

Adrenal P-450 Activities in the Adrenal Tumors

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8572

機能性副腎皮質腫瘍ならびに非機能性副腎皮質腫瘍における 腫瘍内チトクローム P-450 活性に関する研究

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任代理: 馬淵 宏助教授)

高 崎 秀 昭

副腎においてステロイドホルモンの生合成を行っているのは、副腎皮質チトクローム P-450 (cytochrome P-450, P-450) を中心としたモノオキシゲナーゼ系である。本研究は、副腎皮質の機能性および非機能性副腎腫瘍において、これら P-450 がステロイド合成にどのように関与しているかを蛋白レベルで検討することを目的とした。腫瘍はいずれも手術により摘出された副腎腺腫組織であり、その電子伝達系諸要素は、ウシ副腎皮質ミトコンドリアおよびブタ精巣ミクロゾームから分離精製された標品を用いた。水中で基質ステロイド、電子伝達系諸要素およびアスコルビン酸を含む反応系を作成し、種々の蛋白濃度の可溶化した副腎ホモジネートを添加しインキュベーションした。反応によって得られた生成物のステロイド量を計測し各種 P-450 活性を求めた。その結果、原発性アルドステロン症の副腎腺腫内 P-450 活性では、P-450 コレステロール側鎖切断酵素 (side chain cleavage, SCC) $12.33 \pm 4.01 \text{ nmol プレグネノロン/mg 蛋白/min}$, P-450 11β $55.84 \pm 3.70 \text{ nmol コルチコステロン/mg 蛋白/min}$ であり対照群 $6.50 \pm 0.94 \text{ nmol プレグネノロン/mg 蛋白/min}$, $8.77 \pm 1.11 \text{ nmol コルチコステロン/mg 蛋白/min}$ と比較して、ミトコンドリア P-450 活性の有意の上昇を認め、特に P-450 11β 活性の上昇が顕著であった。クッシング症候群においては、副腎腺腫内 P-450 活性では特にミクロゾーム P-450 17α 活性の上昇が認められ、対照群 $0.056 \pm 1.3 \times 10^{-3} \text{ nmol 生成物/mg 蛋白/min}$ に対して $0.408 \pm 0.03 \text{ nmol 生成物/mg 蛋白/min}$ と著明な活性上昇を示した。非機能性副腎腺腫においては、各種 P-450 活性とも測定可能であり統計的に有意な活性の上昇および減少は示さなかった。以上の結果より機能性副腎腫瘍においては、腺腫内ステロイド合成の酵素活性には正常副腎に比し異常が認められ、主として P-450 11β および P-450 17α 活性が病態発生に関与している可能性が示唆された。また、非機能性副腎腺腫においても腺腫内ステロイド合成の酵素活性の存在が確認され、そのステロイド合成能の存在が示唆された。

Key words ステロイド合成, チトクローム P-450, 副腎皮質腫瘍

ステロイドホルモンは、副腎皮質、精巣、卵巣、胎盤などの産生臓器でコレステロールを基質として生合成される。これらのステロイドホルモン生合成過程ではチトクローム P-450 (cytochrome P-450, P-450) が重要な役割を果たしている。P-450 は鉄-プロトポルフィリンを補欠分子族とし、還元型 CO 差スペクトルが 450 nm に極大吸収を示す酸素添加酵素であるが副腎皮質には少なくとも 4 種の副腎皮質チトクローム P-450 があることが知られている¹⁾。このうちミトコンドリア内膜には P-450 コレステロール側鎖切断酵素 (side chain cleavage, SCC) と P-450 11β (11β 位および 18 , 19 位水酸化酵素) が、ミクロゾーム膜には、P-450 C21 (21 位水酸化酵素)、P-450 17α (17α 位水酸化および 17 - 20 位側鎖切断酵素) が局在している^{2,3)}。副腎皮質ステロイドホルモンの生合成の過程で生ずる代謝中間体は、これら両オルガネラ膜間を往復しながら各 P-450 によって特異的に化学修飾を受ける。この為、各酵素の活性の強さはホルモンの産生量に大きな影響を与えると考えられる。

1983年に Meuli ら⁴⁾はラットを高 K^+ 食あるいは低 Na^+ 食で

飼育すると血漿アルドステロンレベルが上昇する⁵⁾ ことに着目し、ラットに K^+ 添加食を与えると球状層ミトコンドリア中に分子量 $49,000$ の蛋白質が誘導されることを見出し、このものがアルドステロン合成酵素ではないかと予想した。その後の研究によってこれはウシ P-450 11β に対する単クローン抗体と免疫交差性をもつことが明らかになった⁶⁻⁸⁾。一方、ヒトにおいてアルドステロン過剰状態を引き起こす代表的疾患の一つである原発性アルドステロン症患者の摘出副腎腺腫を用いた研究では 18 位水酸化反応の亢進が、これまでも報告されており^{9,10)}、アルドステロン合成にこれらミトコンドリア P-450 がどのように関与しているかが注目された。そこで筆者は、原発性アルドステロン症患者の摘出腺腫組織を用いてミトコンドリア P-450 を測定し正常組織ならびに原発性アルドステロン症における腺腫組織の P-450 SCC および P-450 11β 活性についてそれぞれ反応回転数 (turnover number, TN) を求め比較し、その成績を報告した¹¹⁾。

これまでミクロゾーム P-450 活性に関してはヒトにおいて P-450 17α 活性のみは、従来の方法では求められなかったが新

平成 6 年 6 月 9 日受付, 平成 6 年 8 月 8 日受理

Abbreviations: DLPC, dilauroilphosphatidyl choline; FpD, NADH-cytochrome b_5 reductase; FpT, NADPH-cytochrome P-450 reductase; HPLC, high-pressure liquid chromatography; P-450, cytochrome P-450; RT, retention time; SCC, side chain cleavage; TN, turnover number

たに副腎組織よりミクロゾーム層を抽出することにより測定可能となった為、これら副腎においてステロイド合成に関与するすべての P-450 が測定可能となった。そこで本研究ではこれまでに得られた知見に加えて、原発性アルドステロン症ならびに正常副腎についてこれらミクロゾーム P-450 活性を含む各種 P-450 活性について比較検討を行った。また、同様にクッシング症候群および非機能性副腎腺腫に関してもそれぞれ各種 P-450 活性を測定し比較検討を行った。

対象および方法

I. 対象

臨床症状および諸検査により原発性アルドステロン症ならびにクッシング症候群と診断され、手術施行により摘出された副腎標本を用いた。また臨床所見上は非機能性腫瘍ながら手術施行が行われた副腎標本ならびに対照として、鉱質コルチコイドおよび糖質コルチコイドが正常範囲内で他の内分泌異常の合併がないことが確認された Grawitz 腫瘍患者の摘出副腎を用いた。

得られた副腎 1g に対して 2.4ml の 30mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) に浮置し、テフロンホモジナイザーで粉碎した。タンパク定量はウシ血清アルブミンを標準タンパク質とし、ビューレット法によって測定した。次に副腎ホモジネートを 30mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4), 0.1mM ジチオスレイトール (和光純薬工業, 大阪), 0.1mM EDTA (花王アトラス, 東京), 1% コール酸ナトリウム (和光純薬), 0.5% エマルゲン 913 (花王アトラス) を含む系で 4°C, 1 時間にて可溶化を行った。この際 P-450 11 β 活性保護剤としてその基質である 10 μ M のデオキシコルチコステロン (Sigma, St.Louis, U.S.A) を添加して安定化を計った。またジチオナイトおよびメチルバイオラジェン添加にて一酸化炭素で通気しその吸光度を求め P-450 の変性の大きい副腎例は対象から除外した。測定に用いた内訳は原発性アルドステロン症 7 例 (男性 3 例, 女性 4 例, 42-71 才) クッシング症候群 3 例 (男性 1 例, 女性 2 例, 38-54 才), 非機能性副腎腺腫 3 例 (男性 2 例, 女性 1 例, 37-58 才) および対照 8 例 (男性 5 例, 女性 3 例, 33-62 才) であった。なお、上記副腎腫瘍患者はいずれも未治療例であり、摘出された腫瘍径はそれぞれ原発性アルドステロン症例では 1.3~1.8cm, クッシング症候群例では 2.4~4.0cm, 非機能性副腎腺腫例では 2.2~3.2cm であった。

II. 電子伝達系

NADPH-アドレノドキシン還元酵素, アドレノドキシン, NADH-チトクローム b_5 還元酵素 (NADH-cytochrome b_5 reductase, FpD), NADPH-チトクローム P-450 還元酵素 (NADPH-cytochrome P-450 reductase, FpT), チトクローム b_5 (b_5) などの電子伝達系諸要素は, Suhara ら¹²¹³⁾の方法に準じて精製し下記のごとく濃度を決定した。

1. NADPH-アドレノドキシン還元酵素

ウシ副腎皮質ミトコンドリアより調整し, 活性は室温で 30mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.2) 中に 2 μ M のアドレノドキシン, 50 μ M の NADPH, 20 μ M のチトクローム C (Sigma) を含む 0.5ml の系に触媒量の酵素標品を加え, チトクローム C の還元による 550nm の吸光度増加の初速度 ($\Delta\epsilon 550 \text{ nm} = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) を求め, 1 分間に 1 μ mol のチトクローム C を還元する酵素量を 1 単位とした。

2. アドレノドキシン

ウシ副腎皮質より精製し濃度はその絶対吸収スペクトルにより 414nm のモル吸光係数 ($\epsilon 414 \text{ nm} = 9.92 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) を用いて決定した。

3. FpT

ブタ精巣ミクロゾームより精製し, 活性は 300mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.7), 50 μ M チトクローム C, 50 μ M NADPH を含む 0.5ml の系に触媒量の酵素標品を加え, NADPH-アドレノドキシン還元酵素と同様にして求めた。

4. FpD

ブタ精巣ミクロゾームから FpT を精製する際の DEAE-セファセル溶離成分より精製し活性は室温で 100mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.5), 1mM フェリシアン酸カリウム, 100 μ M NADH を含む 0.5ml の反応系に触媒量の酵素標品を加えフェリシアン酸イオンの 420nm における吸光度減少初速度 ($\Delta\epsilon 420 \text{ nm} = 1.02 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) を求め 1 分間に 1 μ mol のフェリシアン酸イオンを還元する酵素量を 1 単位とした。

5. b_5

ブタ精巣ミクロゾームより精製し, 濃度は酸化還元差スペクトルで $\Delta\epsilon 409-429 \text{ nm} = 185 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を用いて求めた。

III. 副腎ホモジネート中の P-450 SCC 活性測定

[1 α , 2 α (n)-³H] コレステロール (Amersham, Buckinghamshire, UK) を終濃度 120 μ M に調整し, ツイーン 20 (半井化学薬品, 京都) を加え 70°C で 5 分間インキュベーションしコレステロールを溶解させた。室温にて冷却後, 水中で更に 3.5 μ M アドレノドキシン, 500 単位/1 アドレノドキシン還元酵素, 15mM アスコルビン酸および各蛋白濃度の副腎ホモジネート, 30mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) を加え 37°C で 2 分間プレインキュベーションを行った。150 μ M NADPH (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) を添加し反応を開始し 37°C で 15 分間反応を行い 1.6ml の停止液 (メタノール: クロロホルム = 1 : 1) を加え反応を終結した。内部標準として [4-¹⁴C] プレグネロン (Amersham) を加えた後 0.5ml の蒸留水にて水洗 10 秒間攪拌の後, 1 分間 3,000 回転で遠心分離した。有機溶媒層を分離した後, 蒸発乾固し少量のクロロホルムで再溶解し, シリカゲル薄層クロマトグラフィプレート (0.6 \times 9cm, G25UV, Macherey-Nagel, Duren, Germany) にスポットした。シクロヘキサン: 酢酸エチル = 6 : 4 混合液で展開後, ヨウ素を付着させてステロイドを確認した。検出した生成物をプレートからきり取り液体シンチレーションカウンター LSC-671 (アロカ, 東京) でプレグネロンの放射活性を計測し P-450 SCC を求めた。

IV. 副腎ホモジネート中の P-450 11 β 活性測定

反応系は 30mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) を用いて全量 0.3ml とし, 50nmol のデオキシコルチコステロン (Sigma) と 3nmol のアドレノドキシン, 0.2 単位のアドレノドキシン還元酵素, 等の電子伝達系諸要素を III. に準じて加える。P-450 11 β は不安定な酵素である為, 先に 100nmol NADPH を添加し反応系を作成し, 反応開始は, 37°C で 2 分間プレインキュベーションの後, 各蛋白濃度の副腎ホモジネートにて行った。反応は, 37°C で 3 分間行い反応停止後, 反応系に内部標準ステロイドとして, 19 位ノルテストステロン 10nmol を加えてから有機溶媒層を分離した。溶媒を N₂ 気流下, 40°C 以下で蒸発・乾固させ 100% メタノールに溶かし抽出したステロイドを高速度液体

クロマトグラフィー [high pressure liquid chromatography, HPLC (CHEMCOSORB 5-ODS-H ϕ 2.1 \times 150mm (ケムコ, 大阪)] で分離・定量した。ステロイドの溶離は 240nm の吸収で測定し 50% メタノール溶媒にて流速 0.8ml/分, カラム温度 45 $^{\circ}$ C で分離した。また, ステロイドの定量は, HPLC プロファイルにおける既知量のステロイドのピーク面積と生成物のピーク面積の比から求め, 同時に内部標準ステロイドから回収率を計算し, 生成物量の補正を行った。

V. 副腎ホモジネート中の P-450 C21 活性測定

リン脂質であるジラウロイルホスファチジルコリン (dilauroilphosphatidyl choline, DLPC) (Sigma) を含む 30mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) 中に 200 μ M の 17 α 位水酸化プロゲステロン (Makor, Jerusalem, Israel) を添加後, 各蛋白濃度の副腎ホモジネートを加えた。更に電子伝達系として 0.3mM NADPH, 1.1 μ M チトクローム *b*₅, 6.0×10^3 単位/1FpT, 4.8×10^5 単位/1FpD を添加し反応系を作成し 37 $^{\circ}$ C で 2 分間ブレインキューブレーションした後 0.3mM NADPH によって反応を

開始した。37 $^{\circ}$ C で 30 分反応させた後内部標準として 19 位水酸化アンドロステンジオン (Sigma) を加え II. に準じて有機溶媒層を分離後, 蒸発・乾固させた。100% アセトニトリルにて溶解させた後, HPLC 法 [CHEMCOSORB 5-ODS-H ϕ 2.1 \times 150mm (ケムコ)] にて分離, 定量した。測定条件は 32% 液体クロマトグラフィー用アセトニトリル (和光純薬) を溶媒としカラム温度 40 $^{\circ}$ C, カラム流速 0.2ml/分にて行った。

VI. 副腎組織よりのマイクロゾーム層の分離・精製

副腎組織を氷上にて懸濁しテフロンホモジナイザーで粉碎した後, Kominami ら³⁾の方法に準じ, 超遠心にてマイクロゾーム層を分離した。可溶性には前述同様, 0.1mM EDTA, 0.1mM ジチオスレイトール, 1% コール酸, 10% ツイーン20 を用い 1 時間攪拌後 P-450 17 α 活性測定に用いた。また, 蛋白定量はビュレット法によって行った。

VII. 副腎マイクロゾーム中の P-450 17 α 活性測定

反応基質には 200 μ M のプロゲステロン (Sigma) を用いた。添加する電子伝達系諸要素は, ほぼ V. に準じたが, 副腎ホモジネートに代わり VI. によって得られた副腎マイクロゾームを加えた。37 $^{\circ}$ C, 45 分間, 反応を行い内部標準ステロイドには 19 位ノルテストステロンを用いた。ステロイド抽出, HPLC 操作は V. に従い, 溶媒には 36% 液体クロマトグラフィー用アセトニトリルを用いた。カラム温度は 40 $^{\circ}$ C, カラム流速は 0.2ml/分にて分離を行った。

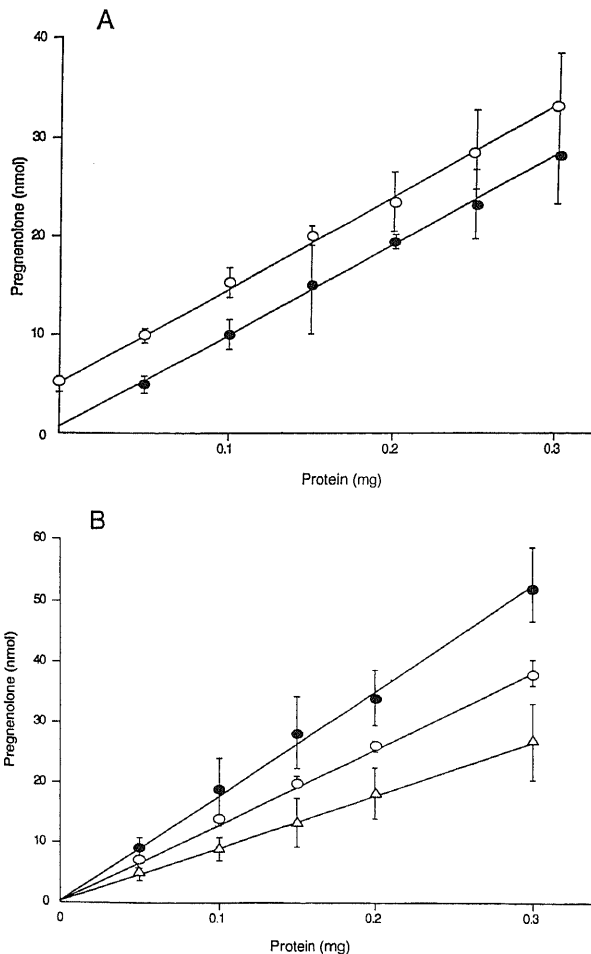


Fig. 1. Effects of various concentrations of adrenal homogenates on the activity of P-450 SCC in the reconstituted system. A. Normal adrenal tissue. The assay was carried out in the absence (●) or presence (○) of 40 μ M of purified P-450 SCC. B. Adrenal tumor. ○, Cushing's syndrome; ●, aldosterone-producing adenoma; △, non-functioning adrenal tumor. In this assay, conversion of pregnenolone from cholesterol was measured, as P-450 SCC activity. Each point represents mean \pm S.E.M.

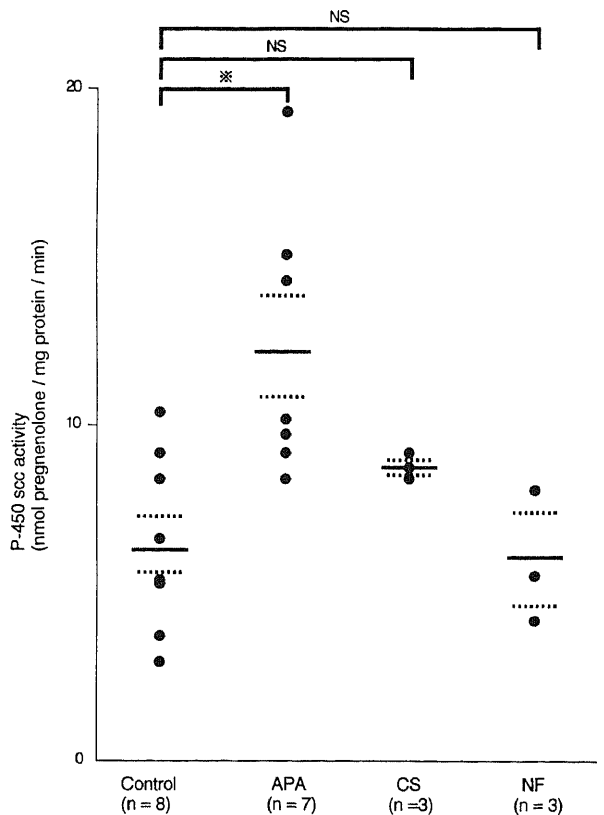


Fig. 2. P-450 SCC activities in the control adrenal tissue (control), aldosterone-producing adenoma (APA), Cushing's syndrome (CS) and non-functioning adrenal tumor (NF). Plots show enzyme activity of P-450 SCC and each bar indicates mean \pm S.E.M. *, $p < 0.01$ vs. control; NS, not significant.

VII. 各種ヒト副腎 P-450 活性測定に及ぼす反応時間, ならびに精製チトクローム P-450 の影響

ヒト副腎 P-450 SCC, P-450 11 β , P-450 C21, P-450 17 α 各種活性測定に際し, 反応時間による P-450 の活性の影響をみる為, それぞれ, ホモジネート蛋白 0.2mg, また P-450 17 α 活性に関してはミクロゾーム蛋白 0.3mg にて各反応時間における生成ステロイド量を比較検討した. また, 各種 P-450 活性測定に, それぞれの電子伝達系諸要素が不足なく添加されているかを確認するために, 更に既存の精製 P-450¹³¹⁴ を P-450 SCC 40 μ M, P-450 11 β 20 μ M, P-450 C21 8 μ M, P-450 17 α 20 μ M, と一定濃度加え, III., IV., V., VI. に準じて反応を行った.

IX. 統計学的検討

測定値はすべて平均値 \pm 標準誤差で示した. 各疾患群と対照群の統計学検定は, Student の t-検定により行い, $P < 0.05$ を有意差有りとして判定した.

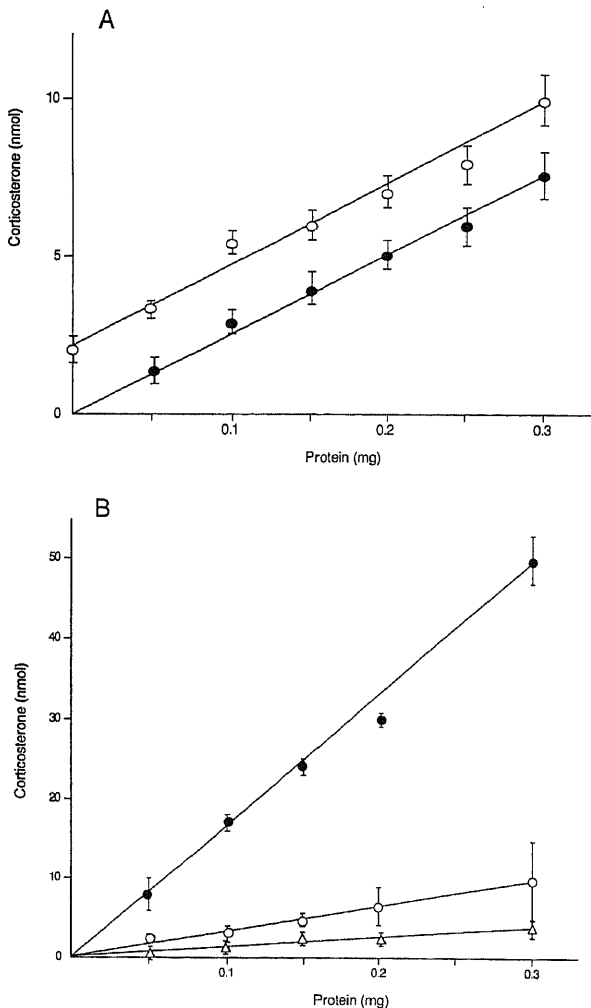


Fig. 3. Effects of various concentrations of adrenal homogenates on the activity of P-450 11 β in the reconstituted system. A. Normal adrenal tissue. The assay was carried out in the absence (●) or presence (○) of 20 μ M of purified P-450 11 β . B. Adrenal tumor. ○, Cushing's syndrome; ●, aldosterone-producing adenoma; △, non-functioning adrenal tumor. In this assay, conversion of corticosterone from deoxycorticosterone was measured, as P-450 11 β activity. Each point represents mean \pm S.E.M.

成 績

I. 副腎ホモジネート中の P-450 SCC 活性

1. 対照群 (n=8)

本反応における生成物(プレグネノロン)の Rf 値は 0.46 であり, 内部標準より求めた回収率は平均 $89.3 \pm 6.6\%$ であった. また, 本反応はホモジネート蛋白 0.3mg まで蛋白濃度依存性をもって増加反応を示し(図 1 A), その傾きより求めた TN は 6.50 ± 0.94 nmol プレグネノロン/mg 蛋白/min であった.

2. 腺腫群 (n=13)

本反応においても各腺腫群においてホモジネート蛋白に蛋白濃度依存性をもって増加反応を示し(図 1 B), その TN はそれぞれ原発性アルドステロン症腺腫群 (n=7) で 12.33 ± 4.01 nmol プレグネノロン/mg 蛋白/min, クッシング症候群腺腫群 (n=3) で 8.80 ± 0.40 nmol プレグネノロン/mg 蛋白/min, 非機能性副腎腺腫群 (n=3) で 5.93 ± 1.99 nmol プレグネノロン/mg 蛋白/min であり, 原発性アルドステロン症腺腫群では, 対照群と比較して P-450 SCC は亢進している傾向にあった ($P < 0.01$) (図 2). 腺腫群での平均回収率は $91.4 \pm 4.4\%$ であった.

II. 副腎ホモジネート中の P-450 11 β 活性

1. 対照群 (n=8)

本反応における基質(デオキシコルチコステロン)および予

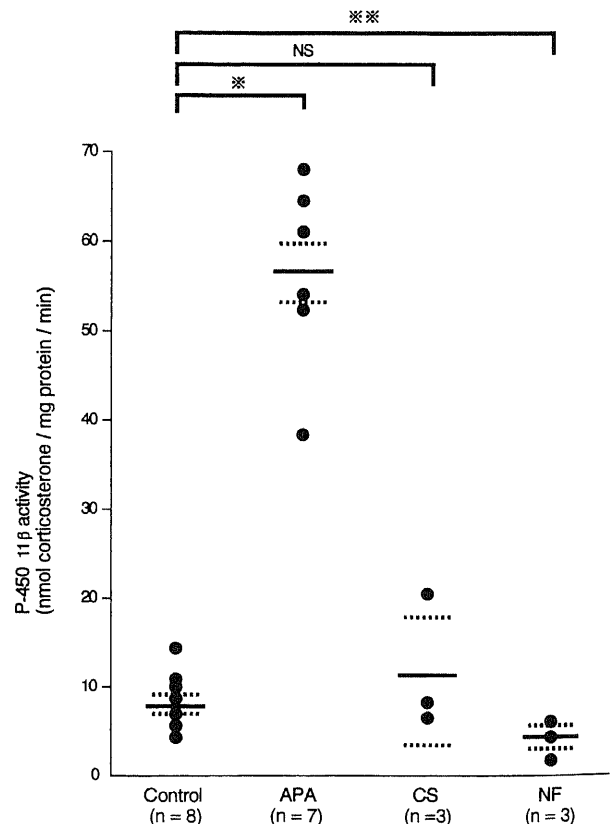


Fig. 4. P-450 11 β activities in the control adrenal tissue (control), aldosterone-producing adenoma (APA), Cushing's syndrome (CS) and non-functioning adrenal tumor (NF). Plots show enzyme activity of P-450 11 β and each bar indicates mean \pm S.E.M. *, $p < 0.001$ vs. control; **, $p < 0.1$ vs. control; NS, not significant.

想される生成物であるコルチコステロン, 18水酸化コルチコステロン, 18水酸化デオキシコルチコステロン, アルドステロン, ならびに内部標準ステロイド(19位ノルテストステロン)の各ステロイドの保存時間 (retention time, RT) はそれぞれ60分, 30分, 14分, 25分, 12分, 45分であり, 内部標準ステロイドの回収より求めた回収率は $87.6 \pm 6.2\%$ であった. 3分間のインキュベーションにおいては, 生成物はコルチコステロンおよび18水酸化デオキシコルチコステロンのみでありコルチコステロンより18水酸化コルチコステロン, アルドステロンへの反応の進行に相当する生成物の産生は認められなかった. 本反応においては, P-450 11 β 活性をコルチコステロンの生成量をもって TN とした. また, 本反応においてもホモジネート蛋白 0.3mg まで濃度依存性をもって増加反応を示し(図 3 A), その

TN は $8.77 \pm 1.11 \text{ nmol コルチコステロン/mg 蛋白/min}$ であった.

2. 腺腫群 (n=13)

各腺腫群において生成物は, コルチコステロンおよび18水酸化デオキシコルチコステロンであり, その回収率は $88.4 \pm 6.5\%$ であった. また, 各群ともホモジネート蛋白に濃度依存性をもって増加し(図 3 B), その TN はそれぞれ原発性アルドステロン症腺腫群 (n=7) $55.84 \pm 3.70 \text{ nmol コルチコステロン/mg 蛋白/min}$, クッシング症候群腺腫群 (n=3) $11.80 \pm 5.29 \text{ nmol コルチコステロン/mg 蛋白/min}$, 非機能性副腎腺腫群 (n=3) $4.27 \pm 1.41 \text{ nmol コルチコステロン/mg 蛋白/min}$ であり, 対照群と比して特に原発性アルドステロン症腺腫群の P-450 11 β 活性の著明な上昇を認め ($P < 0.001$) 約 6.37 倍の活性を得た(図 4).

Ⅲ. 副腎ホモジネート中の P-450 C21 活性

1. 対照群 (n=7)

本反応における基質(17位水酸化プロゲステロン)および予測される生成物であるデオキシコルチゾール, コルチゾール, アンドロステンジオンならびに内部標準ステロイド(19位水酸化アンドロステン)の各ステロイドの RT はそれぞれ62分, 21分, 53分, 9分, 10分であり, 回収率は $87.6 \pm 6.2\%$ であった. このうち反応生成物は21位水酸化反応によるデオキシコルチゾールのみであり 17 α 位水酸化反応によるアンドロステンジオンの検出は本再構成系では行い得なかった. 本反応においても21位水酸化反応は, ホモジネート蛋白濃度依存性に増加し(図 5 A), TN は $0.67 \pm 0.12 \text{ nmol デオキシコルチゾール/mg 蛋}$

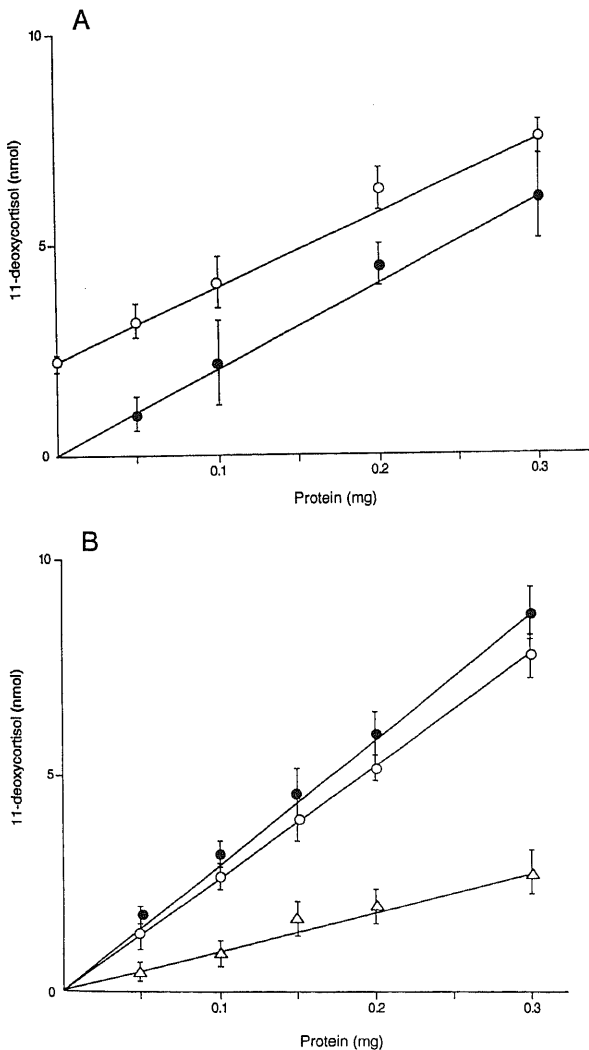


Fig. 5. Effects of various concentrations of adrenal homogenates on the activity of P-450 C21 in the reconstituted system. A. Normal adrenal tissue. The assay was carried out in the absence (●) or presence (○) of $8 \mu\text{M}$ of purified P-450 C21. B. Adrenal tumor. ○, Cushing's syndrome; ●, aldosterone-producing adenoma; △, non-functioning adrenal tumor. In this assay, conversion of 11-deoxycortisol from 17α -hydroxyprogesterone was measured, as P-450 C21 activity. Each point represents mean \pm S.E.M.

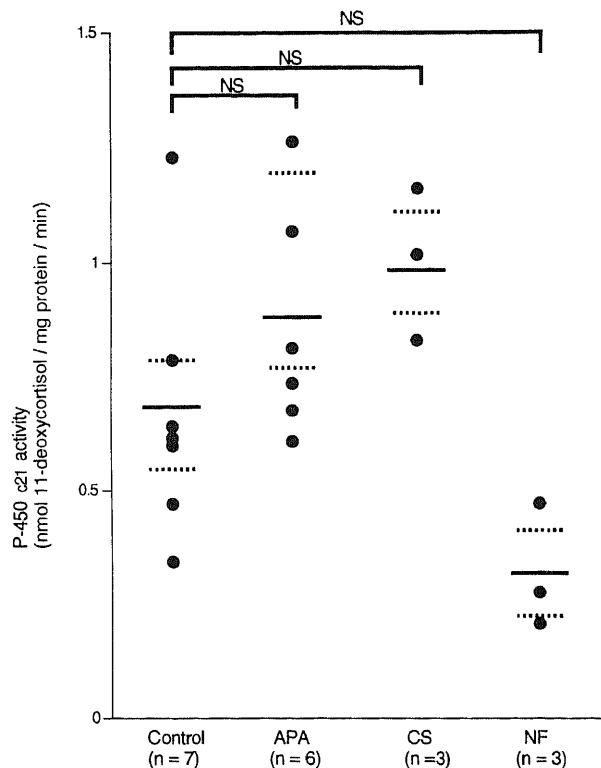


Fig. 6. P-450 C21 activities in the control adrenal tissue (control), aldosterone-producing adenoma (APA), Cushing's syndrome (CS) and non-functioning adrenal tumor (NF). Plots show enzyme activity of P-450 C21 and each bar indicates mean \pm S.E.M. NS., not significant.

白/min であった。

2. 腺腫群 (n=12)

いずれの腺腫群においても反応活性は21位水酸化反応のみであり、アンドロステンジオンの生成は認め得なかった。腺腫群の回収率は $86.4 \pm 8.2\%$ であった。各群ともホモジネート蛋白濃度依存性の P-450 C21 活性を認め (図 5 B), P-450 C21 反応における TN はそれぞれ、原発性アルドステロン症腺腫群 (n=6) 0.86 ± 0.11 , クッシング症候群腺腫群 (n=3) 1.00 ± 0.12 , 非機能性副腎腺腫群 (n=3) 0.32 ± 0.10 nmol デオキシコルチゾール/mg 蛋白/min でありいずれの群も対照群と比較して有意な増加, または減少を認めなかった (図 6)。

IV. 副腎ミクロゾーム中の P-450 17 α 活性

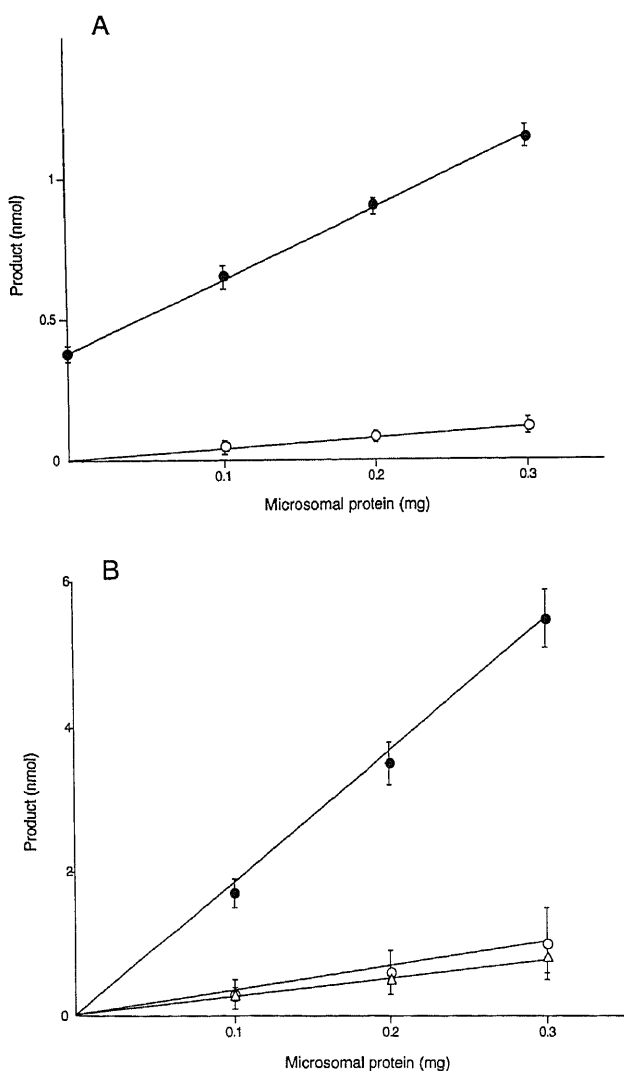


Fig. 7. Effects of various concentrations of adrenal microsomes on the activity of P-450 17 α in the reconstituted system. A. Normal adrenal tissue. The assay was carried out in the absence (●) or presence (○) of 20 μ M of purified P-450 17 α . B. Adrenal tumor. ○, Cushing's syndrome; ●, aldosterone-producing adenoma; △, non-functioning adrenal tumor. In this assay, conversion of 17 α -hydroxyprogesterone and 11-deoxycortisol from progesterone was measured, as P-450 17 α activity. Product consists of 17 α -hydroxyprogesterone and 11-deoxycortisol. Each point represents mean \pm S.E.M.

1. 対照群 (n=5)

本反応における基質 (プロゲステロン) および予想される生成物である 17 α 水酸化プロゲステロン, アンドロステンジオン, デオキシコルチゾール, デオキシコルチコステロンおよび内部標準である19位ノルテストステロンの RT はそれぞれ116分, 36分, 32分, 13分, 29分, 24分であった。本反応における生成物はプロゲステロンよりの 17 α 位水酸化反応による 17 α 水酸化プロゲステロンおよびその後21位に水酸化されるデオキシコルチゾールならびにプロゲステロンより直接21位水酸化されるデオキシコルチコステロンのみであり, 17 α 水酸化プロゲステロンよりの C17C20 側鎖切断反応であるアンドロステンジオンの生成は, 認められなかった。したがって, P-450 17 α の活性には, 17 α 水酸化プロゲステロンおよびデオキシコルチゾールの産生量の総和をもってその活性とした。本反応における回収率は 89.4 ± 3.3 であり TN は, $0.056 \pm 1.3 \times 10^{-3}$ nmol 生成物/mg 蛋白/min であった (図 7 A)。

2. 腺腫群 (n=11)

いずれの 17 α 水酸化反応も生成物は 17 α 水酸化プロゲステロンのみでありアンドロステンジオンの生成は認められなかった。本反応における回収率は平均 $82.4 \pm 4.6\%$ であり, TN はそれぞれ原発性アルドステロン症 (n=5) で $0.061 \pm 4.2 \times 10^{-3}$, クッシング症候群 (n=3) で 0.408 ± 0.03 , 非機能性副腎腺腫 (n=3) で 0.074 ± 0.048 nmol 生成物/mg 蛋白/min であった (図 7 B)。この結果からは, 対照群と比して特にクッシング症候群

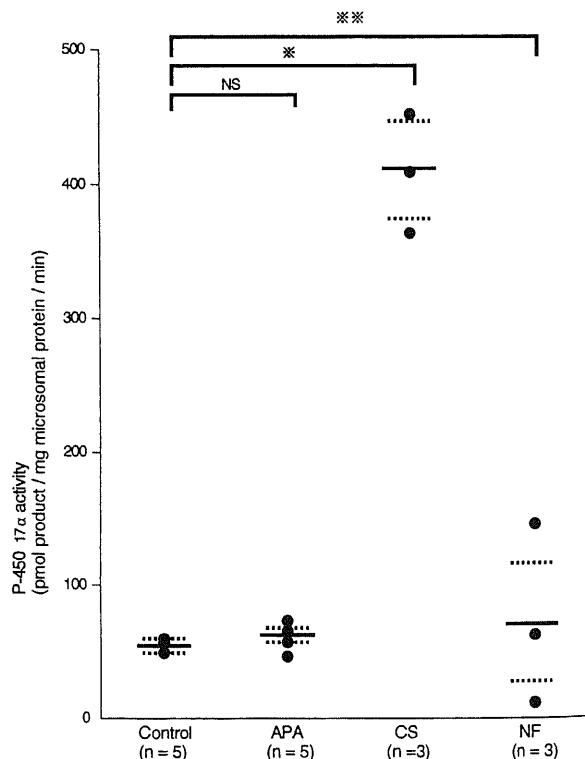


Fig. 8. P-450 17 α activities in the control adrenal tissue (control), aldosterone-producing adenoma (APA), Cushing's syndrome (CS) and non-functioning adrenal tumor (NF). Product consists of 17 α -hydroxyprogesterone and 11-deoxycortisol. Plots show enzyme activity of P-450 17 α and each bar indicates mean \pm S.E.M. *, p < 0.001 vs. control; **, p < 0.1 vs. control; NS, not significant.

において P-450 17 α 活性の著明な上昇を認め ($P < 0.001$) 約 7.29 倍の活性を得た (図 8)。

V. 各種ヒト副腎 P-450 活性測定に及ぼす精製チトクローム P-450 の効果

本反応に用いた各蛋白濃度内では、各 P-450 活性とも添加された精製 P-450 に対して P-450 SCC では、プレグネノロンで 17.0nmol/min/nmol P-450, P-450 11 β では、コルチコステロンで 11.2nmol/min/nmol P-450, P-450 C21 では、デオキシコルチゾールで 13.4nmol/min/nmol P-450, P-450 17 α では 17 α 水酸化プロゲステロンおよびデオキシコルチゾールで 1.8nmol/min/nmol P-450, の活性上昇を認め (図 1A, 3A, 5A, 7A), 本反応系における電子伝達系諸要素が充分量添加されていることが、確認された。

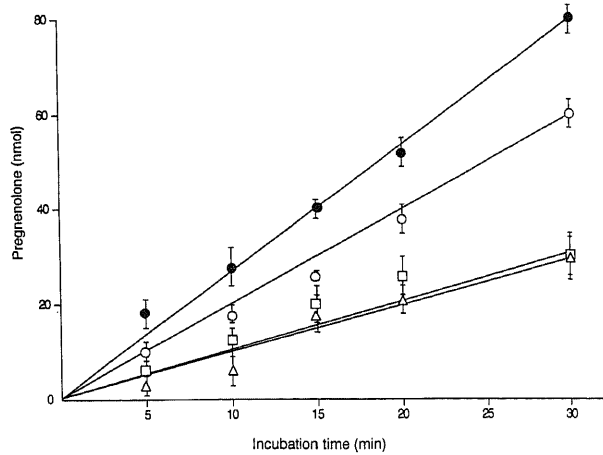


Fig. 9. Effects of incubation periods on P-450 SCC activity in the adrenal homogenates (0.2 mg protein). Cholesterol was converted to pregnenolone. Each point represents mean \pm S.E.M. \circ , Cushing's syndrome; \bullet , aldosterone-producing adenoma; \triangle , non-functioning adrenal tumor; \square , control adrenal tissue.

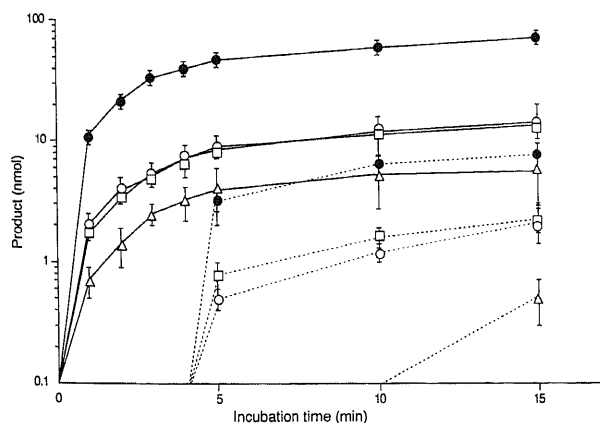


Fig. 10. Effects of incubation periods on P-450 11 β activity in the adrenal homogenates (0.2 mg protein). deoxycorticosterone was converted to corticosterone, and 18-hydroxycorticosterone. Each solid line indicates product of corticosterone and dotted line indicates product of 18-hydroxycorticosterone. Each point represents mean \pm S.E.M. \circ , Cushing's syndrome; \bullet , aldosterone-producing adenoma; \triangle , non-functioning adrenal tumor; \square , control adrenal tissue.

VI. 各種ヒト副腎 P-450 活性測定に及ぼす反応時間の検討
 対照群 ($n=3$), 原発性アルドステロン症群 ($n=3$), クッシング症候群 ($n=3$), 非機能性副腎腺腫群 ($n=3$) において各群とも P-450 SCC 反応では、インキュベーション時間30分間まではほぼ直線的に時間依存性に増加反応を示した (図 9)。P-450 11 β 反応では、各群とも約 5 分間は、ほぼ直線的に時間依存性をもって増加反応を示したが、5 分以後は、その増加反応は、減衰傾向を示し 18 水酸化コルチコステロンの生成を認め、インキュベーション時間とともにその生成量は、増加している傾向があった。反応様式は、各群とも違いは認められず、原発性アルドステロン症群においてもコルチコステロンおよび 18 水酸化コルチコステロンの産生上昇を認めたが、アルドステロンの生成

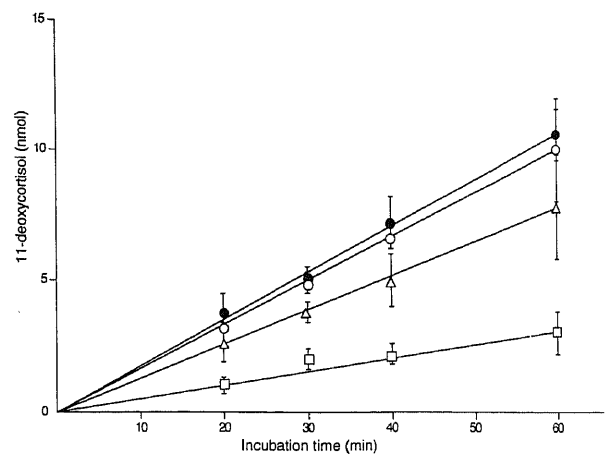


Fig. 11. Effects of incubation periods on P-450 C21 activity in the adrenal homogenates (0.2 mg protein). 17 α -hydroxyprogesterone was converted to 11-deoxycortisol. Each point represents mean \pm S.E.M. \circ , Cushing's syndrome; \bullet , aldosterone-producing adenoma; \triangle , non-functioning adrenal tumor; \square , control adrenal tissue.

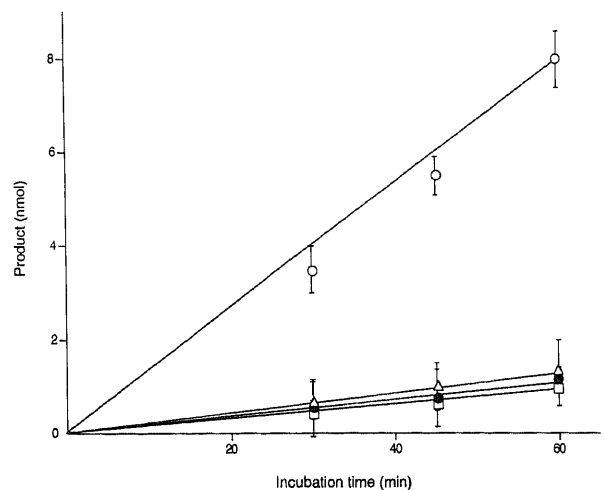


Fig. 12. Effects of incubation periods on P-450 17 α activity in the adrenal microsomes (0.3 mg protein). Progesterone was converted to 17 α -hydroxyprogesterone and 11-deoxycortisol. Product consists of 17 α -hydroxyprogesterone and 11-deoxycortisol. Each point represents mean \pm S.E.M. \circ , Cushing's syndrome; \bullet , aldosterone-producing adenoma; \triangle , non-functioning adrenal tumor; \square , control adrenal tissue.

は、認めなかった(図10)。また、P-450 C21 および P-450 17 α 反応においては、各群とも約60分間は、ほぼ直線的に増加反応を示すものの 17 α 水酸化プロゲステロンに続くアンドロステンジオンの生成は認められなかった(図11, 12)。

考 察

1958年, Klingenberg¹⁹によって肝ミクロゾーム分画に一酸化炭素を結合させると 450nm に吸収極大を示す色素が発見され、1962年, Omura ら¹⁰によって名付けられたこのヘム蛋白質(チトクローム P-450)は、その後、ステロイドホルモン生合成をはじめ、コレステロール代謝、ビタミンD代謝、アラキドン酸代謝などの様々な水酸化反応に関与していることが明らかにされた¹⁷⁻¹⁹。また、その臓器分布も肝、副腎をはじめ卵巣、胎盤、睾丸、腎、小腸粘膜、皮膚、肺など多くの臓器に広く分布しており、その機能的な重要性をうかがわせた。ことに副腎および肝では含量が多く、副腎皮質ミクロゾーム内の P-450 含量は蛋白質相当で約 1nmol/mg であり肝臓ミクロゾームの P-450 含量と比較して同程度量であるものの他の臓器と比較すると著明な含量を有しており、さらに副腎皮質のミトコンドリアではミクロゾームを大きく越える濃度で存在し、肝臓のミトコンドリアでの P-450 をも大きく上回ることも知られるようになった²⁰。このように、副腎皮質における P-450 の役割が明らかにされるにつれ、その反応様式も次第に明らかにされるようになった。つまり、副腎皮質の細胞のミトコンドリアとミクロゾームには2つの異なる型の P-450 電子伝達系が局在しミトコンドリアの電子伝達系は、NADPH を電子供与体としフラビン蛋白質の NADPH-アドレノドキシ還元酵素、鉄イオン蛋白質であるアドレノドキシと種々の P-450 より構成され、一方、ミクロゾームの電子伝達系は NADPH または NADH を電子供与体とし、P-450 還元酵素と P-450 より構成される。これによってステロイドホルモンの生合成の代謝過程で副腎皮質に取り込まれたコレステロールはミトコンドリア内で側鎖切断を受けたのち、両オルガネラ膜の間を往復しながら化学修飾を受け特定の化学構造をもつホルモン分子となって血液中に分泌される。このようにオルガネラ膜に局在しているそれぞれ基質特異性をもつ各種 P-450 はステロイド生合成の代謝経路で重要な役割を果たしその活性の増減は、各種ステロイド産生に大きな影響を及ぼすことが推定された。

さらに今日では各種 P-450 の精製もなされ^{21,23}、各動物種による副腎 P-450 のステロイド代謝活性も測定されるようになった²¹。このため、ヒトにおける種々のステロイド産生異常症についてこの副腎 P-450 の解析が期待された。1977年、小泉²²は、リポイド副腎過形成の症例において剖検にて得られた副腎中の P-450 SCC を解析し、それまでこれらの症例が 20 α -水酸化酵素が欠損しているとの報告²³ に対してその本体が P-450 SCC 欠損にあることを明らかにした。

これまでも副腎において、原発性アルドステロン症、クッシング症候群、非機能性副腎腺腫などの各種副腎腺腫においては培養組織での解析がなされており、なかでも小島²⁴ は、手術にて摘出された副腎組織を組織培養し、そのステロイド生成能を報告した。そのなかで小島らは、これら副腎腺腫においては、腫瘍組織内におけるステロイド合成に関与する酵素系に活性異常があると推論した。今回、著者が得た成績ではこの酵素の活性異常には、原発性アルドステロン症では P-450 11 β が、

クッシング症候群では P-450 17 α が、また、非機能性副腎腺腫では P-450 SCC を除く諸酵素が関与していることが明らかになった。

本実験系においては、電子伝達系に NADPH を用いている。チトクローム P-450 への電子伝達の際、発生するスーパーオキシドアニオン (O_2^-) は実験系にエピネフリンが存在した場合、これをアドレノクロムに変え、アドレノクロムは、NADPH からの電子の供給を脱共役し、この過程で更に O_2^- が生ずる。この結果、P-450 活性は阻害されるが、この阻害は O_2^- のスカベンジャーであるアスコルビン酸を共存させることにより効果的に解消される²⁵。この為、本実験系においては、血液および副腎髄質の影響を完全に除外する為、諸電子伝達系以外に、アスコルビン酸 15mM を加えた。また活性測定に際しては既存の 40 μ M の精製 P-450 SCC, 20 μ M の P-450 11 β , 8 μ M の P-450 C21, 20 μ M の P-450 17 α を加え、本系における電子伝達系諸要素およびアスコルビン酸の効果につき十分な飽和量にて計測し得たかを確認した。その結果、各反応とも P-450 SCC ではプレグネノロンで 17.0nmol/min/nmol P-450, P-450 11 β ではコルチコステロンで 11.2nmol/min/nmol P-450, P-450 C21 ではデオキシコルチゾールで 13.4nmol/min/nmol P-450, P-450 17 α では 17 α 水酸化プロゲステロンおよびデオキシコルチゾールで 1.8nmol/min/nmol P-450, の活性が本反応とほぼ平行的に増加していることが確認され、本例での電子伝達系は充分量存在し、アスコルビン酸の効果についても充分あることが確認された。

しかし、P-450 17 α 反応に関しては、本反応の活性をさらに強調するため、NADH-b₅還元酵素、b₅ を添加したが有意な活性は得られなかった。これは、基質をプレグネノロン、プロゲステロン、17 α -プロゲステロン、11 β 水酸化プロゲステロンと変えて試みたが有意な活性は得られなかった。これは、ヒトにおいては P-450 17 α 自体の活性が、極めて低いのか、ミクロゾーム膜に共存して局在する P-450 C21 と基質特異性が交差するため、相対的な活性の強さが異なることによるかは不明であるが、本系での P-450 17 α 活性の測定は困難であった。このため、さらにこれらミクロゾーム反応での活性を高めるために副腎細胞より超遠心法によってミクロゾーム層を抽出して P-450 17 α 活性を測定した。このことは、厳密な意味では、本来の副腎での代謝活性から逸脱していることにはなるが、副腎における2種類の電子伝達系は全く異なるものであり、その電子伝達系には、互換性がないことより副腎皮質細胞よりミクロゾーム層を抽出して活性測定を行うことは、副腎における代謝活性を反映し得るものと考えた。今回、本操作を加えることによって P-450 17 α 活性が測定可能となりヒトによる各種 P-450 活性測定が可能となった。

原発性アルドステロン症では、これまでも腺腫内ステロイド生成、分泌に関して鉍質コルチコイド系においてアルドステロン以外のステロイドの過剰産生が報告されている^{24,25}。すなわち、原発性アルドステロン症患者の血中および腺腫内ステロイドホルモンの分析では、アルドステロンのみならずコルチコステロン、18水酸化コルチコステロン、プロゲステロンなどのミネラルコルチコイドの分泌増多が確認され²⁶⁻²⁸、本症は単にアルドステロンのみを分泌する副腎皮質疾患ではなく“過ミネラルコルチコイド状態”と呼ぶ状態にあるのではないかと推定された^{29,30}。これら鉍質コルチコイドの産生過剰の一因子とし

て本症における腺腫内ステロイド合成酵素の活性亢進, 特に P-450 11 β 活性の亢進が関与していることは, すでに著者が報告¹¹⁾したが, 本酵素が11位水酸化のみならず18位水酸化を行うことを考えると, きわめて興味ある結果と考えられる. 今回, 新たに, 著者が得た成績では, 原発性アルドステロン症腺腫内 P-450 11 β 活性は TN にて 55.84 ± 3.70 nmol コルチコステロン/mg 蛋白/min であり対照群 8.77 ± 1.11 nmol コルチコステロン/mg 蛋白/min と比較して有意に高い酵素活性を示した ($P < 0.001$). 今回, 電子伝達系に用いた諸要素は, ウン副腎など, ヒト以外の種より得られたものである. このことは, ヒト副腎の P-450 を測定し, その絶対値を比較する際には, この種差が厳密な意味で問題となる可能性がある. しかし, 今回の検討のように, 同一条件下において各症例を定性的に比較することは, 充分可能と思われ, 原発性アルドステロン症の腺腫内酵素活性において特に P-450 11 β 活性が正常副腎に比して平均約 6.37 倍の活性上昇を示しているという今回の実験結果は, ある程度生体内での酵素活性様式を反映していると解される. しかし, 本腺腫におけるステロイド産生がミネラルコルチコイド優位となっていることを説明する上で, Dufau ら⁹⁾が述べていた腺腫組織における 17 α 水酸化反応の活性低下の存在は, 本実験系では認められなかった.

クッシング症候群においては, 著明な P-450 17 α 活性の増加を認め, その活性は, TN で 0.408 ± 0.03 nmol 生成物/mg 蛋白/min であり, 対照群 $0.056 \pm 1.3 \times 10^{-3}$ nmol 生成物/mg 蛋白/min に比して約 7.29 倍と高値であった ($p < 0.001$). しかし, プロゲステロンが P-450 17 α によって 17 α 位に水酸化を受け 17 α 水酸化プロゲステロンに変換された後, さらに P-450 C21 によって21位水酸化を受けデオキシコルチゾールとなるのか, 17 α 位水酸化とそれに続く C17C20 側鎖切断反応を受けアンドロステンジオンとなるのかは, 両酵素の相対的な活性の強さが関係し, ホルモンの産生量に影響を与えるものと考えられる. Sinzawa ら³¹⁾は, モルモット副腎より単離したミクロゾームを用い P-450 C21 と P-450 17 α 濃度の影響について検討し, ステロイドホルモン産生の代謝経路はそれぞれの P-450 分子種の存在量のみで支配されるものではなく, P-450 酵素活性の調節機構が重要な役割を果たしていると推定している. なかでも, P-450 C21 および P-450 17 α を含むプロテオリソームを用いてそれぞれの NADPH-P-450 還元酵素の影響をみた場合, 還元酵素濃度に対して依存性を示すが, 還元酵素濃度が高い場合には, 17 α 位水酸化より21位水酸化活性が還元酵素に強い依存性を示すことを報告している. また, プロゲステロン代謝における P-450 C21 の影響をみた場合, P-450 C21 量を増加させると 17 α 水酸化プロゲステロンの生成量は減少するがデオキシコルチゾールの生成は減少せず, アンドロステンジオンの生成量にもほとんど影響を与えないことを報告している³²⁾. これらの事実は, プロゲステロンのミクロゾームにおける代謝では反応中間体の 17 α 水酸化プロゲステロンは P-450 から解離することなく連続的に代謝され, その後に進行する C17-20 側鎖切断 (リアーゼ) 反応または, 21位水酸化反応に代謝されることを示している. したがって, 本実験系においてプロゲステロンよりの P-450 17 α 活性の測定において生成物に 17 α 水酸化プロゲステロンおよび, それに引き続く21位水酸化反応によるデオキシコルチゾールの総和をもって P-450 17 α の活性としたのは, ある程度副腎内での P-450 17 α 活性を反映していると考えられ

る. しかし, 本反応系において 17 α 水酸化プロゲステロンに引き続くアンドロステンジオンの生成がいずれの群においても認められなかったことは, 先述の様に添加する電子伝達系諸要素の濃度など諸因子の影響が考えられ, 直接生体内での代謝活性を真に反映するのではないものと思われる.

非機能性副腎皮質腺腫では, P-450 SCC 5.93 ± 1.99 nmol プレグネノロン/mg 蛋白/min で, P-450 11 β 4.27 ± 1.41 nmol コルチコステロン/mg 蛋白/min, P-450 C21 0.32 ± 0.10 nmol デオキシコルチゾール/mg 蛋白/min, P-450 17 α 0.074 ± 0.048 nmol 生成物/mg 蛋白/min, と正常群と比較して統計的に差を見いだすことはできず, むしろ個々の症例の個体差が大きいのが目立った. これまで非機能性副腎腺腫が臨床症状を示さない原因として, 1) 生物活性を示さないステロイドを大量に産生する, 2) 生物活性の弱いステロイドを過剰に分泌するが, 臨床症状が極めて軽微である, 3) 活性ステロイドを産生するが, 臨床症状を呈するには不十分量である, 4) ステロイド産生能を欠く, などが推定されている³³⁾. しかし, 今回著者が得た成績では, ステロイド代謝において活性に差異はあるものの全例で各種 P-450 活性を得たことより, これら非機能性副腎腺腫にはある程度, 何等かのステロイド合成能は有しているものと考えられた. 近年, 非機能性副腎腺腫と思われていた症例でコルチゾールの自律性分泌が認められたという報告例^{34,35)}や腫瘍摘出後, 副腎機能不全を生じたという報告³⁶⁾など明らかな臨床症状を欠く前クッシング症候群が相次いで報告され, 非機能性副腎腺腫の中にも当該例が含まれるものと想定される. また, 笹野³⁷⁾は, 臨床病理学的な検索より非機能性副腎腺腫には, 1) コレステロールの取り込みを含めてステロイド合成がまったく行われていない好酸性の豊かな細胞質をもつ好酸性細胞腫と, 2) 多くの場合プロゲステロンとかコルチコステロンといった生物学的活性の低い前駆体を含むステロイドホルモンを合成し組織学的に副腎皮質細胞の形態をよく再現している腺腫とに大別できると報告している. 特に後者においてステロイド合成酵素の発現が認められることから, これらの腫瘍が種々のステロイド産生能を有していることを推定している. このことは, 著者らの成績と合致するものの, 一方でステロイド合成酵素の阻害因子が存在する可能性も否定し得ないと思われる. Ohnishi ら³⁸⁾はカルモデュリンが P-450 11 β のコルチコステロンからアルドステロンへの転換を阻害することを報告しているが, 非機能性副腎腺腫では, 酵素活性のみではなく, この様な阻害因子に関する影響も考慮する必要があると思われる.

また, 非機能性副腎腺腫に限らず前述の機能性腺腫においても血中ステロイド値に関して, その血中濃度は腫瘍重量, 産生されたステロイドの細胞外への放出速度や代謝速度等, 種々の因子が関与するため, 腺腫内の酵素活性が直接血中濃度として反映されないことは, 充分留意する必要があると思われる.

近年, 遺伝子および遺伝子産物の構造と機能の関係を解明するため, 遺伝子のクローニング技術が発達してきた. 特に P-450 遺伝子や P-450 還元酵素遺伝子のクローニングについても多くの研究がなされ, ヒトや動物の P-450 SCC, P-450 C21, P-450 17 α , や P-450 還元酵素について一次構造が解明され^{39~42)}, 21位水酸化酵素欠損症などの遺伝子解析などの副腎疾患の解明に応用されている. P-450 11 β に関してはその構造が明らかにされ^{43~45)} 原発性アルドステロン症腺腫からのアルドステロン合成酵素, P-450ald の精製^{46~48)} や突然変異による選択的

P-450aldo 欠損などの報告がなされている。P-450 11 β は多機能酵素であり^{45,46)}、今後、遺伝子構築上酸化、水酸化反応などの機能や部位が解明されていくものと思われる。

本研究によって、機能性副腎腺腫症において原発性アルドステロン症においては、P-450 11 β 活性の、クッシング症候群においては、P-450 17 α 活性の増加が中心的役割を果たすことが示された。また、非機能性副腎腺腫症においては、ステロイド合成能の存在する可能性が示唆された。副腎疾患においては、機能亢進症に対して各種ホルモン合成阻害剤が使用されることがある。この際、非選択的にホルモン合成阻害を来す薬物の使用による広汎な副腎機能低下が問題となる。現在、臨床的に用いられている薬剤として、原発性アルドステロン症に対してスピロラクトンやアミノグルチタミドが、また、クッシング症候群では、op¹-DDD、メチラポンあるいは、トリロスタンなどの酵素阻害剤が使用される。スピロラクトンやアミノグルチタミドは P-450 に影響を及ぼし酵素阻害、特に P-450 11 β をかなり選択的に阻害するとの報告もあり⁵⁰⁻⁵²⁾、これは、著者の成績からも合致する有効な薬物治療と考えられる。一方、op¹-DDD、メチラポンや、トリロスタンなどの酵素阻害剤は、必ずしも P-450 17 α を介して酵素活性を阻害するのではない⁵³⁾。現在までに選択的に P-450 17 α を阻害するという薬剤は報告されていないが、手術不能例に対するクッシング症候群においても、より選択的な酵素阻害剤の投与が望ましいと考えられる。

結 論

原発性アルドステロン症、クッシング症候群および非機能性副腎腺腫における摘出副腎組織を用いて腺腫内 P-450 SCC 活性、P-450 11 β 活性、P-450 C21 活性およびミクロゾーム P-450 17 α 活性を測定、比較検討し次の結論を得た。

1. 原発性アルドステロン症の副腎腺腫内 P-450 活性は、P-450 SCC、P-450 11 β 、P-450 C21、P-450 17 α で、それぞれ、 12.33 ± 4.01 、 55.84 ± 3.70 、 0.86 ± 0.11 、 $0.061 \pm 4.2 \times 10^{-3}$ nmol 生成物/mg 蛋白/min であり、対照群 6.50 ± 0.94 、 8.77 ± 1.11 、 0.67 ± 0.12 、 $0.056 \pm 1.3 \times 10^{-3}$ nmol 生成物/mg 蛋白/min と比して、P-450 SCC 活性の上昇および P-450 11 β 活性の著明な上昇を認めた。原発性アルドステロン症の腺腫内ステロイド合成の酵素活性には、正常副腎組織と比較すると異常があると思われ、特に P-450 11 β 活性の上昇が関与していることが示された。

2. クッシング症候群の副腎腺腫内 P-450 活性は、P-450 SCC、P-450 11 β 、P-450 C21、P-450 17 α で、それぞれ、 8.80 ± 0.40 、 11.80 ± 5.29 、 1.00 ± 0.12 、 0.408 ± 0.03 nmol 生成物/mg 蛋白/min であり、対照群と比して、P-450 17 α 活性の著明な上昇を認めた。クッシング症候群の腺腫内ステロイド合成の酵素活性にも、正常副腎組織と比較すると異常があると思われ、特に P-450 17 α 活性の上昇が関与していることが示された。

3. 非機能性副腎腺腫の副腎腺腫内 P-450 活性は、P-450 SCC、P-450 11 β 、P-450 C21、P-450 17 α で、それぞれ、 5.93 ± 1.99 、 4.27 ± 1.41 、 0.32 ± 0.10 、 0.074 ± 0.048 nmol 生成物/mg 蛋白/min であり、対照群と比して、統計的に有意な活性の上昇および減少は認められなかったが、非機能性副腎腺腫においても酵素活性上、ステロイド合成能を有していることが示唆

された。

4. 原発性アルドステロン症、クッシング症候群、非機能性副腎腺腫などの各種副腎腫瘍における腺腫内ステロイド合成酵素活性を検討し、機能性副腎皮質腫瘍におけるステロイド合成異常には、ステロイド合成酵素チトクローム P-450 の発現異常が関与している可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲賜りました恩師竹田亮祐名誉教授に深謝致します。また、終始御指導、御助言頂きました金沢大学医学部内科学第二講座宮森勇講師および高血圧グループの諸先生方、ならびに貴重な資料を提供いただいた金沢大学医学部泌尿器科学教室の諸先生方に感謝致します。本研究を当初より御指導、御教示頂きました金沢大学理学部化学科片桐正之名誉教授、須原克子博士、ならびに教室員の皆様にここから感謝致します。

なお、本論文の要旨は、昭和63年度「副腎ホルモン産生異常症」調査研究班班会議(1989年、東京)、日本内分泌学会第62回総会(1989年、東京)、第71回米国内分泌学会(1989年、シアトル)で報告した。

文 献

- 1) Miller, W. L.: Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr. Res.*, **9**, 295-318 (1988).
- 2) Mitani, F., Simizu, T., Ueno, R., Ishimura, Y., Izumi, S., Komatsu, N. & Watanabe, K.: Cytochrome P-450 11 β and P-450scc in adrenal cortex. *J. Histochem. Cytochem.*, **30**, 1066-1074 (1982).
- 3) Kominami, S., Ochi, H., Kobayashi, Y. & Takemori, Y.: Studies on the steroid hydroxylation system in adrenal cortex microsomes. Purification and characterization of cytochrome P-450 specific for steroid C-21 hydroxylation. *J. Biol. Chem.*, **255**, 3386-3394 (1980).
- 4) Meuli, C. & Muller, J.: Potassium intake and aldosterone biosynthesis. The role of cytochrome P-450. *Am. J. Physiol.*, **245**, 440-456 (1983).
- 5) Kramer, R. E., Gallant, S. & Brownie, A. C.: The role of cytochrome P-450 in the action of sodium depletion on aldosterone biosynthesis in rats. *J. Biol. Chem.*, **254**, 3953-3958 (1979).
- 6) Lauber, M., Sugano, S., Ohnishi, T., Okamoto, M. & Muller, J.: Aldosterone biosynthesis and cytochrome P-450 11 β : evidence for two different forms of the enzyme in rats. *J. Steroid. Biochem.*, **26**, 693-698 (1987).
- 7) Ohnishi, T., Wada, A., Lauber, M., Yamano, T. & Okamoto, M.: Aldosterone biosynthesis in mitochondria of isolated zones of adrenal cortex. *J. Steroid. Biochem.*, **31**, 73-81 (1988).
- 8) Lauber, M. & Muller, J.: Purification and characterization of two distinct forms of rat adrenal cytochrome P450 11 β . *Arch. Biochem. Biophys.*, **274**, 109-119 (1989).
- 9) Dufau, M. L., Villet, D. B. & Kliman, B.: Pregnenolone metabolism in an aldosterone secreting tumor of the adrenal and its adjacent adrenal tissue. *Clin. Endocrinol.*, **28**, 983-991 (1968).
- 10) Vecsei, P., Purjesz, I. & Wolff, H. P.: Studies on the biosynthesis of aldosterone in solitary adenoma and in nodular hyperplasia of the adrenal cortex in patients

- exhibiting Conn's syndrome. *Acta Endocrinol.*, **62**, 391-398 (1969).
- 11) Takasaki, H., Miyamori, I., Nagai, K., Takeda, R., Mochizuki, H. & Katagiri, M.: Mitochondrial P-450 activities in aldosteronoma tissues. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.*, **38**, 533-535 (1991).
- 12) Suhara, K., Takemori, S. & Katagiri, M.: Improved purification of bovine adrenal iron-sulfur protein. *Biochem. Biophys. Acta.*, **263**, 272-278 (1972).
- 13) Suhara, K., Gomi, T., Sato, H., Itagaki, E., Takemori, S. & Katagiri, M.: Purification and immunological characterization of the two adrenal cortex mitochondrial cytochrome P-450 proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, **190**, 290-299 (1978).
- 14) Suhara, K., Fujimura, Y., Schiroo, M. & Katagiri, M.: Multiple catalytic properties of the purified and reconstituted cytochrome P-450 system of pig testis microsomes. *J. Biol. Chem.*, **259**, 8729-8739 (1984).
- 15) Klingenberg, M.: Pigment of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **75**, 376-386 (1958).
- 16) Omura, T. & Sato, R.: A new cytochrome in liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, **237**, 1375-1382 (1962).
- 17) 三谷美美子: ステロイド代謝とチトクローム P-450. 代謝, **13**, 1961-1973 (1976).
- 18) Chazarian, J. G., Martinez, J. E., Gallardo, A. C., Kulkoski, J. A. & Peterson, B. L.: Induction of renal cytochrome P-450 by the polychlorinated biphenyl Aroclor-1254. *J. Biol. Chem.*, **255**, 8275-8281 (1980).
- 19) Kupfer, D. & Navarro, J.: Metabolism of prostaglandin A1 by hepatic microsomal monooxygenase P-450 system in the guinea pig and rat. *Life. Sci.*, **18**, 507-513 (1976).
- 20) Ichikawa, Y. & Yamamoto, T.: Electron spin resonance of microsomal cytochromes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **121**, 742-749 (1967).
- 21) Suhara, K., Fujii, T., Tani, T. & Katagiri, M.: A sensitive method for quantitation of steroid hydroxylase activities of individual P-450 in tissue homogenates. *J. Steroid. Biochem.*, **26**, 113-116 (1987).
- 22) 小泉晶一: チトクローム P450 欠損症. 代謝, **19**, 1785-1797 (1982).
- 23) Degenhart, H. J., Visser, H. K. A., Boon, H. & O'Doherty, N. J.: Evidence for deficient 20α -cholesterol-hydroxylase activity in adrenal tissue of a patient with lipid adrenal hyperplasia. *Acta Endocrinol.*, **71**, 512-518 (1972).
- 24) 小島元子: 原発性アルドステロン症にみられるステロイド分泌異常について. 日内分泌会誌, **54**, 246-254 (1978).
- 25) Bogdan, A., Auzeby, A., Plouin, P. F. & Touitou, Y.: In vitro glucocorticosteroid and mineralocorticosteroid biosynthesis in Conn's adenoma tissues. *J. Endocrinol. Invest.*, **16**, 65-68 (1993).
- 26) Crane, M. G. & Harris, J. J.: Deoxycorticosterone secretion rate in hyperadrenocorticism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **26**, 1135-1143 (1966).
- 27) Biglieri, E. G., Hane, S., Salton, P. E. & Forsham, P. H.: In vivo and in vitro studies on adrenal secretions in Cushing's syndrome and primary aldosteronism. *J. Clin. Invest.*, **42**, 516-524 (1962).
- 28) Ojima, M., Aida, M. & Kanbegawa, A.: Simultaneous determination of plasma 18-hydroxycorticosterone, 18-hydroxy-11-deoxycorticosterone and aldosterone in man. *Tohoku J. exp. Med.*, **124**, 367-369 (1978).
- 29) Biglieri, E. G., Salton, P. E., Schambelan, M. & Kronfield, S. J.: Hypermineralocorticoidism. *Amer. J. Med.*, **45**, 170-175 (1968).
- 30) Melby, J. C., Dale, S. L., Grekin, R. J., Gaunt, R. & Wilson, T. E.: 18-hydroxy-11-deoxycorticosterone secretion in experimental and human hypertension. *Recent Progr. Horm. Res.*, **28**, 287-339 (1972).
- 31) Sinzawa, K., Ishibashi, S., Murakoshi, M., Watanabe, K., Kominami, S., Kawahara, A. & Takemori, S.: Relationship between zonal distribution of microsomal cytochrome P-450s (P-450 17α , lyase and P-450 C21) and steroidogenic activities in guinea pig adrenal cortex. *J. Endocrinol.*, **119**, 191-200 (1988).
- 32) Sinzawa, K., Kominami, S. & Takemori, S.: Studies on cytochrome P-450 (P-450 17α , lyase) from guinea pig adrenal microsomes: dual function of a single enzyme and effect of cytochrome b5. *Biochem. Biophys. Acta.*, **833**, 151-160 (1985).
- 33) 小島元子, 齊藤万一郎, 伊藤信雄, 草野良郎, 福地総逸: 非機能性副腎腫瘍のステロイド生成能. 日内会誌, **73**, 1649-1655 (1984).
- 34) Beyer, H. S. & Doe, R. P.: Cortisol secretion by an incidentally discovered nonfunctional adrenal adenoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **62**, 1317-1321 (1986).
- 35) Bogner, U., Eggens, J. & Oelkers, W.: Incidentally discovered ACTH-dependent adrenal adenoma presenting as 'Pre-Cushing's syndrome'. *Acta Endocrinol.*, **111**, 89-92 (1986).
- 36) Huiras, C. M., Pehling, G. B. & Caplan, R. H.: Adrenal insufficiency after operative removal of apparently nonfunctioning adrenal adenomas. *JAMA.*, **261**, 894-898 (1989).
- 37) 笹野公伸: 非機能性副腎皮質腫瘍においてステロイド合成酵素の発現. 医のあゆみ, **153**, 18-22 (1990).
- 38) Ohnishi, T., Wada, A., Nonaka, Y., Sugiyama, T., Yamano, T. & Okamoto, M.: Effect of Calmodulin on aldosterone synthesis by a cytochrome P-450 11β reconstituted system from bovine adrenocortical mitochondria. *J. Biochem.*, **100**, 1065-1076 (1986).
- 39) White, P. C., New, M. I. & Dupont, B.: HLA-linked congenital adrenal hyperplasia results from a defective gene encoding a cytochrome P-450 specific for steroid 21-hydroxylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **81**, 7505-7509 (1984).
- 40) Werkmeister, J. W., New, M. I., Dupont, B. & White, P. C.: Frequent deletion and duplication of the steroid 21-hydroxylase genes. *Am. J. Hum. Genet.*, **39**,

461-469 (1986).

41) Higashi, Y., Tanae, A., Inoue, H., Fujii, Y. & Kuriyama, Y.: Evidence for frequent gene conversion in the steroid 21-hydroxylase P-450 (C21) gene. *Am. J. Hum. Genet.*, **42**, 17-25 (1988).

42) Reindollar, R. H., Lewis, J. B., White, P. C., Fernhoff, P. M., McDonough, P. G. & Whitney, J. B.: Prenatal diagnosis of 21hydroxylase deficiency by the complementary deoxyribonucleic acid probe for cytochrome P-450 c-210H. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **158**, 545-547 (1988).

43) Mornet, E., Dupont, J., Vitek, A. & White, P. C.: Characterization of two genes encoding human steroid 11 β -hydroxylase (P-450 11 β). *J. Biol. Chem.*, **264**, 20961-20967 (1989).

44) Kawamoto, T., Mitsuchi, Y., Toda, K., Miyahara, K., Yokoyama, Y., Nakano, K., Hosoda, K., Yamamoto, Y., Imura, H. & Shizuta, Y.: Cloning of cDNA and genomic DNA for human cytochrome P-450 11 β . *FEBS Lett.*, **269**, 345-349 (1990).

45) Oertle, M. & Muller, J.: Two types of cytochrome P-450 11 β in rat adrenals: separate regulation of gene expression. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **91**, 201-209 (1993).

46) Kawamoto, T., Toda, K., Miyahara, K., Kuribayashi, I., Nakao, K., Hosoda, K., Yamamoto, Y., Imura, H. & Shizuta, Y.: Cloning and expression of a cDNA for human cytochrome P-450ald as related to primary aldosteronism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**, 309-316 (1990).

47) Ogishima, T., Shibata, H., Shimada, H., Mitani, F., Suzuki, H., Saruta, T. & Ishimura, Y.: Aldosterone synthase cytochrome P-450 expressed in the adrenals of patients with primary aldosteronism. *J. Biol. Chem.*, **266**, 10731-10734 (1991).

48) Ogishima, T., Suzuki, H., Hata, J., Mitani, F. & Ishimura, Y.: Zone-specific expression of aldosterone synthase cytochrome P-450 and cytochrome P-450 11 β in rat adrenal cortex: histochemical basis for the functional zonation. *Endocrinology.*, **130**, 2971-2977 (1992).

49) Holland, O. B. & Carr, B.: Modulation of aldosterone synthase messenger ribonucleic acid levels by dietary sodium and potassium and by adrenocorticotropin. *Endocrinology.*, **132**, 2666-2673 (1993).

50) Menard, R. H., Guenther, T. M., Kon, H. & Gillette, J. R.: Studies on the destruction of adrenal and testicular cytochrome P-450 by spironolactone. *J. Biol. Chem.*, **254**, 1726-1733 (1979).

51) Menard, R. H.: Spironolactone and cytochrome P-450: Impairment of steroid 21-hydroxylation in the adrenal cortex. *Arch. Biochem. Biophys.*, **173**, 395-402 (1976).

52) 永井国男, 宮森 勇, 竹田亮祐, 板垣英治, 片桐正之: 精製チトクローム P-450 11 β 触媒反応に及ぼす副腎ステロイド生成阻害剤の作用. *日内分泌会誌*, **61**, 90-96 (1985).

53) 永井国男: 精製副腎皮質チトクローム P-450 触媒反応に及ぼす副腎ステロイド生成阻害剤の作用. *十全医会誌*, **95**, 915-929 (1986).

Adrenal P-450 Activities in the Adrenal Tumors Hideaki Takasaki, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, **103**, 731—742 (1994)

Key words steroid synthesis, cytochrome P-450, adrenal tumor

Abstract

In the adrenal cortex, steroid hormone biosynthesis is regulated by the catalytic action of monooxygenase system such as cytochrome P-450s. In order to clarify the role of the adrenal cytochrome P-450 in steroidogenesis in the functional and non-functional tumors of the adrenal cortex, quantitative determination of P-450 activities was performed, using a reconstructed cytochrome P-450 system. All adrenal tumors were obtained from patients during adrenal surgery. Elements for electron were isolated and purified from bull adrenal cortex mitochondria and microsomes of pig testis. The reconstituted system containing the matrix steroid, adrenodoxin, NADPH, adrenodoxin reductase, and ascorbic acid was prepared with soluble adrenal homogenate of various protein concentrations. The amount of steroid generated in the reconstituted system was measured and various P-450 activities were evaluated. In aldosterone-producing adenoma, activities of P-450SCC and P-450 11 β were 12.33 ± 4.01 nmol product/mg protein/min and 55.84 ± 3.70 nmol product/mg protein/min, respectively. These values were significantly higher than those in the control groups, 6.50 ± 0.94 and 8.77 ± 1.11 nmol product/mg protein/min, respectively. Microsomal P-450 17 α activity in the adrenal adenoma of Cushing's syndrome was $0.056 \pm 1.3 \times 10^{-3}$ nmol product/mg microsomal protein/min which was significantly increased compared to the control value of $0.056 \pm 1.3 \times 10^{-3}$ nmol product/mg microsomal protein/min. In the clinically non-functioning adrenal adenomas, both mitochondrial and microsomal P-450 activities were also detected, but these values were not significantly different from the controls. These results demonstrate that the adrenal cytochrome P-450 enzyme activities are increased in the functioning adrenal tumors which account for the altered steroidogenesis in these disorders. Though to a lesser extent, P-450 activities were also present in the so called "non-functioning adrenal tumors", indicating that these tumors may also synthesize adrenal steroids. However, it remains to be investigated whether these non-functioning adrenal tumors eventually evolve into clinically symptomatic adrenal cortical tumors.