

Ad4BP/SF-1はステロイド産生に関与する一連の遺伝子の発現制御を行う転写因子として同定された。つまり、細胞特異的な機能を担うために必要な細胞特異的転写因子と考えられている。しかしながら今回の実験では本因子が細胞特異的遺伝子の制御のみならず、全ての細胞に必要な解糖系遺伝子の転写制御を行っていることを示すものであった。細胞特異的遺伝子発現によって獲得される機能的特異性を実際に発揮するには、遺伝子発現の後にステロイドホルモン合成と、多分コレステロール合成が活性化されることが必要である。この二つの経路が活発に機能するにはATPとNADPH、アセチル-CoAなどの物質が必要であることが知られているが、これらの物資の産生には解糖系が動くことが必須である。細胞特異的な機能の発揮に必要な遺伝子と解糖系遺伝子の制御をAd4BP/SF-1が行うことで、この一見無関係に見える二つの経路を協調的に制御していることが明らかになった。

E. 結論

Ad4BP/SF-1はステロイド産生細胞において解糖系遺伝子の発現制御を通じ、細胞内ATP産生の制御を行っている。このような制御をもとに、細胞の生存と細胞特異的な機能の活性化を制御していると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1, Glycolytic genes as the targets of a nuclear receptor Ad4BP/SF-1.
T Baba, H Otake, T Sato, K Miyabayashi, Y Shishido, C-Y Wang, Y Shima, H Kimura, M Yagi, Y Ishihara, S Hino, H Ogawa, M Nakao, T Yamazaki, D Kang, Y Ohkawa, M Suyama, B-Ch Chung, K Morohashi
Nature Commun. in press
- 2, Contribution of Leydig and Sertoli cells to testosterone production in mouse fetal testes.
Y Shima, K Miyabayashi, S Haraguchi, T Arakawa, H Otake, T Baba, S Matsuzaki, Y Shishido, H Akiyama, T Tachibana, K Tsutsui, K Morohashi
Mol Endocrinol 27, 63-73, 2013
- 3, Steroid hormones and the development of reproductive organs
K Morohashi, T Baba, M Tanaka
Sexual Development 7, 61-79, 2013
- 4, Aristaless related homeobox gene, Arx, is implicated in mouse fetal Leydig cell differentiation possibly through expressing in the progenitor cells.
K Miyabayashi, Y Katoh-Fukui, H Ogawa, T Baba, Y Shima, N Sugiyama, K Kitamura, K Morohashi
PLOS One 8, e68050, 2013
- 5, Heterogeneity in sexual bipotentiality and plasticity of granulosa cells in developing mouse ovaries.
K Harikae, K Miura, M Shinomura, S Matoba, R Hiramatsu, N Tsunekawa, M Kanai-Azuma, M Kurohmaru, K Morohashi, and Y Kanai
J Cell Sci 126, 2834-2844, 2013
- 6, Homeoproteins Six1 and Six4 regulate male sex determination and mouse gonadal development.
Y Fujimoto, S Tanaka, Y Yamaguchi, H Kobayashi, S Kuroki, M Tachibana, M Shinomura, Y Kanai, K Morohashi, K Kawakami, and R Nishinakamura
Dev Cell 26, 416-430, 2013
- 7, Maml1 deficiency significantly reduces mRNA expression levels of multiple genes expressed in mouse fetal Leydig cells but permits normal

- genital and reproductive development
M Miyado, M Nakamura, K Miyado, K Morohashi, S Sano, E Nagata, M Fukami, T Ogata
Endocrinol 153, 6033-6040, 2012
- 8, WNT family genes and their modulation in the ovary-independent and persistent vaginal epithelial cell proliferation and keratinization induced by neonatal diethylstilbesterol exposure in mice
T Nakamura, S Miyagawa, Y Katsu, H Watanabe, T Mizutani, T Sato, K Morohashi, T Takeuchi, T Iguchi, Y Ohta
Toxicology 296, 13-19, 2012
- 9, Cbx2, a polycomb group gene, is required for Sry gene expression in mice.
Y Katoh-Fukui, K Miyabayashi, T Komatsu, A Owaki, T Baba, Y Shima, T Kidokoro, Y Kanai, A Schedl, D Wilhelm, P Koopman, Y Okuno, K Morohashi
Endocrinol 153, 913-924, 2012
- 10, Identification of enhancer specific for fetal Leydig cells in Ad4BP/SF-1 gene.
Y Shima, K Miyabayashi, T Baba, H Otake, S Oka, M Zubair, K Morohashi
Endocrinol 153, 417-425, 2012
- 11, SF-1 expression during adrenal development and tumorigenesis.
Gardiner JR, Y Shima, K Morohashi, A Swain
Mol. Cell. Endocrinol. 351, 12-18, 2012
- 12, DNA methylation of intronic enhancers directs tissue-specific expression of Steroidogenic Factor 1/Adrenal 4 Binding Protein (SF-1/Ad4BP).
EA. Hovivik, TE. Bjanesoy, O Mai, S Okamoto, Y Minokoshi, Y Shima, K Morohashi, U Boehm, M Bakke
Endocrinol 152, 2100-2112, 2011
- 13, The fetal and adult adrenal cortex
K Morohashi, M Zubair
Mol. Cell. Endocrinol. 336, 193-197, 2011
2. 学会発表
(招待講演)
- 2013年
- 1, Endocrine Society's 95th Annual Meeting, June 15-18, San Francisco, UAS
A Novel Landscape of Target Genes for Ad4BP/SF-1.
Ken-ichirou Morohashi
- 2, 衛生環境・環境トキシコロジー学会 9月13-14日 福岡 特別講演
性差の内分泌制御と遺伝的制御
嶋雄一, 宮林香奈子, 大竹博之, 馬場崇, 諸橋憲一郎
- 3, 第32回日本アンドロロジー学会7月26-27日 大阪 特別講演
胎仔型ライディッシュ細胞の存在意義
嶋雄一, 宮林香奈子, 大竹博之, 馬場崇, 諸橋憲一郎
- 2012年
- 4, 15th Conference on the adrenal cortex, Adrenal 2012, June 19-22, League city, Texas, UAS
Glycolytic genes as the targets of Ad4BP/SF-1
Ken Morohashi
- 5, 第85回日本生化学会大会 2012年12月16日 福岡
胎仔精巣におけるテストステロン合成経路の解明
嶋雄一, 宮林香奈子, 原口省吾, 馬場崇, 大竹博之, 筒井和義, 諸橋憲一郎
- 6, 第44回日本動脈硬化学会 福岡 7月19-20

日

性差形成と維持の機構

諸橋 憲一郎

- 7, 第85回日本内分泌学会 名古屋 4月19日-21日

胎仔ライディッヒ細胞と成獣ライディッヒ細胞の異質性について

諸橋憲一郎

- 8, 第85回日本内分泌学会 名古屋 4月19日-21日

核内受容体 Ad4BP/SF-1 の副腎皮質における新たな機能

馬場崇, 大竹博之, 宮林香奈子, 嶋雄一, 佐藤哲也, 木村宏, 大川恭行, 須山幹太, 諸橋憲一郎

2011年

- 9, 第6回日本生殖内分泌学会 東京 11月19日

生殖腺におけるステロイドホルモン産生

諸橋憲一郎

- 10, 第84回日本内分泌学会 神戸 4月21日-23日

胎仔型ライディッヒ細胞の生理学的機能の解明

嶋雄一, 諸橋憲一郎

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

ステロイド産生細胞分化・再生に関する研究

分担研究者 宮本 薫 福井大学医学部分子生体情報学 教授

【研究要旨】

私どもは、ホルモン補充療法に変わりうる再生治療法の開発を目指し、間葉系幹細胞を副腎ステロイド産生細胞に転換することを試みている。本研究では幹細胞からステロイド産生細胞への分化誘導系を用いて、新たなステロイドホルモン合成関連遺伝子群の同定を試みた。ゲノムワイドのChIP-on-chip assayおよびマイクロアレイによる網羅的発現解析、さらにはSF-1複合体の単離精製と複合体構成タンパク質の解析により、ステロイドホルモン合成に関わる新たな遺伝子群を同定した。それらの中から、新たなSF-1標的遺伝子であるヘム合成の律速酵素ALAS1およびGlutathione-S-transferase A (GSTA)遺伝子ファミリー、さらにはSF-1と複合体を形成するC/EBP β 遺伝子に着目し、それらの転写調節およびステロイドホルモン合成との関連を解析した。

A. 研究目的

副腎皮質ホルモン産生異常の治療には、主にホルモン補充療法が用いられているが、より生理的なホルモン動態を考慮すると外部からの投与によるホルモン補充療法にかわる自律的な分泌調節が可能な再生医療の開発が望まれる。私どもはこういった観点に立って、幹細胞からフィードバック機能を備えた副腎皮質ホルモン産生細胞の作製を試みている。骨髄間葉系幹細胞は成体から比較的容易に採取できること、さらにES細胞ほどではないにしろ様々な細胞に分化しうることから再生医療への応用に適した幹細胞である。本研究の目的は、骨髄間葉系幹細胞を用いて副腎皮質ホルモン産生細胞を創り出すと同時に、その分化メカニズムを分子レベルで明らかにすることである。その一環として、骨髄間葉系幹細胞からステロイドホルモン産生細胞への分化誘導系を用いて新たなステロイドホルモン合成関連遺伝子群を同定した。新たに同定したSF-1標的遺伝子であるヘム合成の律速酵素ALAS1および解毒酵素の一種であ

るGSTA遺伝子ファミリーに着目して、それらの転写調節およびステロイドホルモン合成との関連を解析した。さらにSF-1複合体を単離精製し、複合体構成タンパク質を同定した。それらの中からC/EBP β に着目し、同様の解析を行った。

B. 研究方法

1) ヒト骨髄由来間葉系幹細胞に転写因子SF-1を導入し、ChIP-on-chip assayによりゲノムワイドにSF-1結合部位を解析した。ヒト骨髄由来幹細胞株hMSC-TERT-E6E7および親株にFlagタグを付けたSF-1遺伝子を導入して樹立した、恒常的にSF-1を発現する細胞株を用いて、それぞれの細胞から核を単離したのちホルムアルデヒド処理を行い超音波による断片化後、Flagタグを利用した免疫沈降を行った。回収されたDNA断片を用いて、Promoter tiling arrayを行った。さらに転写因子SF-1により発現変動する遺伝子群をDNA microarrayによる網羅的遺伝子発現解析

により明らかにした。

- 2) hMSC-TERT-E6E7にFlagタグを付けたSF-1遺伝子を導入して、SF-1を恒常的に発現する細胞株を作製した。この細胞を大量培養したのち、核を単離し0.1M NaCl存在下にMNuclease処理を行って核タンパク質複合体を生理的条件下で抽出した。SF-1タンパク質複合体を、イムノアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、複合体構成タンパク質をSDS-PAGEにより分離したのち、MALDI-TOF MS/MSにより同定した。
- 3) 本研究では、新たなSF-1標的遺伝子としてヘム合成の律速酵素ALAS1およびGSTA遺伝子ファミリーに、SF-1複合体構成因子としてC/EBP β に着目し解析を行った。これらに遺伝子群のステロイドホルモン合成における役割を、siRNAの手法を用いて解析した。
- 4) これらの遺伝子群のSF-1による転写調節を、ルシフェラーゼアッセイおよびEMSAにより解析した。
- 5) hGSTA遺伝子ファミリーに関しては、hGSTA遺伝子近傍の染色体構造変化を、レポーターアッセイおよびChromatin conformation capture assay (3C assay)により解析した。3C assayはゲノム上で離れて存在するDNA部位が3次元構造上は近接して存在しているかどうかを検証するアッセイ系である。

C. 研究結果

- 1) ヘム合成の律速酵素ALAS1遺伝子のノックダウンにより、ステロイドホルモンの初期産

物であるプロゲステロンの産生が減少したことから、ALAS1が新たなステロイドホルモン合成関連遺伝子であることが示された。

- 2) hGSTA遺伝子ファミリーのうちGSTA1およびGSTA3が、ステロイドホルモンの中間代謝物を基質として、ステロイドホルモンへと変換する活性を持つことが示された。これは、解毒酵素の一種と考えられていたGSTA1およびGSTA3がステロイド合成にも関与していることを示している。
- 3) 染色体上でクラスターを形成しているGSTA遺伝子ファミリーは共通してSF-1により転写制御されている。さらにこれらのファミリーが染色体上で3次元的に近接して存在することを3C assayにより証明した。これは、SF-1の発現によりクラスターを形成するファミリー遺伝子群が染色体上で三次元的な構造変化を受け、相互に近接するために起こる転写調節機構の存在を示している。
- 4) SF-1複合体の構成タンパク質の一つであるC/EBP β はSF-1と協調して、ステロイドホルモン合成関連遺伝子群の転写を促進することが明らかとなった。またこの促進効果はトロピックホルモンの二次メッセンジャーであるcAMPにより増強されることが明らかとなった。実際siRNAによるC/EBP β のノックダウンでは、プロゲステロン産生が抑制された。

D. 考察

本研究では、間葉系幹細胞に転写因子SF-1を導入して細胞分化を誘導し、その際の染色体構造の変化を解析した。まずChIP-on-chip assayによりゲノムワイドにSF-1結合サイトを

検索し2000か所以上の結合サイトを同定した。さらにDNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析により、新たなSF-1標的遺伝子を同定した。さらに新たな標的遺伝子の転写調節機構をレポーターアッセイにより確認した。本研究においても新たなSF-1標的遺伝子であるhGSTA3の転写がその遺伝子プロモーター領域に存在するSF-1結合サイト依存的に調節されていることを明らかにした。

hGSTA3遺伝子はhGSTA1~hGSTA4までの遺伝子とともに遺伝子ファミリーを形成し、染色体上でクラスターとして存在している。本研究では、これら遺伝子ファミリーが染色体上で3次元的に近接して存在することを3C assayにより証明した。これは、クラスターを形成するファミリー遺伝子群が共通の転写調節を受けることを可能にする新たな機構であり、グロビン遺伝子クラスターなどで示されているが、ステロイドホルモン合成関連遺伝子では初めての報告である(引用文献9)。

本研究で解析した、新たなSF-1標的遺伝子(ALAS1,hGSTA)およびSF-1複合体構成タンパク質(C/EBP β)は、すべてステロイドホルモン合成に関与していることが明らかとなった。本研究の成果は、これまで不明であった一部の先天性副腎疾患の責任遺伝子解明の一助となるものと期待される。

E. 結論

新たなSF-1標的遺伝子(ALAS1,hGSTA)およびSF-1複合体構成タンパク質(C/EBP β)の解析から、これらの遺伝子がステロイドホルモン合成に関与していることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Soneda, S., Yazawa, T., Fukami, M., Adachi,

M., Mizota, M., Fujieda, K., Miyamoto, K., Ogata, T. : Proximal promoter of the cytochrome P450 oxidoreductase gene: Identification of microdeletions involving the untranslated exon 1 and critical function of the SP1 binding sites. *J Clin Endocrin Metab.* 96(11): 1881-1887, 2011.

- 2) Yazawa, T., Kawabe, S., Inaoka, Y., Okada, R., Mizutani, T., Imamichi, Y., Ju, Y., Yamazaki, Y., Usami, Y., Kuribayashi, M., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Differentiation of mesenchymal stem cells and embryonic stem cells into steroidogenic cells using steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1. *Mol. Cell. Endocrinol.* 336: 127-132, 2011.
- 3) Hatanaka, A., Chen, B., Sun, J.Q., Mano, Y., Funakoshi, M., Kobayashi, H., Ju, Y., Mizutani, T., Shinmyozu, K., Nakayama, J., Miyamoto, K., Uchida, H., Oki, M.: Fub1p, a novel protein isolated by boundary screening, binds the proteasome complex. *Genes & Genetic Systems* 86:305-314, 2011.
- 4) Ju, Y., Mizutani, T., Imamichi, Y., Yazawa, T., Matsumura, T., Kawabe, S., Kanno, M., Umezawa, A., Kangawa, K., Miyamoto, K.: Nuclear receptor 5A(NR5A) family regulates 5-aminolevulinic acid synthase 1(ALAS1) gene expression in steroidogenic cells. *Endocrinology* 153: 5522-5534, 2012.
- 5) Orisaka, M., Hattori, K., Fukuda, S., Mizutani, T., Miyamoto, K., Sato, T., Tsang, B.K., Kotsuji, F., Yoshida, Y.: Dysregulation of ovarian follicular development in female rat: LH decreases FSH sensitivity during preantral-early antral transition. *Endocrinology* 154 (8):2870-2880, 2013.

- 6) Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Mizutani, T., Imamichi, Y., Ju, Y., Matsumura, T., Yamazaki, Y., Usami, Y., Kuribayashi, M., Shimada, M., Kitano, T., Umezawa, A., Miyamoto, K. : Androgen/Androgen receptor pathway regulates expression of the genes for cyclooxygenase-2 and amphiregulin in periovulatory granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 369:42-51, 2013.
- 7) Kawabe, S., Yazawa, T., Kanno, M., Usami, Y., Mizutani, T., Imamichi, Y., Ju, Y., Matsumura, T., Orisaka, M., Miyamoto, K. : A novel isoform of liver receptor homolog-1 is regulated by steroidogenic factor-1 and the specificity protein family in ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 154(4):1648-1660, 2013.
- 8) Imamichi, Y., Mizutani, T., Ju, Y., Matsumura, T., Kawabe, S., Kanno, M., Yazawa, T., Miyamoto, K. : Transcriptional regulation of human ferredoxin 1 in ovarian granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 370:1-10, 2013.
- 9) Matsumura, T., Imamichi, Y., Mizutani, T., Ju, Y., Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Ayabe, T., Katsumata, N., Fukami, M., Inatani, M., Akagi, Y., Umezawa, A., Ogata, T., Miyamoto, K. : Human glutathione S-transferase A (GSTA) family genes are regulated by steroidogenic factor 1 (SF-1) and are involved in steroidogenesis. *The FASEB Journal* 27(8):3198-3208, 2013.
- 10) Imamichi, Y., Mizutani, T., Ju, Y., Matsumura, T., Kawabe, S., Kanno, M., Yazawa, T., Miyamoto, K. : Transcriptional regulation of human ferredoxin reductase through an intronic enhancer in steroidogenic cells. *BBA - Gene Regulatory Mechanisms* 1839(1), 33-42, 2014.
2. 総説
- 1) Miyamoto, K., Yazawa, T., Mizutani, T., Imamichi, Y., Kawabe, S., Kanno, M., Matsumura, T., Ju, Y., Umezawa, A.: Stem cell differentiation into steroidogenic cell lineages by NR5A family. *Mol. Cell. Endocrinol.* 336:123-126, 2011.
- 2) 水谷哲也, 宮本薫 : ステロイド合成律速因子であるコレステロール輸送タンパク質StARの新たな転写調節機構. *生化学.* 83(5):388-391, 2011.
- 3) 水谷哲也, 宮本薫 : クロマチン高次構造変換解析による転写調節領域の同定. *日本生殖内分泌学会雑誌.* 16:27-29, 2011.
- 4) 矢澤隆志, 梅澤明弘, 宮本薫 : 卵巣におけるステロイドホルモン合成に関わる遺伝子群の転写調節機構. *日本生殖内分泌学会雑誌.* 16:5-8, 2011.
- 5) 宮本薫 : 卵胞発育とエピジェネティクス—StAR遺伝子を中心として—. *特集 卵と卵胞の発育・成熟, 卵胞の発育と成熟(4). HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY.* 18(4):55-60, 2011.
- 6) 矢澤隆志, 宮本 薫 : 万能細胞由来のステロイドホルモン産生細胞の創出. *医学のあゆみ.* 239(14):1445-1450, 2011.
- 7) 水谷哲也, 今道力敬, 河邊真也, 矢澤隆志, 宮本薫 : 卵巣における遺伝子発現とその調節メカニズム. *日本生殖内分泌学会雑誌.* 17:11-16, 2012.
- 8) 深見真紀, 曾根田瞬, 矢澤隆志, 宮本薫, 緒方勤 : チトクロームP450オキシドレダクターゼ(POR)異常症の分子基盤 : POR遺伝子発現制御機構. *日本生殖内分泌学会雑誌.* 17:17-20, 2012.

3. 学会発表

(シンポジウム)

- 1) 宮本薫：卵巣顆粒膜細胞における転写因子とその調節機構. 第84回日本内分泌学会学術集会. **教育講演9**. 神戸, 2011,4,21-23.
- 2) 矢澤隆志：幹細胞を用いたステロイドホルモン産生機構の解明. 平成23年度日本動物学会中部支部大会. **公開シンポジウム1：生殖とステロイドホルモン**. 福井, 2011,7,30-31.
- 3) 矢澤隆志：幹細胞からのステロイドホルモン産生細胞の作製. 第29回内分泌代謝学サマーセミナー. **第7回内分泌学会若手発表**. 仙台,2011,7,7-9.
- 4) 矢澤隆志：ステロイドホルモン産生の分子機構の解明. 平成23年度動物学会奨励賞**受賞講演**. 日本動物学会第82回旭川大会. 旭川,2011,9,21-23.
- 5) 水谷哲也：卵巣におけるクロマチン構造変換を介した転写調節機構. 第16回日本生殖内分泌学会学術集会. **性腺における新たな転写制御とエピジェネティクス**. 東京,2011,11,19.
- 6) 矢澤隆志：幹細胞からのステロイドホルモン産生細胞の分化誘導. **シンポジウム4 再生医療と内分泌代謝疾患**. 第85回日本内分泌学会学術総会. 愛知, 2012,4,19-21.
- 7) 宮本 薫：幹細胞を用いたステロイドホルモン合成関連遺伝子の転写制御と再生医療. 日本生化学会北陸支部第30回大会記念シンポジウム. 金沢,2012,5,26.
- 8) Miyamoto, K., Yazawa, T., Mizutani, T.: Stem cell differentiation into steroidogenic cell lineage by NR5A family transcription factors. Breast cancer. The 15th International Congress on Hormonal Steroids and

Hormones & Cancer. 金沢, 2012,11,15-17.

- 9) 水谷哲也, 宮本薫：GSTAファミリーのクロマチン構造の変化を介した転写制御とステロイド産生に対する役割. **シンポジウム17 卵胞発育・排卵・卵成熟の調節機構の分子メカニズム**. 第86回日本内分泌学会学術総会 仙台市,2013,4,25-27.

4. 書籍

- 1) Yazawa, T., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Differentiation of pluripotent stem cells into steroidogenic cells: role of SF-1 regulator. Stem Cells and Cancer Stem Cells Vol.8:169-177, 2012. Springer Netherlands.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 特願2011-284430(H23.12.26)
体外受精におけるヒト成熟卵マーカー及びその使用
- 2) 国際出願(H24.9.25)
出願番号PCT/JP2012/74486
体外受精における成熟卵子マーカー及びその使用
- 3) 特願2013-156672(出願中)
卵子の受精可能性の検査のためのバイオマーカーおよびそれを用いた判定

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

主任研究者 柳瀬 敏彦 (福岡大学医学部 内分泌・糖尿病内科学)
研究協力者 明比 祐子 (福岡大学医学部 内分泌・糖尿病内科学)
田邊 真紀人 (福岡大学医学部 内分泌・糖尿病内科学)
田中 智子 (福岡大学医学部 内分泌・糖尿病内科学)
小玉 正太 (福岡大学医学部再生・移植医学講座)
高柳 涼一 (九州大学医学部医学研究院 病態制御内科学)

【研究要旨】

自験119例の副腎腫瘍(従来の診断基準下で非機能性 95例、SCS 24例)の解析に基づき、副腎性サブクリニカルクッシング症候群(SCS)の新しい診断基準を提唱した。現行の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、米国内分泌学会のスクリーニング基準である1mgDST F値 $1.8 \mu\text{g/dl}$ 以上を必須項目とした場合、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。統計学的にも1mg DST後の血中F値は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1mgDST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。124症例の糖尿病合併高血圧症におけるPAの頻度を検討し、14例(11.3%)がPAであることを明らかにした。また、AII受容体拮抗剤(ARB)の使用は、定型的PA症例の診断には影響を与えないことを明らかにした。再生医療の観点から、間葉系幹細胞にSF-1遺伝子を導入し、新たにアンジオテンシンII(AII)によるステロイド産生機構を明らかにすると同時に、このステロイド産生細胞のマウス副腎不全モデル(二期的両側副腎摘出)への移植により副腎不全を部分的にレスキューし得ることを明らかにした。

A. 研究目的

- 1) 副腎性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(H25)

本邦における副腎性サブクリニカルクッシング症候群(SCS)の診断は1995年に制定された厚生省特定疾患調査研究班による基準が用いられている¹⁾。しかしながら、近年、コルチ

ゾール測定系が1995年当時のRIAからほとんどの施設でEIAに切り替わったことにも関連して、Dex 1mg試験の血中コルチゾールカットオフ値 $3.0 \mu\text{g/dl}$ の妥当性²⁾やDex 1mgとDex 8mg試験の結果の乖離³⁾に関する議論がある。現行の診断基準は、副腎性SCSの病態を広く認識させる上で、一定の貢献をしてきたが、見直しと同時に新たな診断基準の作成を求める機運があ

る。2008年、米国内分泌学会ではCushing病を含めた広義のクッシング症候群のスクリーニング検査として、Dex 1mg負荷後の血中コルチゾール値 $1.8\mu\text{g/dl}$ がカットオフ値として提唱された⁴⁾。本研究では、これらの動向も踏まえた上で、自験症例群の解析から、副腎性SCSの新しい診断基準案の作成を試みた。

2) 原発性アルドステロン症(PA)に関する臨床研究 (H24)

近年、全高血圧患者の8-13%がPAであることが、我が国のみならず全世界的に明らかにされてきている⁵⁾。さらに、PAは高率(約50%)に耐糖能異常を合併する⁶⁾。一方、糖尿病患者の50-60%が高血圧を合併する⁷⁾。しかし、高血圧合併2型糖尿病患者においてPAに関する検討成績は極めて少ない。本研究は、糖尿病患者におけるPA合併頻度を明らかにし、その臨床的特徴を明らかにすることを目的とした。

3) ステロイド産生細胞再生研究 (H23, H25)

(1) AIIによるステロイド産生能の検討

SF-1/Ad4BP (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^{8,9)}。我々はこれまでの研究で、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¹⁰⁻¹²⁾。このSF-1誘導性ステロイド産生細胞は、培地中に副腎ステロイド(コルチコステロン、アルドステロン、コルチゾール、DHEA)と性腺ステロイド(テストステロン、エストラジオール)を分泌し、ステロイド合成酵素(StAR, CYP11A1, 3β -HSD2, CYP21A2, CYP17A1, 17β -HSD3, CYP19A1)が発現誘導された。一方、アルドステロン分泌は、EIA法とLC-MS/MS法によっ

て検出されたが、CYP11B2 cDNAはリアルタイムPCR法で検出されなかった。生体内においてアルドステロンは副腎球状層から分泌され、アンジオテンシンII (Ang II)、ACTH、KClなどが分泌を刺激する。間葉系幹細胞においてAII受容体1型(AT1)が内因性に発現していることを確認したことから、本研究では、SF-1誘導性ステロイド産生細胞をA IIにて刺激し、ステロイド産生への影響について検討した。

(2) 副腎不全モデルにおける再生ステロイドホルモン産生細胞の効果

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) 副腎性SCSの診断基準改定のための臨床研究 (H25)

コルチゾールの測定は九大、福大ともにEIA(エクルーシス、ロシュ)であったことから同一評価が可能と考えられた。まずDex 1mg負荷後の血中コルチゾール値と各基準項目との関係を検討した。負荷後血中コルチゾール値をほぼ1.0刻みに(米国指針のカットオフ値1.8を考慮し、一部変則的) ①0~0.9 ②1.0~1.7 ③1.8~2.9 ④3.0~3.9 ⑤4.0~4.9 ⑥5.0~の6層に分け、以下の5項目を満たす患者の割合をそれぞれの層別に算出した。項目は(1)血中DHEA-S低値 (2)尿中遊離コルチゾール値 $70\mu\text{g/日}$ 以上 (3)早朝ACTH基礎値 10.0pg/mL 未満 (4)21~23時の血中コルチゾール値

5.0 μ g/dL以上 (5) 上記(3)(4)をともに満たすこととした。次に、上記の各診断項目がどの程度病態を反映しているのか評価するため、高コルチゾール血症により起こりうる高血圧症、耐糖能異常、高コレステロール血症の3つの罹患率を各々検討した。診断基準は以下によった。高血圧症はI度以上(収縮期血圧140mmHg以上または拡張期血圧90mmHg以上)を示すか、すでに降圧薬内服中、耐糖能異常は75g-OGTTにて境界型または糖尿病型と診断されたか、空腹時血糖110mg/dL以上または随時血糖200mg/dL以上、あるいはすでに糖尿病と診断され加療中、高コレステロール血症はFriedewaldの計算式により算出したLDL-C値140mg/dL以上または内服加療中を疾患有りと判断した。最後に上記の結果をもとに、Dex 1mg負荷の新カットオフ値を含む新診断基準を作成し、従来基準との比較検討を行った。

2) PAに関する臨床研究 (H24)

2009年4月1日より2012年8月31日までの間、当科に入院した高血圧合併2型糖尿病患者のうち、入院時に安静臥床下でARRを測定された患者124例を対象とした。ARR測定時の投与降圧剤は多岐にわたるが、ARR測定時には安全性への配慮から降圧薬の中止や変更は行っていない。ARRデータ判明後、ARR \geq 200を満たす患者に対し、降圧薬をカルシウムチャネルブロッカー(CCB)に変更し、3日後より迅速ACTH負荷試験、立位-フロセミド負荷試験、カプトプリル負荷試験を行い、3試験中、2試験以上の陽性例をPA確定診断とした。迅速ACTH負荷試験ではPACの最大値200pg/ml以上かつアルドステロン最大値/コルチゾール比8.5以上で陽性と判断した。立位-フロセミド負荷試験では負荷後のPRAが2.0ng/ml \cdot hr以下を陽性とし、カプトプリル負荷試験で負荷ARR \geq 200で陽性とし

た。次に、PA群と非PA群に分け、種々の因子に関して、2群間で比較検討した。高血圧合併糖尿病患者の第一選択薬となっているARBによるARRへの影響も検討した。さらに、同期間、当科で経験した43例のPA患者における耐糖能異常例の特徴を検討した。統計学的検討は、unpaired t-test及び、logisticモデルによる回帰分析を用いた多変量解析、Fisher検定を用いて行い、 $p < 0.05$ を有意差有りとした。

3) ステロイド産生細胞再生研究 (H23, H25)

(1) AIIによるステロイド産生能の検討

ヒト骨髄単核球(Lonza社)を間葉系幹細胞用培地(Invitrogen社)にて4週間培養し、実験に用いた。レンチウイルスベクタープラスミド(CSII-EF-RFA-IRES2-Venus)(理研バイオリソースセンターより供与)のEF1 α プロモーター下流にヒトSF-1/Ad4BP 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-SF-1またはCSII-EFをコトランスフェクションし、培養3日目の培地を回収しウイルス液とした。24-well collagen type 1 plateの1ウェルあたり 1×10^4 間葉系幹細胞を播種し、MOI=20にて一晚感染後、培地交換した。感染より11日目にAngIIを含む培地にて細胞を刺激し、13日目に培養上清を回収した。細胞よりtotal RNAを調整した。EIAキット(Cayman chemical社)にて、培地中のホルモン濃度を定量した。また細胞よりtotal RNAを精製し、RT後、リアルタイムPCRにてステロイド合成酵素の発現量を β -actinを相対発現比として検討した。

(2) 副腎不全モデルにおける再生ステロイドホルモン産生細胞の効果

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。同上のヒトSF-1 cDNA搭載レンチウイルスを293T細胞へ遺伝子導入し、培養3日目の培地を回収しウイルス液とした。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。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。EIAキット (Cayman chemical社) にて、血漿コルチコステロン濃度を測定した。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。組織よりtotal RNAを抽出し、RT後、SLightCycler480 (RocheDiagnosis) にてPCRを行い、PCR産物を2% agarにて電気泳動した。

(倫理面への配慮) 臨床研究は臨床研究審査会の承認を得て倫理指針を遵守した。実験動物を用いる研究では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) 副腎性SCSの診断基準改定のための臨床研究 (H25)

Dex 1mg負荷後血中コルチゾール値をほぼ1.0刻みに層別化し、それぞれの層で各基準の陽性者数を求め、さらにカットオフ値を $1.8 \mu\text{g/dL}$

または $3.0 \mu\text{g/dL}$ とした場合の5つの基準項目の陽性率を算出した。その結果、(1)早朝血中ACTH 10pg/ml 未満と(2)21–23時の血中F値 $5.0 \mu\text{g/dl}$ 以上の有用性が高く、両基準を満たす症例は、Dex 1mg負荷後コルチゾール値 $1.7 \mu\text{g/dL}$ 以下の層では認めず、Dex1mg負荷の結果との整合性が示唆された。 $1.8 \mu\text{g/dL}$ 以上の層の34例中、19例 (55.9%) が両基準を満たした。しかし早朝ACTH $\geq 10\text{pg/ml}$ を呈しつつもCRH負荷試験に対する反応が2倍未満と低下していた2症例 (ACTH基礎値 $21.3 \rightarrow$ 負荷後 28.2pg/ml 、基礎値 $17.8 \rightarrow$ 負荷後 28.6pg/ml) が存在したことから、ACTHの抑制は早朝の基礎値のみでは判定すべきではなく、CRH負荷試験に対する反応低下も考慮するべきと考えられた。 1mgDST F値 $1.8 \mu\text{g/dl}$ 以上を必須項目とした場合、(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、(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。この基準を用いて、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。また、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。これら3項目中1項目のみ陽性の場合にはSCS疑い例として他の所見 (血中DHEA-S値、尿中遊離コルチゾール、副腎シンチグラフィ、臨床所見) を参考に診断することを提唱する。この新基準を用いると、従来非機能性として診断されていた97例中2例が新たにSCSと診断された。いっぽう従来基準でSCSと診断されていた22例中4例は新基準でSCS疑い例となった。全

体では、119例の副腎偶発腫のうち20例が新基準によりSCSと診断された。

2) PAに関する臨床研究 (H24)

ARRが測定された124例2型糖尿病合併高血圧症例を対象とした。平均年齢は、 63.01 ± 12.08 歳であり男性79例(63.7%)、糖尿病歴は 12.84 ± 11.3 年、高血圧歴は 10.43 ± 10.97 年であった。124例中ARRが200以上の症例は23例であったが、このうち、糖尿病により明らかな低レニン・低アルドステロン血症のために、ARR比が見かけ上200以上を呈した6症例(何れもPAC70.3pg/ml以下)は負荷試験対象からは除外した。残りの17例の負荷試験の結果、14例中11例が3つの負荷試験の全てに陽性、残り3例において3試験中2試験で陽性所見を示し、これら14例を最終的にPAと診断した。高血圧合併糖尿病患者124例中、PAは14例(11.3%)であった。

PA合併糖尿病患者の特徴を検討するために、PA群14例と非PA群110例に分け比較検討した。両群の男女比、年齢に有意差は無かった。糖尿病歴はPA群(n=14)で 5.21 ± 6.51 年と非PA群(n=106)の 13.73 ± 11.43 年と比べて有意に短く、高血圧歴は両群間に有意差は無かった。さらに、Logisticモデルによる回帰分析を用いた多変量解析でも、寄与因子としてPA群では糖尿病歴が有意に短かった。糖尿病に先行して高血圧を発症していた症例は、両罹病歴が得られたPA群14例中の8例で認めたのに対し、両罹病歴が得られた非PA群では91例中の17例に認めた。すなわちPA群では非PA群に比して高血圧先行例が多く、Fisher検定でも両群間に有意差を認めた(P=0.013)。血清K値は、PA群で 3.82mEq/L 、非PA群で 4.17mEq/L とPA群で有意に低値であったが、明確な低K血症を示した1例を除いては14例中13例(92.8%)の症例

で正常範囲(3.5mEq/dl 以上)を示した。また、PA群では有意にFBS、HbA1cが低値であったが、尿中Cペプチドの一日定量値は有意差を認めなかった。

さらに、ARB、CCB内服がPAC、PRAに及ぼす影響を検討したが、Fisher検定で有意差を認めなかった。更に、PAC、PRA、ARR値を124例全体で検討したところ、ARB内服群、非内服群間で有意差を認めなかった。次に、PA群、非PA群のそれぞれについて同様の検討を行ったがARB内服の有無で両群間のARRに有意差を認めなかった。

次に、当科でPAと診断された43症例のPAについて、糖尿病群15例、非糖尿病群28例に分け、両群間での種々の因子に関する比較検討を行った。t検定で群間比較したところDM合併例では非合併群に較べ有意に高齢(66.45 ± 8.43 vs 55.07 ± 10.53 歳)であり、高血圧病歴(17.44 ± 11.28 vs 7.55 ± 9.87 年)も長い事が判明した。

3) ステロイド産生細胞再生研究 (H23, H25)

(1) AIIによるステロイド産生能の検討

リアルタイムPCRにて、骨髄由来間葉系幹細胞および脂肪組織由来間葉系幹細胞において、AT1の発現レベルを検討した結果、MOI=50, 100, 200にてAT1 mRNA 発現レベルの増加を認めた。SF-1誘導性ステロイド産生細胞をAIIにて刺激したところ、AIIによってSF-1誘導性ステロイド産生細胞の培地中のコルチコステロン、アルドステロン濃度が増加した。間葉系幹細胞におけるCYP11B2 cDNAはリアルタイムPCRにて検出され、SF-1の遺伝子導入のみではその発現量に変化を認めなかったが、AIIによってCYP11B2の発現誘導を認めた。AIIによるアルドステロン産生亢進はAT1阻害薬によって消失した。これらの結果より、SF-1誘導性

ステロイド産生細胞はAII-AT1受容体経路によりステロイド産生が調節されていることが判明した。

(2) 副腎不全モデルにおける再生ステロイドホルモン産生細胞の効果

両側副腎摘出マウスは8日以内に全例死亡するが、SF-1誘導性ステロイド産生細胞移植群は、コントロール細胞移植群の1/9例に比して、44.4%(4/9)が少なくとも30日目まで生存した。移植7日目の血漿Bは、SF-1誘導性ステロイド産生細胞移植群 2.62 ± 1.46 、コントロール細胞移植群 0.06 ± 0.06 ng/mlであった。移植後30日間生存マウスの左腎摘出で全例が8日以内に死亡した。移植再生副腎細胞から産生されたBにより、副腎不全モデルをレスキューしたと考えられる (H25)。

D. 考察

1995年に本班で策定された診断基準は低コルチゾール域の血中コルチゾールの信頼性の問題や米国内分泌学会との診断基準との不統一性等の問題点が指摘されている。本私案ではその点を考慮し、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が、他条件の設置により、現行の診断基準同様、耐糖能異常の観点から、臨床的意義のあるSCS症例を診断することは可能と考えられた。

今回の検討により、高血圧合併糖尿病患者の少なくとも11.3%にPAが合併している事実が確認された。高血圧集団におけるPA合併頻度の検討は、施設研究として数多く存在するが、総じて10%前後と理解されている。糖尿病は、種々の成因により高血圧合併症を起こしやすく、そのために日常臨床では高血圧成因とし

て二次的要因を想起しにくい疾患であると言える。糖尿病患者では、PAと診断されずに見逃されている高血圧合併症例群は少なくないと予想され、ARRによるPAの積極的スクリーニングの臨床的意義は大きいと考えられる。内服降圧薬の種類によっては、PRA、PACが変化しARRに影響を与え偽陰性や偽陽性が増える可能性が指摘されている。ARB、ACE (angiotensin converting enzyme) 阻害薬、抗アルドステロン薬、利尿薬、 β -blockerは特にPRA値に影響を与えるため、比較的影響の少ないCa拮抗剤、 α -遮断薬投与下でのPA精査が推奨されている。糖尿病診療においては、腎保護の観点からARBの使用頻度が高い現状がある。今回の研究から少なくとも比較的、定型的なPA群を糖尿病合併高血圧群からスクリーニングする上では、降圧剤の種類の違いや服用の有無は大きな障害にならないと考えられた。PA合併糖尿病患者の特徴として糖尿病歴はPA合併群で有意に短かった。また糖尿病に先行して高血圧を発症していた症例群は、Fisher検定で有意差を認め、PA群では57.1%、非PA群では18.7%と、PA合併群で有意に高血圧先行例が多かった。糖尿病が原因の高血圧であれば、高血圧は糖尿病と同時期発症もしくは後年発症になると考えられるので、PA合併糖尿病例では高血圧先行例が多いという事実は、高血圧合併糖尿病症例でPA合併を積極的に疑うきっかけとして参考になる。

最後に同じ研究期間内に当科で最終的にPAと診断されたPA患者43例を対象に糖尿病合併例と非合併例に分け群間比較した。糖尿病非合併群に比して糖尿病合併群ではPA診断に至るまでの高血圧罹病期間が長く、PA診断年齢も有意に高かった。高血圧は併存している糖尿病によるものとの先入観から、結果的にPAの診断が遅れる傾向にある可能性が示唆された。

骨髄間葉系幹細胞におけるAT1の発現を確認した。AII刺激によるステロイド産生への影響について解析した結果、AIIはLV-SF1感染細胞のステロイド産生を亢進した。AIIによるステロイド産生亢進は、AT1ブロッカーLosartanとの同時投与でキャンセルされたため、AIIによるステロイド産生亢進はAT1を介すると考えられる。CYP11A1などのステロイド合成酵素はSF-1の導入によって誘導されるが、CYP11B2はSF-1の導入のみでは発現誘導されず、AIIによって顕著に誘導された。AngIIは、細胞内カルシウム濃度を増加させカルモジュリン-CaMKシグナルを活性化し、転写因子ATF1、CREBがリン酸化されて転写調節領域(Ad1)に結合してCYP11B2の転写を促進する。LV-SF1感染細胞ではAIIによって顕著なCYP11B2の発現誘導を示した。間葉系幹細胞におけるCYP11B2の発現誘導には、SF-1とAIIが必要と考えられる。また脂肪組織由来の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。副腎臓器再生は実現していないが、細胞レベルでの医療応用を見据えた発展が期待される結果であった。

E. 結論

臨床的に副腎性SCSの新しい診断基準を提唱し、糖尿病合併高血圧症におけるPAの頻度を明らかにした。また再生医療の観点から、間葉系幹細胞にSF-1遺伝子を導入し、新たにAIIによるステロイド産生機構を明らかにすると同時に、この細胞の移植によりマウス副腎不全モデルをレスキューし得ることを示した。

F. 参考文献

1. 名和田新：厚生省特定疾患「副腎ホルモン産生異常症」調査研究班 平成7年度研

究報告書 1996.pp234-235

2. Odagiri E, Naruse M, Terasaki K et al. : The diagnostic standard of preclinical Cushing's syndrome: evaluation of the dexamethasone suppression test using various cortisol kits. *Endocr J*, 51: 295-302, 2004
3. Katabami T, Obi R, Shirai N, et al: Discrepancies in results of low-and high-dose dexamethasone suppression tests for diagnosing preclinical Cushing's syndrome. *Endocr J*, 52: 463-469, 2005
4. Nieman LK, Biller BM, Findling JW, et al. : The diagnosis of Cushing's syndrome : an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 93: 1526-1540, 2008
5. Nishikawa T, Omura M, Saito J, Matsuzawa Y: Primary aldosteronism: comparison between guidelines of the Japanese and the US Endocrine Society. *Expert Rev Endocrinol Metab* 7: 637-645, 2012
6. Reincke M, Meisinger C, Holle R, Quinkler M, Hahner S et al.: Is primary aldosteronism associated with diabetes mellitus? Results of the Results of the German Conn's Registry. *Horm Metab Res* 42:435-439, 2010
7. Iimura O: Insulin resistance and hypertension in Japanese. *Hypertension Res* 19 suppl 1: S1-8, 1996
8. Morohashi KI, Omura T: Ad4BP/SF-1, a transcription factor essential for the transcription of steroidogenic cytochrome P450 genes and for the establishment of the reproductive function. *Faseb J* 10:1569-1577, 1996
9. Parker KL, Schimmer BP: Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev*

- 18:361-377, 1997
10. Tanaka T, Gondo S, Okabe T, Ohe K, Shirohzu H, Morinaga H, Nomura M, Tani K, Takayanagi R, Nawata H, Yanase T : Steroidogenic factor 1/adrenal 4 binding protein transforms human bone marrow mesenchymal cells into steroidogenic cells. J Mol Endocrinol 39:343-350, 2007
 11. Gondo S, Okabe T, Tanaka T, Morinaga H, Nomura M, Takayanagi R, Nawata H, Yanase T: Adipose tissue-derived and bone marrow-derived mesenchymal cells develop into different lineage of steroidogenic cells by forced expression of steroidogenic factor 1. Endocrinology 149:4717-4725, 2008
 12. Gondo S, Yanase T, Okabe T, Tanaka T, Morinaga H, Nomura M, Goto K, Nawata H : SF-1/Ad4BP transforms primary long-term cultured bone marrow cells into ACTH-responsive steroidogenic cells. Genes Cells 9:1239-1247, 2004

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1) 国内 (主なもの)

(論文発表)

1. 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
2. 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

(学会発表)

1. 柳瀬敏彦: 教育講演17「グルココルチコイドの作用と副作用: ステロイド性糖尿病を中心に」第84回日本内分泌学会学術総会(神戸) 2011.4.21-23
2. 柳瀬敏彦, 明比祐子: クリニカルアワー2「副腎不全の治療」QOL, ホルモン動態から見たステロイド補充療法のEBM 第84回日本内分泌学会学術総会(神戸) 2011.4.21-23
3. 柳瀬敏彦: クリニカルアワー6 厚生労働省難治性疾患克服研究事業 各研究班トピックス発表 厚労省・副腎ホルモン産生異常に関する調査研究班の研究活動紹介 第84回日本内分泌学会学術総会(神戸) 2011.4.21-23
4. 柳瀬敏彦: クリニカルアワー9 性ステロイドとメタボリックシンドローム アンδροゲンの抗肥満作用の基盤研究と生活習慣病創薬 第84回日本内分泌学会学術総会(神戸) 2011.4.21-23
5. 柳瀬敏彦: 教育講演7「糖尿病診療のピットフォール: 内分泌性糖尿病の病態」第54回日本糖尿病学会年次学術集会(札幌) 2011.5.19-21
6. 柳瀬敏彦: シンポジウム18「メタボを防ぐホルモン力」アンδροゲンの抗メタボ作用の基盤研究 第11回日本抗加齢医学会総会(京都) 2011.5.29
7. 柳瀬敏彦: 教育講演 The Year 6「The Year in 副腎」第21回臨床内分泌代謝Update(浜松) 2012.1.27-28
8. 柳瀬敏彦: クリニカルアワー6 厚生労働省難治性疾患克服研究事業各研究班ト

- ピックス発表 厚労省・副腎ホルモン産生異常に関する調査研究班の研究活動紹介 第85回日本内分泌学会学術総会（名古屋）2012.4.20
9. 柳瀬敏彦：クリニカルアワー9 性ステロイドとメタボリックシンドローム アンδροゲンの抗肥満作用の基盤研究と生活習慣病創薬 第85回日本内分泌学会学術総会（名古屋）2012.4.21
 10. 明比祐子, 柳瀬敏彦：クリニカルアワー8 コルチゾール代謝・産生の軽度異常時の対処:軽症副腎不全の診断と治療 第85回日本内分泌学会学術総会（名古屋）2012.4.21
 11. 柳瀬敏彦：特別講演「ステロイドホルモン産生異常症に関する幾つかの話題」第13回日本内分泌学会近畿支部学術集会（大阪）2012.10.20
 12. 柳瀬敏彦：シンポジウム3 長寿社会における性差医学・医療の現状と展望「アンδροゲンから見た生活習慣病治療戦略」第6回日本性差医学・医療学会学術集会（仙台）2013.2.1-2
 13. 柳瀬敏彦, 高田彩子, 福田高士, 野見山崇, 明比祐子：シンポジウム7 下垂体ホルモン補充療法の工夫と長期効果 原発性・続発性副腎機能不全症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 第23回間脳下垂体腫瘍学会（鹿児島）2013.3.16
 14. 柳瀬敏彦：シンポジウム2「ステロイドホルモン研究Update」座長兼演者 間葉系幹細胞からのステロイド産生細胞再生と副腎不全モデルにおける移植研究の試み 第86回日本内分泌学会学術総会（仙台）2013.4.26
 15. 柳瀬敏彦:クリニカルアワー8「厚生労働省班研究トピックス」原発性アルドステロン症、副腎性サブクリニカルクッシング症候群の全国疫学調査（二次調査再解析結果）第86回日本内分泌学会学術総会（仙台）2013.4.26
 16. 柳瀬敏彦:教育講演「内分泌疾患と糖尿病」第56回日本糖尿病学会年次学術総会(熊本) 2013.5.16-18
 17. 柳瀬敏彦：副腎偶発腫瘍の鑑別と治療 日本内科学会生涯教育講演会Aセッション（第1回）（大阪）2013年5月19日
- 2) 海外
（論文発表:主なもの）
1. Bao B., Jiang J., Yanase T., Nishi Y., Morgan J. R. : Connexon-mediated cell adhesion drives microtissue self-assembly. *FASEB J* 25:255-64, 2011
 2. Qiu Y., Tanaka T., Nawata H., Yanase T.: Dihydrotestosterone inhibits lectin-like oxidized-LDL receptor-1 expression in aortic endothelial cells via a NF-kappaB/AP-1-mediated mechanism. *Endocrinology* 153:3405-15, 2012
 3. Akehi Y, Kawate H, Murase K, Nagaishi R, Nomiyama 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
 4. Murase K, Nagaishi R, Takenoshita H, Nomiyama 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.
 5. 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
6. 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
 7. 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
 3. Yanase T : Plenary lecture 6 Androgen and Metabolic syndrome. The 10h Annual Congress of Endocrinology (SuZhou, China) 8.18-20, 2011

I. 知的所有権の出願・取得状況
(予定を含む)

なし

学会発表

1. Yanase T : Symposium 6: Subclinical adrenal diseases: Diagnosis and treatment of subclinical Cushing syndrome (SCS). International Congress of Endocrinology 2012 5.5-9, 2012 (Florence, Italy)
2. Yanase T : Symposium 12: Hormonal replacement therapy, DM and metabolic syndrome. Androgen and metabolic syndrome. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer. 11.15-17, 2012 (Kanazawa, Japan)

図1 SCS新診断基準の提唱アルゴリズム(私案)

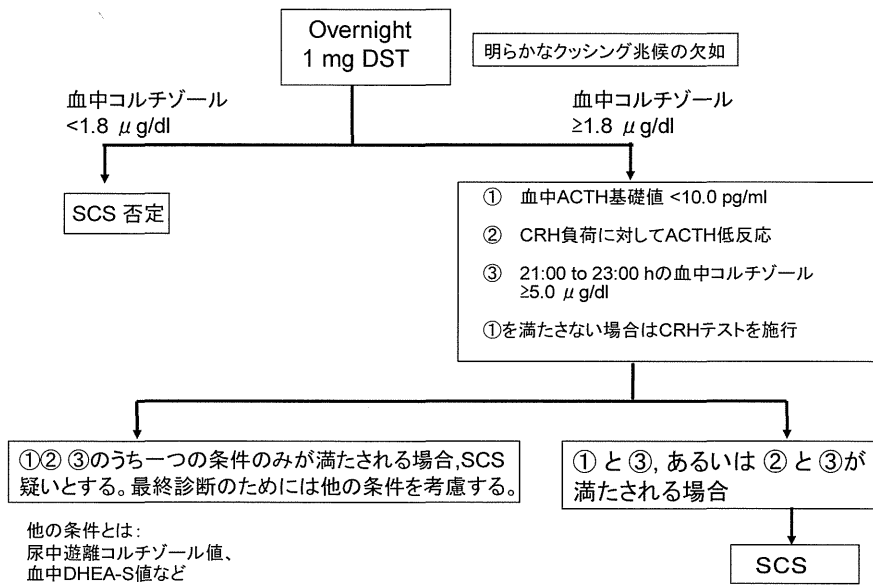


表1 ARB内服がPRA, PAC, ARRに及ぼす影響

		ARB (+)	ARB (-)	p value
total	n	58	66	
	PRA (± SD)	2.77 (± 4.57)	1.62 (± 2.89)	0.095
	PAC (± SD)	76.90 (± 65.2)	96.08 (± 67.7)	0.118
	ARR (± SD)	128.9 (± 190.7)	246.4 (± 545.9)	0.122
PA	n	5	9	
	PRA (± SD)	0.24 (± 0.05)	0.28 (± 0.22)	0.720
	PAC (± SD)	163.4 (± 73.5)	170.4 (± 93.6)	0.887
	ARR (± SD)	666.1 (± 207.3)	1087 (± 1188.6)	0.456
Non PA	n	53	57	
	PRA (± SD)	3.00 (± 4.71)	1.83 (± 3.06)	0.123
	PAC (± SD)	68.75 (± 58.7)	84.34 (± 55.1)	0.153
	ARR (± SD)	78.22 (± 78.6)	113.7 (± 112.6)	0.060

The effects were examined in all patients, and in patients with or without PA. P values were determined using Student's independent-samples t-test and were considered to be statistically significant at P < 0.05.

ARB, angiotensin II receptor blocker; DM, diabetes mellitus; PA, primary aldosteronism; PAC, plasma aldosterone concentration; PAR, plasma renin activity; ARR, PAC/PRA ratio

副腎皮質ステロイド合成酵素関連遺伝子発現調節に關与する 転写因子の解析

研究分担者 岩崎泰正 高知大学保健管理センター
研究協力者 西山 充 高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科
田口崇文 高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科
次田 誠 高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科
中山修一 高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科
岡崎瑞穂 高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科

【研究要旨】

【背景】副腎皮質球状層では主としてアンジオテンシンII (AII)・AT1受容体由来のシグナルがCYP11B2遺伝子・蛋白の発現を介してアルドステロンの合成を、また副腎皮質束状層においてはACTH・melanocortin receptor type 2 (MC2R) 由来のシグナルがCYP11B1遺伝子・蛋白の発現を介してコルチゾールの合成を調節している。しかし、前者においてAII刺激により生じた細胞内Ca⁺濃度の上昇がいかなる転写因子を介してCYP11B2遺伝子の発現を調節するのか、また後者においてMC2Rの作用に不可欠な補助因子と機能するmelanocortin receptor accessory protein (MRAP) の発現がいかに制御されているのか、副腎皮質ステロイド合成調節機構に関しては、未だ不明な点が数多く残されている。

A. 方法

ヒトCYP11B2遺伝子およびMRAP遺伝子の転写調節領域、各2kbをクローニングし、レポータープラズミドに組み込んだコンストラクトを作成した。これらをヒト副腎皮質由来H295R細胞に遺伝子導入した状態で、AIIによるCYP11B2遺伝子発現に關与する転写因子、ならびにACTHによるCYP11B1遺伝子発現制御に關連するMRAP遺伝子、この両者の転写調節に關与する転写因子の同定を、それぞれ試みた。

B. 結果

1. CYP11B2遺伝子の転写に關しては、従来から報告されている誘導型転写因子Nur77/Nurr1共発現の効果は、本実験系で

は軽微であった。一方、細胞内Ca⁺の上昇で活性化される転写因子NFATの共発現は、CYP11B2の転写を強力に促進した。またCYP11B2遺伝子の転写調節領域にNFAT結合配列を認め、その部位への結合がelectromobility shift assay (EMSA) 法で確認された。

2. MRAP遺伝子の転写に關しては、cAMP・protein kinase A (PKA) による転写誘導は確認されたが、CREBの關与は否定的であった。一方ACTH/MC2Rシグナル伝達系の活性化により発現が誘導される誘導型転写因子AP1 (Fos/Jun) は、MRAP遺伝子の転写活性を強力(10倍以上)に促進した。またMRAP遺伝子の転写調節領域に