

### 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

## 液体クロマトグラフ・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

#### 研究分担者

慶應義塾大学医学部 小児科 長谷川奉延

#### 研究協力者

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、村田満  
株式会社あすか製薬メディカル 中川利沙、本間誠次郎  
慶應義塾大学医学部 小児科 三輪雅之、池田一成、石井智弘

#### 【研究要旨】

【目的】 LC-MS/MS を用いた新生児血清 T・DHT・T/DHT 比の基準範囲設定。【対象・方法】 在胎週数 37-41 週、日齢 4-6 日の日本人満期健常新生児（男 48 例女 43 例）。血清 0.1ml についてピコリン酸誘導体化・カラム精製後 LC-MS/MS 法により T、DHT を測定し基準範囲(ng/ml、2.5-97.5 パーセントイル)を設定、性差を Mann-WhitneyU 検定。【結果】 T：男 0.13-0.91、女 0.03-0.18 ( $p<0.001$ )。DHT：男 0.01-0.24、女児 0.01-0.04 ( $p<0.001$ )、T/DHT：男 2.7-9.4、女 2.4-17.2 ( $p<0.05$ )。既報との比較：T・DHT は免疫化学的測定法に比し低値、誘導体化なし LC-MS/MS 法に比しほぼ同じ範囲であった。【考察】 既報より高特異性・高感度かつ多数例で T・DHT・T/DHT 比の基準範囲を設定した。生後 4-6 日の女児 DHT、男女 T/DHT の基準範囲は過去に報告がなく、また DHT・T/DHT の性差を初めて証明した。今後、性分化疾患新生児の鑑別診断における有用性を検討する予定である。

#### 【背景】

新生児期性分化疾患の鑑別診断において、血中 testosterone (T)、dihydrotestosterone (DHT) がしばしば測定される。しかし、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。これ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するからである。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) を用いた T、DHT 測定が可能となったが、十分な例数による新生児基準範囲の報告はない。今回

我々は、LC-MS/MS を用いた新生児血清 T、DHT および T/DHT 比の基準範囲を設定したので報告する。

#### 【対象】

生後 4-6 日の健常新生児 91 例(男 48 例、女 43 例、在胎週数 37-41 週、出生体重 2532-3732 g) 表 1 参照

#### 【方法】

定量には内部標準法を用いた。すなわち、新生児血清 0.1 mL に内部標準として T、DHT の重水素標識体を添加、酢酸エチル抽出、固相カ

ラム精製、ピコリン酸エステル誘導体化<sup>1)</sup>、固相カラム精製後、LC-MS/MS で測定した(T、DHT 共に定量下限値 0.01 ng/ml)。T/DHT 比の算出、および男女間の有意差検定(Mann-Whitney U検定)は、T、DHT の定量下限値未満を 0.01 として行った。

### 【結果】

T、DHT および T/DHT 比男女別基準範囲を表 2-4 に示す。3 項目の男女別分布を図 1-3 に示す。男児 DHT の 1 例、女児 DHT の 25 例において定量下限値未満であった。3 項目いずれにおいても性差を認めた(p<0.05)。

### 【考察】

生後 4-6 日の新生児血清 T、DHT および T/DHT 比の基準範囲を設定した。本検討の成績を過去の免疫化学的測定法および LC-MS/MS 法による既報と比較した(表 2-4)。

- 1) 生後 4-6 日の T/DHT 基準範囲、DHT および T/DHT の性差は、世界で初めての報告である。
- 2) 2002 年の Tomlinson<sup>2)</sup>、1979 年の Pang ら<sup>3)</sup>の RIA による基準範囲と比較し、男児 T、女児 T、男児 DHT において本検討の基準範囲は低値であった。RIA 既報と乖離した理由は、RIA 法では胎生皮質ステロイド等の共存ステロイドの影響を受けるが、LC-MS/MS 法では受けないためと考える。
- 3) LC-MS/MS による新生児早期の基準範囲の報告は、2010 年 Kulle ら<sup>4)</sup>の報告のみであった。Kulle らの報告と比較し、男児 T、男児 DHT、女児 DHT の範囲はほぼ同等、女児 T では低値であった。なお、Kulle らの例数は男児 8 例、女児 6 例と少数、定量下限は 0.03ng/ml と我々の方法(0.01ng/ml)より高く、T、DHT いずれにおいても、男女の中央値が同じ値であった。

以上より、今回設定した我々の基準範囲は、RIA および LC-MS/MS による既報に比し、より信頼性が高いと考える。

### 【今後の課題】

本測定法による T、DHT および T/DHT 比について、外陰部異常を伴う新生児早期副腎・性腺ステロイド産生異常症鑑別診断における有用性を確認する。

### 【結語】

生後 4-6 日の新生児血清 T、DHT および T/DHT 比の基準範囲を設定した。

### 【参考文献】

- 1) Yamashita K, Miyashiro Y, Maekubo H, Okuyama M, Honma S, Takahashi M, Numazawa M 2009 Development of highly sensitive quantification method for testosterone and dihydrotestosterone in human serum and prostate tissue by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. Steroids 74: 920-926
- 2) Tomlinson C, Macintyre H, Dorrian CA, Ahmed SF, Wallace AM 2004 Testosterone measurements in early infancy. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 89: F558-559
- 3) Pang S, Levine LS, Chow D, Sagiani F, Saenger P, New MI 1979 Dihydrotestosterone and its relationship to testosterone in infancy and childhood. J Clin Endocrinol Metab 48: 821-826
- 4) Kulle AE, Riepe FG, Melchior D, Hiort O, Holterhus PM 2010 A novel ultrapressure liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of androstenedione, testosterone, and dihydrotestosterone in pediatric blood samples: age- and sex-specific reference data. J Clin Endocrinol Metab 95: 2399-2409

## 【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. 新生児副腎機能ー新生児・乳児の永久皮質ステロイド分泌に日内変動はあるか?ー.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

表1. 日本人満期健常新生児91例

	例数	日齢 (日)	在胎週数 (週)	出生体重 (g)
男児	48	4-6 (4)	37-41 (39)	2532-3732 (3002)
女児	43	4-6 (4)	37-41 (39)	2572-3606 (3090)

範囲  
(中央値)

表2. Testosterone基準範囲(ng/ml) -既報との比較-

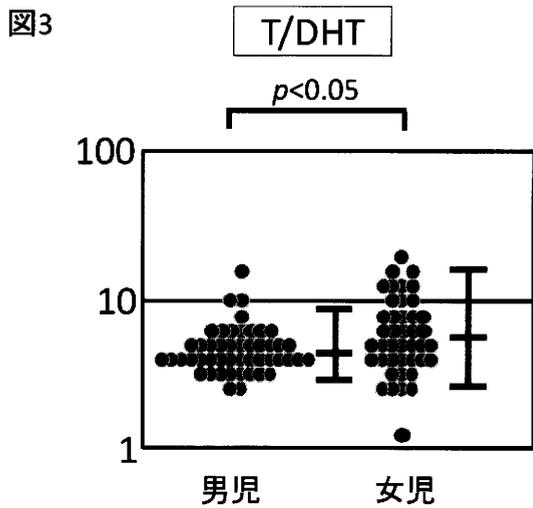
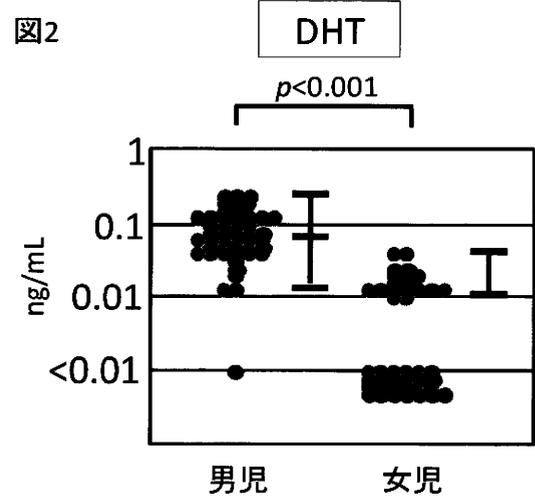
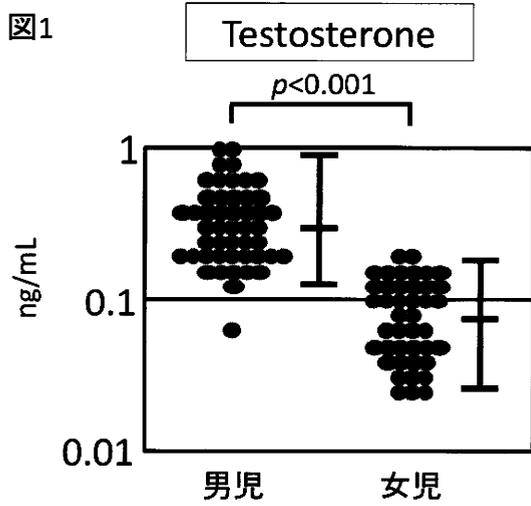
	測定法	日齢	男児			女児		
			例数	基準範囲 [範囲]	中央値	例数	基準範囲 [範囲]	中央値
本検討	LC-MS/MS	4-6	48	0.13 – 0.91 [0.06 – 1.01]	0.31	43	0.03 – 0.18 0.02 – 0.20	0.08
Tomlinson (2002)	RIA	<10	36	0.29 – 3.31	0.66	36	0.09 – 1.08	0.21
Pang (1979)	RIA	<14	29	[ND – 2.4]	-	20	[ND]	-
Kulle (2010)	LC-MS/MS	<7	8	[0.06 – 0.78]	0.20	6	[0.06 – 0.78]	0.21

表3. Dihydrotestosterone基準範囲(ng/ml) -既報との比較-

	測定法	日齢	男児			女児		
			例数	基準範囲 [範囲]	中央値	例数	基準範囲 [範囲]	中央値
本検討	LC-MS/MS	4-6	48	0.01 – 0.24 [<0.01 – 0.27]	0.07	43	<0.01 – 0.04 [<0.01 – 0.04]	0.01
Pang (1979)	RIA	<14	16	[ND – 0.6]	-	12	[ND]	-
Kulle (2010)	LC-MS/MS	<7	8	[<0.03 – 0.20]	0.03	6	[<0.03 – 0.03]	0.03

表4. T/DHT比 基準範囲

測定法	日齢	男児			女児			
		例数	基準範囲 [範囲]	中央値	例数	基準範囲 [範囲]	中央値	
本検討	LC-MS/MS	4-6	48	2.7-9.4 [2.6-14.2]	4.3	43	2.4-17.2 [1.4-19.0]	5.6



## 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

研究分担者 勝又 規行

国立成育医療研究センター 分子内分泌研究部 基礎内分泌研究室長

### 【研究要旨】

非古典的 StAR 欠損症においては、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。

### 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、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とされてきたが、2006 年に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* 遺伝子異常が同定され(Baker BY, et al. *J Clin Endocrinol Metab*, 91:4781-4785, 2006)、StAR 欠損症には臨床的多様性が存在することが明らかになった。本研究では、非古典的 StAR 欠損症の新たな 2 家系で分子遺伝学的、臨床的解析を行った。

### 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 2 家系 3 例 (表 1)。

症例 1 は現在 14 歳の女子。皮膚色素沈着を認めた兄が 1 歳 6 ヶ月のとき急性脳症で死亡。2 歳 5 ヶ月のとき発熱を契機に痙攣を発症、全身皮膚色素沈着を認め、副腎不全と診断。成長、発達は正常で、10 歳 6 ヶ月から二次性徴出現し、12 歳 6 ヶ月で初経、規則的な月経あり。

症例 2 は現在 10 歳の男子。1 歳 8 ヶ月のとき皮膚色素沈着を認め、2 歳 3 ヶ月のときに、副腎不全と診断。成長、発達は正常で、外性器は正常男性型で、思春期前の段階。

症例 3 は現在 8 歳の女子。症例 2 の妹。1 歳 8 ヶ月のとき皮膚色素沈着を認め、2 歳 2 ヶ月のときに、副腎不全と診断。成長、発達は正常で、外性器は思春期前の段階。

**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。

**変異 StAR の機能解析：**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。

**臨床的解析：**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で承認された説明書・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 は L157P 変異と R188H 変異の複合ヘテロ接合体であった (図 1A)。症例 2、3 は Q258X 変異と R272H 変異の複合ヘテロ接合体であった (図 1B)。R188H

変異および R272H 変異はこれまでに報告のない変異であった。

変異 StAR の機能解析：R188H 変異 StAR の活性は野生型 StAR の 37.4%、R272H 変異 StAR の活性は 32.4%であった。

臨床的解析：副腎不全発症時の所見を表 1 に示す。血中 ACTH が著明な高値であるにも関わらず、コルチゾールは正常から低値であった。血漿レニン活性は正常から高値であった。症例 2、3 ばかりでなく、発熱、痙攣で発症した症例 1 においても、血清電解質は正常であった。腹部 CT 検査で副腎は描出され、その大きさは正常であった。

ACTH 負荷試験および立位・フロセミド負荷試験の結果を表 2 に示す。ACTH 負荷試験では、血中コルチゾールは無反応か低反応であった。立位・フロセミド負荷試験では、血漿レニン活性が上昇するのに伴い、アルドステロンも上昇した。

#### D. 考察

症例 1 で同定した L158P 変異は、スイス人の古典的先天性副腎リポイド過形成症で報告されており、StAR 活性を完全に損なう(Fluck CE, et al. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 5304-5308, 2005)。症例 2、3 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。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、これまでに報告のない新規変異であり、StAR 活性を低下させるが、残存活性が認められる。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る。

今回報告した非古典的 StAR 欠損症の 3 例では、血漿レニン活性は正常からやや高値、血清電解質は正常であり、立位・フロセミド負荷で血漿レニン活性、アルドステロンの上昇が認められ、鉱質コルチコイドの分泌は保持されている。このような症例では、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り、その確定

診断には遺伝子解析が必須であると考えられる。

#### E. 結論

非古典的 StAR 欠損症においては、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。

#### F. 研究発表

学会発表

Fujieda K, Tajima T, Katsumata N. Cytochrome P450scc as a cause of congenital lipoid adrenal hyperplasia (lipoid CAH) (in Symposium P450). 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto, Japan, March 26-30, 2010.

Yoshimura K, Hanamiya R, Tsutsumi M, Katsumata N, Kojima T, Hirose S. Two male siblings with microdeletion of the Xp21 region presenting with adrenal hypoplasia and mental retardation. 6th Congress of Asian Society of Pediatric Research & 51st Annual Meeting of Taiwan Pediatric Association, Taipei, Taiwan, April 15-20, 2010.

Katsumata N, Nagasaki K, Ogawa Y, Kikuchi T. Novel C617Y Mutation in the 7th Transmembrane Segment of Luteinizing Hormone/Choriogonadotropin Receptor in a Japanese Boy with Peripheral Precocious Puberty. 92nd Annual Meeting of the Endocrine Society, San Diego, CA, USA, June 19-22, 2010.

吉村和子, 花宮理比等, 堤信, 橋口千鶴, 平田雅昭, 村松和彦, 勝又規行, 廣瀬伸一. 微小欠失による精神運動発達遅滞を認めた DAX-1 遺伝子異常症の兄弟例. 第 113 回日本小児科学会学術集会, 盛岡, 4 月 23-25 日, 2010.

勝又規行, 藤原幾磨, 小川英伸, 藤倉かおり. 高血圧を呈さない 17 $\alpha$ 水酸化酵素欠損症の遺伝子解析. 第 44 回日本小児内分泌学会学術集

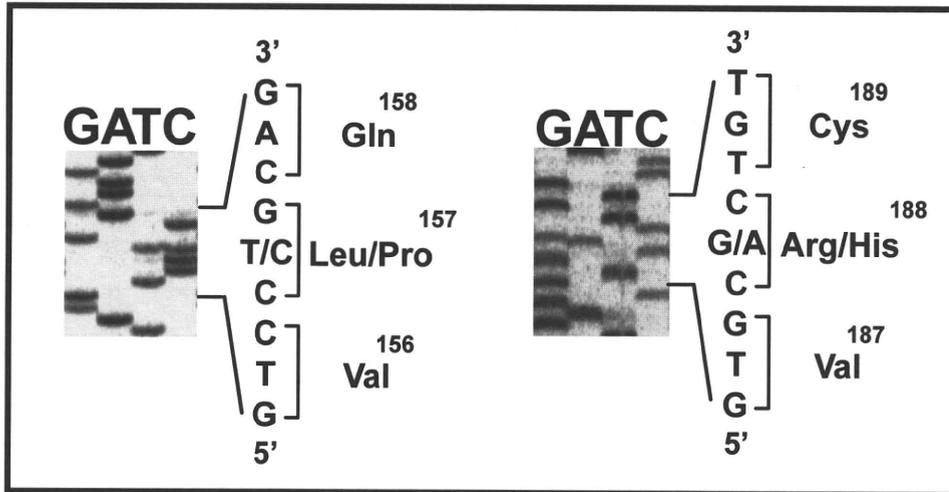
会、大阪、10月7-9日、2010.

脇和之, 山本晶子, 西垣五月, 水野祐介, 野田雅裕, 内木康博, 堀川玲子, 小崎里華, 勝又規行, 佐合治彦. 21 水酸化酵素欠損症の出生前診断・胎児治療を行った9例. 第44回日本小児内分泌学会学術集会、大阪、10月7-9日、2010.

## G. 謝 辞

本研究にご協力いただいた埼玉県立小児医療センター代謝内分泌科・望月弘先生、福井県立病院小児科・津田英夫先生に深謝いたします。

A. 家系 1、症例 1



B. 家系 2、症例 2

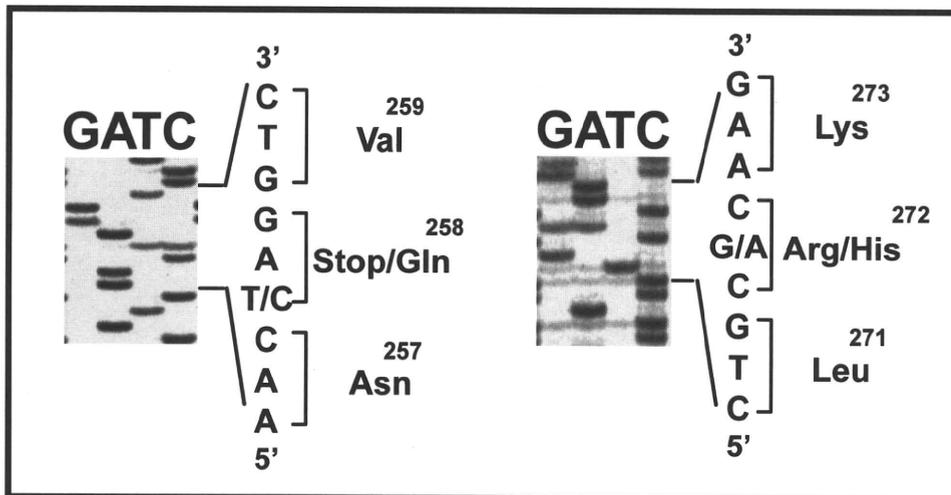


図 1. 非古典的 StAR 欠損症患者の *STAR* 遺伝子解析。

A. 症例 1 は L157P 変異と R188H 変異の複合ヘテロ接合体。

B. 症例 2 は Q258X 変異と R272H 変異の複合ヘテロ接合体。

表 1. 非古典的 StAR 欠損症患者の副腎不全発症時の臨床所見

	家系 1	家系 2	
	症例 1	症例 2	症例 3
性別	女	男	女
発症年齢	2 歳 5 ヶ月	1 歳 8 ヶ月	1 歳 8 ヶ月
初発症状	色素沈着、発熱、痙攣	色素沈着	色素沈着
ACTH (pg/ml)	3000	7500	380
Cortisol ( $\mu$ g/dl)	2.0	2.7	8.8
Aldosterone (pg/ml)	41	13	46
PRA (ng/ml/h)	5.5	4.6	0.9
Na (mEq/l)	134	138	138
K (mEq/l)	3.9	4.4	4.0
Cl (mEq/l)	89	106	107
BS (mg/dl)	63	101	94
副腎 CT 所見	正常	正常	正常

表 2. 非古典的 StAR 欠損症患者の ACTH 負荷試験および立位-フロセミド負荷試験所見

	家系 1	家系 2	
	症例 1	症例 2	症例 3
検査時年齢	2 歳 5 ヶ月	2 歳 3 ヶ月	2 歳 2 ヶ月
ACTH 負荷 Cortisol ( $\mu$ g/dl)	2.0 → 2.0	3.2 → 3.0	10.9 → 12.3
立位-フロセミド負荷 PRA (ng/ml/h)	5.5 → >20	4.6 → 16.5	0.1 → 3.2
Aldosterone (pg/ml)	41 → 140	13 → 38	46 → 73

## 21-水酸化酵素欠損症の成長予後に関する検討

研究分担者 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・講師

### 【研究要旨】

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。今回当科での本疾患患者の成長、ステロイド投与量などの関連を検討した。対象は14名(男性3名、女子11名)である。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。

### A. 研究目的

1989年より21-水酸化酵素欠損症(21-OHD)の新生児マススクリーニングが施行され、出生18,000人に1人の割合で本症患者が新生児期に発見されるようになった。過去の報告によれば21-OHDでは成人身長が $-1$ 〜 $-2SD$ 程度の低身長をきたすとされている。低身長の原因としては、ハイドロコルチゾンの投与量、投与回数、CYP21遺伝子の変異などの因子が関係していると考えられている。今回、北海道大学病院で新生児マススクリーニングにより早期に治療開始した21-OHDの身長予後について検討した。

### B. 研究方法

当院にて1歳前より治療を行い、成人身長に到達した15歳以上になった21-OHD患者14名(男性3名、女子11名)対象に、各年齢での身長、予測身長との差、治療薬剤投与量、投与回数、骨年齢について検討した。

### C. 研究結果

1. 成人身長に到達した男子で身長は $-1.26SD$ 、女子では $-0.78SD$ であった。
2. 両親の身長より計算した目標身長に比較し、

女子では $-0.58SD$ 、男子では $-0.34SD$ 低かった。

3. 成長経過では出生後半年までに身長SDスコアは $-0.75SD$ 、1歳までに $-1.5SD$ まで低下していた。しかしその後8歳までに $-0.1SD$ となった。

4. 思春期の発来時期を検討したが、男子で平均11歳、女子で平均10歳であった。さらに思春期の獲得身長は女子で $18.3 \pm 5.2\text{cm}$ 、男子で $19.0 \pm 4.31\text{cm}$ 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。

5. 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。

### D. 考案

過去の報告でも日本では出生後1歳まで身長の伸びが低下することが示されてきたが、我々の検討でも同様であった。今回思春期期の伸びが低下した原因については、思春期前にすでに骨成熟が副腎アンドロゲンにより進んでいた症例が存在したためである。1歳までの成長率の低下であるが、日本でのグルココルチコイド投与量は新生児期から乳児期にかけて、欧米より多い。成長率低下と関連するかは今後多数例で

の解析が必要である。

## E. 結論

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まで低下していた。この早期の成長の停滞が低身長を招くと推測された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

学会発表

1. Nakamura A, Jo W, Ishizu K, Tajima T, Fujieda K Longitudinal growth of patients with 21-hydroxylase deficiency. International Symposium on Pediatric Endocrinology. 2010 3月31日 東京

2. Tajima T, Fujieda K Cytochrome P450csc as a cause of congenital adrenal hyperplasia (lipoid CAH) (シンポジウム) 2010年3月26日 京都

4. Tajima T Dr Kenji Fujieda Memorial Lecture 49th Annual Meeting of the European Society for Pediatric Endocrinology 2010年9月24日プラハ

5. 田島敏広 先天性副腎過形成症の最近の進歩 (教育講演) 第113回日本小児科学会学術集会 2010年4月 盛岡

論文・総説

1. 田島敏広、中村明枝、城和歌子、石津桂、奥原宏治、藤枝憲二

先天性副腎過形成の成因と治療の最近の話題 日本小児科学会雑誌 114; 1373-1380, 2010

2. 田島敏広 ホルモン薬 小児の薬の使い方 小児内科増刊号 42 228-229

3. 田島敏広 先天性副腎過形成と無月経、月経異常 産科と婦人科 33 1301-1305 2010

4. 田島敏広 小児の治療指針 先天性副腎過形成症 2010年増刊号 550-551頁, 2010年

英文

1. Dateki S, Kosaka K, Hasegawa K, Tanaka H, Azuma N, Yokoya S, Muroya K, Adachi M, Tajima T, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, Sato N, Fukami M, Ogata T. Heterozygous orthodontic homeobox 2 mutations are associated with variable pituitary phenotype. J Clin Endocrinol Metab 95, 756-764, 2010

2. Tajima T, Ishizu K, Yorifuji T. Loss of function mutation (V101A) in a LIM domain of the LHX4 gene causes combined pituitary hormone deficiency. Exp Clin Endocrinol Diabetes 118, 405-409, 2010

3. Nakamura A, Shimizu C, Nagai S, Yoshida M, Aoki K, Kondo T, Miyoshi H, Wada N, Tajima T, Terauchi Y, Yoshioka N, Koike T. Problems in diagnosing atypical Gitelman's syndrome presenting with normomagnesaemia. Clin Endocrinol 72, 272-276, 2010

4. Adachi M, Asakura Y, Muroya K, Tajima T, Fujieda K, Kuribayashi E, Uchida S. Increased Na reabsorption via the Na-Cl cotransporter in autosomal recessive pseudohypoaldosteronism. Clin Exp Nephrol 14, 228-232, 2010

## (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

研究分担者 諸橋 憲一郎  
九州大学大学院医学研究院 教授

### 【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ている。一方、本遺伝子のノックアウトマウスには副腎が形成されないこと、ならびに本遺伝子の強制発現マウスでは副腎形成が促進されることを考慮すると、本因子は単にステロイドホルモン産生に関与する遺伝子の制御を行っているだけではなく、副腎皮質細胞の分裂や増殖を制御していると推測される。しかしながら、本因子がどのようなメカニズムで細胞増殖を制御しているのかは不明である。この問題を明らかにするため、副腎皮質における本因子の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。

### A. 研究目的

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。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することを目的とした。

### B. 研究方法

Ad4BP/SF-1 に対する抗体を用いた免疫沈降を行うことで本因子が核内で結合している DNA 領域を回収する。その後、増幅ならびにサイズフラクショネーションを行い、次世代シーケンサーによる塩基配列決定を行った。次世代シーケンサーによって得られる塩基配列情報は膨大なものであり、これを解析するためのツールを、オープンリソースを用いて検討した。

（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

免疫沈降には副腎皮質由来の Y1 細胞を用いて条件検討を行い、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。また、次世代シーケンサーについては、本学医学研究院に設置されている機器を用いるため、詳細な検討を行う必要は無かったが、数回の予備の実験を行い、我々が調製した DNA から理想的な結果が得られることを確認した。

また実際には、胎仔副腎皮質や成獣副腎皮質が GFP によって標識されたマウスより、FACS にてこれらの細胞を分取することになるため、FACS による回収の検討を行い、条件を設定した。

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。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。

#### D. 考察

本年度は実験系の確立に多くの時間を費やしたが、理想的な実験系を確立できたものと考えている。今後、実際のサンプルを用いてデータを得てゆくところであり、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關係に限らず、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。

#### E. 結論

免疫沈降法と次世代シーケンサーによって、副腎皮質における Ad4BP/SF-1 の標的遺伝子の全体像を明らかにするための実験系を確立した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1, Kusaka, M., Katoh-Fukui, Y., Ogawa, H., Miyabayashi, K., Baba, T., Sugiyama, N., Sugimoto, Y., Okuno, Y., Kodama, R., Iizuka-Kogo, A., Senda, T., Aizawa, S. and Morohashi, K.  
Abnormal epithelial cell polarity and migration of Emx2 KO embryonic gonads induced by ectopic EGFR expression.  
Endocrinology 151, 5893-5904, 2010
- 2, Yokoyama, C., Katoh-Fukui, Y., Morohashi, K., Konno, D., Azauma, M. and Tachibana T.  
Production and characterization of monoclonal antibodies to germ cells.  
Hybridoma 29, 53-57, 2010

##### 2. 学会発表

(招待講演)

- 1, Morohashi, K.  
Keynote Lecture; Molecular and Cellular Mechanisms of Testis Differentiation

- Gordon Research Conference, 2010  
Reproductive Tract Biology  
Andover, Andover, New Hampshire, USA,  
Aug 15-19
- 2, Morohashi, K., Mohamad, Z., Baba, T., Miyabayashi, K., Otake, H., Shima, Y.  
Symposium; Common Steroidogenic Primordia in Gonadal and Adrenal Morphogenesis  
Lineage of Testicular Leydig cells and Adrenal Cortex  
43 rd Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction  
Milwaukee, USA, July 28-Aug 3
  - 3, Morohashi, K.  
The Keith Parker Memorial Lecture; Ad4BP/SF-1 as the key factor for steroidogenic cell development  
14th Adrenal Cortex Conference  
San Diego, USA, June 16-18
  - 4, Shima, Y., Baba, T., Miyabayashi, K., Otake, H., Kurihara, Y., and Morohashi, K.  
Transcriptomic analysis of fetal Leydig cells  
第 33 回 日本分子生物学会、第 83 回 日本生化学会 神戸 12 月 7 日-10 日
  - 5, 諸橋 憲一郎  
ステロイド産生細胞の発生  
第 28 回内分泌代謝サマーセミナー  
長崎 7 月 8 日-10 日

#### 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

## 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

中村 保宏、 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】 原発性アルドステロン症の発症機序は、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。病理組織診断では、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に関わる因子の発現はほとんど解明されていない。本研究では、これらの ZG において、アルドステロン合成に関与する酵素の 1 つである HSD3B2 の転写を調節する代表的な 4 調節因子の発現度を検討することで、原発性アルドステロン症の病態を解明することを目的とした。

【対象と方法】 東北大学病院にて手術で切除された IHA11 例、APA18 例、腎癌などで合併切除された正常副腎 20 例を対象とした。IHA、正常副腎、および APA の付随副腎における ZG および束状層(ZF)において、NGFIB, GATA-6, SF-1, DAX1 の発現を免疫染色で調べ、H-score にて比較検討した。

【結果】 IHA の ZG では、NGFIB, GATA-6, SF-1, DAX1 発現が正常副腎の ZG に比べ有意に高値であった( $P<0.05$ )。また NGFIB は APA の付随副腎 ZG に比べても有意に高値であった( $P<0.05$ )。APA の付随副腎 ZG では、GATA-6, DAX1 発現が正常副腎の ZG に比べ有意に高値であった( $P<0.05$ )。

【考察】 IHA の ZG や APA の付随副腎 ZG では、NGFIB, GATA-6, SF-1, DAX1 の発現度が、それらの病態の修飾因子となっていることが考えられ、うち IHA の ZG では、NGFIB 発現上昇がアルドステロン産生亢進の一要因となっている可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

原発性アルドステロン症の発症機序は、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。しかし、これまでの研究では両 ZG 間での HSD3B2 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。本研究では、これらの ZG において、アルドステロン合成に関与する酵素の 1 つである HSD3B2 の転写を調節する代表的な 4 調節因子である、GAT-6, GATA-6, SF-1, DAX1 の発現度を検討することで、原発性アル

ドステロン症の病態を解明することを目的とした。

## B. 研究方法

東北大学病院にて手術で切除された IHA11 例、APA18 例、腎癌などで合併切除された正常副腎 20 例を対象とした。IHA、正常副腎、および APA の付随副腎における ZG および束状層 (ZF) において、NGFIB, GATA-6, SF-1, DAX1 の発現を免疫染色で比較検討した。これらの免疫染色の評価には H-score を使用した。この際に、ZG の判別のため C17 (ZF に陽性) および 3βHSD (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)。

(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

NGFIB, GATA-6, SF-1, DAX1 のいずれも副腎皮質細胞の核に発現しており、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 ( $p < 0.05$ )。APA の付随副腎や IHA の ZG での NGFIB, GATA-6, DAX1 の発現は正常副腎の ZG に比べ有意に高値であった ( $p < 0.05$ )。IHA の ZG での SF-1 の発現は正常副腎の ZG に比べ有意に高値であった ( $p < 0.05$ )。また、IHA の ZG での NGFIB 発現は APA の付随副腎 ZG に比べ有意に高値であった ( $p < 0.05$ )。

## D. 考察

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。

## E. 結語

転写調節因子の発現パターンと、APA の付随副腎、IHA の ZG における HSD3B2 発現調節との一定の関連が示唆された。

## F. 研究発表

・論文発表(邦文)

1. 笹野公伸、中村保宏：機能性および非機能性副腎皮質腫瘍の病理組織学的鑑別—副腎皮質機能は摘出検体でどこまでわかるか？、医学のあゆみ、232 : 911-915、2010
2. 笹野公伸：副腎皮質疾患とメタボリック症候群、医学のあゆみ、232 : 885、2010
3. 笹野公伸：神経内分泌腫瘍の病理診断、日本消化器病学会雑誌、107 : 374-379、2010
4. 笹野公伸：副腎皮質微小腺腫、病理と臨床、28 : 302-303、2010
5. 笹野公伸：乳癌の術前補助療法の治療効果の病理組織学的判定の長所と限界、CANCER BOARD 乳癌、3 : 47-51、2010
6. 笹野公伸：エストロゲン依存性腫瘍の新しい展開、日本更年期学会雑誌、18 : 96-100、2010
7. 笹野公伸：遺伝子発現パターンからみた乳癌分類：乳癌の分子病理学的分類、最新医学、65 : 48-53、2010
8. 笹野公伸：アロマターゼ阻害剤を取り巻く最近の話題、別冊 医学のあゆみ 乳癌治療 Update—最新診療コンセンサス、45-49、2010
9. 笹野公伸：消化管／膵臓の神経内分泌腫瘍の悪性度分類、医学のあゆみ、234 : 303-304、2010

・論文発表 (英文)

1. Kyono K, Doshida M, Toya M, Sato Y, Akahira J, Sasano H: Potential indications for ovarian autotransplantation based on the analysis of 5,571 autopsy findings of females under the age of 40 in Japan. *Fertil Steril.* 93:2429-2430. 2010
2. Geisler J, Suzuki T, Helle H, Miki Y, Nagasaki S, Duong NK, Ekse D, Aas T, Evans DB, Lønning PE, Sasano H: Breast cancer aromatase expression evaluated by the novel antibody 677: Correlations to intra-tumor estrogen levels and hormone receptor status. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 118:237-241. 2010
3. Hata S, Miki Y, Fujishima F, Sato R, Okaue A, Abe K, Ishida K, Akahira J, Unno M, Sasano H: Cytochrome 3A and 2E1 in human liver tissue: Individual variations among normal Japanese subjects. *Life Sci.* 86:393-401. 2010
4. Chanplakorn N, Chanplakorn P, Suzuki T, Ono K, Chan MS, Miki Y, Saji S, Ueno T, Tbi M, Sasano H: Increased estrogen sulfatase (STS) and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1(17beta-HSD1) following neoadjuvant aromatase inhibitor therapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 120:639-648. 2010
5. Takagi K, Miki Y, Nagasaki S, Hirakawa H, Onodera Y, Akahira J, Ishida T, Watanabe M, Kimijima I, Hayashi S, Sasano H, Suzuki T: Increased intratumoral androgens in human breast carcinoma following aromatase inhibitor exemestane treatment. *Endocr Relat Cancer.* 17:415-430. 2010
6. Yiu CC, Sasano H, Ono K, Chow LW: Changes in protein expression after neoadjuvant use of aromatase inhibitors in primary breast cancer: a proteomic approach to search for potential biomarkers to predict response or resistance. *Expert Opin Investig Drugs.* 19:S79-S89. 2010
7. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torkelson EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC: American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol.* 28:2784-2795. 2010
8. Morimoto R, Kudo M, Murakami O, Takase K, Ishidoya S, Nakamura Y, Ishibashi T, Takahashi S, Arai Y, Suzuki T, Sasano H, Ito S, Satoh F: Difficult-to-control hypertension due to bilateral aldosterone-producing adrenocortical microadenomas associated with a cortisol-producing adrenal macroadenoma. *J Hum Hypertens.* 2010 May 13. [Epub ahead of print]
9. Iino K, Oki Y, Yamashita M, Matsushita F, Hayashi C, Yogo K, Nishizawa S, Yamada S, Maekawa M, Sasano H, Nakamura H: Possible Relevance between Prohormone Convertase 2 Expression and Tumor Growth