

免疫組織化学の結果、対照群では脱髄病変部位に一致してIgGの強い染色が認められ、これらの部位での血液脳関門の破綻が示唆されたが、L-NAME群ではIgGの染色はごく僅かであった。さらに、7-NIあるいはaminoguanidine投与群においても、急速補正後の生存率に著明な改善がみられた (Fig. 3)。

### 【考察】

CPMの発症機序は低ナトリウム血症の急速補正により血清ナトリウムが急激に上昇した結果、血液脳関門が破綻して脳浮腫と体液性攻撃因子の脳内浸入が生じ、oligodendrogliaの傷害から脱髄に至ると想定されているが、その詳細は未だ判然としていない<sup>4,6)</sup>。低ナトリウム血症の急速補正により発症する疾患であるので最も重要なのは補正速度に注意をして過剰補正をしないことであるが、その予防のための適正な補正速度に関しては未だに統一見解はなく、また発症予防に有効な治療薬剤も見つかっていない。今回の我々の検討により、SIADHラットモデルにおいて実験的に惹起されたCPMに対し、非選択的NOS阻害剤であるL-NAMEが非常に有効であることが示された。従来より、血液脳関門の透過性調節にNOが関与し、NOS阻害剤により血液脳関門の透過性が低下するという報告がある<sup>7,8)</sup>。今回の実験でも、血液脳関門の破綻を示すと考えられるIgGの染色がL-NAME投与により著減したことから、L-NAMEのCPM発症予防作用は主として血液脳関門の破綻を阻止することによる可能性が示唆された。

さらに、選択的NOS阻害剤を用いて各種NOSサブタイプの中でどのタイプが重要であるかを検討した結果、iNOS及びnNOS阻害剤がCPMの発症予防に有効であることが示され、これらサブタイプのCPM発症機序における役割が示唆された。しかし、その作用機序の詳細は明らかでなく今後の検討を必要とすると考えられた。

### 【結論】

今回の検討により、NOS阻害剤がCPMの発症予防に有効な治療薬となりうる可能性が示唆された。しかし、一般にNOS阻害剤には血圧上昇などの副作用があることが知られているので、今後は副作用の少ない安全な薬剤を開発して、実際に臨床応用を進めて行くことが期待される。

### 【文献】

1. Lauren R, Karp BI: Myelinolysis after correction of hyponatremia *Ann Intern Med* 126: 57-62, 1997.
2. Gross P, Reimann D, Neidel J, Doke C, Prospert F, Decaux G., Verbalis JG., Schrier RW: The treatment of severe hyponatremia. *Kidney Int Suppl* 64: S6-11, 1998.
3. Cross AH, Misko TP, Lin RF, Hickey WF, Trotter JL, Tilton RG.: Aminoguanidine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, ameliorates experimental autoimmune

- encephalomyelitis in SJL mice. *J Clin Invest* 93: 2684-90, 1994.
4. Rojiani AM, Prineas JW, Cho ES: Electrolyte-induced demyelination in rats. 1. Role of the blood-brain barrier and edema. *Acta Neuropathol* 88: 287-92, 1994.
  5. Adler S, Martinez J, Williams DS, Verbalis JG: Positive association between blood brain barrier disruption and osmotically-induced demyelination. *Mult Scler* 6: 24-31, 2000.
  6. Baker EA, Tian Y, Adler S, Verbalis JG: Blood-brain barrier disruption and complement activation in the brain following rapid correction of chronic hyponatremia. *Exp Neurol* 165: 221-30, 2000.
  7. Thiel VE, Audus KL: Nitric oxide and blood-brain barrier integrity. *Antioxid Redox Signal* 3: 273-8, 2001.
  8. Jansson A, Mazel T, Andbjør B, Rosen L, Guidolin D, Zoli M, Sykova E, Agnati LF, Fuxe K: Effects of nitric oxide inhibition on the spread of biotinylated dextran and on extracellular space parameters in the neostriatum of the male rat. *Neuroscience* 91: 69-80, 1999.

# 抗利尿ホルモン(ADH)非依存性尿濃縮機構の解析の必要性

研究分担者 木村時久 (古川市立病院)

研究協力者 太田耕造 ( 同 )

松原光伸 (東北大学腎高血圧内分泌科)

## 【背景と目的】

生体の体液量の維持を目的とした腎における尿濃縮機構は、抗利尿ホルモン(ADH)分泌の研究と、そのレセプターを介した腎特異的水チャンネル(AQP2)[1]の発現調節機構が明らかとなることにより、ほぼ解明されたとも考えられる。しかし、実際の病態モデルを用いた検討から、これらの一連の機序のみでは説明のつかない状態が存在することも明らかとなりつつある。近年、腎特異的Naトランスポーター(rBSC1)が見出され[2]、我々は、種々の病態モデルを作成し、抗利尿ホルモンとrBSC1とAQP-2の発現を観察してきた[3,4,5,6]。その結果最大尿濃縮にはADHの増加がとともに、rBSC1とAQP-2の発現増加が必要であることが判明した [3,4,6]。今回はADH非依存性尿濃縮機構の解析の必要性を検討する目的で、慢性腎不全モデルラットを作成し、尿濃縮とrBSC1、AQP-2の発現との関連の複雑性について検討した。さらには、中枢性モデルラットを用いて、ADHの投与実験を行い、さらに検討を加えた。

## 【方法】

5/6腎摘後8週間のラットを慢性モデルラットとした。このラットに脱水刺激を加え、前後で血液のADH測定と腎のrBSC1とAQP-2の発現を検討した。先天性中枢性尿崩症モデルラット(BBラット)にはOsmotic Minipumpを用いて、vasopressinを3日間皮下投与し、尿所見の変化と、腎でのrBSC1とAQP-2の発現を検討した。

RNAは競合的PCR法とIn situ hybridization法、蛋白はウェスタンブロット法と免疫染色法で解析した。

## 【結果】

腎不全モデルラットでは脱水刺激により尿浸透圧は413+46から1126+168mOsm/kgH<sub>2</sub>Oに濃縮された。中枢性尿崩症モデルラットでもvasopressin投与後、ほぼ同レベルの尿濃縮が得られた。

RNA解析では、腎不全ラットではrBSC1、AQP-2ともに基礎発現が偽手術ラットと比較して低下していた。脱水刺激により、偽手術ラットではこれらの膜蛋白の発現増加が確認されたが、腎不全のラットではrBSC1、AQP-2ともに発現の変化が認められなかった。蛋白解析でも同様な結果が得られた。しかし、腎不全ラットにおいて著しい血液中のADH

の上昇が認められた。

中枢性尿崩症のラットではvasopressin刺激により、rBSC1の著しい増加が認められた。

#### 【考察】

今回の研究ではADH不応性の尿濃縮障害である腎不全ラットと、中枢性ラットにおいて、ほぼ同じ尿濃縮における腎尿細管膜蛋白の発現を検討した。

尿崩症のモデルラットにおいてはすでに vasopressin 投与が AQP2 の発現を増加させることが報告されている[7,8]。今回、rBSC1 の発現増加も確認されたが、正常ラットの脱水刺激に認められたような尿の最大濃縮[3,5]は得られなかった。

一方、腎不全ラットでは、rBSC1 と AQP2 とともに発現障害が認められ、やはり、脱水時に著しい血中 ADH の上昇にもかかわらず、尿の最大濃縮は認められなかった。しかし、尿は軽度ながらも、BB ラットの vasopressin 投与レベルまでは濃縮された。

以上より、ADH のみでは尿の最大濃縮を誘発することができず、また、逆に、ADH 反応性の膜蛋白の発現の障害にもかかわらず、尿がある程度は濃縮されることも明らかとなった。

従って、体液量の調節に必要な尿濃縮の機構はいくつかの独立した機序があると考えられ、全体像を把握するには、まず、腎自体に内在する ADH 刺激とは無関係な機序を検討する必要があると考えられた。

#### 【結論】

尿の濃縮機構には ADH 分泌とそれに反応する腎尿細管膜蛋白の発現調節のみでは説明のつかない機序も存在することが明らかとなった。特に、腎に内在する ADH 非依存性の機序の解明が必要と考えられた。

#### 【文献】

1. Fushimi K, Uchida S, Hara Y, Hirata Y, Marumo F, Sasaki S: Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* 361: 549-552, 1993.
2. Gamba G, Miyanosita A, Lombardi M, Lytton J, Lee W-S, Hediger MA, Hebert SC: Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporters family expressed in kidney. *J Biol Chem* 269: 17713-17722, 1994.
3. Marumo R, Kaizuma S, Nogae S, Kanazawa M, Kimura T, Saito T, Ito S, and Matsubara M: Differential upregulation of rat Na-K-Cl cotransporter, rBSC1, mRNA in the thick ascending limb of Henle in different pathophysiological conditions. *Kidney Int* 54: 877-888, 1998.
4. Nogae S, Michimata M, Kanazawa M, Honda S, Ohta M, Imai Y, Ito S, and Matsubara M: Small to moderate cardiac infarcts increase sodium transporter transcripts (rBSC1) in the thick

- ascending limb of Henle but not those of water channel (AQP2) in the collecting ducts. *Kidney Int* 57:2055-2063, 2000.
5. Michmata M, Nogae S, Ohta M, Kaizuma S, Imai Y, Ito S, and Matsubara M: Topographic distribution of aquaporin 2 mRNA in the kidney of dehydrated rats. *Exp Nephrol* 8: 28-36, 2000.
  6. Michimata M, Wang W, Fujita S, Mizutani H, Fujimori K, Satomi S, Ohta M, Ito S, Kimura T, Araki T, Imai Y, and Matsubara M: Limited urinary concentration and defective upregulation of transcripts for kidney specific sodium cotransporter (rBSC1) and apical water channel (AQP2) during dehydration in rats with syngeneic kidney isograft. *Kidney Int* 60: 672-679, 2001.
  7. Hayashi M, Sasaki S, Tsuganezawa H, et al.: Expression and distribution of aquaporin of collecting duct are regulated by vasopressin V2 receptor in rat kidney. *J Clin Invest* 94: 1778-1783, 1994.
  8. Yamaoto T, Sasaki S, Fushimi K et al.: Vasopressin increases AQP-CD water channel in apical membrane of collecting duct in Brattleboro rats. *Am J Physiol* 269: C655-664, 1995.

Fig. 1 低 Na 血症急速補正後の神経症状に与える L-NAME の影響

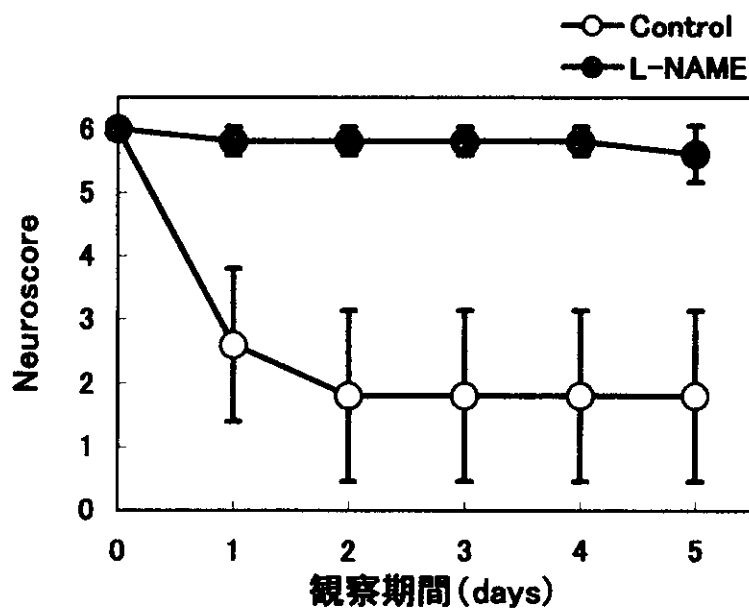


Fig. 2 低 Na 血症急速補正後の生存率に与える L-NAME の影響

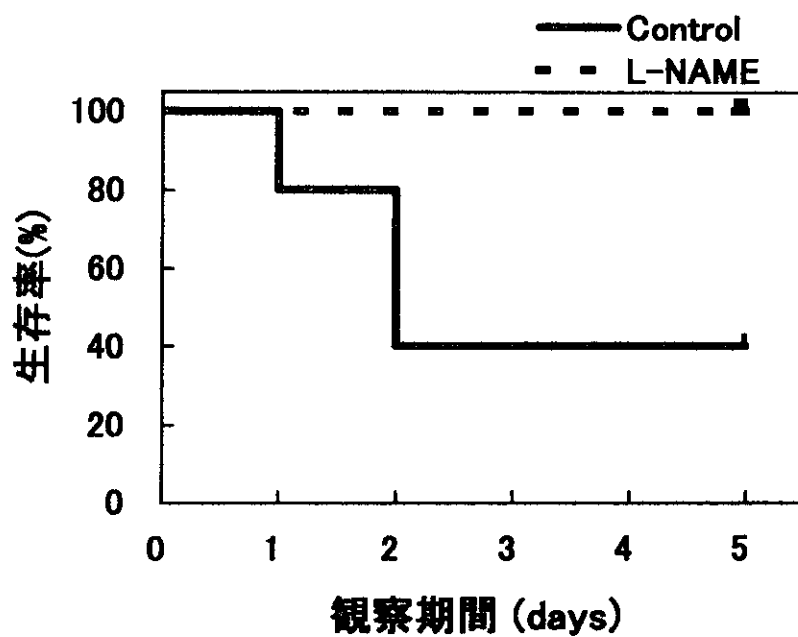


Fig. 3 低 Na 血症急速補正後の 24 時間生存率に与える選択的 NOS 阻害剤の影響

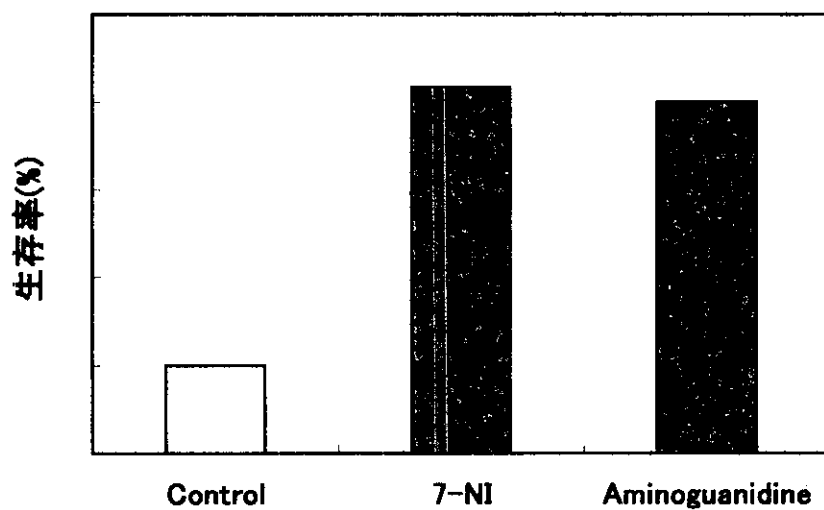


表 1. Neurological Score

6	no impairment
5	hyperexcited state
4	some motor changes
3	obvious motor disabilities
2	seizing and periods of listlessness
1	complete inability to move

表 2. 急速補正前後の血清 Na (mEq/L)

	補正前	補正24時間後
対照群	107 ± 4	132 ± 6
L-NAME投与群	106 ± 3	130 ± 3

## 中枢性尿崩症ラットに対するバゾプレシン遺伝子導入の検討

分担研究者	齊藤寿一（社会保険中央総合病院）
研究協力者	井手野順一（自治医科大学内分泌代謝科）
	川上昭雄（同）
	六角久美子（同）
	本多一文（同）
	水上浩明（自治医科大学分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部）
	小澤敬也（同）

### 【背景】

日本における中枢性尿崩症の治療としては、現在主としてDDAVPの点鼻療法が施行されている<sup>1)</sup>。しかし、点鼻療法には鼻粘膜の炎症による薬剤吸収の低下や周囲の人々の理解が得られにくい等の問題が指摘されている。さらに外部からの薬剤投与による補充では、生体のホルモン需要の変化に対応が困難で相対的なホルモンの過剰・不足状態が引き起こされる危惧がある。このためより確実に安全なホルモン補充療法の開発が必要とされている。

近年動物個体に対して遺伝子を導入することが可能となっているが、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターは、1)非病原性ウイルス由来で安全性が高い、2)神経を始めとする幅広い組織に遺伝子導入が可能である、3)導入遺伝子の発現が長期間持続する、等の利点があり遺伝子治療を行う上で有用なベクターと考えられている<sup>2)</sup>。

今回、ラット正常バゾプレシン(AVP)遺伝子を発現するAAVベクターを作製し、in vitro及びin vivoにおける遺伝子導入の効果についてAVP分泌を指標として検討した。

### 【方法】

1. Wild type ラットAVP cDNA3)の5'側にCMVプロモーター、3'側にポリ(A)を付加した治療遺伝子を作製した。この治療遺伝子をAAVに組み込んだベクタープラスミドを構築し、ベクタープラスミドを AAVプラスミド、ヘルパープラスミドとともにリン酸カルシウム共沈法にて 293細胞にトランスフェクションし、60時間後にベクターを回収した。ついで塩化セシウム超遠心密度勾配にて精製を行い、透析・濃縮後に dot blot法にてベクター(AAV-AVP)を定量した。

2. In vitroにおける導入遺伝子の発現を検討するため、293細胞にベクターを感染させ 48時間後に培養上清を回収し、上清中の AVPをRIAにて測定した。コントロールとしてβ-galactosidaseを発現するベクター(AAV-LacZ)を用いた。



3. ラット定位脳手術装置を用いて、先天的にAVPを欠損した中枢性尿崩症(Brattleboro)ラットの両側視床下部視索上核近傍に、計  $6 \times 10^{10}$  viral particleのベクターを投与し、遺伝子導入の効果を検討した。

4. AVPの分泌動態の検討のため、2M高張食塩水を1mL/100gBW、または滅菌蒸留水4mL/100gBWを腹腔内に投与し、投与後の変化について検討した。

### 【結果】

293細胞にベクターを感染させた後の培養上清中のAVPは、AAV-AVP群においてAAV-LacZ群に比し有意に高値を示した。またAAV-AVP群におけるAVP産生量は、投与したベクター量に依存して高値を示した。

自由飲水下において、AAV-AVPを視床下部に投与したBrattleboroラットの尿量は有意に減少し尿浸透圧の上昇がみられた。この効果は、ベクター投与後28週を経過しても持続した。さらにAAV-AVP投与ラットについて脳を摘出しAVP免疫組織染色を行ったところ、視索上核にAVP免疫染色陽性のニューロンがみられた。

AAV-AVPを投与したBrattleboroラットとAVPを欠損していないwild typeのLong-Evans(LE)ラットに高張食塩水を腹腔内投与したところ、血漿浸透圧の上昇がみられ、同時に血中AVPも増加した(Brattleboro ラット:  $33.9 \pm 33.5$ pg/mL, LEラット:  $124 \pm 42.8$ pg/mL)。滅菌蒸留水を腹腔内に投与すると、尿量の変化はベクターを投与したBrattleboroラットとLEラットとの間で有意な差はみられなかった。また尿浸透圧はベクター投与ラット・LEラット共に、水負荷の4時間後に最低値を示した。

### 【考察】

今までにAVP mRNAやアデノウイルスに正常AVP遺伝子を組み込んだベクターをBrattleboroラットの視床下部に投与し、尿崩症を改善させた報告がある<sup>4,9)</sup>が、尿崩症の改善効果は不十分で効果持続も短いものであった。外来性にAVP遺伝子を導入しAVPを産生させるとともに導入遺伝子により産生されるAVPの分泌動態を検討するためには、長期間にわたり遺伝子を発現させることが必要である。この問題を解決するために、我々はAAVベクターを用いた遺伝子導入について検討した。

今回作製したAAV-AVPベクターのAVP産生能は、培養細胞やBrattleboroラット視床下部にベクターを投与した実験結果により確認された。また生体内において尿崩症の改善効果がベクター投与後28週経過した現在も持続していることから、効果発現も長期にわたることが示された。

AVP分泌刺激が加わると、視床下部においてAVP mRNAが増加しAVPが産生される<sup>9)</sup>。同時に下垂体後葉に貯蔵されたAVPが血中に分泌される。ベクターにより導入された遺伝子から産生されたAVPが浸透圧刺激により分泌されるかどうか確認するため、高張食塩水投与を行った。高張食塩水投与後には、AAV-AVP群においても血中AVPが増加したことが

ら、外来性に導入された遺伝子から産生されたAVPが浸透圧刺激に反応して分泌されることが示された。一方、急性水負荷を行うと尿浸透圧が低下し水利尿がみられたことから、AVP分泌は水負荷により抑制されていると推察された。このことはホルモンの産生と分泌は必ずしも関連しないことを示しており、今後遺伝子治療を検討する上で重要な所見と考えられた。

#### 【結論】

AAVベクターを用いることにより、ラット正常AVP遺伝子を培養細胞やBrattleboro ラットの視床下部に導入し、AVPを発現、分泌させることが可能であった。さらに高張食塩水による浸透圧刺激により血中AVPが上昇し、また水負荷により低張尿が排出され水利尿がみられたことから、外来性に導入した遺伝子により産生されるAVPの分泌もフィードバック機構により調節されていると考えられた。

#### 【文献】

1. 大磯ユタカ：尿崩症、内科学第6版、杉本恒明、小俣政男 総編集、朝倉書店、東京、1389-1392, 1995.
2. Bueler H: Adeno-Associated Viral Vectors for Gene Transfer and Gene Therapy. *Biol Chem*, 380: 613-622, 1999.
3. Rehbein M, Hillers M, Mohr E, et al: The Neurohypophyseal Hormones Vasopressin and Oxytocin. *Biol Chem*, 367: pp695-704, 1986.
4. Maciejewski-Lenoir D, Jirikowski GF, Sanna PP, et al: Reduction of exogenous vasopressin RNA poly(A) tail length increase its effectiveness in transiently correcting diabetes insipidus in the Brattleboro rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: pp1435-1439, 1993.
5. Geddes BJ, Harding TC, Lightman, et al: Long-term gene therapy in the CNS: Reversal of hypothalamic diabetes insipidus in the Brattleboro rat by using an adenovirus expressing arginine vasopressin. *Nature Medicine*, 3: 1402-1404, 1997.
6. Zingg HH, Lefebvre D, Almazan G : Regulation of Vasopressin Gene Expression in Rat Hypothalamic Neurons. *J Biol Chem*, 261: pp12956-12959, 1986.

## DDAVP錠剤導入に向けた検討（第二報）

分担研究者 大磯ユタカ（名古屋大学大学院医学研究科分子細胞内科学）  
研究協力者 有馬 寛（名古屋大学大学院医学研究科分子細胞内科学）  
村瀬孝司（同環境医学研究所発生・遺伝分野）

### 【背景】

中枢性尿崩症の第一選択治療薬デスモプレシンは世界中で広く使用されている。わが国では1978年に点鼻チューブを用いた第一世代の剤型が認可され、1999年には第二世代のスプレー製剤が発売された。一方でデスモプレシンは経口投与でも抗利尿効果が点鼻剤と同等に発揮されることが確認され<sup>1,3)</sup>、アジアや欧米等世界40カ国では使用が簡便である第三世代のデスモプレシン錠剤が第一選択となっている。わが国においてもデスモプレシン錠剤を中枢性尿崩症治療薬として導入する目的で、我々は昨年度の班会議において正常人におけるデスモプレシン錠剤の抗利尿効果を報告した。

### 【目的および方法】

今回はデスモプレシン錠剤の安全性および特異性を検討する目的で正常人においてデスモプレシン錠剤(100 mg)内服前後に血中下垂体前葉ホルモン (ACTH, TSH, PRL, GH, LH, FSH)を測定し、デスモプレシン錠剤の内服が各種ホルモンに与える影響を検討した。また、中枢性尿崩症患者会の協力を得て行ったデスモプレシン治療に関する患者アンケート調査を施行した。

### 【結果】

昨年度の班会議で報告したようにデスモプレシン錠剤は水負荷後の正常人において抗利尿効果を示し、最終採尿を行った服用後3時間の時点でも尿量は有意に低下し、尿浸透圧はデスモプレシン錠剤服用30分後から上昇し、3時間後には平均約530 mOsm/kgとなった。デスモプレシン錠剤内服前、および内服1時間、2時間後の下垂体前葉ホルモンを測定したところ、ACTH, GH, TSH, PRL, LH, FSHのいずれも有意な変動を示さなかった（図1）。以上よりデスモプレシン錠剤が前葉ホルモンに影響を与えずに特異的に抗利尿効果を示すことが確認された。

中枢性尿崩症患者アンケートは中枢性尿崩症患者25人を対象に行った。年齢は1-61歳、性別は男性12人、女性 13人であった。デスモプレシン錠剤を使用したいと答えた患者は23人、点鼻またはスプレーと併用したいと答えた患者が2人、デスモプレシン錠剤を使用したくないと答えた患者はみられなかった。

従来のデスモプレシンの問題点としては以下の事項が指摘された（重複回答あり）。

- 1) 冷蔵保存の必要性 (9人)
- 2) 他人の視線が気になる (8人)
- 3) 鼻炎時に無効 (6人)
- 4) 持続効果時間が一定しない等の効果不安定 (13人)

以下に患者アンケートから抜粋した意見を示す。

「大切な薬なので身の回りに置いておきたいが、冷蔵保存のため困難です。阪神の震災やテロの映像をみるたびに怪我よりも脱水で死ぬのだろうなと感じています。」

「アレルギー性鼻炎のせいでいつも効果が不安定で本当に困っています。デスマプレシンを効かすために事前に鼻の状態が整うようにアレルギー性鼻炎の点鼻をしなければならないことも多く大変です。」

「チューブの片方を鼻に入れてもう片方を口にくわえて吹くため、他人には見せられない姿だと思います。以前に電車で行った時に女子高生に[あの人変な薬、鼻に入れている。ドラッグちがう?]と言われ、非常に恥ずかしく、腹がたちました。」

「レストランで食事中、点鼻薬を使用すると同席の友人に麻薬を吸っているみたいで恥ずかしく目立つからやめてと言われたことがあります。」

「小学生時代に点鼻チューブの投薬をクラスメイトの前で行い、その後何年もいじめられました。今でも思い出だけで恐くなります。」

このように患者アンケートから点鼻薬の効果が安定しないこと、および点鼻剤がゆえの精神的ストレスが示され、錠剤への期待が強いことが明らかになった。

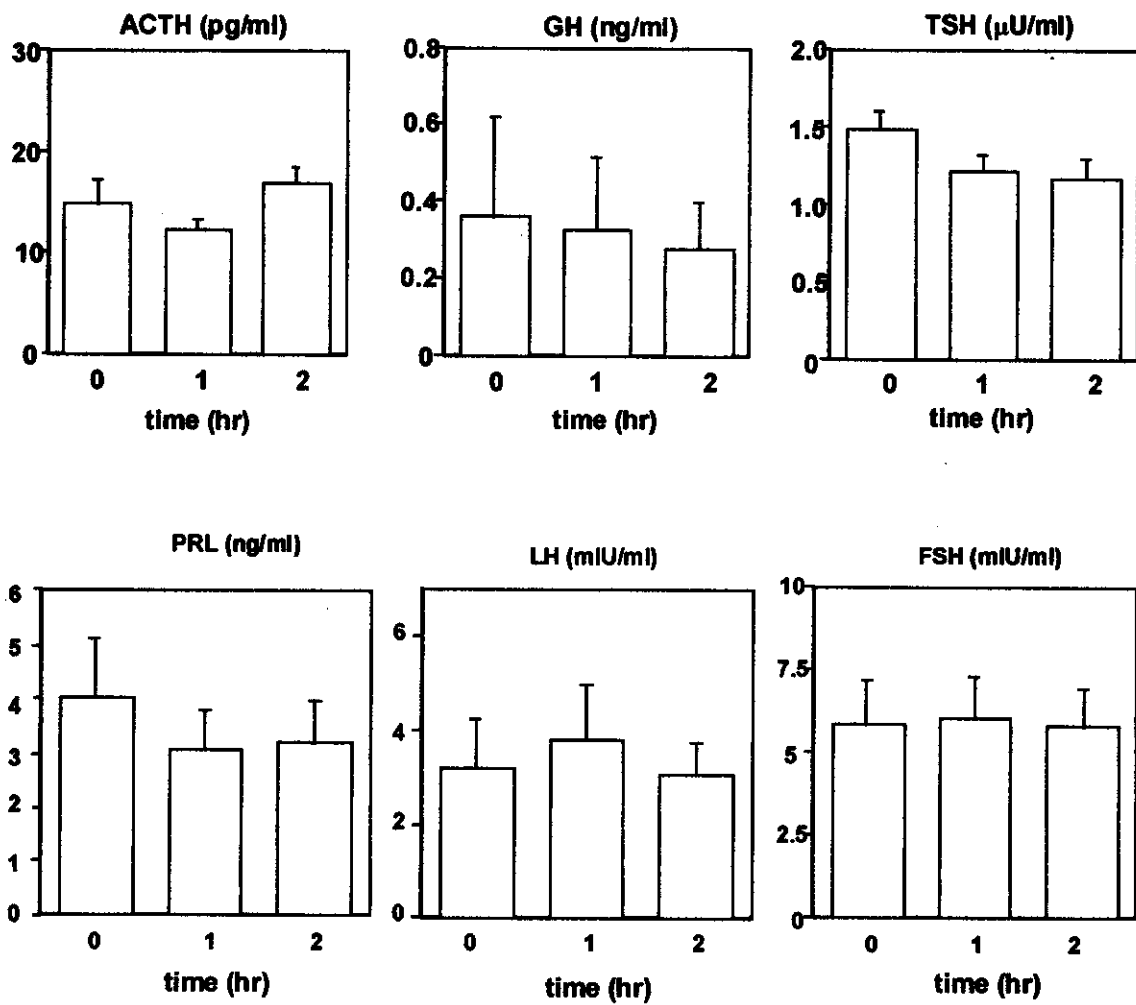
#### 【結論】

デスマプレシン錠剤は正常人において下垂体前葉ホルモンに影響を与えずに抗利尿効果を示し、安全性および有効性が確認された。中枢性尿崩症患者から治療のQOL改善を強く求められている点を合わせ考えると、本学会議が中心となってデスマプレシン錠剤のわが国への早期導入を実現し、世界各国の治療水準に達する必要がある。

#### 【文献】

1. Williams TDM, Dunger DB, Lyon RJ et al: Antidiuretic effect and pharmacokinetics of oral 1-desamino-8-D-arginine vasopressin. 1. Studies in adults and children. J Clin Endocrinol Metab 63: 129-132, 1986.
2. Vilhardt H, Bie P: Antidiuretic effect of perorally administered DDAVP in hydrated humans. Acta Endocrinol 105: 474-476, 1984.
3. Hammer M, Vilhardt H: Peroral treatment of diabetes insipidus with polypeptide hormone analog, desmopressin. J Pharmacol Exper Therap 234: 754-760, 1985.

図 1. デスマプレシン錠剤内服が下垂体前葉ホルモンに与える影響



## 2. プロラクチン分泌異常症

## 「プロラクチン分泌異常症」座長のまとめ

寺本 明（日本医科大学脳神経外科）

「プロラクチン分泌異常症」に関しては、平成11年度、12年度に引き続き、本年度も継続的研究が2件、新規の研究が2件報告された。

まず千原ら（神戸大学内科）は継続的研究として、ヒト下垂体腺腫における新規転写因子mPOUの発現に関する病理組織学的検討を報告した。彼等はこれまでの研究において酵母のOne-Hybrid systemを用いてPRL遺伝子プロモーターのPit-1結合部位に結合するタンパクをスクリーニングし、mPOUタンパクを同定した。さらに、mPOUはPRLおよびGH遺伝子発現を活性化することを明らかにしてきた。

今回の研究では、下垂体腫瘍におけるmPOUタンパクの発現に関して免疫組織化学的に検索した。手術で摘出した下垂体腺腫17例（PRL産生5例、GH産生4例、TSH産生1例、非機能性7例）を対象とし、ABC法にて腺腫細胞におけるmPOUタンパクの局在を調べた。その結果、mPOUタンパクは腺腫細胞の核に局在が求められ、PRL産生腺腫とGH産生腺腫の全例で陽性であった。一方、FSH産生腺腫と非機能性腺腫では全例陰性であった。以上より、GH及びPRL遺伝子の発現を決定する因子として、Pit-1以外にmPOUも関与する可能性を指摘している。

第二に、やはり継続的研究の1つとして、宮崎ら（島根医科大学産婦人科）は、PRL及びGH遺伝子発現におけるcAMP-MAPキナーゼ系の意義を報告した。PRLの合成や分泌をコントロールする物質は様々であるが、TRHやPACAPも、下垂体のPRL産生細胞に作用してその合成分泌を促進することが知られている。彼等はこれまでに、ラットの下垂体腫瘍細胞由来のGH3細胞をモデルとして用い、TRHによるPRL及びGHの合成や分泌に至るまでの細胞内情報伝達系において、特にMAPキナーゼの関与について報告してきた。即ち、TRHは、膜表面に存在するレセプターで刺激を受けるとprotein kinase Cを介し、MEKK、MAPキナーゼのキナーゼであるMEKと、続いてMAPキナーゼを活性化させ、PRLの合成を増加させると共にGHの合成を減少させる。一方、TRHによりCa系経路であるCaM-キナーゼⅡや、ミオシン軽鎖キナーゼを介し、PRLやGHの分泌が促進される。一方、PACAP27はadenylate cyclaseを介し、細胞内cAMPレベルを上昇させ、PKAを活性化させることとPRLの遺伝子発現を増加させ分泌を促進させるとされている。今回彼等は、GH3細胞を用い、cAMPによるPRLやGHの合成におけるMAPキナーゼの関与について検討を行った。cAMPアナログCPT-cAMPで細胞を刺激するとMAPキナーゼ活性は有意に増加し、これはcAMPキナーゼ（PKA）阻害剤H89およびMAPキナーゼ阻害剤PD98059（PD）で抑制された。またcAMP刺激でPRL mRNAは増加し、GH mRNAは減少した。PKAを細胞に過剰発現させるとMAPキナーゼ活性は増加し、cAMP刺激時と同様のmRNA発現の変化が

生じた。細胞内cAMPを上昇させるPACAP27によってもCPT-cAMPと同様にMAPキナーゼを活性化させた。cAMP及びPACAP27によるPRLプロモーターの活性の増加はH89及びPDによる完全に抑制された。以上よりcAMPはMAPキナーゼ活性化反応を介してPRL及びGHの合成を制御している可能性を報告した。

一方、島津ら（国立京都病院臨床検査部）は、下垂体腫瘍における高PRL血症の成因に関する考察—不顕性ACTH細胞腺腫の症例から—を報告した。一般に、下垂体腫瘍における高PRL血症の機序としては、1)腺腫自体によるPRL産生、2)腫瘍による下垂体茎の圧迫によりPIFを遮断、3)視床下部障害によるPIF産生分泌障害、4)下垂体腺腫のparacrine effectによる非腫瘍性PRL産生、等が挙げられる。

今回、彼等は上記の機序を考察する上で興味深い一例を報告した。即ち、37歳時、乳汁分泌と高PRL血症（150-200ng/ml）、鞍上部進展する下垂体腫瘍を指摘された。プロモクリプチンによりPRL値は抑制されたが、明らかな腫瘍縮小はみられず、38歳時ハーディ手術をうけた。鞍上部進展は解除されたが、PRL高値のためプロモクリプチンが再開された。腫瘍が徐々に増大するためラジオサージェリーを受けた。病理組織所見ではACTH陽性、PRL陰性であり、腫瘍周囲の正常下垂体にPRL産生亢進がみられた。

即ち、本症例では1)は免疫染色から否定。2)と3)は手術による減圧のため積極的な理由とはならず、4)の機序が最も疑われる。Cushing病腺腫の海綿静脈洞サンプリングにおいてもACTHの高値側でPRLが高値を示すことはしばしば観察されている。勿論、腫瘍の免疫染色ではPRL陰性であり、ACTHのparacrine effectでPRLの分泌が誘導される可能性を支持する事実である。

最後に、橋本ら（高知医科大学第二内科）は、高PRL血症患者及び産褥婦人における免疫能の検討を報告した。

EstrogenやPRLは免疫機能に影響を与え、自己免疫疾患の発症や病勢に影響を与えることが知られている。そこで彼等はPRLのみが高値を示す高プロラクチン血症患者（PRL群、n=8）と、estradiol (E2)とPRLの両方が高値を示す分娩後3日目の産褥婦人（Preg群、n=20）において細胞免疫機能を測定し、対照の男性群（M群、n=9）、女性群（F群、n=14）と比較検討した。F群ではM群に比しCD4が高値を示し、CD16、NK細胞活性が低値を示した。F群、PRL群、Preg群間ではCD4、CD8、CD4/ CD8比に有意差は認められなかった。また、Preg群ではNK細胞活性がM群比し有意に低く、F群に比しては低値傾向を示した。また、Preg群とF群の比較ではPreg群がTh1が低く、Th2が高い傾向を示し、Th1/ Th2比は有意に低値を示した。PRLとTh1/ Th2比の間に有意の負の相関が、E2とTh2との間に有意の正の相関がみられた。以上より、E2とPRLが高値を示す妊娠末期から分娩直後には、Th1/ Th2比が低値を示すことから液性免疫活性の上昇があると考えられ、これにはPRL及びE2の上昇が関与していると推察している。

以上、最近3年間の研究を通じてPRLの産生及び分泌機構はかなり解明され、更に高PRL血症の病態やその与える影響についての臨床研究にも発展した。今後はこれらの研究



をさらに展開させると共に、現在広く用いられている薬物療法の長期治療成績を整理する時期に来ていると思われる。

# ヒト下垂体腺腫における新規転写因子mPOUの発現に関する病理組織学的検討

分担研究者 千原和夫（神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学、  
内分泌代謝・神経・血液腫瘍内科）  
研究協力者 井口元三（ 同上 ）  
阪上義雄（神戸大学医学部脳神経外科）  
玉木紀彦（神戸大学医学部脳神経外科）  
置村康彦（神戸大学医学部保健学科）

## 【背景】

近年、下垂体前葉細胞の発生と分化に関与する種々の転写調節因子が明らかにされつつある。これらの転写因子は単独で作用するのではなく、相互に影響しながら、下垂体の発生分化、ホルモン発現を規定していることが想定されている。私どもは、酵母を利用した one-hybrid system を用いて、PRL 遺伝子 5' 上流領域の Pit-1 結合エレメントに結合するタンパクとして、POU 蛋白の一員である mPOU をクローニングした。mPOU はクラス VI に分類される POU 蛋白であり、その発現は下垂体以外に脳神経系、骨格筋、肺、リンパ球に認められるが、その機能については未だ十分には明確でない<sup>1)9)</sup>。私どもは、mPOU がプロラクチン(PRL)、および成長ホルモン(GH)遺伝子発現を促進することを明らかにした。しかし、実際に、ヒト下垂体において mPOU 蛋白が存在するのか、存在するとすれば、どのタイプの細胞に存在するのか明らかではなかった、そこで、今回、下垂体腫瘍における mPOU 蛋白の発現について免疫組織学的手法を用いて検討した。

## 【対象】

当院において Transsphenoidal approach により摘出術を施行した下垂体腺腫 17 例を対象とした。性別（男性 9 例、女性 8 例）、年齢 20～67 才(平均 44.7 才)、腫瘍（PRL 産生腫瘍 5 例、GH 産生腫瘍 4 例、FSH 産生腫瘍 1 例、非機能性腺腫 7 例）。手術時摘出腫瘍組織を直ちに 10%ホルマリン固定し、5 $\mu$ mパラフィン切片を作成した。

mPOU 蛋白の発現を検討するため、抗 mPOU 抗体を作成した。mPOU 蛋白の 70-84 番目の 16 残基のアミノ酸(CVRKPSTPESPAKSEV)より成るペプチドを合成し、ヘモシアニンとコンジュゲートした後、家兎に免疫し、抗 mPOU 血清を得た。得られた抗体の特異性については enzyme immunoassay 法により確認した。

組織切片を脱パラフィンした後、抗原賦活の為 2N HCl で 30 分間処理した。その後、一次抗体である Rabbit 抗 mPOU 抗体(1:300)を 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させ、Avidin-biotin 法による免疫染

色 (Vectastain Elite detection system (Vector Labo.))を用いて、mPOU蛋白を3,3-diaminobenzipine tetrahydrochlorideで茶褐色に発色させ可視化した。

#### 【結果】

摘出腫瘍組織を用いて免疫染色で検討を行った結果、mPOU蛋白の発現は一部のヒト下垂体腫瘍細胞に認められた。その細胞内局在について検討したところ、核内に特に強く発現が認められた。

mPOU蛋白の発現が認められたヒト下垂体腫瘍について腫瘍細胞の種類を検討した。表1に示すごとく、PRL産生腫瘍では5例中5例(100%)、GH産生腫瘍では4例中4例(100%)と全例で腫瘍組織に免疫活性を認めた。しかし、他の腫瘍について行なった検討では、FSH産生腫瘍では1例中0例、非機能性腺腫では7例中0例と全く免疫活性を認めず、mPOU蛋白はPRL産生腫瘍とGH産生腫瘍に特異的に発現していた。

#### 【考察】

私どもは、One-Hybrid systemを用いてPRL遺伝子5'上流領域のPit-1結合エレメントに結合する転写因子としてmPOU蛋白をクローニングした。ついで、このmPOUはPRL、およびGH遺伝子発現を促進することを一過性発現系で明らかにした。私どもは、これらの成績から、実際に vivo でも、mPOUがPRL、GH遺伝子発現に促進的に関与する可能性を想定している。

今回のヒト下垂体腫瘍においてmPOU蛋白がPRL産生腫瘍とGH産生腫瘍に特異的に発現していたという成績は、この可能性をさらに支持するものと考えられる。これまで、下垂体特異的転写因子であるPit-1が、GH、PRL遺伝子の組織特異的発現を規定するものと考えられてきたが、mPOUの関与にも考慮する必要がある。

一方、今回の成績は、mPOUの発現もまたPit-1によって規定されていると解釈することもできる。しかし、mPOUの発現は、下垂体以外には脳神経系、骨格筋、肺、リンパ球にも認められており<sup>4) 5)</sup>、Pit-1によってのみ、発現が規定されているわけではなさそうである。同様に、mPOUがPit-1発現を規定しているわけでもなさそうである。しかし、mPOUはPit-1結合エレメントに結合し、Pit-1遺伝子にはPit-1結合エレメントが存在するので、mPOUは、PRL、GH遺伝子発現に直接影響を及ぼすばかりでなく、mPOUはPit-1遺伝子発現を介して、PRL、GH遺伝子発現に間接的に影響を及ぼす可能性もある。

今後、mPOU非発現GH、PRL産生細胞とmPOU発現GH、PRL産生細胞の生物学的性格の比較検討、mPOUノックアウトマウスの解析等をとおして、mPOUの生理的意義を明確にしていくとともに、mPOUおよびPit-1の相互の遺伝子発現に及ぼす影響について解明することが必要となろう。

### 【結論】

ヒト下垂体腫瘍細胞においてmPOU蛋白の発現パターンには細胞特異性が認められた。GHおよびPRL遺伝子の発現を規定する因子として、下垂体特異的転写因子Pit-1以外にmPOUも作用する可能性が示唆された。

### 【文献】

1. Wu R, Jurek M, Sundarababu S, Weinstein DE: The POU gene Brn-5 is induced by neuregulin and is restricted to myelinating Schwann cells. *Mol Cell Neurosci* 17: 683-95, 2001.
2. Cui H, Bulleit RF: Expression of the POU transcription factor Brn-5 is an early event in the terminal differentiation of CNS neurons. *J Neurosci Res* 52: 625-32, 1998.
3. Cui H, Bulleit RF: Expression of the POU transcription factor Brn-5 inhibits proliferation of NG108-15 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 236: 693-6, 1997.
4. Wey E, Lyons GE, Schafer BW: A human POU domain gene, mPOU, is expressed in developing brain and specific adult tissues. *Eur J Biochem* 220: 753-62, 1994.
5. Andersen B, Schonemann MD, Pearse RV 2nd, Jenne K, Sugarman J, Rosenfeld MG: Brn-5 is a divergent POU domain factor highly expressed in layer IV of the neocortex. *J Biol Chem* 268: 23390-8, 1993.
6. Andersen B, Rosenfeld MG: POU domain factors in the neuroendocrine system: lessons from developmental biology provide insights into human disease. *Endocr Rev* 22: 2-35, 2001.