

#### 【4】下垂体ホルモン複合欠損症

## 「下垂体ホルモン複合欠損症」座長のまとめ

橋本浩三（高知医科大学第二内科）

今年度は、先天性下垂体ホルモン複合欠損症の原因や自己免疫性下垂体炎の抗原となる可能性のある未知の下垂体特異的遺伝子の解析、既知ではあるが機序不明であった変異 Pit-1 の解析、下垂体細胞の分化に強く関与していると思われる GATA-2 の下垂体腺腫での発現に関する検討、リンパ球性下垂体炎に於ける自己抗体の検討などが行われた。

異ら（大阪大）は昨年に続き、Body Map法により下垂体に特異的に発現する遺伝子の検索を行った。ヒト下垂体から抽出した mRNA から cDNA の 3' 末端の cDNA ライブラリーを作成し、そこから 1000 個のクローンの塩基配列を解析し、約 60 種の主要組織や細胞での発現様式と比較した。今回は、未知の下垂体遺伝子と考えられるもののうち、11 種類につき解析され、そのうち、下垂体特異的な発現が認められた Pi-b, c、非特異的発現が認められた Pi-g, Pi-a について報告された。Pi-b は 0.7 kb であり、92 と 129 アミノ酸の蛋白をコードしており、40 アミノ酸が細菌のプロテアーゼと 40% の一致を示したことより、自己免疫性下垂体炎の抗原となっている可能性もある。Pi-c は 1.8 kb に 243 アミノ酸の蛋白がコードされ、免疫グロブリン様ドメイン 2 つとシグナルペプチドがあり、分泌蛋白と考えられた。また、この遺伝子は IGDC1 と 5' 端が類似しており、IGDC1 としてもスプライミングされている可能性もある。Pi-g は 2.9 kb に 632 アミノ酸の蛋白がコードされ、SH3 結合蛋白と類似し、心臓の他、肝、脾、骨格筋などでも発現していた。Pi-a は全長が確認されていないが、確認された 2.1 kb に 568 アミノ酸の蛋白がコードされ、線虫で明らかにされた蛋白と 45% 相同性を示した。下垂体と胃で高頻度に発現しており、重要な蛋白と考えられた。

千原ら（神戸大）は、GH, PRL, TSH などの下垂体ホルモン複合欠損症患者で原因として報告された既知の変異 Pit-1 遺伝子のうち、POU ドメインの領域に変異をもつ変異遺伝子の解析は既に報告があるので、今回は転写活性化領域に変異を持つ mutant Pit-1（14 番目と 24 番目のプリンがロイシンに変異したものの、P14L 及び P24L）の機能解析を行った。内因性に Pit-1 を発現していない COS7 細胞に wild Pit-1 や mutant Pit-1 と共に、PRL や GH の 5' 上流をルシフェラーゼ遺伝子と結合させたレポータープラスミドを発現させたところ、P24L の PRL や GH のプロモーター活性化能は明らかに低下していたが、P14L は wild Pit-1 と差がなかった。しかし POU ドメインに異常のある E250X という mutant Pit-1 に比し、P24L は完全には機能を消失していなかった。また、P14L や P24L は wild Pit-1 に対し、ドミナントネガティブな作用は示さなかった。多くの転写因子のコアクチベータとして知られる、CREB-binding protein (CBP) と P24L との結合性を検討したところ、wild Pit-1 と CBP の結合には問題がなかったが、P24L と CBP との結合に問題があった。cAMP は Pit-1 の対象遺伝子の発現を増強することが知られている。cAMP による PRL プロモーターや Pit-1 binding site とレポー

ター遺伝子を結合させた遺伝子発現に及ぼす、wild Pit-1とmutant Pit-1（リン酸化に必要な220番目のスレオニンを変異させ、リン酸化を受けられなくしたもの）の影響をみたところ、このmutant Pit-1はwild Pit-1と同様な遺伝子発現増強作用を示した。しかしP24LはcAMPによる遺伝子発現増強反応を示さなかった。以上よりPit-1とCBPの結合が、この経路の活性化に必須であることが判明した。しかしP24Lは転写活性を完全に消失していないことから、Pit-1に他のコアクチベーターが関連している可能性も残されている。

長村ら（東海大）は、近年ラットの下垂体細胞の分化にPit-1とGATA-2のバランスが重要であることが報告されていることより、ヒト下垂体腺腫に於けるGATA-2とPit-1の蛋白と遺伝子の発現を、免疫組織学的手法とRT-PCRにより検討した。免疫染色では、ゴナドトロピン産生腺腫では全例にGATA-2の発現がみられたが、Pit-1の発現は認められなかった。GH産生腺腫、PRL産生腺腫ではPit-1は全例陽性であったが、GATA-2の発現は認められなかった。TSH産生腺腫ではGATA-2、Pit-1共に大多数の症例に発現が認められた。RT-PCRの結果では、FSH産生腺腫の8例全例に163ベースペアのGATA-2のmRNAのバンドがみられ、TSH産生腺腫でも5例中3例に強く、1例に弱く発現していた。GH産生腺腫やPRL産生腺腫では、GATA-2の発現はほとんど認められなかったが、Pit-1は大多数の症例で認められた。ラットの下垂体前葉細胞の分化においては、GATA-2が働くとゴナドトロフに、Pit-1が働くとソマトロフ、ラクトロフに分化するとされている。Pit-1とGATA-2がある割合で存在すると、それらの協調作用によりサイロトロフへと分化するとされている。GATA-2とPit-1の遺伝子や蛋白の発現が、ラットの下垂体細胞の分化過程の発現と類似していることより、ヒト下垂体腺腫においてもGATA-2がPit-1と共に、その機能発現に強く関与していると考えられた。

橋本ら（高知医大）は昨年につき、リンパ球性下垂体炎における自己抗体の検討を行うため、各種下垂体機能低下症患者のガンマグロブリンが、下垂体前葉ホルモン分泌に影響する活性を有するか否かにつき検討した。まず、リンパ球性下垂体炎患者で認められる下垂体細胞サイトゾールの22kDa蛋白および49kDa付近の蛋白の本体を解析するため、免疫沈降し、アミノ酸分析した。その結果、ヒト下垂体の22kDa抗原のN端アミノ酸配列はヒトGHに相当しており、49kDa抗原のN端アミノ酸配列は、免疫グロブリン重複領域に一致していた。しかし50kDa付近には非特異的なバンドがみられることもあり、49kDa抗原についてはさらに検討が必要である。リンパ球性下垂体炎、特発性尿崩症、empty sella症候群、Sheehan症候群、下垂体腺腫術後下垂体不全、橋本病患者、及びコントロールとしての健常者の血清から30%ポリエチレングリコール法によりガンマグロブリンを抽出し、これをDMEMで再溶解し、ラット下垂体前葉細胞の単層培養系に加えて6時間インキュベートし、メジウム中のACTH, GH, PRL, cAMPを測定した。リンパ球性下垂体炎3例中では、22kDa抗体陽性例の2例でACTH分泌抑制活性、1例でPRL分泌刺激活性を認めた。抗体陽性の特発性尿崩症患者では逆にACTH分泌刺激活性が認められたが、cAMPの刺激活性は認められなかった。その他の疾患では22kDa抗体陽性者はなく、橋本病1例で49kDa抗体が

認められたのみであった。これらの患者のガンマグロブリンのうちSheehan症候群1例がACTH, GH, PRL抑制活性を示したのみであった。GH分泌に影響する活性はどの例でも認められなかった。以上より抗下垂体抗体陽性者では、ラット下垂体前葉細胞からのACTH分泌に影響する活性が比較的高頻度に認められたが、今回の検討では例数も少なく、それらの意義についてはさらに検討が必要である。

加藤ら（島根医大）は、中枢性尿崩症の発症12年後に下垂体機能低下症をきたし、下垂体前葉のリンパ球浸潤を認めた頭蓋咽頭腫の1例を報告した。この例では、ADHの分泌不全の他に下垂体前葉のホルモンの分泌がPRL以外すべて低下しており、視床下部ないし下垂体茎の障害が示唆された。MRIで内部不均一の下垂体腫瘍が認められ、上方に進展し視交叉を圧迫しており、ガドリニウム造影で、囊腫状病変が認められた。経蝶形骨洞的摘出術が施行され、組織的に頭蓋咽頭腫と診断され、間質にリンパ球の浸潤がみられた。隣接する下垂体前葉にはリンパ球の広範な浸潤が認められたが、腺構造は保たれ、巨細胞や囊腫性病変を認めなかった。本例では抗下垂体抗体は陰性であり、自己免疫性というより、囊腫状頭蓋咽頭腫による二次性のリンパ球性下垂体炎の像と考えられた。リンパ球性下垂体炎と診断されたものの中にもこのような例があるので、病理組織診断に際して留意すべきであることが指摘された。

#### まとめ

今後は、下垂体に特異的に発現する遺伝子の検索により、新しい下垂体ホルモン調節に関わる転写因子や自己抗原になりうる蛋白の発見が望まれる。さらに下垂体の自己抗原の解明も未解決な点が残されており、引き続き検討が必要と思われる。

Pit-1の24番目のアミノ酸、ProlineはCBPとのinteraction、および Pit-1によって制御される遺伝子のcyclic AMPによる発現増強に必須である

分担研究者 千原和夫（神戸大学医学部第三内科）  
研究協力者 岸本正彦（神戸大学医学部第三内科）  
置村康彦（神戸大学医学部保健学科）  
井口元三（神戸大学医学部第三内科）  
麓万里子（神戸大学医学部第三内科）  
飯田啓二（神戸大学医学部第三内科）  
加治秀介（兵庫県立看護大学）

#### 【背景】

下垂体特異的転写因子Pit-1はソマトトロフ、ラクトロフ、サイロトロフの発生、分化に重要であると同時に、成長ホルモン(GH)、プロラクチン(PRL)および甲状腺刺激ホルモン(TSH) $\beta$ 遺伝子のPit-1 binding DNA配列に結合し、その発現を調節している。従って、Pit-1遺伝子の異常では、GH、PRLおよびTSHの複合欠損を呈する。現在までに、11種類の異なるヒトPit-1異常症での変異が報告されているが、その多くはDNAへの結合および二量体形成に重要な役割を果たしていることが知られているPOUドメイン内に存在している1-8。しかしながら、転写活性化ドメインにも2種類の変異が報告されている。そのひとつは、14番目のプロリンがロイシンに変わったもの（以下P14L）7、もうひとつは、24番目のプロリンがロイシンに変わったもの（以下P24L）8である。P14LとP24Lの症例ではいずれもヘテロでの発症であったため、これまでこれらの変異Pit-1はdominant negativeな変異体と推測されていた9-11。しかしながら、これまでP14LとP24Lの機能解析はまったく行われておらず、その実体は不明であった。今回私どもはこれらのmutant Pit-1の機能解析を行った。

#### 【方法と結果】

(A) wild Pit-1発現ベクター(pcDNA3.1-Pit-1)と、14番目のプロリンをロイシンに変異させたmutant Pit-1発現ベクター(pcDNA3.1.-P14L)および24番目のプロリンをロイシンに変異させたmutant Pit-1発現ベクター(pcDNA3.1.-P24L)を作製、PRL遺伝子5'上流0.6kbあるいはGH遺伝子5'上流1.8kbをルシフェラーゼ遺伝子と結合させたレポーター遺伝子とともにリポフェクテースにより、COS7細胞に導入し、その転写活性能を検討した。その結果、意外なことに、P14Lはwild Pit-1と同等の機能を有することが明らかとなった。一方、P24L

はwild Pit-1の機能を100%として表わすと、PRLレポーター遺伝子、GHレポーター遺伝子をそれぞれ56%、69%活性化することとどまった。

(B) P14LとP24Lは、dominant negativeな変異体と推測されていたため、これらのmutantがWild Pit-1によるPRLレポーター遺伝子発現活性化に対しdominant negativeな作用を有するか検討したが、P14LとP24Lのいずれも、dominant negativeな作用を示さなかった。

(C) P24LではDNA結合、および二量体形成に重要とされるPOUドメインは正常であることからcoactivatorとの相互作用の障害による可能性を考え、以下の実験を行った。COS7細胞にCBPと、wild Pit-1あるいはP24Lの発現ベクターをトランスフェクトし、48時間後に全細胞から蛋白を抽出した。これに抗CBP抗体を加え免疫沈降を行いその沈殿物をSDS-PAGEで展開し、抗Pit-1抗体を用いたWestern blotによりCBPとPit-1の結合を検討した。その結果、P24LはCBPと共沈せず、P24LはCBPと結合できないことが明らかとなった。

(D) Pit-1存在下に生じるcyclic(c) AMPによる遺伝子発現の活性化にwild Pit-1とP24Lで相違があるか、7つの連続したPit-1 binding DNA 配列の下流にPRL遺伝子ミニマルプロモーターおよびルシフェラーゼ遺伝子を結合させたレポーター遺伝子を使用し検討したところcAMPはwild Pit-1存在下にレポーター遺伝子の転写を著しく増強したが、P24L存在下には影響を与えなかった。

#### 【考察】

今回、私どもは、ヒトPit-1異常症で実際に報告されていたが、その機能がこれまで未知であったmutant Pit-1(P14LとP24L)の機能解析を初めて行った。転写活性化ドメインで認められていたmutant Pit-1はこれらのみであり、これまで詳細が不明であった転写活性化ドメインの機能の解明が期待されたが、意外にもP14Lは、少なくとも私どもの検討した条件下では、wild Pit-1と同等の機能を有しており、病因となりうる変異ではない可能性が示唆された。一方、同じプロリンからロイシンへの変異であっても、24番目のコドンの場合(P24L)には明らかな機能低下が認められた。

私どもは、P24LのPOUドメインが正常であることに注目し、Pit-1を含む種々の転写因子のcoactivatorとして働くことが知られているCREB-binding protein (CBP)<sup>12</sup>とPit-1との相互作用の障害をその機能低下の原因と推測し、検討を行った。P24LとCBPの結合は障害されており、新規の複合下垂体ホルモン欠損症の発症メカニズムとなりうる可能性が示唆された。しかしながら、P24Lはdominant negativeな作用を有さないにもかかわらず、ヘテロの症例で発症しておりgenomic imprintingなど他のメカニズムが関与している可能性が考えられた。

一方、これまでcAMPによる刺激によって、Pit-1を介する遺伝子発現が増強することは知られていたが、その詳細なメカニズムは不明であった。私どもはこのメカニズムにPit-1自体のリン酸化は関与していないことをすでに報告しているが<sup>13</sup>、今回さらに、CBPと結合不能なP24Lは、Pit-1によって制御される遺伝子のcAMPによる発現増強反応を全くひきお

こさないことを示し、転写共役因子であるCBPがsignal transducerとしての役割も保持している可能性を見出した。また、P24Lは転写因子としての機能を完全には消失しておらず、Pit-1にはCBP以外の未知のcoactivatorが存在する可能性が考えられた。

#### 【結語】

1. Pit-1の24番目のプロリンはCBPとの相互作用に必須である。2. P24Lの機能は一部残存しているのでPit-1にはCBP以外にも別のcoactivatorが作用する可能性が示唆された。3. CBPはPit-1によって制御される遺伝子のcAMPによる発現増強に不可欠であることが明らかとなった。

#### 【文献】

1. Radovick S, et al: A mutation in the POU-Homeodomain of Pit-1 responsible for combined pituitary hormone deficiency. *Science* 257: 1115-1121, 1992.
2. Cohen LE, Zanger K, Brue T, Wondisford FE, Radovick: Defective Retinoic acid regulation of the Pit-1 gene enhancer: A novel mechanism of combined pituitary hormone deficiency. *Mol. Endocrinol* 13: 476-484, 1999.
3. Pernasetti F, et al: Pro239Ser: A novel recessive mutation of the Pit-1 gene in seven middle eastern children with growth hormone, prolactin, and thyrotropin deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 83: 2079-2083, 1998.
4. Pellegrini-Bouiller I, et al: A new mutation of the gene encoding the transcription factor Pit-1 is responsible for combined pituitary hormone deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 81: 2790-2796, 1996.
5. Brown MR, et al: Central hypothyroidism reveals compound heterozygous mutations in the Pit-1 gene. *Horm. Res* 49: 98-102, 1998.
6. Irie Y, et al: A novel E250X mutation of the PIT1 gene in a patient with combined pituitary hormone deficiency. *Endocrine J* 42: 351-354, 1995.
7. Fofanova OV, et al: Rarity of PIT1 involvement in children from Russia with combined pituitary hormone deficiency. *Am J Med* 77: 360-365, 1998.
8. Ohta K, et al: Mutations in the Pit-1 gene in children with combined pituitary hormone deficiency. *Biochem Biophys Res Comm* 189: 851-855, 1992.
9. Tatsumi K, Amino N: PIT1 abnormality. *Growth Horm IGF Res* 9: 18-23, 1999.
10. Parks JS, et al: Genetics of growth gene expression. *Horm Res* 40: 54-61, 1993.
11. Pfaffle R, et al: Pit-1: Clinical aspects. *Horm Res* 45: 25-28, 1996.
12. Xu L, et al: Signal-specific co-activator domain requirements for Pit-1 activation. *Nature* 395: 301-306, 1998.
13. Okimura Y, Howard PW, Maurer RA: Pit-1 binding sites mediate transcriptional responses to

cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate through a mechanism that does not require inducible phosphorylation of pit-1. *Mol Endocrinol* 8: 1559-1565, 1994.



## 下垂体特異的遺伝子の構造解析

分担研究者 巽 圭太 (大阪大学 大学院医学系研究科・生体情報医学)  
研究協力者 田中 進 ( 同 )  
網野信行 ( 同 )  
大久保公策 (大阪大学 細胞生体工学センター)

### 【背景】

先天性下垂体ホルモン単独欠損症の病因遺伝子としてはホルモンとホルモン受容体の遺伝子が、複合欠損症の病因遺伝子としては転写因子1)、ホルモン受容体、プロホルモン変換酵素、接着因子などが明らかにされている。先天性下垂体ホルモン複合欠損症の病因遺伝子の解明をさらに進めていく一つの方法として下垂体に特異的に発現する遺伝子を明らかにし、その中より病因候補遺伝子を選び、解析する方法がある。

本研究では、先天性下垂体ホルモン複合欠損症の病因の解明や、自己免疫性下垂体炎の自己抗原の解明のために下垂体特異的に発現している新規遺伝子を単離した。

### 【対象と方法】

#### 1. BodyMap法<sup>2)</sup>による下垂体特異的な遺伝子の単離

下垂体と他の64種類の組織/細胞より抽出したmRNAからcDNAの3'末端のcDNAライブラリーを作成し、そこから各々約1000個のクローンの塩基配列を解析して各組織の遺伝子の3'末端配列(GS; gene signature)の発現様式 (BodyMap) を明らかにした。下垂体と他の組織のGSの発現様式を比較することにより下垂体特異的に発現する遺伝子のGSを抽出し、これらをプローブとしてヒト下垂体cDNAライブラリーをスクリーニングし、cDNAクローンを単離した。

#### 2. 下垂体特異的な遺伝子の構造、発現の解析

RACEによりcDNAの5'末端を同定し、Northern解析により組織特異性とcDNAの長さを確認した。また、データベースを検索し既知の蛋白との異同、ドメインの有無を調べた。

### 【結果】

下垂体で2回以上発現し、下垂体と神経系に限局しているものを表1に示した。神経系での発現を含めたことにより\*のGS2つが前回と比較し増加した。他の組織でも少し発現している表1の下2つも解析対象とした。以前の報告<sup>3,4)</sup>に比べ、この3年間で他の組織が2倍に増加したのでpi 記号のついた解析対象のGS配列は前回の18種類より11種類に減少した。またcDNA解析プロジェクトなどでデータベースの情報が増加したので、一部は

KIAAやFLで示される、機能や局在の未解明のcDNAの塩基配列と一致した。

pi 記号のついた11種類の解析のまとめを表2に示した。11種類のうち7種類のcDNAを単離し、データベースで塩基配列が明かな2種類も含めて7種類についてNorthern解析を行うと3回以上発現している2種類について下垂体特異性が確認された。

pi-bは1kb前後の2つのsplice variantのcDNAあり、129と92アミノ酸の蛋白がコードされ、このうち40アミノ酸が細菌のproteaseと40%一致した。Northernでは下垂体特異的な発現が認められた(図.a)。酵素は自己抗原となることも多く、自己免疫性下垂体炎の診断のマーカーになる可能性がある。

pi-cは1.8kbのcDNAに243アミノ酸の蛋白がコードされている。データベースでは4.4kbで3'末端が異なるIGSF1/IGDC1がX染色体のゲノム解析より報告されていた(5,6)。特徴は免疫グロビン様ドメインを持つことで、pi-cには2つ、IGSF1/IGDC1には12個認められた。更にシグナルペプチドがあり、pi-cは分泌蛋白と想定された。Northern解析ではpi-cは3'プローブでは下垂体特異的な発現が認められたが(図.b)、5'プローブでは4.5kbのbandも得られ、IGSF1/IGDC1としてもサブライズされているようである(図.c)。IGSF1/IGDC1は膜貫通部位があり、細胞の局在に関わる可能性がある。

pi-gは2.9kbのcDNAに632アミノ酸の蛋白がコードされており、KIAA0512と一致した。構造としては約400アミノ酸が赤血球の $\alpha$ スペクトリンのSH3領域に結合する蛋白と60%類似した。Northern解析では心臓にやや強く、他の組織でも発現が認められた(図.d)。機能としては構造蛋白として分泌に関与している可能性がある。

pi-aは全長はまだ確認していないが、現在ある3kbのcDNAには940アミノ酸の蛋白がコードされている。構造としては細胞外蛋白に多いLE domainが一つ認められた。興味深いことには線虫のESTおよびゲノムprojectより初めて明らかにされた蛋白とほぼ全長にわたり47%の相同性があり、組織形成に重要な働きをする可能性がある。BodyMapでは胃でも下垂体の半分の頻度で発現した。

pi-oはGHRHRの3'末端であることを明らかにした。

pi-sはKIAA0681と一致し、Zn fingerドメインをもつが、Northernでは非特異的な発現を示した。

pi-m、pi-q、pi-pは特徴的なドメインはなく、Northernでは非特異的な発現を示した。

### 【考察】

BodyMap法による下垂体特異的な既知の遺伝子は、5回以上高発現したものに下垂体ホルモン遺伝子7つの内5つが、2回発現したものに7B2、cAMP-dependent protein kinase - alpha subunitのホルモン分泌に関係する遺伝子が認められ、下垂体の蛋白レベルでの主要な働きがホルモンの合成・分泌であることが確認された。

GSが既知の配列でなかった11種類の内、7種類でNorthern解析を行い、下垂体特異的であったものは発現頻度が3回以上の2種類のみであった。発現頻度が2回以下のものについ

では、今回のようにcDNAをライブラリーよりクローニングする方法ではなく、GS配列を用いて発現レベルのスクリーニングをもう一段してから解析をすると、今後は新たな下垂体特異的な遺伝子をさらに効率よく単離できると思われた。

pi-bやpi-cのように下垂体特異的な発現をするものは組織特異性のある自己抗原の可能性があり、今後、自己免疫性下垂体炎症例でラジオリガンド法などにより自己抗体のスクリーニングが必要である。

pi-aは胃でも発現が認められたが、下垂体での発現頻度が高く線虫の遺伝子と類似し、重要な蛋白と思われ、今後、組織・細胞特異性、細胞内の局在や機能の解析が必要である。

### 【結論】

BodyMap法により2種類の下垂体特異的に発現する遺伝子と、1種類の下垂体での発現頻度が高く線虫の遺伝子と全長にわたり相同性の高い遺伝子を新たに同定した。

### 【文献】

1. Tatsumi K, Miyai K, Notomi T, Kaibe ., Amino N, Mizuno Y, Kohno H: Cretinism with combined hormone deficiency caused by a mutation in the PIT1 gene. *Nat Genet* 1: 56-58, 1992.
2. Okubo K, Hori , Matoba R, Niiyama T, Fukushima A, Kojima, Matsubara K: Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. *Nat Genet* 2: 173-179, 1992.
3. 巽 圭太、網野 信行、大久保 公策、松原 謙一. 下垂体特異的遺伝子の単離. 厚生省特定疾患 間脳下垂体機能障害研究班 平成8年度総括研究事業報告書, pp. 109-113, 1997,
4. 巽 圭太、網野 信行、大久保 公策、松原 謙一. 下垂体特異的遺伝子の解析. 厚生省特定疾患 間脳下垂体機能障害研究班 平成9年度総括研究事業報告書, pp. 115-118, 1998.
5. Mazzarella, R., Pengue, G., Jones, J., Jones, C., and Schlessinger, D. (1998). Cloning and expression of an immunoglobulin superfamily gene (IGSF1) in Xq25. *Genomics*, 48, 157-162.
6. Frattini A, Faranda S, Redolfi E, Allavena P, Vezzoni P: Identification and genomic organization of a gene coding for a new member of the cell adhesion molecule family mapping to Xq25. *Gene*, 214: 1-6, 1998.

表1. BodyMap法で下垂体特異的に発現する遺伝子

GS	下垂体	神経系	その他	蛋白質
9703	49	3	0	prolactin
9496	17	0	0	growth hormone
9512	6	0	0	glycoprotein hormones, common alpha
9535	6	0	0	LH beta
9544	6	0	0	(pi-b)
9504	5	0	0	FSH beta
9589	3	0	0	(pi-c)
9628	2	0	0	(pi-o)
9606	2	0	0	cAMP-dependent protein kinase - alpha subunit
5547*	2	7	0	7B2 (secretory granule, neuroendocrine protein 1)
9657	2	0	0	(pi-s) KIAA0681
9573	2	1	0	(pi-g) KIAA0512
7300*	2	6	0	KIAA0343
9714	2	0	0	(pi-p) KIAA1024/ clone 23597
9651	2	0	0	(pi-d)
9536	2	0	0	(pi-e)
9548	2	0	0	(pi-m) FL320392
9726	2	0	0	(pi-q) FLJ22030
-----				
7702*	11	4	1	secretogranin I (chromogranin B)
9510	4	0	4	(pi-a) AK026832

表2. BodyMap法からの遺伝子解析のまとめ

GS	下垂体	他	データベース	構造/類似蛋白	cDNA	Northern
pi-b/9544	6	0	(AW583046)	細菌の蛋白分解酵素	全長	下垂体特異的
pi-a/9510	4	4(胃*2)	AK026832	LEドメイン	部分	
pi-c/9589	3	0	(IGSF1/IGDC1)	Ig様ドメイン	全長	下垂体特異的
pi-g/9573	2	1(神経系)	KIAA0512	SH3結合蛋白	全長	非特異的
pi-m/9548	2	0	FL320392	-	全長	非特異的
pi-q/9726	2	0	FLJ22030	-	部分	非特異的
pi-s/9657	2	0	KIAA0681	Zn finger	未	非特異的
pi-p/9714	2	0	KIAA1024	-	未	非特異的
pi-o/9628	2	0	(GHRHR)		部分	
pi-d/9651	2	0			未	
pi-e/9536	2	0			未	

データベース欄で()を付けてあるのは本研究でのcDNAクローニングの結果、蛋白コード領域に相同性が認められたもの。

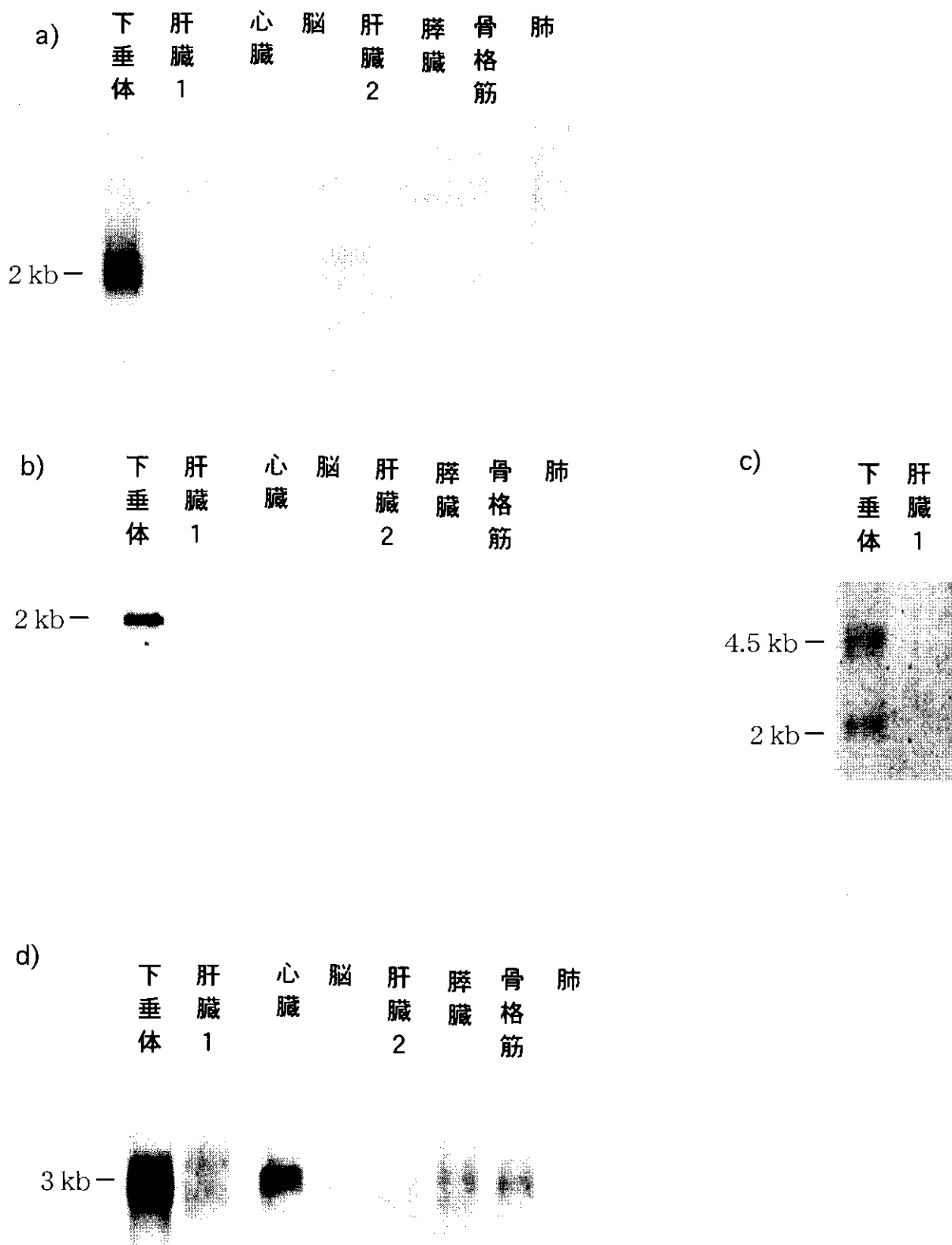


図. 下垂体で発現している遺伝子のNorthernによる組織特異性の検討。  
a) pi-b、b) pi-c,3' probe、c) pi-c,5' probe、d) pi-gをプローブに用いた。

## 下垂体腺腫におけるGATA-2の分子病理学的検討

分担研究者 長村義之 (東海大学病態診断系病理学部門)  
研究協力者 寺本 明 (日本医科大学脳神経外科)  
山王なほ子 ( 同 )  
梅岡克哉 ( 同 )  
黒谷玲子 (東海大学病態診断系病理学部門)

### 【背景】

近年、ひと下垂体腺腫の機能発現におけるさまざまな転写制御因子の存在、および、機能が明らかにされてきており、POMC、LH/FSH、GH/PRL/TSHの3つの細胞系譜に分化することがわかっている1),2)。これらはそれぞれ独自の転写因子とその協調因子により機能分化が規定されると考えられており、我々の研究室においてもこれまでに免疫組織化学、RT-PCR法、in situ hybridization法などを用いて、Pit-1、Ptx-1、NeuroD1などの転写活性因子について検討し成果をあげてきた3),4)。一方、GATA-2は2つのZnフィンガーを持つ転写因子で、血液幹細胞の維持、増殖に関与するとされていたが5)、近年、マウスThyrotropin  $\beta$  subunitの分化に関与している6)、ラットにおいて胎生期に発現しPit-1との協調作用によりGonadotropin産生細胞の分化を決定している7)ことが報告され下垂体細胞の分化における役割が注目されるようになった。しかし、これまでの研究は、ラットなどの哺乳動物に関するものが多く、ヒト下垂体、特に内分泌学的に特異的な状態にある下垂体腺腫に関する報告はされておらず、脳下垂体腺腫における腫瘍発生、分化を解明するうえで極めて重要と思われる。今回、ヒト下垂体腺腫におけるGATA-2およびPit-1の発現を、免疫組織学的手法、およびRT-PCR法を用いて検討した。

### 【対象と方法】

手術摘出された下垂体腺腫38例(GH産生腺腫10例、PRL産生腺腫6例、ACTH産生腺腫4例、TSH産生腺腫5例、FSH産生腺腫8例、非機能性腺腫5例)および剖検にて摘出された正常下垂体組織2例を対象症例とした。これら40症例に対し免疫組織学的手法にてGATA-2およびPit-1蛋白の発現を検討し、さらにRT-PCR法を用いてmRNAの発現を検討した。

免疫組織学的手法では、摘出された組織を10%ホルマリンにて8-24時間固定し、パラフィン抱埋したものを用いた。前処置としてGATA-2に対しては、オートクレーブにて120度10分間の抗原賦活化を行ない、Pit-1ではマイクロウェーブにて100℃10分間の抗原賦活化を行った。一次抗体はGATA-2(SANTA CRUZ C-20 1:100)、Pit-1(SANTA

CRUZ X-7 1:100)を用い、ABC法にて、DAB発色をした。RT-PCR法では手術摘出された組織から採取されたcDNAをもとに、既知のプライマーを用いて行った。

### 【結果】

免疫組織学的手法においてGATA-2蛋白の発現はGH産生腺腫1/10例、PRL産生腺腫1/6例、ACTH産生腺腫0/4例、TSH産生腺腫4/5例、FSH産生腺腫8/8例、非機能性腺腫1/5例にみられ、Pit-1蛋白の発現はGH産生腺腫10/10例、PRL産生腺腫6/6例、ACTH産生腺腫0/4例、TSH産生腺腫4/5例、FSH産生腺腫0/8例、非機能性腺腫1/5例にみられ。また、RT-PCR法にてGATA-2 mRNAの発現はGH産生腺腫3/10例、PRL産生腺腫1/6例、ACTH産生腺腫0/4例、TSH産生腺腫4/5例、FSH産生腺腫8/8例、非機能性腺腫2/5例にみられ、Pit-1 mRNAは、GH産生腺腫10/10例、PRL産生腺腫5/6例、ACTH産生腺腫0/4例、TSH産生腺腫4/5例、FSH産生腺腫1/8例、非機能性腺腫1/5例にみられた。免疫組織学的手法、RT-PCR法ともに、GATA-2の発現はFSH産生腺腫、TSH産生腺腫の大多数にみられたが、他の腺腫での発現はほとんどなく、Pit-1はGH産生腺腫、PRL産生腺腫、TSH産生腺腫では大多数で発現がみられたが、他の腺腫ではほとんど発現がみられなかった。

### 【考察】

Jeremyらの報告によると、GATA-2は、胎生10週ころに下垂体腹側より発現し、下垂体前葉細胞のgonadotrophおよびthyrotrophへの分化に関与するとされる。一方、中間部から発生したPit1はGH、PRL、の分化を誘導するが、gonadotrophに対しては阻害因子として働く。つまり、ラット下垂体前葉細胞はGATA-2が働いた場合にはgonadotrophに、Pit-1が働いた場合にはsomatotroph、lactotrophに分化するとされている。一方、Pit-1にはGATA-2がDNAと結合するのを阻害する作用があるために、Pit-1が過剰な状態ではGATA-2はDNAと結合することなく、Pit-1とGATA-2がある割合で存在した場合に、それらの協調作用によりthyrotrophへの分化を引き起こすとされている。

これらの結果をもとにヒト下垂体腺腫におけるGATA-2の発現を検討したが、ラット下垂体前葉細胞の分化の場合と同様、Gonadotropin産生腺腫においては、GATA-2の発現はみられたもののPit-1の発現は弱く、TSH産生腺腫においてはGATA-2、Pit-1共に強い発現がみられ、GH産生腺腫、PRL産生腺腫においてはPit-1の発現はみられたもののGATA-2はほとんど発現がみられなかった。以上の結果より、ヒト下垂体腺腫の分化においてもその機能発現にGATA-2とPit-1の発現が強く関与しているものと思われる。

### 【結論】

ヒト下垂体腺腫においてGATA-2、Pit-1の発現を検討した。GATA-2の発現はFSH産生腺腫、TSH産生腺腫に、Pit-1の発現はGH産生腺腫、PRL産生腺腫、TSH産生腺腫に強く見られた。GATA-2はヒト下垂体腺腫においても、ラット下垂体前葉細胞の分化と同様に、

FSH産生腺腫における機能発現への関与が示唆された。TSH産生腺腫ではGATA-2およびPit-1の協調作用により機能発現が起こるものと思われた。

【文献】

1. Ingraham H, Chen R, Mangalam HJ, Elsholtz HP, Flynn S E, Lin C R, Simms DM, Swanson L, Rosenfeld MG: A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Nature* 347: 528-533, 1990.
2. Asa SL, Puy LA, Lew AM, Sundmark VC, Elsholtz HP: Cell type-specific expression of the pituitary transcription activator pit-1 in the human pituitary and pituitary adenomas. *J. Clin. Endocrinol Metab*, 77: 1275-1280, 1993.
3. Sanno N, Inada K, Utsunomiya H, Umemura S, Itoh Y, Matsuno A, Teramoto A, Osamura RY: Expression of pit-1 product in human pituitaries: Histochemical studies using an antibody against synthetic human pit-1 protein. *Med Sci Res*, 22: 685-687, 1994.
4. Tahara S, Kurotani R, Sanno N, Takumi I, Yoshimura S, Osamura RY, Teramoto A: Expression of pituitary homeo box 1 (Ptx1) in human non-neoplastic pituitaries and pituitary adenomas. *Mod Path*
5. Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, Alt FW, Orkin, SH: An early hematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 371: 221-226, 1994.
6. Jermy SD, Shawn MO, Sarah EF, Mathias T, Anatoli S, Daniel PS, Farideh H, Annel KA, Michael GR: Reciprocal interaction of Pit1 and GATA2 mediate signaling gradient-induced determination of pituitary cell types. *Cell*, 97: 587-598, 1999.
7. David F. Gordon., Suzanne R. Lewis., Bryan R. Haugen., R. Andrew James., Michael T. McDermott., William M. Wood. And E. Chester Ridgway : Pit-1 and GATA-2 interact and functionally cooperate to activate the thyrotropin  $\beta$ -subunit promoter. *J Biol Chem* 39: 24339-24347, 1997.



# 尿崩症の発症12年後に下垂体機能低下症をきたし、下垂体前葉のリンパ球浸潤を認めた頭蓋咽頭腫の一例

分担研究者 村上宜男（島根医科大学第一内科）  
研究協力者 栗岡聡一（同）  
加藤 讓（同）

## 【背景】

下垂体前葉のリンパ球浸潤はリンパ球性下垂体炎の病理組織診断において重要な所見である。しかし、他の疾患における下垂体前葉内のリンパ球浸潤の意義や頻度については、なお明らかではない。今回、下垂体前葉のリンパ球浸潤を証明した頭蓋咽頭腫の一例を経験したので報告する。

## 【症例】

症例：60歳、男性。主訴：全身倦怠感、頭痛。家族歴、既往歴には特記すべきことなし。12年前、特に誘因なく口渇、多飲、多尿が出現した。中枢性尿崩症の診断でデスマプレシンの投与を受け、症状は軽快した。1ヵ月前から37°Cの発熱、頭痛、吐気が出現した。血清コルチゾールの低値を認めたため精査、加療目的で入院した。入院時現症：身長155cm、体重53kg、体温35.7°C、血圧120/80mmHg。貧血、黄疸を認めず、甲状腺腫を触知せず。心肺、腹部に異常を認めず。神経学的所見に異常を認めず、視野欠損なし。

デスマプレシンの投与によって濃縮尿が得られた。トランスアミナーゼとコレステロール値は軽度高値であった。既にヒドロコチゾンを補償投与しており、血清電解質は正常であった。ホルモン基礎値は、甲状腺系、GH、副腎皮質系、性腺系のいずれも低値で、PRLの基礎値は高値であった（表1）。尿崩症発症時と今回入院時のホルモン分泌刺激試験の成績を比較して表2示す。尿崩症発症時には高張食塩水負荷後の血漿浸透圧の上昇時にADHの増加反応が認められなかった。インスリン低血糖試験においてGHが低反応を示したが、他の下垂体前葉ホルモンの反応は正常であった。今回入院時にはTRH負荷時のTSH、インスリン負荷時のGHおよびACTHならびにLHRH負荷時のLH、FSHの反応はいずれも低下していた。PRLの基礎値が高値でTRH刺激に反応したこと、およびACTHがCRH刺激に反応したことから、視床下部ないし下垂体茎の障害が関与することが示唆された。血清中の抗下垂体抗体は陰性であった。

尿崩症のみで下垂体前葉ホルモン欠落症状を認めなかった6年前のMRI像においては、トルコ鞍内にT1強調画像で高信号を呈する腫瘤像を認めた。後葉の高輝度は消失していたが、下垂体茎には明らかな異常を認めなかった。今回入院時のMRI像では、腫瘤の内部

は不均一で、上方に進展し視交叉を圧迫していた。ガドリニウム造影後の側面像では周辺が増強され、嚢腫性病変が疑われた。内部には隔壁様の構造が認められた。

#### 【病理組織所見】

経蝶形骨洞的摘出術を施行した。嚢腫性病変の内部から白黄色クリーム状の内容物を得た。均質無構造の物質で、周辺には好中球、好酸球ならびに形質細胞の集塊を認めた（図1）。腫瘍は円柱-扁平上皮型の頭蓋咽頭腫で、間質にはリンパ球の侵潤がみられた。隣接する下垂体前葉にはリンパ球の広範な侵潤が認められたが、下垂体前葉の腺構造は保たれていた（図2）。巨細胞や肉芽腫性病変を認めなかった。

#### 【考察】

トルコ鞍ならびに海綿静脈洞、眼窩、副鼻腔などの傍トルコ鞍部に慢性炎症を合併する症例が報告されている（文献1）。これらは、リンパ球性下垂体炎を主体とするもの、ラトケ嚢腫などの嚢腫性病変の破裂の結果、下垂体に巨細胞を含む肉芽腫性炎症を呈するもの（文献2）、ならびに、Tolosa-Hunt症候群を主症状とするものに大別される。今回報告した症例では、下垂体前葉にリンパ球侵潤を認めた。しかし、巨細胞や肉芽腫性炎症は観察されず、臨床的にもTolosa-Hunt症候群を認めなかった。

一方、頭蓋咽頭腫においては、腫瘍の間質に異物巨細胞や炎症細胞の侵潤が認められるほか、周辺の神経組織にも結合組織の増生や反応性のグリオーシスが高頻度に観察されることが報告されている（文献3）。Puchnerらは、下垂体前葉にリンパ球侵潤を認めた嚢腫状頭蓋咽頭腫の3症例を報告した（文献4）。いずれも中年の患者で、術前に2例では汎下垂体機能低下症が、他の1例ではゴナドトロピン分泌低下症が認められた。術後には全例が汎下垂体機能低下症を呈した。本症例の臨床像は以上の報告例と類似したものであった。

#### 【まとめ】

尿崩症の発症12年後に続発性副腎不全をきたした頭蓋咽頭腫の一例を経験した。腫瘍被膜内から得た内容物には好中球、好酸球の集塊を認めた。隣接する下垂体前葉にリンパ球の侵潤を認めたが、巨細胞や肉芽腫性病変を認めなかった。頭蓋咽頭腫の進展に加えて、下垂体前葉のリンパ球侵潤が頭痛や下垂体前葉機能低下症の発症に関与した可能性が示唆された。頭蓋咽頭腫患者の一部においては下垂体前葉のリンパ球侵潤が認められるため、リンパ球性下垂体炎の病理組織診断に際して留意すべきであると考えられる。

#### 【文献】

1. Hama S, Arita K, Kurisu K, Sumida M, Kurihara K: Parasellar chronic inflammatory disease

presenting Tolosa-Hunt syndrome, hypopituitarism and diabetes insipidus: a case report. *Endocrine J* 43: 503-510, 1996.

2. Roncaroli F, Bacci A, Frank G, Calbucci F: Granulomatous hypophysitis caused by a ruptured intrasellar Rathke's cleft cyst: report of a case and review of the literature. *Neurosurgery* 43: 146-149, 1998.
3. Kasai H, Hirano A, Llena JF, Kawamoto K: A histopathological study of craniopharyngioma with special reference to its stroma and surrounding tissue. *Brain Tumor Pathol* 14: 41-45, 1997.
4. Puchner MJA, Ludecke DK, Saeger W: The anterior pituitary lobe in patients with cystic craniopharyngiomas: three cases of associated lymphocytic hypophysitis. *Acta Neurochir (Wien)* 126: 38-43, 1994.

表1 入院時ホルモン基礎値

T3	79	ng/dL	ACTH	<5	pg/mL
fT4	0.3	ng/dL	cortisol	1	μg/dL
TSH	0.38	μU/mL	u-17-OHCS	0.5	mg/day
GH	0.3	ng/mL	u-17-KS	0.03	mg/day
u-GH	<5	pg/mL	LH	<0.1	mIU/mL
IGF-I	89	ng/mL	FSH	0.6	mIU/mL
PRL	46.7	ng/mL	testosterone	<5	ng/dL

表2 ホルモン分泌刺激試験の成績

ホルモン	負荷試験	基礎値 ⇒ 頂値		基礎値 ⇒ 頂値	
		1989年6月		2000年5月	
ADH	5%NaCl	1.0	⇒	0.7	
s-Osm		275	⇒	304	
TSH	TRH	2.74	⇒	13.46	2.74 ⇒ 5.42
GH	ITT	<0.1	⇒	6.0	0.2 ⇒ 0.2
PRL	TRH	18	⇒	33	34.4 ⇒ 61.1
ACTH	ITT	16.6	⇒	74.2	<5 ⇒ 8
CRH					8 ⇒ 50
LH	LHRH	4.8	⇒	28.2	<0.1 ⇒ 2.5
FSH	LHRH	7.6	⇒	14.7	0.4 ⇒ 2.6