

の意義を検討した結果、ARR post-CCTが990の場合、感度55.3%、特異度94.4%、1720の場合、感度44.7%、特異度100.0%であった。また、PAC post-SITが109 pg/mLの場合、感度60.0%、特異度100.0%であった。

D. 考 察

3つのグループにおける各機能確認検査の陽性率を検討した結果、CCTとFUTは85%以上の陽性率であったのに対して、SITは65%以下の陽性率であった。著者らの施設では、重症高血圧、心血管系合併症や低カリウム血症を合併する症例ではSITを実施していないことから、対象選択のバイアスが結果に影響した可能性は否定できない。しかしながら、このような実施対象者の制約および4時間との実施時間の長さは、機能確認検査の普及に必ずしも適しているとは言えない。

一方、CCTとFUTはいずれのグループでも同様の高い陽性率を示し、特に、ARR基礎値が1,000以上あるいはPACが250 pg/ml以上の場合はほぼ全例で陽性を示した。このことから、機能確認検査は必ずしも2検査は必要なく、1検査で十分で、しかも、起立性低血圧などの副作用が少ない点からCCTが第一選択になると考えられた。

PAの病型診断は治療法の実施において重要な診断プロセスである。本検討から、ARR post-CCTとPAC post-SITは片側性PAで両側性PAより高く、特に、ROC解析により、前者が1,720以上ある

いは後者が109pg/mL以上の場合、各々特異性は100%であった。このことから、機能確認検査における結果から、病型を推定することが可能であることが示された。

E. 結 論

ARR陽性の高血圧例、特にARR1,000以上またはPAC 250以上の場合は、CCTとFUTは高い陽性率を示したが、SITはこれらと比較して陽性率が低く偽陰性が多かった。以上から、ARR陽性のPA疑い患者では、検査時間、費用および検査リスクの減少の観点から、現在推奨されている2検査ではなく1検査で良いことが示唆された。今後、最適な機能検査に関する前向き研究による更なる検討が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 中尾佳奈子、難波多挙、成瀬光栄. 二次性高血圧を疑わせる徴候と検査所見
Medical Practice.28 (5) ;816-20:2012
2. 難波多挙、中尾佳奈子、島津章、成瀬光栄. 高齢者の原発性アルドステロン症の臨床像：自験109例での検討. 第20回臨床内分泌代謝Update Proceeding、

- 日本内分泌学会雑誌、
87Suppl.59-60:2011.
3. 成瀬光栄、田辺晶代. もっとわかりやすい原発性アルドステロン症診療マニュアル. 2011. 診断と治療社
 4. Nanba K, Tamanaha T, Nakao K, Tsukamoto Kawashima S, Usui T, Tagami T, Okuno H, Shimatsu A, Suzuki T, Naruse M. Confirmatory testing in primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012(in press)
 5. Ross GP, Barisa M, Auchus R, Amar L, Naruse M, Nishikawa T, Omura M, Pessina AC, Adrenal vein sampling for identification of the subtypes of primary aldosteronism: results on 2635 cases of the avis study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012. (in press)
- ## 2. 学会発表
1. Nanba K, Tamanaha T, Nakao K, Kawashima S, Yuno A, Usui T, Tagami T, Shimatsu A, Naruse M, Comparison of clinical characteristics between elderly and younger patients with primary aldosteronism, 37th Meeting of the International Aldosterone Conference, Boston, USA 2011.6月
 2. Naruse M, Diagnosis and treatment of primary aldosteronism in Japan, PUMCH Clinical Endocrinology and Metabolism Forum, PCEMF 2011、北京、中国、2011.6月
 3. 成瀬光栄、内分泌性高血圧診療の進歩と課題、第45回日本内科学会近畿支部生涯教育講演会、2011.12月
 4. 成瀬光栄、田中剛史、大谷すみれ、小河淳、田邊真紀人、山崎力、PHAS-J研究班、EBM-1：わが国の高血圧症における原発性アルドステロン症(PA)の実態調査研究(PHAS-J)、第65回国立病院総合医学会、2011.10月
 5. 成瀬光栄、PHAS-J研究班、PHAS-J2研究班、わが国の高血圧における原発性アルドステロン症(PA)の実態調査研究(PHAS-J)および学会ガイドラインに基づく診断と効果的な薬物療法の確立に関する研究(PHAS-J2)、第65回国立病院総合医学会、2011.10月
 6. Naruse M, Clinical guidelines and reality in primary aldosteronism, 27th Meeting of the International Society of Hypertension, Beijing, China, 2011.11月
 7. 成瀬光栄、国立病院機構(NHO)病院ネットワークを活用した学会ガイドラインの適用率に関する研究(PHAS-J2)第12回日本内分泌学会近畿支部学術集会、2011.10月
 8. 成瀬光栄、内分泌性高血圧診療の進歩と課題、第45回日本内科学会近畿支部生涯教育講演会、2011.12月
 9. 成瀬光栄、症例から学ぶ副腎疾患診療の組み立て方、第21回臨床内分泌代謝Update、2012.1月
 10. 成瀬光栄、大谷すみれ、宮崎康、田中剛史、波多史朗、小河淳、立木美香、

田上哲也、国立病院機構PHAS-J2研究
班 国立病院機構(NHO)ネットワー
クを活用したPAに関する研究、第21
回臨床内分泌代謝Update、2012.1月

H. 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

厚生労働科学研究費補助金

(「副腎ホルモン産生異常に関する調査研究」班) 分担研究報告書

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

研究分担者 西川 哲男 横浜労災病院長

研究協力者 大村 昌夫 松澤 陽子 斎藤 淳 横浜労災病院 内分泌・糖尿病センター

牧田 幸三 東京北社会保険病院 放射線科

松井 青史 横浜労災病院 放射線IVR科

【研究要旨】

目的 超選択的ACTH負荷副腎静脈法(SS-ACTH-AVS)の診断により、アルドステロン産生腺腫(APA)やコルチゾール産生腺腫(CPA)の治療法がどのように変化したかについて検討を行った。

方法 原発性アルドステロン症140例のSS-ACTH-AVS診断結果に基づき、画像検査で確認可能なAPAとCPAは、腺腫を含めた片側副腎部分切除を行った。

結果と考察 CTで副腎腫瘍が確認可能なAPA(APmacroA)は29例、微細なAPA(APmicroA) 22例、APAとCPAの合併15例、APAと非機能性腺腫(NF)合併症例5例、両側副腎APA 5例、IHA 61例中NF合併例は6例、CPA合併例は3例診断された。

外科的治療が適応と診断された82例中28例で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された。

結語 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。

A. 研究目的

副腎静脈血採血(AVS)の普及を目的として開発した副腎静脈採血用マイクロカテーテル(Omura-Makitaマイクロカテーテル; OM-MC)は、副腎中心静脈での正確な採血を容易にしたのみならず、中心静脈よりさらに上流の副腎静脈分枝での採血も可能とした。OM-MCを用い

てACTH刺激後に左右副腎中心静脈と静脈分枝で採血を行う超選択的ACTH負荷副腎静脈採血(SS-ACTH-AVS)は、副腎内複数箇所でのホルモン測定結果が得られることから、従来の副腎静脈採血より診断に使用可能な情報量が増加し、副腎内局所での精緻なホルモン分泌動態の分析が可能となった。

そこでSS-ACTH-AVSを行い診断と治

療を行った原発性アルドステロン症でのSS-ACTH-AVS所見を分析し、SS-ACTH-AVSによる新たな診断基準を作成するとともに、中心静脈で採血を行う従来のACTH負荷副腎静脈採血(ACTH-AVS)とSS-ACTH-AVSの診断能を比較検討した。SS-ACTH-AVSの診断結果に基づく新たな副腎の外科的手術法についても検討を行った。

B. 研究方法

対象症例

横浜労災病院で2008年8月から2011年9月までに、超選択的ACTH負荷副腎静脈採血を行った原発性アルドステロン症140例を対象とした。

PAはACTH負荷試験、カプトプリル負荷試験、フロセミド立位試験、生理食塩水負荷試験のうち2種以上の検査で陽性となった場合診断した。またPAとコルチゾール産生腺腫(CPA)の合併は、CTで副腎腫瘍が確認され1mgデキサメサゾン抑制試験陽性で診断した。

SS-ACTH-AVS

SS-ACTH-AVSはセンルジンガー法で通常の左右副腎用カテーテルを左右副腎中心静脈順次挿入し、さらに通常の副腎用カテーテルを通してOM-MCを両側副腎中心静脈と左右副腎内静脈分枝に進め、採血を行った。採取した副腎静脈血中アルドステロンとコルチゾール濃度をRIAで測定した。

治療

SS-ACTH-AVSにより、CTで確認された副腎腫瘍からのアルドステロンまたはコルチゾール過剰分泌が確認された症例では、その腫瘍を含めた片側副腎部分切除を行った。

(倫理面への配慮)

SS-ACTH-AVS、片側副腎部分切除は文書による同意を取得した後に施行した。

C. 研究結果

APAの診断

CTで確認された腫瘍から血液をうける副腎静脈分枝でACTH刺激後アルドステロン濃度14,000pg/ml以上、その他の同側副腎内静脈分枝で、アルドステロン濃度が14,000pg/ml以下の場合、その副腎腫瘍をAPAと診断した。

微細なAPAの診断

APAと同様のアルドステロン分布を示すが画像検査で副腎腫瘍が確認されていない場合、微細なAPA (APmicroA)がアルドステロン過剰分泌の原因となっていると診断した。

特発性アルドステロン症の診断

ACTH刺激後アルドステロン濃度が両側副腎中心静脈とすべての静脈分枝で14,000pg/ml以上となった症例は、両側副腎からの瀰漫性アルドステロン過剰分泌が生じている特発性アルドステロン症(IHA)と診断した。

PAに合併したコルチゾール産生腺腫合併の診断

両側または片側副腎からのアルドステロン過剰分泌が診断された症例の中で、CTで確認された副腎腫瘍に直結する副腎静脈分枝で、ACTH刺激後コルチゾール $>380 \mu\text{g/dl}$ 、それ以外の副腎静脈分枝でACTH刺激後コルチゾール $<380 \mu\text{g/dl}$ の場合、CTで確認されている副腎腫瘍をコルチゾール産生腺腫(CPA)と診断した。

PAに合併した非機能性腺腫の診断

CTで確認された副腎腫瘍に直結する副腎静脈分枝でACTH刺激後アルドステロン濃度 $<14,000\text{pg/ml}$ 、かつすべての副腎静脈分枝でACTH刺激後コルチゾール $>380 \mu\text{g/dl}$ の場合、CTで確認された副腎腫瘍をNFと診断した。

SS-ACTH-AVSでの診断結果

APA 76例、IHA 61例、片側副腎過形成病変3例が診断された。

APAのうちCTで副腎腫瘍が確認可能な通常のAPA(APmacroA)は29例、APmicroA 22例、APAとCPAの合併15例、APAと非機能性腺腫(NF)合併症例5例、両側副腎APA5例であった。

IHA 61例中NF合併例は6例、CPA合併例は3例であった。

SS-ACTH-AVSで通常のAVSの診断から診断名が変更となった症例

通常のAVSでは片側副腎からのアルドステロン過剰産生と診断されていた71例

が、APmacroA 29例、APmicroA 22例、APAとCPAの合併例3例、APAとNF合併例5例、片側副腎過形成病変によるPA 3例と診断することが可能となった。

通常のAVSでは両側副腎からのアルドステロン過剰分泌と診断されていた66例は、IHA52例、IHAとCPAの合併3例、IHAとNFの合併6例、両側アルドステロン産生腺腫5例と診断可能であった。

SS-ACTH-AVSにより治療法が変更となった症例

APmacroAと診断された29例中18例が、従来の片側副腎全摘から、腺腫を含めた片側副腎部分切除へと切除範囲の縮小が可能となった。

通常のAVSで両側副腎からのアルドステロン過剰分泌と診断された症例は従来薬物治療で経過観察とされていたが、今回SS-ACTH-AVSで両側APAと診断された5例は、APmacroAを含む片側副腎部分切除で外科的治療が可能となった。

顕性クッシング症候群の原因となっているCPAを合併したPA5例では、CPAを含む片側副腎部分切除が行われた。

E. 結論

SS-ACTH-AVSはアルドステロンとコルチゾールの過剰分泌の有無を副腎内副腎静脈一次分枝レベルで判定可能とし、従来のAVSによる副腎皮質疾患の診断能を飛躍的に向上させ、その結果、片側副腎APmacroAでは片側副腎部分切除、両側APAでは外科的治療を初めて可能と

した。

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%で認められた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishikawa T, Omura M, Satoh F, Shibata H, Takahashi K, Tamura N and Tanabe A Guidelines for the diagnosis and treatment of primary aldosteronism -The Japan Endocrine Society 2009 . *Endocr J* 2011;58:711-721
- 2) Tesuo Nishikawa, Masao Omura Should primaryaldosteronism be diagnosed among normotensive subjects during general health check-up and/or general outpatient clinics? *Hypertens Res* 2011;34:47-48
- 3) Yoko Matsuzawa, Kenichi Sakurai, Jun Saito, Masao Omura and Tetsuo Nishikawa: Salivary cortisol can reflect adiposity and insulin sensitivity in type 2 diabetes. In “Steroid- Clinical Aspect”, edited by Hassan Abduljabbar, published by InTech, Croatia, p141-149, 2011.
- 4) Masao Omura, Jun Saito, Yoko Matsuzawa and Tetsuo Nishikawa: Supper-selective ACTH-stimulated

adrenal vein sampling is necessary for detecting precisely functional state of various lesions in unilateral and bilateral adrenal disorders, inducing primary aldosteronism with subclinical Cushing’s syndrome. *Endocrine Journal* 2011, 58 (10), 919-920

2. 学会発表

- 1) 西川哲男原発性アルドステロン症の臨床 第20回臨床内分泌代謝 Update2011年1月28日札幌コンベンションセンター
- 2) Yuichi Takashi, Masao Omura, Koshiro Mishimoto, Kuniaki Mukai, Kohzoh Makita, Seishi Matsui⁵ Yoko Matsuzawa, Jun Saito¹⁾, Tetsuo Nishikawa¹⁾ Does aldosterone-producing cell clusters (APCC) develop to aldosterone-producing adenoma via its intermediate form of grown APCC in primary aldosteronism? The 4th International Aldosterone Forum in Japan Tokyo, Japan, May,2011.
- 3) Houda Sellami, Y. Yatsuzawa, J. Saito, M. Omura, T. Nishikawa :Kinetics of left ventricular mass and renal function in PA patients one year after unilateral adrenalectomy. The 4th International Aldosterone Forum in Japan Tokyo, Japan, May,2011.

- 4) Tetsuo Nishikawa. Adrenal Vein Sampling-State of Art-SYMPOSIA CLINICAL-ALDOSTERONE EXCESS : TECHNOLOGY, STRATEGIES & OUTCOMES June 4. 2011 THE ENDOCRINE SOCIETY' S 93rd Annual Meeting & Expo, Boston, Massachusetts, June, 2011)
- 5) Gian Paolo Rossi, Marlena Barisa, Bruno Allolio, Richard Auchus, Gregory Kline, Andre Lacroix, Jacques WM Lenders, Steven B Magill, Mitsuhide Naruse, Tetsuo Nishikawa, Pierre Francois Plouin, Martin Reincke, Lars Christian Rump, Fumitoshi Satoh, Michael Stowasser, Christian Strasburger, Akiyo Tanabe, Scott Trerotola, Jiri Widimsky, Jr., K wan-Dun Wu: The Adrenal Vein Sampling International Study(AVIS) on Use and Interpretation of Adrenal Vein Sampling for Identifying the Major Subtypes of Primary Aldosteronism: Results of First Phase Late-breaking presentation, THE ENDOCRINE SOCIETY'S 93rd Annual Meeting & Expo, Boston, Massachusetts, June, 2011
- 6) Masao Omura, Kohzoh Makita, Seishi Matsui, Maki Nagata, Yoko Matsuzawa, Jun Saito, Kunio Yamaguchi, Tetsuo Nishikawa. Supersensitive ACTH-stimulated adrenal venous sampling enables to treat patients with aldosterone-producing adenoma by unilateral partial adrenalectomy June 4. 2011 BOSTON ENDO 2011
- 7) 大村昌夫 牧田幸三 松井青史 西川哲男 副腎静脈採血の現状-超選択的ACTH負荷副腎静脈採血による副腎皮質疾患の診断と治療の革新及び通常の副腎静脈法の再評価 難病性副腎疾患シンポジウム2011年7月2日 東京国際フォーラム
- 8) 大村昌夫 牧田幸三 松井青史 西川哲男 副腎静脈採血法を駆使した副腎皮質疾患の診断と治療-超選択的ACTH負荷副腎静脈採血による副腎皮質疾患の診断と治療の革新及び通常の副腎静脈法の再評価 第29回内分泌代謝学サマーセミナー 2011年7月7日 仙台市民陵会館
- 9) Y. Matsuzawa, H. Sellami, J. Saito, M. Omura, T. Nishikawa: Study on the effect of aldosterone excess on abnormal glucose metabolism, The European Association for the Study of Diabetes. 47th Annual Meeting Lisbon - Portugal, Sept., 2011
- 10) 大村昌夫、牧田幸三、松井青史、松澤陽子、齋藤 淳、西川哲男 副腎静脈採血による副腎性二次性高血圧の診断。第34回日本高血圧学会総会 2011年10月20日 栃木県総合文化センター
- 11) 大村昌夫、牧田幸三、松井青史、井上淳、永田真樹、山口邦雄、角田幸雄、

笹野公伸、松澤陽子、齋藤 淳、西川哲男。超選択的ACTH負荷副腎静脈採血に基づくアルドステロン産生腺腫の片側副腎部分切除による新たな治療 第34回日本高血圧学会総会 2011年10月20日

栃木県総合文化センター

- 9)京原麻由、大村昌夫、牧田幸三、松井青史、竹本潤哉、滝口朋子、松澤陽子、齋藤淳、西川哲男 超選択的ACTH負荷副腎静脈採血で測定したアルドステロン産生腺腫症例の中心静脈及び分枝におけるアルドステロン濃度第 19回日本ステロイドホルモン学会 2011年11月26日 福岡大学病院メディカルホール

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

OM-カテーテルの特許出願中である。

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—

研究分担者 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))

研究協力者 米田 隆 (同上)

研究協力者 米谷 充弘 (同上)

【研究要旨】

原発性アルドステロン症(PA)は脳血管障害や心筋梗塞などの合併症が多く早期からの治療が必要である。アルドステロン産生腺腫 (APA) は報告者により異なるがPAの中で40~60%を占め、片側性の場合には腺腫摘出により治療可能であるため、その診断は極めて重要である。APAの局在診断には副腎静脈サンプリング(AVS)が必須であるが、その成功率は施設により大きく異なる。我々は数分でコルチゾールが測定可能なキット(クイックF測定)を開発し、AVS時に用いることにより成功率が90%以上になることを報告した¹⁾。日本ではACTH負荷によるAVSが推奨されている。今回ACTH負荷前後によるクイックF測定の有用性を検討した。

【研究方法】

日本内分泌学会の診断指針²⁾に従い最終診断されたPA患者41例(女13、男28例、年齢53 ± 11歳)を対象とした。対象患者の血圧は130 ± 12/81 ± 10 mmHg(カルシウムチャネルブロッカーまたは α 1ブロッカー内服下)、血漿アルドステロン値(PAC) 129 ± 64 pg/mL、PRA 0.3 ± 0.2 ng/mL·h、血清カリウム値 4.0 ± 0.4 mEq/Lであった。ACTH負荷AVSを指針に従い実施した。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。クイックF測定法を図2に示す。下大静脈(IVC)検体で検出されたイムノクロマト紙上のFのライン濃度

(20 μ g/dL未満)が副腎静脈検体で、消失したもの(F濃度は40 μ g/dL以上)を「可」、濃度が低下したもの(F濃度が20~40 μ g/dL)を「境界」、変化のないもの(F濃度が20 μ g/dL未満)を「不可」と判定した。「可」と「境界」の場合を副腎静脈へのカテーテル挿入成功と判断したが、可能な限り「可」になるようにサンプリングを繰り返した。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。AVSは全例14時開始で施行した。

【結 果】

ACTH 負 荷 前 の AVS 成 功 率 は

70.7%(41例中29例)、ACTH負荷後の成功率は92.7%(41例中38例)であった。クイックF測定で「可」と判定された21例中20例(95.2%)で、実測値でもACTH負荷前、負荷後ともに成功であった。一方、クイックF測定で「不可」と判定された6例は全例においてACTH負荷前は不成功であった。クイックF測定で「境界」と判定された14例中8例(57.1%)はACTH負荷前、負荷後ともに成功、また残りの6例(42.9%)も全例ACTH負荷後は成功であった(図2)。

【考案】

AVSの成功率に左右する因子としてYoungら3)は、患者の選択、AVS施行者の技術、基準に従ったプロトコール、正しいデータの解釈を挙げている。APAの局在を診断にCTは正答率が50%以下と低くAVSが重要であることはコンセンサスが得られている。問題は施設間により成功率が10数%から90%以上とばらつきが多いことである。日本ではAVSの成功率を上げるためにACTH負荷が推奨されている2)。我々の検討ではAVSの年間件数が多い施設と年間10回くらいの施設においてクイックF測定キットを用いて成功率を検討すると使用前では成功率が10%未満の施設でも使用後は90%以上になった(未発表データ)。これらの事実はクイックF測定キットの有用性を示唆している。Klineら4)はAVSがPAの局在診断のゴールドスタンダードになるためには、選択性の診断基準が重要であると報

告している。Rossiら5)はACTH負荷AVSはカテーテルの副腎静脈への選択性は改善するが、診断には悪影響を及ぼす場合もあることを報告している。我々の今回の検討でもACTH負荷により選択性は改善したが、クイックF測定で「可」と診断された症例ではACTH負荷は必要がなかった。この成績は今後幅広くAVSが施行される場合、臨床的に重要になると考えられる。

【結語】

クイックF測定で「可」と判定された場合、ACTH負荷前後で成功率に差がなく、負荷はAVSの成功率を上げる目的では必要ではないと考えられる。

【文献】

- 1) Takeda Y, et al. Primary aldosteronism, diagnosis and treatment in Japan. Rev Endocr Metab Disord. 12:21-5, 2011
- 2) Nishikawa T, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of primary aldosteronism--the Japan Endocrine Society 2009. Endocr J 58:711-21, 2011
- 3) Young WF, et al. What are the keys to successful adrenal venous sampling (AVS) in patients with primary aldosteronism? Clin Endocrinol 70: 14-7, 2009
- 4) Kline GA, et al. Adrenal vein

sampling may not be a gold-standard diagnostic test in primary aldosteronism: final diagnosis depends upon which interpretation rule is used. *Int Urol Nephrol* DOI 10.1007/s11255-008-9441-9, 2008

- 5) Rossi GP, et al. Adrenal vein sampling for primary aldosteronism: the assessment of selectivity and lateralization of aldosterone excess baseline and after adrenocorticotrophic hormone (ACTH) stimulation. *J Hypertens* 26: 989-997, 2008

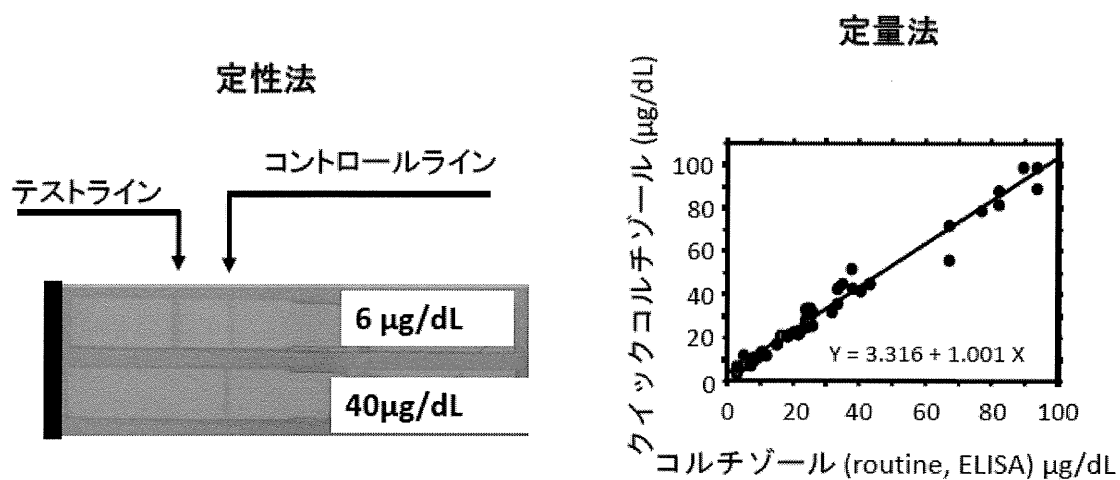


図1. クイックコルチゾール測定法の定性法及びELISA法とのデータの相関を示す。サンプル中のコルチゾール濃度が高くなるとテストラインが消失する。またクイック法と従来の測定法によるデータは正の相関を示した。

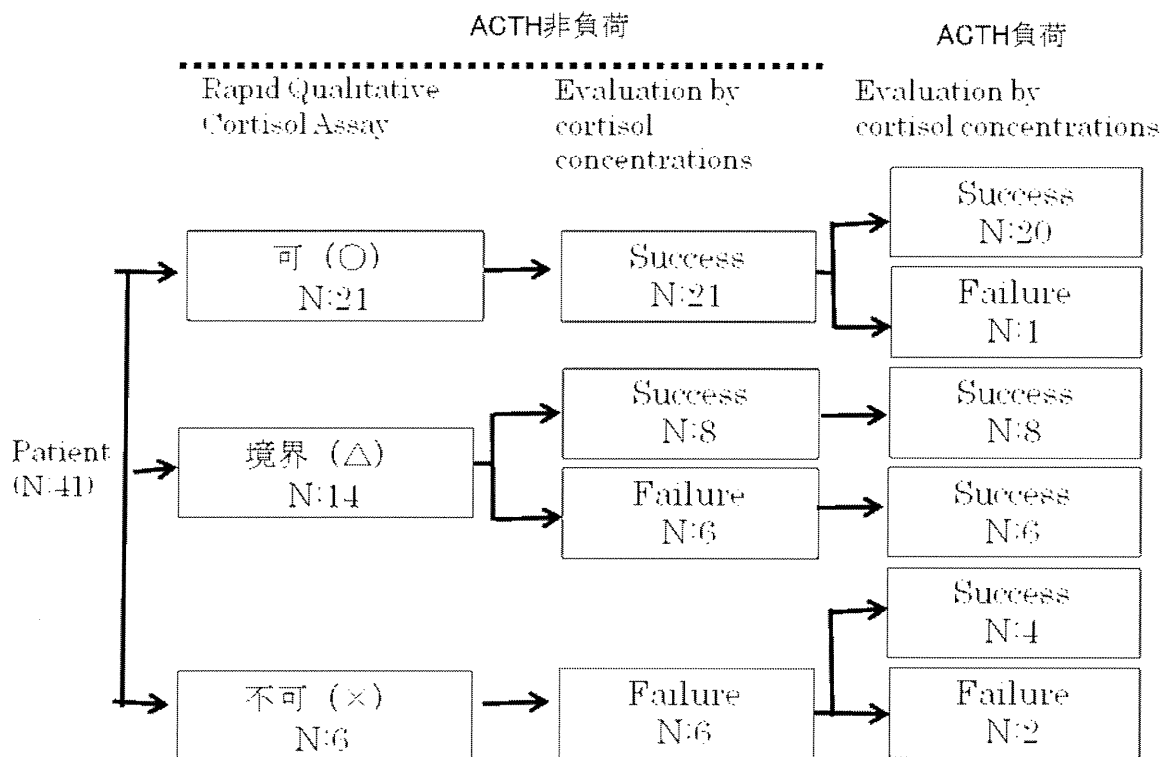


図2. ACTH負荷前後でのAVSの成功とクイックコルチゾール測定による定性法での結果を示す。定性法による判定で「境界」パターンと「不可」パターンでは、ACTH負荷により成功率が改善したが、「可」では成功率には差を認めなかった。

業 績

- 1) Takata H, Takeda Y, Zhu A, Cheng Y, Yoneda T, Demura M, Yagi K, Karashima S, Yamagishi M. Protective effects of mineralocorticoid receptor blockade against neuropathy in experimental diabetic rats. *Diabetes Obes Metab.* 2011 Sep 23. doi: 10.1111/j.1463-1326.2011.01499.
- 2) Karashima S, Takeda Y, Cheng Y, Yoneda T, Demura M, Kometani M, Ohe M, Mori S, Yagi K, Yamagishi M. Clinical characteristics of primary hyperaldosteronism due to adrenal microadenoma. *Steroids.* 76(12):1363-6, 2011
- 3) Demura M, Wang F, Yoneda T, Karashima S, Mori S, Oe M, Kometani M, Sawamura T, Cheng Y, Maeda Y, Namiki M, Ino H, Fujino N, Uchiyama K, Tsubokawa T, Yamagishi M, Nakamura Y, Ono K, Sasano H, Demura Y, Takeda Y. Multiple noncoding exons 1 of nuclear receptors NR4A family (nerve growth factor-induced clone B, Nur-related factor 1 and neuron-derived orphan receptor 1) and NR5A1 (steroidogenic factor 1) in human cardiovascular and adrenal tissues. *J Hypertens.* 29(6):1185-95, 2011
- 4) Demura M, Demura Y, Ameshima S, Ishizaki T, Sasaki M, Miyamori I, Yamagishi M, Takeda Y, Bulun SE. Changes in aromatase (CYP19) gene promoter usage in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 73(3):289-93, 2011
- 5) Takeda Y, Karashima S, Yoneda T. Primary aldosteronism, diagnosis and treatment in Japan. *Rev Endocr Metab Disord.* 12(1):21-5, 2011
- 6) Ito Y, Takeda R, Karashima S, Yamamoto Y, Yoneda T, Takeda Y. Prevalence of primary aldosteronism among prehypertensive and stage 1 hypertensive subjects. *Hypertens Res.* 34(1):98-102, 2011
- 7) 武田仁勇 高血圧症治療の現況、他疾患を伴う高血圧の治療：糖尿病 医学と薬学 66(6) 889-893、2011
- 8) 武田仁勇、出村昌史 アルドステロン研究のホットスポット 血圧 19(1)：47-50、2012

**(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

研究分担者 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

研究協力者 吉川 賢忠 東京大学医科学研究所附属病院 助教

研究協力者 清水 宣明 東京大学医科学研究所 特別研究員

【研究要旨】

多様なグルココルチコイド(GC)作用の共通のプラットフォームとして機能するGCレセプター (GR) はすべての組織に発現している。したがって、GC-GR系の多組織にわたる多彩な作用の分子基盤として標的遺伝子の組織特異的な発現制御が想定されている。そこで、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。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わかった。すなわち、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な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。かかる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たものであり、生体代謝機構を理解する上でも重要な示唆を与える。

A. 研究目的

グルココルチコイド (GC) は広範な組織に対して影響を及ぼす生命維持に必須のステロイドホルモンであり、その分泌・代謝・シグナル伝達の異常は様々な病態と密接に関連する。また、GCは臨床医学の広範な領域において主要な治療薬としての位置を占めているが、その多臓器において多岐にわたる副作用の根本的

解決の糸口は見出されていない。

多様なGC作用の共通のプラットフォームとして機能するグルココルチコイドレセプター (GR) はすべての組織に発現している。したがって、GC-GR系の多組織にわたる多彩な作用の分子基盤として標的遺伝子の組織特異的な発現制御が想定されている。これまでにGR量、リガンドの細胞内代謝（不活性化）、転写共役因子の組織特異的な発現、ヒストン-

クロマチンレベルにおける遺伝子の修飾、など、多くのメカニズムが組織特異的GC応答性の制御に関して提唱されている。しかし、いずれか単独のみでは複雑なホルモン応答のコントロールには不十分であり、複数の調節系が精緻にGCに対する応答を制御し、細胞の合目的的応答や恒常性維持につながっているものと推測されるが実態は未解明である。

そこで、GR応答性遺伝子発現制御を包括的に理解するため、標的臓器におけるGR応答性遺伝子を同定し、それらの役割を明らかにすることを目的とした。また、それらの遺伝子の組織特異的発現調節機構を究明することとした。以上を踏まえ、骨格筋をモデルに、GR標的遺伝子同定からその機能を解析し、GC作用の本態に迫ることを実施した。とくに、今年度は骨格筋特異的GR遺伝子破壊マウスの作成をめざした。

B. 研究方法

- 1) GC筋萎縮モデルは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た。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た。なお、標的遺伝子の同定は既報のごとく行った。
- 2) R 応 答 性 遺 伝 子 発 現 は GRE-luciferase 遺伝子を用いたレポーターアッセイにより、内因性GC応答性遺伝子のmRNA発現はリアルタイムPCR法によった。

- 3) GRの標的遺伝子プロモーターとの相互作用はクロマチン免疫沈降法によって解析した。

- 4) ラット骨格筋の病理組織学的解析、免疫染色は既報のごとく行った。

- 5) 骨格筋特異的GR遺伝子破壊マウスの作成は、Schuetz博士より供与されたGRfloxマウスと α MHC-Creマウスを交配させて作成した。

(倫理面への配慮)

動物実験は所属施設の基準に従った。

C. 研究結果

- (1) GR標的遺伝子の同定とその生物学的役割の解明

ラット骨格筋におけるGC-GR系の標的遺伝子を探索し、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の機能を探索するため、Cre-loxPシステムによってKLF15を発現するアデノウイルスを作成し、ラット腓腹筋に投与して各種遺伝子のmRNA発現を定量的RT-PCR法で検討した。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、いずれも増加した。KLF15は、また、筋萎縮関連遺伝子atrogen-1、MuRF1遺伝子のmRNA発現を転写レベ

ルで増加させた。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の異化を亢進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atrogin-1、MuRF1発現の増加の関与が確認できた。

ラットにDEX投与GC筋萎縮モデルを作成した。mTOR活性化作用が知られている分岐鎖アミノ酸BCAAを投与することによって、筋萎縮は抑制された。また、かかる作用はmTOR拮抗薬ラパマイシンによって阻害された。したがって、ラット骨格筋量制御におけるGR-mTORクロストークの意義が確認できた。

(2) 骨格筋特異的GR遺伝子破壊マウスの作成

ドイツ癌研究所Schuetz博士より供与されたGRfloxマウスと α MHC-Creマウスを交配させて作成した。マウスは正常に生まれ、寿命も野生型と変わらなかった。体重はGRKOでやや重かった。現在詳細な解析を行っているが、骨格筋は、GRKOが野生型に比してその横断面積がとくにII型線維において広い傾向があった。

D. 考 察

グルココルチコイドによる筋萎縮は

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。ここで、mTOR活性化によってGR機能が抑制され、GRとmTORの間には相互に排他的な相互作用が存在することが確認された。つまり、十分な栄養が摂取された場合、そのインスリンなどを介したセンシングによって異化径路が上流で抑制され、ただちに栄養貯留一同化に適した環境にスイッチされる。かかる仕組みは、動物の食に対する適応機構の一端を示すものかもしれない。医学的には、本研究成果はGC筋萎縮の治療法を開発する上でブレークスルーを与えるものである。とくに、GRKOを用いた検討から、通常摂食下においてもGCは骨格筋異化作用をドライブしていることが示唆され、生体代謝の恒常性維持におけるGC-GR経路の新しい意義を検証する契機となる。

E. 結 論

GR標的遺伝子の同定とその機能解析、そして組織特異的発現制御機構解明によってGC作用の全貌が明らかになるものと思われる。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 雑誌発表論文

Shimizu N, Yoshikawa N, Ito N, Maruyama T, Suzuki Y, Takeda S, Nakae J, Tagata Y, Nishitani S, Takehana K, Sano M, Fukuda K, Suematsu M, Morimoto C, Tanaka H
Crosstalk between Glucocorticoid Receptor and Nutritional Sensor mTOR in Skeletal Muscle
Cell Metab. 13(2):170-82, 2011

Mu SY, Shimosawa T, Ogura S, Wang H, Uetake Y, Kawakami-Mori F, Marumo T, Yatomi Y, Geller DS, Tanaka H, Fujita T
Epigenetic modulation of the renal β -adrenergic-WNK4 pathway in salt-sensitive hypertension
Nat Med 17 (5):573 – 580, 2011

Toyokawa G, Cho H-S, Iwai Y, Yoshimatsu M, Takawa M, Hayami S, Maejima K, Shimizu N, Tanaka H, Tsunoda T, Field H, Kelly J, Neal D, Ponder B, Maehara Y, Nakamura Y, and Hamamoto R
The histone demethylase JMJD2B plays an essential role in human carcinogenesis through positive regulation of cyclin-dependent kinase 6
Cancer Prev Res 4(12):2051-61, 2011

2. 学会発表

清水宣明、吉川賢忠、丸山崇子、田中廣壽

骨格筋におけるステロイドホルモンシグナルと栄養シグナルのクロストーク
日本ケミカルバイオロジー学会 第6回
年会2011年5月23-25日(東京)

田中廣壽

ゲノムワイドアプローチによるグルコ
コルチコイド作用の解析

CKD と 心 血 管 イ ベ ン ト Expert
Meeting VI
2011年7月 (東京)

清水宣明、吉川賢忠、丸山崇子、田中
廣壽

骨格筋におけるグルココルチコイドシ
グナルと栄養シグナルのクロストーク
第19回日本ステロイドホルモン学会
学術集会
2011年11月26日 (福岡)

松宮遼、清水宣明、吉川賢忠、丸山崇
子、馬艶霞、森本幾夫、田中廣壽

骨格筋におけるグルココルチコイドに
よるREDD1とKLF15遺伝子発現調節機
構

第19回日本ステロイドホルモン学会
学術集会
2011年11月26日 (福岡)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。