

定キットは全て7位抗体（7位をキャリア蛋白結合位置とし、これを免疫源とした抗体）を使用しており、以前使用されていた3位抗体に比して、胎児副腎由来のステロイドとの交叉反応は低くなっている。しかし、本症例の測定に使用した7位抗体のキットでも、17OHPregとの交叉率は1.04%となっている（私信）。新生児期の17OHPreg濃度は測定できなかったが、術前には著しい高値（163.3ng/mL）を示していた。これに交叉率を掛け合わせた単純計算では、17OHPの測定値を約1.7ng/mL分だけ引き上げたこととなる。実際には測定方法の違いで交叉率が変動する可能性があり、また、17OHPregと同等の交叉反応性を有する17OHPreg硫酸抱合体の影響も考慮する必要がある。したがって、本症例の17OHP高値の1つの原因は、腫瘍から産生された17OHPregによる交叉反応と考えられる。

一方で、LC-Ms/Msにて測定した17OHPも、濾紙血・血清ともに高値であり、腫瘍からは17OHPも分泌されていたことが示唆された。日齢5の濾紙血17OHP 13.5ng/mL (LC-Ms/Ms) は、札幌市衛生研究所のデータでは、正常対照満期産児の値より明らかに高値であり、精査にて21OHDと診断された症例に比肩できる値であった。⁹⁾

以上より、本症例で濾紙血17OHPが高値であった理由の第一は、腫瘍から17OHPが分泌されていたことであり、更には、同じく腫瘍由来の17OHPregおよびその硫酸抱合体の交叉反応も寄与したものと考えられる。このことを更に類推すると、本児の腫瘍では、 3β 水酸化ステロイドデヒドロゲナーゼおよび21水酸化酵素の活性が低かったことが予想される。LC-Ms/Msで測定した11DOF濃度が低値であったことも、この仮説に矛盾しない。胎児副腎皮質細胞では両酵素の活性が低い⁹⁾ことが知られており、先天性である本児の腫瘍が胎児副腎に由来していることが示唆される。実際に、小児期の副腎皮質腫瘍は、残存した胎児副腎皮質細胞を発生母地としている可能性を指摘している報告¹⁰⁾もある。

一方、テストステロンが高値であったことが

ら、腫瘍組織の 17β 水酸化ステロイドデヒドロゲナーゼ活性が高いことが予想される。成人におけるテストステロン産生性副腎皮質腫瘍において、 3β 水酸化ステロイドデヒドロゲナーゼ活性が低い症例¹¹⁾や 17β 水酸化ステロイドデヒドロゲナーゼ活性が高く、かつ21水酸化酵素活性が低い症例が報告されている。^{12,13)}本症例においても、正常副腎皮質が、腫瘍化に伴って酵素発現パターンの変化を生じ、 17β 水酸化ステロイドデヒドロゲナーゼ活性が亢進した可能性が考えられた。同様に、 3β 水酸化ステロイドデヒドロゲナーゼと21水酸化酵素の活性低下には、胎児副腎皮質の本来の性質だけでなく、腫瘍化による酵素発現パターンの変化も寄与しているのかもしれない。

濾紙血17OHPを呈した副腎腫瘍の報告は、千葉県の子児例⁹⁾（濾紙血17OHP 45ng/mL）に次ぎ、本例が世界で2番目となる。千葉県の症例は、胎児診断されていたアンドロゲン産生性副腎腫瘍で、新生児期には男性化は欠如していたとされている。本症例でも、初診時にクッシング徴候や男性化徴候は認めず、血中コルチゾール濃度も正常範囲であった。しかし、ACTH低値に着目できていれば、より早期に診断できた可能性がある。副腎腫瘍は希少な疾患であるが、17OHP高値の鑑別にあたっては、その可能性も念頭に置き、特に21OHDとして矛盾がある場合などは、細心の注意が必要であると考えられた。

謝 辞

LC-Ms/Msによる検討をしていただいた札幌市衛生研究所、藤倉かおり先生、山岸卓弥先生ならびに尿中ステロイドプロファイルを測定していただきました慶応義塾大学病院中央臨床検査部、本間桂子先生に深謝いたします。

参考文献

- 1) Therrell BL: Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 30(1): 15-30, 2001.
- 2) 高澤 啓, 鹿島田健一, 松原洋平他: マスクリーニングを契機に発見された 3β -水

- 酸化ステロイド脱水素酵素欠損症の1例
日本小児科学会雑誌 116(2): 440, 2012.
- 3) Fukami M, Hasegawa T, Horikawa R, et al: Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency in three patients initially regarded as having 21-hydroxylase deficiency and/or aromatase deficiency: diagnostic value of urine steroid hormone analysis. *Pediatr Res.* 59(2): 276-80, 2006.
- 4) Hishiki T, Kazukawa I, Saito T, et al: Diagnosis of adrenocortical tumor in a neonate by detection of elevated blood 17-hydroxyprogesterone measured as a routine neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia: a case report. *J Pediatr Surg.* 43(10): e19-22, 2008.
- 5) 田久保憲行, 橘田一輝, 横関祐一郎他: upd (11) pat で診断された Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) の1症例 日本内分泌学会雑誌 86(3): 703, 2012.
- 6) 長崎啓祐, 佐藤英利, 野村道代, 帆苺恵子, 小田辺なお子, 浅見 直: 新生児マススクリーニングで17-OHP 高値を呈した Beckwith-Wiedemann 症候群の2例 日本マス・スクリーニング学会誌 22(2): 181, 2012.
- 7) Wieneke JA, Thompson LD, Heffess CS: Adrenal cortical neoplasms in the pediatric population: a clinicopathologic and immunophenotypic analysis of 83 patients. *Am J Surg Pathol.* 27(7): 867-81, 2003.
- 8) 藤倉かおり, 山岸卓弥, 野町祥介他: 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 日本マス・スクリーニング学会誌 21(2): 75(173), 2011.
- 9) Mesiano S, Jeffe RB: Developmental and Functional Biology of the Primate Fetal Adrenal Cortex. *Endocr Rev.* 18(3): 378-403, 1997.
- 10) Wilkin F, Gagné N, Paquette J, Oligny LL, Deal C: Pediatric adrenocortical tumors: molecular events leading to insulin-like growth factor II gene overexpression. *J Clin Endocrinol Metab.* 85(5): 2048-56, 2000.
- 11) Sakai Y, Yanase T, Hara T, Takayanagi R, Haji M, Nawata H: Mechanism of abnormal production of adrenal androgens in patients with adrenocortical adenomas and carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 78(1): 36-40, 1994.
- 12) Schteingart DE, Woodbury MC, Tsao HS, McKenzie AK: Virilizing syndrome associated with an adrenal cortical adenoma secreting predominantly testosterone. *Am J Med.* 67(1): 140-6, 1979.
- 13) Leinonen P, Ranta T, Siegborg R, Pelkonen R, Heikkilä P, Kahri A: Testosterone-secreting virilizing adrenal adenoma with human chorionic gonadotrophin receptors and 21-hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf).* 34(1): 31-5, 1991.

受付日:平成24年10月11日
受理日:平成24年11月20日

Androgen-producing adrenocortical tumor in a male neonate detected by neonatal screening with elevated 17- hydroxyprogesterone level.

Takeshi Sato¹⁾, Koji Muroya¹⁾, Junko Hanakawa¹⁾, Yumi Asakura¹⁾, Katsuyuki Matsui²⁾, Yoshihiro Maruo²⁾, Masanori Adachi¹⁾

- 1) Department of Endocrinology and Metabolism, Kanagawa Children's Medical Center
2) Department of Pediatrics, Shiga University of Medical Science

原 著

X連鎖性低リン血症性くる病による低身長に対して 成長ホルモン治療が有効であった4症例

東京都立小児総合医療センター内分泌代謝科¹⁾, 松戸市立病院小児医療センター小児科²⁾,
あいち小児保健医療総合センター内分泌代謝科³⁾

齊藤 友康¹⁾²⁾ 井澤 雅子³⁾ 武田 良淳¹⁾
山田 誠¹⁾ 後藤 正博¹⁾ 長谷川行洋¹⁾

要 旨

X連鎖性低リン血症性くる病(XLH)は近位尿細管でのリン再吸収障害とビタミンD代謝障害が主な病態で低リン血症性くる病の大部分を占める。多くの症例は歩行開始後にO脚や低身長などの症状を契機に発見される。低リン血症を認めるにも関わらず、1,25(OH)₂Dの上昇は認めず、血清カルシウム値およびintact PTH値は正常である。この病態に対し、従来よりリン製剤とビタミンD製剤による治療が行われ、骨のくる病変化の改善が報告されている一方、最終身長は低く終わる症例が存在する。近年、低身長のXLH患者を対象に成長ホルモン(GH)治療が行われ、身長SD値の改善を認めたとの報告が散見される。本論文では、従来の治療によっては低身長が改善しにくいと思われたXLH患者において、低身長に対するGH治療の効果を後方視的に確認した。対象はPHEX遺伝子異常が確認されている3家系4症例(男2人、女2人)である。中性リン酸塩とビタミンD製剤の内服に加え、GHを0.254~0.372mg/kg/weekで投与し、身長SD値の変化を調べた。最終身長まで確認できた症例1は身長SD値が-2.6SDから-1.0SDと10年4か月の治療期間で+1.6SD値の改善を認めた。他の3症例に関しても、+1.4~+2.7SDの身長SD値の改善(治療期間:2年5か月~4年1か月)を認めた。本論文で検討したXLHの4症例に於いて従来のリン製剤、ビタミンD製剤と併用した成長ホルモン治療は低身長に対して有効であった。

キーワード: PHEX, 低身長, 成長ホルモン, リン製剤, 活性型ビタミンD製剤

はじめに

X連鎖性低リン血症性くる病(XLH: X-linked hypophosphatemic rickets)は近位尿細管でのリン再吸収障害とビタミンD代謝障害が主な病態である。O脚や低身長などの症状を契機に発見される。X連鎖性の遺伝形式をとり、原因遺伝子としてPHEX(phosphate regulating gene with homologies to endopeptidase on the X chromosome)が同定されている。従来、リン製剤とビタミンD製剤により治療が行われ、骨のくる病変化は改善する¹⁾。身長予後に関しては、上述した従来の治療下での最終身長の報告が複数存在し、 $-1.69 \pm 1.11SD$ ²⁾から $-2.8 \pm 0.6SD$ ³⁾と最終身長に対する治療効果は必ずしも一定していない。XLHに対し

て従来の治療に加え、GH治療を行い成長率の改善を認めたという報告は少なくとも4報存在する³⁾⁻⁵⁾。そのうち最終身長まで評価した2報³⁾⁴⁾の対象は臨床症状、家族歴および生化学的検査より診断された散発例を含む、いわばXLH疑い患者であり、PHEX遺伝子異常は確認されていない。

今回、従来の治療下では成長率の低下が進行したPHEX遺伝子異常4症例を対象に、GH治療の低身長に対する有効性を報告する。

対象と方法

中性リン酸塩と1 α (OH)Dの内服による治療が2年間以上行われ、内服コンプライアンスに問題がなかったにも関わらず身長SD値が-2.5SD以下へ成長率低下の進行がみられたPHEX遺伝子異常症3家系4症例(男2人、女2人)を対象とした(表1,表3)。症例1,2は新規の変異、症例3,4は既報の変異である⁷⁾。

4症例のXLH診断時(生後2か月~1歳9か月)の各検査データを表2に示す。GH治療開始時の年齢は3

(平成23年10月21日受付)(平成24年6月23日受理)

別刷請求先: (〒271-8511) 松戸市上本郷4005番地

松戸市立病院小児医療センター小児科

齊藤 友康

E-mail: bukou@wing.ocn.ne.jp

表1 各症例の PHEX 遺伝子変異

	変異	家族歴
症例1 (男性)	IVS20-1G>C	家族歴なし
症例2 (男性)	G575E	母が同疾患
症例3 (女性)	R291X	母が同疾患
症例4 (女性)	R291X	症例4と同一家系 母が同疾患 症例3と同一家系

表2 4症例の低リン血症性くる病診断時の検査データ

	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	ALP (IU/L)	尿中 Ca/Cr	TmPO4/GFR (mg/dL)
症例1 (1歳7か月)	9.3	2.1	6,910	0.03	1.99
症例2 (2か月)	9.7	3.6	2,862	0.23	4.0
症例3 (2歳1か月)	9.8	3.4	1,762	0.11	3.55
症例4 (6か月)	9.6	3.1	2,081	0.06	3.65

※TmPO4/GFRの年齢別基準値: 4.2~7.0 (2か月~12か月), 4.5~5.3 (1歳~3歳)

表3 GH治療開始後の身長SD値の変化

	診断時		GH治療開始時		GH治療後		GH治療期間
	年齢	身長SD値	年齢	身長SD値	年齢	身長SD値	
症例1	1歳7か月	-1.9	5歳5か月	-2.6	15歳9か月	-1.0	10年4か月
症例2	2か月	-1.8	3歳0か月	-2.5	7歳1か月	-1.1	4年1か月
症例3	1歳9か月	-1.3	4歳11か月	-2.7	7歳4か月	-0.6	2年5か月
症例4	6か月	-1.5	3歳4か月	-2.5	5歳9か月	+0.2	2年5か月

歳0か月~5歳5か月で、いずれもGH治療開始前にGH分泌刺激試験によりGH分泌不全は否定されている。

GHはIGF-1値が各年齢の基準値⁸⁾の上限付近になるように、0.254~0.372mg/kg/weekの範囲で投与された。中性リン酸塩(Pとして35.6~120.9mg/kg/day分4)と1α(OH)D(アルファカルシドールとして0.046~0.10μg/kg/day)内服は診断時より投与され、GH治療期間中も継続した。中性リン酸塩の投与量は、定期的になんげリン製剤内服後(0分, 30分, 60分, 90分, 120分)の血清P値およびintact PTHの測定をして決定した。内服後の血清P濃度の上昇幅が思春期前、後でそれぞれ1.5, 1.0mg/dL前後となることを目安とした。また二次性の副甲状腺機能亢進症の出現を避けるために、内服後の血清intact PTH値が正常上限の2~3倍以上にならないようにすることも留意した。ビタミンD製剤の投与量は尿中カルシウム(mg/dL)/

クレアチニン(mg/dL)比が0.2~0.3を超えないように調整した。なお、中性リン製剤およびビタミンD製剤および成長ホルモンの投与は、都立清瀬小児病院倫理委員会の承認を得て行った。

各症例のGH投与前後の身長SD値およびTmP/GFR値を後方視的に調べた。また、長期間の経過を追跡できた症例1に関してはIGF-1値とTmP/GFR値の関係について検討した。GH治療による有害事象の出現の有無については全症例について耐糖能異常、骨年齢の進行および側弯の有無などを定期的に診察および検査して確認した。耐糖能異常については空腹時血糖、HbA1cおよび尿糖の有無、側弯の有無については胸腰部レントゲンにより確認した。

結 果

GH投与により4症例いずれも身長SD値の改善を認めた(表3, 図1)。GH治療期間は2年5か月間から

10年4か月間と幅があるものの、GH治療開始時の身長SD値 $-2.5SD \sim -2.7SD$ がGH治療開始後には身長SD値 $-1.1SD \sim +0.2SD$ といずれの症例においても改善を認めた。特にGH治療期間が10年4か月と長期間で骨年齢が15歳6か月に達している症例1(男児)は、身長SD値が $-2.6SD$ (5歳5か月)から -1.0

SD(15歳9か月)と改善を認めた。

症例1においてGH投与後にTmP/GFR値の上昇を認めた(図2)。症例1はGH治療開始前にはTmP/GFR値 $1.25 \sim 1.43 \text{ mg/dL}$ と低値であったが、GH投与後は10歳2か月時および14歳10か月時を除き、 2.0 mg/dL 以上に上昇している。他3症例はGH治療開始前(GH治療開始年齢:3歳0か月~4歳11か月)からTmP/GFR値は症例1(GH治療開始年齢:5歳5か月)と比べ高めで、GH治療後は低下傾向または変化ない結果であった。

症例1においてGH治療開始前のIGF-1値は基準範囲の下限値付近で経過していたが、GH治療開始後のIGF-1値は基準範囲の上限値付近で経過した(図3)。

治療期間中、いずれの症例においても骨年齢の進行、耐糖能障害および側弯などの有害事象の発生は認められなかった。またいずれの症例に於いても診断時にはくる病所見(O脚および骨レントゲンでのくる病所見)を認めたがGH治療開始時には骨レントゲンによるくる病所見は消失し、O脚は改善傾向を認めた。GH治療開始後、くる病所見およびO脚の悪化はなかった。

考 察

XLHに対してはリン製剤やビタミンD製剤による治療が行われ、くる病所見は改善するが、身長予後の改善は一定していない。Miyamotoらによる5年以上の治療期間を有する22症例においては、身長SD値が $-2.38 \pm 1.11SD$ から最終身長が $-1.69 \pm 1.11SD$ と改善を認めたとの報告がある²⁾。しかし、6症例を対象として8.5 \pm 2.5年の治療期間で身長SD値が $-2.1 \pm 0.6SD$ から最終身長が $-2.8 \pm 0.5SD$ と改善を認めなかったとの報告³⁾もある。

低身長のXLHの児を対象にGH治療を開始し、最終身長まで経過をみている報告は調べた限りでは2報^{3,4)}存在する。1報は従来の治療を行っても低身長を

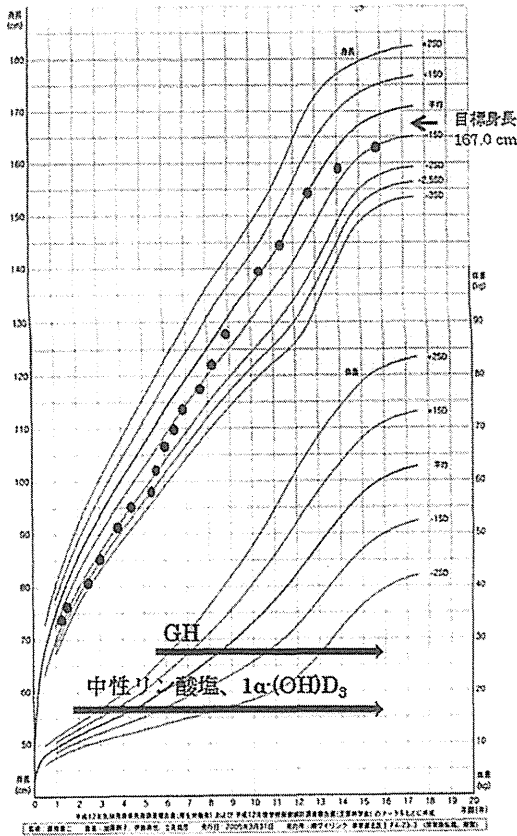


図1 症例1の成長曲線

症例1の身長の経過を示した。また、中性リン酸塩、 $1\alpha(\text{OH})\text{D}$ およびGHの治療開始年齢と期間を併記した。

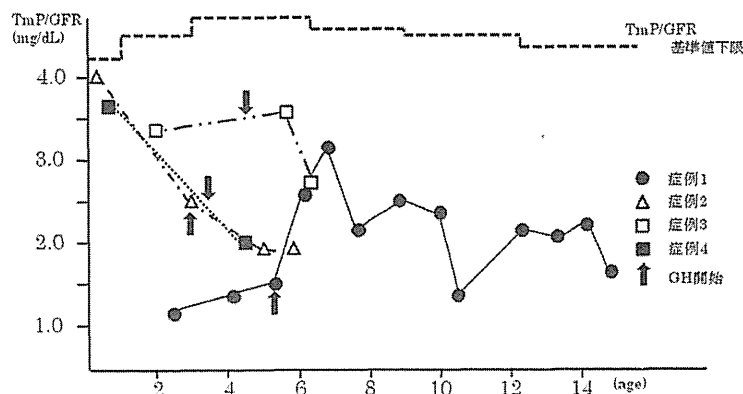


図2 4症例のTmP/GFRの変化

各症例のTmP/GFRと年齢の関係を示した。またGH治療開始時を矢印(↑)で示した。

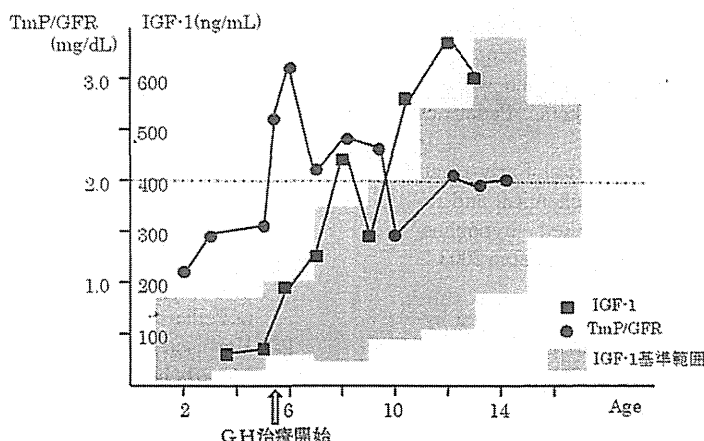


図3 症例1のIGF-1値とTmP/GFR値の経過
 症例1の各年齢におけるIGF-1値とTmP/GFRの関係を示した。■は各年齢のIGF-1値の基準値を示している。

認めたXLHの児を対象に、低身長重症度に応じて2グループに分け、より重症のGH治療群(身長SD値 $-3.4 \pm 0.5SD$; 治療開始年齢: 7.8 ± 1.8 歳)とGH非治療群(身長SD値 $-2.1 \pm 0.6SD$; 治療開始年齢: 7.9 ± 2.5 歳)で身長の経過を比較した。GH治療群は前思春期では $0.195mg/kg/week$ 、思春期では $0.293mg/kg/week$ のGH投与が行われた。最終身長のSD値はGH治療群、非治療群それぞれ、 $-2.4 \pm 0.5SD$ 、 $-2.8 \pm 0.5SD$ であり、GH治療群において有意に最終身長の改善を認めた³⁾。もう1報は、低身長を認めたXLHの児(9.4~12.9歳)を対象にした3症例でGH治療($0.33mg/kg/week$)を最終身長まで(GH治療期間: 3.1~6.3年間)併用し、身長SD値が平均 $0.9SD$ ($0.5 \sim 1.3SD$)改善したと報告している⁴⁾。今回、我々が報告した4症例はGH治療期間に差があるものの、いずれの症例においても身長SD値は $1.4SD \sim 2.7SD$ 改善しており既報の2報告^{3,4)}と同様の結果が得られた。

本病態におけるGHの治療効果の機序として、GH-IGF-1を介する直接的な軟骨内骨化に対する影響に加えて、GH-IGF-1系の作用によるリン再吸収率の上昇作用^{9,10)}が報告されている。低身長を認めたXLHの児を対象にGH治療開始後、血清P値とTmP/GFR値が3~4年目まで改善を認め、そのことが部分的に最終身長の改善に寄与しているのではないかと報告もある³⁾。長期にわたり経過をみることができた症例1については、GH治療開始後、TmP/GFR値の上昇を認め、4年目以降もGH治療開始前と比べ高い値で経過した。IGF-1値上昇に伴いTmP/GFR値の上昇を認めていることから、GH-IGF-1系による近位尿管でのリン再吸収障害の改善が、部分的に身長SD値の改善に寄与しているかもしれない。他の3症例に関してはGH治療開始前後のTmP/GFR値は一定の傾向を示して

いないが、著明な低下は認めていない。TmP/GFR値は乳児期以降、加齢により正常値が低下することを考えると、GH治療によりTmP/GFR値の低下が抑制されていることを示唆する所見かもしれない。

XLH患者の中には、リン製剤とビタミンD製剤により治療が行われても身長予後が不良に終わる症例が存在する。本論文で検討した4症例のうち最終身長まで経過を確認できたのは1例のみだが、同様な症例に対してGH治療の有効性を示唆する結果と考える。

結 論

リン製剤とビタミンD製剤による治療が行われても身長に対する治療効果が乏しいと思われたX連鎖性低リン血症性くる病の4症例においてGH治療により成長率の改善を認めた。

日本小児科学会の定める利益相反に関する開示事項はありません。

文 献

- 1) Hasegawa Y, Miyamoto J. Hypophosphatemic rickets/osteomalacia.—Mainly on patients with PHEX mutations—. Clin Calcium 2007; 17: 1592—1599.
- 2) Miyamoto J, Koto S, Hasegawa Y. Final height of Japanese patients with X-linked hypophosphatemic rickets: Effect of vitamin D and phosphate therapy. Endocrine Journal 2000; 47: 163—167.
- 3) Baroncelli GI, Bertelloni S, Ceccarelli C, et al. Effect of growth treatment on final height, phosphate metabolism, and bone mineral density in children with X-linked hypophosphatemic rickets. The Journal of Pediatrics 2001; 138: 236—243.

- 4) Haffner D, Nissel R, Wühl E, et al. Effects of growth hormone treatment on body proportion and final height among small children with X-linked hypophosphatemic rickets. *Pediatrics* 2004 ; 113 : 593—596.
- 5) Mäkitie O, Doria A, Kooh SW, et al. Early treatment improves growth and biochemical and radiographic outcome in X-linked hypophosphatemic rickets. *J Clin Endocrinol metab* 2003 ; 88 : 3591—3597.
- 6) Reusz GS, Hoyer PF, Lucas M, et al. X linked hypophosphatemia : treatment, height gain, and nephrocalcinosis. *Arch Dis Child* 1990 ; 65 : 1125—1128.
- 7) Sato K, Tajima T, Nakae J, et al. Three novel *PHEX* gene mutations in Japanese patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Pediatr Res* 2000 ; 48 : 536—540.
- 8) 藤枝憲二, 島津 章. IRMA キットを用いた IGF-1, IGF-2, IGFBP-3 測定 of 臨床検討. *ホルモンと臨床* 1994 ; 44 : 1229.
- 9) Saggese G, Baroncelli GI. Long-term growth hormone treatment in children with renal hypophosphatemic rickets : Effect on growth, mineral metabolism, and bone density. *The Journal of Pediatrics* 1995 ; 127 : 395—402.
- 10) Harbison MD, Gertner JM. Permissive action of growth hormone on the renal response to dietary phosphorus derivation. *J Clin Endocrinol Metab* 1990 ; 70 : 1035—1040.

Growth Hormone Treatment Was Effective in Increasing Height in 4 Patients
with XLH Who Were Short Despite Phosphate and Vitamin D Therapy

Tomoyasu Saito^{1,2)}, Masako Izawa³⁾, Ryojun Takeda¹⁾,
Makoto Yamada¹⁾, Masahiro Goto¹⁾ and Yukihiro Hasegawa¹⁾

¹⁾Division of Endocrinology and Metabolism, Tokyo Metropolitan Children's Medical Center

²⁾Department of Pediatrics, Matsudo City Hospital

³⁾Division of Endocrinology and Metabolism, Aichi Children's Health and Medical Center

X-Linked hypophosphatemic rickets (XLH), caused by the *PHEX* gene mutation, is characterized by hypophosphatemia, rickets and impaired growth. Conventional therapy with oral vitamin D and phosphate has been shown to result in improved growth and resolution of the rickets. However, some patients remain unresponsive regarding short stature. The aim of this study is to show the beneficial effect of growth hormone treatment on height for those patients with a short stature despite failure conventional treatment. We investigated four patients with growth retardation (height SD range : -2.5—-2.7SD, age : 3.0—5.4 years) in spite of vitamin D and phosphate therapy. These patients, who were proven to have *PHEX* gene mutation, were treated with GH for 2.4 to 10.3 years. Their height became 1.4—2.7SD greater than at the initiation of GH treatment. These results suggest that GH treatment combined with conventional therapy may increase short stature in patients with XLH.

神奈川県における先天性中枢性甲状腺機能低下症の疫学的調査 第一報

曾根田明子¹⁾, 安達昌功^{1,2)}, 室谷浩二¹⁾, 朝倉由美¹⁾, 住吉好雄²⁾, 春木英一^{2,3)}, 山上祐次^{2,3)}

1) 地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター内分泌代謝科

2) 神奈川県医師会先天性代謝異常対策委員会, 3) 財団法人神奈川県予防医学協会

【要 旨】

神奈川県では、濾紙血中のTSHおよびFree T4を全例で同時測定し、中枢性の先天性甲状腺機能低下症 (congenital hypothyroidism, CH) もマススクリーニング対象疾患に含めている。現行のFree T4カットオフ (CO) 値 [0.70ng/dL] の妥当性の検討を最終目的として、県下の中枢性CHの疫学調査を立案した。今回はその一次調査結果を報告する。過去10年間の出生児を対象とした調査により、42例の中枢性CH症例が集積され、発生頻度は1:20,714人と算出された。中枢性CH以外の下垂体機能低下を伴うものが22例 (52.4%) で、甲状腺機能低下のみの症例が20例 (47.6%) であった。本県でマススクリーニングをうけた39例中17例 (43.6%) はマススクリーニングで異常を指摘されていなかったことから、現行のCO値では、中枢性CHの約半数が見逃されている可能性が示唆された。

【キーワード】

新生児マススクリーニング, 先天性甲状腺機能低下症, 中枢性甲状腺機能低下症, Free T4, カットオフ値

【結 言】

先天性甲状腺機能低下症 (congenital hypothyroidism, 以下CH) は、早期発見・早期治療により正常な発育・発達が期待される疾患であり、本邦でも1979年より新生児マススクリーニング対象疾患に加えられている。スクリーニング法として、国内の多くの検査施設で採用されているのは、TSH単独測定方式、またはprimary TSH/back up FT4方式 (全例にTSHを測定し、高値検体についてのみ遊離サイロキシン (Free T4, 以下FT4) を測定する) である。これらTSH

測定を優先する方法は、偽陽性が少なくかつ軽症のCHを発見できる利点を有するが、サイロキシンまたはFT4優先方式と異なり、中枢性CHおよびTSH遅発上昇型CHは見逃される¹⁾。この両方式の利点を生かすため、本県を含む一部の地域 (札幌市, 山形県, 四国地方など) では、TSH・FT4を全例で同時に測定している。煩雑かつ経費の増加も不可避であるが、米国小児科学会 (American Academy of Pediatrics) の勧告では、TSH・FT4同時測定が最も理想的なCHマススクリーニング法であると記載されている²⁾。

本県でのFT4カットオフ (CO) 値は0.70ng/dL (血清表示) に設定されているが、感度の向上のために1.0ng/dL程度にすべきであるとの指摘がある³⁾。しかし、CO値の引き上げにより偽陽性率も当然増加するため、陽性的中率 (positive predictive value) の変動の予測が重要である。われわれは、FT4のCO値を再検討することを目的とし、その基礎調査として、県下の中枢性

<連絡先>

安達 昌功

〒232-8555 横浜市南区六ツ川2-138-4

神奈川県立こども医療センター内分泌代謝科

Tel: 045-711-2351 Fax: 045-742-7821

E-mail: madachi@mars.sannet.ne.jp

CH疫学調査を立案・実施した。今回は、その一次調査結果につき報告する。

【方法】

2008年10月に本県内の小児科を標榜するすべての病院と療養病床を有する診療所、合計139施設に対し「先天性中枢性甲状腺機能低下症（中枢性クレチン症）の概数調査」質問用紙を郵送した。調査項目として、①調査時点でのCH診療の有無 ②過去10年（1997年4月以降）のCH患児の総数 ③同中枢性CH患児の総数の記載を求めた。中枢性CHの患児が存在する場合は、マススクリーニング陽性であった症例、すなわちFT4低値が指摘された症例と指摘されなかった症例の内訳、および甲状腺機能低下のみの症例と他の下垂体機能低下を伴う症例（汎下垂体機能低下症）の内訳につき質問した。また、マススクリーニングの際のFT4値が明らかでない場合には、その記載を求めた。

中枢性CHの定義は、①視床下部性または下垂体性の甲状腺機能低下症 ②脳腫瘍や頭部外傷など明らかに後天性の原因があるものは除く ③低出生体重児の低(F)T4血症は除く、以上の3項目を満たすものとした。甲状腺機能のみ低下している症例に限らず、下垂体機能低下

を合併する症例（汎下垂体機能低下症症例）も対象としているため、口蓋裂に伴う汎下垂体機能低下症や、septo-optic dysplasiaも含んで中枢性CHと定義した。

本県のCHマススクリーニング方法は図1の通りである。すなわち、一次検査でTSHおよびFT4を測定し、TSH 30.0μIU/mL以上（血清表示）の場合は直ちに要精密検査となる。また、TSH 15.0μIU/mL以上またはFT4 0.70ng/dL未満では再採血を行い、再度TSH 15.0μIU/mL以上またはFT4 0.70ng/dL未満を示した場合に要精密検査となるシステムである。精査施設のほとんどは、小児内分泌を専門とする医師の在籍する施設である。

【結果】

1. 回収率

調査票を郵送した139施設のうち94施設より回答を得たが、うち14施設は小児科の診療を行っていないとの回答であった。これらを除外し、実際に小児科の診療が行われていた125施設に限定すると、80施設から回答が得られたこととなり、回収率は64.0%と算出された。

2. CH診療の有無と各施設別症例数（図2-a）

CHの診療を行っているとは回答した施設は

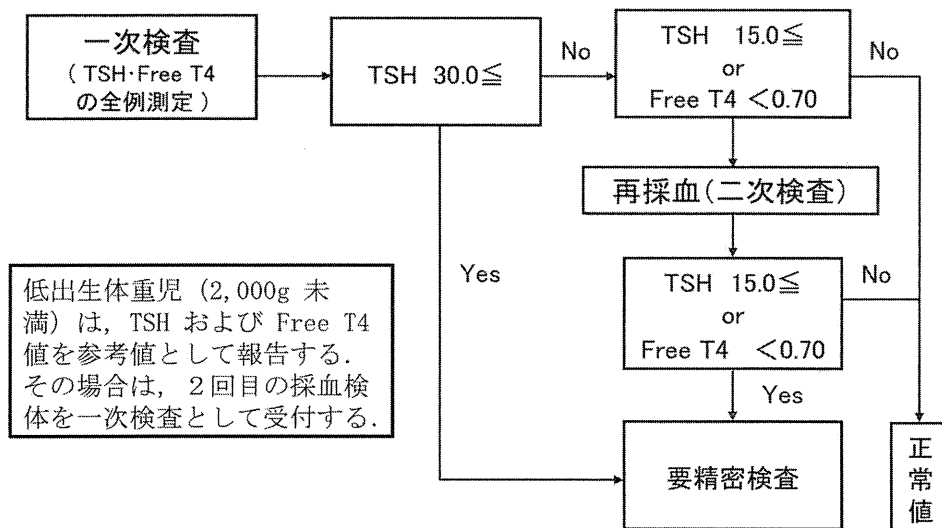
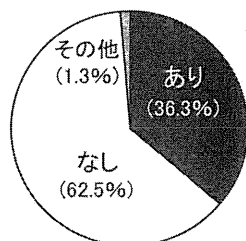


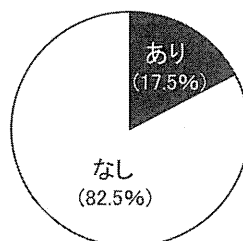
図1. 神奈川県におけるCHスクリーニング方法
単位；TSHはμIU/mL, Free T4はng/dL. いずれも血清表示.

a) 先天性甲状腺機能低下症 (CH)



CH 診療経験の有無

b) 中枢性 CH



中枢性 CH 診療経験の有無

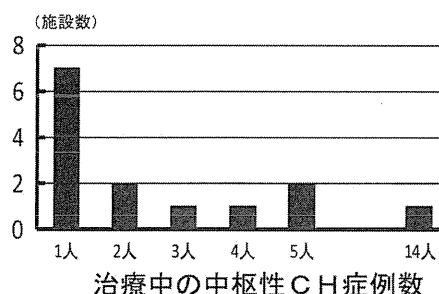
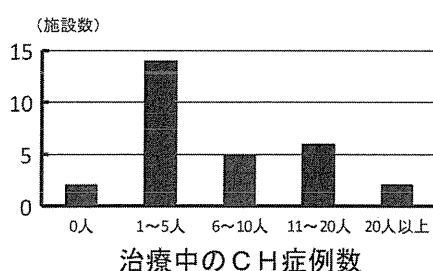


図2. 診療施設別の、先天性甲状腺機能低下症 (CH) の診療経験および診療症例数
 a) CH全体に関する調査結果. 上段の「その他」は、診断のみ行った1施設.
 b) 中枢性CHに関する調査結果.

36.3% (29/80施設) であり、1施設を除き小児内分泌を専門とする医師の在籍する施設であった。また、別の1施設は、診断のみを行い、治療は他院で行っているとの回答であった。治療を行っている28施設でのCH症例総数は314例となった。施設別では、症例数が5以下の施設が全体の55.2% (16/29) であった。

3. 中枢性CHの診療の有無と各施設別症例数 (図2-b)

中枢性CHの診療経験のある施設は17.5% (14/80施設) であり、1施設を除いた13施設は小児内分泌を専門とする医師の在籍する施設であった (施設内訳: 市中総合病院 9, 大学病院 4, こども病院 1)。14施設での合計症例数は42例であった。施設別の診断症例数は、1施設を除き5例以下であった (中央値は1.5名)。中枢性CH症例の詳細 (中枢性CH以外の下垂体機能低下の合併の有無、およびマススクリーニングでの異常の有無) を表1に示した。下垂体機能低下を伴う症例が52.4% (22/42) で、甲状腺機能低下のみの症例が47.6% (20/42) であった。

3例は他県で出生した症例であったためFT4を含むマススクリーニングは受けていなかった。本県でマススクリーニングを受け、FT4低値を指摘された症例は56.4% (22/39) であった。

4. CHと中枢性CHの本県における発生頻度

今回の調査結果と当該期間の県内出生数より、CHおよび中枢性CHの発生頻度を算出した。当該期間の本県内の出生数は807,855人であった。同期間のCH症例数は314例であり、ここから算出されるCHの発生頻度は1:2,573人となった。中枢性CHのうち本県内出生の症例数は39例であり、中枢性CHの発生頻度は1:20,714人と算出された。ただし、いずれも精査の有無やその詳細な結果は未調査であり、あくまでも一次調査での申告に基づくものである。

5. 中枢性CHのマススクリーニング結果

中枢性CH42症例のうち、マススクリーニング時のFT4値が判明した12症例について、その詳細を表2に示した。FT4が0.7ng/dL以上の値であったため異常なしと判断された症例は4例 (症例9~12) であった。

表1. 中枢性甲状腺機能低下症の42例の病型とマススクリーニングの結果

	MS陽性	MS陰性	県外出生	
汎下垂体機能低下	7例	13例	2例	22例 (52.4%)
甲状腺機能低下のみ	15例	4例	1例	20例 (47.6%)
合計	22例 (県内出生の56.4%)	17例 (県内出生の43.6%)	3例	42例

MS：マススクリーニング

【考察】

今回の検討において、調査用紙の回収率は64.0%と良好な成績であった。神奈川県医師会先天性代謝異常対策委員会の集計では、当該期間中にマススクリーニングで中枢性CHと診断された症例は21例であった⁴⁾。今回の調査でマススクリーニング陽性であった中枢性CHはほぼ同数の22例であり、この点から、本調査における中枢性CHの捕捉率は良好であったと推察される。しかし、今回集積された症例は、中枢性CHが疑われる症例というべきであり、休薬後の病型診断や下垂体機能全般に関する詳細な精査結果は未調査である。したがって、以下の推論も、あくまで一次調査の結果から得られたデータにもとづくものであることを理解しなければならない。

まとまった数のCH症例を診療している施設は少なく、特に中枢性CHについては1症例のみと答えた施設が最も多かった。したがって、症例の治療方針やその経過の検討のためには、各医療機関の情報共有と連携が必要と考えられた。

今回の調査において、中枢性CHは42例が集積されたが、中枢性CH以外の下垂体機能低下症を伴うもの（汎下垂体機能低下症）と甲状腺機能低下症のみの症例が、各々52.4%、47.6%と拮抗していたことが特徴的であった。1994～1996年にオランダで行われたCHマススクリーニングの前方視的検討では、中枢性CHと診断された19例のうち78.0%が汎下垂体機能低下症であった⁵⁾。また、2000～2004年の札幌市での検討では、中枢性CHと診断された6例のうち4例（66.7%）が他の下垂体機能低下を伴っていた⁶⁾。さらに、1990～2000年に米国インディア

ナ大学で行われた後方視的研究では、中枢性CHの41/42例（97.6%）が複合型下垂体機能低下症であったとされている⁷⁾。これらの報告では、中枢性CHは全てマススクリーニングで発見された症例に限られている。したがって、本調査結果と併せて考えると、マススクリーニングで発見されず、その後中枢性CHと診断される症例のなかに、甲状腺機能低下症のみの症例が多く存在する可能性が示唆される。しかし前述のように、今後の二次調査を経て、さらに詳細な検討を加えることが重要であろう。

当該期間の出生数から算出したCHの発生頻度は1：2,573人であった。北米・欧州での発生頻度は、3,000～4,000出生に1人とされている⁸⁾。一方本邦では、実際にCHとして治療されている患者数は1：2,000～2,500であるとの推定がなされており、今回の検討結果とよく一致した⁹⁾。今回の検討は、マススクリーニングを受けた直後（新生児～乳児期）の調査ではないので、一過性の甲状腺機能低下がある程度除外された、より真実に近い治療実態を反映しているものと考えられる。ただし、全例で詳細な病型診断が施行されているとは考え難く、一過性甲状腺機能低下症例も含まれていることが予測され、真のCH頻度は1：2,573人より低い値であると推測される。

中枢性CHの発生頻度は、1：20,714人と算出された。以前は本邦・欧米ともに、約100,000出生に1名程度と見積もられていたが、その後の検討により実際の発生頻度はかなり高いことが明らかにされてきた。TSH・FT4同時測定（FT4 CO値1.0ng/dL）を実施している札幌市では、中枢性CHの発生頻度（2000～2004年）は、1：

13,814と報告されている⁹⁾。オランダでは primary T4/back up TSH システムに、さらにTBG の測定を加え (T4 -1.6SD 未満, T4 SDS/TBG nmol/L 8.5 未満), 中枢性CH 発見のための精力的な努力を行っているが、2006年の報告では中枢性CHの発生頻度は1:21,000とされている⁹⁾。二次調査により、更に精度のよい発生頻度の把握が期待される。

本調査において中枢性CH:全CHの割合は、1:8.5であった。中枢性CH:全CHの割合は、過去の札幌市の報告では1:7.8⁹⁾、オランダの報告では1:12.7⁹⁾であった。本調査結果は、過去の報告と概ね同様の結果であったと考えられる。

本県で出生しFT4を含むマススクリーニングを受けた中枢性CH39例のうち、17例(43.6%)はマススクリーニング結果が正常であり、中枢性CHの約半数が見逃されている可能性が考えられた。FT4_1.0ng/dLをCO値に設定している札幌市では、FT4再検率は0.76%、FT4精査率は0.026%、陽性的中率(positive predictive value)は27.3%(文献6)より算出)であると報告されている。一方、FT4_0.7ng/dLをCO値としている本県のFT4再検率は0.16%、FT4精査率(概算)は0.013%、PPVは22%であった(2007年度実績)。仮に札幌市と同じFT4_1.0ng/dLをCO値

とした場合には、再検率は0.60%に上昇すると予測された。FT4値は在胎週数や出生時体重と相関するため¹⁰⁾¹¹⁾、本県では体重2,000g未満の低出生体重児の場合は、生後すぐのFT4値は参考として報告するに留め、生後1ヶ月前後での再採血検体を一次検査としている(図1)。このことが、予想再検率が札幌市の値よりも低くなっている一因かもしれない。二次調査にて各症例の濾紙血FT4値が把握できれば、CO値を引き上げた場合のPPVが予測できるため、適正なCO値に関する科学的な検討が可能となると期待される。実際に、本調査でMS結果が判明した症例ではCO値1.0ng/dLとしても依然2例はMSで発見困難(表2, 症例9, 12)であった。また表2に示すように、FT4は初回の採血時に比して再採血時に高値に推移する傾向が窺われた。中枢性CH児が再採血で正常と判定されることを防ぐ目的で、初回と再採血時のCO値を別個に設定する(再採血時のCO値を高く設定する)ことの必要性も示唆された。

【追記】

春木英一先生は、平成22年4月に御逝去なさいました。先生の新生児マススクリーニング事業に対する多大なる功績に対し衷心より敬意を

表2. マススクリーニングの結果が確認できた中枢性CHの12例

症例	1回目		2回目		MS結果	病型
	TSH	FT4	TSH	FT4		
1	3.5	0.37	3.1	0.62	陽性	汎下垂体機能低下
2	3.1	0.48	1.8	0.50	陽性	汎下垂体機能低下
3	4.1	0.55	4.7	0.38	陽性	汎下垂体機能低下
4	3.0	0.68	1.3	0.68	陽性	甲状腺機能低下のみ
5	1.5	0.50	5.0	0.60	陽性	甲状腺機能低下のみ
6	4.3	0.33	3.0	0.66	陽性	甲状腺機能低下のみ
7	5.9	0.14	2.4	0.48	陽性	甲状腺機能低下のみ
8	4.6	0.43	1.1	0.66	陽性	甲状腺機能低下のみ
9	0.7	0.27	0.6	1.10	異常なし	甲状腺機能低下のみ
10	5.6	0.83	—	—	異常なし	汎下垂体機能低下
11	3.0	0.90	—	—	異常なし	汎下垂体機能低下
12	0.6	1.44	—	—	異常なし	汎下垂体機能低下

FT4: Free T4

単位; TSHは $\mu\text{U/mL}$, Free T4は ng/dL . いずれも血清表示.

表し、ここに謹んでご冥福をお祈り申し上げます。

【文 献】

- 1) Fisher D: Next generation newborn screening for congenital hypothyroidism? *J Clin Endocrinol Metab* 90: 3797-9, 2005
- 2) American Academy of Pediatrics, Rose SR, Brown RS, Foley T, et al.: Update of newborn screening and therapy for congenital hypothyroidism. *Pediatrics* 117: 2290-303, 2006
- 3) 松浦信夫, 柴山啓子. 新生児 TSH, F-T4 スクリーニングの意義—発見される中枢性甲状腺機能低下症の病態— *日本マス・スクリーニング学会誌* 16: 33-42, 2006
- 4) 平成20年(2008年)度 先天性代謝異常症等マススクリーニング・データ整理研究会報告書. 神奈川県医師会先天性代謝異常対策委員会内 マススクリーニング・データ整理研究会
- 5) Van Tijn DA, de Vijlder JJ, Verbeeten B Jr, Verkerk PH, Vulsma T: Neonatal detection of congenital hypothyroidism of central origin. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 3350-3359, 2005
- 6) Fujiwara F, Fujikura K, Okuhara K, et al.: Central congenital hypothyroidism detected by neonatal screening in Sapporo, Japan (2000-2004): It's prevalence and clinical characteristics. *Clin Pediatr Endocrinol* 17: 1765-1769, 2008
- 7) Nebesio TD, McKenna MP, Nabhan ZM, Eugster EA.: Newborn screening results in children with central hypothyroidism. *J Pediatr* 6: 990-993, 2010
- 8) Gu YH, Kato T, Harada S, Inomata H, Aoki K.: Time trend and geographic distribution of treated patients with congenital hypothyroidism relative to the number of available endocrinologists in Japan. *J Pediatr* 157: 153-157, 2010
- 9) Kempers MJ, Lanting CI, van Heijst AF, et al.: Neonatal screening for congenital hypothyroidism based on thyroxine, thyrotropin, and thyroxine-binding globulin measurement: potentials and pitfalls. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 3370-3376, 2006
- 10) Kok JH, Hart G, Endert E, Koppe JG, de Vijlder JJ: Normal ranges of T4 screening values in low birthweight infants. *Arch Dis Child* 58: 190-194, 1983
- 11) Hume R, Simpson J, Delahunty C, et al.: Human fetal and cord serum thyroid hormones: developmental trends and interrelationships. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 4097-4103, 2004

受付日：平成22年9月6日

受理日：平成23年2月21日

Transcriptome Analysis of Adrenocortical Cells in Health and Disease

Tomohiro Ishii

Department of Pediatrics, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan

INTRODUCTION

The human and mouse genome projects are historical landmarks in which the entire genomic sequence of these species was published.^{1–3} The projects identified 10,000 to 15,000 genes, far less than expected. Therefore, it was inferred that quantitative or qualitative variations in transcription, including the production, stability, degradation, and alternative splicing of RNA also contribute to phenotypic variation. Recently developed high-throughput techniques have helped identify nearly 40,000 predicted mRNAs in a mouse genome.³ A study that examined 55 different tissues reported that approximately 2000 transcripts were detected in all tissues, suggesting 5% of all mRNAs are ubiquitously expressed.⁴ In contrast, more than 4000 transcripts were expressed in only one tissue type, indicating 10% of mRNAs fulfill a specific function in a single tissue. The number of transcripts varies in each tissue. For example, approximately 10,000 of the 40,000 transcripts were expressed in the mouse eye,

but less than 6000 were expressed in the pancreas. More than 9000 transcripts were found in the adrenal glands, suggesting that over 7000 transcripts play a specific role in the adrenal cortex and medulla. In order to understand the significance of a set of transcripts, specific technology is required, especially that which relates to bioinformatics. This chapter provides an overview of transcriptome analysis, discusses recent progress, and introduces representative studies involving transcriptome analysis of adrenocortical cells.

STRATEGIES FOR DETERMINING A TRANSCRIPTOME

The transcriptome is the complete set of transcripts in a specific type of cells or tissue. In general, there are two strategies for determining a transcriptome (Table 11.1). cDNA microarray analysis is based on hybridization between fluorescent-labeled target cDNAs and probes representing known transcripts that are synthesized and spotted on the solid

TABLE 11.1 Comparison of Two Strategies for Determining Transcriptome

	cDNA Microarray	RNA-Seq
Technology	Hybridization	Next-generation sequencing
Quantification	Relative (ratio)	Absolute (molecule)
Unknown transcripts	Uncovered	Covered
Bioinformatics	Developed	In progress
Cost	Low	High

Abbreviation: RNA-Seq, RNA sequencing.

surface of a chip.⁵ Hybridization chips are custom-made or commercially available for different species and platforms. Comparing cDNA microarray data from different platforms is sometimes difficult. MicroArray Quality Control (MAQC) recommends standards and quality control metrics.^{6,7} National Center for Biotechnology Information's Gene Expression Omnibus (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) provides a public database of microarray data and allows only quality-controlled data to be uploaded. Microarray uses relative quantification in which the intensity of a feature is compared to that of the same feature under a different condition, and the identity of the feature is known by its position. In contrast, RNA sequence (RNA-Seq) has been recently developed based on a next-generation sequencing technique.^{8,9} RNA-Seq is not limited to defined transcripts that correspond to an existing genomic sequence. RNA-Seq can identify rare or tissue-specific splicing variants that have never been reported. Although RNA-Seq is a very promising method with the potential to overtake cDNA microarrays, the technology is still under active development. Understanding the strategy used to determine a transcriptome is essential for determining functional elements of cells or tissues and for

interpreting physiology and pathophysiology in health and disease, respectively.

DATA MINING

Generally, the goal of transcriptome analysis is to identify genes differentially expressed among different conditions, leading to a new understanding of genes or pathways associated with the conditions. Transcriptome analysis requires an appropriate statistical method with a multiple comparison test to interpret global changes in the expression of thousands of genes.¹⁰ Analysis of variance (ANOVA) is one of the traditional methods used to analyze the significance of differential expression by comparing the variance across replicate groups to the variance within replicate groups. Additionally, the application of a multiple comparison test, such as the Bonferroni correction or false discovery rate (FDR), is recommended.¹¹ The Bonferroni correction is too strict for maintaining a low false negative rate. FDR represents a reasonable approach and controls the yield of false positives and false negatives with a variable cut-off between 0.05 and 0.25.¹² In addition to statistical significance, fold change is also important for assessing the degree of differential expression as a measure of biological significance. A volcano plot is a popular graphical display of p values from a statistical test against fold changes on a logarithmic two-dimensional plot (Figure 11.1). It provides an easy method for identifying differentially expressed genes (DEGs) that are both statistically and biologically significant in the condition. Pathway or ontology analysis enables researchers to interpret DEGs in the framework of biological processes and systems, rather than in a traditional gene-centric manner. Comparing the list of gene profiles of interest against previously assembled lists of genes grouped by function or cellular localization can provide useful insights. Several pathway databases are

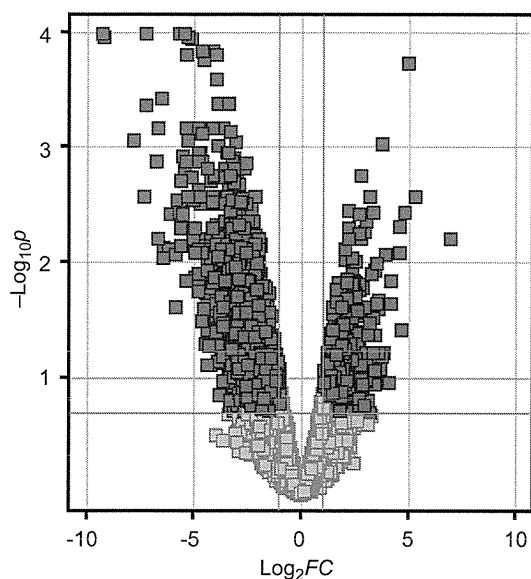


FIGURE 11.1 Volcano plot. Red squares indicate genes differentially expressed in adrenocortical cells of *Star*^{-/-} mice; grey squares indicate genes not differentially expressed; green lines show cut-off lines of fold change (FC) = 2.0 (x-axis) and *p* value modified by false discovery rate = 0.2 (y-axis).

available, including the Gene Ontology (GO) Consortium (www.geneontology.org)¹³ and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (www.genome.jp/kegg).¹⁴ Dedicated web-based applications for pathway analysis are available, including Ingenuity Pathways Analysis (IPA) and NextBio.^{15,16} The results of transcriptome analysis must be carefully interpreted, and conclusions must not be drawn without using an appropriate data mining technique.

TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF ADRENAL GLANDS AND ADRENOCORTICAL CELL LINES UNDER ADRENOCORTICOTROPIC HORMONE STIMULATION

Trophic hormone regulation is essential for adrenocortical cells to differentiate and produce sufficient amounts of steroid

hormones.¹⁷ Mineralcorticoid production by glomerulosa cells is controlled by renin and angiotensin, as well as by potassium level. Glucocorticoid synthesis by fasciculata cells is regulated by adrenocorticotrophic hormone (ACTH). Lee and Widmaier reported the transcriptome of the adrenal glands in neonatal rats with or without chronic ACTH stimulation *in vivo*, using a rat cDNA microarray with 15,923 probes.¹⁸ ACTH induced significant changes in the expression of 214 genes with an FDR of 0.25 or less and a fold change of 1.5 or greater, including downregulation of genes associated with *de novo* cholesterol biosynthesis and cholesterol trafficking and upregulation of genes associated with intracellular metabolism and glucocorticoid inactivation (Table 11.2). These data demonstrate that the developmental effects of ACTH alter the expression of a broad range of genes involved not only in steroid hormone synthesis but also in cellular functions related to the growth and differentiation of the adrenal glands. Additionally, the negative effects of ACTH on the genes required for cholesterol synthesis and the production of active glucocorticoids suggest a key adaptive feature of the developing adrenal glands, which minimizes excessive exposure of other tissues, such as brain, to glucocorticoids.¹⁹ Schimmer *et al.* conducted transcriptome analysis of adrenocorticotropin action in the Y1 mouse adrenal tumor cell line *in vitro*, using a mouse cDNA microarray of 5655 probes.²⁰ ACTH affected the accumulation of 1289 transcripts (588 upregulated and 687 downregulated) with a FDR less than 0.05 (Table 11.3), a much larger number of genes than previously reported. The genes upregulated by ACTH were in the category of cholesterol biosynthesis, cholesterol mobilization, or corticosteroid biosynthesis and metabolism. As expected, ACTH regulated the expression of genes encoding transcription factors involved in the expression of steroidogenic enzymes and of signaling molecules involved in hormonal

TABLE 11.2 Genes Regulated by ACTH in Adrenal Glands of Neonatal Rats by cDNA Microarray

Functional Category	Gene	Description	FC	
Signal transduction	<i>Spp1</i>	Secreted phosphoprotein 1	4.6	
	<i>Pla2g1b</i>	Phospholipase A2, group IB	3.7	
	<i>Rdc1</i>	Chemokine orphan receptor 1	3.2	
	<i>Gria3</i>	Glutamate receptor, ionotropic. AMPA3 (alpha 3)	2.9	
	<i>Per2</i>	Period homolog 2	2.6	
	<i>Mtap2</i>	Microtubule-associated protein 2	2.5	
	<i>Pdk2</i>	Pyruvate dehydrogenase kinase 2	2.5	
	<i>Pak1</i>	p21 (CDKM1A)-activated kinase 1	2.4	
	<i>Cxcl10</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	2.3	
	<i>Cx3cl1</i>	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	2.2	
	<i>Il18</i>	Interleukin-18	2.0	
	<i>Ghr</i>	Growth hormone receptor	2.0	
	<i>Gprk5</i>	G protein-coupled receptor kinase 5	0.5	
	<i>Emb</i>	Embigin	0.48	
	<i>Gfra1</i>	Glial cell line derived neurotrophic factor family receptor 1	0.45	
	<i>Inha</i>	Inhibin alpha	0.45	
	<i>Pdyn</i>	Prodynorphin	0.43	
	<i>Cd36</i>	cd36 antigen	0.4	
	<i>Sfrp4</i>	Secreted frizzled-related protein 4	0.37	
	<i>Tm4sf3</i>	Transmembrane 4 superfamily member 3	0.16	
	Transcription factor activity	<i>Dbp</i>	D site albumin promoter binding protein	3.8
	Cell growth/maintenance	<i>Spp1</i>	Secreted phosphoprotein 1	4.6
<i>Pla2g1b</i>		Phospholipase A2, group IB	3.7	
<i>Gria3</i>		Glutamate receptor, ionotropic, AMPA3 (alpha 3)	2.9	
<i>Ret</i>		Ret proto-oncogene	2.8	
<i>Apoc1</i>		Apolipoprotein C-1	2.6	
<i>Hpx</i>		Hemopexin	2.5	
<i>Mtap2</i>		Microtubule-associated protein 2	2.5	
<i>Cxcl10</i>		Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	2.3	
<i>Loc65042</i>		Tricarboxylate carrier-like protein	2.2	
<i>Il18</i>		Interleukin-18	2.0	
<i>Ghr</i>		Growth hormone receptor	2.0	

(Continued)

TABLE 11.2 (Continued)

Functional Category	Gene	Description	FC
	<i>Vamp1</i>	Vesicle-associated membrane protein 1	0.5
	<i>Gfra1</i>	Glial cell line derived neurotrophic factor family receptor 1	0.45
	<i>Inha</i>	Inhibin alpha	0.45
	<i>Cd36</i>	cd36 antigen	0.4
	<i>Slc1a3</i>	Solute carrier family 1, member 3	0.34
Cell–cell signaling	<i>Spp1</i>	Secreted phosphoprotein 1	4.6
	<i>Gria3</i>	Glutamate receptor, ionotropic. AMPA3 (alpha 3)	2.9
	<i>Inha</i>	Inhibin alpha	0.45
	<i>Pdyn</i>	Prodynorphin	0.43
	<i>Slc 1a3</i>	Solute carrier famil 1, member 3	0.34
Development/morphogenesis	<i>Srd5a1</i>	Steroid 5 alpha-reductase 1	6.4
	<i>Spp1</i>	Secreted phosphoprotein 1	4.6
	<i>Mtap2</i>	Microtubule-associated protein 2	2.5
	<i>Cxcl10</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	2.3
	<i>Il18</i>	Interleukin-18	2.0
	<i>Ghr</i>	Growth hormone receptor	2.0
	<i>Ania4</i>	Activity and neurotransmitter-induced early gene protein 4	2.0
	<i>Gfra1</i>	Glial cell line derived neurotrophic factor family receptor 1	0.45
	<i>Inha</i>	Inhibin alpha	0.45
	<i>Sfrp4</i>	Secreted frizzled-related protein 4	0.37
Structural/cell adhesion/extracellular matrix	<i>Spp1</i>	Secreted phosphoprotein 1	4.6
	<i>C1s</i>	Complement component 1, s subcomponent	3.0
	<i>Lox</i>	Lysyl oxidase	2.8
	<i>Cx3cl1</i>	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	2.2
	<i>Il18</i>	Interleukin-18	2.0
	<i>Vamp1</i>	Vesicle-associated membrane protein 1	0.5
	<i>Cd36</i>	cd36 antigen	0.4
	<i>Bcan</i>	Brevican	0.23
	<i>Mmp9</i>	Matrix metalloproteinase 9	0.13
Lipid and cholesterol	<i>Pla2g1b</i>	Phospholipase A2, group IB	3.7
Metabolism/biosynthesis	<i>Gria3</i>	Glutamate receptor, ionotropic. AMPA3 (alpha 3)	2.9
	<i>Mch</i>	Medium-chain S-acyl fatty acid synthetase thio ester hydrolase	2.6

(Continued)

TABLE 11.2 (Continued)

Functional Category	Gene	Description	FC
	<i>Dig1</i>	Dithiolethione-inducible gene-1	2.3
	<i>Sc4mol</i>	Sterol-C4-methyl oxidase-like	0.5
	<i>Hmgcs1</i>	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase 1	0.48
	<i>Cd36</i>	cd36 antigen	0.4
	<i>Idi1</i>	Isopentenyl-diphosphate delta isomerase	0.4
	<i>Cyp11b</i>	Cytochrome P450, subfamily XIB gene cluster	0.37
	<i>Pla2g4a</i>	Phospholipase A2, group IVA	0.37
	<i>Ptgs1</i>	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1	0.36
	<i>Sqle</i>	Squalene epoxidase	0.36
Immune response	<i>Spp1</i>	Secreted phosphoprotein 1	4.6
	<i>Cxcl10</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	2.3
	<i>Cx3cl10</i>	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	2.2
	<i>RT1Aw2</i>	RT1 class Ib gene(Aw2)	2.2
	<i>Il18</i>	Interleukin-18	2.0
	<i>Inha</i>	Inhibin alpha	0.45

Abbreviation: FC, fold change.

Modified data published by Lee JJ, Widmaier EP. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 96: 31–44.

regulation of steroidogenesis. The genes down-regulated in response to ACTH contained significantly enriched clusters with functions in DNA replication, mitotic cell cycle, cell division, nuclear transport, and RNA processing, consistent with the growth-inhibiting effect of ACTH in Y1 cells.²¹ Schimmer *et al.* also determined the relative contributions of the cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling pathway and the protein kinase C-dependent pathway to the ACTH effects as approximately 56% and 6%, respectively. Approximately 38% of the ACTH-affected transcripts could not be assigned to these signaling pathways and thus represent candidates for regulation via other mechanisms. The combined data from the two studies by Lee and Widmaier and Schimmer *et al.*, despite a certain level of inconsistency between these studies, provide useful reference

sets for more detailed studies of the factors that contribute to regulation of steroidogenesis and growth and development in the adrenal cortex upon ACTH stimulation.

TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF DIFFERENT ZONES

Adrenocortical zonation remains an unresolved aspect for researchers investigating the mechanism underlying and the control element of zonation.²² Transcriptome analysis of different zones might help elucidate the molecular signature of functional zonation. The zona fasciculata and zona glomerulosa are present in rodents, whereas the zona reticularis is observed only in primates. Nishimoto *et al.* assessed the transcriptome of DEGs in the zona glomerulosa and zona

TABLE 11.3 Genes Regulated by ACTH in Y1 Adrenocortical Cell Line by cDNA Microarray

Gene	Description	FC	<i>p</i>	PKA	PKC
UPREGULATION					
<i>Adamts4</i>	A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 4	8.68	0.0368	+	+
<i>Orc4l</i>	Origin recognition complex, subunit 4-like (<i>S. cerevisiae</i>)	5.55	0.0008	+	-
<i>Procr</i>	Protein C receptor, endothelial	4.96	0.0008	+	-
<i>Spp1</i>	Secreted phosphoprotein 1	3.98	0.0064	+	-
<i>Scarb1</i>	Scavenger receptor class B, member 1	3.85	0.0008	+	-
<i>Cdk8</i>	Cyclin-dependent kinase 8	3.68	0.0031	+	+
<i>Ier3</i>	Immediate early response 3	3.61	0.002	-	+
<i>Star</i>	Steroidogenic acute regulatory protein	2.92	0.0008	+	-
<i>Elac2</i>	ElaC homolog 2 (<i>E. coli</i>)	2.91	0.0008	-	+
<i>Alas1</i>	Aminolevulinic acid synthase 1	2.62	0.0008	+	-
<i>Ucp2</i>	Uncoupling protein 2, mitochondrial	2.42	0.0015	+	-
<i>Cnnm2</i>	Cyclin M2	2.40	0.0111	-	+
<i>Ostf1</i>	Osteoclast stimulating factor 1	2.32	0.0008	+	+
<i>Prkar2b</i>	Protein kinase, cAMP dependent regulatory, type II beta	2.26	0.0008	+	+
<i>Eno1</i>	Enolase 1, alpha non-neuron	2.22	0.0368	-	-
<i>Hs1bp1</i>	HS1 binding protein	2.17	0.0008	+	+
<i>Gla</i>	Galactosidase, alpha	2.17	0.0008	+	-
<i>Sdc3</i>	Syndecan 3	2.11	0.0008	+	+
<i>Net1</i>	Neuroepithelial cell transforming gene 1	2.08	0.0008	+	-
<i>Mthfd2</i>	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NAD+ dependent), methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	2.07	0.0008	+	-
<i>Psap</i>	Prosaposin	2.07	0.0147	+	-
<i>Esd</i>	Esterase D/formylglutathione hydrolase	2.06	0.0008	+	+
<i>Dhcr7</i>	7-Dehydrocholesterol reductase	2.06	0.002	+	-
<i>Alas2</i>	Aminolevulinic acid synthase 2, erythroid	2.03	0.0082	-	-
<i>Odc1</i>	Ornithine decarboxylase, structural 1	2.02	0.0008	-	+
<i>Bzrp</i>	Benzodiazepine receptor, peripheral	2.01	0.0008	+	-
<i>Gnaq</i>	Phosphatidylethanolamine binding protein	2.01	0.0287	+	-
<i>Myo10</i>	Myosin X	2.00	0.004	+	+
<i>Psph</i>	Phosphoserine phosphatase	2.00	0.0287	+	-

(Continued)