

201128165A

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 柳 瀬 敏 彦

平成 24 年 3 月

目 次

I. 序文	1
II. 研究班構成員名簿	3
III. 総括研究報告書	5
研究代表者	
福岡大学医学部 内分泌・糖尿病内科学教授	
	柳瀬 敏彦
IV. 分担研究報告	
(1) 疫学関連研究	
1. 原発性アルドステロン症の全国における実態調査(その2)	15
横浜労災病院内分泌・糖尿病センター	
	西川 哲男
2. 副腎偶発腫で発見された副腎癌の長期予後	
東邦大学医学部内科学糖尿病・代謝・内分泌科	27
	上芝 元
3. 副腎性サブクリニカルクッシング症候群患者の予後調査	31
九州大学大学院医学研究院病態制御内科学	
	高柳 涼一
(2) 先天性副腎酵素異常症の生化学的・遺伝子学的診断システムの確立	
4. 本邦のAllgrove症候群の5家系5症例の分子遺伝学的、臨床的検討	39
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	
	勝又 規行
5. 21-水酸化酵素欠損症に対するタンデムマススクリーニングの有用性について	45
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	
	田島 敏広
6. 尿5 α /5 β 代謝物比による乳児～小児5 α -reductase欠損症診断の カットオフ値設定の研究	49
慶應義塾大学医学部小児科学	
	長谷川 奉延
7. 副腎ホルモン産生異常症の全国疫学調査における、21水酸化酵素欠損症 の成人身長および成人期副腎ホルモン補充療法についての解析	55
旭川医科大学小児科	
	棚橋 祐典

(3) 副腎低形成症の基盤研究としての副腎発生・分化機構の基礎研究

8. SF-1/Ad4BP誘導性ステロイド産生細胞のアルドステロン産生について 63
福岡大学医学部内分泌・糖尿病内科学
柳瀬 敏彦
9. ステロイド産生細胞分化・再生に関する研究 69
福井大学医学部分子生体情報学
宮本 薫
10. 副腎皮質の発生初期過程に関する研究 75
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) 原発性アルドステロン症(PA)の診断基準の再評価

11. 原発性アルドステロン症の新しい診断・治療戦略の開発 79
京都大学大学院医学研究科 内分泌代謝内科
曾根 正勝
12. 降圧薬内服下におけるアルドステロン/レニン比による
原発性アルドステロン症のスクリーニング 83
慶應義塾大学医学部 腎臓内分泌代謝内科
柴田 洋孝
13. 「CTで片側結節を認める原発性アルドステロン症を副腎静脈
サンプリングなしで手術治療する条件」に関する研究 91
東北大学病院 腎高血圧内分泌科
佐藤 文俊
14. 原発性アルドステロン症における機能確認検査の診断的意義 95
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 光荣
15. 当院で超選択的ACTH負荷副腎静脈採血を行い診断した副腎疾患
に関する研究 101
横浜労災病院
西川 哲男
16. 原発性アルドステロン症患者における副腎静脈サンプリングでの
迅速コルチゾール測定の有用性—ACTH負荷前後での検討— 107
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

(5) GC抵抗症や偽性低アルドステロン症の病態理解と治療法開発のための

GC/アルドステロン作用機構の基礎的研究

17. 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応答性遺伝子発現とその生物学的意義 …… 113
東京大学医科学研究所 先端医療研究センター
田中 廣壽
18. 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 …… 121
東京大学分子細胞生物学研究所
加藤 茂明

(6) 副腎腫瘍の成因や発生機序に関する基礎的研究

19. 「アルドステロン産生腺腫におけるカリウムチャンネルの変異に関する検討」
に関する研究 …… 125
福井大学医学部第三内科
宮森 勇
20. 正常および腫瘍性副腎組織におけるMetabotropic/Ionotropic Glutamate
Receptors type 3 (mGLUR3 and iGLUR3)発現の検討 …… 129
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
笹野 公伸
21. CYP11B2遺伝子のNFATによる転写調節 …… 137
高知大学保健管理センター
岩崎 泰正

V. 会議記録

- 平成23年度 研究報告会プログラム …… 143

VI. 研究成果の刊行に関する一覧表 …… 167

I. 序 文

序 文

平成 23 年度より故藤枝憲二教授を引き継ぎ、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」班の研究代表者を担当させていただくことになりました。本研究班では副腎ホルモン産生・作用異常症の実態を把握し、病因・病態の解明に努め、より適切な診断・治療法を国民に提示することを目標としています。中でも原発性アルドステロン症(PA)、副腎低形成（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な対象疾患としています。藤枝班では平成 20-22 年に上記 5 疾患とサブクリニカルクッシング症候群(SCS)、アジソン病を対象として平成 9-10 年度以来、約 10 年ぶりの全国疫学調査が実施されました（平成 22 年度報告書参照）。一方でこのような全国疫学調査は、何度も実施できるわけではありませんので、本研究班では、本調査を将来に向けてより有効に活用することを計画しています。二次調査回答率が低かった PA、SCS、アジソン病については改めて二次調査票の回収率の向上により、さらに信頼性の高い統計解析を計画しており、また様々な角度から基礎統計以外のサブ解析も試みていきたいと思えます。また、疾患によっては過去の全国疫学調査を活用し、追跡予後調査を行うことにより適切な治療ガイドラインの作成に役立てたいと考えています。一方、ステロイド産生・作用異常症の病態解明や革新的な治療法の開発には、臨床研究のみならず基礎研究も重要であり、推進していく必要があります。

平成 23 年 7 月 2 日（土）、12 月 10 日（土）の 2 回にわたり、それぞれ褐色細胞腫研究班、PHAS-J2 研究班（代表：成瀬光栄氏）と本班の共同開催で、副腎疾患の中ではもっとも頻度が高く、高血圧の成因として注目度も高い PA に関する公開シンポジウムを東京にて開催いたしました。今後も市民向け、一般医家に向けてこのような情報公開を積極的に行いたいと思えます。

本研究班の研究目標の達成に向けてご尽力いただいている研究分担者の皆様、また全国疫学研究の重要性を認識していただき疫学調査にご協力いただいている全国の先生方に心から深謝申し上げます。また、種々、ご指導いただきました厚生労働省並びに国立保健医療科学院の関係者の皆様にも深謝いたします。

平成 23 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 柳瀬 敏彦

II. 研究班構成員名簿

厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服に関する調査研究
「副腎ホルモン産生異常に関する調査研究」 班
構成員名簿

研究代表者		
柳瀬敏彦	福岡大学医学部内分泌・糖尿病内科	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	教授
宮本 薫	福井大学医学部分子生体情報学	教授
加藤 茂明	東京大学分子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
高柳 涼一	九州大学大学院医学研究院病態制御内科	教授
成瀬 光荣	国立京都医療センター内分泌代謝高血圧研究部	部長
長谷川奉延	慶應義塾大学医学部小児科	准教授
田島 敏広	北海道大学大学院小児科、小児内分泌学	講師
勝又 規行	国立成育医療研究センター分子内分泌研究部	室長
棚橋 祐典	旭川医科大学小児科、小児内分泌学	助教
西川 哲男	横浜労災病院	院長
宮森 勇	福井大学医学部第三内科	教授
柴田 洋孝	慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科	専任講師
武田 仁勇	金沢大学大学院臓器機能制御学（内分泌代謝内科）	准教授
曾根 正勝	京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科	特定講師
佐藤 文俊	東北大学病院腎高血圧内分泌科	講師
岩崎 泰正	高知大学保健管理センター	教授
笹野 公伸	東北大学大学院医学系研究科病理診断学	教授
上芝 元	東邦大学医学部内科学糖尿病代謝内分泌科	准教授
事務局	〒814-0180 福岡市城南区七隈 7 丁目 45-1 福岡大学医学部 内分泌・糖尿病内科学	
		明比 祐子、渡辺 幸恵
会 計	〒814-0180 福岡市城南区七隈 8 丁目 19-1 福岡大学研究推進部	林田 圭子

Ⅲ. 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 柳瀬 敏彦

福岡大学医学部 内分泌・糖尿病内科

研究要旨

本研究班では、疫学関連研究、原発性アルドステロン症関連臨床研究、ステロイド合成・副腎分化・再生関連研究、ステロイド作用の分子生物学的調節機構に関する研究、先天性副腎不全および副腎酵素異常症における病態解明と診断・治療に関連する研究を行い、以下のような成果が報告された。(1) 疫学関連研究：平成 22 年度報告の原発性アルドステロン症 (PA) の全国疫学データのサブ解析によりアルドステロン/レニン比 (ARR) > 20 (200) の陽性率は 83%、確定診断はフロセミド立位試験並びに迅速 ACTH 試験で 90% の陽性率、AVS 施行は 66%、心血管系合併例は 10% と判明した (西川)。過去の全国疫学調査により副腎癌として報告された 50 例の長期予後について追跡調査がなされ、50 例中 17 例が 5 年以内に死亡し、11 例が手術により治癒し 7 年以上の生存が確認された (上芝)。副腎性サブクリニカルクッシング症候群 (SCS) の予後は不明であり手術適応については明確でない。副腎性 SCS と診断された患者の追跡調査を施行され、高血圧や糖尿病を合併する副腎性 SCS では、腫瘍摘出によりこれらの心血管イベントリスクファクターの改善が期待される結果であった (高柳、柳瀬)。(2) 先天性副腎酵素異常症の生化学的・遺伝子学的診断システムの確立：Allgrove 症候群の 5 家系 5 症例の分子遺伝学的、臨床的検討が行われ、5 症例とも AAS 遺伝子変異が同定され、臨床的特徴として、アカラシアが明らかでない例、運動・言語の発達遅滞、痙性歩行が幼少時から認められる例が存在する、などの特徴が明らかにされた (勝又)。21-水酸化酵素欠損症 (OHD) の新生児期スクリーニングの 17-OHP 測定では偽陽性が多いことから、LC-MS/MS 法による測定が検討された。LC-MS/MS 法では早産児でも 17-OHP が高値を示し、現時点ではむしろスクリーニング後の確定診断のための二次検査に有用であった (田島)。乳児～小児 5α -reductase 欠損症 (5α RD) 診断目的で、 $5\alpha/5\beta$ 代謝物比の診断精度が検討され、 5α THF/ 5β THF、 5α THE/ 5β THE の有用性が示唆されたがカットオフ値の設定は今後の課題である (長谷川)。H22 年度報告の全国疫学調査のサブ解析として 21 水酸化酵素欠損症 (21OHD) の成人身長、肥満の実態が解析され、成人身長および体重のコントロールは男女とも十分でなかった。成人期の GC 投与は多様であったが、投与量の明らかな多寡

はなかった(棚橋)。(3) 副腎低形成症の基盤研究としての副腎発生・分化機構の基礎研究: 間葉系幹細胞に SF-1/Ad4BP を遺伝子導入しステロイド産生細胞へ形質転換させた細胞は AII 受容体 1 型 (AT1) を発現し、AII 応答性に CYP11B2 の発現誘導とアルドステロン産生増加を認めることを示した (柳瀬)。ゲノムワイドの ChIP-on-chip assay およびマイクロアレイによる網羅的発現解析により、新たな SF-1 標的遺伝子としてヘム合成の律速酵素である ALAS1 を同定した (宮本)。次世代シーケンサーとクロマチン免疫沈降法により一群の解糖系酵素遺伝子が Ad4BP/SF-1 の標的遺伝子となり、ステロイド産生細胞増殖に関わっている可能性が示唆された (諸橋)。(4) PA 診断基準の再評価: 現行の診断基準の普及努力と同時に、一般医科レベルでも簡易に診断していくための診断基準の提示に向けた幾つかの臨床的研究が報告された。アルドステロン産生副腎腺腫 (APA) 患者では非アルドステロン症患者や特発性アルドステロン症 (IHA) 患者に比べ ACTH 負荷後の血漿アルドステロン濃度 (PAC) が有意に高値で PA 疑い患者の中から高い感度で APA 患者を選別し、副腎静脈サンプリング (AVS) を必要とする症例のスクリーニングに有用と考えられた (曽根)。PA スクリーニングにおいて臨床的に PA を強く疑えば、内服降圧薬の種類を問わず、まず ARR によるスクリーニングを一度は行う意義が高いと報告された (柴田)。LC_MS/MS を用いた高感度測定法で末梢血の 18-oxocortisol (18-oxoF) 濃度を測定し、AVS の成績と比較検討した結果、末梢血 18-oxoF 濃度は PA の subtype 診断に有用であることが示された (佐藤)。PA の診断における機能確認検査は 1 種類の検査で十分で、特に ARR あるいは PAC 高値例では機能検査を実施せずに、次の病型・局在診断を行うことが可能であることが示唆された (成瀬)。超選択的 ACTH 負荷副腎静脈法 (SS-ACTH-AVS) の導入により APA とコルチゾール産生腺腫 (CPA) を腺腫を含む片側副腎部分切除術を施行することが可能であった (西川)。PA 患者の AVS において、迅速半定量法によるコルチゾール測定が副腎静脈へのカテーテルの挿入の成否の判定に極めて有用であることが示された (武田)。(5) GC 抵抗症や偽性低アルドステロン症の病態理解と治療法開発のための GC/アルドステロン作用機構の基礎的研究: グルココルチコイド (GC) と GC レセプター (GR) の作用系モデルとして骨格筋における GR 応答性遺伝子を同定したところ、REDD1 と KLF15 遺伝子産物が、mTOR 活性抑制、atrogin-1、MuRF1 ユビキチンリガーゼ遺伝子発現亢進作用などによって GC による骨格筋同化抑制と異化作用の基盤を担っていることが判明し、GC 誘発性筋萎縮の発症機構の一端が明らかになった (田中)。偽性低アルドステロン症 I 型の原因遺伝子であるミネラルコルチコイドレセプター (MR) と相互作用する新規因子 p150 を同定した。p150 は腎臓遠位尿細管及び大腸上皮において MR と共局在を示し、少なくともヒストン脱アセチル化活性を介して MR 標的遺伝子発現を負に制御することが判明した (加藤)。(6) 副腎腫瘍の

成因や発生機序に関する基礎的研究：最近、カリウムチャンネルの一種である Kir3.4 をコードする KNCJ5 の遺伝子変異が APA の成因として注目されている。日本人における APA 例の腫瘍部においてカリウムチャンネルの一種である Kir3.4 をコードする KNCJ5 の遺伝子の G151R あるいは L168R ヘテロ接合型変異が確認された（宮森）。代謝型グルタミン酸受容体に属する glutamate metabotropic receptor 3 (GRM3) とイオン型グルタミン酸受容体の 1 つである ionotropic glutamate receptor 3 (iGLUR3) は正常副腎皮質、副腎皮質腫瘍に発現し、副腎組織での生理的、病理的役割に参与している可能性が示唆された（笹野）。副腎皮質における CYP11B2 転写調節機序の研究からアンジオテンシン II (AngII) や K は少なくとも一部 Ca^{2+} /NFAT シグナル伝達系を介してアルドステロン合成を調節している可能性が示唆された（岩崎）。

分担研究者

諸橋憲一郎	九州大学大学院医学研究院分子生命科学教授
宮本 薫	福井大学医学部分子生体情報学教授
加藤 茂明	東京大学分子生物学研究所核内情報研究分野教授
宮森 勇	福井大学医学部第三内科教授
高柳 涼一	九州大学大学院医学研究院病態制御内科教授
西川 哲男	横浜労災病院院長
成瀬 光荣	国立京都医療センター内分泌代謝高血圧研究部部長
笹野 公伸	東北大学大学院医学系研究科病理診断学教授
岩崎 泰正	高知大学保健管理センター教授
田中 廣壽	東京大学医科学研究所先端医療研究センター准教授
武田 仁勇	金沢大学大学院医学系研究科分子病態内科准教授
長谷川奉延	慶應義塾大学医学部小児科准教授
上芝 元	東邦大学医学部内科学糖尿病代謝内分泌科准教授
勝又 規行	国立成育医療研究センター研究所室長
田島 敏広	北海道大学大学院小児科講師
佐藤 文俊	東北大学病院腎高血圧内分泌科講師
柴田 洋孝	慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科専任講師
棚橋 祐典	旭川医科大学・小児科助教
曾根 正勝	京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科特定講師

A. 研究目的

本班は、副腎ホルモン産生・作用異常症の実態を把握し、病因・病態の解明に努め、より適切な診断・治療法を国民に提示することを目的とする。以下の研究を3カ年計画で実施することを目標としている。

I. 疫学研究：平成20-22年度全国疫学調査のサブ解析、予後調査研究

II. 基礎・臨床研究の推進と新たな診断・治療法の開発

- (1) 先天性副腎酵素異常症の生化学的・遺伝子学的診断システムの確立
- (2) 副腎低形成症の基盤研究としての副腎発生・分化機構の基礎研究の推進
- (3) ES細胞あるいは間葉系幹細胞から再生したステロイド産生細胞を用い、臨床応用を目指した治療法の開発
- (4) PA診断基準の再評価並びに手術療法と薬物療法に関する優劣性評価と治療指針の策定
- (5) 副腎不全症における副作用予防の観点からのEBMに基づく至適ステロイド補充療法の提示（指針作成）
- (6) GC抵抗症や偽性低アルドステロン症の病態理解と治療法開発のためのGC/アルドステロン作用機構の基礎的研究の推進、GC副作用発現機序への応用研究の展開
- (7) PAや副腎癌など副腎腫瘍の成因や発生機序に関する基礎的研究の推進
- (8) SCSの診断基準の見直し、改訂診断基準の提示

これらの設定目標のうち、平成23年度に実施された研究内容について以下に記載する。

B 研究方法、C 研究成果及びD 考察

(1) 疫学関連研究

平成22年度報告の原発性アルドステロン症(PA)の疫学データ（一次調査4032例のうち、1310件の回答で、5年間での全国推定患者数は7487例）のサブ解析の結果、77%が片側腺腫、低K血症（ $<3.5\text{mEq/L}$ ）69%、アルドステロン/レニン比（ARR） >20 （200）は83%、確定診断はフロセミド立位試験並びに迅速ACTH試験で90%の陽性率、AVS施行は66%、心血管系合併が10%と判明した（西川）。平成11年度より5年間にわたり全国1014施設への疫学調査により副腎偶発腫と診断された3678例のうち副腎癌として報告された50例の長期予後について追跡調査が行われ、長期予後に関しては、50例中17例が5年以内に死亡し、11例が治癒し、7年以上生存していた。治癒した症例の腫瘍の大きさは、平均腫瘍径8.3cmより小さいものが大部分を占めた。副腎癌の平均生存期間は18カ月、5年生存率は16%と予後不良であることから、早期診断、早期

治療が重要と考えられた(上芝)。副腎性サブクリニカルクッシング症候群 (SCS) は、副腎腫瘍からのコルチゾールの自律性分泌を認めるものの、典型的なクッシング徴候を欠く病態である。SCS では、高血圧、耐糖能異常、脂質異常症、骨粗鬆症などの生活習慣病を高頻度に合併するが、手術適応については明確でない。過去 15 年間に、副腎性 SCS と診断された患者 26 例を対象に、疾患追跡調査を行い、手術例、非手術例に分けて、心血管イベントのリスクファクターに関して比較検討を行った。手術群の長期観察例(10 例：平均観察期間 4.3 年)では、高血圧は 71%が改善、糖代謝異常は 75%に改善を認めた。一方、非手術群の長期観察例 (12 例：平均観察期間 4.3 年) では、高血圧は 1 例で改善したものの、6 例で悪化を認めた。糖代謝異常も 1 例のみ改善を認め、5 例で悪化を認めた。非手術群の中で、副腎皮質シンチで両側に集積を認めた 5 症例すべてに、他臓器の悪性腫瘍の合併を認めた。高血圧や糖尿病を合併する副腎性 SCS では、腫瘍摘出により、これらの心血管イベントリスクファクターの改善が期待できると考えられた (高柳、柳瀬)。なお、平成 20-22 年度に行われた全国疫学調査で一次調査回答数の多かった PA (4161 例)、SCS (1247 例) の二次調査票の回収率は共に 31%であり、また同様に回収率の低かったアジソン病の 3 疾患については、二次調査票の回収率の増加をめざし、未回答医療機関に平成 23 年度末に再送を行った。平成 24 年度、これらの疾患については再解析の予定である。

(2) 先天性副腎酵素異常症の生化学的・遺伝子学的診断システムの確立

本邦の Allgrove 症候群 5 家系 5 症例 (男子 2 例、女子 3 例) で分子遺伝学的、臨床的検討を行った。対象は 5 家系 5 症例。AAAS 遺伝子の全エクソンを 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。臨床情報については、後方視的に解析した。遺伝子解析: 5 症例は、それぞれ R119X 変異、R194X 変異、Q237X 変異、IVS6-2A>C および IVS7+1G>A 変異のホモ接合体であった。IVS7+1G>A 変異は新規の変異であった。本邦の Allgrove 症候群では、近親婚の家系が多い、AAAS 変異のホットスポットはあるいは創始者効果は認められない、アカラシアが明らかでない例や運動・言語の発達遅滞、癩性歩行が幼少時から認められる例が存在するなどの臨床的特徴が明らかにされた(勝又)。21-水酸化酵素欠損症(OHD)の新生児期のスクリーニングでは特に早産児において、様々なストレスにより 17-OHP が上昇することにより、偽陽性が多いとされる。6 例の 21-OHD と診断した患者の濾紙血を用いて、LC-MS/MS の有用性を正常者と比較検討した。その結果 17-OHP、 Δ 4-アンドロステンジオン(4-AD)、21-デオキシコルチゾール(21-DOF) が測定可能で、診断に有用であった。LC-MS/MS 法で、早産児でも 17-OHP が高値を示し、在胎週数とともに、17-OHP が低下した。しかし要精密検査の対象者において 17-OHP、21-DOF、F を同時に LC-MS/MS 法で測定することにより、本症の確定診断を行うことが

できた。LC-MS/MS 法は現時点では、21-OHD のスクリーニング後の確定診断のための二次検査に有用と言える(田島)。尿 $5\alpha/5\beta$ 代謝物比による乳児～小児 5α -reductase 欠損症 (5α RD) 診断のカットオフ値を設定し、診断精度を評価した。対象は 46、XY DSD 5α RD 13 例、46、XY DSD 非 5α RD 95 例、対照男児 1256 例。尿ステロイドプロファイル GC/MS 法による 6 種の $5\alpha/5\beta$ 代謝物比 (5α THF/ 5β THF、 5α THE/ 5β THE、 5α 20 β Ct1/ 5β 20 β Ct1、 5α THA/ 5β THA、An/Et、11oxoAn/11oxoEt) について、年齢別カットオフ値 (生後 0、1、2、3-5、6-11 ヶ月、1-2、3-5、6-10、11-15 歳の対照 1% タイル値) を設定し、カットオフ値未満を陽性として感度特異度を求めた。診断精度の高い $5\alpha/5\beta$ 代謝物比は、 5α THF/ 5β THF、 5α THE/ 5β THE で、感度 100%、特異度 99% であった。乳児～小児 5α RD 診断には、対照 1% タイル値をカットオフ値とした 5α THF/ 5β THF、 5α THE/ 5β THE が有用であった。新生児 5α RD の診断基準は、今後の課題である(長谷川)。H22 年度報告のこの本研究班による全国疫学調査のサブ解析として、21OHD におけるよびグルココルチコイド (GC) およびフルドコロチゾン (FC) 補充療法の実態を調査した。成人身長は、男性 -1.6 ± 1.1 SD、女性 -1.4 ± 1.1 SD でありマスキング開始前後で差はなかった。男性においては、FC 投与群では有意に高く、女性においては、非古典型が有意に低かった。成人身長到達年齢は男性 14.4 ± 2.4 歳、女性 14.8 ± 2.3 歳であり、男性においては成人身長と正相関を認めた。高度肥満の割合は、男性 23%、女性 16% であり、病型間や、GC の種類に差は認めなかった。GC の種類では、ヒドロコロチゾン (HC) の割合が約 60% と最多であった。一方、合成 GC 単独あるいは併用が約 30% で認められた。HC 投与量は中央値で男性 22.5mg、女性 20.0mg であった。成人身長および体重のコントロールは男女とも十分でなかったが、関連する因子に性差を認めた。成人期の GC 投与は多様であったが、投与量の明らかな多寡はなかった(棚橋)。

(3) 副腎低形成症の基盤研究としての副腎発生・分化機構の基礎研究

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すると同時に、副腎の発生分化にも必須の因子である。間葉系幹細胞に SF-1/Ad4BP を遺伝子導入し、ACTH・LH 応答性を有するステロイド産生細胞へ形質転換する。このステロイド産生細胞は、培地中に副腎ステロイドと性腺ステロイドを分泌し、アルドステロン産生も検出されたが CYP11B2 cDNA は検出されなかった。本研究において間葉系幹細胞におけるアンジオテンシン II 受容体 1 型 (AT1) の発現を認めたため、SF-1/Ad4BP 誘導性ステロイド産生細胞を AII にて刺激したところ、AII によって SF-1/Ad4BP 誘導性ステロイド産生細胞の培地中のコルチコステロン、アルドステロン濃度が増加した。間葉系幹細胞における CYP11B2 cDNA はリアルタイム PCR にて検出され、SF-1/Ad4BP の遺伝子導入のみではその発現量に変化を認めなかったが、AII によって CYP11B2 の発現誘導を認

めた。AngIIによるアルドステロン産生亢進はAT1阻害薬によって消失した。これらの結果より、SF-1/Ad4BP誘導性ステロイド産生細胞はAII-AT1受容体経路によりステロイド産生が調節されていることが判明した(柳瀬)。幹細胞からステロイド産生細胞への分化誘導系を用いて、新たなSF-1標的遺伝子の同定を試みた。ゲノムワイドのChIP-on-chip assayおよびマイクロアレイによる網羅的発現解析により、分化誘導に伴うステロイドホルモン合成に関わると想定される新たなSF-1標的遺伝子を同定した。本年度は、そのうちヘム合成の律速酵素であるALAS1に着目して解析を行った。ステロイドホルモン産生細胞では、ALAS1の転写は、上流3.5kb付近に存在するSF-1サイトに依存していた。ALAS1はヘムの供給を通してステロイドホルモン産生に関わっていることが明らかとなった(宮本)。Ad4BP/SFは副腎皮質細胞増殖への関与もあると推定されるが、メカニズムは不明である。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を行った。その結果、一群の解糖系酵素遺伝子の近傍にAd4BP/SF-1の蓄積が認められ、これらの遺伝子がAd4BP/SF-1の標的遺伝子となっている可能性が示唆された。ChIP-sequence法により、副腎皮質においてAd4BP/SF-1が制御する遺伝子の全体像を解明する。副腎皮質由来のY1細胞より、Ad4BP/SF-1に対する抗体を用いた免疫沈降を行い、本因子が核内で結合しているDNA領域を回収した。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。Ad4BP/SF-1は解糖系酵素遺伝子の制御に関与する可能性が強く示唆された。解糖系酵素は細胞内のエネルギー産生を、ひいては細胞の分裂や生存自体を制御すると考えられる。実際に、Ad4BP/SF-1をノックダウンした細胞では細胞増殖の低下も観察されており、このような制御経路をもってAd4BP/SF-1がステロイド産生細胞の生存を制御していると考えられる(諸橋)。

(4) PA診断基準の再評価:

本研究班としては、本班と日本内分泌学会と合同で作成されたPAの診療ガイドラインの普及、啓蒙に努力すると同時に、副腎静脈サンプリング(AVS)が行えないような施設でも、PA診断が行えるような診断法の提示に向けて、継続的努力を続けていく必要がある。ARR200以上の患者PA80例を対象にAカプトプリル負荷試験、副腎静脈サンプリングによりnon-PA群、IHA群、アルドステロン産生腺腫(APA)群の3群に分け、1mgデキサメタゾン抑制下ACTH負荷試験を行った。APA患者では非アルドステロン症患者や特発性アルドステロン症(IHA)患者に比べACTH負荷後の血漿アルドステロン濃度(PAC)が有意に高値であることを示し、PA疑い患者の中から高い感度でAPA患者を選別することが可能であった。本試験はPA疑い患者のうちAPAが強く疑われ、優先的にAVSを

必要とする症例のスクリーニングに有用と言える(曾根)。降圧薬内服下における ARR による PA のスクリーニングについて検討した。PA と確定診断され 127 例と非 PA 59 例を対象にほとんどの降圧薬の内服下で PA と非 PA では ARR に有意差を認め、同一患者における降圧薬の切り替えを行わない場合は偽陰性が 28 名中 7 名で、Ca 拮抗薬および α 遮断薬に変更すると 3 名に減少した。以上の結果より、内服降圧薬は ARR に影響を与えるが、実地臨床ではほとんどの例でその影響は少なく、臨床的に PA を強く疑えば、確定診断の段階で偽陰性はなくなることから、高血圧患者ではまず ARR によるスクリーニングを一度は行う意義が高いと考えられた(柴田)。LC_MS/MS を用いた高感度測定法で末梢血の 18-oxocortisol (18-oxoF) 濃度を測定し、PA の subtype 診断での有用性を AVS と比較検討した。ROC 解析を行い cut-off 値 18-oxoF 濃度 4.7ng/dl 以上で APA の感度 63% だが特異度は 97%と高い診断能を有した。CT での副腎結節の画像診断と組み合わせた結果では、片側副腎結節をもつ PA での APA 診断は ROC 解析で末梢血 18-oxoF 濃度の cut-off 値 4.6 ng/dl 以上で感度 73%、特異度 97%の診断能を得た。PA の局在診断は CT 等の画像診断に比較して明らかに技術習得に成功した施設での AVS の正診性が高い。18oxoF の測定は画像診断と併用して局在診断に有用である(佐藤)。PA 診断においてアルドステロン過剰を評価する機能確認検査は重要な診断プロセスとされるが、全例で実施すべきか、どの検査が最適かを検討した。ARR が陽性の高血圧患者で、カプトプリル試験 (CCT)、フロセミド立位試験 (FUT)、生食負荷試験 (SIT) の内、少なくとも 1 種類の機能確認検査が実施された Group A (120 名)、3 種類の検査が実施された Group B (57 例)、副腎静脈サンプリングあるいは副腎手術にて診断が確認された Group C (57 例) において、各機能確認検査の陽性率を検討した。その結果、CCT と FUT はいずれのグループでも高い陽性率を示したが、SIT の陽性率はいずれのグループでも他の検査より低かった。各機能確認検査は ARR 1000 以上あるいは PAC 250 pg/mL 以上の例では、高い陽性率を示した。以上から、PA の診断における機能確認検査は 1 種類の検査で十分で、特に ARR あるいは PAC 高値例では機能検査を実施せずに、次の病型・局在診断を行うことが可能であることが示唆された(成瀬)。超選択的 ACTH 負荷副腎静脈法 (SS-ACTH-AVS) の導入により、APA やコルチゾール産生腺腫 (CPA) の治療法が従来の片側副腎全摘から腺腫を含む片側副腎部分切除へと治療法が変更することが可能となった。SS-ACTH-AVS は副腎皮質疾患の診断能を飛躍的に向上させ、副腎機能性腺腫を含めた部分切除による治療を可能とした(西川)。PA 患者における副腎静脈サンプリングでの迅速コルチゾール測定の有用性を ACTH 負荷前後で検討した。PA 患者 41 例を対象とし、ACTH 負荷前にクイック F 測定を用いた迅速半定量法で副腎静脈へのカテーテルの挿入の成否を判定した。最終的な AVS 成功の判定には F の実測値を用い、ACTH 負荷前は副

腎静脈中 F 濃度が IVC の 2 倍、負荷後は IVC の 5 倍以上を成功と判定した。クイック F 測定で「可」の判定では 95.2%が、実測値でも ACTH 負荷前、負荷後ともに成功であり、「境界」の判定は 57.1%で ACTH 負荷前、負荷後ともに成功、42.9%が ACTH 負荷後は成功であり、その有用性が明らかとなった（武田）。APA においてアルドステロン過剰分泌や腫瘍形成の分子学的な要因については未だ不明の点が多い。

(5) GC 抵抗症や偽性低アルドステロン症の病態理解と治療法開発のための GC/アルドステロン作用機構の基礎的研究

グルココルチコイド(GC)-GC レセプター (GR) 作用モデル系として骨格筋をモデルに、GR 応答性遺伝子を同定してそれらの役割を明らかにし、標的臓器における GR 応答性遺伝子発現制御を理解することをめざした。その結果、新規標的遺伝子 REDD1 と KLF15 遺伝子産物は、mTOR 活性抑制、atrogin-1、MuRF1 ユビキチンリガーゼ遺伝子発現亢進、などによって GC による同化抑制と異化作用の基盤となっていることが判明し、GC 誘発性筋萎縮の発症機構の一端が明らかになった。骨格筋において、GC は、GR 標的遺伝子の協調的な組織特異的発現調節を介して骨格筋量を精緻に制御していることが示された。GR-mTOR クロストークは、中枢からのストレスシグナルと栄養のセンシングが末梢組織で起こることを示しており、生体代謝機構を理解する上でも重要な示唆を与える（田中）。偽性低アルドステロン症 I 型の原因遺伝子であるミネラルコルチコイドレセプター(MR)は腎尿細管においてナトリウムの再吸収に関わる遺伝子 SGK や ENaC をリガンド依存性に誘導することが知られているがその機序の詳細は不明である。FLAG-MR 安定発現 HEK293 細胞から MR 相互作用因子の精製を行い、LC-MS/MS を用いて同定を試みた結果、新規 MR 相互作用因子 p150 が同定された。p150 は、腎臓遠位尿細管及び大腸上皮において MR と共局在を示し、両者はリガンド依存的に相互作用した。ルシフェラーゼアッセイでは p150 の過剰発現により MR 転写活性は約 50%抑制された。反対に p150 の RNAi により内因性 MR 標的遺伝子 ENaC α および SGK1 の発現レベルが 2 倍以上上昇した。以上の結果から p150 は MR 転写活性を抑制する新規 co-repressor であることが示唆された。p150 を含む蛋白質複合体精製の結果、少なくともヒストン脱アセチル化活性を介して MR 標的遺伝子発現を負に制御することが判明した(加藤)。

(6) 副腎腫瘍の成因や発生機序に関する基礎的研究の推進

最近、カリウムチャンネルの一種である Kir3.4 をコードする KCNJ5 の遺伝子変異によりアルドステロン分泌が亢進する可能性が示唆され APA の成因として注目されている。今回、日本人における APA、正常部副腎の KCNJ5 遺伝子異常を解析した。4 症例の APA において、カリウムチャンネル Kir3.4 をコードする KCNJ5 の遺伝子のヘテロ接合型変異を確認した。検討を行った全症例の腺腫部からのみ G151R あるいは L168R の変異が確認

され、これらの変異が APA の病因として重要である可能性が示唆された。なお、正常副腎部分では同変異は確認されなかった(宮森)。また APA において代謝型グルタミン酸受容体に属する glutamate metabotropic receptor 3 (GRM3) の mRNA 発現上昇が証明された。また、イオン型グルタミン酸受容体の 1 つである ionotropic glutamate receptor 3 (iGLUR3) は副腎髄質でその発現が報告されており、正常副腎皮質、副腎皮質腫瘍での両者の発現度を免疫組織化学的検索と定量 RT-PCR 法で解析を用いて検討した。iGLUR3 の mRNA 発現は NA、APA、CPA では全症例に確認されたが、各群間の有意差はなく、ACC では 5 例中 2 例のみに確認された。GRM3 の mRNA 発現は NA11 例、APA10 例、CPA11 例に確認されたが、APA での発現量が NA に比べ有意に高かった ($P < 0.05$)。ACC では全例で検出感度以下であった。免疫組織化学的検討では、iGLUR3 蛋白は NA では球状層 (ZG) に特異的に観察された。腫瘍組織では、APA、CPA、NFA で部分的にみられたが、ACC では確認されなかった。両者は正常副腎皮質、副腎皮質腫瘍に発現し、副腎組織での生理的、病的役割に関与している可能性が示唆された(笹野)。アルドステロン合成遺伝子 CYP11B2 の転写調節機序の詳細は未だ明らかでない。同遺伝子の 5'-' 転写調節領域約 2Kb をクローニングし、副腎由来 Y1 細胞を用いて解析を行った。その結果、細胞内 cAMP/PKA 系の活性化は CYP11B2 の転写活性を約 3.5 倍増加させた。一方、同遺伝子プロモーター上に 2 ヶ所の結合配列が存在する NFAT を共発現させたところ、転写活性は約 23 倍と著明に増加した。AII や K は少なくとも一部 Ca^{2+} /NFAT シグナル伝達系を介してアルドステロン合成を調節している可能性が示唆された。NFAT 阻害剤は、将来的にアルドステロン合成阻害剤として使用しうる可能性がある(岩崎)。

E. 結論

副腎ホルモン産生異常に関する調査研究を様々な観点から行ない、多くの成果が得られた。これらの成果は、本領域の疾患の病態の理解、新たな診断法や治療法の開発に有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

SS-ACTH-AVS の合併症として、副腎内出血が約 1% に認められた (西川哲男)。

G. 研究発表

分担研究報告並びに刊行成果参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得 (出願中)

特願 2011-284430 (H23.12.26) 体外受精におけるヒト成熟卵子マーカー (宮本薫)

OM-カテーテルの特許出願中 (西川哲男)

特許取得

18-oxocortisol (18-oxoF) の測定法に関して (佐藤文俊)

IV. 分担研究報告書