

氏名	まえかわ たかし 前川 尚志
学位の種類	博士(医学)
学位授与年月日	平成27年3月25日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科(博士課程) 医科学 専攻
学位論文題目	原発性アルドステロン症の副腎皮質病変における cytochrome P450 11B1(CYP11B1)と cytochrome P450 11B2(CYP11B2)、cytochrome P450c17 (CYP17)発現動態の検討 (新たに作られたモノクローナル抗体を用いた、原発性アルドステロン症の副腎皮質における CYP11B1 および CYP11B2 発現の検討)
論文審査委員	主査 教授 笹野 公伸 教授 出澤 真理 教授 菅原 明

論文内容要旨

【研究背景・目的】

原発性アルドステロン症(Primary aldosteronism; PA)は、病的な副腎皮質組織からアルドステロンが過剰に合成・分泌され、二次性の高血圧を引き起こす疾患である。本邦では、全高血圧患者の内 6-10%程度が PA 患者であると報告されている。PA 患者では、同程度の血圧を呈する本態性高血圧患者と比べてアルドステロンの直接作用により脳卒中、心筋梗塞、心房細動などの重篤な心血管障害を有意に多く引き起こす事が近年明らかになってきている。その為、早期発見早期治療が望まれている。

また、コルチゾールは我々の生存に欠かせない重要な副腎皮質ホルモンであるが、過剰に合成・分泌される事で糖尿病や動脈硬化症などの合併症を引き起こす。PA にコルチゾールの過剰な合成・分泌が加わると、アルドステロンが単独で高値であるよりも、高血圧や臓器障害が重篤化することが提唱されている。また、この場合は一般的に治療抵抗性で、患者の予後は PA の中でも更に不良である。そのため、同一病変内でアルドステロンとコルチゾールの合成動態の詳細を検討する必要があると考えられていた。

PA の一形態であるアルドステロン産生腺腫(Aldosterone-producing adenoma: APA)では、腫瘍性に増殖した細胞からアルドステロンが過剰に合成される。APA ではこの腫瘍を摘出する事が主な治療となる。その為、アルドステロンを合成している場所を正確に同定する必要がある。しかしステロイドホルモン自体を見る事は出来ないので、代わりにステロイド合成酵素を視覚化する事で、アルドステロン合成の場所を特定してきた。

今回はアルドステロン合成の最終段階でステロイドを変換する Cytochrome P450 11B2(CYP11B2)について注目した。この酵素が発現している場所ではアルドステロンが合成されている可能性が非常に高いと考えられた。しかしそれには1つ問題があった。CYP11B2 に構造的に非常に良く似た酵素、Cytochrome 11B1(CYP11B1)の存在である。この酵素はコルチゾールの合成の最終段階で必要とされる酵素である。両者はアミノ酸配列で非常に高い相同性を有しており、特異的抗体の作成が難しく、両者の局在を正確に検索する事が非常に困難であった。これまでも、ポリクローナル抗体を用いた APA での CYP11B1 および CYP11B2 の検索をした報告はあったものの、抗体の特異性の問題が解決されていなかった。また、この際に APA 腫瘍部に CYP11B1 の発現が報告されたものの、その真偽は不明であった。

今回は、新たに抗 CYP11B1 および CYP11B2 モノクローナル抗体が作成可能となった為、こ

れらを用いて正常副腎皮質および PA、特に APA の副腎皮質病変における CYP11B1 と CYP11B2 の発現および局在について今回免疫染色を用いて半定量的に解析した。

【研究対象と方法】

本研究では正常副腎 10 例、特発性アルドステロン症(Idiopathic hyperaldosteronism:IHA)9 例、APA31 例の、合計 50 例を対象とした。各症例には CYP11B1 と CYP11B2 および cytochrome P450c17(CYP17)の免疫組織化学を行い、染色の強さと陽性率を総合して評価する H-score を算出し、半定量的に解析した。APA27 例に対し蛍光免疫染色を行い、同一細胞で CYP11B1 および CYP11B2 が共発現している Hybrid cells(Hybrid cells タイプ A)、同一細胞で CYP11B2 および CYP17 が共発現している Hybrid cells(Hybrid cells タイプ B)、同一細胞で CYP11B1 および CYP17 が共発現している Hybrid cells(Hybrid cells タイプ C)について、その細胞群の面積比、細胞個々の面積、各染色強度について検討し、半定量的に解析した。

【結果】

正常副腎、IHA、APA の附随副腎の球状層において、CYP11B2 は決してびまん性ではなく散在性に発現しているのが認められた。APA の腫瘍部では CYP11B2 が不規則に小集団を形成して発現しているのに対して、CYP11B1 は腫瘍内で部分的に陽性像が認められた。一方 APA の附随副腎においては、CYP11B2 の発現は認められるものの、その発現量は正常副腎、IHA の球状層に比べると有意に低下していた。APA 腫瘍部で蛍光免疫染色を行い、詳細に半定量的検討を行ったところ、大部分の領域で CYP11B1 および CYP11B2 が共に陰性、CYP11B2 および CYP17 が共に陰性、CYP11B1 および CYP17 が共に陰性の細胞であった。CYP11B1 および CYP11B2、CYP11B2 および CYP17 が共に陰性の細胞は他の細胞に比べて個々の細胞の面積が有意に大きかった。Hybrid cells に関してはタイプ A がより多く認められ、ごく少数であるが Hybrid cells タイプ B が、少数の Hybrid cells タイプ C が認められた。これらの Hybrid cells の動態と、性差、年齢、腫瘍径、デキサメサゾン抑制試験後の血中コルチゾール濃度の間には有意な相関関係は認められなかった。

【結語】

CYP11B2 は、正常副腎、IHA、APA の附随副腎の各球状層で散在性に小塊を形成して発現しており、アルドステロン産生は球状層全体ではなくあくまでも局所的に行われている事が初めて明らかになった。一方、アルドステロン合成がほとんど行われていない APA の附随副腎球状層では CYP11B2 の発現は低下していた。

さらに、APA 腫瘍部においては、腫瘍細胞の大部分で CYP11B1、CYP11B2、CYP17 が陰性であり、これらの細胞では生物学的に活性が高いステロイドホルモンはあまり合成されていない事が考えられた。これらの腫瘍細胞の面積は Hybrid cells に比して有意に大きく、細胞質内に多くの脂肪滴が蓄積されより低いステロイド合成動態を示しているものと考えられた。また今回の検討で 3 種類の Hybrid cells が APA に存在し、APA のごく少数の細胞ではコルチゾールとアルドステロンが同時に合成、分泌されている事が初めてわかった。CYP11B1 は、正常副腎では束状層においてコルチゾール合成に関わっておりアルドステロン合成を行う球状層では発現していない。しかし過去の *in vitro* の実験では、腫瘍細胞で CYP11B1 がアルドステロン合成の一部を担うことも示されていた。今回の検討では CYP11B1、B2 が同じ腫瘍細胞で発現している群が認められ、上記の *in vitro* の所見と矛盾しないものと考えられた。また、APA の腫瘍細胞では CYP11B1 と CYP17 が同時に発現する Hybrid cells タイプ C が見られ、APA でもコルチゾールが賛成される可能性が示された。更に、APA の腫瘍細胞では CYP17 と CYP11B2 双方が同じ腫瘍細胞で発現する Hybrid cells タイプ B が認められた。この所見は、Hybrid cells タイプ B ではアルドステロンだけでなくコルチゾールも過剰合成している可能性があると考えられ、今後これらの細胞について臨床病理学的に内分泌上の特徴を明らかにしていく必要があるものと考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

博士論文題目 原発性アルドステロン症の副腎皮質病変における cytochrome P450 11B1(CYP11B1)と cytochrome P450 11B2(CYP11B2)、cytochrome P450c17 (CYP17)発現動態の検討

所属専攻・分野名 医科学専攻 ・ 病理診断学 分野

氏名 前川 尚志

アルドステロンは副腎皮質球状層のみで合成され分泌される水電解質代謝に関わる生体の恒常性維持に関してはもっとも重要なステロイドホルモンの一つである。しかしこのアルドステロンに関しては長い間球状層全てで瀰漫性に分泌されるのか？あるいは一部の球状層細胞で分泌されるのかは不明のままであった。更に原発性アルドステロン症(Primary aldosteronism; PA)は、病的な副腎皮質組織からアルドステロンが過剰に合成・分泌され、二次性の高血圧を引き起こす疾患であるが、この中でももっとも頻度が高いアルドステロン産生腺腫(Aldosterone-producing adenoma: APA)ではどの細胞からアルドステロンが過剰に合成、分泌されるのかは未解明であった。そこで今回の前川の研究ではアルドステロン合成の最終段階でステロイドを変換する Cytochrome P450 11B2(CYP11B2)について注目し Cytochrome 11B1(CYP11B1)に対しての特異的モノクローナル抗体を用いて正常副腎皮質および PA、特に APA の副腎皮質病変における CYP11B1 と CYP11B2 の発現および局在について c17 とあわせて今回免疫染色を用いて初めて半定量的に解析した。この結果からアルドステロン産生は球状層全体ではなくあくまでも局所的に行われている事が初めて明らかになった。一方、アルドステロン合成がほとんど行われていない APA の附随副腎球状層では CYP11B2 の発現は低下していた。APA 腫瘍部においては、腫瘍細胞の大部分で CYP11B1、CYP11B2、CYP17 が陰性であり、アルドステロンを含む生物学的に活性のあるステロイド合成に関与している細胞はごくわずかである事を初めて明らかにした。今回の前川の研究はヒト副腎皮質及び皮質疾患で初めてアルドステロン合成の場と合成の程度を明らかにした優れた内容であり、今後の更なる発展が期待される優れた研究成果であるとも考えられる。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。