

東海大学大学院令和元年度博士論文

ACTH 非依存性クッシング症候群術後の副腎
機能早期改善に関する研究

指導 深川 雅史教授

東海大学大学院医学研究科

先端医学専攻

安田 敦

- ・この学位申請論文は、International Journal of Endocrinology に掲載された主要公刊論文を基に作成された。

- ・International Journal of Endocrinology に掲載された主要公刊論文の一部を学位申請論文に用いることに加えて、学位申請論文を機関リポジトリ [電子書庫システム] で公開することの承諾を得ている。

Summary

ACTH(adrenocorticotrophic hormone)非依存性クッシング症候群(CS)は、主にコルチゾール産生副腎腺腫によって引き起こされる。この高コルチゾール血症によって視床下部 CRH(corticotropin releasing hormone)-下垂体 ACTH 系 (HPA axis) が抑制される結果、非腫瘍部の正常副腎組織は ACTH による刺激を受けないため萎縮し機能は低下する。それ故、本疾患に対し腫瘍摘出術を施行すると、高コルチゾール血症は解除されるが術後に副腎機能低下症となる。

しかしながら、予めグルココルチコイド受容体 (GR) 拮抗薬を投与することにより高コルチゾール血症による HPA axis の抑制 (negative feedback) を解除しておくこと、ACTH による正常副腎への刺激を速やかに回復させることが可能と考えられる。その結果、残存副腎機能の早期の改善が可能となることが期待される。このため我々は

デキサメタゾン (DEX) 誘発 CS ラットモデルにおいて、GR 拮抗薬であるミフェプリストン (MIF) 投与群と非投与群での副腎機能を比較した。

MIF 投与ラット群では血漿 ACTH レベルが上昇し、副腎重量の増加を認めた。さらに、病理学的所見および副腎におけるコルチコステロン合成酵素である CYP11B1 の mRNA 発現レベルを比較して、MIF 投与ラット群において副腎の萎縮性変化がより少ないことを確認した。これらの結果は、MIF 投与が HPA axis の抑制および残存副腎組織の萎縮を予防することを示唆した。したがって、我々の研究は術前の GR 拮抗薬投与が残存副腎機能を改善し、ACTH 非依存性 CS の術後副腎機能不全を予防する可能性があることを示した。

Introduction

ACTH 非依存性クッシング症候群 (CS) は、主にコルチゾール産生副腎腺腫によって引き起こされる。CS の高コルチゾール血症では、心血管疾患、耐糖能障害および脂質代謝障害、感染症、骨代謝障害などを生じ、生命予後の著しい低下が生じる。この疾患の治療としては有効な薬物療法がないため副腎腫瘍切除術が第一選択となる。しかしながら、コルチゾール産生副腎腺腫の外科的切除後にはほとんどの症例で副腎機能不全を発症する。また、残存している副腎組織の機能回復に数ヶ月または数年以上かかることも多い。恒久的な副腎皮質機能低下症となることもあり、その場合には生涯にわたるステロイド補充が必要となるため患者の Quality of Life を著しく低下させる結果となる。

ACTH 非依存性 CS の原因は片側の副腎腺腫によるものが大部分であるが、稀に両側腺腫が原因となることもある。しかしながら最近の画像診断技術の進歩と普及によって両側性副腎腫瘍が発見される可能性はより高くなった。このため、両側性コルチゾール産生副腎腺腫による ACTH 非依存性 CS に遭遇する機会は近い将来さらに増加すると予測される。そのような中で我々は、副腎静脈サンプリング (AVS) が両側副腎腺腫を伴う ACTH 非依存性 CS の確定診断を得るために有用であることを報告した。その報告では AVS によるホルモン産生の局在診断が治療

の選択に重要であることを示した。

この知見を基に、両側性コルチゾール産生副腎腺腫による CS に対して、副腎機能の温存を期待して一側全摘出術と対側部分切除術を施行したが術後に副腎機能の回復を認めることがなかった症例を経験した。この副腎機能が回復しなかった原因を我々は以下のように考察した。片側副腎腺腫症例においては病側の切除のみで健側の副腎は萎縮をしているが手術による障害を受けない。一方で、両側副腎腺腫による CS では両側副腎への手術と機能の温存のため部分切除による副腎温存手術が必要となる。それ故、その手術で残す副腎組織の萎縮と手術による影響から片側副腎腺腫症例に比較して副腎温存手術後の副腎機能回復はさらに困難であると推測した。

副腎機能不全の主な病態生理学的な機序は、高コルチゾール血症における HPA axis の慢性的な抑制のために、残存副腎皮質組織が萎縮することであると報告されている。慢性的な高コルチゾール血症は視床下部 CRH 産生細胞の活性を抑制し、これにより ACTH 分泌の減少が引き起こされる。ACTH による副腎皮質への刺激の減少は残存副腎皮質の萎縮をもたらす。さらに HPA axis が正常に戻るには数ヶ月から数年を要する。

そこで、我々は次のような仮説を立てた。ACTH 非依存性 CS の術前に GR 拮抗薬を投与すると GR 拮抗作用により術後の HPA axis は迅速に活性化され、ACTH が適切なレベルに上昇し、残存の副腎組織を成長させるように刺激

される。従って、残存の副腎組織の機能は手術後に保存されやすくなり、特に副腎機能温存のため萎縮した副腎組織を部分切除術で残す両側性コルチゾール産生副腎腺腫による CS に対して重要な薬剤になると思われる。さらに、GR 拮抗薬の術前投与は、糖尿病および高血圧の管理を改善し、CS 患者における Quality of Life を改善し得る。GR 拮抗薬としてミフェプリストン (MIF: 11β -[P-(ジメチルアミノ)フェニル]- 17β -ヒドロキシ- 17 -(1-プロピニル)エストラ-4,9-ジエン-3-オン) は GR に対する結合親和性がコルチゾールやデキサメタゾン (DEX) よりも強い薬剤である。しかしながら MIF について本研究のような CS ラットモデルを用いた先行研究は我々の調査の限りでは確認されておらず、本邦において MIF は未認可であるが、薬剤の効果が動物実験で明らかになれば今後の臨床応用につながる研究と考えられた。このため我々は DEX 誘発 CS ラットモデルにおいて、MIF 投与群と非投与群での副腎機能を比較して MIF 投与の効果を検討し、研究成果を報告した。本論文では、DEX 誘発 CS ラットモデルを用いて行なった研究をまとめて、今後の臨床応用も含んだ ACTH 非依存性 CS 術前の GR 拮抗薬投与の有用性について検証した。

Discussion

本研究では、ACTH 非依存性 CS の術前に GR 拮抗薬 (MIF) を使用すると、HPA axis と残存副腎機能を速やかに回復できると仮定した。この仮説に基づいて、我々は DEX 誘発 CS ラットモデルにおいて、MIF 投与群と非投与群での副腎機能を比較し、残存副腎機能が MIF の投与によって維持されることを検証した。まず、我々のラット系が ACTH 非依存性 CS モデルとして適切であることを確認した。DEX 群では、ACTH レベルの抑制、SBP の上昇、血糖値の上昇が観察された。これらの所見は、ACTH 非依存性 CS における高グルコルチコイド血症の状態と同等の所見を示した。一方、MIF 投与ラットは血漿 ACTH レベルの上昇を示して、血圧の上昇を防ぎ、高血糖を改善しており、CS 患者へ MIF 投与を行った既報の報告と同様の所見であった。以上の結果は、我々の ACTH 非依存性 CS ラットモデルが、MIF の投与による残存副腎機能の改善を検証するのに適切であることを示唆した。

次に本研究においてどのように副腎萎縮を評価するかという点について検討した。副腎萎縮の主な病態生理学的機序は、高グルコルチコイド血症の状態における HPA axis の慢性的な抑制として報告されている。ACTH 分泌の抑制は、副腎皮質細胞の萎縮を引き起こし、ステロイド合成酵素の活性化が起こらず、このためステロイド分泌は減少して、アポトーシス細胞も観察されると報

告されている。これらの文献に基づいて、副腎重量、副腎皮質髄質面積比およびコルチコステロン合成酵素 *CYP11B1* の mRNA 発現を評価した。本研究では、副腎重量と皮質髄質面積比は MIF 投与ラットで有意に増加を認めた。さらに、副腎における *CYP11B1* の mRNA 発現レベルは MIF 投与後に有意な増加が見られた。したがって我々の研究では、MIF の投与が副腎萎縮を抑制し、副腎の機能低下を予防することを示された。また ACTH 非依存性 CS 患者において手術後の副腎機能不全を予防するため MIF を使用した臨床例の報告がある。しかし、我々の知る限りでは ACTH 非依存性 CS ラットモデルにおける MIF 投与群と非投与群での副腎萎縮を評価する詳細な研究は行われていない。したがって、我々の報告は、ACTH 非依存性 CS において副腎萎縮を軽減し、術後の副腎機能を改善するための新しい治療法に関する重要な報告となる可能性がある。

続いて、我々の動物実験の臨床的な有用性について検討を行なった。高血圧症の全患者の 5～10% に二次性高血圧の原因として内分泌性高血圧があり、これらの因子には原発性アルドステロン症、褐色細胞腫および CS が含まれている。ACTH 非依存性 CS のほとんどの症例は、片側性副腎皮質腺腫が原因であり、最近まで両側性コルチゾール分泌副腎腺腫が ACTH 非依存性 CS の原因としては稀であると考えられてきた。しかし、医療技術の進歩に伴い、両側副腎腺腫による CS の診断が増加する可能性が

ある。両側腺腫症例に対して両側副腎温存手術が必ずしも正常な副腎皮質機能を温存するわけではなく、十分な副腎機能にどれだけの残存副腎組織が必要かについてもほとんどわかっていない。これに関して、MIF の術前投与といった治療方法では、両側性コルチゾール分泌腺腫による CS の副腎部分摘出術後の副腎機能を維持できる可能性を持っている。

薬剤の選択は、以下のように手術後の副腎機能の維持の点を考慮した。現在、CS にはいくつかの薬物療法があり、ミトタンやメチラポンなどの副腎ステロイド合成阻害薬が使用されている。ミトタンは副腎ミトコンドリアに作用して副腎皮質組織を障害し、副腎皮質に不可逆的な損傷を引き起こす。また、メチラポンは 11β ヒドロキシラーゼを阻害し、副腎皮質ホルモンの合成を阻害する。その副腎皮質への影響は可逆的であり、メチラポンは CS の治療薬として使用されることも多い。対照的に、MIF は GR を抑制し、ACTH の分泌を促進させる。これにより ACTH 受容体が副腎皮質を刺激して、副腎皮質でのホルモン合成は維持される。これらの薬剤の作用は副腎皮質でのホルモン合成を阻害するものと促進するもので異なっており、この点において副腎萎縮を軽減し副腎機能を改善するための MIF の使用はより合理的であると我々は判断した。

この実験で使用した薬物の用量に関して、我々は過去の報告において CS 患者へ実際に投与された量と期間を

参考にした。ヒトとラットの体重および寿命を参照してヒトからラットへ変換し、MIF の用量およびその投与期間を計算した。また、MIF をサルに投与して毒性を評価した以前の実験では、副作用が 10mg /100 gBW 以上であることが過去の報告で示されていたので、過剰量による悪影響を引き起こさないように用量を調整した。最近では、GR に特異的に作用する MIF 以外の GR 拮抗薬 (CORT 125134) が承認されており、この薬も効果的な治療法となることが期待されているが、基本的にはこの実験の方法と概念は適切だと考えられる。さらに、既報の報告では、ヒストンデアセチラーゼ阻害 (HDACi) が GR 転写を抑制し、そして CS のモデルにおいて高血圧および高血糖を改善させることを示唆した。そのため、HDACi も、MIF と同様に GR の作用を阻害する効果があると考えられる。

さらに、我々はこの研究で使用した薬物治療の分子メカニズムを検討した。CYP11B1 および CYP11B2 酵素はシトクロム P450 ファミリーの酵素に属し、副腎皮質ホルモンの合成に関与している。CYP11B1 は副腎皮質束状層に存在し、コルチコステロンの合成に関与しているのに対し、CYP11B2 は副腎皮質球状層に存在し、アルドステロン合成に関与している。CYP11B1 の発現は、ACTH による刺激によって増加することが示されているが、CYP11B2 の発現は、ナトリウム損失とともに増加し、そして長期の ACTH 刺激とともに減少することが示されている。本研究の結果はまた、MIF 投与群において ACTH 上昇とともに

CYP11B1 の発現の増加および CYP11B2 の発現レベルの減少を示し、MIF の非投与群では反対の傾向を示した。これらの結果は、MIF による抗グルココルチコイド効果として合致していた。一方、GR はグルココルチコイドの作用を仲介するように作用し、リンパ球など様々な組織に広く分布しており、免疫制御や代謝に関与している。そしてグルココルチコイドの投与は受容体のダウンレギュレーションを引き起こすことが示されている。このため、MIF の継続投与は、下垂体における ACTH 抑制の解除をさらに促進する可能性がある。本実験において、適量の MIF はステロイドシグナル伝達による血圧上昇を抑制し、さらに異化作用および体重減少を抑え、血糖値の上昇もまた MIF 投与により適切に抑制された。

加えて、実験系の妥当性を評価し、本実験における ACTH の測定方法について検討した。採血中の疼痛刺激の結果として起こり得るストレス反応が ACTH に及ぼす影響は以前の文献に記載されている。この実験では、実験動物保護の観点から、以前の報告と同様に、麻酔でストレスを取り除きながら尾静脈より採血を行なった。別の研究でも、ACTH に対する麻酔の影響は有意ではないことが示されており、我々も麻酔下での ACTH 測定を行った。また、この研究で使用した ACTH アッセイについては、過去の研究でラット ACTH の測定のために検証された妥当性のある抗体を使用して検査キットで測定を行なった。さらに、SBP の評価についても議論したところ、異常な SBP

値が麻酔または無呼吸下で発生する傾向があることを示す報告を認めた。しかし、麻酔下でない限り、動いているラットの血圧を測定することは困難であるため、血圧測定は麻酔下で行われた以前の報告を参考にして行うこととした。

今回、我々の実験の結果では DEX 誘発 CS ラットモデルにおいて MIF の投与が HPA axis の抑制および残存副腎組織の萎縮を予防することを示唆した。MIF の投与により残存の副腎組織の機能が手術後に保存されやすくなることが示されれば、特に副腎機能温存のため萎縮した副腎組織を部分切除術で残す両側性コルチゾール産生副腎腺腫による CS に対して重要な薬剤になると思われる。しかしながら、今回の実験では MIF 投与が DEX による作用に拮抗して副腎組織の萎縮を防いだことは示されたが、手術後の副腎機能の回復を評価する実験までは至っていない。このため萎縮からの回復期での副腎機能の評価する実験系で MIF の有効性を証明することが今後の課題の一つである。例えば本ラットモデルに対して MIF を投与後、一定の期間において、急性熱負荷試験などのストレス負荷試験を行って血漿 ACTH とコルチコステロンを測定し、ストレスへの反応性を確認して副腎機能の回復を評価するといった実験系も検討している。本邦において MIF は未認可の薬剤であるが、MIF の術前投与は、糖尿病および高血圧の管理を改善し、CS 患者における Quality of Life を改善し得るため、薬剤の効果が動物実験で明らか

になれば本研究は今後の臨床応用につながる重要な研究になると考えられる。

また、本研究において他にも多くの課題があるが以下のことも検討課題としている。今回の実験で再現した ACTH 非依存性 CS ラットモデルの副腎の状態は片側副腎腺腫症例における健側の副腎と同様な状態である。片側副腎腺腫症例では病側の切除のみで健側の副腎は萎縮をしているが手術による障害を受けていない。両側副腎腺腫症例の部分切除術後の残存副腎ではその手術の影響を受けて機能の回復はさらに遅れることが予想される。上述のように、両側副腎腺腫による ACTH 非依存性 CS に遭遇する機会は近い将来さらに増加することが考えられるため、副腎機能温存の重要性は今後さらに増していくことと思われる。このために両側副腎腺腫症例を再現した ACTH 非依存性 CS ラットモデルの構築を行うことも我々の課題の一つである。

さらに、上述のように CORT 125134 といった GR に対して特異性の高い GR 拮抗薬や HDACi のような MIF と同様な効果を持った薬剤が出てきており、今後我々の研究で用いる薬剤の選択についても検討すべき点と考えている。今回の動物実験のデータを元に、GR に対してより高い選択性を持った GR 拮抗薬の開発を行うことができれば、副作用が少なくより効果的に ACTH 非依存性 CS の残存副腎機能の改善を促す治療が可能になると思われる。加えて、これらの薬剤は萎縮した副腎の回復を促すという点で

ACTH 非依存性 CS の術後のほか、ステロイド長期投与による続発性副腎機能低下症や抗 PD-1 抗体薬などの免疫チェックポイント阻害薬関連の副腎機能低下症に対する治療への応用の可能性も検討課題と考えている。我々は本研究の成果を今後の臨床試験や治験などに繋げて、本邦における ACTH 非依存性 CS の術後副腎機能改善に関する研究に貢献し新規治療の臨床応用を目指していく。

Conclusion

我々は DEX 誘発 CS ラットモデルにおいて、MIF 投与群と非投与群での副腎機能を比較し、残存副腎機能が MIF の投与によって維持されることを検証した。MIF 投与ラットは、血漿 ACTH レベルの上昇、副腎重量の増加、血圧正常化および高血糖の改善を示した。さらに、MIF 投与ラットの副腎皮質は病理学的分析においてより少ない萎縮性変化を示し、副腎における *CYP11B1* の mRNA 発現レベルは DEX 投与群と比較して増加した。これらの結果は、MIF 治療が HPA axis の抑制を防ぐ可能性があることを示唆している。術前 MIF 投与は ACTH 非依存性 CS の残存副腎機能を改善する可能性がある。