

201324012B

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業
(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23～25年度 総合研究報告書

研究代表者 柳 瀬 敏 彦

平成26年5月

目 次

I. 序文	1
II. 研究班構成員名簿	5
III. 総合研究報告書	9
研究代表者 福岡大学医学部内分泌・糖尿病内科	
	柳瀬 敏彦
IV. 総合分担研究報告書	43
(1) 疫学・診断基準	45
1. 全国疫学調査	47
	三宅 吉博・柳瀬 敏彦
2. 副腎偶発腫長期予後調査	50
東邦大学医学部内科学糖尿病・代謝・内分泌分野	
	上芝 元
3. 本邦における先天性副腎酵素欠損症全国疫学調査のサブ解析 および 21 水酸化酵素欠損症の追加予後調査	59
旭川医科大学小児科	
	棚橋 祐典
(2) 先天性副腎酵素異常症の生化学的・遺伝学的診断システムの確立	65
4. 尿中ステロイドプロファイル分析によるステロイド産生異常症鑑別診断法の確立	67
慶應義塾大学医学部小児科	
	長谷川奉延
5. 先天性 ACTH 不応症の分子遺伝学的、臨床的解析	74
国立成育医療研究センター研究所 分子内分泌研究部	
	勝又 規行
6. 先天性副腎疾患に関する研究	77
北海道大学大学院医学研究科小児科学分野	
	田島 敏広

(3) 副腎ステロイド産生機構の基礎研究	83
7. 副腎皮質の発生初期過程に関する研究	85
九州大学大学院医学研究院性差生物学（分子生物学）分野	
	諸橋憲一郎
8. ステロイド産生細胞分化・再生に関する研究	90
福井大学医学部分子生体情報学領域	
	宮本 薫
9. ステロイド産生異常症の臨床研究並びに再生ステロイド産生細胞に関する 基礎的研究	95
福岡大学医学部内分泌糖尿病内科	
	柳瀬 敏彦
10. 副腎皮質ステロイド合成酵素関連遺伝子発現調節に関与する転写因子の解析	106
高知大学臨床医学部門、同医学部内分泌代謝・腎臓内科	
	岩崎 泰正
11. 正常および腫瘍性副腎組織における Metabotropic Glutamate Receptors type 3 (mGLUR3) および Purkinje Cell Protein 4 (PCP4)発現の検討	108
東北大学大学院医学系研究科病理診断学分野	
	笹野 公伸
(4) 原発性アルドステロン症に関する研究	117
12. 原発性アルドステロン症の新規診断法の開発と腎機能障害の合併に関する研究	119
東北大学病院 腎・高血圧・内分泌科	
	佐藤 文俊
13. 原発性アルドステロン症に関する調査研究	126
京都大学大学院医学研究科 糖尿病・内分泌・栄養内科	
	曾根 正勝

14. 原発性アルドステロン症の診断(副腎静脈サンプリング), 薬物治療, 遺伝子発現調節機構	132
金沢大学大学院医薬保健学総合研究科臓器機能制御学(内分泌代謝内科)	
	武田 仁勇
15. 本邦アルドステロン産生腺腫における KCNJ5 遺伝子変異の特徴	139
群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科学	
	山田 正信
16. 原発性アルドステロン症の全国調査、新たな診断法と手術法の開発、 および遺伝子異常による病態解析	145
横浜労災病院 内分泌・糖尿病センター	
	西川 哲男
17. 原発性アルドステロン症の効率的スクリーニング法と新しい病態生理の解析	154
大分大学医学部内分泌代謝・膠原病・腎臓内科学講座	
	柴田 洋孝
18. 原発性アルドステロン症の診断と治療に関する検討	156
国立病院機構京都医療センター内分泌代謝内科	
	成瀬 光栄
(5) GC 抵抗症の病態理解のための GC 作用機構の研究	161
19. 骨格筋量・筋力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	163
東京大学医科学研究所附属病院抗体・ワクチンセンター免疫病治療学分野、 同 アレルギー免疫科	
	田中 廣壽
(6) その他の副腎腫瘍の成因や病態に関する研究	169
20. サブクリニカルクッシング症候群患者の長期予後調査および血管機能評価	171
九州大学大学院医学研究院病態制御内科学	
	高柳 涼一

21. 原発性アルドステロン症に対するミネラルコルチコイド拮抗薬の有用性の検討と
悪性褐色細胞腫に対する CVD 療法の有用性の検討 178
聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院 代謝・内分泌内科

方波見卓行

V. 会議記録..... 185

VI. 研究成果の刊行に関する一覧表..... 191

I. 序 文

序 文

平成23-25年度の3年間、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きました。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。本研究班では、原発性アルドステロン症(PA)、副腎低形成(アジソン病)、副腎酵素欠損症、グルココルチコイド(GC)抵抗症、偽性低アルドステロン症を重点疾患として指定いただきましたが、稀少性故に臨床研究が極めて困難な疾患群もあり、本分野全体が抱える問題点やニーズも勘案して、研究を推進いたしました。また、この分野で過去、欠落していた疾患予後の解明を主たる研究目標に掲げました。

前任の藤枝班では上記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)。その時の二次調査の回収率が30%にとどまった疾患に関して延長追加調査を行い、最終的に原発性アルドステロン症(PA)1706例、サブクリニカルクッシング症候群(SCS)390名、アジソン病146名の再解析を行いました。調査期間が2003-2007年という限定はありますが、特記すべき点としては、PAにおける高血圧、低K血症の改善予後に関しては多変量解析の結果、薬物療法に比べ、手術療法の統計学的優位性が明らかとなり、またSCSにおいて、副腎腫瘍径3.5cm以上が高血圧の予後不良因子となることを明らかにいたしました。これらの疫学データは、当該分野では、我が国最大規模のデータとして、今後の診療・治療指針作成上、重要な参考資料として活用が期待されます。また、平成25年度には、平成11-15年当時、当班で集積された副腎偶発腫瘍3,678症例の10年後予後調査を施行し、本年度、中間報告をさせていただきました。しかしながら、いまだ、調査票の回収率が不十分で、次年度以降の調査延長、最終解析を計画しております。本研究班では、その他にも、基礎、臨床研究の両面で、この分野の新しい医療の発展、展開に繋がるような新知見が、数多く明らかにされています。ご一読、ご批判、賜れば幸いに存じます。

平成24年度、25年度には、副腎疾患に関する市民公開講座を東京にて開催させていただき、患者会の皆様との交流の足場も出来ました。また、この3年間の班活動において、一般医家や専門医を対象とする副腎疾患に関するシンポジウムも2回ほど、開催させていただき、この分野の啓蒙活動にも多少とも貢献できたものと自負しております。

最後に、本研究班の研究目標の達成に向けてご尽力いただいた研究分担者の皆様、また、大変、ご多忙の中、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た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26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

副腎ホルモン産生異常に関する調査研究班

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
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性差生物学	主幹教授
	宮本 薫	福井大学医学部分子生体情報学	教授
	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	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 光栄	独立行政法人国立病院機構京都医療センター 臨床研究センター 内分泌代謝高血圧研究部	副センター長、部長
	長谷川 奉延	慶應義塾大学医学部小児科	教授
	田島 敏広	北海道大学大学院医学研究科小児科学	講師
	勝又 規行	独立行政法人国立成育医療研究センター研究所 分子内分泌研究部基礎内分泌研究室	室長
	棚橋 祐典	旭川医科大学小児科学	助教
	西川 哲男	独立焼成法人労働者健康福祉機構横浜労災病院 内分泌糖尿病センター	院長
	柴田 洋孝	大分大学医学部・内分泌代謝・膠原病・腎臓内科学	教授
	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	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	高知大学教育研究部医療学系臨床医学部門 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分野	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
山田 正信	群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科学	教授	
方波見卓行	聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院代謝・内分泌科	准教授・部長	
三宅 吉博	福岡大学医学部衛生・公衆衛生学	准教授	
事務局		〒814-0180 福岡市城南区七隈7-45-1 福岡大学医学部内分泌・糖尿病内科（三小田玲子） TEL 092-801-1011（内3645） FAX 092-865-5163 e-mail reikos@fukuoka-u.ac.jp	
経理事務担当者		〒814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1 福岡大学研究推進部研究推進課（三村正彦） TEL 092-871-6631（内2824） FAX 092-866-2308 e-mail suisin@adm.fukuoka-u.ac.jp	

Ⅲ. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）

平成23～25年度 総合研究報告書

副腎ホルモン産生異常に関する調査研究

主任研究者 柳瀬 敏彦

福岡大学医学部 内分泌・糖尿病内科教授

研究要旨

全国疫学調査に基づく原発性アルドステロン症(PA)及びサブクリニカルクッシング症候群(SCS)の予後解析の結果、PAにおける高血圧、低K血症の改善予後に関して薬物療法に較べ、手術療法の統計学的優位性が明らかとなった。治療の確実性の点において、片側性APA症例では、手術が望ましいことを本邦で初めて明確に示した。現在、片側性病変のPAに対しては、片側副腎全摘術が一般的であるが、超選択的副腎静脈サンプリングを施行し、分枝レベルでのAPA局在診断が得られた場合は、正常副腎を温存した腫瘍摘出術が可能であることが、2施設から報告された。一方で、本班の臨床研究で長期の抗アルドステロン薬の使用でPAが臨床的寛解に至るものが少なくないことも明らかになった。手術は完全治癒が期待できるが、抗アルドステロン薬が代替できるか否かは不明であり、今後の課題である。本班の共通目標として、PA診断、病型鑑別(腺腫、両側副腎過形成)に関して可能な限り、簡易化、標準化を目指す研究が続けられた。その方向性でPA診断に必要な負荷試験選別、PA病型診断における末梢血18-oxo-cortisol測定による腺腫、過形成鑑別、AVS症例選別のためのACTH負荷の有用性、AVS時の迅速コルチゾール測定開発キットの有用性を示す報告など目標達成に向けた多くの研究成果が集積された。PAの成因研究ではCYP11B2特異抗体を用いたPA腺腫のサブタイプ分類が提唱され、PA腺腫におけるKCNJ5遺伝子の高頻度の体細胞変異が明らかにされた。SCS診断基準における低濃度域の血中コルチゾール(F)値のキット間測定誤差による診断上の混乱を回避する手段として、1mgDSTにおける血中F値のカットオフ値を現行の $3.0\mu\text{g/dl}$ から米国内分泌学会提唱の $1.8\mu\text{g/dl}$ に引き下げる試案が提示された。診断基準としての採用は、今後の検討課題となった。またSCSの全国調査による予後解析において、副腎腫瘍径 3.5cm 以上がオッズ比2.28で高血圧の予後不良因子と判明した。今後、SCS診療指針作成時の手術適応として参考にすべき知見と言える。2003-07年の全国疫学調査の21-水酸化酵素欠損症を対象としたサブ解析としての予後調査では成人身長が報告され、GC補充に伴う本症患者における低身長が、男女とも初めて明らかとなった。幼小児期の過剰なGC補充療法の弊害を啓蒙する上で、重要な知見である。本班では難病、稀少疾患である先天性の副腎ステロイド産生異常症の病態、成因解明に努めており、本班で種々の遺伝子異常が明らかにされた。また、検査診断法も報告された。ステロイド作用機構の研究に端を発し、糖質コルチコイド誘発性筋萎縮の詳細な機序が明らかとなり、現在、治療をめざした自主臨床研究へと発展している。また、SF-1はステロイド合成酵素のみならず、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等の遺伝子も標的とすること、また、解糖系、コレステロール合成系など副腎組織の増殖維持に重要な役割を果たす酵素群をも標的としていることが判明した。副腎癌はSF-1高発現で、SF-1機能の抑制により増殖も抑制されるこ

とから、今後、副腎癌治療への応用研究も期待される。再生医療研究では、iPS細胞からのステロイド産生細胞再生の成功や間葉系幹細胞からのステロイド産生細胞の移植でマウス副腎不全モデルのレスキューが確認された。今後の医療応用を見据えた発展が期待される結果であった。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。

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 光栄：京都医療センター臨床研究センター部長

笹野 公伸：東北大学大学院医学系研究科病理診断学分野教授

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：金沢大学大学院医薬保健総合研究科臓器機能制御学准教授

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

山田 正信：群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科学教授

方波見卓行：聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院代謝・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：北海道大学大学院医学研究科小児科学講師

佐藤 文俊：東北大学病院腎・高血圧内分泌科講師

柴田 洋孝：大分大学医学部内分泌代謝・膠原病・腎臓内科学教授

棚橋 祐典：旭川医科大学小児科学助教

曾根 正勝：京都大学大学院医学研究科糖尿病・内分泌・栄養内科講師

三宅 吉博：福岡大学医学部衛生・公衆衛生学准教授

A. 研究目的

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。我が国で欠落している疾患予後調査を当班研究の柱に据え、以下の臨床、基礎研究を推進した。

- 1) 全国疫学調査：各種副腎疾患の治療に伴う予後の調査を計画・施行・解析(H23-24)、並びに副腎偶発腫の長期(10年)予後の調査の計画・施行・解析する(H24-25)
- 2) 診断システムの確立を含む先天性ステロイド産生異常症に関する研究
- 3) サブクリニカルクッシング症候群(SCS)の診断基準改定のための臨床研究
- 4) 原発性アルドステロン症(PA)研究
- 5) その他の副腎腫瘍の病態に関する研究

- 6) ステロイド合成・作用機構に関する研究
- 7) ステロイド産生細胞再生研究

B. 研究方法

1) 全国疫学調査

- (1) SCS, PAの治療予後解析：H22年解析の全国疫学調査(2003-07年対象)で二次調査の回収率が30%にとどまったPA、サブクリニカルクッシング症候群(SCS)に関して1年間の延長、追加解析を行い、予後の解析を行った。統計解析は疫学専門の三宅氏(分担研究者)が担当した。
- (2) 副腎偶発腫10年予後調査：H11-15年当時、当班で集積された副腎偶発腫瘍3,678症例(副腎癌50例、非機能性腺腫1868例、コルチゾール産生腺腫386例含む)の10年後、長期予後調査を計画、施行し、H25年度に中間解析を行った(上芝、柳瀬H24,25)。
- (3) 21-水酸化酵素欠損症(21OHD)の予後に関する全国調査：21OHDの長期的な治療予後は不明。また、女兒の外性器異常の予防として、出生前診断および母体へのデキサメサゾン(Dex)投与による出生前治療の有効性が報告されているが、胎児期のGC曝露が出生後に与える長期予後も不明。2003年-07年の全国疫学調査の二次調査で回答が得られた633例の21OHDについて成人身長、肥満、GC投与量の実態と高血圧、耐糖能異常、骨粗鬆症の発症等に関する予後調査を計画。21OHD罹患者の出生前診断の実態調査も計画(棚橋H23,25)。

2) 診断システムの確立を含む先天性ステロイド産生異常症に関する研究

先天性副腎過形成、先天性副腎低形成等の先天性疾患の成因、病態研究、診断システムの確立をめざした。

- (1) 尿ステロイド代謝物による先天性副腎疾患の診断法の開発：新生児期の種々のステロイド産生異常症を尿ステロイド代謝物あるいは代謝物比により診断する方法の確立を試みた(長谷川H23-25)。
- (2) 21OHDの17OHP(17 α -ヒドロキシprogesteron)測定法の検討：新生児期スクリーニングの17-OHP測定は偽陽性が多いため、LC-MS/MS法による測定を検討(田島H23)。
- (3) 先天性副腎疾患の遺伝子解析：全国調査における副腎低形成の遺伝子異常に関する実態報告(棚橋)、Allgrove症候群(ACTH不応症、無涙症、アカラシアが三徴)5症例のAAS遺伝子解析、SCC欠損症のCYP11A1遺伝子解析、ACTH不応症のMC2R(ACTH受容体)遺伝子解析(勝又)、アルドステロン欠損症のCYP11B2解析を施行(田島H24)。
- (4) 21-OHDの治療指針改訂のための調査研究：1999年の治療指針の改訂に向けて、小児内分泌学会評議員156名を対象に、21OHDの初期ならびに維持GC療法に関するアンケート調査を施行(田島H25)。

3) 副腎性サブクリニカルクッシング症候群(SCS)に関する研究

- (1) SCSの予後：九大、福大共同の施設研究として副腎性SCS患者の長期予後を調査(柳瀬、高柳H24)。

(2) SCS診断基準改定案：福大と九大の副腎腫瘍119例[従来の診断基準下で非機能性95例、SCS24例]を対象に、SCSの診断基準案の作成を試みた。低濃度域の血中コルチゾール(F)値のキット間測定誤差による診断上の混乱を回避する手段として、1mgDSTにおける血中F値のカットオフ値を現行の $3.0 \mu\text{g/dl}$ から米国内分泌学会提唱の $1.8 \mu\text{g/dl}$ に引き下げて検討した(柳瀬、高柳H25)。

4) 原発性アルドステロン症(PA)研究

(1) アルドステロン産生微小腺腫の病態解明：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(small size APA)の病態解明のため、40名のAPAの腫瘍サイズとステロイド合成酵素の関係について免疫組織化学的検討を行った(佐藤H24,25)。

(2) 特発性アルドステロン症(IHA)の発症機序の研究：特発性アルドステロン症(IHA)患者ではBMI高値例が多く、病因として脂肪由来液性因子の関与を検討。血清のアルドステロン合成酵素CYP11B2転写活性および培地中アルドステロン分泌能への影響をH295R細胞を用いて検討(柴田H24)。

(3) PA診療の標準化に向けた臨床研究：PAを一般医家診療でも簡易に診断していくための診断指針の提示に向けた種々の臨床研究が試みられた。PAの絶対診断はAVSあるいは手術病理所見に基づいた。ACTH負荷によるPACの反応性の差異からAPAとIHAを鑑別する研究(曾根H23)、内服降圧薬の種類によるARRへの影響の検討(柴田H23,柳瀬H24)、LCMS/MSを用いた末梢血18-oxocortisol(18-oxoF)濃度測定によるAPA,IHA鑑別の試み(佐藤：H23)、PA診断に必要な機能確認検査の種類に関する検討(成瀬：H23)、迅速ACTH試験と生食負荷試験による片側性あるいは両側性PAの鑑別の検討(成瀬H25)等が行われた。

(4) PAにおける先端的診療：AVS時に副腎静脈分枝レベルの採血による超選択的副腎静脈サンプリング(SSAVS)を試み(西川、佐藤H23-25)、病巣摘出と正常副腎温存を行い、その成績を評価した。

(5) PAにおける薬物療法の効果：PAが薬剤(スピロノラクトン及びエプレレノン)で寛解状態に至ることが可能かどうか、効果検証を行った(武田、方波見H24)。

(6) PA術後の副腎機能、腎機能評価

・片側副腎摘除術後の副腎予備能変化：片側副腎摘除は副腎機能に影響しないとされるが、エビデンスはない。APA患者の片側副腎摘除術前後の副腎皮質機能の変化について評価。PA14名において、術前後のコルチゾール・ACTHの基礎値とACTH刺激試験での副腎予備能を比較した(曾根H25)。

・PA術後の腎機能悪化の予知因子：PAでは循環血漿量の増加で糸球体過剰濾過を伴い、副腎摘出後に腎機能が悪化する事がある。悪化予知因子を検討した(成瀬H25)。

(7) PAにおけるKCNJ5、ATPaseの体細胞変異の意義に関する研究：近年、アルドステロン産生副腎腺腫(APA)の病因としてKCNJ5、ATP1A1、ATP2B3遺伝子などの体細胞変異が報告されているが、本邦における陽性率や臨床所見との関連性は不明である。APA摘出術を受けた

患者を対象に、組織体細胞変異と種々の臨床指標との関連を検討した(西川、山田、柴田、佐藤H24,25)。

5) その他の副腎腫瘍の病態に関する研究

- (1) 副腎腫瘍におけるCYP11B遺伝子のメチル化制御：各種副腎腫瘍におけるコルチゾール、アルドステロン産生能とCYP11B1,2の遺伝子制御の関連を検討(武田H25)。
- (2) 各種機能性副腎腫瘍における非侵襲的血管機能評価：PA、クッシング症候群(CS)、褐色細胞腫の心血管病リスクを非侵襲機能検査で評価した(高柳H25)。
- (3) CSにおけるPA合併頻度：CS、SCSにおけるPA合併頻度と高血圧成因として合併PAの関与の可能性を検討(西川H25)。
- (4) ヒト副腎組織における各種蛋白発現に関する研究：近年、報告されている副腎関連の種々の蛋白発現を検討(笹野H23-25)。

6) ステロイド合成・作用機構の研究

- (1) GC誘発性筋萎縮の機序解明：GC誘発性筋萎縮をGR標的遺伝子、蛋白異化、同化の観点から明らかにする(田中H23-25)。
- (2) Ad4BP/SF-1(SF-1)の新規標的遺伝子の同定とその機能解析：ChIP-sequence法によりステロイド産生細胞におけるSF-1の標的遺伝子を同定(諸橋H23-25)、あるいは間葉系幹細胞からステロイド産生細胞への分化誘導系における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標的遺伝子同定し、その機能を解析した(宮本H23-25)。
- (3) CYP11B2とACTH受容体関連蛋白Mrapの発現調節機構の解明：副腎皮質のACTH受容体であるMC2Rが機能発揮には、受容体関連蛋白Mrap (melanocortin 2receptor accessory protein; Mrap)の存在が必須である。CYP11B2ともどもその発現調節機構を検討した(岩崎H24-25)。

7) ステロイド産生細胞再生研究

- (1) 間葉系幹細胞由来ステロイド産生細胞再生と移植研究：ヒト間葉系幹細胞にSF-1を導入し、未解明のアルドステロン産生能を検討(柳瀬H23)。副腎再生医療のための基盤研究として、C57BL/6マウス脂肪組織より調整した間葉系幹細胞にヒトSF-1cDNAを含むレンチウイルスベクターまたは空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、両側副腎摘出マウスの腎皮膜下に細胞移植しマウス生存能を検討した(柳瀬H25)。
- (2) ヒトES/iPS細胞由来ステロイド産生細胞：ヒトES/iPS細胞を中胚葉系に分化誘導し、SF-1導入し作成を試みた(H24曾根)。

(倫理面への配慮) 疫学研究および遺伝子解析研究では各倫理指針を遵守した。必要な場合には、各研究施設において倫理委員会や臨床研究審査会の承認を得て行った。実験動物を用いる研究では各研究施設の指針に則り、動物愛護の精神の下に行った。

C. 研究結果

1) 全国疫学調査

- (1) PA、SCSの治療予後解析：PAにおける高血圧、低カリウム血症の改善予後に関して多変量解析の結果、薬物療法に比べ、手術療法の統計学的優位性が示された(表1)。またSCSにおいて、副腎腫瘍径3.5cm以上がオッズ比2.28で高血圧の予後不良因子と判明した。

表1 アルドステロン産生腺腫における治療と予後に関する多変量解析

	血圧		低カリウム血症	
	補正 オッズ比 *	補正 オッズ比 **	補正 オッズ比 ***	補正 オッズ比 ****
手術	0.44 (0.28-0.70)	0.47 (0.29-0.77)	0.16 (0.10-0.25)	0.17 (0.11-0.29)
薬物	1.28 (0.83-2.01)	1.13 (0.72-1.81)	1.17 (0.70-2.00)	1.18 (0.68-2.09)

*手術と薬物療法を相互に補正 (N = 791) **性別、年齢、手術、薬物療法を補正 (N = 739)

手術と薬物療法を相互に補正 (N = 808) *性別、年齢、手術、薬物療法を補正 (N = 750)

- (2) 副腎偶発腫の10年後予後調査(中間解析)：H11-15年当時、当班で集積された副腎偶発腫瘍3,678症例(副腎癌50例、非機能性腺腫1868例、コルチゾール産生腺腫386例含む)の10年後、長期予後調査を計画、アンケート形式の調査票を送付し、回収できた分に関して、H25年度に中間解析を行った(上芝、柳瀬H24,25)。今回の追跡調査の結果、1841例(回収率50.1%)の報告を受けた。男性942例、女性873例、未報告26例であった。平均年齢58.1±13.0歳で、病型別では非機能性腺腫53.7%と半数以上を占め、SCSを含むコルチゾール産生腺腫11.9%、褐色細胞腫7.8%、アルドステロン産生腺腫5.0%の順で前回調査と同様であった。副腎腺腫全体では71.6%に達し、副腎癌は1.5%であった。転帰の報告を受けたのは1276例で、継続25.4%、転院9.6%、追跡不可58.6%、死亡6.3%であった。死亡として報告された81例のうち、死因の報告があった76例の内訳は心血管障害15.8%、脳血管障害9.2%、副腎癌以外の癌46.1%、その他28.9%で、死因の1/4は心・脳血管障害であった。より詳細な予後解析には症例数が足りず、延長解析とした(上芝、柳瀬)。(上芝、三宅、柳瀬H24-25)。
- (3) 21OHDの予後解析(身長)：2003-07年の全国疫学調査の21-OHDを対象としたサブ解析としての予後調査では成人身長の現状が報告され、GC補充に伴う本症患者における低身長傾向が、男女とも初めて明らかとなった(棚橋H23)。
- (4) 21OHDの予後に関する全国調査：高血圧、耐糖能異常、インスリン抵抗性、骨粗鬆症、不妊原因の副腎遺残腫瘍の調査のため、また出生前診断が行われた21OHDの予後調査に関

する調査票が作成された(棚橋H25)。

2) 先天性ステロイド産生異常症の研究

- (1) 尿ステロイド代謝物による先天性副腎疾患の診断法の確立：乳児～小児 5α -reductase欠損症(5α RD)における 5α THF/ 5β THF、 5α THE/ 5β THEの有用性が示され、新生期 5α RDの診断基準として、「 5α / 5β THE比生後21日以降1%タイル値未満、生後7日→21日の 5α / 5β THE上昇倍率3倍未満の2点を満たす」を条件とする仮診断基準を提唱した(H23)。 3β HSDDの診断指標候補は $\Delta 5$ ステロイド代謝物であったが、 $\Delta 5$ 代謝物による診断では、胎生皮質由来 $\Delta 5$ が著明に増加する21OHDとの鑑別が困難であった。 $\Delta 5$ / $\Delta 4$ 代謝物和の比は、 3β HSDDの永久皮質の $\Delta 5$ と $\Delta 4$ ステロイド比の増加を検出しにくい指標と結論した(長谷川H25)。
- (2) 21-OHDの17OHP測定：LC-MS/MS法では早産児21OHDでも17-OHPが高値を示す。現時点ではLC-MS/MS法は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結論(田島H23)。
- (3) 先天性副腎疾患の遺伝子解析：全国疫学調査において57例の先天性副腎低形成の内訳で、DAX-1、SF-1、MC2Rなどの既知遺伝子変異のほか、変異なしも16例報告され、本症にはなお病因不明の病態が存在することが明らかとなった(棚橋H24)。思春期、二次性徴が自然発来したコレステロール側鎖切断酵素(SCC)欠損症の女兒にCYP11A1変異を見出し、発現解析でSCC残存活性を証明した。SCC欠損症の二次性徴発現が初めて明らかとなった(勝又H24)。Allgrove症候群の5家系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、過去、報告のなかった特徴が明らかにされた(勝又H23)。アルドステロン合成酵素欠損症は過去、日本人では証明されていなかったが、日本人小児2例でCYP11B2変異が初めて明らかとなった(田島H24)。3例の先天性ACTH不応症のMC2R遺伝子解析で、1例は複合ヘテロ性変異、2例でホモ接合性変異(1例は新規)が同定された。MC2R変異による先天性ACTH不応症は、出生直後から低血糖症状を示すこと、電解質は正常でもPRAが軽度高値となることが明らかになった(勝又H25)。
- (4) 21OHDの治療指針作成のための調査研究：初期治療の回答は、40人(回収率25.6%)、維持療法の回答は31人(回収率19.8%)であった。新生児の初期治療に関して、塩喪失症状なしの場合のHCの投与量は、治療指針の通り100～200mg/m²/日が20/40人と半数を占めたが、50～100mg/m²/日が13人、20～50mg/m²/日が6人と少量から開始する施設も半数あった。維持療法の幼児期のHC量は、治療指針通りの15～30mg/m²/日は16/31人と半数を占めたが、海外の推奨量10～15mg/m²/日も10人みられた。一般に不要とされる精神的ストレス時の増量も見受けられた。以上の結果から、先天性副腎過形成症の治療の標準化を提唱する(田島H25)。

3) 副腎性サブクリニカルクッシング症候群(SCS)に関する研究

- (1) 副腎性SCSの長期予後：SCS患者の追跡調査により高血圧や糖尿病例では、腫瘍摘出によ

り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(柳瀬、高柳H24)。

(2) SCS診断基準改定案：現在のSCS診断基準項目の中で¹⁾ACTH基礎値10pg/ml未満²⁾日内リズムの消失(夜間コルチゾール(F)値 $5.0 \mu\text{g/dl}$ 以上)³⁾ACTH分泌刺激試験(CRH負荷)の低反応の3項目に関して、1mg DST $1.8 \mu\text{g/dl}$ 未満で上記1),2)を満たす症例は一例も認めなかったことから、上記3項目はSCSの鑑別条件として有用と判断した。1mgDST F値 $1.8 \mu\text{g/dl}$ 以上を必須項目として1)と3)あるいは2)と3)を満たせばSCSとする案を作成した。高血圧、耐糖能異常、高コレステロール血症の頻度との関連性を検討した結果、耐糖能異常を高率に検出した。統計学的にも1mg DST後の血中F値は単変量、多変量解析の何れにおいても耐糖能異常と有意の関連性を示し、本診断基準案の適用による耐糖能異常の検出において、感度86%、特異度73%、正確性78%と適切な統計学的数値を示した。現行の1mg DSTのカットオフ値を引き下げても、他条件の設定により臨床的に意味のあるSCSを診断することは可能と考えられた(柳瀬、高柳H25)。

4) PAに関する研究

(1) アルドステロン産生微小腺腫の病態解明：40例のPA中、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。切除標本上での最大腫瘍面積と術前の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。CTで描出し得ない微小なAPAでも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、加療対象となる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(佐藤H25)。

(2) 特発性アルドステロン症(IHA)の発症機序に関する研究：IHA患者血清は、CYP11B2-luciferaseレポーター活性および培地中アルドステロン濃度を有意に上昇させた。CTから算出した内臓脂肪面積と有意な相関を認めた。以上からIHAの成因として、内臓脂肪由来のCYP11B2活性化因子が関与する可能性が示唆された(柴田H24)。

(3) PA診療の標準化に向けた臨床研究：PAを一般内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)患者では正常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)が有意に高値であった。PA疑い患者の中からAPA患者を選別するのに有用と考えられた(曾根H24)。生食負荷試験において現行の2L/4時間ではなく、1L/2時間においても施行可能であることを示した(成瀬H24)。臨床的にPAを強く疑われる症例は、内服降圧薬の種類を問わずARR >200 を満たすことが多く、ARR測定を行う意義が高いと報告された(柴田H23)。糖尿病合併高血圧患者124例におけるPA頻度を検討したところ、14例(11,3%)と高率のPAの合併を認め、PA合併糖尿例では高血圧が糖尿病より先行する症例が多いことを明らかにした(柳瀬H24)。末梢血の18-oxoF濃度をAVSの成績と比較検討した結果、IHAとAPAの鑑別に有用であった(佐藤H24)。PA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・局在診断検査が可能と考えられた(成瀬：H24)。PA病型の鑑別診断法として、迅速ACTH試験では、一側性PAの最

適カットオフ値はACTH負荷後頂値PAC403pg/mlであった。一方、生食負荷試験では一側性群の4時間後PACは両側性群と比して有意に高値で、一側性PAの最適カットオフ値はPAC4h>110pg/mlであった。迅速ACTH試験と生食負荷試験はいずれもPAが一側性か両側性かの鑑別にも有用であった(成瀬H25)。AVSにおいて、迅速判定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H24)。

(4) PAにおける先端的診療：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)。超選択的副腎静脈サンプリング(SSAVS)による両側腫瘍性病変と過形成の鑑別にに基づき施行する正常副腎温存両側副腎手術の成否を検討した。PA299例中29例(21.6%)が術前CTで病変を指摘し得なかったmAPA、5例(3.7%)が両側APAと診断。両側APA5例中4例は1期的両側副腎手術、1例は2期的手術を施行した。5例中3例は術後に全ての降圧薬を中止、正常血圧を維持している。SSAVSによる両側腫瘍性病変と過形成の鑑別に基いて施行する正常副腎温存両側副腎手術により、両側APAの病態は治癒可能と考えられた(佐藤H24-25)

(5) PAにおける薬物療法の効果検討：

・臨床的寛解率：PA患者92例にスピロノラクトン(SP) (n=47)及びエプレレノン(EPL) (n=42)を投与し、完全寛解(CR)及び部分寛解(PR)について検討した。CRの指標は3カ月間SPまたはEPLの服薬休にてPAC/PRA(ARR)<200、負荷試験陰性、正K血症、正常血圧とし、PRはARR<200、負荷試験陰性、正K血症、高血圧とした。SP投与群(平均投与 期間4.8年)ではCR 5例(11%)、PR4例(9%)であった。寛解(+)群と寛解(-)群で年齢、血圧、ARR、PAC、PRA、投与量、投与期間において有意の差を認めなかった。EPL投与群(平均投与期間3.1年)ではCRはなし、PR 4例(8%)であった。PR群は非PR群に比べARRが有意に高値であった。寛解率の成績は従来の報告よりSP投与群、EPL投与群とも高く、APAにおいても寛解が観察された(武田H24)。

・MR拮抗薬(MRB)の効果検証：PAに対しMRBを主体する降圧治療(M群)を施行した場合の治療効果を臨床的活動性指標としてAldosterone Resolution Score (ARS)を用いて検討した。M群(43例)と片側APAの摘出手術を行った群(O群) (16例)の高血圧罹病期間、血圧、介入前のPAC、PRA、ARRに差はなく、M群の血清Kは有意に低値、eGFRは有意に高値だった。両群の介入後の血圧、降圧薬の数、血清KとeGFRに差はなかった。局在不明のPAはMRBを主体とする治療を平均約47週行い、比較的良好な降圧とeGFRの改善が得られ、効果は手術と同等だった。ARSが3点程度の例ではMRBを主体とした降圧治療で手術と類似の降圧と腎機能改善が得られる可能性がある(方波見H24)。

(6) PA術後の副腎機能、腎機能評価：

・片側副腎摘除術後の副腎予備能の変化：全例ともPA術後に明らかな副腎不全症状は示さなかった。術後2週間後において、コルチゾール基礎値は術前に比べ有意変化を認めず、ACTH基礎値は有意な上昇を認め、ACTHの上昇がその代償機構として働いていると考えられた。ACTH刺激試験ではコルチゾールの頂値は術前に比べ全例で低下し、コルチゾー

ル血中濃度一時間曲線下面積(AUC)も有意な低下を認めた。術後1年後の観察でも同様の結果であった。本研究により、片側副腎摘除術の安全性が示されたが、術後は術前と同等の副腎予備能を保持できないことも判明した。術後の軽度の副腎予備能の低下はストレスへの対応力や高負荷時の身体能力に影響する可能性もある。PAの治療法として片側副腎摘除術か薬物療法かを選択する際に認知しておくべき事と考えられた(曾根H25)。

- ・PA術後の腎機能悪化の予知因子：副腎摘出術を施行した一側性病変のPA患者45名を対象に術後1ヶ月のeGFR $<60\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ を術後腎機能悪化とし、術前の関与因子を解析した。88.9%(40/45名)で術後にeGFRが低下し、37.8%(17/45名)で術後腎機能悪化(eGFR <60)を認めた。ロジスティック回帰分析により、術前eGFR($p<0.0001$)、年齢($p=0.008$)、服用降圧薬数($p=0.0027$)、ARR($p=0.0351$)が術後腎機能悪化と有意な関連を示した。術前eGFRで調整するとARRのみ術後腎機能悪化と有意な関連性を示し、ROCによるカットオフ値の検討でARR：3050が感度58.8%、特異度82.1%であった。PA術後は腎機能悪化を認める頻度が高く、eGFR、年齢、降圧薬数、ARRが予知因子になりうる。術前に患者への十分な説明と共に、ARR高値例では器質的な腎機能障害の進行予防のため早期診断、治療が望まれる(成瀬H25)。

- (7) PAにおけるKCNJ5、ATPaseの体細胞変異の意義に関する研究：各施設の多数例のAPA解析の結果、約70%と高率にKCNJ5変異を同定し、変異群ではACTHに対する反応性が非変異群に比して過大との特徴を明らかにした(西川H24、山田H24、柴田H25)。さらに同変異を伴うAPAでは非変異例に比して、アルドステロン産生能が強く、より重症型であった(山田H24)。コルチゾール自律分泌を伴うAPAもKCNJ5変異を有した(山田H25)。APA88例の解析結果では、KCNJ5遺伝子変異をもつAPA(K群)62例(70.5%)、ATPase遺伝子変異をもつAPA(A群)3例(3.4%)、変異のないAPA(W群)23例(26.1%)であった。K群はW群に比し年齢が若く高血圧罹病期間が短く、PACが高かったが、左室心筋重量係数はK群とW群は同程度の心肥大が認められた。術後両群の血圧の改善度は同等であった。PAは心血管合併症が多く、早期治療が望まれる(西川H25)。KCNJ5変異陽性例では、陰性例と比べて、血清K値の低値、PACの高値、経口食塩負荷24時間尿中アルドステロン排泄量の高値、24時間尿中18OHF値の高値を認めた。KCNJ5変異陽性のAPAは腺腫内CYP11B2とCYP11B1の高発現を認め、24時間尿中18-OHFと変異の関連が示唆された(柴田H25)

5) その他の副腎腫瘍に関する研究

- (1) 副腎腫瘍におけるCYP11B遺伝子のメチル化制御：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