

研究班の全国疫学調査から新たに発見された4家系（旭川、名古屋、広島、島根）4家系について血液検体の提供をうけ、バソプレシン（AVP）遺伝子を解析した。

#### 【方法】

PGSF1(pi-b)とPGSF2(pi-c)に関してはエクソン/イントロン構造をヒトゲノムのドラフト配列より決定した。患者の血液検体よりゲノムDNAを抽出し、各々の遺伝子の蛋白コード領域を含むエクソンをPCRで増幅し蛍光自動塩基配列決定装置により塩基配列を直接決定し、正常配列と比較した。

#### 【結果】

下垂体ホルモン複合欠損症の家系1、2の合計4症例ではPGSF1 遺伝子とPGSF2 遺伝子の各々5つの蛋白コード領域には変異を認めなかった。特に家系1ではPGSF2 遺伝子内に兄弟間で異なる多型があり、ヒトゲノムのドラフト配列でX染色体q25に位置するこの遺伝子が伴性劣性遺伝の病因としては否定された。

東京慈恵会医科大学小児科より血液検体の提供をうけたTSH・GH・PRL複合欠損症の1症例にはPIT1 遺伝子の一塩基置換によるS179Rの劣性変異を認めた。野瀬クリニックより血液検体の提供をうけた1症例にはPROP1遺伝子に一塩基挿入のS156insTのフレームシフトの劣性変異を認めた。

家族性中枢性尿崩症4家系ではAVP 遺伝子の2家系はシグナル蛋白末端（-1）に、他の2家系は各々ニューロフィジンをコードする第47、69アミノ酸に変異を認めた。

#### 【考察】

これまで明らかにされた先天性下垂体ホルモン複合欠損症の病因候補遺伝子は下垂体特異的転写因子の候補遺伝子アプローチか大きな家族例のある疾患の連鎖解析からのポジショナルクローニングであった。今回は発現頻度が高い下垂体特異的な遺伝子を候補遺伝子として解析したが、遺伝子異常を認めなかった。

GHとPRLの完全欠損を伴うTSH・GH・PRL複合欠損症ではこれまでの症例と同様にPIT1 遺伝子かPROP1 遺伝子に遺伝子異常を認めた。今回認めたPIT1 遺伝子のS179R変異はPOUホメオドメインに位置し、DNAとの結合に影響するものと考えられた。これは日本で10例目、7種類目となる変異である。また、PROP1 遺伝子のS156insT変異はDNA結合領域よりC末端側の転写活性化領域を欠失する変異で、転写活性化能の消失かmRNAないし変異蛋白の安定性に影響すると考えられた。本例は日本では3例目、3種類目となる変異で、これまでの症例では欧米人の高頻度に認められるS101delAGは認められず、S101delAGは創始者効果により欧米人に高頻度に広まったものと考えられた。

家族性中枢性尿崩症ではこれまで世界で40家系ほどの遺伝子変異が報告されており、ほとんどはシグナル蛋白とニューロフィジンをコードする領域に位置し、今回発見した4つ

の変異もこれらの領域にあり、変異AVP前駆体蛋白が細胞に緩徐な壊死をもたらし、幼少時にAVP分泌不全を来し発症するものと考えられた。

#### 【まとめ】

6種の前葉ホルモンに加えAVPも部分欠損する先天性の下垂体ホルモン複合欠損症の男子同胞例 2家系で下垂体に特異的に発現する2つの新規遺伝子、PGSF1とPGSF2を病因候補遺伝子として解析したが、変異を認めなかった。典型的なTSH・GH・PRL複合欠損症や家族性中枢性尿崩症ではそれぞれ既知の遺伝子において変異を発見した。

#### 【文献】

1. Tatsumi K, Miyai K, Notomi T, Kaibe K, 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. 巽 圭太, 田中 進, 網野 信行, and 大久保 公策, "下垂体特異的遺伝子の構造解析," 厚生省厚生科学研究補助金特定疾患研究対策事業 間脳下垂体機能障害に関する調査研究班 平成12年度総括研究事業報告書: pp. 94-98, 2001.
3. Tanaka S, Tatsumi K, Okubo K, Itoh K, Kawamoto S, Matsubara K, Amino N: Expression profile of active genes in the human pituitary gland. *Journal of Molecular Endocrinology*: 28, 33-44, 2002.
4. Yagi H, Nagashima K, Miyake H, Tamai S, Onigata K, Yutani S, Kuroume T: Familial congenital hypopituitarism with central diabetes insipidus. *J Clin Endocrinol Metab*: 78, 884-889, 1994.

# 自己免疫性視床下部下垂体炎における新規下垂体特異的遺伝子産物に対する抗体の検討

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 )
	橋本浩三 (高知医科大学医学部内科学第二)
	村上宜男 (島根医科大学医学部内科学第一)
	加藤 譲 ( 同 )

## 【背景】

自己免疫性視床下部下垂体炎患者の血清中には自己抗体が存在する可能性が高く、これまで下垂体細胞に対する免疫染色や下垂体抽出物を用いたイムノプロットによる解析がなされてきた。しかしながら、下垂体特異的な自己抗原自体に直接アプローチする試みは殆ど報告されてなかった。本研究では自己免疫性視床下部下垂体炎患者の血清中に存在するであろう下垂体特異的な自己抗体に対応する下垂体特異的物質を明らかにするために、下垂体に特異的に発現する遺伝子産物を候補抗原としてラジオリガンド法により特異的な抗体価を測定した。

## 【対象と方法】

### 1. 対象症例

- 1) 自己免疫性視床下部下垂体炎 17例  
リンパ球性下垂体前葉炎 8例  
リンパ球性漏斗下垂体後葉炎 9例  
(うち3例は下垂体生検で確診)
- 2) 他の下垂体ホルモン欠損症 17例  
ACTH単独欠損症 10例  
TSH単独欠損症 4例  
Sheehan症候群 3例

### 2. 候補抗原

Body Map法により我々が明らかにした下垂体に特異的に発現する2つの新規遺伝子産物、PGSF1a、PGSF2<巽 圭太, 2001 #2; Tanaka, 2002 #1>と、これまでに抗体の存在が示唆されたhGH。

### 3. ラジオリガンド法

ラジオリガンド、即ち、標識抗原を作製するために、下垂体特異的遺伝子のcDNAをin

in vitroの転写翻訳系用のvectorに組み込み、試験管内でreticulocyte lysateを用いたin vitroの転写翻訳システム (TNT coupled in vitro transcription / translation system, Promega) により<sup>35</sup>S-Met標識した抗原を作製、カラム精製する。

作製した標識抗原を血清中の自己抗体と一晩反応して抗体と標識抗原の複合体を生成する。血清中の抗体をProtein G Sepharose (Amersham)に結合させ、96-well filtration system (Millipore)を用いて結合していないfreeの標識抗原を洗浄・濾過した後、標識抗原-特異抗体-protein G sepharose複合体を $\beta$  counter (Micro Beta, Amersham)で計測する。hGH以外は標準となるような陽性対象となる特異抗体が無いので健常人プール血清に対する比をindexとした。

### 【結果と考察】

アッセイの信頼性を、組換え体のあるhGHで見ると陽性検体では良好な希釈曲線が得られた。また、阻害実験として反応液中にhGHを加えると特異的に反応が抑制されたのに対し、対照としてovalbuminを加えると反応が抑制されなかった。これらのことより、このアッセイ系の特異性が確認できた。なお、カットオフ値としては健常人37例の平均+3SDを用いた。抗hGH、PGSF1a、PGSF2抗体に関するAssay内変動誤差は2.6-4.9%、Assay間変動誤差は3.3-5.2%と良好であった。

この様なアッセイ系で3種に対する抗体価を測定した結果を図1に示す。健常人は全てカットオフ値(破線)より低い値を取った。

抗hGH抗体はリンパ球性下垂体前葉炎2例、生検で確定診断したリンパ球性漏斗後葉炎の例1例とACTH単独欠損症1例で認めた(図1.上段)。抗PGSF1a抗体は生検で確定診断したリンパ球性漏斗後葉炎、ACTH単独欠損症とSheehan症候群で1例ずつ認めた(図1.中段)。抗PGSF2抗体はリンパ球性下垂体前葉炎2例でのみ認めた(図1.下段)。この結果から、今回検討した抗体の中では抗PGSF2抗体については陽性率が低いながらも疾患特異性が高く、自己免疫性視床下部下垂体炎の補助診断に役立つ可能性があるとし唆された。

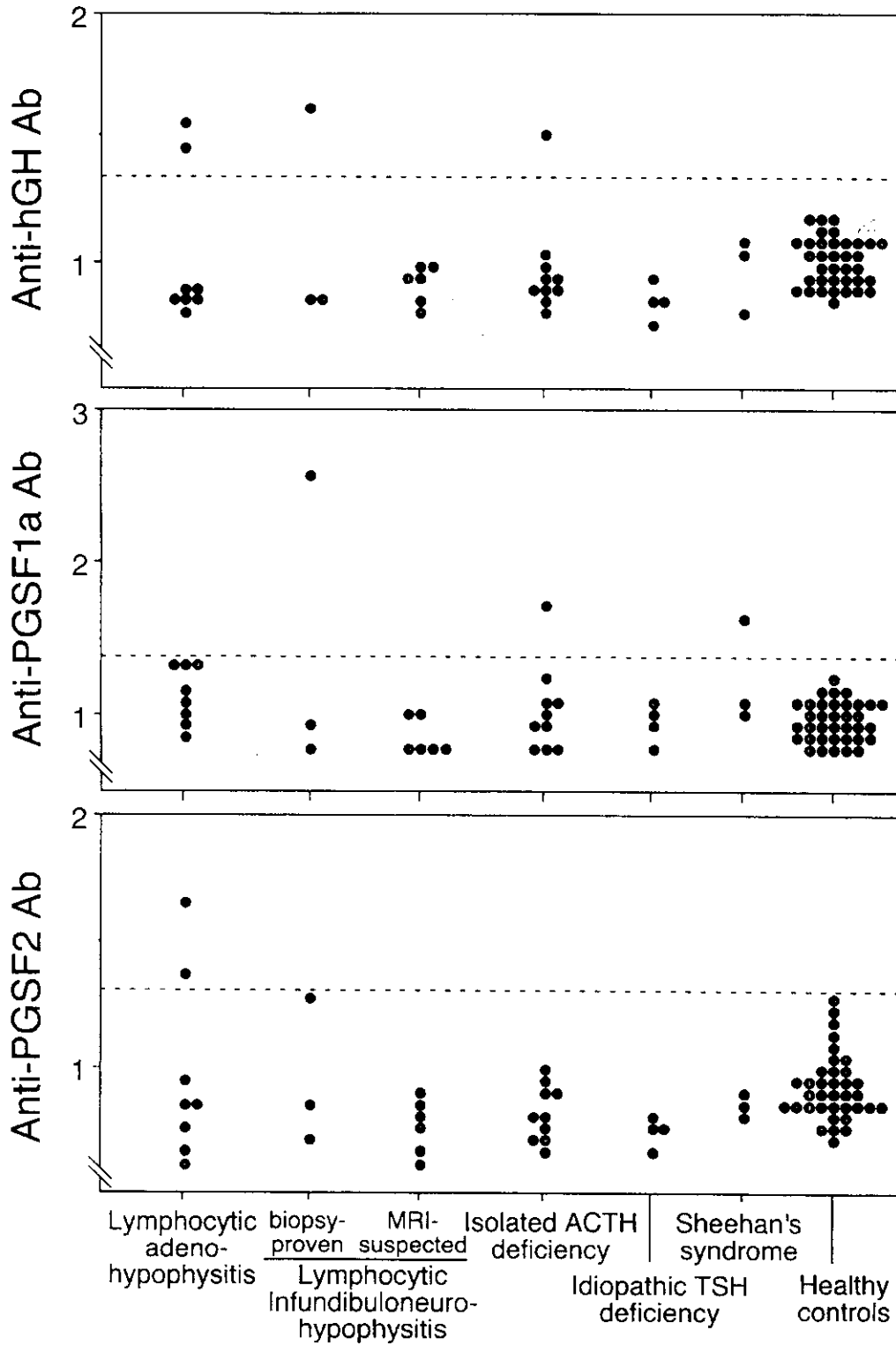
次に、これらの抗体陽性例に注目してみると、抗PGSF2抗体陽性の2例は抗hGH抗体も陽性、抗hGH抗体陽性で抗PGSF2抗体陰性の2例は抗PGSF1a抗体が陽性、残る1例は抗PGSF1a抗体のみ陽性であった。また、これらの抗体価の相関を調べると抗hGH抗体価と抗PGSF1a抗体価あるいは抗PGSF2抗体価とは相関を認めた。従って、一旦抗下垂体特異的蛋白に対する抗体が陽性になると下垂体細胞の抗原群に対して幅広く自己抗体が生成されたと考えられた。また、これらの症例は何れも下垂体細胞に対する免疫染色や下垂体抽出物を用いたイムノプロットでは抗体が検出されず、これらとは独立した診断価値を持つと考えられた。

### 【結語】

下垂体に特異的に発現する新規遺伝子産物に対する自己抗体検出法を開発し、抗体価は

高くは無いものの自己免疫性視床下部下垂体炎の補助診断に役立つ可能性があるとし唆された。

図1. 抗下垂体特異的蛋白抗体



# 抗ヒト下垂体抗体検出法を用いた自己免疫性視床下部下垂体炎の病態解析

班長	加藤 讓 (島根医科大学第一内科)
研究協力者	村上宜男 ( 同 )
	西木正照 ( 同 )

## 【背景】

抗ヒト下垂体自己抗体(APA)の検出法としてヒト下垂体膜抗原を用いたイムノブロッティング法を開発し、APAはリンパ球性下垂体炎に疾患特異性が高いことを報告した(文献1,2)。今回は下垂体機能低下症や下垂体MRI異常を呈する自験例のうちで、自己免疫疾患合併例、多彩な自己抗体陽性例ならびに病理学的に下垂体前葉のリンパ球浸潤を認めた4症例の病態についてAPAを用いて解析した。

## 【対象と方法】

患者4名の血清サンプルを用いてAPAを測定した。4名の臨床背景と下垂体MRI所見を表1に示す。APAの測定方法には、既報(文献1)のように下垂体組織をホモジネートしたのち100,000gの遠心分離で得られた膜蛋白分画を用いた。ヒト下垂体膜抗原をSDS-PAGE法で電気泳動し、PVDFメンブレンに転写した。ブロッッキング後、50倍希釈の患者血清と2時間反応させた。洗浄後、1,000倍に希釈したビオチン化抗ヒトIgGヤギ血清と1時間インキュベートしたのち、可視化した。

## 【結果】

4症例のAPAの結果を図1に示す。原発性胆汁性肝硬変(PBC)を合併した症例1で68,49,43kDの、バセドウ病を合併した症例2で68,49kDの陽性バンドを認めた。組織学的にリンパ球浸潤を認めた頭蓋咽頭腫の症例3、多彩な自己抗体を認めた症例4では陰性であった(表1)。

## 【考察】

既にわれわれは、剖検時に得られたヒト下垂体組織を用いてヒト下垂体膜抗原に対するAPAはリンパ球性下垂体炎に特異性が高いことを報告した(文献1,2)。今回の検討により下垂体前葉機能低下と原発性胆汁性肝硬変を合併した症例1の男性例およびMRI異常とバセドウ病の合併を認めた症例2の女性例では、APAが陽性で自己免疫機序が関与する可能性が示唆された(文献3)。一方、組織学的にリンパ球浸潤を認めた頭蓋咽頭腫の症例3の男性例(文献4)ではAPAは陰性で、リンパ球性下垂体炎とは異なり頭蓋咽頭腫に伴う

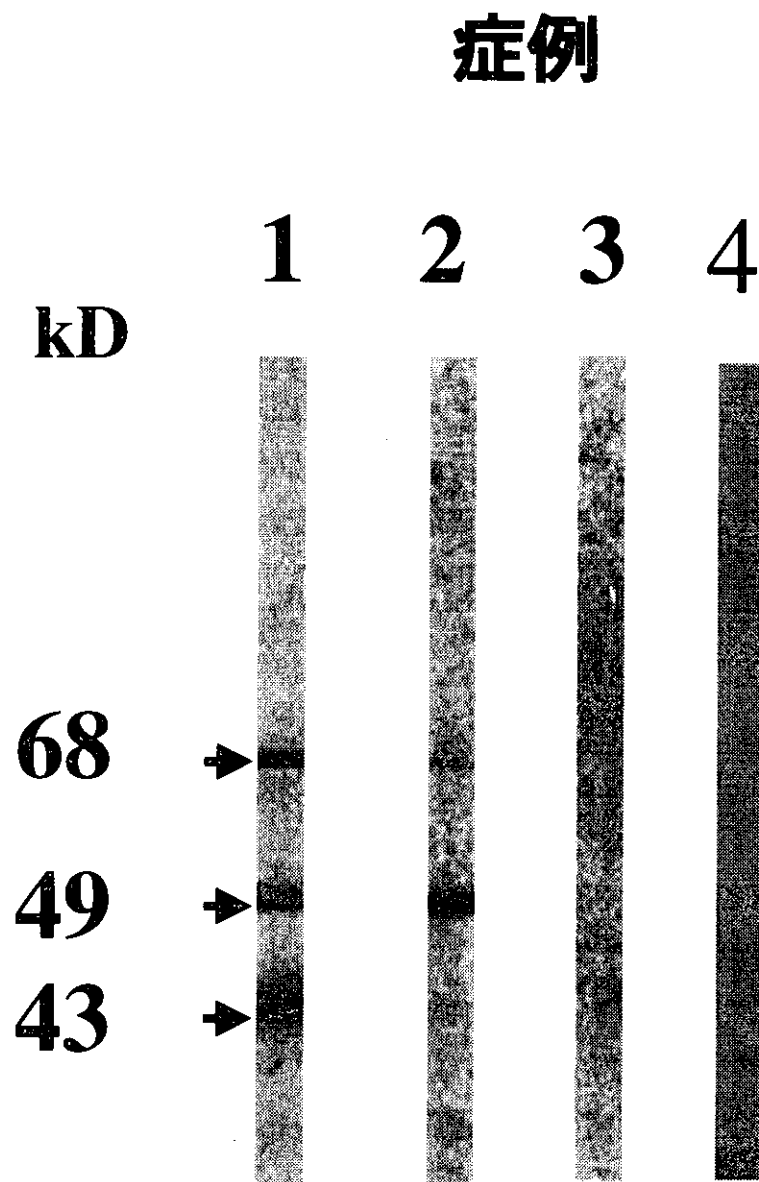
非特異的リンパ球浸潤と考えられた。また、多彩な自己抗体を認めた症例4の男性例においてもAPAは陰性で、自己免疫機序による下垂体前葉の障害はないものと考えられた。以上の成績から、APAは下垂体機能低下症や下垂体MRI異常を呈する疾患の病態生理の解析に有用と考えられる。

#### 【まとめ】

ウエスタンブロットイング法を用いて下垂体機能低下症や下垂体MRI異常を呈した患者4名の血清中の抗下垂体抗体について検討した。自己免疫疾患を合併する2症例において68, 49, 43kDのヒト下垂体膜抗原に対する抗体を認めた。特発性と考えられる下垂体機能低下症や下垂体MRI異常を有する症例の少なくとも一部には、自己免疫異常が関与する可能性が示唆された。本法は下垂体機能低下症や下垂体MRI異常を呈する疾患の病態生理の解析に有用と考えられる。

#### 【文献】

1. Nishiki M, Murakami Y, Ozawa Y, Kato Y: Serum antibodies to human pituitary membrane antigens in patients with autoimmune lymphocytic hypophysitis and infundibuloneurohypophysitis. *Clin Endocrinol* 54: 327-333, 2000.
2. Crock P, Salvi M, Miller A, Wall J, Guyda H: Detection of anti-pituitary autoantibodies by immunoblotting. *J Immunol Methods* 162: 31-40, 1993.
3. Nishiki M, Murakami Y, Koshimura K, Shomiya M, Tanaka J, Yabe I, Kobayashi I, Kato Y: A case of autoimmune hypophysitis associated with asymptomatic primary biliary cirrhosis. *Endocrine J* 45:697-700, 1998.
4. 村上宜男、栗岡聡一、加藤 讓：尿崩症の発症12年後に続発性副腎不全をきたし、下垂体前葉のリンパ球浸潤を認めた頭蓋咽頭腫の一例。 *日本内分泌学会雑誌* 77 (Suppl):54-55, 2001.



**図1** イムノプロテイングによる抗下垂体抗体



表1 4症例の臨床所見と抗下垂体抗体の成績

	1	2	3	4
男/女	男	女	男	男
年齢(歳)	56	76	60	68
前葉ホルモン分泌低下症	ACTH,GH,LH,FSH	(-)	ACTH,GH,TSH, LH,FSH	(-)
高PRL血症	(-)	(+)	(+)	(-)
尿崩症	(-)	(-)	(+)	(+)
下垂体MRI所見	前葉腫大	茎肥厚	囊腫様病変	茎肥厚、後葉腫大 および高信号消失
合併症	PBC	Basedow病	頭蓋咽頭腫	多種の自己抗体
抗下垂体抗体	(+)	(+)	(-)	(-)

# リンパ球性下垂体炎及びリンパ球性漏斗下垂体神経葉炎各1例に於けるグルココルチコイドの抗腫瘍効果

分担研究者	橋本浩三（高知医科大学第二内科）
研究協力者	浅羽宏一（同）
	田村香苗（同）
	田中康司（同）
	高尾俊弘（同）
	肥塚直美（東京女子医科大学第二内科）

## 【背景】

リンパ球性下垂体炎は、下垂体にリンパ球や形質細胞が浸潤する慢性の炎症性疾患であり、原因には自己免疫機序の関与が考えられている。1962年GoudieとPinkertonにより最初に報告され(1)、当初きわめて稀な疾患と考えられていたが、MRIなどの画像診断の進歩に伴い、近年報告例が急速に増加している。当初は炎症が前葉のみに認められるリンパ球性下垂体前葉炎が主として報告されていたが、1970年Saitoら(2)は、下垂体基—下垂体後葉に局限したリンパ球性炎症が原因の尿崩症の剖検例を報告し、1993年Imuraら(3)がリンパ球性漏斗下垂体神経葉（後葉）炎が特発性尿崩症の原因である可能性を報告して以来、報告が増加している。グルココルチコイドにより軽快する症例も報告されているが、治療効果については明らかにされていない。そこで今回我々は、グルココルチコイド治療により腫瘍が縮小した自験例2例を報告し、グルココルチコイドの治療効果について文献的にも考察したので報告する。

## 【症例1】

患者：54歳、女性。

主訴：全身倦怠感、頭痛。

既往歴：46歳時に子宮筋腫にて子宮全摘。

家族歴：祖父に胆嚢癌、祖母に脳梗塞、父に糖尿病。

現病歴：平成12年（53歳時）1月頃より食思不振、多飲多尿が出現していたが放置。同年12月頃より頭痛が出現したため、A病院にて頭部MRIを施行、下垂体腺腫が疑われ、東京女子医科大学病院を紹介。下垂体生検を含む精査にてリンパ球性下垂体前葉炎に伴う中枢性尿崩症と診断された。内分泌学的検査では、下垂体前葉ホルモンや甲状腺ホルモンはほぼ正常であった。DDAVPにて多飲多尿は改善したが、平成13年7月頃より全身倦怠感が出現し、DDAVPを中止しても尿量が減少し、浮腫が出現したため、同年8月高知医科大学病院を紹介され入院となった。

現 症：身長153cm、体重51.6kg、血圧を含めて異常なし。

検 査：入院時一般検査では赤沈の亢進と軽度の貧血を認めた以外に異常なく、内分泌学的検査では血中LH、fT4、cortisol、DHEA-S、estradiolが低値であった（表1）。下垂体前葉4者負荷試験では、ACTH、PRL、GHの反応性からは下垂体茎の障害が、TSH、LH、FSHの反応性からは下垂体の障害も示唆された。（図1）。免疫学的検査では、抗Tg抗体、抗TPO抗体は陰性で、当教室で行っているヒト下垂体サイトゾールを抗原としたウエスタンブロット法による解析では、57kDa付近にバンドを認めた。

画 像：トルコ鞍部 MRI T1 強調画像では後葉の高信号は消失し、トルコ鞍内には1.5x1.5x1.0cm大で一部に低信号域を認める不均一な腫瘤病変を認め、鞍上進展を来し、下垂体茎の肥厚も認めた。

経 過：リンパ球性下垂体前葉炎増悪の診断のもとに、コートリル 20mg、チラージン S 50mgで補充療法を開始し、4ヶ月後明らかに腫瘤が縮小した（図2）。また、下垂体—副腎系、下垂体—甲状腺系の機能が回復傾向にある。

## 【症例2】

患 者：27歳、男性。

主 訴：発熱、頭痛。

既往歴：末梢神経障害（つまずきやすい）、尋常性疣贅。

家族歴：祖父、母、兄に下肢の脱力。父に甲状腺機能低下症。

現病歴：19歳時から繰り返し左眼窩の腫脹、疼痛が出現。A病院にて外眼筋生検を施行、眼窩筋炎と診断され、ステロイド剤投与にて軽快した。抗核抗体陽性などより膠原病の関与が疑われたが確定診断には至らなかった。また19歳時より多飲多尿を自覚しており、23歳時には精査の結果、中枢性尿崩症、下垂体前葉機能軽度低下（特に性腺機能）と診断された。DDAVPの補充のみで経過は良好だったが、26歳時より性腺機能低下が顕著となり、平成13年2月頃（27歳）より頬部紅斑、発熱、頭痛などの症状が出現し、SLEが疑われB病院に入院。下垂体MRIにて下垂体茎の肥厚を認めたことからリンパ球性下垂体炎の合併が疑われたため当科へ紹介入院となった。

現 症：身長171cm、体重65.7kg、血圧に異常ないが、顔面に蝶形紅斑、結膜に軽度貧血、胸部に女性化乳房と紅斑を認めた。

検 査：入院時一般検査では赤沈亢進、貧血、白血球減少、軽度肝酵素の上昇、総コレステロール低値、高γグロブリン血症を認めた。免疫学的検査では、肝炎ウイルスは陰性、抗TPO抗体は陰性、抗Tg抗体は0.5(IU/ml)と陽性だった。抗核抗体、抗DNA抗体、抗Sm抗体は全て陽性だった。またウエスタンブロット法による抗下垂体抗体の検索では、ヒト下垂体サイトゾールの20kDa、及び29kDa付近に陽性バンドを認めた。内分泌学的検査では血中LH、FSH、GH、fT3、fT4が低値を示し、血中および尿中ステロイドも全て低値であった（表2）。下垂体前葉4者負荷試験では、ACTH系、TSH、PRL、GHの反応性からは下

垂体茎の障害が、LH、FSHの反応性からは下垂体障害も示唆された（図3）。

画像：トルコ鞍部MRI T1強調画像では、後葉の高信号域は消失し、下垂体茎の肥厚が認められた。下垂体前葉は軽度萎縮していた。

経過：蝶形紅斑、発熱、抗核抗体、白血球減少などの所見よりリンパ球性漏斗下垂体後葉炎を合併したSLEと診断し、コトリル補充に引き続きプレドニン30mgにより加療を開始した。加療により自覚症状や低補体血症は改善し、トルコ鞍部MRIでも下垂体茎の肥厚は改善した（図4）。

### 【考察】

グルココルチコイドの治療効果について我々が158例の文献的を検討した範囲内では、64例に使用されており、リンパ球性下垂体炎におけるステロイド治療の抗腫瘍効果は、腫瘍縮小、視野改善は薬理量使用例で62.5%、補充量で44.4%、量不明で33.3%、全体で46.9%だった（表3）(4)。自然寛解例も一部に報告されていることより有効例の全てが、グルココルチコイドによるものとは断定できないが、現時点では有用な治療法であると考えられた。また、下垂体機能に関しては、Kristofらによるとグルココルチコイドの大量療法で、9例中4例に前葉機能の改善が、4例中3例で尿崩症の完全寛解が、残り1例もDDAVPの使用量が軽減したとの報告されており(5)、機能回復も期待できると考えられる。今回の1例目では補充量により腫瘍の縮小と前葉機能の回復が認められた。しかし、漏斗下垂体後葉炎では、病初期を逃すと尿崩症の改善が見られないと思われるので、腫瘍がなくても初期であれば薬理量を試みた方が良いと考えられる。

### 【結語】

補充量及び薬理量のステロイドにより下垂体の腫大、下垂体茎の肥厚が改善したリンパ球性下垂体前葉炎および下垂体漏斗下垂体後葉炎の各一例を報告した。画像上明らかな腫瘍病変が認められる場合は、ステロイド療法が抗腫瘍効果に有効であると考えられた。

### 【参考文献】

1. Goudie RB, Pinkerton PH : J Path Bact 83 : 584, 1962.
2. Saito T, et al : J Clin Endocr 31 : 391, 1970.
3. Imura H, et al : N Engl J Med 329 : 683, 1993.
4. 橋本浩三: ホと臨床 49 : 1065, 2001.
5. Kristof RA, et al : J Nneuro Neurosurg Psychiatry 67 : 398, 1999.

表1：症例1、内分泌学的検査

ACTH	(pg/ml)	9	cortisol	( $\mu$ g/dl)	1.99
TSH	( $\mu$ IU/ml)	0.76	testosterone	(ng/dl)	10
PRL	(ng/ml)	46.2	estradiol	(pg/ml)	<10
GH	(ng/ml)	6.08	DHEA-S	(ng/ml)	123
LH	(mIU/ml)	0.3	抗Tg抗体	(U/ml)	< 0.3
FSH	(mIU/ml)	4.4	抗TPO抗体	(U/ml)	< 0.3
f-T3	(pg/ml)	2.27	抗下垂体抗体		(+)
f-T4	(ng/dl)	0.51	(ヒト下垂体サイトゾルの57kDa付近に陽性バンドを認める)		
ADH	(pg/ml)	1.6			
S-Osm	(mOsm/kg)	279			

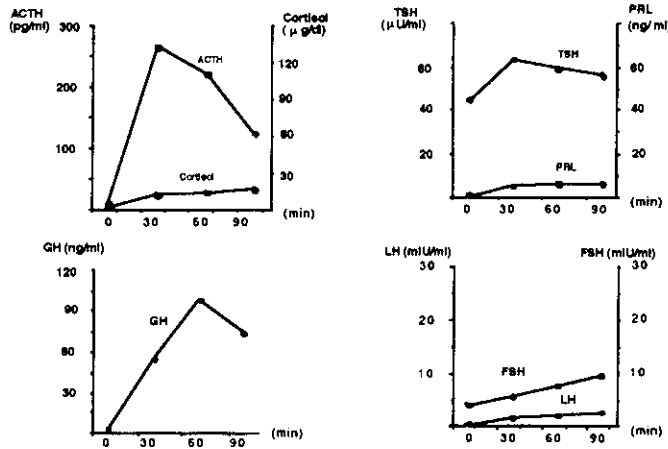


図1：症例1、下垂体前葉負荷4者試験



図2：症例1、トルコ鞍部Gd造影MRI T1 強調画像

表2：症例2、内分泌学的検査

ACTH	(pg/ml)	26	cortisol	( $\mu$ g/dl)	2.04
TSH	( $\mu$ IU/ml)	2.87	testosterone	(ng/dl)	23
PRL	(ng/ml)	38.0	estradiol	(pg/ml)	<10
GH	(ng/ml)	0.12	f-testosterone	(pg/ml)	2.4
LH	(mIU/ml)	<0.25	androstendione	(ng/ml)	0.21
FSH	(mIU/ml)	<0.25	DHEA-S	(ng/ml)	522
f-T3	(pg/ml)	2.00	17-OHCS	(mg/day)	1.9
f-T4	(ng/dl)	0.62	17-KS	(mg/day)	2.0
IGF-1	(ng/ml)	56	抗下垂体抗体		(+)
ADH	(pg/ml)	0.8	(ヒト下垂体サイトゾルの20kDa, 29kDa付近に陽性バンドを認める)		
S-Osm	(mOsm/kg)	291			

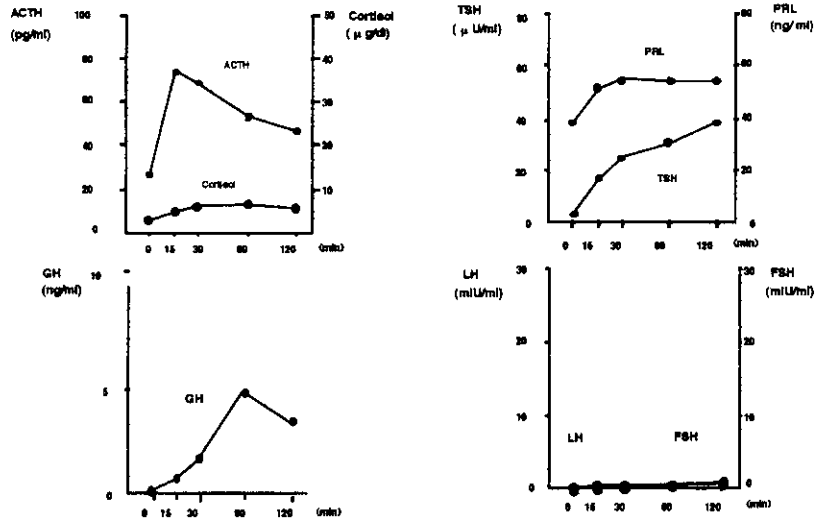


図3：症例2、下垂体前葉4者負荷試験

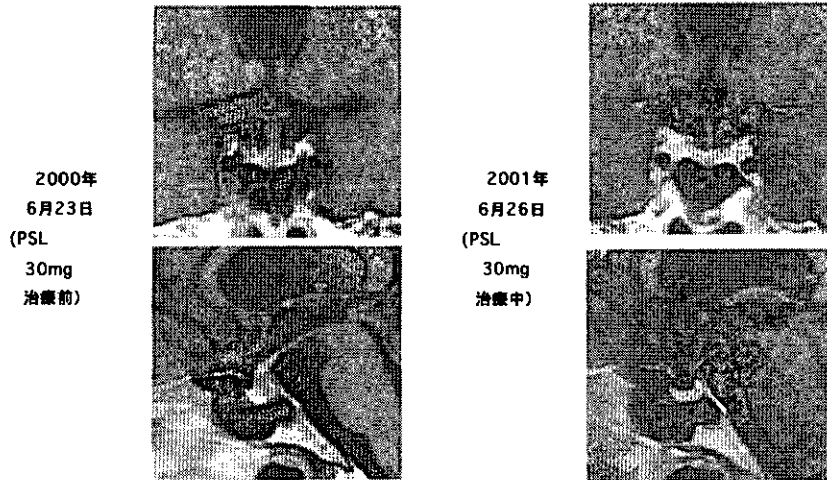


図4：症例2、トルコ鞍部Gd造影MRI T1強調画像

表3：ステロイド治療の抗腫瘍効果（腫瘍縮小，視野改善）

	NO.	効果あり(%)	効果なし	不明
薬理量 <sup>a</sup>	(16)	10(62.5)	2	4
補充量 <sup>b</sup>	(36)	16(44.4)	2	18
量不明	(12)	4(33.3)	2	6
計	(64)	30(46.9)	6	28

a : PSL換算>10mg/day    b : PSL換算<7.5mg/day

(橋本浩三、水と臨床49, 1065, 2001)

# 複合下垂体ホルモン欠損症の病因とされる変異Pit-1(R271W)の機能解析

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	岸本正彦（                    同上                    ） 井口元三（                    同上                    ） 飯田啓二（                    同上                    ） 加治秀介（兵庫県立看護大学） 置村康彦（神戸大学医学部保健学科）

## 【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、分化に重要であるだけでなく、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)遺伝子のPit-1 binding DNA配列に結合し、その発現を促進する。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15種類28例のPit-1異常症の報告があるが、そのうち12例は271位のア르기ニンがトリプトファンに変異したPit-1 (R271W) の報告である(1-8)。これまで、このR271Wはdominant negativeな作用を示すことが、GHのpromoterを使用した解析で報告されている(Radovick, et al. 1992)。今回、dominant negativeな作用を示す機序を明らかにする目的で、R271Wの機能解析をおこなった。

## 【方法と結果】

1. wild Pit-1発現ベクター(pcDNA3.1-Pit-1)と、271番目のア르기ニンをトリプトファンに変異させたmutant Pit-1発現ベクター(pcDNA3.1-R271W)を作製した。R271Wの変異(CGGからTGG)について、直接シーケンス(Fig.1 A)、ならびに既報(9, 10)のamplification created restriction site assayにて確認した。pcDNA3.1-Pit-1からのPCR産物(W, Fig. 1B, lane2)、pcDNA3.1-R271WからのPCR産物(271, Fig. 1B, lane3)を制限酵素MluIで処理すると、それぞれ105bp(lane4)と128bp(lane5)のDNAバンドが得られ、変異の導入が確認された。
2. GH遺伝子5'上流1.8kbあるいはPRL遺伝子5'上流0.6kb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を、pcDNA3.1-Pit-1(W)、pcDNA3.1-R271W(271)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。なおpcDNA3.1(E)によりプラスミド総量を一定にした。意外にもR271WはWildPit-1と同等に機能し、dominant negativeな作用を示さなかった(Fig. 2)。

3. PRL遺伝子5'上流1.9kb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およびPit-1結合エレメントをtandemにつないだレポーター遺伝子を使用し同様の検討を行なったが、R271WはWild Pit-1と同等に機能し、dominant negativeな作用を示さなかった(Fig. 3)。
4. PRL遺伝子5'上流0.6kb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を使用し、COS7以外の細胞(JEG3、CHO)に導入し検討したが、やはり同様の結果を得た(Fig. 4)。
5. pcDNA3.1-Pit-1、pcDNA3.1-R271Wの細胞内への導入効率に違いがないか検討するため、これらを単独、あるいは両者合わせてCOS7細胞に導入したのち、細胞から蛋白を抽出し、抗Pit-1抗体にて免疫沈降、Western blottingを行なった。この結果、両者の導入効率に違いはないことが確認された(Fig. 5)。
6. R271Wの核移行機能に障害がないか、Wild Pit-1およびR271WにGFPをfusionさせ、COS7細胞に強制発現させ、蛍光顕微鏡にて観察を行なった。pEGFP (GFP 発現ベクター)単独では細胞全体に淡くGFPが分布するのに対し(Fig.6A)、Wild Pit-1とfusionさせたGFPは核に強く移行し(Fig.6B)、この現象はR271WにGFPをfusionさせた場合でも全く同様であった(Fig. 6C)。このことよりR271Wの核移行機能に障害がないことが示された。

#### 【考察】

今回、私どもは、dominant negativeな作用をもつと報告されていたR271Wの機能を再検討したが、少なくとも、今回の私どもの実験系では、R271Wはdominant negativeな作用を示さなかった。興味深いことに、R271Wの報告例はde novo発症の症例が多く、家系として報告されたものは、これまでに2家系にすぎない。このうち、Okamotoらによって報告された家系では、発端者の父親、祖母はヘテロR271Wを保有しながら発症しておらず(11)、従来推測されてきたdominant negativeな作用だけでこの表現形を説明することは困難である。Okamotoらはこの現象を、末梢リンパ球での検討ではあるが、Pit-1遺伝子は母親から伝わった場合genomic imprintingを受けるからであろうと推測している。しかしながら、De Zegherらは、R271Wが母親から伝わった結果発症した複合下垂体ホルモン欠損症の母子例を報告しており(12)、R271Wによる複合下垂体ホルモン欠損症の発症機構について今後さらなる検討が必要と考えられる。

#### 【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 S: 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. Eiken HG, Odland E, Coman H, Skjelkvale L, Engebretsen LF, Apold J: Application of natural and amplification created restriction sites for the diagnosis of PKU mutations. Nucleic Acid Res 19: 1427-1430, 1991.
  10. Aarskog D, Eiken HG, Bjerknes, et al. : Pituitary dwarfism in the R271W Pit-1 gene mutation. Eur J Pediatr 156: 829-834, 1997.
  11. Okamoto N, Wada Y, Ida S, et al.: Monoallelic expression of normal mRNA in the *PIT1* mutation heterozygotes with normal phenotype and biallelic expression in the abnormal phenotype. Hum Mol Genet. 3: 1565-1568, 1994.
  12. De Zegher F, Pernasetti F, Vanhole C, et al. : The prenatal role of thyroid hormone evidenced by fetomaternal Pit-1 deficiency. J Clin Endocrinol Metab 80: 3127-3130, 1995.

Figure 1.

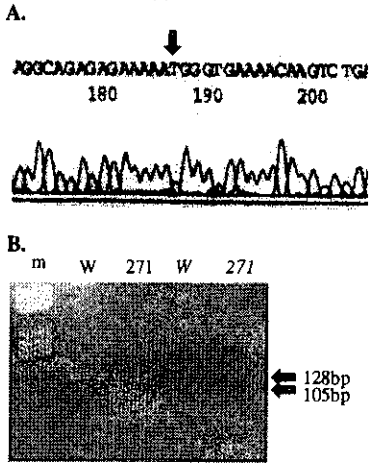
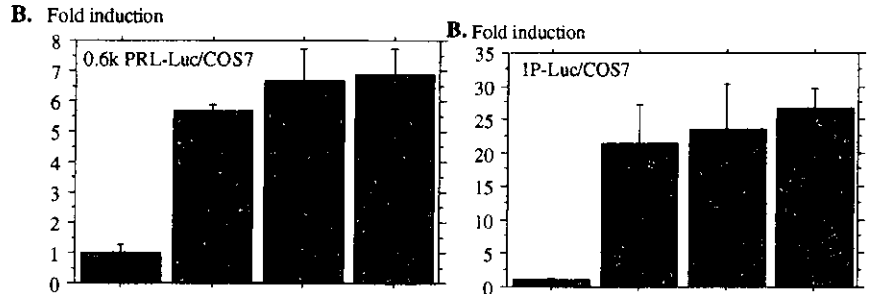
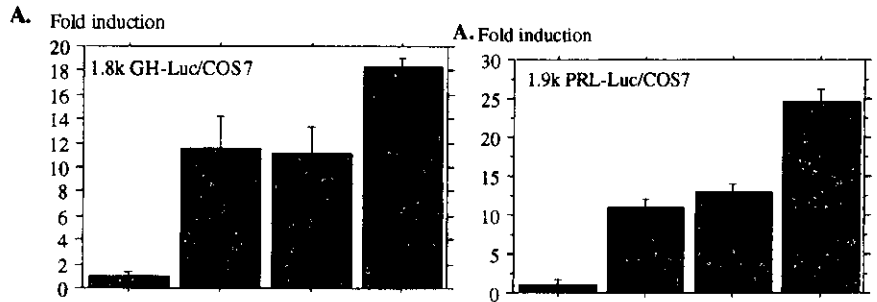
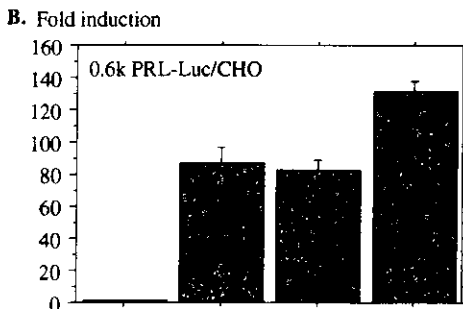
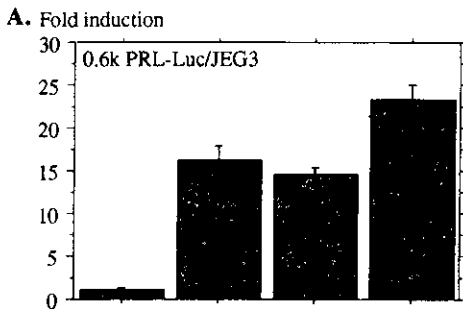


Figure 2.



E	0.6μg	0.3μg	0.3μg	0μg	E	0.6μg	0.3μg	0.3μg	0μg
W	0μg	0.3μg	0μg	0.3μg	W	0μg	0.3μg	0μg	0.3μg
271	0μg	0μg	0.3μg	0.3μg	271	0μg	0μg	0.3μg	0.3μg

Figure 4.



E	0.6μg	0.3μg	0.3μg	0μg
W	0μg	0.3μg	0μg	0.3μg
271	0μg	0μg	0.3μg	0.3μg

Figure 5.

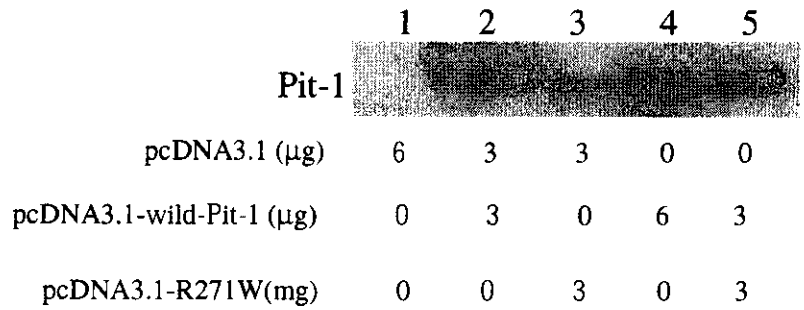
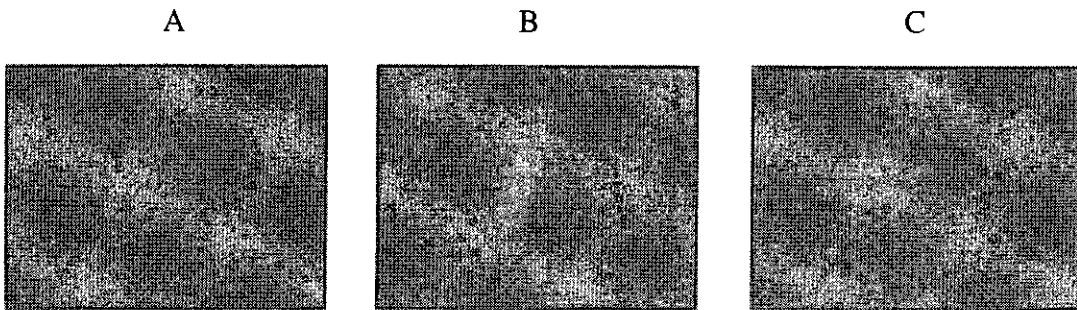


Figure 6.



## 5. 全国疫学調査の解析

## 「全国疫学調査の解析」 座長のまとめ

大磯ユタカ（名古屋大学分子細胞内科学）

厚生労働省特定疾患間脳下垂体機能障害に関する調査研究班が、加藤 讓班長（島根医科大学第一内科）によって新たに再編成されて以来6年が経過した。この間一貫して本班関連疾患の全国疫学調査が疫学班との共同作業により積極的に進められてきた。その結果、間脳下垂体系6疾患の疫学面に関するわが国における最新のデータベースが構築され、これらが病態解析をはじめとした診断・治療面での有用な学術的ツールとなったことはもちろん、新規治療薬の開発過程においてオーファンドラッグ申請に応用されるなど実務面でも当分野における医療の発展に果たしている役割はきわめて大きなものであると考えられる。

平成13年度に行われた「全国疫学調査」関連の研究は、1. 下垂体偶発腫に関する全国多施設調査（日本医科大学脳神経外科、寺本 明ら）、2. 成人下垂体機能低下症全国疫学調査（東京医科歯科大学難治疾患研究所疫学、横山徹爾ら）、3. ホルモン補償療法中の成人下垂体機能低下症の病態（島根医科大学第一内科、村上宜男ら）の3研究である。本年度は加藤班6年度目の区切りの年であり、これら3つの病態に対する精力的な調査研究が行われ、以下の各々の報告書に見られるように医学的に興味深く、臨床的に有意義な成績が得られた。ここでは簡単にそれぞれの成績について紹介する。

寺本らにより行われた下垂偶発腫の病態に関する全国疫学調査は、最近の急速な画像診断の進歩によって明らかとされてきた本病態の多数例における解析により、臨床的な治療指針決定のための基礎ともなる成績である。昨年度に引き続き行われた全国多施設二次調査では合計506例の下垂体偶発腫が報告された。その約半数で外科的な診断が行われており、病理組織学的には非機能下垂体腺腫が80%、ラトケ嚢胞が16%であり、さらに免疫染色による二次的な詳細の検討では非機能下垂体腺腫のうち約半数近くのものでFSH、ACTHなどが陽性に染色された。一方、手術を行わず6ヶ月間以上経過を観察した残る248例ではその75%が経過中に腫瘤像の大きさに変化を示さず、12%では増大が、同じく12%では縮小が認められた。経過観察症例の中で4%の症例が最終的に手術の転帰をとったが、手術理由としては60%が腫瘤の増大によるものであった。それら症例の病理組織像は60%が非機能性下垂体腺腫、40%がラトケ嚢胞であった。これらの成績を含め、治療方針の確立が急がれていた下垂体偶発腫における病態の概要が明らかとなった点は臨床上たいへん意義深いものと考えられる。

横山らによって「特定疾患の疫学に関する研究班」との共同研究として行われた成人下垂体機能低下症全国疫学調査では、成人の6種類の下垂体ホルモン機能低下症（成長ホルモン分泌低下症、ACTH分泌低下症など）の年間受療者数の推計と臨床疫学的特性を昨年度に施行した一次調査に引き続き行った二次調査により検討した。二次調査で回答のあっ