

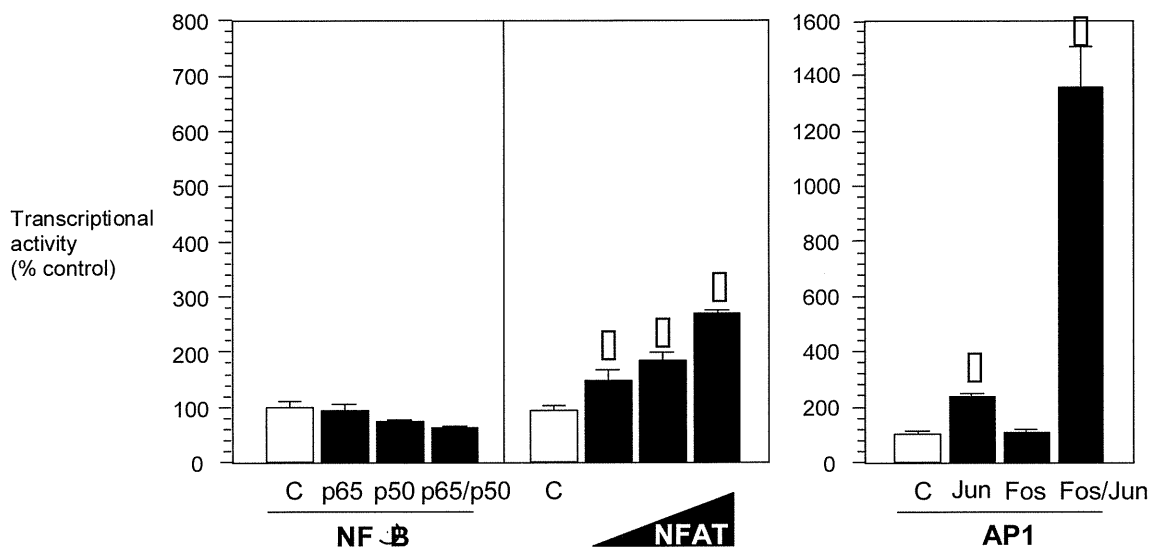
図1. ヒトMRAP遺伝子5'側転写調節領域の塩基配列。転写開始点より -150bp以内に、典型的なNFAT結合配列ならびにAP1配列が認められる。

```

-1000  AAATATTTTCTAGCTCTCTACATTGAATTGGTCTAAACATTATAACCAAC
-950   CCAGTAGCAACAAGCACCCCTATCATCTAGACCATGATAGCTAAATACCA
-900   TTTTCTACTAAGAAGCTGGGATTCTTGGAGAAATGACTGAATTCAAGGTT
-850   CGCGGGGGTATCCAATCTTTTGGCTTCCCTGGGCCACACTGGAAGAAGAA
-800   TAATTGTCTTGGGCCACACATAAAATACACAAATAGTAACAATAGCTGAT
-750   GAGCTTTAAAAAAAATGCAAAGAATCTCATAATGTTTTAAGAAAGTTTA
-700   TGAATTTGTATTGAGCCACACTCAAAGCCATCCTGGGCCACATGTGGCCT
-650   ATGGCAAGCTTGTTCTAGGACAAGAAATGTACAAAATGTACATAGATTTA
-600   AGTTCAAAAATGCATTTTATATATATATATTTTCTGAGACAGAGTCTCACT
-550   CCATTACCCAGTCTGGAGTGTAGTGGCATGATCTTGGCTCACTGCAACCT
-500   TCACCTCTTGGGTTCAAGCCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGTT
-450   GAGACTGACTACAGGTGTGCACAACCATGCTTGACTAATTTTTGTATTAT
-400   TTTAGTAGAGACGGGGTTTCACCCTGTTGGTCAGGCTGGTCTTGAACCTC
-350   TGGCCTCAAGTGATCCTTCTGCCTCGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACA
-300   GGCATGAGCCACCGTGCCCAGCCTCAGAAATGCATAATTTTTTTAAGCTT
-250   CTTATTATTTACTGTTGGAAGACGCTAGGCAGGGATAAATAGGTGCAGCA
-200   TAAAAGACTTTTCAGGGCAGTGAAACTACTTTGTATGATACGATAATGGTG
-150   GATACATGTTATTATACATTTTCCCAAACCCGTAGAATGTACAACAACNFAT-RE
-100   TGAACCCTAATGTAAACTATGGACTCTGGGTGATAATGATGTGTCATTGAP1
-50    CATTGTTGGTTCATCAGTTGTAACAAATGTACCACTCTGAGGCAGCAGGT
+1    GGATAATGGGGAGGCTATGCAGGTGTGTGGGCTGGAGgt

```

図2. NFAT ないし AP1 (Fos/Jun) の共発現が MRAP 遺伝子転写に及ぼす影響。NFAT により用量依存性の刺激効果が、またFos/Jun の同時発現により強力な誘導効果（約13倍）が認められた。



アルドステロン過剰産生を伴うクッシング症候群の CYP11B1及びB2遺伝子のエピジェネティクス

分担研究者 武田 仁勇（金沢大学医薬保健研究域医学系臓器機能制御学（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）

研究協力者 出村 昌史（同上）

研究協力者 笹野 公伸（東北大学大学院病理診断学分野）

【研究要旨】

近年、組織の遺伝子発現にエピジェネティクス制御が重要であることが明らかにされている。DNAメチル化はその制御の主たる機序であり、CpGサイトが関与している。今回、両ホルモン過剰産生を有する副腎腺腫におけるCYP11B2及びコルチゾール産生酵素遺伝子CYP11B1のメチレーション状態について検討した。その結果、6例のクッシング腺腫におけるCYP11B1遺伝子は低メチル化状態を示した。副腎腺腫組織においてアルドステロン過剰産生を示した2例においてCYP11B2は低メチル化状態を示した。ホルモン過剰産生と責任遺伝子の低メチル化に伴う過剰発現との関連性が示唆された。

A. 研究目的

近年組織の遺伝子発現にエピジェネティクスによる制御が重要であることが明らかにされている。DNAメチル化はエピジェネティクスにおける主たる機序であり、CpGサイトが関与している。CpGサイトは遺伝子 coding region近傍にCpG islandとして高い頻度で存在している。近年エピジェネティクスが癌の発症に強く関与していることが明らかにされたが、生活習慣病である高血圧や糖尿病においても、その環境要因がエピジェネティックな影響を及ぼし、発症に関与していることが報告されている。我々は副腎におけるアルドステロン合成酵素遺伝子 *CYP11B2* の遺伝子発現調節が遺伝子上流の

メチレーションにより調節を受けることを報告した¹⁾。

アルドステロンとコルチゾールの過剰産生を伴う副腎腺腫の存在が報告されているが、その分泌機序は明らかではない²⁾。両ホルモン過剰産生を有する副腎腺腫における *CYP11B2* 及びコルチゾール産生酵素遺伝子 *CYP11B1* のメチレーション状態について検討した。

B. 研究方法

内分泌学会の指針により診断したCushing症候群の患者で副腎静脈サンプリングにてアルドステロンの過剰産生が証明された6例の症例に対し、摘出副腎組織においてCYP11B1, B2, 17の抗体を用いてアルドステロン及びコルチゾー

ルの過剰産生が証明された組織を用いた。表1に臨床検査成績を示す。DNAのメチル化は既報のごとくバイスルファイトシーケンス法を用いて行った³⁾。

C. 結果

6例のクッシング腺腫における*CYP11B1*遺伝子は低メチル化状態を示した(図1)。副腎腺腫組織においてアルドステロン過剰産生を示した2例において*CYP11B2*は低メチル化状態を示した(図2)。

D. 考案

コルチゾールは副腎皮質束状層において産生され、球状層からはアルドステロンのみ合成される。我々は正常ヒト副腎において球状層において*CYP11B1*遺伝子が高度にメチル化され、束状層では脱メチル化されていることを見出し、コルチゾールの分泌と関係していることを報告した⁴⁾。またアルドステロン産生腺腫組織において*CYP11B2*遺伝子の脱メチル化が正常副腎に比して高度であることを見出した¹⁾。これらの事実はコルチゾール及びアルドステロンの分泌調節に*CYP11B1*, *B2*の遺伝子のメチル化が関与していることを示唆している。今回クッシング腺腫において*CYP11B1*遺伝子の脱メチル化が観察され、コルチゾール過剰産生に関与していることが推察された。アルドステロン過剰産生を有するクッシング腺腫組織では*CYP11B2*遺伝子の低メチル化状態が1例において観察されたが、症例を重ねて検討する必要がある。

E. 結語

副腎腺腫からのコルチゾール及びアルドステロン過剰産生の機序に各遺伝子のメチル化が関与している可能性が示唆された。メチル化に

影響する因子も含めさらに検討が必要である。

文献

- 1) 出村昌史 他.アルドステロン研究の最前線 アルドステロン産生のエピジェネティクス, 最新医学 65; 2253-2260, 2010
- 2) Hiraiishi K, et al. Clinicopathological features of primary aldosteronism associated with subclinical Cushing's syndrome. *Endocr J* 58; 543-51, 2011
- 3) Wang F, et al. CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)-associated dynamic changes of DNA methylation in the angiotensinogen gene. *Hypertension* 63; 281-288, 2014.
- 4) 武田仁勇, 出村昌史 組織レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系のエピジェネティクス, 適応医学16; 2-7, 2012

表1. 臨床データ

症例	1	2	3	4	5	6
年齢/性別	58歳/F	37歳/F	33歳/F	44歳/F	60歳/F	57歳/M
Cushing徴候	±	+	+	—	—	—
高血圧	+	+	+	+	+	—
糖尿病	—	—	—	—	—	—
HOMA-R	1.6	1.8	2.3	1.3	1.8	2.1
75gOGTT	×	境界型	IRI遅延	IRI遅延	IRI遅延	×
脂質異常症	+	+	—	—	+	+
K(mEq/L)	4.1	3.6	3.7	4.1	3.4	4.1
心血管合併症	心肥大	心肥大	—	—	—	—
PAC/PRA	161/0.5	70/0.2	177/3.5	113/1.8	111/0.3	138/0.2
ARR	322	350	51	63	370	919
F/ACTH	8.1/5.5	13.2/<5.0	11.2/<5.0	16.0/1.3	13.3/<5.0	13.1/11.8
23時F	5.0	13.5	8.8	4.6	×	4.3
CCT/FUT	—/—	陽性/陽性	陰性/—	—/—	陰性/陽性	陰性/陽性
1mgDST-F	4.9	13.1	9.4	10.1	5.6	4.7
8mgDST-F	4.5	15.1	15.2	10.4	9.5	4.1

HOMA-R, homeostasis model assessment index of insulin resistance; PAC, 血漿アルドステロン; PRA, 血漿レニン活性; ARR, PAC/PRA比; F, 血清コルチゾール; CCT, カプトプリル負荷試験; FUT, フロセミド立位試験; DST, デキサメサゾン抑制試験

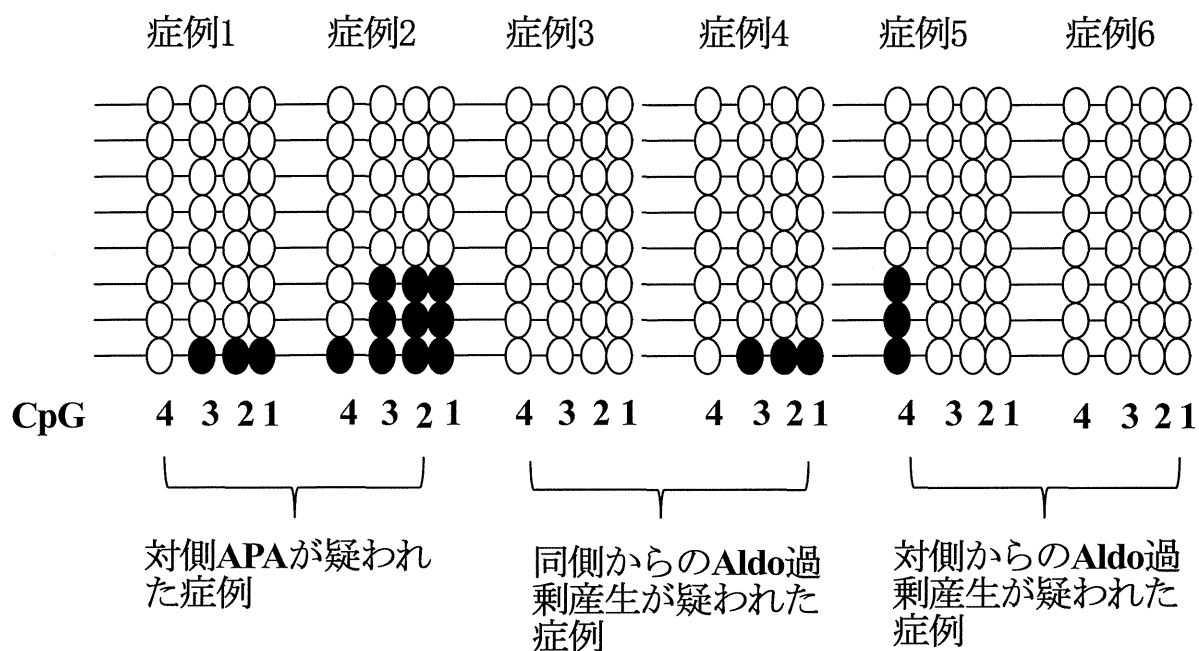


図1 各症例の腺腫組織におけるCYP11B1遺伝子上流のCpG部位のメチレーションの状態を示す。○は非メチル化, ●はメチル化を示す。

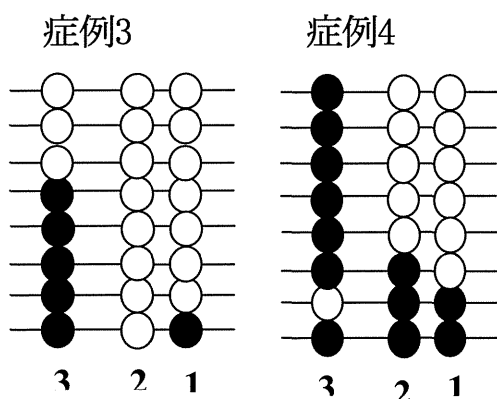


図2 各症例の腺腫組織におけるCYP11B2遺伝子上流のCpG部位のメチレーションの状態を示す。○は非メチル化, ●はメチル化を示す。

Purkinje cell protein 4 (PCP4)のヒト副腎組織での発現と、 アルドステロン産生調節への関与

分担研究者	笹野 公伸	東北大学大学院医学系研究科病理診断学分野
	中村 保宏	東北大学大学院医学系研究科総合地域医療研修センター
	Saulo J.A. Felizola	東北大学大学院医学系研究科病理診断学分野
	伊勢 和恵	東北大学大学院医学系研究科病理診断学分野
	佐藤 文俊	東北大学病院腎・高血圧・内分泌科

【研究要旨】

〔目的〕 Purkinje Cell Protein 4 (PCP4)は、カルモジュリン(CaM)とカルシウムの結合・解離を促進する蛋白質である。近年、副腎アルドステロン産生皮質腺腫(APA)でPCP4の発現が報告されたが、その詳細や機能的意義は十分解明されていない。本研究では、様々な副腎組織でのPCP4発現およびそのアルドステロン調節への関与について検討した。

〔対象と方法〕 種々のヒト副腎組織でのPCP4発現を、定量RT-PCR (qPCR)法ないし免疫組織化学的検討により解析を行った。副腎皮質癌由来培養細胞株H295R細胞にangiotensin-II(AngII)やforskolin(FSK)を添加し、PCP4のmRNA発現量を検討した。PCP4特異的なsiRNAをH295R細胞にトランスフェクションし、qPCRでCYP11B2mRNA発現量、さらに培養液中のアルドステロン量を測定した。

〔結果〕 免疫組織学的検討では、正常副腎皮質や特発性アルドステロン症(IHA)の球状層およびアルドステロン産生副腎皮質腺腫(APA)でPCP4が強発現していた。qPCR解析では、APAでのPCP4のmRNA発現量はCYP11B2発現量と正の相関と関係があった ($P<0.0001$)。また、APAのうちKCNJ5遺伝子mutation症例では、wild typeのAPA症例に比べてPCP4 ($P=0.005$) 及びCYP11B2 ($P<0.005$) の発現量が有意に高かった。PCP4 mRNA発現量は、AngII添加により上昇した。PCP4 のノックダウンでは、AngIIによるCYP11B2のmRNA発現誘導、アルドステロン量産生が有意に減少した。

〔考察〕 PCP4は、ヒト副腎組織に発現しアルドステロン産生調節に重要な役割を果たしていることが証明された。

A. 研究目的

ヒト副腎アルドステロン産生皮質腺腫(APA)でのアルドステロン過剰産生には、細胞内カルシウムシグナルが重要であることが知られている。Purkinje Cell Protein 4 (PCP4)は、カルモ

ジュリン(CaM)とカルシウムの結合・解離を促進する蛋白質である。PCP4は小脳プルキンエ細胞に発現し、同細胞内カルシウムシグナルを調節してその神経伝達に重要な働きをしていることが知られている。近年、APAでPCP4発現

が報告された。しかし、これまでPCP4の正常副腎皮質および副腎腫瘍組織での両者の発現発現パターン、およびその機能的役割については十分解明されてはいない。本研究では、PCP4の上記副腎組織での発現度及びin vitroでの機能的意義を検討することで、APAでのPCP4の生理的、病理的機能への関与を解明することを目的とした。

B. 研究方法

- 1) 東北大学病院にて腎癌などで合併切除された正常副腎(NA)15例、切除されたAPA15例、コルチゾール産生性副腎腺腫(CPA)15例、特発性アルドステロン症(IHA)5例を対象とし、PCP4蛋白の発現について免疫組織化学的検討を行った。また、APA45例を対象とし、定量RT-PCR法を用いてPCP4のmRNAs発現の解析を行った。
- 2) 副腎皮質癌由来培養細胞株H295R細胞にangiotensin-II(AngII)やforskolin(FSK)を添加し、PCP4のmRNA発現量をtime-course(3h、6h、12h、24h)で検討した。
- 3) PCP4に特異的なsiRNAをH295R細胞にトランスフェクションし、qPCRでCYP11B2mRNA発現量、さらに培養液中のアルドステロン量を測定した。(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

- 1) 免疫組織化学的検討の結果、核や細胞質に発現するPCP4蛋白はNAやIHAでは球状層(ZG)での発現度が、束状層(ZF)や網状層(ZR)に比べ有意に高かった(図1)。腫瘍組織間では、APAではCPAに比べPCP4の核及び細胞質発現度が有意に高かった(図2)。

APAの定量RT-PCR解析では、KCNJ5変異APA(28例)ではKCNJ5野生型APA(17例)に比しCYP11B2とともにPCP4 mRNA発現量が有意に高かった(図3)。またCYP11B2とPCP4のmRNA発現量には正の相関がみられた(図3)。CYP11B1との間には相関はなかった(図3)。

- 2) PCP4 mRNA発現量は、AngIIやFSK添加により上昇し、そのpeakは6hであった(図4)。一方、CYP11B2の両者の添加による発現のpeakは12hであった(図4)。
- 3) 特異的siRNAのトランスフェクションにより、H295R細胞でのPCP4の発現レベルは効果的に抑制された(図5)。この状態でAngIIを添加した場合、AngIIによるCYP11B2のmRNA発現誘導、アルドステロン量産生が有意に減少した(図6)。CYP11B1mRNA発現やコルチゾール産生量には影響はみられなかった。

D. 考察

ヒト副腎細胞では、AngIIなどにより細胞内カルシウムシグナルの刺激が生じ、その結果CYP11B2発現が誘導されてアルドステロン産生が引き起こされる。今回の検討では、PCP4は副腎のアルドステロン産生に関わる細胞に強く発現し、またCYP11B2の発現誘導を介してアルドステロン産生刺激に関与していることが証明された。予想では、PCP4は小脳プルキンエ細胞と同様に副腎皮質細胞でもカルモジュリン(CaM)とカルシウムの結合・解離に関与して上記役割を果たしていることが推定される。今後は、その機序の詳細、及びアルドステロン産生細胞でのPCP4の発現や機能を調節する因子の解明が必要と考えられた。

E. 結語

PCP4は、ヒト副腎組織に発現しアルドステロン産生調節に重要な役割を果たしていることが証明された。

○研究発表

●論文発表 (英文)

1. Nakamura Y, Rege J, Satoh F, Morimoto R, Kennedy MR, Ahlem CN, Honma S, Sasano H, Rainey WE.
Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of human adrenal vein corticosteroids before and after ACTH stimulation.
Clin Endocrinol (Oxf), 76(6):778–784, 2012
2. Satoh H, Saito R, Hisata S, Shiihara J, Taniuchi S, Nakamura Y, Nukiwa T, Ebina M, Sasano H.
An ectopic ACTH-producing small cell lung carcinoma associated with enhanced corticosteroid biosynthesis in the peritumoral areas of adrenal metastasis.
Lung Cancer, 76(3):486–490, 2012
3. Miki Y, Ono K, Hata S, Suzuki T, Kumamoto H, Sasano H.
The advantages of co-culture over mono cell culture in simulating in vivo environment.
J Steroid Biochem Mol Biol, 131(3–5):68–75, 2012
4. Kukidome D, Miyamura N, Sakakida K, Shimoda S, Shigematu Y, Nishi K, Yamashita Y, Eto M, Sasano H, Araki E.
A case of cortisol producing adrenal adenoma associated with a latent aldosteronoma: usefulness of the ACTH loading test for the detection of covert aldosteronism in overt Cushing syndrome.
Intern Med, 51(4):395–400, 2012
5. Inuzuka M, Tamura N, Sone M, Taura D, Sonoyama T, Honda K, Kojima K, Fukuda Y, Ueda Y, Yamashita Y, Kondo E, Yamada G, Fujii T, Miura M, Kanamoto N, Yasoda A, Arai H, Mikami Y, **Sasano H**, Nakao K.
A case of myelolipoma with bilateral adrenal hyperaldosteronism cured after unilateral adrenalectomy.
Intern Med, 51(5):479–85, 2012
6. Brutsaert EF, **Sasano H**, Unger P, Beasley MB, Golden BK, Inabnet WB, Levine AC.
Adrenal cortical carcinoma with late pulmonary metastases causing clinical Cushing’s Syndrome: Case report with immunohistochemical analysis of steroidogenic enzyme production.
Endocr Pract, 18(6):e138–143, 2012
7. Iwata M, Oki Y, Okazawa T, Ishizawa S, Taka C, Yamazaki K, Tobe K, Fukuoka J, **Sasano H**, Nishikawa T.
A Rare Case of Adrenocorticotrophic Hormone (ACTH)–independent Macroadrenal Hyperplasia Showing Ectopic Production of ACTH.
Intern Med, 51(16):2181–2187, 2012
8. Felizola SJ, Nakamura Y, Hui XG, Satoh F, Morimoto R, M McNamara K, Midorikawa S, Suzuki S, Rainey WE, **Sasano H**.
Estrogen-related receptor α in normal adrenal cortex and adrenocortical tumors: Involvement in development and oncogenesis.
Mol Cell Endocrinol, 365(2):207–211, 2012
9. Mise K, Ubara Y, Sumida K, Hiramatsu R, Hasegawa E, Yamanouchi M, Hayami N, Suwabe T, Hoshino J, Sawa N, Hashimoto M, Fujii T,

- Sasano H, Takaichi K.**
Cushing's Syndrome after Hemodialysis for 21 Years.
J Clin Endocrinol Metab, 98(1):13–19, 2013
10. Sakuma I, Suematsu S, Matsuzawa Y, Saito J, Omura M, Maekawa T, Nakamura Y, **Sasano H**, Nishikawa T.
Characterization of steroidogenic enzyme expression in aldosterone-producing adenoma: a comparison with various human adrenal tumors.
Endocr J, 60(3):329–336, 2013
 11. Fujimoto K, Honjo S, Tatsuoka H, Hamamoto Y, Kawasaki Y, Matsuoka A, Ikeda H, Wada Y, **Sasano H**, Koshiyama H.
Primary aldosteronism associated with subclinical Cushing syndrome.
J Endocrinol Invest, 36(8):564–567, 2013
 12. Rege J, Nakamura Y, Satoh F, Morimoto R, Kennedy MR, Layman LC, Honma S, **Sasano H**, Rainey WE.
Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Analysis of Human Adrenal Vein 19–Carbon Steroids Before and After ACTH Stimulation.
J Clin Endocrinol Metab, 98(3):1182–1188, 2013.
 13. Yokoyama H, Adachi T, Tsubouchi K, Tanaka M, **Sasano H**.
Non-functioning Adrenocortical Carcinoma Arising in an Adrenal Rest: Immunohistochemical Study of an Adult Patient.
Tohoku J Exp Med, 229(4):267–270, 2013
 14. Miyata M, Yoshida M, Shinoda J, **Sasano H**, Oiso Y.
A Marked Difference in the Vasopressin Responsiveness Between the Adrenal Glands in a Patient with Adrenocorticotropin-independent Macronodular Adrenal Hyperplasia.
Intern Med, 52(10):1073–1078, 2013
 15. Hayashi M, Kataoka Y, Sugimura Y, Kato F, Fukami M, Ogata T, Homma K, Hasegawa T, Oiso Y, **Sasano H**, Tanaka H.
A 68-year-old phenotypically male patient with 21-hydroxylase deficiency and concomitant adrenocortical neoplasm producing testosterone and cortisol.
Tohoku J Exp Med.231(2):75–84. 2013
 16. Felizola SJ, Nakamura Y, Satoh F, Morimoto R, Kikuchi K, Nakamura T, Hozawa A, Wang L, Onodera Y, Ise K, McNamara KM, Midorikawa S, Suzuki S, **Sasano H**.
Glutamate receptors and the regulation of steroidogenesis in the human adrenal gland: The metabotropic pathway.
Mol Cell Endocrinol. Sep 27. 2013 [Epub ahead of print]
 17. Wang F, Demura M, Cheng Y, Zhu A, Karashima S, Yoneda T, Demura Y, Maeda Y, Namiki M, Ono K, Nakamura Y, **Sasano H**, Akagi T, Yamagishi M, Saijoh K, Takeda Y.
Dynamic CCAAT/Enhancer Binding Protein-Associated Changes of DNA Methylation in the Angiotensinogen Gene.
Hypertension. 2013 Nov 4 [Epub ahead of print]
 18. Felizola SJ, Nakamura Y, Arata Y, Ise K, Satoh F, Rainey WE, Midorikawa S, Suzuki S,

Sasano H.

Metallothionein-3 (MT-3) in the Human Adrenal Cortex and its Disorders.

Endocr Pathol. 2013 Nov 17 [Epub ahead of print]

19. Pilon C, Urbanet R, Williams TA, Maekawa T, Vettore S, Sirianni R, Pezzi V, Mulatero P, Fassina A, **Sasano H**, Fallo F.

1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits the human H295R cell proliferation by cell cycle arrest: A model for a protective role of vitamin D receptor against adrenocortical cancer.

J Steroid Biochem Mol Biol. 2013 Nov 20. doi:pii: S0960-0760(13)00258-6. 10.1016/j.jsbmb.2013.11.008 [Epub ahead of print]

20. Iwakura Y, Morimoto R, Kudo M, Ono Y, Takase K, Seiji K, Arai Y, Nakamura Y, **Sasano H**,

Ito S, Satoh F.

Predictors of decreasing glomerular filtration rate and prevalence of chronic kidney disease after treatment of primary aldosteronism: Renal outcome of 213 cases.

J Clin Endocrinol Metab. 2013 Nov 27 [Epub ahead of print]

●論文発表 (邦文)

1. 三瀬広記, 乳原善文, 住田圭一, 早見典子, 諏訪部達也, 星野純一, 橋本雅司, 藤井丈士, **笹野公伸**, 高市憲明

21年の長期血液透析経過中、中心性肥満、低K血症と両側大腿骨頭壊死にて Cushing

症候群の診断に至った1例

日本腎臓学会誌 54巻6号 870 2012

2. 柴原裕紀子, **笹野公伸**

基礎からみた乳腺疾患 乳癌腫瘍免疫 update Cancer Board 乳癌 5巻2号 134-139 2012

3. 五味直哉, 伊藤良則, **笹野公伸**, 深水康吉

術前薬物療法の効果判定(第3回)

Cancer Board 乳癌 5巻2号109-125 2012

4. 佐藤文俊, 森本玲, 工藤正孝, 岩倉芳倫, 小野美澄, 柘津昌広, 中村保宏, **笹野公伸**, 伊藤貞嘉

【内分泌学からみた血圧調節のメカニズム】アルドステロン

内分泌・糖尿病・代謝内科(1884-2917)35巻5号 417-424 2012

5. 橘田一輝, 田久保憲行, 昆伸也, 大津成之, 風張眞由美, 横田行史, **笹野公伸**, 本間桂子, 長谷川奉延, 石井正浩

新生児マス・スクリーニング検査の17 α 水酸化プロゲステロン(17-OHP)高値を契機に、内分泌

学的検査をもとに診断されたACTH非依存性Cushing症候群の1例

日本マス・スクリーニング学会誌(0917-3803)22巻3号 212-216 2012

F. 知的所有権の出願、取得状況

- 1) 特許取得

なし。

- 2) 実用新案登録

なし。

- 3) その他

なし。

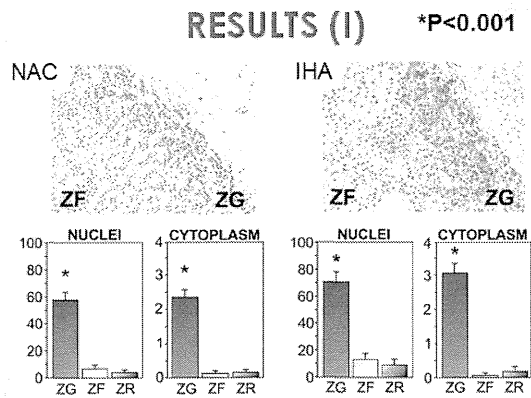


図1 NAおよびIHAでのPCP4蛋白の発現

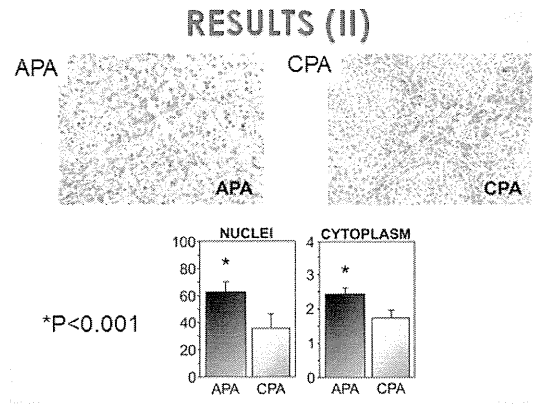


図2 APAおよびCPAでのPCP4蛋白の発現

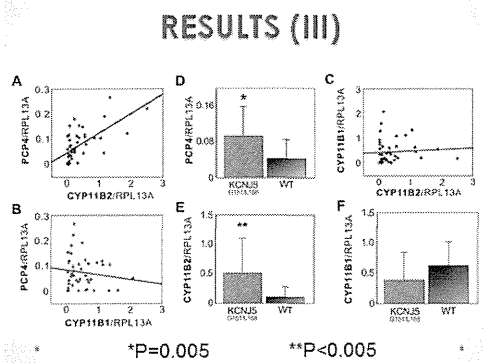
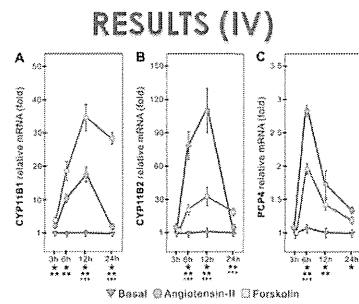


図3 APAでのPCP4mRNAの発現



*P<0.01 (angiotensin-II vs. basal); **P<0.01 (forskolin vs. basal); ***P<0.01 (angiotensin-II vs. forskolin).

図4 H295R細胞でのAnGII及びFSKによるPCP4及びCYP11B1/2mRNA発現の変化

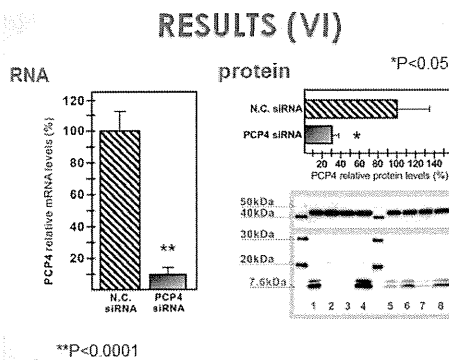


図5 H295R細胞での特異的siRNAによるPCP4発現の変化

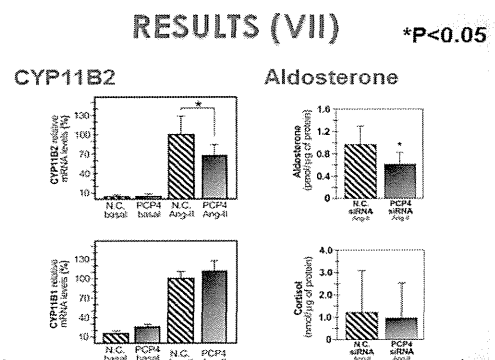


図6 H295R細胞でのPCP4発現ノックダウンによるCYP11B1/2発現およびステロイドホルモ

**(4) ステロイド産生細胞による細胞療法
に関する研究**

SF-1/Ad4BP誘導性ステロイド産生細胞の 副腎不全マウスへの移植効果について

主任研究者 柳瀬 敏彦（福岡大学医学部内分泌・糖尿病内科）

分担研究者 田中 智子（福岡大学医学部内分泌・糖尿病内科）

小玉 正太（福岡大学医学部再生・移植医学講座）

【研究要旨】

〔目的〕 間葉系幹細胞は骨髄や脂肪組織などに存在する成体幹細胞である。我々は転写因子SF-1/Ad4BP(SF-1)の過剰発現によって間葉系幹細胞がステロイド産生細胞へ形質転換することを報告した。本研究ではSF-1誘導性ステロイド産生細胞を副腎不全モデルマウスへ移植し、生存期間、血中コルチコステロン値について検討した。

〔方法〕 C57BL/6マウス皮下脂肪組織より調整した間葉系幹細胞にヒトSF-1 cDNAを搭載したレンチウイルスベクターまたは空のウイルスベクターを感染させ3日間非接着性ディッシュにて培養後、外科的に両側副腎を摘出したマウスの左腎皮膜下に細胞を移植した。

〔結果〕 両側副腎を摘出したマウスは8日以内に全例死亡したが、SF-1誘導性ステロイド産生細胞移植群は44.4% (9例中4例)がエンドポイントの30日目まで生存した。コントロール細胞移植群は10例中1例が30日間生存した。移植後7日目の血漿コルチコステロン(B)は、SF-1誘導性ステロイド産生細胞移植群でコントロール細胞移植群に比べ、有意に高値であった。移植後30日間生存したマウスの左腎を摘出すると全例が8日以内に死亡し、腎摘後の血漿Bは不検出であった。これらの結果より移植細胞が産生したステロイドホルモンが副腎不全をレスキューしたと考えられた。

〔結語〕 SF-1誘導性ステロイド産生細胞は血中にステロイドホルモンを分泌し副腎不全を改善する可能性が示唆された。

A. 研究目的

間葉系幹細胞は主に骨髄や脂肪組織中に存在する成体幹細胞で多分化能を有する。SF-1はステロイド合成酵素の発現を調節する転写因子で副腎、性腺、下垂体の発生・分化におけるマスターレギュレーターである。我々はこれまでの研究で、ウイルスベクターを用いてSF-1を間葉系幹細胞に遺伝子導入し、ACTHおよびLH応答性を有するステロイド産生細胞へ形質

転換することを明らかにした。

これまで副腎組織や副腎組織培養細胞の移植が副腎不全をレスキューすることは報告されてきたが、幹細胞から分化誘導したステロイド産生細胞の移植によるホルモン補充効果について報告はない。本研究は外科的に両側副腎を摘出した副腎不全モデルマウスに、間葉系幹細胞から誘導したSF-1誘導性ステロイド産生細胞を移植し、生存期間および血中コルチコステロ

ン値について検討した。

B. 研究方法

1. 脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ASCs)

C57BL6マウス皮下脂肪組織を細切後、コラゲナーゼ処理し、stromal vascular fraction(SVF)を回収した。SVFをDexter培地にて2週間培養し、接着細胞を実験に用いた。

2. レンチウイルスの作製

レンチウイルスベクタープラスミド (CSII-EF-RfA-IRES2-Venus)のEF1 α プロモーター下流にヒトSF-1 cDNAを組み込みCSII-EF-hSF-1プラスミドを作製した。293T細胞へCAG-HIV-g/p、CMV-VSV-G-RSV-RevおよびCSII-EF-hSF-1またはCSII-EFを遺伝子導入し、培養3日目の培地を回収しウイルス液とした。力価はフローサイトメーターにて決定したVenus陽性細胞率と感染時に用いた間葉系幹細胞の細胞数より算出した。

3. ウイルス感染

6-well ultra low attachment dish に1ウェルあたり 5×10^5 /2ml DMEM medium となるようASCsを播種し、レンチウイルスベクターをMultiplicity of infection (MOI) = 20となるよう培地に加え、一晚感染後、培地交換した。感染より3日目に細胞塊を回収し移植に用いた。

4. 両側副腎摘出マウスへの移植

レシピエントマウスは実験期間を通じて通常食餌、摂水にて飼育した。副腎摘出は二期的に行った。麻酔下にマウス右体側を切開し、副腎動脈、副腎静脈を鉗子で挟み、右副腎を摘出後、結紮し、閉腹した。一週間後、右副腎と同様に左副腎を摘出し、続けて左腎皮膜下に細胞 5×10^5 – 1×10^6 個(ウイルス感染時)を移植した。移植後30日間生存したマウスより左腎臓を摘出した。移植前後と左腎摘出後に採血した。

5. ステロイドホルモン測定

EIAキット (Cayman chemical社)にて、血漿コルチコステロン (B) 濃度を測定した。

6. 組織免疫染色

抗Ad4BP抗血清 (九州大学 諸橋憲一郎先生より供与) を用いて、組織切片を免疫染色した。

7. RT-PCR

RNeasy mini kit (Qiagen社)にて組織よりtotal RNAを抽出し、RT kit (Qiagen社)にてcDNAへ逆転写した。SYBR Green Ex Taq (Takarabio)を用いて、LightCycler480 (RocheDiagnosis)にてPCRを行い、PCR産物を2%agarにて電気泳動した。

C. 結果

1. SF-1誘導性ステロイド産生細胞移植によるホルモン補充効果

両側副腎を摘出したマウスは8日以内に死亡し、血漿Bは検出下限 (0.3 ng/ml)未満であった (n=4)。SF-1誘導性ステロイド産生細胞移植群は9例中4例が30日間生存した。空のレンチウイルスを感染させたコントロール細胞移植群は10例中1例が30日間生存した。移植後7日目の血漿B値はSF-1誘導性ステロイド産生細胞移植群 2.62 ± 1.46 ng/ml (n=8)、コントロール細胞移植群は 0.06 ± 0.06 ng/ml (n=9)であった (p=0.0737)。移植後30日生存したマウスの左腎臓を摘出した結果、全例が8日以内に死亡し、腎摘後の血漿Bは不検出であった。

2. 移植片におけるSF-1/Ad4BPの発現

移植後7日目の移植細胞におけるSF-1/Ad4BPの発現を組織免疫染色にて確認した。腎皮膜と腎実質との間に移植細胞は存在し、SF-1陽性細胞を認めた。移植後30日のマクロ組織像は、脂肪組織様変性を認め腎皮膜側に新生血管の走行が見られた。検鏡下に移植細胞と一部腎臓を含む組織を採取し、RT-PCRにてSF-1の発現を

確認した。

D. 考察

これまでにマウスES細胞、間葉系幹細胞、ヒトES細胞およびiPS細胞からステロイド産生細胞への分化誘導が報告されているが、いずれも生体における補充効果について検討されていなかった。間葉系幹細胞から誘導したステロイド産生細胞を副腎不全モデルへ移植した結果、血中Bが検出され、マウスの生存率改善効果が示された。

移植細胞が産生するB量は副腎不全のレスキューに十分量であると考えられたが、移植後30日の生存率は4割程度であったため、遺伝子導入効率や移植細胞数について検討する必要がある。併せて、補充期間や腫瘍形成の有無について今後検討を行う。

E. 結論

SF-1誘導性ステロイド産生細胞は血中にステロイドを産生し、副腎不全をレスキューする可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Akehi Y, Kawate H, Murase K, Nagaishi R, Nomiya T, Nomura M, Takayanagi R, Yanase T: Proposed diagnostic criteria for subclinical Cushing's syndrome associated with adrenal incidentaloma. *Endocrine J* 60(7):903-912, 2013
2. Murase K, Nagaishi R, Takenoshita H, Nomiya T, Akehi Y, Yanase T.: Prevalence and clinical characteristics of primary aldosteronism in Japanese patients with type 2

diabetes mellitus and hypertension. *Endocr J*.60(8):967-76, 2013.

3. Zhou T, Cong S, Sun S, Sun H, Zou R, Wang S, Wang C, Jiao J, Goto K, Nawata H, Yanase T, Zhao Y: Identification of endocrine disrupting chemicals activating SXR-mediated transactivation of CYP3A and CYP7A1. *Mol Cell Endocrinol*.365 (1): 36-43, 2013
4. Tanaka Y, Isobe K, Ma E, Imai T, Kikumori T, Matsuda T, Maeda Y, Sakurai A, Midorikawa S, Hataya Y, Kato T, Kamide K, Ikeda Y, Okada Y, Adachi M, Yanase T, Takahashi H, Yokoyama C, Arai Y, Hashimoto K, Shimano H, Hara H, Kawakami Y and Takekoshi K: Plasma free metanephrines in the diagnosis of pheochromocytoma: diagnostic accuracy and strategies for Japanese patients. *Endocrine J* (in press), 2014
5. Miyake Y., Tanaka K., Nishikawa T., Naruse M., Takayanagi R., Sasano H., Takeda Y., Shibata H., Sone M., Satoh F., Yamada M., Ueshiba H., Katabami T., Iwasaki Y., Tanaka H., Tanahashi Y., Suzuki S., Hasegawa T., Katsumata N., Tajima T., Yanase T. Prognosis of primary aldosteronism in japan: Results from a nationwide epidemiological study. *Endocr J* (in press) 2014
6. 柳瀬敏彦, 福田高士, 高田彩子, 野見山崇, 明比祐子: 原発性・続発性副腎機能不全症患者におけるグルココルチコイド補充指標としてのCGMの有用性に関する検討. *日本内分泌学会雑誌* 89:35-37, 2013
7. 後藤敏孝, 高田徹, 佐藤栄一, 田村和夫, 柳瀬敏彦: クリプトコックス、サイトメガロウイルスの重複感染下でコルチゾール拮抗薬投与後に急性呼吸窮迫症候群を呈したCushing症候群の1例. *感染症学*

雑誌 87:39-43, 2013

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

**(5) 原発性アルドステロン症
の病態に関する研究**

「small size APAにおけるCYP11B1およびCYP11B2発現の特徴」 に関する研究

研究分担者 氏名 佐藤文俊 所属 東北大学病院 腎・高血圧・内分泌科 役職講師

研究協力者 氏名 小野美澄、森本玲、岩倉芳倫、柘津昌広、松田謙、尾股慧、工藤正孝、
伊藤貞嘉、中村保宏、笹野公伸、高瀬圭、清治和将、荒井陽一

【研究要旨】

原発性アルドステロン症 (PA)においてCTで責任病変を描出し得ず、副腎静脈サンプリング (AVS)により局在診断したアルドステロン産生微小腺腫 (aldosterone producing microadenoma) の診断数は増加しているが、小型の腫瘍にもかかわらず、明らかなPAの臨床症状を呈してしまふ詳細な病態については未だ解明されていない。

A. 研究目的

APAの腫瘍サイズとステロイド合成酵素との連関について免疫組織化学的(IHC)に検討を行った。

B. 研究方法

既報の基準に従い当院でPAと診断、Multi-detector CTおよびAVSを施行、既報の基準に従い切除側を決定し、腹腔鏡下副腎摘除術を施行した40名のAPA患者を対象とした。病理標本上で腫瘍の最大径と面積を測定、60mm²未満をSmaller APA群、60mm²以上をLarger APA群とし、抗CYP11B1/B2抗体を使用して腫瘍部のIHC検討をH-score法を使用して施行した。

C. 研究結果

40例の全てのAPA患者で血漿アルドステロン濃度、1日尿中アルドステロン排泄量、降圧薬剤数が術前後で低下した。CTで腫瘍結節を描出し得なかったものは20例であり、腫瘍を指摘

し得たものは20例であった。micro APAはAVSによってのみ局在診断され、微小サイズでもPAの病態であり、術後臨床像はmacro APAと同様に改善した。切除標本上での最大腫瘍面積は術前のPACおよび1日尿中アルドステロン排泄量、CYP11B1のH-scoreと正相関する一方、CYP11B2とは逆相関をそれぞれ有意に認めた。アルドステロン分泌（血漿・尿）はCYP11B2 x 腫瘍面積に相関した。

D. 考察

アルドステロン分泌（血漿・尿）は（CYP11B2のH-score）x（腫瘍面積）に相関したことから、micro APAではmacro APAに比べ腫瘍サイズは格段に小さいがCYP11B2の発現強さがPAの病態を形成していると考えられた。

E. 結論

CTで描出し得ない微小なAPAでも既報のAVSの基準に基づいた手術加療により良好な臨

床成績を得られた。微小なAPAでも相対的にCYP11B2活性が高く、加療対象となり得るに十分なアルドステロン合成能を備えていることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Felizola S. J. Nakamura Y. Hui X. G. Satoh F. Morimoto R. McNamara K. Midorikawa S. Suzuki S. Rainey W. E. Sasano, H. Estrogen-related receptor alpha in normal adrenal cortex and adrenocortical tumors: Involvement in development and oncogenesis. *Mol Cell Endocrinol*2013;365(2):207-11
- 2) Rege J, Nakamura Y, Satoh F, Morimoto R, Kennedy MR, Layman LC, Honma S, Sasano H, Rainey WE. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis of Human Adrenal Vein 19-Carbon Steroids Before and After ACTH Stimulation. *J Clin Endocrinol Metab*2013 ; 98(3): 1182-8
- 3) Yamamoto H, Kaneko K, Ohba K, Morimoto R, Hirose T, Satoh F, Totsune K, Takahashi K. Increased expression of (pro) renin receptor in aldosterone-producing adenomas. *Peptides* 2013; 49C: 68-73
- 4) Miyake Y, Tanaka K, Nishikawa T, Naruse M, Takayanagi R, Sasano H, Takeda Y, Shibata H, Sone M, Satoh F, Yamada M, Ueshiba H, Katabami T, Iwasaki Y, Tanaka H, Tanahashi Y, Suzuki S, Hasegawa T, Katsumata N, Tajima T, Yanase T. Prognosis of primary aldosteronism in Japan: results from a nationwide epidemiological study. *Endocr J* 2014;61(1): 35-40
- 5) Felizola SJ, Nakamura Y, Arata Y, Ise K, Satoh F, Rainey WE, Midorikawa S, Suzuki S, Sasano H. Metallothionein-3 (MT-3) in the Human Adrenal Cortex and its Disorders. *Endocr Pathol* 2013
- 6) Takanami K, Kaneta T, Morimoto R, Satoh F, Nakamura Y, Takase K, Takahashi S. Characterization of lipid-rich adrenal tumors by FDG PET/CT: Are they hormone-secreting or not? *Ann Nucl Med* 2013 ; 28(2): 145-53
- 7) Iwakura Y, Morimoto R, Kudo M, Ono Y, Takase K, Seiji K, Arai Y, Nakamura Y, Sasano H, Ito S, Satoh F. Predictors of decreasing glomerular filtration rate and prevalence of chronic kidney disease after treatment of primary aldosteronism: Renal outcome of 213 cases. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99(5): 1593-8
- 8) Gomez-Sanchez CE, Qi X, Velarde-Miranda C, Plonczynski MW, Richard Parker C, Rainey W, Satoh F, Maekawa T, Nakamura Y, Sasano H, Gomez-Sanchez EP. Development of monoclonal antibodies against human CYP11B1 and CYP11B2. *Mol Cell Endocrinol* 2014 ; 383(1-2): 111-7
- 9) Felizola SJ, Nakamura Y, Satoh F, Morimoto R, Kikuchi K, Nakamura T, Hozawa A, Wang L, Onodera Y, Ise K, McNamara KM, Midorikawa S, Suzuki S, Sasano H. Glutamate Receptors and the Regulation of Steroidogenesis in the Human Adrenal Gland: The Metabotropic Pathway. *Mol Cell Endocrinol* 2014;382(1):170-7
- 10) Rossi GP, Auchus RJ, Brown M, Lenders JW, Naruse M, Plouin PF, Satoh F, Young WF Jr.