の解析を行なった。平均年齢は 53.8 ± 14.7 歳、男女差や病側の左右差はなく、診断時平均腫瘍径は 4.54 ± 2.97 cmであり、ホルモン非産生腺腫平均腫瘍径 2.33 ± 1.26 cmより有意に大きかった。発見の契機として頻度が多かったものは、無症状(人間ドックなど)31.2%、腹部症状の精査16.2%、高血圧の精査15.3%であり、診断方法としては腹部CT45.2%と超音波43.3%が大多数を占めた。診断時の血圧は収縮期 140.9 ± 26.9 mmHg、拡張期 82.1 ± 16.0 mmHg(Mean \pm SD)であったが、血圧正常例が50.3%と半数を占めた。内分泌学的検討では、褐色細胞腫とホルモン非産生腺腫の比較で、血中アドレナリン、血中ノルアドレナリン、尿中アドレナリン、尿中ノルアドレナリンにおいて、いずれの検査でも褐色細胞腫で有意に高値であった(全て $p < 0.0001$)。しかし、初診時の尿中及び血中カテコールアミン検査で正常例が約25%にみられた。1年以上の経過観察期間があった褐色細胞腫26例中の46.2%に腫瘍径の増大がみられた。副腎偶発腫として発見された褐色細胞腫においても、尿中及び血中カテコールアミン検査の有用性が再確認され、初診時正常範囲でも、繰り返しの測定が重要と考えられた。(上芝)

・昨年度、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を作成した。すなわち、1mgデキサメタゾン抑制試験(DST)におけるコルチゾールのカットオフ値を欧米で提唱されている $1.8 \mu\text{g/dL}$ に引き下げ、さらに現在用いられている基準項目の中で、1) ACTH基礎値 10 pg/mL 未満 2) 日内リズムの消失(夜間のコルチゾール値 $5.0 \mu\text{g/dL}$ 以上) 3) ACTH分泌刺激試験(CRH負荷)の低反応の3項目

を鑑別に有用と判断し、2)を必須項目として、1)または3)を満たせばSCSとする診断基準案を作成した。今年度、症例数を増やしその妥当性を検討した結果、矛盾症例はなく、同基準案の変更はなかった。また0.5mgと1mgDSTの両者を施行した症例で、血中コルチゾール値を比較した結果、1mgDSTのコルチゾール値 $1.8 \mu\text{g/dL}$ は0.5mgDSTの $2.8 \mu\text{g/dL}$ に相当することが明らかになった。下垂体性SCSの0.5mgDSTカットオフ値 $3.0 \mu\text{g/dL}$ に近似していることから、DSTのスクリーニングを統一できる可能性が示唆された。(柳瀬)

(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(先天性副腎酵素欠損症、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SCS、アジソン病、褐色細胞腫)の患者数について全国疫学調査を行った。5年間の全国推定患者数は、先天性副腎酵素欠損症1791例、POR異常症44例、先天性副腎低形成症100例、偽性低アルドステロン症258例、 11β 水酸化ステロイド脱水素酵素欠損症27例、原発性アルドステロン症7487例、副腎性SCS1829例、アジソン病911例、褐色細胞腫3537例であった。平成9年度に行われた全国調査時より、患者数が増加しており、その多様性を明らかにするために、今後さらなる解析を加えていく必要がある。それにより、今後の研究の方向性の考察が可能となり、医療レベルの向上、厚生労働行政への還元が可能となると考えられる。(藤枝、梶野、西條)

・PAの二次調査、1284例を対象に臨床像を検討した。現在も二次調査の解析中であり、その結果の解析の一部を本研究報告書にまとめた。病変部位は、片側性の場合、アルドス

テロン産生腺腫でも、副腎皮質球状層過形成でも、左が右よりも1.3~1.5倍多かった。発症年齢は、APA (47.4±0.5歳) と IHA (50.1±1.2歳) の比較では、後者で前者よりも発症年齢が有意に高かった。両側性 (50.3±1.1歳) と片側性 (47.4±0.5歳) の比較では、片側性で両側性よりも発症年齢が有意に低かった。50歳代で確定診断されていたことから必ずしも早期診断がなされていなかった。APAの方がIHAよりも若年性に発症しているため、発見しやすい病型とも考えられた。男女差はない疾患であることが確認された。(西川、田村、佐藤、柴田、武田、宮森)

・アジソン病の二次調査、132例を対象に臨床像を検討した。平均年齢は男性63.2±21.5歳、女性65.6±18.3歳であった。男女とも中高年以上で患者数が増加し、70歳以上が多く、前回調査より約10歳、高齢にシフトしていた。病因は、特発性(自己免疫性)が49%、感染性が27%であり、特発性がやや増加し、感染性は減少していた。副腎クリーゼの発症は31.4%であり、決して稀ではなく、適切な治療が求められる。(柳瀬、藤枝、梶野)

・副腎性SCSの二次調査、395例を対象に臨床像を検討した。平均年齢は男性62.2±10.9歳、女性61.7±12.9歳であった。男性では60~64歳にピークがあり、女性では65~79歳にピークがあった。性年齢分布は、前回調査とほぼ同様であり、副腎偶発腫として発見されることが確認され、その病態がクッシング症候群とは異なることが改めて示唆された。治療開始前の症候として、高血圧の頻度が最も高く63%に認め、糖尿病、肥満は30%前後に合併していた。これらは、腫瘍摘出により、50%の症例で改善しており、診断治療の重要性が確認された。(柳瀬、藤枝、梶野)

・褐色細胞腫の二次調査、284例を対象に臨床像を検討した。男48%、女52%で男女差なく、平均年齢は51.5歳、治療前の血圧は145±33mmHg/84±19mmHgであった。臨床病型は60%が無症候性、40%が症候性で、症候性の

55%が発作性高血圧、45%が持続性高血圧を示した。病変部位は91%が副腎性、9%が副腎外であった。良性は94%、悪性は6%、悪性での転移部位は肝臓と骨に多く見られた。全体の98%で腫瘍摘出術が施行され、その64%が内視鏡下手術、36%が開腹術であった。以上より、無症候性が多く、高血圧も発作型が多いことから、早期診断が困難で、その可能性を考慮した日常診療が必須であると考えられた。また機能診断法と手術方法は施設毎で差を認めることから、今後、標準的診療の普及と長期にわたる追跡調査が必要である。(成瀬)

・先天性副腎酵素欠損症の二次調査、700例を対象に臨床像を検討した。原因として、POR異常症が21水酸化酵素欠損症(21OHD)、リポイド過形成症に続く頻度であることが明らかとなった。年齢分布は、前回調査より約10年遅い40歳未満に集中していた。21OHDの女児においては、生下時外性器の男性化を認め、性の決定が問題となる。今回2例(0.7%)が社会的男性として生活していることが判明した。しかしながら、これらの症例はMS開始以前の症例であり、その後の症例の集積はなかった。21OHDの成人身長SDスコアは、男性-1.69SD、女性-1.40SDであった。男性で身長予後は良くなく、女性においても、今後改善が得られるよう治療を検討していく必要がある。また、今回明らかになったこととして、MS後には、副腎不全を示唆する所見が減少しており、その効果を確認することができた。また、転機として、死亡例は1例のみであり、前回調査より、生命予後が改善していることが明らかとなった。(藤枝、梶野)

・先天性副腎低形成の二次調査、57例を対象に臨床像を検討した。年齢分布は、21OHDと同様、前回調査より15歳上昇し、44歳までの症例が存在した。今回、前回調査との違いとして、DAX1遺伝子以外の責任遺伝子が病因として同定されており、その頻度を解析したことである。約半数の症例でDAX1遺伝子以外

の遺伝子解析行われており、そのうち 21% に変異が認められていた。一方で、未だ原因不明症例の存在も明らかとなり、病態、治療法開発のため、今後も継続した基礎的臨床的研究が必要である。転帰調査においては、前回調査と異なり、死亡例の報告はなく、前回調査よりさらに予後の改善が得られていた。(藤枝、梶野)

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

1. 実用新案登録(平成 21 年 12 月共同考案者として出願)(第 3158079 号)『輸液遮光具』:主に抗がん剤ダカルバジンの光劣化を防止するための遮光具に関する考案