

図2 病型別グルココルチコイド補充療法(種類)

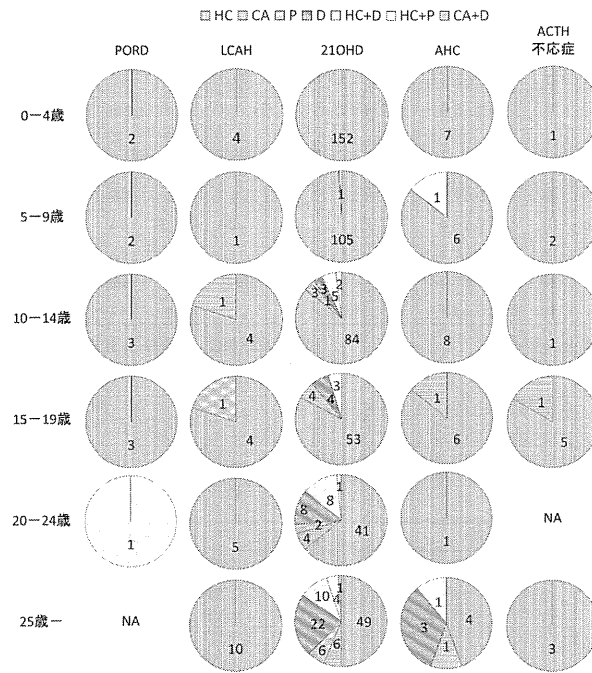
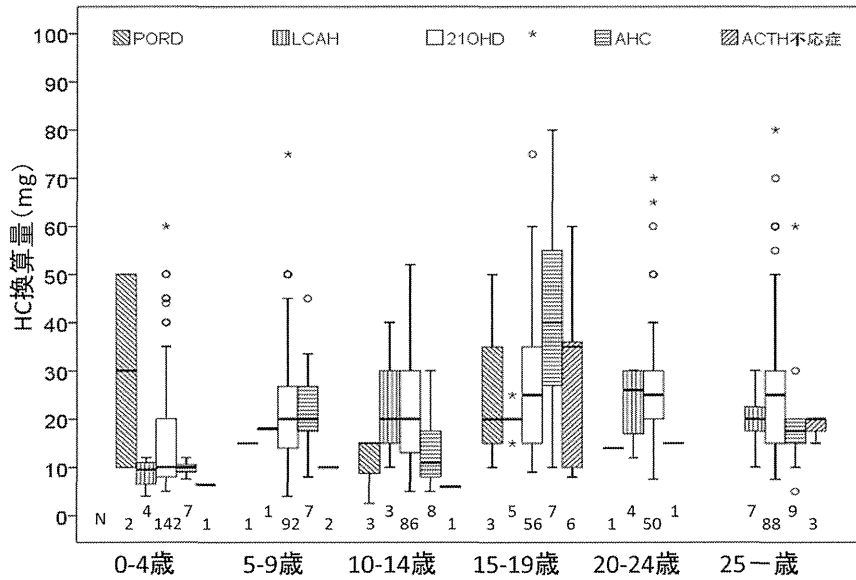


図3 病型別グルココルチコイド補充療法(投与量)



**(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**

# 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

研究分担者 長谷川 奉延 慶應義塾大学医学部小児科学教室 教授

## 【研究要旨】

ガスクロマトグラフ質量分析(GCMS)による尿ステロイドプロファイルを用いた、新生児～小児期ステロイド産生異常症鑑別診断法について検討した。H23)乳児・小児5 $\alpha$ -還元酵素欠損症診断においては、6種の尿中5 $\alpha$ /5 $\beta$ 代謝物比のうち、5 $\alpha$ -tetrahydrocortisone(THE)/5 $\beta$  THE および5 $\alpha$ -tetrahydrocortisol(THF)/5 $\beta$  THFを指標としカットオフ値を設定、高精度で診断可能であることを確認した。H24)新生児・乳児非古典型を含む21-水酸化酵素欠損症とP450オキシドレクターゼ異常症の鑑別診断においては、pregnanetriolone/5 $\alpha$  THE+5 $\beta$  THE比と11-hydroxyandrosteroneを指標としカットオフ値を設定、高精度で鑑別診断可能であることを確認した。H25)新生児3 $\beta$ -水酸化ステロイド脱水素酵素欠損症鑑別診断においては、 $\Delta$ 5ステロイド8種を指標候補として選択した。

## 共同研究者

本間桂子 (慶應義塾大学病院中央臨床検査部)

小山雄平 (慶應義塾大学医学部臨床検査医学)

## A. 研究目的

### 1. 背景

外陰部異常を伴うステロイド産生異常症の鑑別診断は、新生児・乳児期早期に行う必要があるが、生化学的な診断基準は確立されていない。汎用されている免疫化学的ステロイド測定法は、簡便かつ高感度である一方、1) 未知のステロイドが大量に共存するステロイド産生異常症や新生児の生体試料においては、交差反応により偽高値を呈するため診断特異性に問題があること、2) 新生児期基準範囲や診断カットオフ値が設定されていないため判定できないことなどが指摘されている。われわれは、以前より感度・特異性の高いGCMSによる尿ステロイドプロファイル検査を用いた、新生児・乳児期早

期における外陰部異常を伴うステロイド産生異常症の鑑別診断基準設定を試みてきた。

### 2. 研究目的

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。

【H23】 乳児・小児5 $\alpha$ -還元酵素欠損症 (5 $\alpha$  RD) の診断指標選択とカットオフ値設定

【H24】 新生児・乳児非古典型を含む21-水酸化酵素欠損症 (21OHD) とP450 オキシドレクターゼ異常症 (PORD) の鑑別指標選択とカットオフ値設定

【H25】 新生児3 $\beta$ -水酸化ステロイド脱水素酵素欠損症 (3 $\beta$  HSDD) の診断指標選択

## B. 研究方法

【H23】 46、XY DSD 5 $\alpha$  RD 13例、46、XY DSD 非5 $\alpha$  RD95例、対照男児1256例について、6種の尿中5 $\alpha$ /5 $\beta$ 代謝物比の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。

【H24】 臨床症状および/あるいは17OHPマスキリーニング陽性を端緒に尿ステロイドプロフィール分析したC21OHD55例、NC21OHD9例、PORD18例、一過性高17OHP血症（TH17OHP）57例および対照(C)2473例。日齢0～149日。在胎23-41週について、1) pregnanetriolone /5 $\alpha$ および5 $\beta$  tetrahydrocortisone 比（Ptl/THEs）によりC21OHD+NC21OHD+PORDをTH17OHP+Cと鑑別、2) 11-hydroxyandrosterone (11OHA<sub>n</sub>)によりC21OHD+NC21OHDをPORDと鑑別した場合の感度特異度を求めた。

【H25】 性染色体異常を除き全例遺伝子解析により確定した未治療のC3 $\beta$  HSDD、C21OHD、PORD、DSD新生児と健常対照について、 $\Delta$ 5ステロイド代謝物13種および $\Delta$ 5/ $\Delta$ 4代謝物比の比2種（DHEA系、17OHPregnenolone系）についてC3 $\beta$  HSDDとその他3疾患の間のオーバーラップの有無を検討した。

（倫理面への配慮）

患者の保護者または本人の同意を得た。

## C. 研究結果およびD. 考察

【H23】 診断精度の高い5 $\alpha$ /5 $\beta$ 代謝物比は、5 $\alpha$  THF/5 $\beta$  THF、5 $\alpha$  THE/5 $\beta$  THE で、感度100%、特異度99%であった。乳児～小児5 $\alpha$  RD診断には、対照1%タイル値をカット

オフ値とした5 $\alpha$  THF/5 $\beta$  THF、5 $\alpha$  THE/5 $\beta$  THEが有用であった（H23-図1, H23-表1）。

【H24】 1) PTL/THEs 0.01で感度100%、特異度99.6%、2) 11OHA<sub>n</sub> 0.35で感度95.3%、特異度100%であった（H24-図1-3）。尿PTL/THEsと11OHA<sub>n</sub>により、非古典型（NC21OHD）を含む21OHDとPORDを在胎週数、日齢にかかわらず、高い診断精度で鑑別可能であった。

【H25】 C3 $\beta$  HSDD とその他の疾患3群の間にオーバーラップを認めなかったのは、 $\Delta$ 5ステロイド代謝物8種であった。 $\Delta$ 5/ $\Delta$ 4代謝物比の比2種においては、いずれもオーバーラップを認めた（H25-図1）。外陰部異常を伴う正期産新生児におけるC3 $\beta$  HSDDの診断指標候補は、理論通り $\Delta$ 5ステロイド代謝物のみであった。 $\Delta$ 5ステロイド代謝物による診断では、 $\Delta$ 5ステロイドの著明な増加を伴うC21OHDとの鑑別が最も困難であった。

## E. 結論

尿ステロイドプロフィールにより、生後1ヶ月以降の5 $\alpha$  RD診断基準、新生児・乳児期非古典型を含む21OHDとPORDの鑑別診断基準を設定した。また、新生児C3 $\beta$  HSDDの診断指標候補として、8種の $\Delta$ 5ステロイド代謝物を選択した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Koyama Y, Homma K, Murata M, Shibata H, Itoh H, Hasegawa T: Free cortisol/cortisone ratio in pooled urine was increased after rapid-ACTH stimulation test under dexamethasone suppression, *Endocr J*, 58(12): 1099-1103, 2011

- 2) Koyama Y, Homma K, Fukami M, Miwa M, Ikeda K, Ogata T, Hasegawa T, Murata M: Two-step biochemical differential diagnosis of classical 21-hydroxylase deficiency and cytochrome P450 oxidoreductase deficiency in Japanese infants using urinary pregnanetriolone / tetrahydrocortisone ratio and 11 $\beta$ -hydroxyandrosterone by gas chromatography - mass spectrometry, Clin Chem, 58(4):741-747, 2012
- 3) Koyama Y, Homma K, Miwa M, Ikeda K, Murata M, Hasegawa T. Measurement of reference intervals for urinary free adrenal steroid levels in Japanese newborn infants by using stable isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry Clinica Chimica Acta 415, 302-305 2013
- 4) 本間桂子, 長谷川奉延. 尿ステロイドプロフィールによる新生児副腎皮質疾患の早期診断. 小児科臨床 66(2) 199-207 2013
2. 学会発表
- 1) 本間桂子, 中川利沙, 小山雄平, 三輪雅之, 池田一成, 涌井昌俊, 村田満, 本間誠次郎, 長谷川奉延. LC-MS/MSによる血清17OHP値を用いた新生児古典型21OHD診断. 第45回日本小児内分泌学会. 大宮. 2011.10.6-8
- 2) 中川利沙, 本間桂子, 小山雄平, 三輪雅之, 池田一成, 石井智弘, 宮代好通, 菅原辰雄, 笹本英彦, 本間誠次郎, 長谷川奉延. 血清17OHP測定におけるカラム分画RIAの特異性評価 —LC/MS/MSとの比較—. 第45回日本小児内分泌学会. 大宮. 2011.10.6-8
- 3) 小山雄平, 本間桂子, 中川利沙, 笹本英彦, 三輪雅之, 池田一成, 涌井昌俊, 村田満, 本間誠次郎, 長谷川奉延. 新生児血中副腎ステロイド7種とその尿中代謝物との相関. 第19回日本ステロイドホルモン学会. 福岡. 2011.11.27
- 4) 本間桂子, 中川利沙, 小山雄平, 三輪雅之, 池田一成, 涌井昌俊, 村田満, 本間誠次郎, 長谷川奉延. 古典型21-水酸化酵素欠損症女児の生後第1週におけるdihydrotestosterone産生経路. 第46回日本小児内分泌学会. 大阪. 2012.9.27-29
- 5) 中川利沙, 本間桂子, 小山雄平, 三輪雅之, 池田一成, 前久保仁恵, 涌井昌俊, 村田満, 本間誠次郎, 長谷川奉延. LC/MS/MSによる血中21-deoxycortisol (21DOF)を用いた新生児古典型21-水酸化酵素欠損症(C21OHD)診断 第46回日本小児内分泌学会. 大阪. 2012.9.27-29
- 6) 本間桂子, 小山雄平, 長崎啓祐, 高澤啓, 清水長子, 柴田綾子, 涌井昌俊, 村田満, 石井智弘, 長谷川奉延. 尿ステロイドプロフィールによる非古典型を含む21-hydroxylase欠損症とP450oxidoreductase欠損症との鑑別診断. 第20回日本ステロイドホルモン学会. 金沢. 2012.11.17-18
- 7) Koyama Y, Homma K, Noboru Uchida N, Hayashi M, Miwa M, Ikeda K, Ishii T, Wakui M, Murata M, Hasegawa T. Chemotype (urinary steroid concentration) - phenotype - genotype correlations in 53 Japanese patients with 21-hydroxylase deficiency ENDO2012, Houston, USA, Jun. 23-26, 2012.
- 8) Homma K, Koyama Y, Takazawa K, Ishii T, Miwa M, Kazushige Ikeda, Nobuko Shimizu, Ayako Shibata, Masatoshi Wakui, Mitsuru Murata, Tomonobu Hasegawa. Biochemical Diagnosis of Classic 3 $\beta$ -hydroxysteroid Dehydrogenase Deficiency in Term Newborns using Urine Metabolites of  $\Delta$ 5 Steroids. 9th

Joint Meeting , Milan - Italy 9/19-22, 2013

- 9) 本間桂子, 小山雄平, 高澤啓, 鹿島田健一, 林美恵, 石井智弘, 三輪雅之, 池田一成, 清水長子, 柴田綾子, 上村知恵, 涌井昌俊, 村田満, 長谷川奉延, 尿ステロイドプロフィールによる正期産新生児古典型 $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 欠損症の診断指標. 第47回日本小児内分泌学会 10/10-12, 2013

#### 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

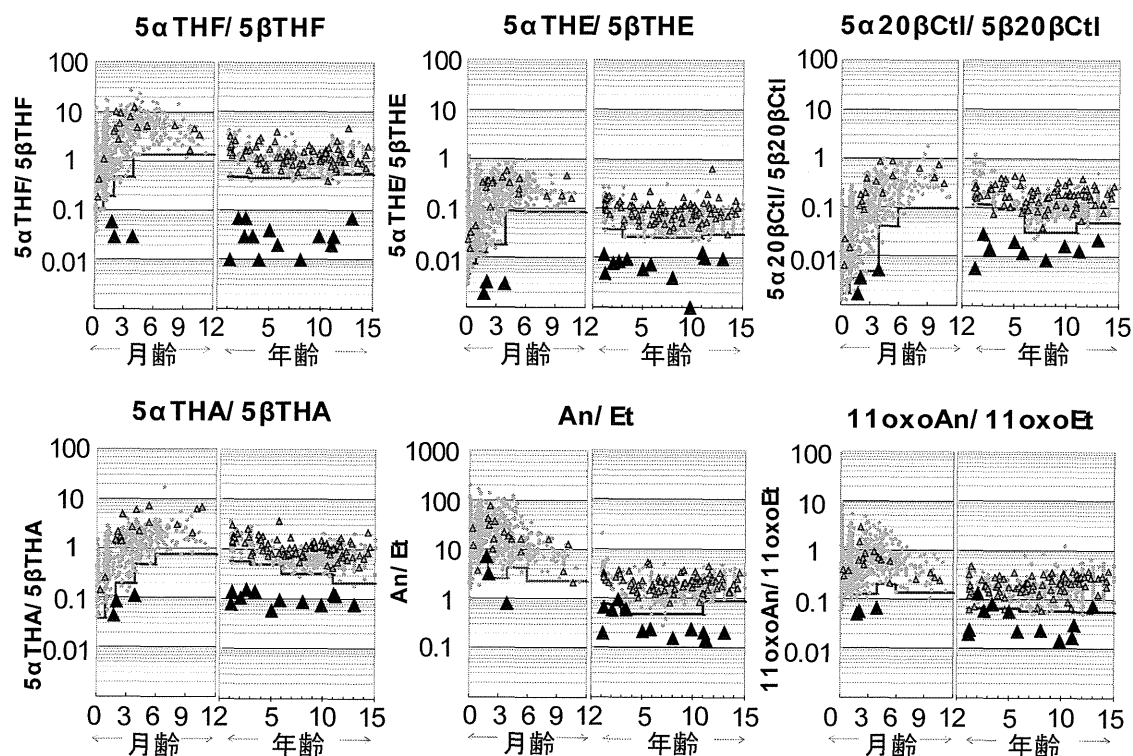
なし

3. その他

なし

H23- 図1 5 $\alpha$ /5 $\beta$ 代謝物比の分布

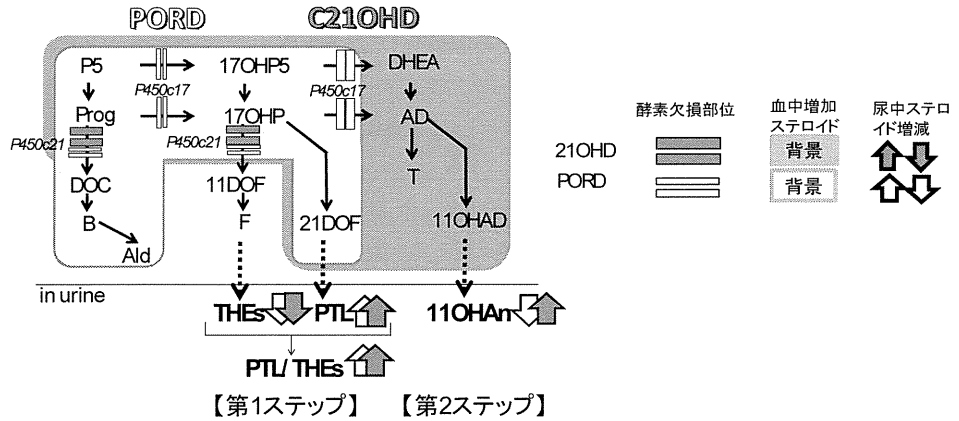
▲5 $\alpha$ RD △非5 $\alpha$ RD 対照 ー対照1パーセントイル



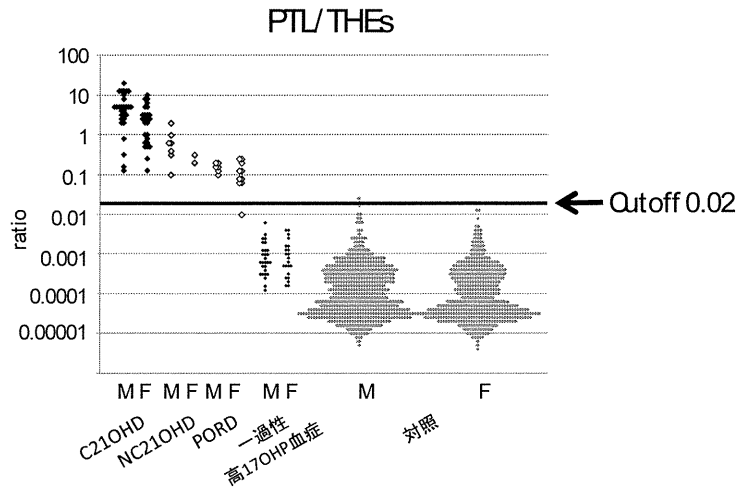
H23- 表1 5 $\alpha$ /5 $\beta$ 代謝物比の診断精度評価

	感度(%)	特異度(%)		5 $\alpha$ RDvs非5 $\alpha$ RD&対照分布 重複なし	
		(vs非5 $\alpha$ RD)	(vs非5 $\alpha$ RD&対照)	乳児期	小児期
5 $\alpha$ THF/5 $\beta$ THF	100.0	99.0	98.8	○	○
5 $\alpha$ THE/5 $\beta$ THE	100.0	99.0	98.7	○	○
5 $\alpha$ 20 $\beta$ CtI/5 $\beta$ 20 $\beta$ CtI	100.0	96.1	98.4		○
5 $\alpha$ THA/5 $\beta$ THA	100.0	99.0	98.4		○
An/Et	69.0	96.1	98.7		
11oxoAn/11oxoEt	85.0	97.0	98.8	○	
5 $\alpha$ THF/5 $\beta$ THF 5 $\alpha$ THE/5 $\beta$ THE >ともに	100.0	100.0	99.7		

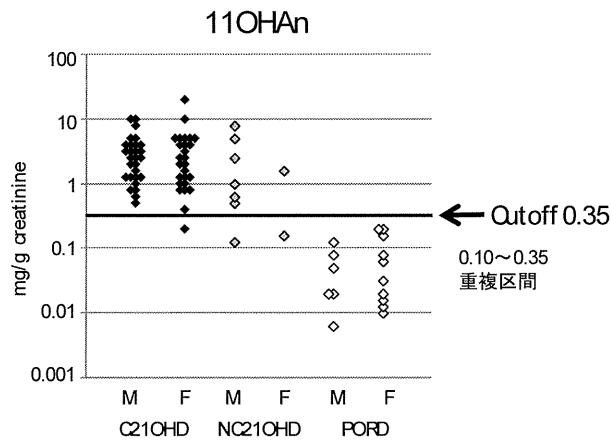
H24-図1 C21OHD・PORDのステロイド代謝



H24-図2 C21OHD・PORD鑑別診断：第1ステップの指標



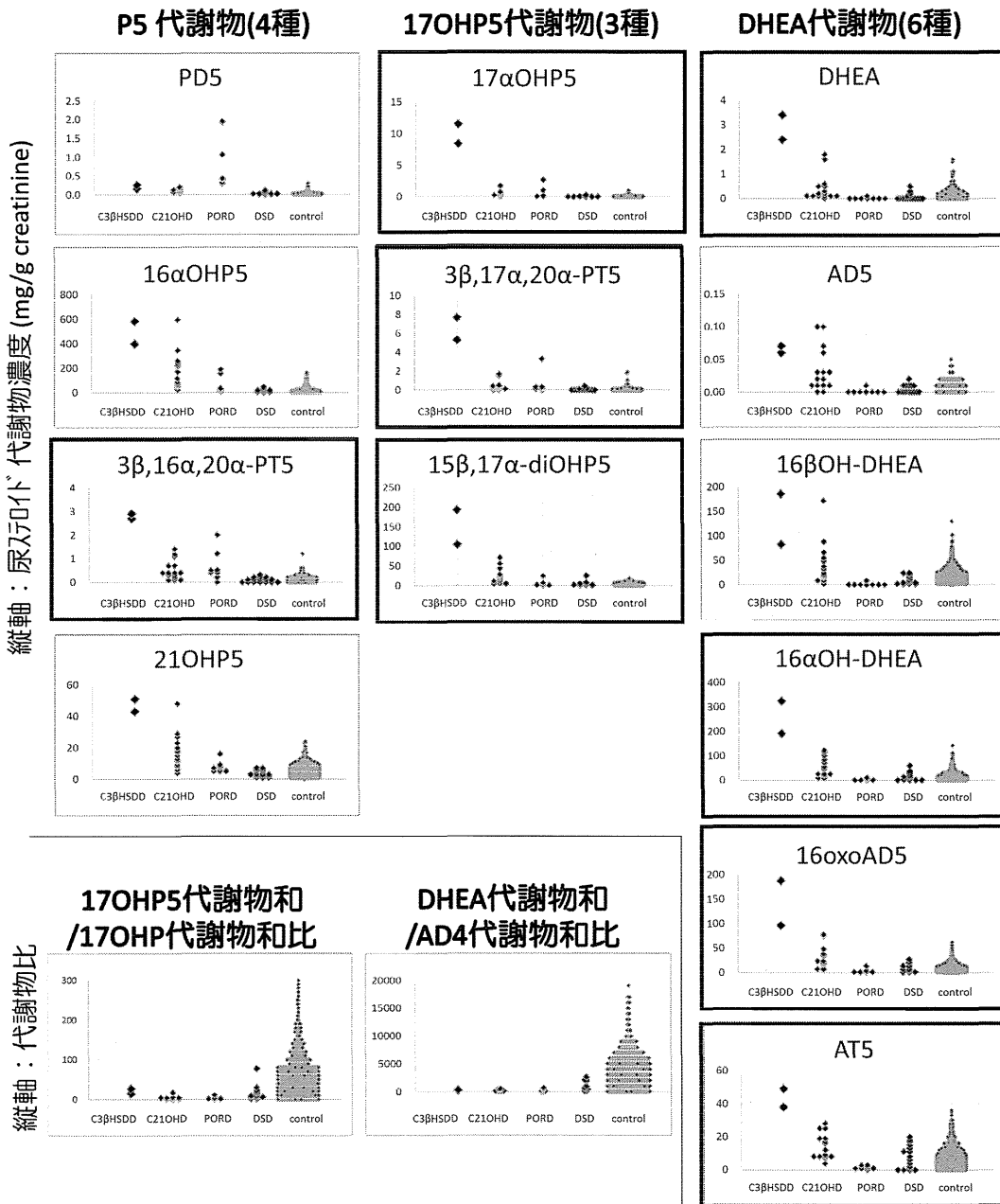
H24-図3 C21OHD・PORD鑑別診断：第2ステップの指標





【図3】  $\Delta 5$ ステロイド代謝物および $\Delta 5$ 代謝物/ $\Delta 4$ 代謝物和比の分布

□ = C3 $\beta$ HSDD とその他の疾患3群の間に重複のなかった項目



## 先天性ACTH不応症の分子遺伝学的、臨床的解析

分担研究者 勝又 規行 国立成育医療研究センター 分子内分泌研究部 基礎内分泌研究室長

### 【研究要旨】

本邦の先天性ACTH不応症のうち、*MC2R*遺伝子変異に起因するものは19%を占め、*MRAP*遺伝子変異に起因するものは稀である。本邦のAllgrove症候群のうち、*AAAS*遺伝子変異に起因するものは63%であり、ACTH不応症と同様に遺伝的多様性の存在が示唆される。同定された*MC2R*遺伝子変異および*AAAS*遺伝子変異は各々の患者に固有であり、本邦の患者では変異のホットスポットあるいは創始者効果は認められない。

### A. 研究目的

先天性ACTH不応症は、副腎のグルココルチコイドの分泌不全がみられるが、ミネラルコルチコイドの分泌は保たれており、外因性のACTHには反応しない稀な疾患である。本症は、ときに無涙症、アカラシアを合併し、その場合はAllgrove症候群と呼ばれる。単独の先天性ACTH不応症およびAllgrove症候群は、常染色体劣性遺伝性疾患である。先天性ACTH不応症の責任遺伝子として、ACTH受容体をコードする*MC2R*遺伝子(1型)、melanocortin 2 receptor accessory proteinをコードする*MRAP*遺伝子(2型)などが知られている。Allgrove症候群の責任遺伝子として*AAAS*遺伝子が知られている。

本研究では、本邦の先天性ACTH不応症およびAllgrove症候群の分子遺伝学的、臨床的解析を行った。

### B. 研究方法

対象：対象は本邦の先天性ACTH不応症(外性器異常、血清電解質異常を伴わない先天性副腎機能低下症)と診断された16家系とAllgrove症候群と診断された8家系。

遺伝子解析：*MC2R*遺伝子、*MRAP*遺伝子および*AAAS*遺伝子の各エクソンを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。

変異ACTH受容体の機能解析：野生型*MC2R* cDNAおよび新規変異*MC2R* cDNAをpcDNA3.1 Zeo(-)プラスミドにクローニングし、マウス副腎由来細胞株Y1の変異株で、ACTH受容体を発現していない細胞株OS3に、各プラスミドをエレクトロポレーション法で導入し、Zeocin耐性を指標に、野生型および変異ACTH受容体を恒常的に発現する細胞を選択した。野生型および変異*MC2R* mRNAの発現は、ノーザンブロット法で検討した。これら細胞にACTH(1-24)を添加し、添加後の細胞内cAMP産生量をRIAで測定した。

臨床的解析：臨床情報を後方視的に解析した。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析研究は、施設の倫理審査委員会で承認された説明書・同意書を用いて同意を得た後に行った。

## C. 研究成果

*MC2R*遺伝子解析：3家系3例において、*MC2R*遺伝子変異が同定された。その内訳は、p.R137変異とp.R146H変異の複合ヘテロ接合体が1例、p.D103N変異およびp.G226R変異のホモ接合体がそれぞれ1例であった。

*MRAP*遺伝子解析：*MRAP*遺伝子の変異は同定されなかった。

*AAAS*遺伝子解析：5家系5例において、*AAAS*遺伝子変異が同定された。その内訳は、p.R119X変異、p.R194X変異、p.Q237X変異、IVS6-2A>C変異およびIVS7+1G>A変異のホモ接合体がそれぞれ1例ずつであった。

変異ACTH受容体の機能解析：野生型あるいはp.G226R変異ACTH受容体を恒常的に発現するOS3細胞において、*MC2R* mRNAの発現量は同等であったのに対し、p.G226R変異ACTH受容体発現OS3細胞のACTH(1-24)刺激に対するcAMPの産生量は、野生型ACTH受容体発現細胞に比し著しく低下していた。

臨床的解析：*MC2R*遺伝子変異が同定された3例の副腎不全の発症時期は、出生直後が2例、6歳が1例であった。全例で色素沈着が認められ、出生直後に発症した2例では低血糖が認められた。血漿レニン活性 (PRA) は測定された2例で軽度高値であった。出生時の身長は全例正常であったが、6歳時に診断された1例では過成長を認めた。

*AAAS*遺伝子変異が同定された5例全例で近親婚が認められた。副腎不全は5例全例で認められた。その発症時期および症状としては、出生直後、生後3ヵ月および6歳時に色素沈着が認められた例が1例ずつ、1歳、2歳および5歳時に低血糖が認められ診断に至った例が1例ずつであった。無涙症は5例全例で認められた。気づかれた時期は、出生直後が2例、1歳、8歳および24歳がそれぞれ1例ずつであった。アカラ

シアは5例中3例で認められ、診断された年齢は2歳、3歳および15歳であった。残りの2例のうち、1例では嚥下困難が認められるが、他の1例では消化器症状はこれまで認められない。神経学的合併症として、5例中4例で運動・言語の発達遅滞、痙性歩行が認められた。

## D. 考察

本邦の先天性ACTH不応症と診断された患者16家系例中3家系3例で*MC2R*遺伝子変異が同定され、*MC2R*遺伝子変異に起因するものは19%を占めると考えられる。同定された変異は各々の患者に固有であり、本邦の患者では変異のホットスポットあるいは創始者効果は認められないと考えられる。一方、*MRAP*変異は同定されなかった。したがって、本邦においては、*MRAP*遺伝子変異に起因する先天性ACTH不応症は、稀と考えられる。

今回、本邦の患者で同定した*MC2R*遺伝子変異のうち、p.R137W変異、p.R146H変異およびp.D103N変異は既知の変異である。一方、p.G226R変異は新規変異である。p.G226R変異ACTH受容体を恒常的に発現するOS3細胞のACTH(1-24)刺激に対するcAMP産生量は、野生型ACTH受容体発現細胞に比し著しく低下しており、p.G226R変異は、ACTH不応症の原因であると考えられる。

*MC2R*遺伝子異常に起因する先天性ACTH不応症では、出生直後から低血糖症状を示すこと、血清電解質が正常であってもPRAが軽度上昇すること、過成長を示すことがあるので、診断時に注意が必要である。

本邦のAllgrove症候群と診断された患者8家系中、3家系3例では*AAAS*遺伝子のナンセンス変異がホモ接合性に、2家系2例ではスプライシング変異がホモ接合体性に認められ、これらの変異はAllgrove症候群の原因であると考えられ

る。したがって、本邦の患者では、AAAS遺伝子変異に起因するものは63%を占める。5家系5例の両親は近親婚であり、同定された変異は各々の患者に固有であり、本邦の患者では変異のホットスポットあるいは創始者効果は認められないと考えられる。残りの3家系では、AAAS遺伝子変異は同定されず、Allgrove症候群でもACTH不応症と同様に遺伝的多様性が存在することが示唆される。

AAAS遺伝子変異が同定された5例のうち、2例ではアカラシアが認められず、これらの症例では、副腎不全、無涙症および運動・言語の発達遅滞と痙性歩行が早期診断の手がかりになると考えられる。

## E. 結論

- 1) 本邦では、MC2R遺伝子変異に起因する先天性ACTH不応症は19%を占める。
- 2) MC2R遺伝子の新規p.G226R変異は先天性ACTH不応症の原因である。
- 3) MC2R遺伝子異常に起因する先天性ACTH不応症では、出生直後から低血糖症状を示すこと、血清電解質が正常であってもPRAが軽度上昇すること、過成長を示すことがある。
- 4) 本邦では、MRAP遺伝子変異に起因する先天性ACTH不応症は稀である。
- 5) 本邦では、AAAS遺伝子変異に起因するAllgrove症候群は63%を占める。
- 6) 本邦のAllgrove症候群には遺伝的多様性が存在する。
- 7) 本邦では、MC2R遺伝子変異およびAAAS遺伝子変異は各々の患者に固有であり、本邦の患者では変異のホットスポットあるいは創始者効果は認められない。

## F. 謝辞

本研究にご協力いただいた東京慈恵会医科大学附属青戸病院小児科・池本智先生、東京大学医学部小児科・広瀬宏之先生、福岡市立こども病院内分泌代謝科・河野斉先生、大阪医科大学第一内科・古玉大介先生、茅ヶ崎市立病院小児科・永渕茂夫先生、小田洋一郎先生、石田クリニック・石田允先生、兵庫県立淡路病院小児科・中村豊先生に深謝いたします。また、OS3細胞を供与してくださったToronto大学のSchimmer教授に深謝します。

## 先天性副腎疾患に関する研究

研究分担者 田島 敏広 北海道大学大学院医学研究科講師

### 【研究要旨】

本邦での先天性副腎疾患の治療の標準化、診断の向上についての検討を行った。

21-水酸化酵素欠損症 (21-OHD) の新生児期のスクリーニングでは17-OHPを測定するが、他のスクリーニングに比較し、偽陽性が多いことが知られている。LC-MS/MSの有用性を検討した。

本邦において「先天性副腎過形成症 (21水酸化酵素欠損症) の治療指針 (1999年改訂)」が発表されている。本邦における21-OHDの治療指針の見直しを行うこととし、小児内分泌学会評議員を対象に、21-OHDの初期治療ならびに維持療法に関するアンケート調査を行った。

先天性のステロイド合成酵素欠損症の中で、アルドステロン合成酵素欠損症は稀である。本邦でその存在を検討した。

以上の研究より、1) LC-MS/MS法によるステロイド分析が21-OHDのスクリーニングに有効であること、2) 新たな治療ガイドラインの作成が必要であること、3) アルドステロン合成酵素欠損症の2例のアルドステロン合成酵素をコードするCYP11B2遺伝子に変異を同定し、本邦でもその疾患の存在が明らかになった。

### A. 研究目的

1) 新生児マススクリーニング (MS) の普及によって21-OHDの早期診断が行われ、国民福祉の向上に貢献してきた。しかしこのMSの最大の問題点は、他のMSに比べ、偽陽性患者が多いことである。特に早産児では17-OHP濃度がしばしば高値を示し、従って、二次検査での正確な確定診断が重要となってくる。その目的のためにLC-MS/MS法によるステロイド分析が有用と考えられる。この方法では17-OHP、コルチゾールに加え、21-DOF、 $\Delta 4$ -Aを同時に測定することができる。そこで、今回二次検査としてLC-MS/MSによる17-OHP、コルチゾール (F)、 $\Delta 4$ -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)、11-デオキシコルチゾール (11-DOF) の同時分析法を検討し、診断の有用性を検討した。

2) 本邦において「先天性副腎過形成症 (21水酸化酵素欠損症) の治療指針 (1999年改訂)」が発表されているが、2010年には米国内分泌学会から診療ガイドラインが出されている。我が国の1999年改訂の治療指針は、これらのガイドラインと比較して、ヒドロコルチゾン (以下HC) の初期治療量や維持療法におけるHCの投与量など、いくつかの点において異なっている。しかし本邦のガイドラインにおいて推奨されている治療量に関しては、参考となる文献等が明らかではない。本邦における21水酸化酵素欠損症 (以下21-

OHD) の治療指針の見直しを行うこととし、小児内分泌学会評議員を対象に、21-OHDの初期治療ならびに維持療法に関するアンケート調査を行った。

- 3) 先天性のステロイド (Ald) 合成酵素欠損症の中で、アルドステロン合成酵素欠損症は稀である。この疾患は常染色体劣性遺伝疾患であり、新生児期に哺乳不良、低ナトリウム血症、高カリウム血症を呈する疾患である。本邦で分子遺伝学的成因を確定したものは今まで報告ない。そこで本邦での分子遺伝学的成因を検討するとともに、その疾患の同定、尿中ステロイド分析の有用性について検討を行った。

## B. 研究方法

- 1) 対象はスクリーニング正常群を在胎週数別にA (32週未満、25名)、B (32~36週、63名)、C (37週以降、76名) の3群と、要精密検査群のうち非患者群をD群 (2名)、先天性副腎過形成症患者群をE群 (6名) とした。指標は17-OHP、F、4-AD、21-DOF、11-DOFに加えて (17-OHP+4-AD) /Fを検討した。遺伝子変異は既報の方法を用いて解析を行った。
- 2) 本症を最も診療している日本小児内分泌学会評議員156名に対して、電子メールでのアンケート調査を行った。初期治療に関しては、2012年8月28日~2012年9月28日、維持療法と思春期の治療に関しては、2013年1月10日~2013年2月28日に調査を行った。
- 3) 新生児期に低Na血症、高K血症、哺乳不良を呈した2例において、CYP11B2遺伝子の解析を行い、新規変異については*in silico* 解析にてその機能に与える効果を検討し

た。また1回尿でのAld欠損症の診断が可能かについて検討した。

## C. 研究成果

- 1) 今回新生児期のろし血を利用できた6例のなかで、早産児は存在しなかった。6例中5例は塩喪失型、1例は単純男性型と診断した。遺伝型を決定できた4例において、塩喪失型患者には酵素活性を消失させる変異、単純男性型には酵素活性の残存する変異を同定した。単純男性型の1例は17-OHPは軽度上昇を示し、再検査にて確定診断となった。  
早産児ではやはり結果を示すが、17-OHPが実際に、高値を示していた。一方患者では17-OHP高値、21-DOF高値、Fの低値を示した。
- 2) 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は、塩喪失症状を認めない場合のHCの投与量は、治療指針の通り100~200 mg/m<sup>2</sup>/日が20/40人と半数を占めたが、50~100mg/m<sup>2</sup>/日が13人、20~50mg/m<sup>2</sup>/日が6人と少量から開始している施設も半数みられた。維持療法における幼児期のHC量は、治療指針通りの15~30mg/m<sup>2</sup>/日は16/31人と半数を占めたが、海外のガイドラインの推奨量10~15mg/m<sup>2</sup>/日も10人みられ、必ずしも現在の治療指針通りに治療が行われてはいなかった。フロリネフの投与量については0.05mg-0.2mgまであり、血漿レニン活性、レニン濃度、体重増加を指標に投与量が調整されていた。またストレス時の投与については精神的ストレス時に増量している場合もあった。

3) 症例1. 在胎40週4日、出生体重3262g、出生身長50cm。生後2ヶ月に哺乳不良、体重増加不良を主訴に入院精査。血液検査で血清Naは130mEq/L、血清K 6.4mEq/L、PRA 155.9ng/ml/hr、Ald, 10.4ng/dl。1回尿の尿中のステロイド分析にてデオキシコルチコステロン、コルチコステロン代謝物は増加、Ald代謝物は測定感度以下。CYP11B2遺伝子解析の結果ではp.W45X、p.R384Xの二つの終止コドンへの変異を同定した。p.W45Xは父由来、p.R384Xは母由来であった。

症例2. 正常分娩にて出生。生後2週目ごろより嘔吐、哺乳不良あり。1か月健診の際に2515gと体重減少があり、入院精査。Na 125mEq/L、K 6.7mEq/L、pH 7.306、BE -7.6、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 17.6、ALD 18.9ng/dl、PRA 7.3ng/ml/hrであった。CYP11B2遺伝子解析の結果、P108L、R181W（既報）の変異を同定した。

#### D. 考察

1) LC-MS/MS法を新生児スクリーニングに導入しているミネソタ州の報告では、第1段階でのスクリーニングに加え、第2段階のスクリーニングとしてLS-MS/MS法を採用することにより陽性的中率はこの3年間で0.8%から7.6%まで上昇したとしている。今回の検討でも現状では新生児スクリーニング後の確定のために、二次検査として有用であると考えられた。

また、36週未満の早期産児において17-OHPが実際高いことが示された。17-OHPは出生体重よりも、在胎週数により相関することが幾つかの報告で示されている。従って、後在胎週数ごとの17-OHPカットオフ値を作成できれば、LC-MS/MS

法によりスクリーニングでの偽陽性率の軽減、第1次スクリーニングへの応用も期待できる。

2) 今回のアンケート調査の結果では予想通り以前の日本のガイドラインのHC量で初期治療、維持療法が行っている解答が多かった。しかし、一方、日本のガイドラインよりすくない量、あるいは日本と米国のガイドラインの中間の量で治療を行っている解答もあった。最近では成人領域においてもHCの補充量については、以前考えていたより少ない量で治療している報告が多い。HCの補充量については今後の検討、標準化が必要と考えられた。フロリネフについては、血圧、血清ナトリウム、血清カリウムを観察しながら、投与量を決定していることが明らかになった。また成人以降、必要なくなる場合も存在した。

3) 今回Ald欠損症において、終止コドンへの変異、二つのミスセンス変異を同定した。

終止コドンへの変異により、nonsense mediated decayによりmRNAが翻訳されないと考えられ、本症の原因と考えられる。また両ミスセンス変異ともPolyphen2の蛋白機能解析予測では、機能喪失と判断され、同様に原因と考えられた。R181Wはユダヤ系イラン人に多く認められる変異として報告されている。日本人での変異頻度は少数の疾患であるため、困難である。

さらに重要なことは1例の1回尿の尿中アルドステロン代謝物の低値を示し、Ald欠損症が診断できることを示した。新生児期の一日蓄尿は状況によっては困難な場合が多いので、新生児期～乳児期で非常

に診断に有用であることが示された。

## E. 結論

- 1) LC-MS/MS法は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であった。
- 2) アンケート調査より治療の標準化が必要であると思われた。
- 3) 日本人にはCY11B2遺伝子変異の報告は今までない。低Na血症を示す疾患としてAld合成酵素欠損症はまれではあるが、本邦でも存在しうることを初めて明らかにし、鑑別疾患の1つであることをあらためて提言する。

## F. 研究発表

### 1.論文発表

1. 石津桂, 中村明枝, 城和歌子, 田島敏広  
新生児マススクリーニング検査で発見され, 経過中に卵巣のう腫茎捻転を起こしたP450オキシドレダクターゼ欠損の1例  
日本マススクリーニング学会雑誌 21  
243-246 2011
2. Tajima T, Fujikura K, Fukushi M, Hotsubo T, Mitsuhashi Y. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia in Japan. *Pediatric Endocrine Review* 2012;10:72-78
3. Hatta Y, Nakamura A, Tajima T et al. Clinical and molecular analysis of six Japanese patients with a renal form of pseudohypoaldosteronism type 1. *Endocr J.* 2013; .60: 299-304.
4. Kondo E, Nakamura A, Homma K, Hasegawa T, Yamaguchi T, Narugami M, Hattori T, Aoyagi H, Ishizu K, Tajima T. Two novel mutations of the CYP11B2 gene in a Japanese patient with aldosterone deficiency type 1. *Endocr J.* 2013;60:51-55.

## 総説

1. 田島敏広, 中村明枝, 城和歌子, 石津桂  
先天性副腎過形成症の最近の進歩  
日本小児泌尿器科学会雑誌 20:18-23;2011
2. 田島敏広, 中村明枝, 石津桂 ライフスパンからみた小児科診療 先天性副腎過形成症 *小児内科* 43 1528-1531;2011
3. 田島敏広 副腎皮質ホルモンの作用とその異常—基本的生理学とステロイドホルモンの作用について *小児内科*44:512-516 2012/12/01
4. 田島敏広. 先天性副腎低形成症. ホルモンと臨床, 2013;60:65-69.
5. 田島敏広. 早発思春期. 臨床婦人科産科, 2013;67:656-661.
6. 田島敏広. 思春期早発症を起こす遺伝子異常. 内分泌・糖尿病・代謝内科, 2013;37:256-267.

## 教科書

1. 田島敏広 副腎 永井敏郎, 大野耕策, 緒方勤, 横谷進 (編集), *Prader-Willi症候群の基礎と臨床 診断と治療社* 東京 2011 pp43-45
2. 田島敏広, 先天性副腎過形成症 今日の小児の治療指針 第15版, 7内分泌疾患, 240-241, 2012
3. 田島敏広 先天性副腎過形成症 からだの科学, ホルモン (内分泌の病気) 275 118-121 日本評論社, 石橋みゆき編
4. 田島敏広: 副腎ステロイドホルモン合成酵素欠損症 (分担), 先天代謝異常ハンドブック, 遠藤文夫, 山口清次, 大浦敏博, 奥山虎之編, PP.404-406, 中山書店, 東京, 2013
5. 田島敏広: 副腎不全 (分担), 小児の臨床検査・小児科学レクチャーVol 3 No 2, 大藪恵一編, PP.463-468, 総合医学社, 東



- 京, 2013
6. 田島敏広：新生児マススクリーニング17-OHP高値（分担），小児の内分泌疾患・小児科学レクチャー 総合医学社，東京，Vol 3, No51107-1114, 2013
  - 2.学会発表
    1. 田島敏広，中村明枝，石津桂，城和歌子 クリニカルアワー 先天性副腎疾患に対するステロイド補療法 第84回日本内分泌学会学術集会 神戸市 2011年4月21日
    2. 中村明枝，石津桂，城和歌子，田島敏広 偽性低アルドステロン症1型にてミネラルコルチコイド受容体遺伝子変異を認めた2例 第84回日本内分泌学会学術集会 神戸 2011年4月22日
    3. 藤倉かおり，山岸卓弥，田上泰子，野町祥介，花井潤師，高橋広夫，三角雄，田島敏広，母坪智行，福士勝 LC-MS/MSによる先天性副腎過形成症スクリーニング確認検査法の検討 第38回日本マススクリーニング学会 福井市 平成23年10月28日
    4. 田島敏広 先天性副腎過形成症 教育講演 第85回日本内分泌学会学術集会，2012年4月23日，名古屋
    5. 田島敏広，石津桂，中村明枝 シンジウム10 希少疾患から学ぶ内分泌疾患バックドア経路 第85回日本内分泌学会学術集会，2012年4月24日，2011 名古屋
    6. Tajima T Molecular basis of combined pituitary hormone deficiency in Japan. Symposium. Pediatric Academic Societies Annual Meeting April 30, Boston 2012
    7. 田島敏広 CYP11B2遺伝子変異を同定した日本人最初のアルドステロン欠損症タイプ1の1例 第20回日本ステロイドホルモン学会学術集会2012年11月18日金沢
    8. 田島敏広：先天性副腎機能異常の新展開，第21回日本ステロイドホルモン学会，豊中，2013年11月16日
    9. 田島敏広：21-水酸化酵素欠損症，第23回臨床内分泌代謝Update，名古屋，2014年1月24日
  - G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

### **(3) 副腎ステロイド産生機構の基礎研究**

## 副腎皮質の発生初期過程に関する研究

諸橋 憲一郎 九州大学大学院医学研究院 教授

### 【研究要旨】

転写因子Ad4BP/SF-1はステロイドホルモン産生関連遺伝子の転写制御因子として同定された。一方、本遺伝子のノックアウトマウスには副腎が形成されないことから、本因子は単にステロイドホルモン産生に関与しているだけでなく、副腎皮質細胞の分裂や増殖を制御していると推測される。しかしながら、本因子がどのようなメカニズムで細胞増殖を制御しているのかは不明であった。そこで、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、mRNAの解析とクロマチン免疫沈降法による解析を行った。その結果、解糖系酵素遺伝子がAd4BP/SF-1の標的遺伝子となっていることが明らかになった。更に、本因子が解糖系の制御を通じ、細胞内のATPやNADPHなどの因子の産生を制御することで細胞増殖を制御することが強く示唆された。また、同じくステロイドホルモン産生能を有する精巣ライディッヒ細胞においてもAd4BP/SF-1によって解糖系が制御されているらしいことが示され、Ad4BP/SF-1による解糖系の制御が全てのステロイドホルモン産生細胞で行われていることが示唆された。

### A. 研究目的

Ad4BP/SF-1は核内受容体型転写因子で、副腎皮質細胞などのステロイドホルモン産生細胞において、ステロイドホルモン産生に関する全ての遺伝子の転写を制御している。また、本遺伝子のノックアウトマウスからは副腎ならびに生殖腺などのステロイドホルモン産生組織が消失する。しかしながらそのメカニズムは不明であった。本研究では次世代シーケンサーを用い、mRNAの発現解析とクロマチン免疫沈降法による解析を行うことで、Ad4BP/SF-1が制御する標的遺伝子の全体像を明らかにすることで、本遺伝子のノックアウトマウスから副腎や生殖腺が消失する理由を明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

実験には主にマウス副腎皮質由来のY-1細胞

ならびにマウス精巣より調製したライディッヒ細胞を用いた。Ad4BP/SF-1のノックダウンには複数種のsiRNAを用いた。これらのsiRNAはAd4BP/SF-1のmRNAならびにタンパク質量を減少させた。グルコース量や中間代謝産物量は質量分析機や分析キットを用いた。次世代シーケンサーによって得られた塩基配列情報は、九州大学生体防御医学研究所の須山教授の研究グループとの共同研究のもとに解析した。

(倫理面への配慮)

本実験にはマウスを用いるが、全ての動物実験は九州大学動物実験指針に従って行なわれた。なお本研究は九州大学実験動物委員会の承認を得たものである。同様に組み替えDNA実験については、組み替えDNA実験委員会の承認を得たものである。

## C. 研究成果

### (1) mRNA発現解析

Y-1細胞をsiAd4BP/SF-1にて処理し、Ad4BP/SF-1をノックダウンした。これらの細胞とコントロールsiRNA処理細胞において発現するmRNAを次世代シーケンサーにて解析した。siAd4BP/SF-1処理で発現する遺伝子数に大きな変動はなかったが、324遺伝子の発現が2倍以上に上昇し、243遺伝子が半分以下に減少した。減少する遺伝子はAd4BP/SF-1が正に制御していると考えられるため、これらの遺伝子に焦点を当てた解析を行った。その結果、これらの遺伝子には解糖系を構成する多くの遺伝子が含まれていた。このことはAd4BP/SF-1が解糖系遺伝子を正に制御することを示唆した。

### (2) Ad4BP/SF-1の結合領域の解析

そこで、Ad4BP/SF-1が解糖系遺伝子座に結合しているかを調べるため、Y-1細胞を用いChIP-sequenceを行った。その結果、全ゲノム中におよそ2000カ所のAd4BP/SF-1の結合が確認された。また、Y-1細胞で発現する11の解糖系遺伝子のうち、7遺伝子にAd4BP/SF-1の結合が確認された。これらの領域にはAd4BP/SF-1の結合配列が存在すること、さらにレポーター遺伝子を用いた解析からは、これらの領域がAd4BP/SF-1依存的に転写を活性することが確認された。

### (3) グルコース、ATP、NADPH量

Ad4BP/SF-1が解糖系を調節しているのであれば、本因子のノックダウンが細胞のグルコース消費、細胞内ATPとNADPH量が減少すると考えられた。そこで、これらの物質を定量したところ、1細胞当たりのグルコース消費は減少し、細胞内ATPとNADPH量はともに減少していた。

### (4) 糖代謝阻害剤の効果

解糖系ならびにペントースリン酸回路の阻害剤2-デオキシグルコース(2DG)存在下でY-1細胞を培養したところ、下図に示すように、細胞内ATPが70%程度に減少した。同程度の減少がsiAd4BP/SF-1を用いたノックダウンによって得られた。

続いて、この条件下における細胞の増殖を調べた。その結果下図に示すように、2-DGによって細胞増殖は抑制され、その抑制はノックダウンの方が強かった。

以上の結果から、Ad4BP/SF-1は細胞内ATP産生に関与していること、また少なくとも細胞内ATP産生を通じ、細胞増殖の制御に関与していることが示唆された。

### (5) ライディッヒ細胞におけるAd4BP/SF-1の結合

これまでの実験結果はAd4BP/SF-1が副腎皮質由来の培養細胞であるY-1細胞で得られた結果であった。培養細胞の特殊性を考えた場合、生体内でもこのようなAd4BP/SF-1による制御が行われているかは重要な点である。そこで、マウス精巣よりライディッヒ細胞を調製し、ChIP-sequence解析を行った。その結果、期待通りに解糖系遺伝子座にAd4BP/SF-1の結合が認められた。

## D. 考察

本研究によって得られた結果は、Ad4BP/SF-1が解糖系酵素遺伝子を制御していることを示すものであった。解糖系酵素はグルコースの分解により細胞内のエネルギー産生を、ひいては細胞の分裂や生存そのもの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が低下する。そもそも、