

氏 名 (本籍)                    なが                    ぬま                    ひろし  
   長                    沼                    廣

学 位 の 種 類                    医                    学                    博                    士

学 位 記 番 号                    医                    第                    1 6 5 9                    号

学位授与年月日                    昭 和   6 0 年   2 月   2 7 日

学位授与の要件                    学位規則第5条第2項該当

最 終 学 歴                    昭 和   5 3 年   3 月  
   東北大学医学部医学科卒業

学位論文題目                     $11\beta$ -hydroxylation in mitochondrial fractions  
   in adrenocortical tumors with primary aldost-  
   eronism, Cushing's syndrome and adrenogenital  
   syndrome and in non-functioning adenomas.  
   (原発生アルドステロン症, Cushing 症候群, 副腎  
   性器症候群および非機能性副腎皮質腫瘍ミトコン  
   ドリア分画における $11\beta$ -hydroxylation の検討)

(主 査)

論文審査委員   教授 笹 野 伸 昭                    教授 吉 永                    馨

教授 京 極 方 久

# 論文内容要旨

## 目 的

副腎皮質腫瘍は、原発性アルドステロン症、Cushing 症候群、副腎性器症候群、非機能性腫瘍に分類される。これらの病型の差に応じた組織学的及び超微形態学的な変化が明らかにされており、腫瘍化による細胞内ミトコンドリアと滑面小胞体の形態の差に応じて、ステロイド合成酵素系の異常がおけると推測される。そこで、ヒトの手術摘出副腎皮質腺腫および癌のミトコンドリアを用いて *in vitro* における  $11\beta$ -hydroxylase ( $11\beta$ -OH lase) の活性を調べ、組織像との対比を行い、腫瘍化に伴う本酵素活性の変化を検討した。

## 対象および実験方法

手術で摘出されたヒト副腎皮質腫瘍 21 例を選んだ。内訳は副腎皮質腺腫 17 例（原発性アルドステロン症 8 例、Cushing 症候群 6 例、非機能性 3 例）、副腎皮質癌 4 例（Cushing 型 2 例、男性化型 2 例）である。対照ヒト副腎皮質としては、乳癌、褐色細胞腫或いは腎癌のために摘出された副腎 5 例を用いた。副腎皮質腫瘍或いは副腎皮質を細切後、0.25 M 蔗糖を含む 10 mM Tris-HCl buffer (THB) の中に入れ、ホモジナイズ後  $600 \times g$  で遠心し、核分画を除いた。その上清を  $6,000 \times g$  で 10 分間遠心する操作を 3 回繰り返す、得られた沈渣をミトコンドリア分画とし、 $-20^{\circ}\text{C}$  に保存した。なお、本分画の一部を 3% glutaraldehyde を含む 0.1 M cacodylate buffer に入れて固定後、電顕観察を行った。前述の方法で得た本分画の浮遊液の一部を用い、Lowry らの変法により蛋白濃度を測定し、11.5 mM NaCl, 15.7 mM KCl, 70 mM コハク酸 Na, 10 mM 蔗糖を含む 20 mM THB で蛋白濃度が 0.1~0.2 mg/ml となるように調整した。この溶液 0.5 ml に、基質として  $1,2-^3\text{H}$ -deoxycorticosterone (DOC) (specific activity: 55 Ci/nmol) を 1~1.5  $\mu\text{Ci}$  (約 18 pmol に相当) 或いは  $1,2-^3\text{H}$ -deoxycortisol (S) (specific activity: 58.5 Ci/nmol) を 1~1.5  $\mu\text{Ci}$  (約 18 pmol に相当) 添加し、大気下に  $37^{\circ}\text{C}$  で振盪しながら 30 分間 incubation した。反応をメタノールで止め、10 倍量のジクロロメタンで抽出し、discard layer を吸引除去し、減圧乾固した。この残渣を silica gel chromatogram (TLC) sheet に apply し、toluene:methanol = 90:10 の溶媒系で展開し、TLC scanner で scan して、基質と生成物を検出した。検出された各ステロイド分画をメタノールで elute し、トリチウムの量を液体シンチレーションカウンターで測定し、生成ステロイド量を算出し、 $11\beta$ -OH lation の指標とした。

## 結 果

電頭的に得られたミトコンドリア分画には比較的細胞膜断片，小胞体の混入の少ないことが証明できた。本分画の incubation の結果，DOCからは corticosterone(B),Sからはcortisol (F) が生成され， $11\beta$ -OH lase がミトコンドリア分画に存在することを確認した。1)対象ヒト副腎皮質：DOCを基質とした $11\beta$ -OH lation は， $24\sim 63$  pmol/mg protein (以下 pmol/mg)(平均  $45$  pmol/mg)，Sを基質とした場合は  $15\sim 30$  pmol/mg (平均  $24$  pmol/mg)であった。2) ヒト副腎皮質腫瘍：①原発性アルドステロン症副腎腺腫：DOCを基質とした本酵素活性は $48\sim 261$  pmol/mg，Sを基質とした場合， $21\sim 75$  pmol/mgで，8例中6例において正常対象例の3～5倍の活性がみられた。このうち5例では，Bから更に  $18$ -hydroxycorticosterone ( $18$ -OH-B) への転換がみられた。②Cushing 症候群を呈した皮質腫瘍：本酵素活性が正常対象例と同程度の例(3例)と高い例(4例)に大別され，後者には臨床的に尿中  $17$ -KSの増加がみられた。前者は組織学的に典型的な腫瘍であり，後者のうち1例は異型腺腫で1例は borderline malignancy の像を示した。③非機能性腺腫：3例中2例は正常対象と同程度の活性を示し，1例は高い活性を示した。④副腎皮質癌：Cushing 型の1例では，正常対象と同程度の活性を示したが，男性化型の2例の活性はいずれも低値であった。

## 考 察

これまで副腎癌において種々のステロイド合成酵素異常が報告されているが，腺腫における酵素異常の報告はほとんどない。今回の実験結果より，原発性アルドステロン症およびCushing 症候群の副腎皮質腺腫において $11\beta$ -OH lation が亢進している例が多いことを明らかにした。特に，前者における亢進が著名で，かつBから  $18$ OH-Bへの転換が認められることから， $18$ -hydroxylation の亢進している例もあると推測された。また，Cushing 症候群を呈した腫瘍の中に本酵素活性の高い群があり，その1例は悪性を示し，悪性に伴い酵素活性が高くなる例もあることを明らかにした。また，非機能性の中にも本酵素活性の高い例もあり，前駆ステロイドの供給が多ければステロイド過剰を示す可能性も推測された。従来，Cushing 型副腎癌では， $11\beta$ -OH lase 活性低下があると報告されているが，ミトコンドリアを取り出し，単位タンパク当たりでみると正常とほぼ同程度であった。一方，男性化型では本酵素活性が低下していることを明らかにした。

## 審 査 結 果 の 要 旨

内分泌活性を示す副腎皮質腫瘍は、臨床的に原発性アルドステロン症、Cushing 症候群または、副腎性器症候群を惹起する。これらの症状の差に応じた腫瘍の所見として、光顕および超微形態学的な差が詳細に報告され、また、血中、組織中のステロイドを測定することにより、ステロイド合成酵素系の異常が推測されてきた。特に副腎癌では、種々の酵素欠損、活性低下がみられ、男性化型では $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, 21-hydroxylase, Cushing 型では $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, 21-hydroxylase,  $11\beta$ -hydroxylase の活性低下が指摘されている。これらステロイド合成酵素の座は、細胞内小器官、特にミトコンドリアおよびマイクロゾームにあるが、小器官を形態学的に観察した業績の多いのに対して、これらを分離採取して、その中の酵素活性を直接検討した報告はない。また、腺腫における酵素異常の有無もいまだ不明の点が多い。本研究は、皮質腫瘍細胞からミトコンドリア分画を採取し、本分画に前駆ステロイド (DOC 或いは11-deoxycortisol) を添加し、反応生成物 (corticosterone あるいは cortisol) の量を測定し、 $11\beta$ -hydroxylase 活性を検討したものである。

この結果、男性化型副腎癌では従来報告されている $3\beta$ -HSD, 21-OH lase の他に、 $11\beta$ -OH lase 活性も低下していることが判明した。Cushing 型腫瘍の本酵素活性は、典型的な副腎癌ではほぼ正常であったが、腺腫群には正常例と亢進例とがみられ、後者の中には組織学的に異型の腺腫, borderline malignancy を示した例が含まれていた。すなわち、典型的な腺腫および癌では $11\beta$ -hydroxylase が正常であるのに対し、いわゆる境界領域の腫瘍では酵素活性の亢進がみられ、組織学的異型に伴う酵素異常が推測された。このような良性から悪性に至る一連の腫瘍型についてステロイド生成酵素の検討は、これまで報告が少ない。

原発性アルドステロン症を呈した腺腫群では、いずれも本酵素活性の亢進がみられた。従来、血中、組織中のステロイド測定から、本腺腫では $17\alpha$ -hydroxylase の活性低下が推測されており、アルドステロン過剰の主な原因と考えられている。本研究から $11\beta$ -OH lase 活性の亢進もアルドステロン過剰の大きな要因であることが判明した。

臨床的に全くステロイド過剰症を示さない非機能性腺腫の中にも、本酵素活性の高いものがみられ、充分ステロイド生成能を持つ腺腫も存在することが明らかになった。

以上のように、副腎皮質腫瘍各型に種々の程度で $11\beta$ -OH lase 活性の異常があることを明らかにした本研究は、内分泌腫瘍における形態と機能との相関を研究する基礎的分野で、画期的な業績としてすでに国際的な評価をうけている。よって本論文は学位に値するものと認められる。