

## アルドステロン産生腺腫におけるKCNJ5, ATP1A1およびATP2B3 体細胞変異と臨床的特徴の検討

分担研究者 柴田 洋孝 大分大学医学部内分泌代謝・膠原病・腎臓内科学講座

### 【研究要旨】

原発性アルドステロン症(PA)は高頻度の内分泌性高血圧であり、アルドステロン産生腺腫(APA)は片側副腎摘出術により根治可能である。近年、APAの発症病因として、KCNJ5, ATP1A1, ATP2B3, CACNA1Dなどの体細胞変異が報告された。副腎静脈サンプリングにより片側性病変と診断され、副腎摘出術を施行されたAPA(N=43)において、31例(72%)にKCNJ5の体細胞変異を認め、ATP1A1変異は1例(2.3%)、ATP2B3変異は認めなかった。KCNJ5変異陽性APAでは、野生型APAと比較して血中および尿中アルドステロン、尿中18-hydroxycortisolの高値、血清K濃度の低値を認めた。免疫染色により、KCNJ5変異陽性APAでは、CYP11B2に加えて、CYP11B1発現の増加傾向を認め、18-hydroxycortisol高値に関与することが示唆され、術前の尿中18-hydroxycortisol高値はKCNJ5体細胞変異陽性の予測因子にな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(PA)は、アルドステロン産生腺腫(APA)または両側副腎過形成による特発性アルドステロン症(IHA)により、アルドステロンの自律的な過剰産生を示す内分泌性高血圧である。病因としては、アルドステロン合成酵素CYP11B2の過剰発現を認めるが、その上流の異常として最近、KCNJ5, ATP1A1, ATP2B3, CACNA1Dなどの体細胞変異が報告された。本研究では、当施設のAPA症例においてこれらの体細胞変異と臨床的特徴の関連を検討した。

### B. 研究方法

対象は、PA診療ガイドライン(日本内分泌学会2009)に準拠して診断されたPA42例を対象とした。経口食塩負荷試験、カプトプリル試験、迅速ACTH試験によりPAの確定診断を施行

し、副腎静脈サンプリングにより局在診断を行い、片側性PAに対して腹腔鏡下副腎摘出術を施行した。

インフォームドコンセントを得た後に、摘出副腎腺腫組織からゲノムDNAを抽出し、既報のKCNJ5, ATP1A1, ATP2B3変異部位周辺をPCRにて増幅し、sequencingにより変異を確認した。KCNJ5変異例(mutant KCNJ5)と非変異例(WT)の臨床所見、血液・尿所見を比較検討した。さらに、APA組織におけるステロイド合成酵素のCYP11B1, CYP11B2の発現を特異的抗体を用いて免疫組織学的に評価した。

### C. 研究結果

#### 1) APA組織における体細胞変異の解析

APA43症例のうち、KCNJ5変異陽性は32例(74.4%)で認め、内訳はG151Rが17例(39%)、L168Rが13例(30%)、T158Aが1例(2%)であり、

ATP1A1変異は1例(2%)であった(表1)。

## 2) KCNJ5変異例と非変異例における血液・尿検査所見の比較

KCNJ5非変異群(WT)と変異群(mutant KCNJ5)を比較すると、性別、年齢、BMI、空腹時血糖、HbA1c、TG、HDL-C、LDL-C、腫瘍径には有意差を認めなかった。しかし、mutant KCNJ5において、血清Na濃度高値、血清K濃度低値、血漿アルドステロン濃度、24時間尿中アルドステロン排泄量、18-hydroxycortisol (18-OHF)排泄量、遊離コルチゾール排泄量の高値を認めた(表1, 2, 3)。

## 3) APA腫瘍部におけるCYP11B1, CYP11B2免疫組織学的解析

APA腫瘍部は、CYP11B2の高発現を認めたが、症例によりCYP11B1の様々な割合の発現を認めた。CYP11B1:CYP11B2の陽性細胞の割合を、0:100 (カテゴリー1)、25:75 (カテゴリー2)、50:50 (カテゴリー3)、75:25 (カテゴリー4)の4種類に分類したところ、カテゴリー3+4に属する割合は、WTで20%、mutant KCNJ5で50%と有意に多く認めた。

## D. 考察

本研究の結果、APA43例中、32例(74.4%)にKCNJ5変異陽性例を認めた。変異の種類としては、G151Rを39%、L168Rを30%、T158Aを2%であった。一方、ATP1A1変異は1例(2%)のみであり、ATP2B3変異は認めなかった。また、臨床データとの相関解析の結果では、KCNJ5変異陽性例では、低K血症やアルドステロン分泌量の高値および尿中18-OHF高値を認めた。これらの結果は、最近の既報と比べると、KCNJ5変異陽性例は報告により異なるが、約40%前後との報告が多い中で、74.4%を明らかに高頻度であった。また、アルドステロン過剰分泌や低K血症といったConn症候群の表現型を相関して

いることは一致していた。本結果では、尿中18-OHF排泄量と関連することが新たに明らかとなった。また、免疫染色の結果から、CYP11B2に加えて、CYP11B1の高発現を認めることから、CYP11B1の高発現も認めるために、18-OHFが腺腫組織内でアルドステロンとともに同時に過剰産生されたことが示唆された。

現時点では、KCNJ5変異は体細胞変異であるため、術前に知ることはできない。また、CYP11B2やCYP11B1の高発現の上流の異常としての病因論としての意義は示されているが、臨床的に長期予後などとの関連や臨床的意義は不明である。尿中18-OHF高値のAPAでは、KCNJ5変異陽性の予測因子として利用できる可能性があるが、カットオフ値の設定にはさらに症例数を積み重ねた解析が必要と思われた。

## E. 結論

自験例のAPA43例のうち、74.4%にKCNJ5変異陽性を認めた。変異の種類としては、G151R、L168Rが多く、T158Aは1例のみであった。術前検査で尿中18-OHF高値の例では、KCNJ5変異陽性の可能性が高いが、KCNJ5変異陽性例の臨床的意義は不明である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 論文

1. Hattori S, Miyajima A, Hirasawa Y, Kikuchi E, Kurihara I, Miyashita K, Shibata H, Nakagawa K, Oya M. Surgical Outcome of Laparoscopic Surgery, Including Laparoendoscopic Single-Site Surgery, for Retroperitoneal Paraganglioma Compared with Adrenal Pheochromocytoma. J Endourol. 2014 Mar 24. [Epub ahead of

- print]
2. Hasegawa M, Miyajima A, Jinzaki M, Maeda T, Takeda T, Kikuchi E, Shibata H, Oya M. Visceral fat is correlated with prolonged operative time in laparoendoscopic single-site adrenalectomy and laparoscopic adrenalectomy. *Urology*. 82: 1312-8, 2013
  3. Hattori S, Miyajima A, Maeda T, Hasegawa M, Takeda T, Kosaka T, Kikuchi E, Nakagawa K, Shibata H, Oya M. Risk factors for perioperative complications of laparoscopic adrenalectomy including single-site surgery. *J Endourol*. 26:1463-7, 2012.
  4. Mitsutomi K1, Masaki T, Shimasaki T, Gotoh K, Chiba S, Kakuma T, Shibata H. Effects of a nonnutritive sweetener on body adiposity and energy metabolism in mice with diet-induced obesity. *Metabolism*. 63:69-78, 2014.
  5. 加隈哲也, 柴田洋孝. 原発性アルドステロン症（両側性病変）の手術適応. *ホルモンと臨床* 60: 447-453, 2012.
  6. 柴田洋孝. 原発性アルドステロン症と KCNJ5 遺伝子変異. *ホルモンと臨床* 60: 199-204, 2012.
  7. 横田健一, 柴田洋孝. 原発性アルドステロン症における臓器障害と外科・内科的治療による長期予後. *血圧* 20: 773-777, 2013.
  8. 林毅, 柴田洋孝. アルドステロン. *内分泌・糖尿病・代謝内科* 36Suppl.4: 219-227, 2013.
  9. 柴田洋孝. Cushing症候群 *日本医師会雑誌* 142特別1: S310-311, 2013.
  10. 横田健一, 柴田洋孝. 内分泌疾患のクリニカル・パール *Medicina* 50: 1632-1635, 2013.
  11. 柴田洋孝. アルドステロン生合成・分泌機構 *The Lipids* 24: 223-229, 2013.
  12. 成瀬光栄, 武田仁勇, 柴田洋孝. 原発性アルドステロン症 診療のパラダイムシフト *カレントセラピー* 31: 750-761, 2013.
  13. 柴田洋孝, 伊藤裕. 原発性アルドステロン症、治療抵抗性高血圧と糖尿病 *日本内科学会雑誌* 102: 850-855, 2013.
  14. 柴田洋孝. アルドステロン産生腺腫および遺伝性アルドステロン症におけるカリウムチャンネル変異の新知見 *医学のあゆみ* 245: 759-764, 2013.
  15. 横田健一, 柴田洋孝. 副腎髄質検査 メタネフリン、ノルメタネフリン *内科* 111:1540, 2013.
  16. 横田健一, 柴田洋孝. 副腎髄質検査 バニリルマンデル酸、ホモバニリン酸 *内科* 111:1538-1539, 2013.
  17. 横田健一, 柴田洋孝. 副腎髄質検査 カテコラミン *内科* 111:1536-1537, 2013.
- 著書**
1. 後藤孔郎, 柴田洋孝. 副腎疾患と遺伝子異常 : an update. *Annual Review2014糖尿病、代謝、内分泌、中外医学社、p.179-186, 2014.*
  2. 柴田洋孝. ミネラルコルチコイド受容体による血圧調節の新しい機序 *Annual Review2014循環器、中外医学社、p.200-207, 2014.*
- 学会発表**
1. 柴田洋孝, 栗原勲, 横田健一, 城理絵, 林毅, 三石木綿子, 大山貴子, 中村俊文, 伊藤裕. ミネラルコルチコイド受容体関連高血圧と臓器障害 第21回日本ス

- テロイドホルモン学会シンポジウム、平成25年11月16日、大阪。
2. 柴田洋孝, 武田彩乃, 栗原勲, 宮下和季, 伊藤裕. 原発性アルドステロン症の診断・治療における薬物療法 第86回日本内分泌学会学術総会シンポジウム、平成25年4月25日～27日、仙台。
  3. 城理絵, 柴田洋孝, 栗原勲, 横田健一, 武田彩乃, 三石木綿子, 林毅, 大山貴子, 中村俊文, 伊藤裕. 糖尿病におけるミネラルコルチコイド受容体(MR)の糖鎖修飾による活性化機構 第86回日本内分泌学会学術総会、平成25年4月25日～27日、仙台。
  4. 大山貴子, 柴田洋孝, 栗原勲, 横田健一, 武田彩乃, 三石木綿子, 林毅, 城理絵, 中村俊文, 伊藤裕. 肥満を伴う特発性アルドステロン症患者における血清中アルドステロン分泌促進因子の検討 第86回日本内分泌学会学術総会、平成25年4月25日～27日、仙台。
  5. 三石木綿子, 柴田洋孝, 栗原勲, 横田健一, 武田彩乃, 林毅, 城理絵, 大山貴子, 中村俊文, 伊藤裕. 上皮成長因子受容体を介したミネラルコルチコイド受容体活性化機構 第86回日本内分泌学会学術総会、平成25年4月25日～27日、仙台。
  6. 林毅, 柴田洋孝, 栗原勲, 横田健一, 武田彩乃, 三石木綿子, 城理絵, 大山貴子, 中村俊文, 伊藤裕. 糖尿病におけるプロテインキナーゼC(PKC)シグナルによるミネラルコルチコイド受容体(MR)活性化機構 第86回日本内分泌学会学術総会、平成25年4月25日～27日、仙台。
  7. 柴田洋孝. 二次性高血圧をどう診断するか? 第2回臨床高血圧フォーラム、平成25年5月25日～26日、東京。
  8. R. Jo, H. Shibata, I. Kurihara, K. Yokota, A. Murai-Takeda, Y. Mitsuishi, T. Hayashi, T. Ohyama, T. Nakamura, H. Itoh. Mineralocorticoid receptor is pathologically activated through its O-GlcNAc modification in hyperglycemic conditions. ISARSH2013, 平成25年4月27日～28日、仙台。
  9. K. Yokota, H. Shibata, I. Kurihara, K. Homma, A. Murai-Takeda, Y. Mitsuishi, R. Jo, T. Ohyama, T. Nakamura, K. Kameyama, K. Mukai, H. Itoh. Characterization of aldosterone-producing adenomas with somatic KCNJ5 mutations. ISARSH2013, 平成25年4月27日～28日、仙台。
  10. H. Shibata, R. Jo, I. Kurihara, K. Yokota, A. Murai-Takeda, Yuko Mitsuishi, Takeshi Hayashi, T. Ohyama, T. Nakamura, H. Itoh. Mineralocorticoid receptor is pathologically activated through its O-GlcNAc modification in hyperglycemic conditions. International Aldosterone Conference 2013, 平成25年6月13日～14日、San Francisco.
  11. H. Shibata. Prevalences and genetics of PA/IHA in Japan. Progress in Primary Aldosteronism 3, 平成25年7月3日～5日、Munich.
  12. H. Shibata. Adipocyte-derived factors as a potential cause of idiopathic hyperaldosteronism. Progress in Primary Aldosteronism 3, 平成25年7月3日～5日、Munich.
  13. 柴田洋孝. 糖尿病とミネラルコルチコイド受容体関連高血圧. 第13回日本内分泌学会九州地方会特別講演、平成25年8月24日、那覇。
  14. 柴田洋孝. 治療抵抗性高血圧とミネラルコルチコイド受容体 第36回日本高血圧学会シンポジウム、平成25年10月24日～26日、大阪。

15. 柴田洋孝. 副腎疾患の診断と治療－  
Overview－ 第23回臨床内分泌代謝Update  
Keynote Lecture、平成26年1月24日～25  
日、名古屋.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

- |           |      |
|-----------|------|
| 1. 特許取得   | 特になし |
| 2. 実用新案登録 | 特になし |
| 3. その他    | 特になし |

表1

mutation	WT	mutant KCNJ5			P値
	n=11 (26%)	G151R n=17 (39%)	T158A n=1 (2%)	L168R n=13 (30%)	
Male:Female	6:5	16:15			0.69
年齢(歳)	50.1±3.6	50.0±2.0			0.98
BMI	25.0±1.3	24.6±0.8			0.78
FPG(mg/dl)	107.7±5.7	102.3±2.2			0.29
HbA1c(%)	5.4±0.1	5.6±0.1			0.41
TG(mg/dl)	133.1±20.0	130±12.8			0.90
HDL(mg/dl)	66.6±20.1	56.8±3.6			0.34
LDL(mg/dl)	91.8±7.7	101.5±4.8			0.28
Na(mEq/l)	142.0±0.6	143.8±0.3			<0.05
K(mEq/l)	3.49±0.13	3.02±0.11			<0.05

表2

		WT (n=11)	mutant KCNJ5 (n=31)	P値
腫瘍径(mm)		14±2	16±1	0.50
血漿Aldo濃度(pg/ml)		325.5±28.7	477.5±57.8	<0.05
尿中Aldo(μg/day)		16.7±1.6	26.3±2.0	<0.001
尿中18-OHF(mg/day)		0.12±0.03	0.23±0.03	<0.05
迅速ACTH負荷 peak PAC/cortisol		28.2±2.2	35.0±3.8	0.13
カプトプリル負荷 PAC <sub>20min</sub> (pg/ml)		301.4±70.6	384.2±63.7	0.42
AVS ACTH(+)	lateralized ratio	15.7±4.7	17.8±4.4	0.78
	contralateral ratio	0.4±0.1	0.4±0.1	0.91

表3

	WT (n=11)	mutant KCNJ5 (n=31)	P値
早朝血清cortisol(μg/dL)	14.0±1.2	15.5±0.6	0.26
夜間血清cortisol(μg/dL)	3.5±0.7	3.8±0.4	0.63
尿中遊離cortisol	37.7±2.5	65.6±7.5	<0.05
尿中Σ(5αβTHE+5αβTHF)	6.4±1.1	6.1±0.4	0.76
mRNA level of CYP11B2	0.50±0.23	0.96±0.20	0.17

**(7) GC 抵抗症の病態理解のための  
GC 作用機構の研究**

## 骨格筋量制御におけるグルココルチコイドと そのレセプターの意義に関する研究

研究分担者 田中 廣壽 東京大学医科学研究所附属病院アレルギー免疫科  
研究協力者 清水 宣明 東京大学医科学研究所附属病院アレルギー免疫科  
丸山 崇子 東京大学医科学研究所附属病院アレルギー免疫科

### 【研究要旨】

主要な筋量制御メカニズムである、タンパク質の異化と同化のバランス制御および筋再生、における内因性グルココルチコイドの役割を、骨格筋特異的グルココルチコイドレセプター遺伝子破壊マウス（GRmKO）の解析を通じて明らかにすることを目的とした。GRmKOはコントロールのfloxマウス（f/f）とほぼ同様の成長曲線を示した。骨格筋量はf/fに比して約20%増加し、とくに2型筋線維の増加が顕著であった。GRmKOではグルココルチコイド投与によっても骨格筋萎縮関連遺伝子の発現は変化せず、骨格筋萎縮も生じなかったことから、グルココルチコイドによる骨格筋萎縮は骨格筋のGRを介していると結論づけられる。また、骨格筋GRは他の筋萎縮モデルにおいても病因的役割を果たしていることが分かった。

### A. 研究目的

超高齢化時代において運動器障害による生活の質（QOL）低下は喫緊の医学的・社会的課題である。骨格筋萎縮は、筋量と筋力が減り運動機能を損なう病態の総称であり、便宜的に次の二つに分けることができる。第一に、筋肉を支配する神経の損傷（神経原性）や筋肉自体の疾病を原因とする（筋原性）筋萎縮。第二に、がんや糖尿病などの消耗性疾患に伴う筋萎縮（悪液質）や、運動不足に低栄養などの要因が加わって生じる筋萎縮（廃用性）、加齢に伴うさまざまな原因により進行する筋萎縮（サルコペニア）、グルココルチコイドGC過剰による筋萎縮（ステロイド筋症）などの、いわば「二次的な」要因による筋萎縮である。後者の「二次的な」筋萎縮は、しばしば同時に複数の要因により引き起こされ、またその進行過程で

も同様にこれら複数の要因が同時に作用して病態が悪化する。したがって、骨格筋におけるGCシグナルの意義を解明することは、複合した筋萎縮の病態解明と治療法開発基盤の構築に大きな意義を有すると考えられる。著者らは、ステロイド筋症モデルラットを用いて、GCは骨格筋においてグルココルチコイドレセプターGRに始まる遺伝子発現機構を作動させる。さらに、GC-GR系はGRの標的遺伝子発現を介して同化のカギ分子であるmTORC1と排他的相互作用し、骨格筋量のみならず生体エネルギーの制御に本質的役割を果たしている、ことを明らかにしてきた。そこで、骨格筋GRの意義をより明確にするため、骨格筋特異的GR遺伝子破壊マウスGRmKOを作出してその解析を行った。また、他の筋萎縮モデルを用いてGR下流シグナルの役割を明らかにすることを試みた。



## B. 研究方法

### (1) 実験動物、試薬

動物実験は、東京大学医科学研究所動物実験委員会の承認下で実施した。7週齢雄のC57BL/6Jclマウス、8週齢雄のC57BL/10-mdxマウスを、9:00-21:00を明期とする明暗サイクルで飼育した。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GR<sup>flox</sup>マウスと $\alpha$ MHC-Creマウスを交配させて作成した。GC筋萎縮モデルはラットにデキサメタゾンDEX 600  $\mu$ g/kg体重を腹腔内注射することにより作成した。前頸骨筋、腓腹筋、ヒラメ筋を採取し、RNA、タンパク、組織学的解析に用いた。

(2) 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。

### (3) 肝、骨格筋mRNA発現解析

セパゾールRNA I Super Gを用いて全RNAを抽出し、オリゴ(dT)20プライマー（ライフテクノロジー）とSuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR（ライフテクノロジー）を用いてcDNAを作製した。リアルタイムPCRは、Thunderbird Probe qPCR Mix（東洋紡）、UPLユニバーサルプローブライブラリーセット、マウス（ロシュアプライドサイエンス）、CFX96リアルタイムPCR解析システム（バイオラッド）を用いて行った。それぞれの遺伝子のmRNA発現量は、段階希釈したcDNAを用いてそれぞれの遺伝子ごとに作製した標準曲線に基づき、検体間の相対量として算出した。

## C. 研究結果

### (1) GRmKOの作出と表現型解析

GRmKO作出に用いたベクターを図1Aに示した。f/f、GRmKO各組織のGR発現量を図1Bに示した。GRの発現は心臓、肝臓、脂肪では差を

認めないが、前頸骨筋、ひらめ筋、腓腹筋いずれにおいてもGRmKOで著明に低下していた。

雄の成長曲線を図2Aに示した。GRmKOはf/fに比して8%重かった。外観上は、GRmKOでは肩、の盛り上がりが顕著であるなど、骨格筋量が増大していることが伺えた（図2B）。各臓器別の重量では、脳、心臓、肝臓、腎臓などの湿重量には差がなかった。しかし、腓腹筋をはじめとした骨格筋重量はGRmKOで有意に重かった（図3）。筋線維の分布に与える影響を免疫組織学的に検討したところ、GRmKOではIIB型速筋線維が著明に肥大していた（図4）。

ステロイド筋症モデルを作成し、骨格筋におけるGR標的遺伝子のmRNAを測定した。dexamethasone 1 mg / kg体重, 24時間ごと、7日間腹腔内投与し、各筋をとりだし、RNAを採取した。RT-PCR法によって各遺伝子のmRNA量を測定した結果、f/fとは対照的に、GRmKOではそれらの遺伝子発現はdexamethasone投与後も変化がないかあってもごくわずかであった（図5）。骨格筋重量測定の結果からも、dexamethasone投与後にもかかわらずGRmKOでは減少しておらず（図6）、ステロイド筋症は骨格筋GRを介して発生するものと考えられた。

ステロイド、尾部懸垂、除神経による筋萎縮モデルを作成し、長母指伸筋(EDL)、ひらめ筋、腓腹筋の重量を比較した。尾部懸垂モデルではGRmKOにおいて萎縮の程度が軽くなる傾向が認められたが、除神経モデルではf/fとGRmKOに差を認めなかった（図7）。

## D. 考察

GRをカギ因子とした遺伝子転写ネットワークが多様な遺伝子の発現調節を介して、筋線維内タンパク質の異化亢進と同化抑制を誘導し、筋線維の太さを負に制御する。かかるプロセス

がクッシング症候群やステロイド投与によって過剰に起こっている状態がステロイド筋症と理解される。本研究の結果から、かかるステロイド筋症の病態が骨格筋GRを介したものであることが明確になったと言える。さらに、ステロイド筋症以外の筋萎縮においても骨格筋GRの関与を示唆する成績を得たことは興味深い。すでに、糖尿病、敗血症などにおいて骨格筋GRが筋萎縮のプロセスに関与している報告と合わせ、今後、GR下流のシグナルをより詳細に解析することでこれらの疾患に伴う筋萎縮にも有効な治療法を提案可能と思われる。

## E. 結論

ステロイド筋症はステロイドの骨格筋GRを介した遺伝子ネットワークの発現調節によって起こる。骨格筋GRはステロイド筋症以外の筋萎縮においても関与している可能性がある。

## F. 研究発表

1. 論文発表
1. 清水宣明, 田中廣壽. 加齢に伴う骨格筋量・筋力低下におけるグルココルチコイドシグナルの意義の究明. 健康医科学研究助成論文集, 28:83-91, 2013.
2. 松宮遼, 清水宣明, 吉川賢忠, 丸山崇子, 田中廣壽. ステロイドミオパチーの診断と治療. リウマチ科. 49(4):463-470, 2013.
3. 田中廣壽, 細野治, 小林弘, 吉川賢忠, 松宮遼. 薬物治療とその留意点 ステロイド 日本臨床. 71(7): 1261-1265, 2013
2. 学会発表
1. Shimizu N, Yoshikawa N, Maruyama T, Kuribara A, Matsumiya R, Tanaka H  
Physiological Regulation of Skeletal Muscle

Mass via Glucocorticoid Receptor. Alpbach, Austria, 平成25年4月4日.

2. 田中廣壽. ステロイド筋症-基礎と臨床. 第5回筋炎ワークショップ、東京、平成25年9月14日
3. 田中廣壽. 骨格筋研究の新展開, 第25回神奈川腎懇話会 (KKC), 横浜, 平成25年9月18日
4. 田中廣壽. これからのリウマチ膠原病診療とステロイド. 第30回城南リウマチ研究会. 東京, 平成25年11月9日
5. 田中廣壽. 生体代謝調節における骨格筋GRの役割. 第21回日本ステロイドホルモン学会学術集会. 大阪, 平成25年11月16日
6. 田中廣壽. 骨格筋研究とその将来展望-ステロイド筋症を中心に. 第20回徳島骨代謝研究会. 徳島. 平成25年11月21日  
田中廣壽. Molecular Mechanism for Muscle Volume Regulation and Its Physiological Significance. 第7回骨・軟骨フロンティア. 東京. 平成25年11月30日

## G. 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

図1 GRmKO作出用ベクター(A)と各組織におけるGR発現(B)

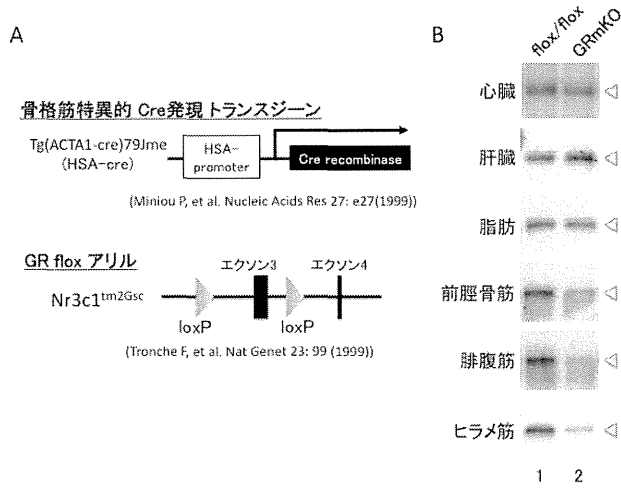


図2 GRmKO成長曲線(A)と外観(B)

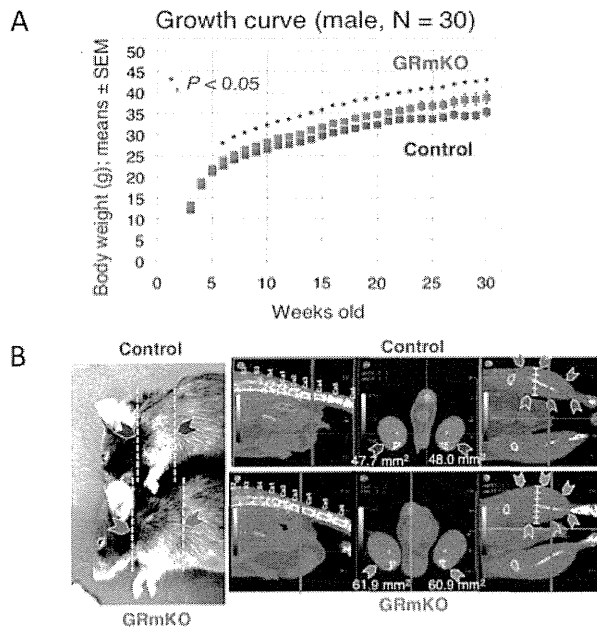


図3 GRmKOの各臓器、骨格筋別の重量

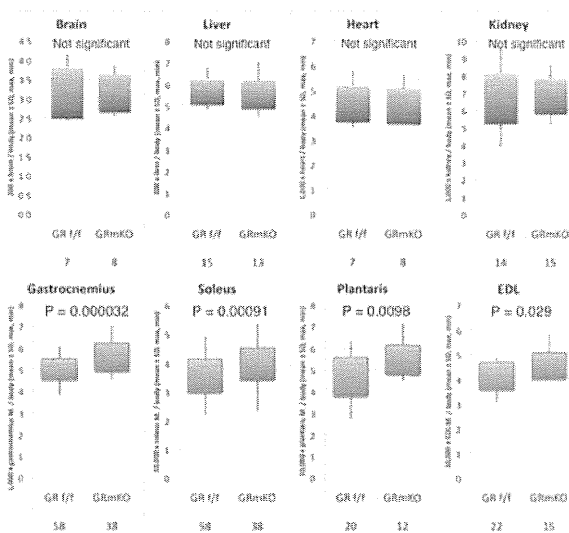


図4 GRmKO腓腹筋の免疫組織学的解析

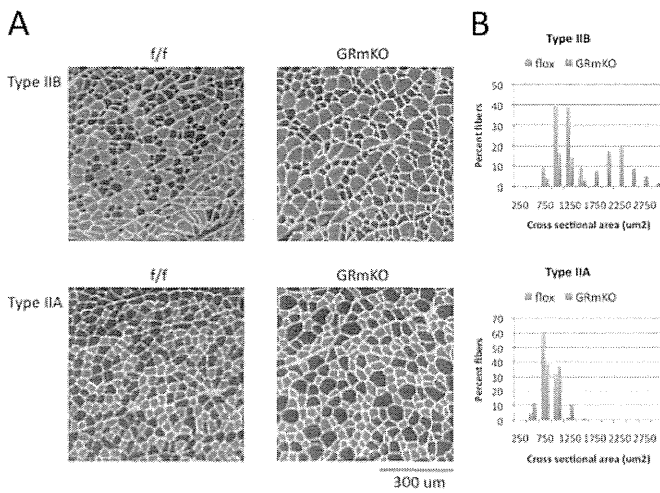


図5 スteroid筋症モデルにおける萎縮関連遺伝子のmRNA発現量

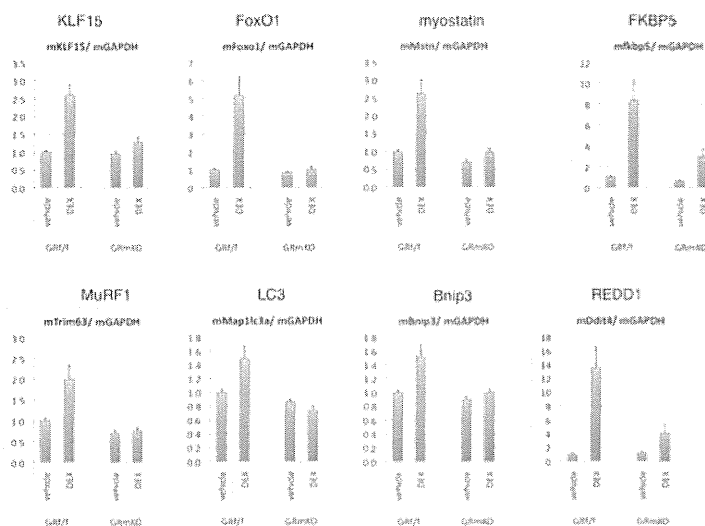


図6 スteroid筋症モデルにおける各筋の湿重量

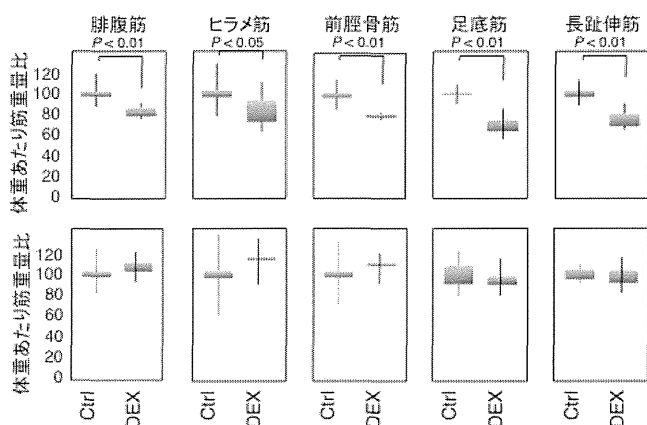
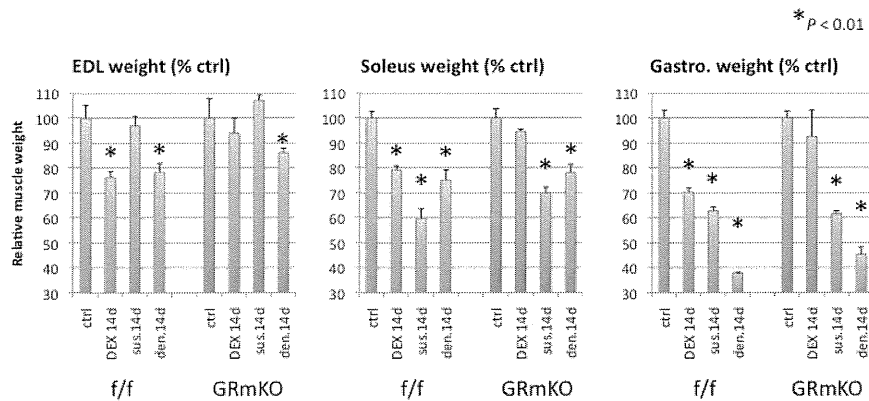


図7 スteroid (DEX)、尾部懸垂 (sus)、除神経 (den) の各筋萎縮モデルにおける筋重量



**(8) その他の副腎腫瘍の成因や病態  
に関する研究**

## 副腎性クッシング症候群とサブクリニカルクッシング症候群における原発性アルドステロン症合併頻度と高血圧合併頻度に関する検討

研究代表者又は研究分担者 西川 哲男 横浜労災病院

### 【研究要旨】

サブクリニカルクッシング症候群(SCS)における原発性アルドステロン症(PA)合併頻度と、SCSの高血圧へのPAの関与を検討した。SCSの85.7%でPAの合併が認められた。PA合併SCSでは、アルドステロン産生腺腫またはアルドステロン-コルチゾール同時産生腺腫切除例で高血圧が改善したが、コルチゾール産生腺腫切除例では高血圧が持続した。SCSの高血圧は合併するPAに依存することが示唆された。

大村昌夫 松澤陽子 斎藤淳 西川哲男  
横浜労災病院 内分泌・糖尿病センター

### A. 研究目的

サブクリニカルクッシング症候群(subclinical Cushing's syndrome; SCS)の45-92%で高血圧が合併し、コルチゾール産生腺腫(cortisol-producing adenoma; CPA)の切除により50-80%で高血圧が改善すると報告されている。しかし潜在性コルチゾール(cortisol; C)過剰分泌が高血圧の原因か否かは不明である。近年CPAに原発性アルドステロン症(PA)が合併する症例が報告されているが、SCSの高血圧へのアルドステロン(aldoosterone; A)過剰の関与を検討した報告はない。今回我々はSCSの高血圧とA過剰、潜在性C過剰の関連を検討したので報告する。

### B. 研究方法

2008年以降に当院で診断された顕性クッシング症候群(overt Cushing's syndrome; OCS)またはSCSを対象に前向きに検討を行った。対象

症例全例でACTH試験を行い、ACTH刺激後アルドステロン $>200\text{pg/ml}$ でPAの合併を疑った。PA合併が疑われたSCSおよびOCSの全例、およびPA非合併CSまたはSCSではinformed consentが取得可能であった症例でACTH刺激を行い副腎分葉内支脈で採血を行う選択的副腎分葉内支脈採血(selective segmental adrenal tributary vein sampling; SS-AVS)を行い、CとAの過剰分泌病変を確定した。

手術例では1年後の高血圧の治癒の有無を検討した。

(倫理面への配慮)

SS-AVS施行前、および手術施行前に文章を用い説明を行い同意が得られた症例でSS-AVS、手術を行った。

### C. 研究結果

OCS 12例、SCS 35例で検討が行われた。

ACTH試験によりSCS35例中30例、OCS 12例中7例でPAの合併が疑われ、SS-AVSでPAの合併

が確認された。

SS-AVSで診断したPA合併SCSの病態は、CとA同時産生腺腫(cortisol- and aldosterone producing adenoma; CPA)8例、APA合併SCS11例、特発性アルドステロン症(idiopathic hyperaldosteronism; IHA)合併SCS11例であった。

PA非合併OCS5例全例とPA合併OCS7例中6例はCPAを含む片側副腎部分切除で治療が行われ、全例で術後副腎不全となり血圧は低下した。

PA合併SCSでは、CPAPを切除した4例、APAを切除したAPA合併SCS 3例は術後全例で降圧薬投与なく血圧は140/90mmHg以下となった。一方CPAを切除したCPA合併APA5例中4例、CPAを切除したCPA合併IHA4例中3例で高血圧が持続した。

#### D. 結論

SCSの85.7%でPAが合併し、SCSでは合併したPAが高血圧の主な要因であることが示唆された。

従って、高血圧治療を目的にSCS症例で手術を予定する場合、ACTH試験によるPA合併のスクリーニングが重要であり、PA合併が疑われたSCSではSS-AVSによるCとAの過剰分泌責任病変を的確に診断し、A過剰分泌の責任病変の切除を優先すべき、と考えられた。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) T. Nishikawa, M. Omura, J. Saito, Y. Matsuzawa, T. Kino: Editorial Comment from Dr Nishikawa et al. to Preoperative maskedrenal damage in

Japanese patients with primary aldosteronism: Identification of predictors for chronic kidney disease manifested after adrenalectomy. *International journal of Urology* 2013, 20(7), 693-694

- 2) J.S aito, Y. Matsuzawa, H. Ito, M. Omura, T. Kino, T. Nishikawa: Alkalizer Administration Improves Renal Function in Hyperuricemia Associated with Obesity. *Japanese Clinical Medicine* 2013, 4, 1-6
- 3) I. Sakuma, J. Saito, Y. Matsuzawa, M. Omura, S. Matsui, T. Maehara, N. Hasegawa, T. Nishikawa: Pulmonary arterial sampling was useful for localizing ectopic ACTH production in a patient with bronchial carcinoid causing Cushing syndrome. *HORMONES* 2013, 12(3), 449-453
- 4) Y. Miyake, K. Tanaka, T. Nishikawa, M. Naruse, R. Takayanagi, H. Sasano, Y. Takeda, H. Shibata, M. Sone, F. Satoh, M. Yamada, H. Ueshiba, T. Katabami, Y. Iwasaki, H. Tanaka, Y. Tanahashi, S. Suzuki, T. Hasegawa, N. Katsumata, T. Tajima, T. Yanase: Prognosis of primary aldosteronism in Japan: results from a nationwide epidemiological study. *Endocrine Journal* 2013, doi:10.1507/endocrj. EJ13-0353
- 5) M. Fujisaki, T. Nagoshi, T. Nishikawa, T. Date, M. Yoshimura: Rapid induction of aldosterone synthesis in cultured neonatal rat cardiomyocytes under high glucose conditions. *BioMed Research International* Volume 2013, Article ID 161396, 6 pages  
doi: org/10.1155/2013/161396
- 6) Matsuzawa, Y.; Suematsu, S.; Saito, J.; Omura, M.; Nishikawa, T. Vascular Aldosterone Production at the Pre-Diabetic Stage of Young Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty



(OLETF) Rats, Compared with Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) Rats. *Molecules* 2013, 18, 15636–15647.

## 2. 学会発表

- 1) Tetsuo Nishikawa. Are Guidelines really working well for generalists and specialists? International symposium of aldosterone and related substances in hypertension 2013、Sendai on April 27–28, 2013
- 2) Jun Saito, Masao Omura, Eriko Nara, Yuichi Takashi, Takumi Kitamoto, Mayu Kyohara, Junya Takemoto, Yoko matsuzawa, Tetsuo Nishikawa. The 344C/T polymorphism of the CYP11B2 gene in Japanese patients with primary aldosteronism. International symposium of aldosterone and related substances in hypertension 2013, Sendai on April 27–28, 2013
- 3) Takumi Kitamoto Sachiko Suematsu, Yoko Matsuzawa, Jun Saito, Masao Omura, Tetsuo Nishikawa. Clinical characteristics of Japanese patients with aldosterone-producing adenoma possessing KCNJ5 gene mutations. International symposium of aldosterone and related substances in hypertension 2013, Sendai on April 27–28, 2013
- 4) Masao Omura, Kohzoh Makita, Seishi Matsui, Jun Inoue, Hiroki Kitoh, Maki Nagata, Kunio Yamaguchi, Yoko Matsuzawa and Tetsuo Nishikawa. We can decide partial adrenalectomy, according to the results of super-selective ACTH-stimulated adrenal vein sampling in patients with primary aldosteronism. The Endocrine society 96<sup>th</sup> Annual Meeting, San Francisco June 15–18, 2013
- 5) Takumi Kitamoto, Sachiko Suematsu, Yoko Matsuzawa, Jun Saito, Masao Omura, Nishikawa Tetsuo. Clinical characteristics of Japanese patients with aldosterone-producing adenoma showing KCNJ5 gene mutation. The Endocrine society 96<sup>th</sup> Annual Meeting, San Francisco June 15–18, 2013
- 6) Masao Omura, Kohzoh Makita, Seishi Matsui, Koshiro Nishimoto, Kuniaki Mukai<sup>4</sup>, Jun Inoue, Maki Nagata, Kunio Yamaguchi, Yoko Matsuzawa, Jun Saito and Tetsuo Nishikawa. Diagnosis and treatment for bilateral aldosterone-producing adenomas. Progress in Primary aldosteronism 3. Carl Friedrich von Siemens Stiftung, Munich, July 3–5, 2013
- 7) Masao Omura, Jun Saito, Jun Inoue, Maki Nagata, Kunio Yamaguchi, Yukio Kakuta, Yoko Matsuzawa and Tetsuo Nishikawa. Cardiovascular complications in primary aldosteronism. Progress in Primary aldosteronism 3. Carl Friedrich von Siemens Stiftung, Munich, July 3–5, 2013
- 8) 北本匠, 大村昌夫, 奈良枝里子, 三宅加奈, 早坂愛, 京原麻由, 高士祐一, 竹本潤哉, 松澤陽子, 齋藤淳, 西川哲男. 原発性アルドステロン症合併クッシング症候群の病態と診断法の検討第22回臨症内分泌代謝update. 2013年1月18日大宮ソニックシティ
- 9) 齋藤淳, 大村昌夫, 奈良枝里子, 三宅加奈, 早坂愛, 北本匠, 京原麻由, 高士祐一, 竹本潤哉, 松澤陽子, 西川哲男. 原発性アルドステロン症に合併した非機能性副腎腺腫の診断法とその重要性 第22回臨症内分泌代謝update 2013年1月18日大宮ソニックシティ

- 10) 大村昌夫 松澤陽子 西川哲男  
原発性アルドステロン症での臓器障害合併予測因子と術後高血圧治癒予測因子についての検討. 第110回日本内科学会講演会 2013年4月13日東京国際フォーラム
- 11) 北本匠, 末松佐知子, 早坂愛, 高士祐一, 京原麻由, 竹本潤哉, 松澤陽子, 大村昌夫, 西川哲男  
KCNJ5遺伝子変異を伴うアルドステロン産生腺腫の治療予後に関する検討  
第110回日本内科学会講演会 2013年4月13日東京国際フォーラム
- 12) 大村昌夫, 牧田幸三, 松井青史, 井上淳, 木藤宏樹, 永田眞樹, 山口邦雄, 角田幸雄, 松澤陽子, 齋藤淳, 西川哲男.  
超選択的ACTH負荷副腎静脈採血と片側副腎部分切除によるアルドステロン産生腺腫の新たな診断治療法. 第86回日本内分泌学会学術総会2013年4月25-27日仙台国際センター
- 13) 松澤陽子, 齋藤淳, 大村昌夫, 西川哲男  
超選択的副腎静脈サンプリングによるクッシング症候群診断は有用か?  
第86回日本内分泌学会学術総会2013年4月25-27日仙台国際センター
- 14) 西川哲男. 「副腎静脈サンプリングの標準化と超選択的AVSの適応」 原発性アルドステロン症～診断・治療の問題点～ 第86回日本内分泌学会学術総会2013年4月25-27日仙台国際センター
- 15) 大村昌夫, 牧田幸三, 松井青史, 井上淳, 永田眞樹, 山口邦雄, 角田幸雄, 上田絢美, 奈良枝里子, 松澤陽子, 齋藤淳, 西川哲男  
アルドステロン産生腺腫の術後高血圧緩解率の検討. 第86回日本内分泌学会学術総会2013年4月25-27日仙台国際センター
- 16) 北本匠 末松佐知子 早坂愛 高士祐一 京原麻由 竹本潤哉 松澤陽子, 齋藤淳, 大村昌夫, 西川哲男. KCNJ5遺伝子変異の有無によるアルドステロン産生腺腫症例の臨床的特徴の検討. 第86回日本内分泌学会学術総会2013年4月25-27日仙台国際センター
- 17) 松澤陽子, 末松佐知子 齋藤淳, 大村昌夫, 西川哲男. KCNJ5遺伝子変異を有するアルドステロン産生腺腫と、その付着正常副腎の機能に関する比較検討. 第86回日本内分泌学会学術総会2013年4月25-27日仙台国際センター

#### 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

## 機能性副腎腫瘍患者における非侵襲的血管機能評価

研究代表者 高柳 涼一 九州大学大学院医学研究院病態制御内科学

### 【研究要旨】

サブクリニカルクッシング症候群（SCS）、原発性アルドステロン症（PA）、褐色細胞腫などのホルモン産生性の副腎腫瘍を有する患者は、高血圧、糖尿病、脂質異常症などの心血管イベントのリスク因子を合併する頻度が高い。心血管イベントの抑制には、ハイリスク患者への早期の積極的な治療介入が必要であり、そのようなハイリスク患者の割り出しが重要である。我々は、IMT、PWV、CAVI、ABI、NICaSなどの非侵襲的な方法で、機能性副腎腫瘍患者の血管を評価した。その結果、SCS患者において、PWVおよびCAVIが高値で、早朝空腹時のコルチゾール濃度と強い正の相関を示し、骨吸収マーカーであるTRACP-5bおよび骨形成マーカーであるPINPとの逆相関を認めた。また、NICaSは、褐色細胞腫患者における循環血液量の予測に有用である可能性が示唆された。

### A. 研究目的

サブクリニカルクッシング症候群（SCS）、原発性アルドステロン症（PA）、褐色細胞腫などのホルモン産生性の副腎腫瘍を有する患者は、高血圧、糖尿病、脂質異常症などの心血管イベントのリスク因子を合併する頻度が高い。

このような慢性的なリスク因子への曝露に加えて、ホルモン自体の血管への直接作用が動脈硬化を進展させ、心血管イベントのリスクが高めることが知られている。心血管イベントの抑制には、ハイリスク患者への早期の積極的な治療介入が効果的であり、そのようなハイリスク患者の割り出しが重要になってくる。

我々は、IMT、PWVおよびCAVI、ABI、NICaSなどの非侵襲的な方法を用いて、機能性副腎腫瘍患者の血管機能の評価した。

### B. 研究方法

九州大学病院内分泌代謝・糖尿病内科に入

院して、副腎に関する精査を受けた患者150名（非機能性 40名、SCS 21名、PA 52名、SCS+PA 14名、褐色細胞腫 23名）に対して、治療開始前に、頸動脈超音波検査（IMT（内膜中膜複合体厚）およびプラークの評価）、PWVおよびCAVI（動脈の硬さを評価）、ABI（動脈の閉塞や狭窄を評価）、NICaS（末梢血管抵抗や心拍出量を評価）などの非侵襲的な血管機能評価を行い、各疾患群間で比較検討し、各種検査項目との相関について検討した（表1）。

（倫理面への配慮）

本研究では、個人情報保護法を遵守し、症例は匿名化して、個人が特定される情報は取り扱わないものとした。

### C. 研究結果

1. SCS患者は、血管の硬さの指標であるPWV

およびCAVIが、他の疾患群と比較して高値を示した。またPA患者では、CAVIが低値であった（表2）。

2. SCS単独群は、PA群およびSCS+PA合併群と比較して、baPWV, CAVIが高値であった。また、SCSとPAを合併した患者では、SCS単独およびPA単独群よりIMTが薄かった（表3）。
3. SCS患者において、PWVおよびCAVIの値が、年齢及び血圧に加えて、早朝空腹時のコルチゾール濃度とも強い正の相関を示した。また、SCS患者において、PWVおよびCAVIの値は、骨吸収マーカーであるTRACP-5bおよび骨形成マーカーであるPINPとの逆相関を認めた。（図1, 2）
4. NICaS（バイオインピーダンスを利用）によって得られた心拍出量と、<sup>131</sup>Iでラベルしたヒト血清アルブミンを用いて得られた循環血液量との間には、強い正の相関を認めた。NICaSは、褐色細胞腫患者における循環血液量の予測に有用である可能性が示唆された。（図3）

#### D. 考察

今回の解析で、SCS患者では、PWVおよびCAVIと早朝血中コルチゾール値が正の相関、骨代謝マーカーと負の相関を認めた。Cushing症候群患者では、血中のosteoprotegerin (OPG)が高値を示すことが知られており、OPGはコルチゾール、さらに冠動脈疾患リスクとの正の相関を示すことが知られている(Dovio et al. JCEM 2007)。さらに肥満患者で、朝の唾液コルチゾール値とCAVIが相関することが報告されている(Himeno et al Metabolism 2012)。

これらの結果より、SCS患者では、コルチゾールの血管への直接作用に加えて、コルチゾールによるOPGの誘導が、骨代謝回転の低

下をもたらし、動脈ステイフネスの増大に寄与していることが示唆された。

#### E. 結論

1. 非侵襲的血管機能評価法は、機能性副腎腫瘍患者における病態の把握や治療方針の決定に有用であると考えられた。
2. SCS患者では、コルチゾールによる骨代謝回転の低下が、動脈のステイフネスの増大に関与していることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

特記すべき事項なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表
  - 1) Tanaka M, Budhathoki S, Hirata A, Morita M, Kono S, Adachi M, Kawate H, Ohnaka K, Takayanagi R: Behavioral and clinical correlates of serum bilirubin concentrations in Japanese men and women. **BMC Endocr Disord** 13:39, 2013.
  - 2) Nomura M, Zhu HL, Wang L, Morinaga H, Takayanagi R, Teramoto N: SMAD2 disruption in mouse pancreatic beta cells leads to islet hyperplasia and impaired insulin secretion due to the attenuation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activity. **Diabetologia** 57:157-166, 2014.
  - 3) Sakamoto R, Matsubara E, Nomura M, Wang L, Kawahara Y, Yanase T, Nawata H, Takayanagi R: Roles for corticotropin-releasing factor receptor type 1 in energy homeostasis in mice. **Metabolism** 62:1739-1748, 2013.
  - 4) Inoue T, Kobayashi K, Inoguchi T, Sonoda N, Maeda Y, Hirata E, Fujimura Y, Miura D,