

ライフサイエンス分野技術説明会
平成28年6月2日 東京・市ヶ谷

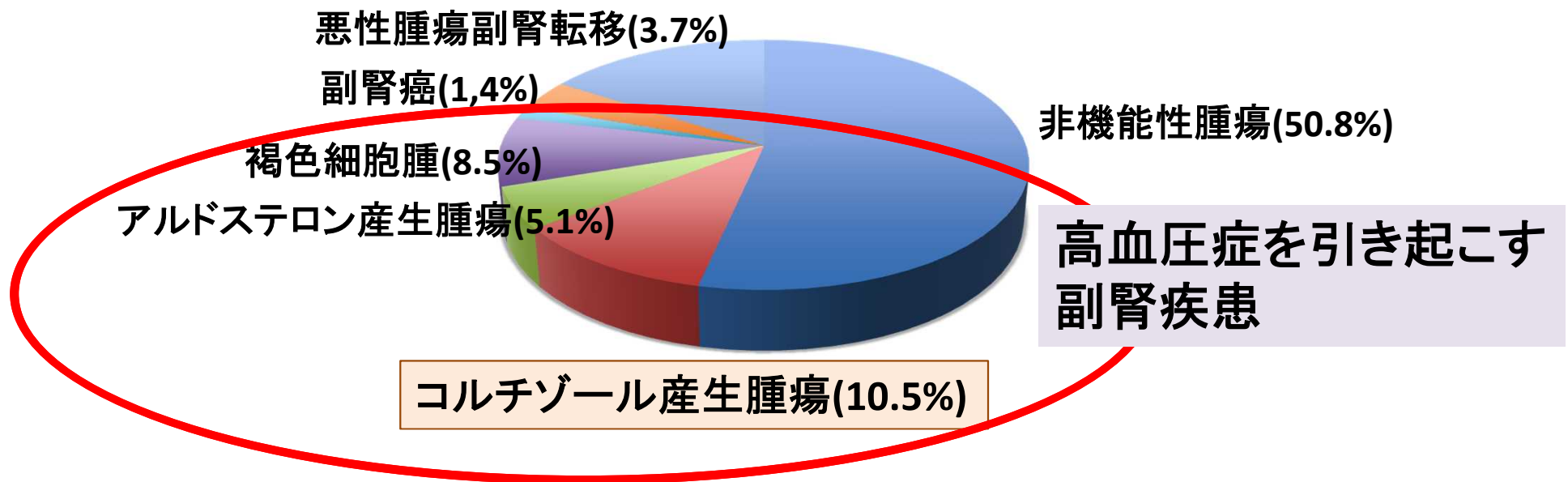
PRKACA遺伝子を使用した副腎性クッシング症候群の迅速簡易診断法の開発

群馬大学 医学部附属病院
患者支援センター
助教 中島 康代



副腎偶発腫瘍

- 画像検査の進歩、普及で近年増加傾向
- 腹部CT施行例の0.3~0.8%に認められると言われている。
- 副腎偶発腫瘍の1/4は副腎性高血圧を来す可能性がある。



クッシング症候群とは？

クッシング症候群
慢性的なコルチゾール過剰産生を来す疾患群

- 1、**副腎性クッシング症候群**
副腎腺腫(コルチゾール産生腺腫)
副腎癌,PMAHなど
- 2、**ACTH依存性クッシング症候群**
クッシング病(下垂体腺腫)
異所性ACTH症候群(産生腫瘍)
- 3、**医原性**
グルココルチコイド長期投与

クッシング症候群の主要症候

コルチゾール作用

脂質代謝

中心性肥満(80%以上)

バッファローハンプ(約60%)

ムーンフェイス(80%以上)

蛋白異化作用

皮膚線条(約50%)

皮下うっ血(約45%)

筋力低下(約50%)

鉱質コルチコイド作用

高血圧(80%以上)

浮腫(約50%)

糖代謝異常(約50%)

骨粗鬆症(約50%)

精神障害(約17%)

男性ホルモン過剰症状

多毛(約40%)

月経異常(約60%)

その他

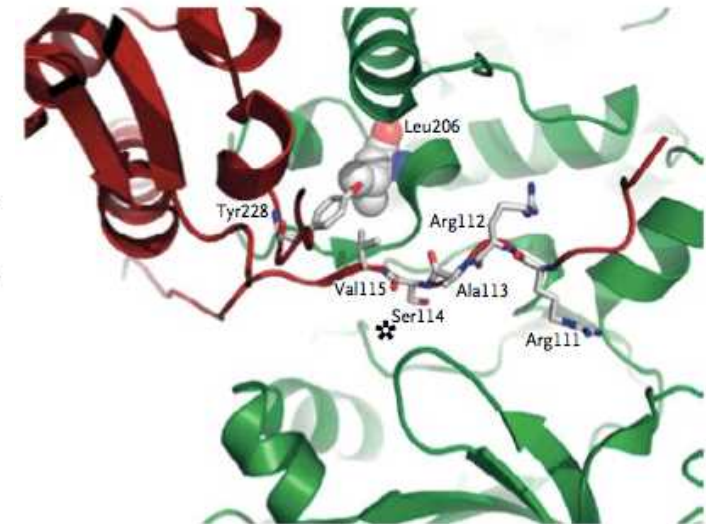
色素沈着(約20%)

ORIGINAL ARTICLE

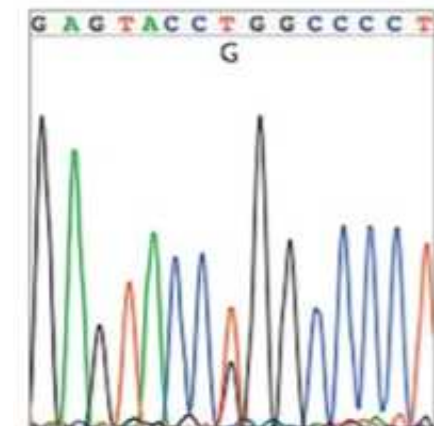
Constitutive Activation of PKA Catalytic Subunit in Adrenal Cushing's Syndrome

Felix Beuschlein, M.D., Martin Fassnacht, M.D., Guillaume Assié, M.D., Ph.D.,
Davide Calebiro, M.D., Ph.D., Constantine A. Stratakis, M.D., D.Sc.,
Andrea Osswald, M.D., Cristina L. Ronchi, M.D., Ph.D., Thomas Wieland, M.Sc.,
Silviu Sbiera, Ph.D., Fabio R. Faucz, Ph.D., Katrin Schaak, Ph.D.,
Anett Schmittfull, M.S., Thomas Schwarzmayer, M.Sc., Olivia Barreau, M.D., Ph.D.,
Delphine Vezzosi, M.D., Ph.D., Marthe Rizk-Rabin, Ph.D., Ulrike Zabel, Ph.D.,
Eva Szarek, Ph.D., Paraskevi Salpea, Ph.D., Antonella Forlino, Ph.D.,
Annalisa Vetro, Ph.D., Orsetta Zuffardi, Ph.D., Caroline Kisker, Ph.D.,
Susanne Diener, M.Sc., Thomas Meitinger, M.D., Martin J. Lohse, M.D.,
Martin Reincke, M.D., Jérôme Bertherat, M.D., Ph.D.,
Tim M. Strom, M.D., and Bruno Allolio, M.D.

N Engl J Med 2014; 370:1019-1028



エクソーム解析によりコルチゾール
産生腺腫の37%にPRKACA遺伝子の
体細胞変異が認められた。



遺伝子変異検出法

1、ダイレクトシーケンス法 (Sequencing) サンガー法

DNAの塩基配列決定方法のひとつ

PCRにて目的のDNAを増幅後にキャピラリーシーケンサーにより塩基配列を解析

保険適応：悪性腫瘍遺伝子検査 (EGFR遺伝子、K-ras遺伝子など) 2100点
研究受託解析 1検体 1000円前後

高価なキャピラリーシーケンサー
設置施設が限られている。
受託解析には数日要する。

遺伝子変異検出法

2、サザンブロット法

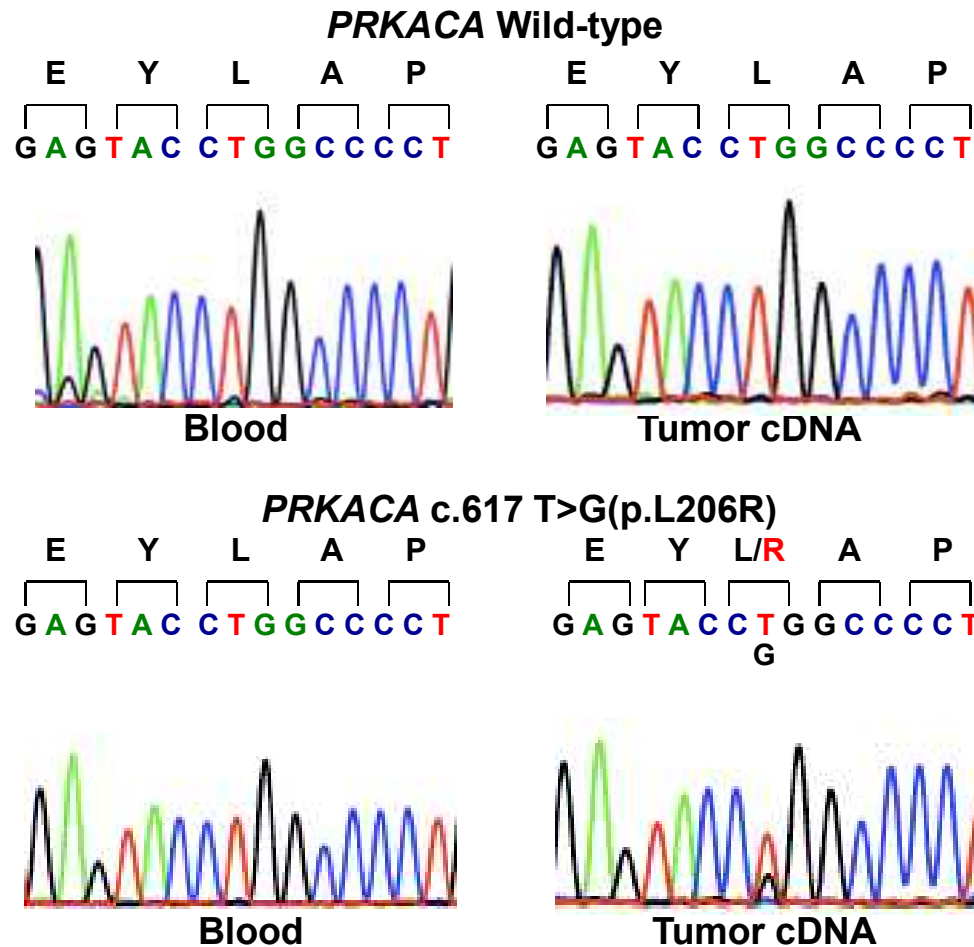
1975年にサザンにより報告されたDNA検出方法

DNA断片をアガロースゲル電気泳動により分離し、メンブランに転写後プローブDNAをハイブリダイズさせ目的のDNA断片を検出する。

保険適応：造血器腫瘍遺伝子検査など2100点
研究受託解析 1検体 数千から数万円

実験方法が煩雑
RI使用（Non-RIでは高価）
受託解析には数日要する。

1、ダイレクトシーケンス法 (Sequencing) サンガー法



遺伝子変異検出法

3、RFLP法 (Restriction Fragment Length Polymorphisms)

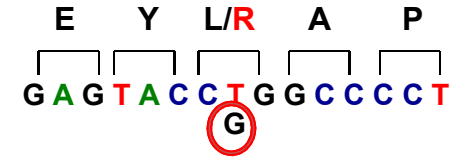
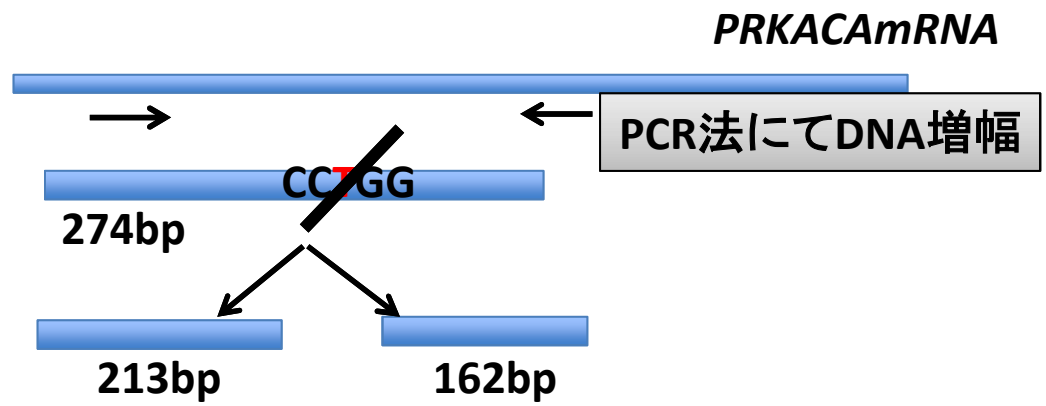
制限酵素切断パターンにより遺伝子多型を検出する方法。
変異部位が制限酵素認識配列があるときに適応できる方法。

PCR装置さえあれば————

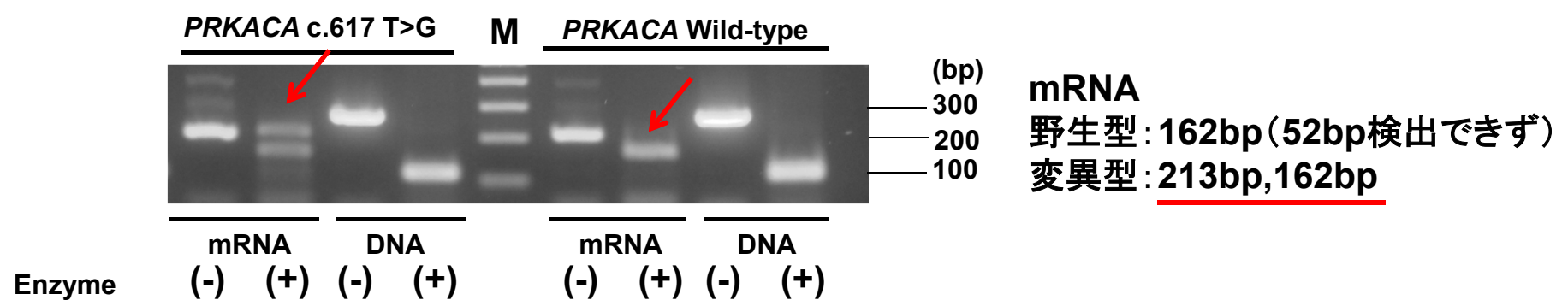
簡便 (DNA抽出—制限酵素切断—アガロースゲル電気泳動:数時間)

安価 (PCR関連試薬、制限酵素程度で)

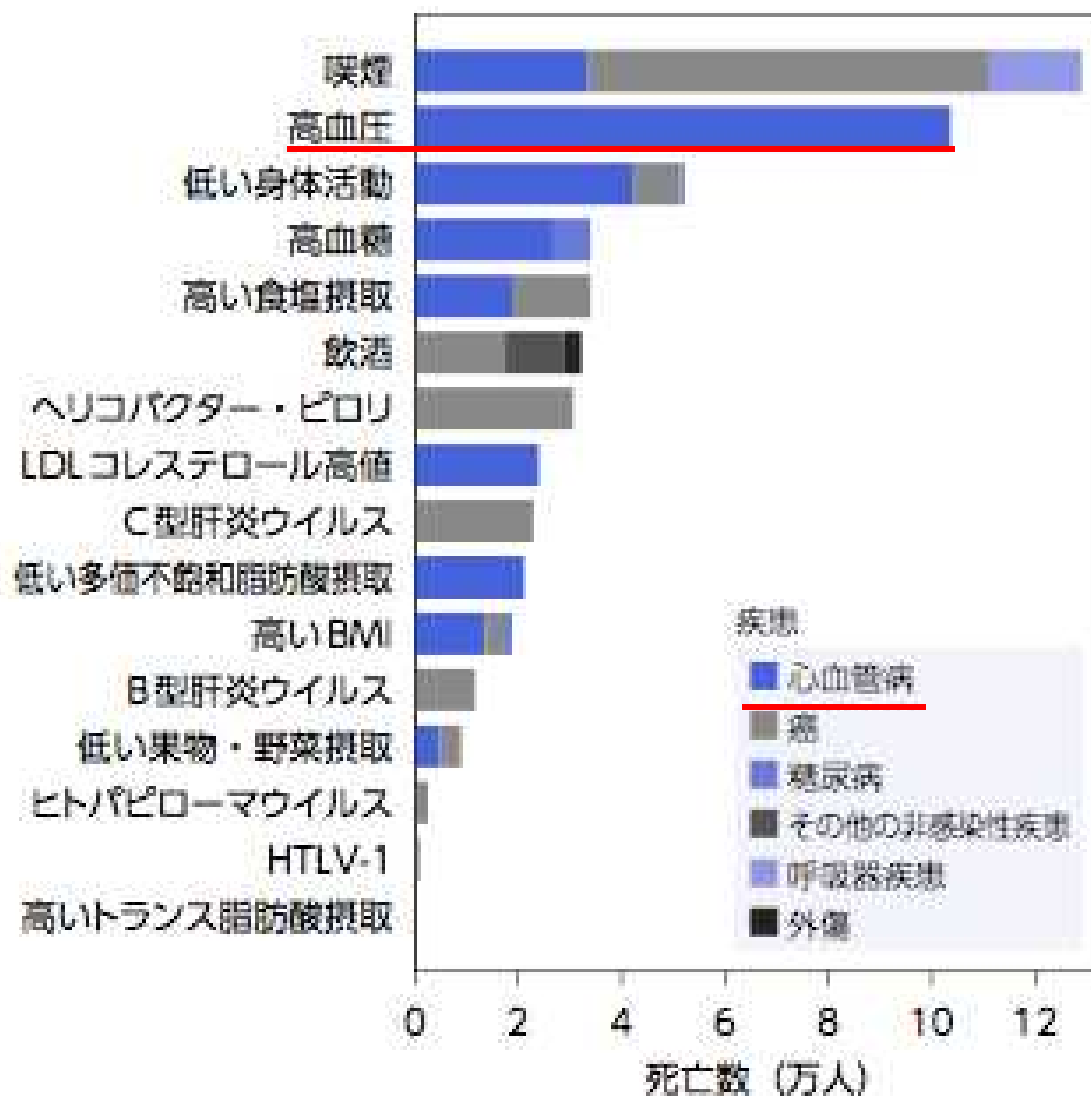
PCR-RFLP



PRKACA c.617 T>G(p.L206R)



本邦の2007年の非感染性疾患および外因による死亡数への各種リスク因子の寄与（男女計）



高血圧治療ガイドライン2014より

初診時の高血圧管理計画

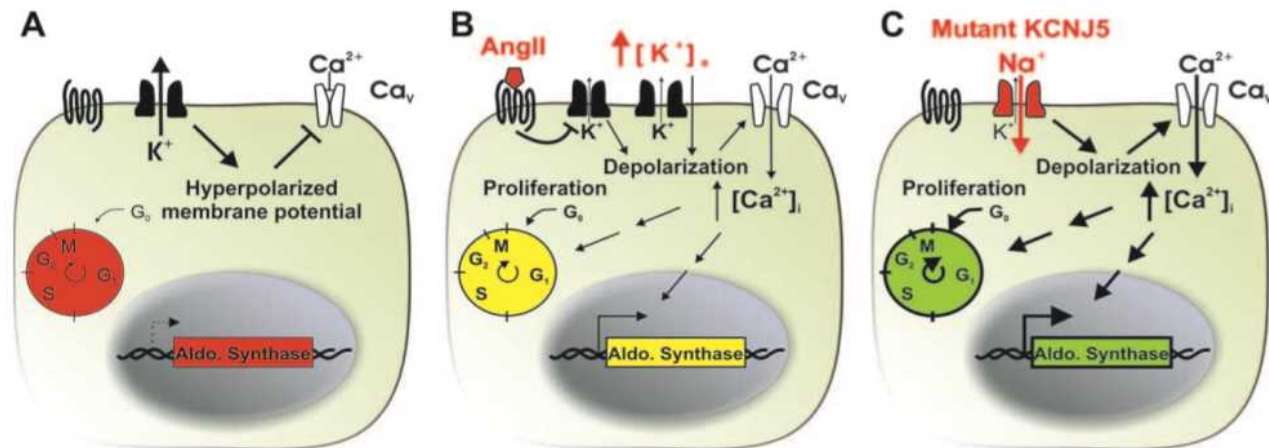


クッシング症候群
原発性アルドステロン症など
副腎疾患

アルドステロン産生腺腫においてKチャンネルKCNJ5遺伝子 体細胞変異が約35%で認められる

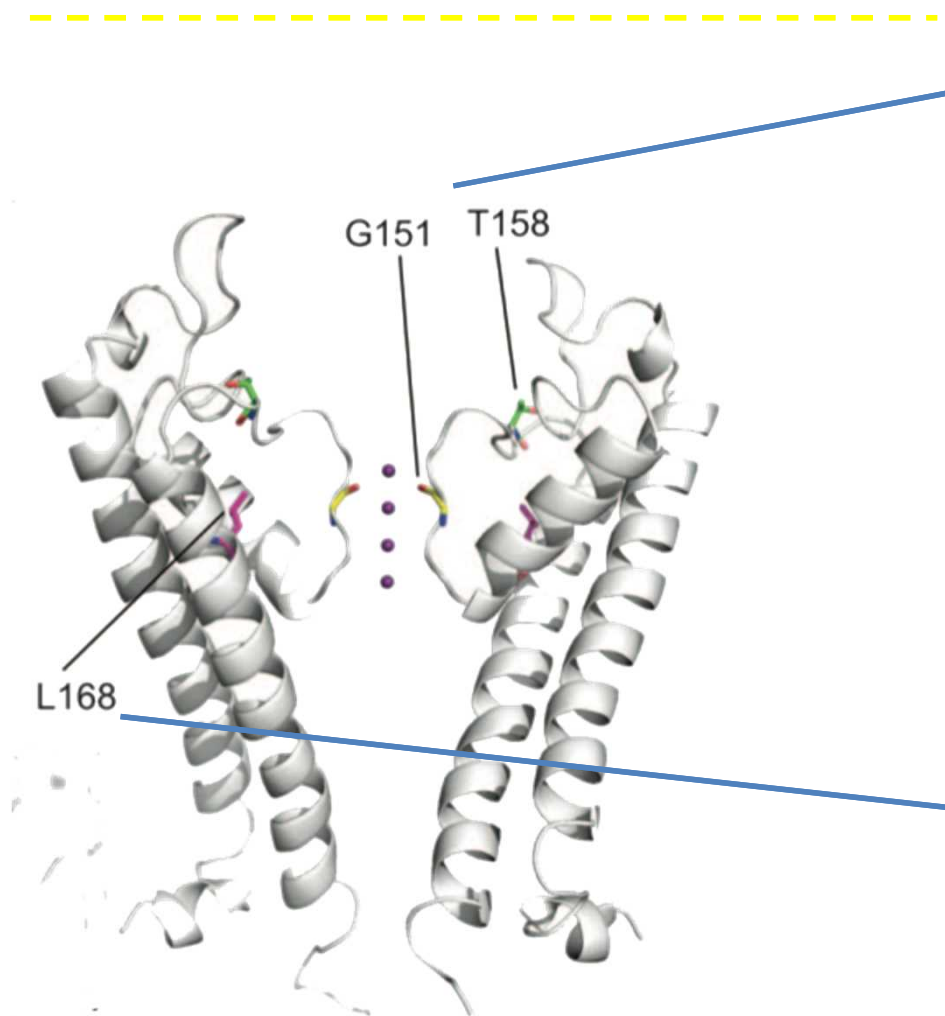
K⁺ Channel Mutations in Adrenal Aldosterone-Producing Adenomas and Hereditary Hypertension

Murim Choi,¹ Ute I. Scholl,¹ Peng Yue,^{2*} Peyman Björklund,^{3,4*} Bixiao Zhao,^{1*} Carol Nelson-Williams,¹ Weizhen Ji,¹ Yoonsang Cho,⁵ Aniruddh Patel,¹ Clara J. Men,¹ Elias Lolis,⁵ Max V. Wisgerhof,⁶ David S. Geller,⁷ Shrikant Mane,⁸ Per Hellman,⁴ Gunnar Westin,⁴ Göran Åkerström,⁴ Wenhui Wang,² Tobias Carling,³ Richard P. Lifton^{1†}

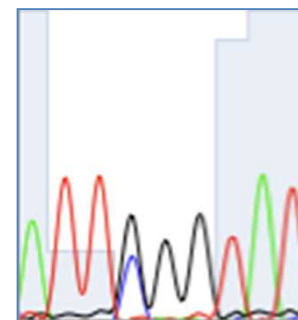


Science 2011, 331:768-772

自験例32例中21例 (66%)に
KCNJ5 遺伝子変異あり

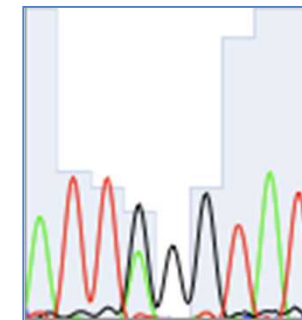


5例
I G/R Y
ATT G GG TAT
 C



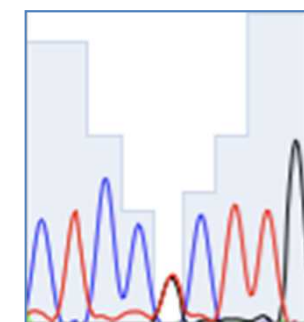
p.G151R
c.451G>C

11例
I G/R Y
ATT G GG TAT
 A



p.G151R
c.452G>A

L L/R L
CTCC T CTTG
 G

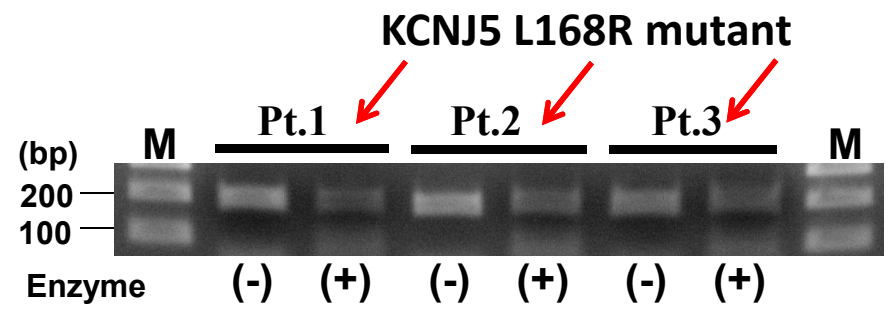
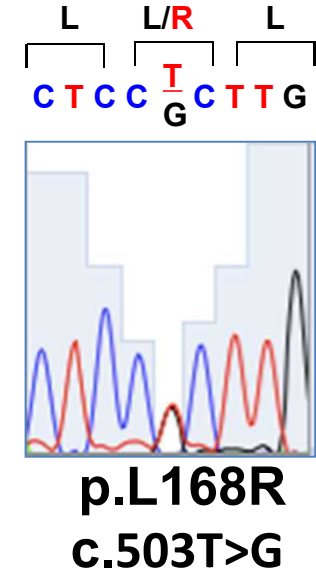
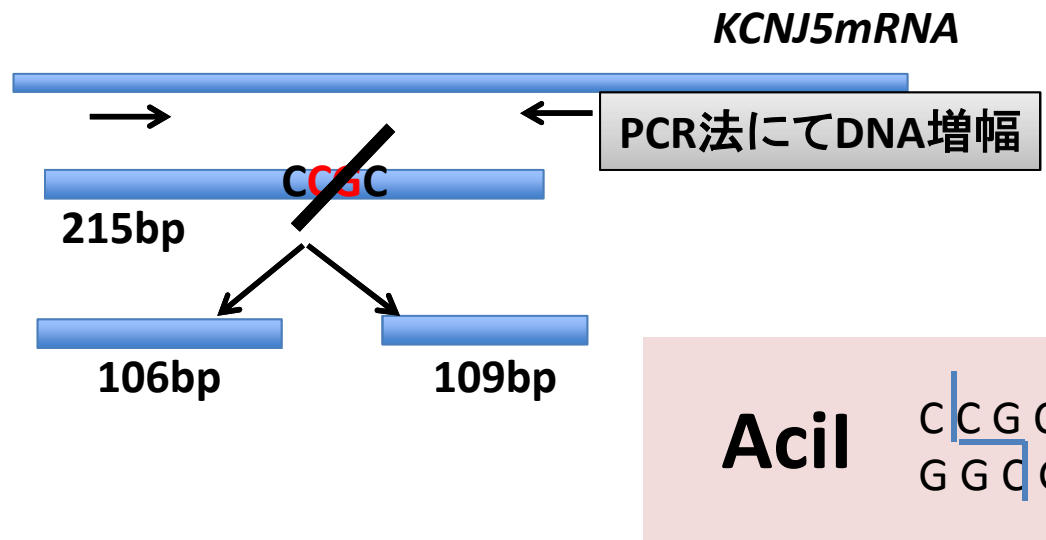


p.L168R
c.503T>G

5例

PCR-RFLP

PCR-RFLP analysis on p.L168R, c.503T>G



副腎疾患の診断の問題点

- 本邦における高血圧症4000万人のうち、10%以上は副腎疾患が原因の高血圧と想定されるが、その多くが適切に診断されていない。
- 副腎疾患が原因の高血圧症は副腎偶発腫瘍の増加などにより今後増加する事が予想される。
- 高血圧を引き起こす副腎疾患には、副腎性クッシング症候群や原発性アルドステロン症があるが、その診断治療は専門的な入院での検査など限られた専門施設でのみ可能である。

実用化に向けた課題

- クッシング症候群や、原発性アルドステロン症の RFLPを用いた簡便で正確な診断方法の確立は、高血圧症全体の治療や、高血圧を原因とする脳卒中の罹患率の抑制に貢献する。
- 現在は術後に、研究室で腫瘍から採取したDNAで RLFPにて変異診断を行っている。
- 術中迅速診断による手術方法選択や、術前診断への開発が期待される。

本技術に関する知的財産権

特願2014-132908,

発明の名称; PRKACA遺伝子を使用したクッシング症候群を呈するコルチゾール産生腫瘍の検査方法;

出願人: 群馬大学,

出願日: 平成26年 6月27日

特開2013-172705,

発明の名称: KCNJ5遺伝子を利用したアルドステロン産生腺腫の検査方法およびアルドステロン産生腺腫治療薬のスクリーニング方法

出願人: 群馬大学,

出願日: 平成24年3月29日

お問い合わせ先

群馬大学 産学連携・知的財産活用センター
〒376-8515 群馬県桐生市天神町1-5-1

TEL 0277-30-1171~1175

FAX 0277-30-1178

e-mail tlo@ml.gunma-u.ac.jp