

(以下 P14L)、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)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、これらの変異型 Pit-1 は dominantnegative な変異体と推測されていた。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。

本研究は、P14L と P24L の機能解析を行うことにより、これらの変異を有した患者における CPHD の発症機構を明らかにすること、さらに、POU ドメインとは対照的に、その具体的な機能が解明されていない転写活性化ドメインの役割を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

(1) 野生型 Pit-1 発現ベクターと、14 番目のプロリンをロイシンに変異させた変異型 Pit-1 発現ベクター、および 24 番目のプロリンをロイシンに変異させた変異型 Pit-1 発現ベクターをそれぞれ作製した。これらを 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、その転写活性を調べた。

(2) P14L と P24L は、dominant negative な変異体と推測されていたため、これらの変異体が野生型 Pit-1 による PRL レポーター遺伝子発現活性化を dominant negative に抑制するかどうかの検討を行った。

(3) 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、何らかの転写共役因子との相互作用の障害が存在する可能性を考えた。その一つの候補として、核内受容体をはじめ様々な転写因子のコアクチベーターとして機能することが知られている CREB-binding Protein(CBP)を想定し、以下の実験を行なった。COS7 細胞に HA-tagged CBP 発現ベクターと、野生型 Pit-1 あるいは P24L の発現ベクターを PRL レポーター遺伝子と共に導入し、48 時間後に全細胞から蛋白を抽出した。これに抗 HA-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 interaction を検討した。また、野生型 Pit-1 や P24L の代わりに、転写活性化ドメインあるいは POU ドメインを発現させて、同様の検討をおこなった。

(4) CBP をいくつかのフラグメントに分けて発現させ、CBP のどの部分が Pit-1 との interaction に重要であるか、Mammalian Two Hybrid System を使用し検討した。また、P24L と CBP の interaction についても同様の方法で検討した。

(5) Pit-1 存在下に生じる cAMP 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。

(6) 野生型 Pit-1、P14L、P24L の細胞内への導入効率に差異がないか、これらを COS7 細胞に導入したのち全細胞から蛋白を抽出し、抗 Pit-1 抗体にて免疫沈降、

Western blotting を行い検討した。

(7) P14L、P24L の核移行機能に障害がないか、COS7 細胞で野生型 Pit-1、P14L または P24L と GFP の融合蛋白を発現させた後、蛍光顕微鏡にてその局在を観察した。

### C. 研究結果

(1) 意外なことに、P14L は野生型 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 は野生型 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% 活性化するとどまった。

(2) P14L と P24L のいずれも、dominant negative な作用を示さなかった。

(3) 既に報告のある通り、野生型 Pit-1 は CBP と直接結合するため、CBP と共沈されてくるのに対し、P24L は CBP と共沈されず、P24L は細胞内において CBP をリクルートできない可能性が示唆された。また、転写活性化ドメインあるいは POU ドメインを野生型 Pit-1 の代わりに発現させて検討したところ、Pit-1 が CBP を細胞内においてリクルートするためには、転写活性化ドメイン (特に第 24 番目のアミノ酸にあたるプロリン)、POU ドメインの双方が必要であることが明らかとなった。

(4) Mammalian Two Hybrid System においても、P24L は Wild Pit-1 とは異なり、CBP と interaction できないことが示唆された。また、CBP の CH1 ドメイン、CH3 ドメインが Pit-1 との interaction に重要であることが明らかとなった。

(5) 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 存在下では影響を与えなかった。GH3 細胞

において、cAMP による Pit-1 依存性プロモーター活性の増強は、CBP の機能障害をおこす Adenovirus Ela の導入によって消失した。

(6) Wild Pit-1、P14L、P24L の導入効率に違いはないことが確認された。

(7) 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、Wild Pit-1 と融合させた GFP は核に強く移行し、この現象は P14L、P24L の場合でも同様であった。このことより P14L、P24L の核移行機能に障害のないことが示唆された。

### D. 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変異型 Pit-1 (P14L と P24L) の機能解析を初めて行う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コアクチベーターとして働くことが知られている CBP と Pit-1 との相互作用の障害がその機能低下の原因ではないかと推測、検討を行った。培養細胞内において P24L は CBP をリクルートできず、この現象は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による刺激は、Pit-1によって発現が制御される遺伝子の発現を増強することが知られていたが、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、今回さらに、変異型 Pit-1 である 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 と独立して機能する未知のコアクチベーターが存在する可能性が考えられた。

#### E. 結論

1. Pit-1 が CBP をリクルートするためには、転写活性化ドメイン (特に第 24 番目のアミノ酸にあたるプロリン)、POU ドメインの双方が必要である。2. P24L の機能は一部残存しているので、Pit-1 には CBP と独立して機能する未知のコアクチベーターが存在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 による発現増強に重要である可能性が示唆された。

#### G. 研究発表論文

Novel function of the transactivation domain of a pituitary-specific transcription factor,

Pit-1. J Biol Chem. 2002 Nov 22;277(47):45141-8.

## 成人下垂体機能低下症の生命予後に関する研究

分担研究者 加藤 讓 島根医科大学第一内科教授  
研究協力者 村上宜男 同上 助教授

研究要旨:成人下垂体機能低下症の生命予後について、全国疫学調査成績に基づいて検討した。成人下垂体機能低下症患者のうち高度の機能障害を有する腫瘍性疾患、特に頭蓋咽頭腫を原疾患とするものでは生命予後が不良であることが示唆される。

### A. 研究目的

欧州における疫学調査では、下垂体機能低下症患者の血管障害による死亡率は、年齢、性別で標準化した期待値に比較してが高いことが報告されている（文献1）。

本邦では、平成4年度施行の全国疫学調査において下垂体前葉機能低下症患者の死亡年齢は平均約55歳であったが、死因については副腎不全を除いては特別の傾向は認められなかった（文献2）。また、平成13年度施行の成人下垂体機能低下症全国疫学調査において、14例の死亡例が報告された。直接死因のうち脳出血2例、心不全1例、突然死1例で、血管障害による死亡は少数であることを報告した（文献3）。

ホルモン補償療法中に出現した主な合併症として、高脂血症、糖尿病、高血圧など血管障害の危険因子となる疾患については多数の報告例が得られたが、狭心症などの心疾患、脳梗塞の発症はそれぞれ6例のみであった（文献3）。したがって、本邦の成人下垂体機能低下症患者においては心血管系疾患の発症やこれらによる死亡は多くはないが、これには高脂血症治療薬や循環器用薬を用いた危険因子の治療が寄与している可能性が考えられた。

今回は成人下垂体機能低下症の生命予後および予後不良に関与する因子についてより詳

細に検討した。

### B. 研究方法

平成13年度施行の成人下垂体機能低下症全国疫学調査の2次調査票を基にして、死亡例の病態について検討した。また、生存例については、下垂体機能低下症の発症年および発症推定年齢に基づいて予後の評価を試みた。

### C. 研究結果

死亡例14例のうち、下垂体機能低下症の原疾患が非腫瘍性疾患のものは2例のみで、他の12例では腫瘍性疾患を有していた。腫瘍性疾患12例のうち、非機能性下垂体腺腫が5例、頭蓋咽頭腫が4例、その他が3例であった（表1）。非機能性下垂体腺腫では、24歳で死亡した1例を除いて他の4例の死亡年齢は69ないし75歳であった。一方、頭蓋咽頭腫患者の死亡年齢は39ないし48歳で、発症後2ないし6年後に死亡した。

非機能性下垂体腺腫5例のうちMR検査が施行された3例全例でマクロアデノーマの上方進展が認められた。非機能性下垂体腺腫と頭蓋咽頭腫の全例で手術が施行され、このうち5例が開頭術であった（表1）。非機能性下垂体腺腫の1例と頭蓋咽頭腫の2例で放射線照射が施行された。非機能性下垂体腺腫と頭蓋咽頭腫を除く

腫瘍性疾患3例では原疾患に対する手術は行われなかった。機能的には、多くの症例が多種類のホルモン分泌障害を合併していた。また、4例は体温調節異常を、7例は視力視野障害を有していた(表2)。以上のように、死亡例は原疾患の病変の拡がりが高く、侵襲的な治療が行われている例が多く、機能的にもホルモン分泌障害、視床下部障害ともに高頻度であることが明らかとなった。

次に、生存例について発症推定年齢および発症年に基づいて検討した。非機能性下垂体腺腫(図1)および頭蓋咽頭腫患者(図2)の調査時年齢、発症推定年齢および発症年を示す。非機能性下垂体腺腫患者の調査時年齢は60歳台が最多で、発症推定年齢に比較して約10年の差がみられた。調査直近の1996~2000年の5年間の発症例数に比較すると、1991~1995年および1986年~1990年の発症例数はそれぞれ92%、73%であった。一方、頭蓋咽頭腫患者では、調査直近の5年間の発症例数に比較すると1991~1995年および1986年~1990年の発症例数はそれぞれ66%、32%で、非機能性下垂体腺腫に比較して予後が不良である可能性が示唆された。1981~1985年の発症例数が多かったが、これらは小児期に発症し成人に達した群を反映するものと考えられた。比較のためにシーハン症候群について検討した場合には、調査時年齢は60歳台が最多で、発症推定年齢に比較して約40年の差がみられること、および1955年~1960年の発症例がなお多数報告されていることから、予後は良好であることが示唆された。

#### D. 考察

下垂体機能低下症は、視床下部下垂体の種々

の異常ならびに原疾患に対する手術や放射線照射の結果、一つ以上の下垂体前葉ホルモンの分泌が恒常的に障害された疾患である。原疾患とそれに対する治療、分泌障害ホルモンの組み合わせとホルモン補償療法、さらに合併症の発現によって多様な病態が形成される。

平成13年度施行の成人下垂体機能低下症全国疫学調査成績において、死亡例は非機能性下垂体腺腫(5例)と頭蓋咽頭腫(4例)を原疾患とするものに多く、成人下垂体機能低下症全体の原疾患(文献3)を考慮すると、上記2疾患を含む腫瘍性疾患の予後が不良であると考えられる。特に頭蓋咽頭腫を原疾患とするものでは死亡年齢が若年で罹病期間が短期間であることから生命予後が不良である可能性が示唆された。横断的な疫学調査成績に基づくものではあるが、発症年ごとの生存患者数の評価の結果も上記の結果に矛盾しないものであった。

下垂体機能低下症患者では、年齢、性別で標準化した期待値に比較して血管障害による死亡率が高いことが報告され、GH欠損症の関与が推定されている(文献1)。さらに、補償療法を受けていないゴナドトロピン(Gn)分泌低下症において死亡率が高いことも報告されており(文献4)、これらはホルモン分泌障害が下垂体機能低下症患者の生命予後関与することを示唆するものである。放射線照射については、照射を受けた患者では脳血管障害による死亡率が高い可能性が示された(文献4)。一方、下垂体腺腫患者における脳血管障害の発症には放射線照射よりもホルモン分泌障害の期間の重要性を示唆する成績も報告されている(文献5)。

今回の検討によって、死亡例は原疾患の病変の拡がりが高く、放射線照射を含めた侵襲的な治療が行われている例が多く、機能的にもホルモン分泌障害、視床下部障害ともに高頻度であ

ることが明らかとなった。したがって、本邦の成人下垂体機能低下症患者の予後評価に際して、GH欠損症を含むホルモン分泌障害の重症度と原疾患の拡がりや治療の侵襲度を分離して評価することは困難であると考えられる。

#### E. 結論

非機能性下垂体腺腫と頭蓋咽頭腫が死亡例の多くを占め、頭蓋咽頭腫では若年で死亡し、罹病期間も短期間であった。死亡例では侵襲の強い治療を受けた例や多種類のホルモン分泌低下を合併する例が多く、体温調節異常や視力視野障害も高頻度に認められた。

以上の成績から、成人下垂体機能低下症患者のうち高度の機能障害を有する腫瘍性疾患、特に頭蓋咽頭腫を原疾患とするものでは生命予後が不良であることが示唆される。

#### 文献

1. Rosén T, Bengtsson B-Å: Premature mortality due to cardiovascular disease

in hypopituitarism. *Lancet* 336: 285-288, 1990.

2. 對馬敏夫：わが国における下垂体前葉機能低下症の実態について。厚生省特定疾患間脳下垂体機能障害調査研究班（班長：入江実）平成7年度総括研究事業報告書、61-64, 1996.
3. 村上宜男、横山徹爾、大磯ユタカ、加藤 讓：疫学調査からみた成人下垂体機能低下症の臨床像。厚生労働省特定疾患間脳下垂体機能障害調査研究班（班長：加藤 讓）平成13年度研究事業報告書、170-176, 2002.
4. Tomlinson JW, Holden N, Hills RK, et al.: Association between premature mortality and hypopituitarism. *Lancet* 357: 425-431, 2001.
5. Erfurth EM, Bülow B, Svahn-Tapper G, et al.: Risk factors for cerebrovascular deaths in patients operated and irradiated for pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 4892-4899, 2002.

表1 死亡例のMR所見と原疾患に対する治療

症例	原疾患	MR 所見					治療		
		下垂体 macroadenoma	トルコ鞍部 占拠性病変	下垂体茎 上方伸展	下垂体茎 の腫大	empty sella	後葉高信号 の消失	手術術式	放射線照射
1	非機能性下垂体腺腫							TSS	
2	非機能性下垂体腺腫	(+)		(+)				Cranial	
3	非機能性下垂体腺腫							TSS	(+)
4	非機能性下垂体腺腫	(+)		(+)				TSS	
5	非機能性下垂体腺腫	(+)		(+)				Cranial	
6	頭蓋咽頭腫		(+)					Unknown	
7	頭蓋咽頭腫		(+)	(+)				Cranial	(+)
8	頭蓋咽頭腫						(+)	Cranial	(+)
9	頭蓋咽頭腫							Cranial	
10	転移性		(+)		(+)		(+)		
11	悪性奇形腫		(+)						
12	その他の腫瘍		(+)	(+)	(+)		(+)		
13	Sheehan 症候群					(+)			
14	外傷性				(+)				

表2 死亡例のホルモン分泌障害と体温調節および視力視野障害

症例	Gn 分泌障害	PRL 分泌障害	ACTH 分泌障害	TSH 分泌障害	GH 分泌障害	ADH 分泌障害	体温調節異常	視力視野障害
1	(+)							
2			(+)	(+)				(+)
3	(+)		(+)	(+)	(+)			
4	(+)				(+)			
5	(+)		(+)	(+)		(+)		
6	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)		(+)
7	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	
8			(+)	(+)		(+)	(+)	(+)
9	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)			
10	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
11	(+)		(+)	(+)				(+)
12			(+)	(+)		(+)		(+)
13	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)			
14	(+)		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

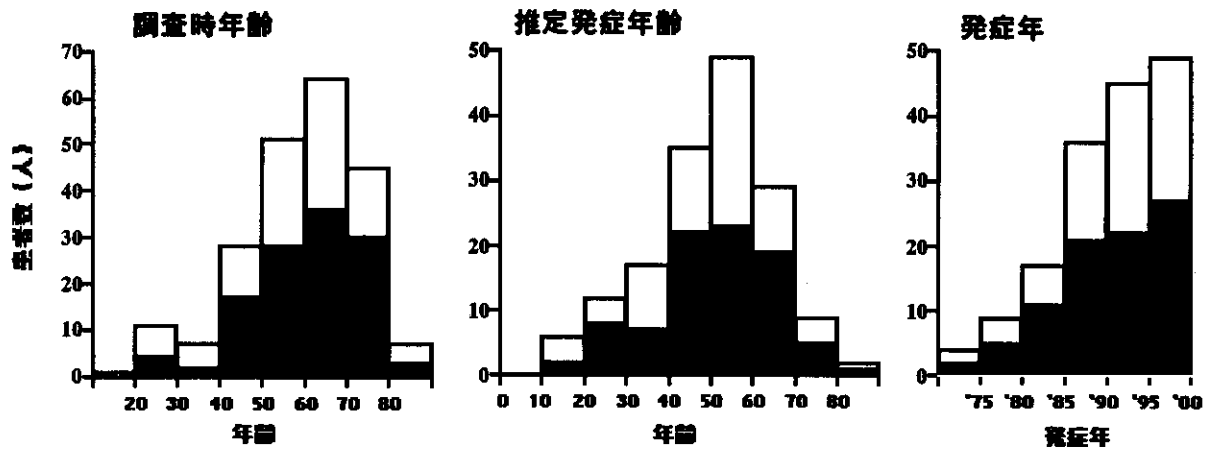


図1 調査時年齢、推定発症年齢および発症年からみた非機能性下垂体腺腫患者数の分布 ■：男性、□：女性を示す。

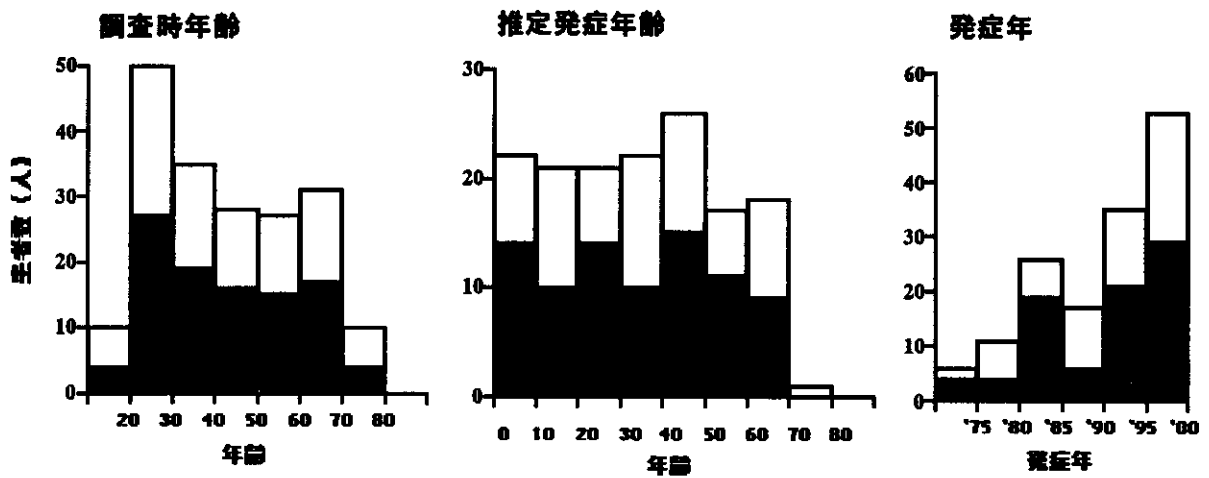


図2 調査時年齢、推定発症年齢および発症年からみた頭蓋咽頭腫患者数の分布 ■：男性、□：女性を示す。



厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

間脳下垂体機能障害に関する調査研究

先端巨大症の診断に関する考察：成長ホルモンの持続的分泌過剰を伴わずにインスリン様成長因子-1が高値を示した下顎前突症の1例

分担研究者 島津 章 国立京都病院臨床研究部長

研究要旨

先端巨大症の診断の手引きを改訂するため、診断に難渋した症例に関し臨床所見および検査所見、臨床経過について解析した。先端巨大症の部分症状として下顎前突症と手掌の発汗過多、足底部軟部組織厚の増加、肥満があり、下垂体病変を認め、スクリーニング検査でIGF-1の高値がみられた。空腹時血中GH基礎値は変動したが、ブドウ糖により完全に抑制された。TRHやGnRH、CRHに対して奇異性上昇はなく、尿中GH排泄量は測定感度以下でGHの持続的過剰分泌はみられなかった。下垂体病変は腺腫を示唆するものでなく、先端巨大症と診断されなかった。GHに対するIGF-1の過敏性もしくは過剰反応が疑われた。4年間の経過で肥満は変わらなかったが血中IGF-1は正常化した。以上より、先端巨大症の診断には、臨床症候、GHの分泌過剰とIGF-1高値の証明および下垂体腺腫の画像所見が必須である。

A. 研究目的

先端巨大症・下垂体性巨人症の「診断の手引き」は、昭和48年度下垂体機能障害調査研究班<sup>1)</sup>が疫学調査を行なった際に、調査対象を示すために作成され、その後数回の改訂を経て、平成7年度間脳下垂体機能障害調査研究班の報告<sup>2)</sup>が用いられている。しかし、手引きが長年の間に一般には「診断基準」と解され、疾患の絶対的必要条件とする考え方もあり、「診断の手引き」の要件を再定義する必要がある。画像診断の進歩と成長ホルモン(GH)および関連因子の測定法の変遷によりGH基礎値が低い早期の先端巨大症が発見されており、一部の項目に手直しが必要となっている。また、治療の必要性和治療目標の設定、治療基準に関する国際的コンセンサス<sup>3)</sup>が提唱されており、診断基準との整合性が必要である。先端巨大症の診断の手引きを改訂するため、診断に難渋した症例に関して解析した。

B. 研究方法

今回、先端巨大症を疑われた下顎前突症においてGH分泌とインスリン様成長因子-1(IGF-1)に乖離がみられた1例を経験した。この症例に関し臨床所見および検査所見、臨床経過について詳細な解析を加えた。

(倫理面への配慮)

今回対象の症例に関して診療の一環として医療行為を行っており、諸検査成績など個人を特定できる情報は一切排除した。個人情報に関する注意事項について最大限の配慮をした。

C. 研究結果

症例報告。

症例：24歳 男性 製造業

主訴：下顎の前突、手掌の発汗過多

家族歴：父方の祖父：高血圧、糖尿病、

冠動脈疾患、父：高血圧、糖尿病

既往歴：幼少時から12歳まで気管支喘息、10歳時からアレルギー性鼻炎。14

歳時、肥満にて1ヶ月間の入院歴がある。  
現病歴：18歳時、咬合不全を指摘され近所の歯科にて矯正を受けていた。22歳時、下顎の過成長による顎変形症のため京都大学医学部附属病院口腔外科を受診した。24歳時、先端巨大症の可能性を指摘され、精査のため入院した。今までに、四肢末端の肥大、頭痛、視野・視力障害などの自覚はなく、急激な身長増加もない。靴のサイズは28cmで変化はない。小児期からの肥満で、最高体重は18-19歳で160kg、20歳で83kg、入院前は105kg前後であった。

現症：身長179.9cm、体重113.2kg、体格指数34.9kg/m<sup>2</sup>。血圧右140/60mmHg、左136/56mmHg。脈拍68分、整。び慢性甲状腺腫(横径55mm)。腹壁に肥満による白色皮膚線条、手掌の発汗過多を認めた。下顎前突はあるが、口唇肥大、鼻翼拡大、前額部突出などの先端巨大症様顔貌は明らかでない。胸腹部、神経学的に異常はない。眼科的異常もない。

一般検査成績：検尿、血液学的検査は正常。生化学検査では総ビリルビン1.9-2.4mg/dl、直接ビリルビン0.6-0.8mg/dlと間接型優位高ビリ血症、P 2.0mg/dlと低値以外に異常を認めなかった。ALP 205IU/L、HbA1c 4.4%も正常であった。

心電図、心臓超音波検査ともに正常。BMR -18.8%。DEXA法による体脂肪率30.2%、大腿骨頸部、腰椎の骨密度はそれぞれ0.990および1.061g/cm<sup>2</sup>と基準範囲内であった。骨代謝マーカーは、尿中NTX、DPD、血中BGPともにほぼ基準範囲内であった。

内分泌学的検査：下垂体前葉及び標的臓器のホルモン基礎値は、GH (IRMA法) 3.8ng/ml、IGF-1 652ng/ml、IGFBP-3 3.95 μg/ml、PRL 2.6ng/ml、LH 6.3mIU/ml、FSH

7.6mIU/ml、テストステロン 4.7ng/ml、TSH 5.0 μU/ml、free T4 1.29 μg/dl、free T3 2.84pg/ml、ACTH 31pg/ml、コルチゾール 10.6 μg/dl。尿中遊離コルチゾール 58.4 - 97.6 μg/日であった。

下垂体前葉ホルモンの分泌予備能は、TSH 5.3→28.6 μU/ml (TRH: 30分後)、PRL 3.8→37ng/ml (TRH: 15分後)、LH 4.6→81mIU/ml (GnRH: 30分後)、FSH 5.8→20.3mIU/ml (GnRH: 60分後)、ACTH 31→90pg/ml (CRH: 30分後)、コルチゾール 9.9→15 μg/dl (CRH: 30分後)、GH 0.14→11.6ng/ml (GRH: 60分後)であった。

早朝空腹時血中GHの基礎値は0.14-11.3ng/mlまで変動した。図1に示すように、血中GH前値は24.5ng/mlであったが、75gブドウ糖投与により120分後に0.27ng/mlと完全に抑制された。血糖曲線は正常型で、インスリンの過剰反応はみられなかった(前値5.2→90分後47 μU/ml)。TRH、GnRH、CRHに対して血中GHは120分後に16.0、10.1、14.7ng/mlの値をとったが、これらは自然のGHサーージを捉えたものと考えられた。ドパミン(2 μg/min/kg体重;120分後)負荷では血中PRLは正常に抑制され、GHは健常人と同様、ドパミン注入中に増加し(頂値7.4ng/ml)、注入中止後の増加反応はみられなかった。尿中GH排泄量は、8.6 pg/mgクレアチニン以下-25.5pg/mgクレアチニン以下と5回の測定全てで測定感度以下であった。

IGF-1にGH依存性がみられるかどうかを検索する目的で、酢酸オクトレオチド1日150 μgを3日間、続いて300 μgを3日間皮下投与した。血中IGF-1は、投与前761ng/ml、4日目548ng/ml、7日目395ng/mlと、オクトレオチド投与後に明らかな減少をみた。

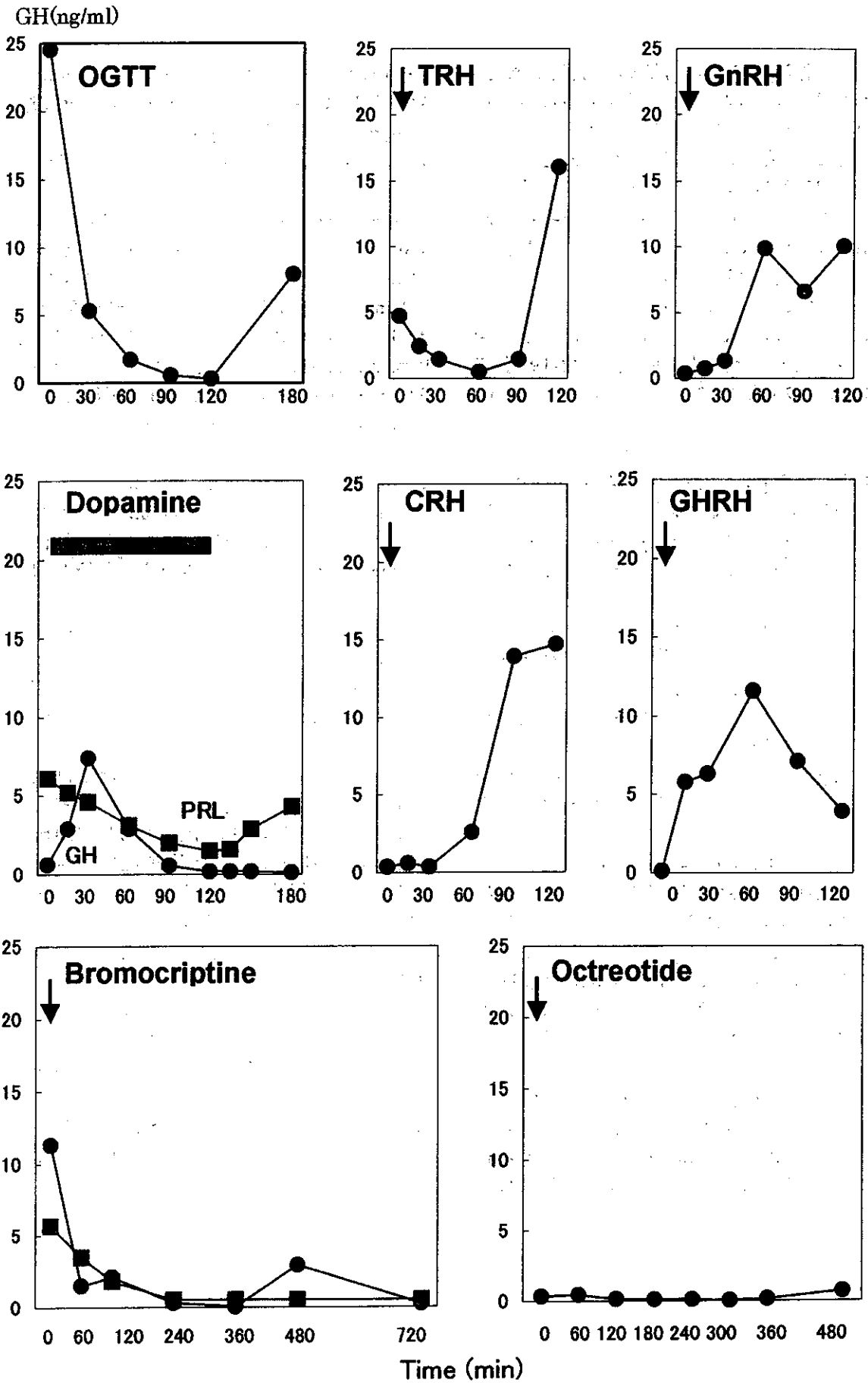


図1. 各種負荷試験における血中 GH(●)および PRL(■)の分泌動態

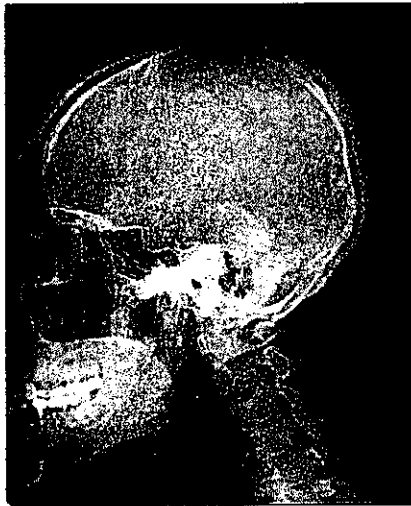


図 2. 頭蓋単純 X 線側面像

画像検査：頭蓋骨単純 X 線（図 2）で、トルコ鞍の拡大はなく、下顎突出、上顎洞・前頭洞の軽度拡大、後頭結節突起突出がみられた。手指末節骨の花キャベツ様変形なし。足底部軟部組織厚(heel pad thickness)は左右とも 22mm であった。頭部 MRI では下垂体の腫大なく、左側後半部に 9mm 大の嚢胞性病変を認めた（図 3）。

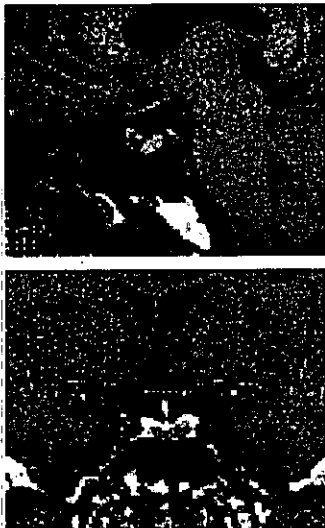


図 3. 頭部 MRI 画像  
上段：矢状断 T1 強調  
下段：冠状断ガドリニウム造影

T1 強調で軽度高信号、T2 強調で軽度低信号を呈し、ガドリニウム造影では全く信号強度の変化がみられないことから、ラトケ嚢胞が最も疑われた。

**臨床経過：**下顎前突症と手掌の発汗過多、足底部軟部組織厚の増加、肥満、血中 IGF-1 の高値がみられたが、血中 GH の過剰分泌や異常増加反応を認めず、下垂体病変も腺腫の存在を強く示唆するものではないため、先端巨大症と診断するに至らなかった。GH に対する IGF-1 の過敏性・感受性亢進が疑われた。外来で血中 GH、IGF-1、IGFBP-3 の測定と前突度の推移について経過を観察した。一時 IGF-1 は 840ng/ml、IGFBP-3 4.96  $\mu$ g/ml まで増加したが、その後減少し下顎前突症の増悪もみられないため、26 歳時、口腔外科にて下顎枝矢状分割術を受け、over jet -7.5→3mm; over bite 4.0→3mm; SKA 45→15mm と改善した。現在、28 歳で血中 GH 1.0ng/ml、IGF-1 347ng/ml、IGFBP-3 2.59  $\mu$ g/ml であり、下垂体嚢胞性病変も不変である。

#### D. 考察

本症例では、小児期からの肥満に加えて下顎突出、咬合不全、足底部軟部組織厚の増加がみられた。手掌の発汗過多は認めるが、全身性の発汗過多ではない。四肢末端の肥大は顕著でなく先端巨大症様顔貌の変化も明らかでない。頭痛、手根管症候群などの感覚障害、関節痛、疲労など臨床的活動性を示す症候にも乏しい。高血圧、耐糖能異常はなく、一般検査にて血清リン値および基礎代謝率はむしろ低く、活動性の先端巨大症は考えがたい。画像検査で下垂体に嚢胞性病変が認められたが、造影検査から下垂体腺腫よりはラトケ嚢胞の可能性が高いと考え、経過観察とした。

血中 IGF-1 値は年齢・性別の基準範囲を凌駕して明らかな高値を示したため、GH 分泌動態について精査した。その結果、早朝空腹時血中 GH の基礎値は大きく変動したが、尿中 GH 排泄量は感度以下であり、GH の持続的分泌の過剰を認めなかった。TRH や GnRH、ドパミン作動薬に対する異常反応もみられず、ブドウ糖経口投与で血中 GH は底値 0.27ng/ml まで明らかに抑制された<sup>3)</sup>ことから、GH 分泌動態はほぼ正常と考えられた。

GH 分泌が正常でありながら IGF-1 が高値を示す病態をどのように考えるか？酢酸オクトレオチドを 6 日間投与したところ、血中 IGF-1 値は 761→548→395ng/ml と明らかに減少した。尿中 GH 排泄量は低いままであった。酢酸オクトレオチドが IGF-1 産生を直接抑制する可能性は残るが、血中 IGF-1 は GH 抑制により正常化しており、少なくとも一部に GH 依存性があることを示している。本症例では、思春期においてみられるような GH に対する IGF-1 産生の過敏性、感受性亢進が存在する可能性<sup>4)</sup>が考えられる。次に肥満が IGF-1 産生を促進している可能性はどうか？通常、肥満患者において GH 分泌は抑制されるが遊離 IGF-1 は高値であると報告<sup>5)</sup>されている。しかし総 IGF-1 および IGFBP-3 が共に高値をしめす例はほとんどない。さらに、本例では肥満の改善がほとんどないまま、数年の経過で徐々に IGF-1 が低下し正常域に入った。肥満と IGF-1 産生との関連は今後の検討課題である。

IGF-1 高値が下顎前突に関連しているか？入院精査後外来で 1 年 10 ヶ月間 IGF-1 値と下顎前突度の推移を観察した。IGF-1 は基準範囲を超えて依然高値であったが、明らかな下顎前突の進行はみられなかったことから、2 年弱の間では

影響していないと結論された。入院中の骨代謝マーカーについても異常値はみられなかった。下顎前突の悪化がないため、口腔外科にて下顎枝矢状分割術に踏み切った。

GH 分泌が正常で IGF-1 が正常でありながら先端巨大症の症状を呈する疾患に acromegaloidism および pseudoacromegaly と呼ばれる病態が知られている。Acromegaloidism では BFU-E の成長因子活性が高い<sup>6)</sup>と報告されている。一方、pseudoacromegaly<sup>7)</sup>においてはインスリン受容体異常症などによる強度のインスリン抵抗性から高濃度のインスリンによる IGF-1 受容体活性化の機序<sup>8)</sup>が想定されている。本例において肥満はあるものの空腹時血中インスリンは高くなく、ブドウ糖経口投与でも高反応はみられず、pseudoacromegaly の可能性は少ない。

#### 参考文献

- 1) 鎮目和夫：厚生省特定疾患下垂体機能障害調査研究班 昭和 48 年度総括研究事業報告書、29-31、1973
- 2) 加藤譲：厚生省特定疾患間脳下垂体機能障害調査研究班（班長 入江實）平成 7 年度総括研究事業報告書、197-198、1995
- 3) Giustina A, et al. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85: 526-529
- 4) Merimee TJ, et al. Adv Exp Med Biol 1991; 293: 85-96
- 5) Frystyk J, et al. Metabolism 1995; 44: 37-44
- 6) Ashcraft MW, et al. J Clin Endocrinol Metab 1983; 57: 272-276
- 7) Flier JS, et al. J Clin Endocrinol Metab 1993; 76: 1533-1541
- 8) Dib K, et al. J Clin Invest 1998; 101: 1111-1120

## E. 結論

先端巨大症の部分症状を呈し、同時に下垂体に病変があり、スクリーニング検査でIGF-1高値がみられた下顎前突症の1例を報告した。尿中GH排泄量やGH分泌動態の検討から、GHの持続的な分泌の過剰はみられず、現段階で先端巨大症でないと判断した。先端巨大症の診断には、臨床症候、GH分泌の過剰とIGF-1高値の証明および下垂体腺腫の画像所見が必須である。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 島津章：先端巨大症，日本医師会雑誌特別号「内分泌疾患診療マニュアル」127(12)：S208-S211，2002
- 2) 島津章：成長ホルモンの代謝作用(糖，脂質，蛋白，電解質)，内分泌・糖尿病科15(Suppl. 1)：129-137，2002
- 3) 島津章，葛谷英嗣：治療薬としてのIGF-1，内分泌・糖尿病科15(Suppl. 1)：297-301，2002
- 4) 島津章，佐野壽昭，加藤元一：下垂体柄断裂による下垂体機能低下症の1剖検例，ホルモンと臨床50('02夏季)増刊号：5-10，2002

### 2. 学会発表

- 1) Shimatsu A.: Plenary lecture, Clinical epidemiology of hypopituitarism in Japan. 6<sup>th</sup> HypoCCS Symposium and Investigator Meeting, Miami, USA, 2002.3.9
- 2) Shimatsu A, Usui T, Tagami T, Kuzuya H.: Suppressed growth hormone and insulin-like growth factor-1 levels during pregnancy in persistent

acromegaly. The 84<sup>th</sup> Annual Meeting of the Endocrine Society, San Francisco, USA 6.19-22, 2002

- 3) 島津章，臼井健，田上哲也，葛谷英嗣：成長ホルモン産生下垂体腺腫による先端巨大症：診断と治療の実際，クリニカルアワー1「興味ある症例 下垂体腺腫」，第75回日本内分泌学会学術総会，大阪，2002.6.28(演題C1-5，第75回日本内分泌学会学術総会抄録集，日本内分泌学会，78(1)：54，2002)
- 4) 島津章，臼井健，田上哲也，葛谷英嗣：成人成長ホルモン分泌異常症における体組成，血中脂質異常と血管障害について．第75回日本内分泌学会学術総会，大阪，2002.6.29(演題P225，第75回日本内分泌学会学術総会抄録集，日本内分泌学会，78(1)：156，2002)
- 5) 佐藤哲子，島津章，田上哲也，河野茂夫，臼井健，山田和範，葛谷英嗣：先端巨大症の経過中に糖尿病性ケトアシドーシス性昏睡を発症した1例．第29回日本神経内分泌学会学術集会，高知，2002.10.11-12
- 6) 臼井健，髭秀樹，重光松崇，佐藤哲子，田上哲也，河野茂夫，山田和範，葛谷英嗣，島津章：成人発症の特発性低ゴナドトロピン性性腺機能低下症の臨床経過．第29回日本神経内分泌学会学術集会，高知，2002.10.11-12
- 7) 島津章：間脳下垂体疾患の診断および治療の手引き(2001年度改訂案)－厚生労働省間脳下垂体機能障害調査研究班会議から，第14回京滋小児内分泌代謝カンファレンス，京都，2002.02.23

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

### 高血糖による下垂体・副腎系機能亢進の分子メカニズム

分担研究者	橋本浩三	高知医科大学第二内科	教授
研究協力者	浅羽宏一	高知医科大学第二内科	
	岩崎泰正	名古屋大学医学部附属病院検査部	
	浅井真人	同病態内科学	
	吉田昌則	同病態内科学	
	二川原健	名古屋大学医学部附属病院検査部	
	高尾俊弘	高知医科大学第二内科	
	大磯ユタカ	名古屋大学医学部病態内科学	

研究要旨：コントロール不良の糖尿病患者で視床下部・下垂体・副腎系（HPA axis）の機能が亢進することが知られているが、その機序の詳細は不明である。以前より我々はこの機序に関して臨床的検討及び糖尿病・肥満モデルラットによる *in vivo*、ラット下垂体培養細胞系による *in vitro* の基礎的検討を行ってきた。今回我々は高グルコースがラット下垂体 POMC 遺伝子の発現にどのような影響を与えるかに関して AtT20 細胞を用いて検討した。ラット POMC 遺伝子 5'-プロモーター領域約 0.7kb と luciferase レポーターの fusion gene をマウス下垂体腫瘍細胞株 AtT20 細胞に導入し高グルコースが POMC 遺伝子プロモーター活性に及ぼす影響を luciferase assay を用いて評価した。また、転写因子反応性エレメントを有するレポーター及び各種シグナル伝達阻害剤を用いて、高グルコースによる変化の詳細についても検討した。培養液中のグルコース濃度を 3mM から 24mM に上昇させると POMC 遺伝子プロモーター活性は 6 時間で約 2 倍以上に上昇した。この効果は L-グルコースでは認められず、グルコースの代謝を介した作用であると考えられた。同様にグルコース濃度を上昇させると NFkB 反応エレメントを有するレポーター遺伝子の転写活性も約 2 倍以上に上昇した。また、NFkB 阻害剤やラジカル消去剤を添加するとグルコース濃度の上昇によって生じる POMC 遺伝子プロモーター活性の上昇は消失した。以上により、グルコース濃度の上昇は ACTH 産生細胞において POMC 遺伝子の発現を促進することが示唆された。この作用はグルコースの代謝を介したものであり、その機序の一部に NFkB などのフリーラジカル反応性の転写因子が関与している可能性が示唆された。

## A. 研究目的

血糖コントロール不良の糖尿病患者では、血中 ACTH、コルチゾールの増加がしばしば認められるが、その機序に関しては未だ明らかにされていない。コルチゾールは、糖質コルチコイドとして、肝臓からのブドウ糖の放出増加などを介して血糖値を増加させる働きがある。そのため血中コルチゾールの増加が血糖コントロールの増悪や糖尿病血管合併症の進展、肥満などの病態に関与している可能性が考えられている。このことより血糖コントロール不良の糖尿病患者における血中 ACTH、コルチゾールの増加の機序を解明し、これらの増加を抑えることが临床上重要と考えられる。そこで我々は、マウス下垂体 ACTH 産生細胞株である AtT-20 細胞を用いて、CRH を介さずにグルコースが直接 ACTH を分泌を亢進させているかに関して、ACTH をコードする Proopiomelanocortin (POMC) 遺伝子の転写活性を指標として検討した。

## B. 研究方法

マウス下垂体 ACTH 産生細胞株である AtT-20 細胞に、ラット POMC 遺伝子 5'-promoter と luciferase レポーター遺伝子との fusion gene を安定性に導入した AtT-20PL 細胞を用いた (共同研究者岩崎より提供)。細胞はフラスコ内にて 10% fetal bovine serum (FBS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (25 mM グルコース) で 37°C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターにて 4 日間培養後、24 well plate へ移し、更に 0.5% FBS DMEM (25 mM グルコース) で 4 日間培養した後以下の実験を行った。POMC 遺伝子プロモーター活性は luciferase assay

を用いて評価し、培養液中及び細胞内 ACTH 濃度は三菱化学の ACTH IRMA キットを用いて測定した。

実験 1 :、血清を含まない DMEM (3 mM グルコース) で 16 時間 preincubation した後、グルコースを添加し DMEM のグルコース濃度を 24 mM とし、POMC 遺伝子プロモーター活性の経時的変化を評価した。

実験 2 : 血清を含まない DMEM (3 mM グルコース) で 16 時間 preincubation し、3 mM 及び 24 mM グルコース DMEM へ medium を変換し 6 時間後の培養液中及び細胞内 ACTH 濃度を検討した。

実験 3 : 血清を含まない DMEM (3 mM D-グルコース及び L-グルコース) で 16 時間 preincubation し、3 mM 及び 24 mM グルコース (D-グルコース及び L-グルコース) DMEM へ medium を変換し 6 時間後の POMC 遺伝子プロモーター活性を比較検討した。

実験 4 : 各種プロモーター特異性 luciferase レポーター遺伝子 (CRE-Luc, API-Luc, SRE-Luc, NFκB-Luc) を用いて、グルコースによりどの様なレポーター遺伝子のプロモーターが活性化されているかを検討した。

実験 5 : グルコースにより活性化された POMC 遺伝子プロモーター活性が、各種シグナル伝達阻害剤 (H89, Ro-32-0432, wortmanin, PDTC) により減弱するか否かを検討した。H89 は PKA 阻害剤、Ro-32-0432 は PKC 阻害剤、wortmanin は PI3 kinase 阻害剤、pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) は NFκB 阻害剤である。

実験 6 : グルコースにより活性化された POMC 遺伝子プロモーター活性がラジカル消去剤である TEMPOL



(tetramethylpiperidine-1-oxyl)により減弱するか否かを検討した。

### C. 研究結果

実験1：グルコース刺激の3時間後より POMC 遺伝子プロモーター活性は有意に増加し、6時間後には刺激前の約2倍となりプラトーとなった(図1)。

実験2：グルコース刺激6時間後の培養液中及び細胞内 ACTH 濃度は、いずれも有意に増加した(図2)。

実験3：グルコースによる POMC 遺伝子プロモーター活性の亢進を D-グルコースと L-グルコースで比較すると、POMC 遺伝子プロモーター活性の亢進は、代謝的に非活性の L-グルコースでは僅かしか見られなかった(図3)。

実験4：各種プロモーター特異性 luciferase レポーター遺伝子を用いてグルコースによりどの様なプロモーターが活性化されているかを検討すると、グルコース刺激により、AP-1 並びに NFκB のプロモーターが有意に活性化された(図4)。

実験5：グルコースにより活性化された NFκB を介した系が、グルコースによる POMC 遺伝子プロモーター活性の亢進に関与しているか否かについて、シグナル伝達阻害剤を用いて検討すると、NFκB 阻害剤である PDTC を添加した場合、グルコースによる POMC 遺伝子転写活性亢進は消失したが、PKA, PKC, PI3 kinase などの阻害剤である H-89, RO, wortmanin では変化が認められなかった(図5)。

実験6：ラジカル消去剤である TEMPOL によりグルコースにより亢進する POMC 遺伝子プロモーター活性は元のレベルまで減

弱した(図6)。

### D. 考察

血糖コントロール不良の患者では、血中 ACTH 及びコルチゾールが、基準値の範囲内ではあるが、健常対照群に比し高値を示すことは良く知られており、高血糖ストレスによる結果であると解釈されている。しかし高血糖によるストレスが何であるのか、視床下部-下垂体-副腎系(HPA axis)のどのレベルでグルコースが作用し、HPA axis を亢進させているのかなどについては不明な点が多い。糖尿病モデル動物を用いた検討でも同様に血中 ACTH 及びコルチコステロンが対照群に比し高値を示すとされているが、動物実験レベルでもその機序については十分に検討されているとは言えない。以前我々は、糖尿病患者の血中 CRH を測定したが、対照群に比して有意に低値を示した(1)。また WBN/Kob ラットを用いた我々の検討では hypothalamus 内 CRH は糖尿病ラットと対照ラットで変わりなかった(2)。以上より、高血糖による ACTH やグルココルチコイドの上昇に視床下部レベルが関与している可能性は少ないと思われた。

下垂体レベルにおいては培養細胞を用いて検討した報告は少ない。我々は以前にラット下垂体前葉細胞単層培養系を用いた実験において、高グルコースの条件下で培養した場合、AVP に対する ACTH の反応性が亢進しており、下垂体レベルにおいてグルコースが ACTH 分泌に関して何らかの関わりを有していることを報告した(3)。今回の我々の検討でも、グルコースは POMC 遺伝子プロモーター活性を促進し ACTH 産生を増加させた。グルコースによる POMC 遺

伝子プロモーター活性の促進は L グルコースでは僅かしか認められず、ラジカル消去剤の前処置により消失した。また、グルコースにより、酸化ストレス反応性転写因子 AP1 ならびに NFκB のプロモーター活性が亢進し、NFκB 阻害剤でグルコースによる POMC 遺伝子プロモーター活性の促進は消失した。

以上により、高血糖による ACTH の産生、分泌の亢進の原因の一部は、グルコースによる NFκB を介した酸化ストレスの亢進が関与していることが示唆された。また、POMC 遺伝子プロモーター活性の亢進は、L グルコースでは認められなかったことより、浸透圧を解したものでではなく、主にグルコースの代謝を介したものであると考えられた。今までに骨芽細胞や腎糸球体メサンギウム細胞などの他の細胞培養実験においてもグルコースによりその機能に変化がもたらされることが報告されており、その変化は酸化ストレスを介したものであることが推定されている(4)。

#### E. 結論

高血糖による高 ACTH 血症の原因一部には、下垂体における酸化ストレスの亢進による NFκB などの亢進を介した POMC/ACTH の産生増加が関与している可能性が示唆された。

#### F. 参考文献

- (1) Hashimoto K et al, Low plasma corticotrophin releasing hormone (CRH) levels in patients with non insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Endocr J* 40:705-709, 1993
- (2) Tojo C et al, Hypothalamic pituitary adrenal axis in WBN/Kob rats with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Endocr J* 43:233-239, 1996
- (3) 浅羽宏一ほか、高グルコース濃度培養条件下におけるラット下垂体前葉細胞からの ACTH 分泌に関する検討、*日本内分泌学会誌* 76:p147, 2000
- (4) 多田久也ほか、高ブドウ糖濃度条件下におけるヒト培養メサンギウム細胞の機能異常に及ぼすトログリタゾンの効果。*糖尿病* 42:275-279, 1999

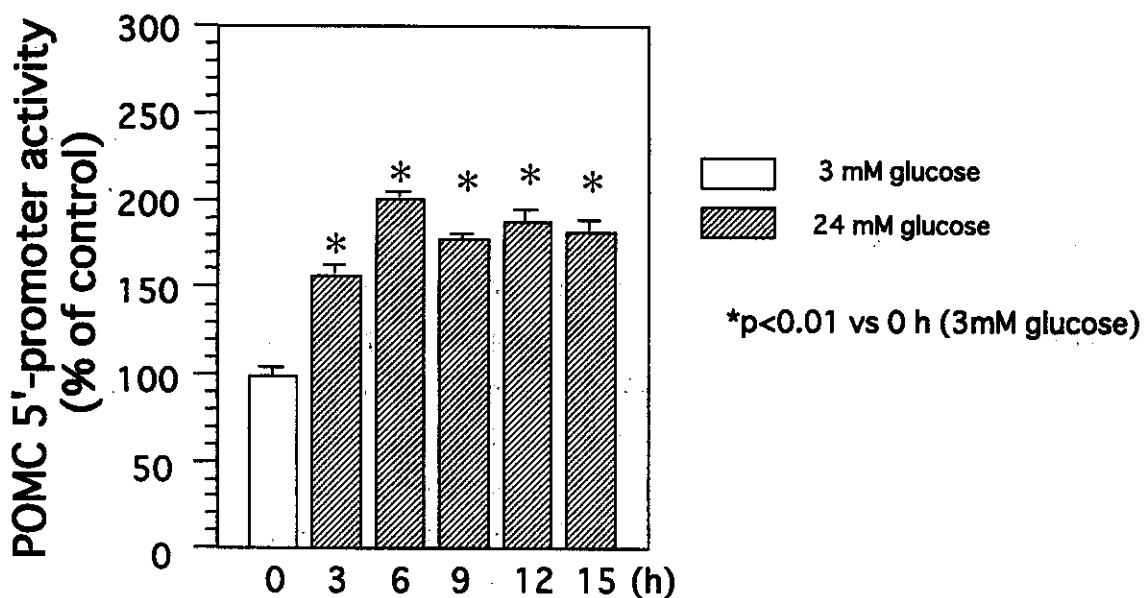


図1 高グルコースの POMC 遺伝子プロモーター活性に及ぼす影響。24 mM グルコース medium に変換後 3 時間で POMC 遺伝子プロモーター活性は有意に増加し、6 時間でプラトーとなった。

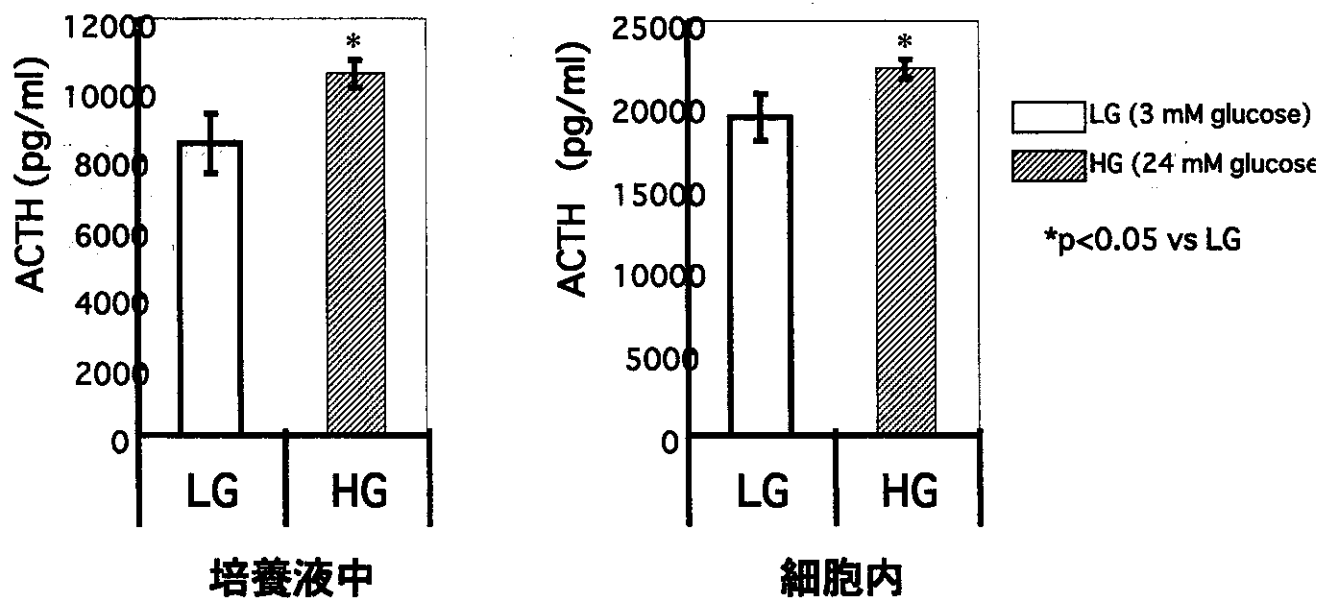


図2 AtT-20PLにおける高グルコース (6時間) の細胞内ACTHと培養液中ACTH濃度に及ぼす影響。24 mM グルコース medium に変換後 6 時間で、培養液中及び細胞内のACTH濃度は有意に増加していた。

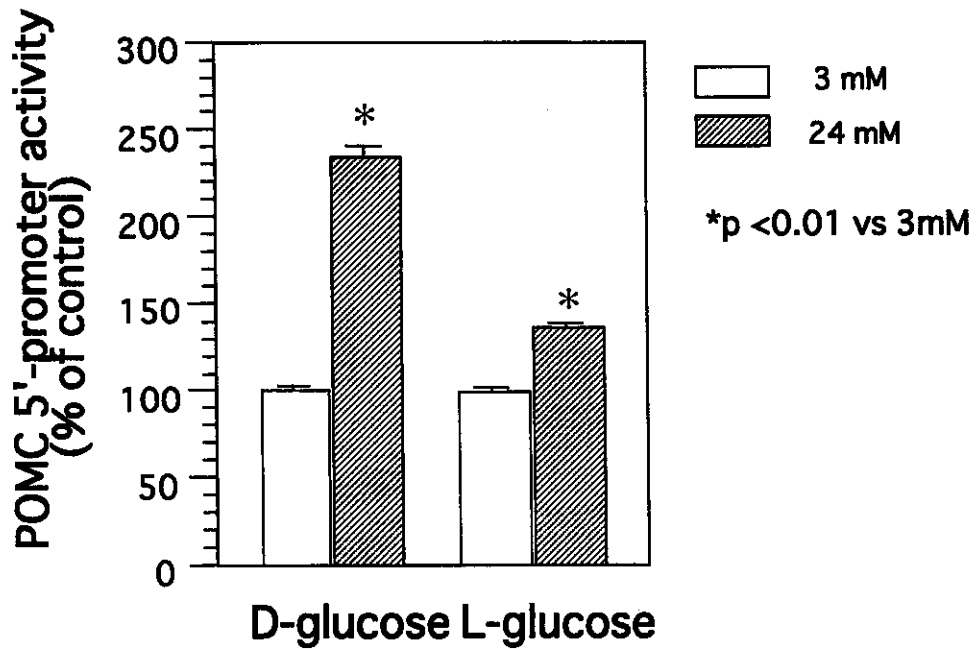


図3 高グルコースの POMC 遺伝子プロモーター活性促進作用におけるD-グルコース と L-グルコース の影響。代謝活性のないL-グルコースでは、24 mM グルコースによる POMC プロモーター活性の亢進は、僅かしか認められなかった。

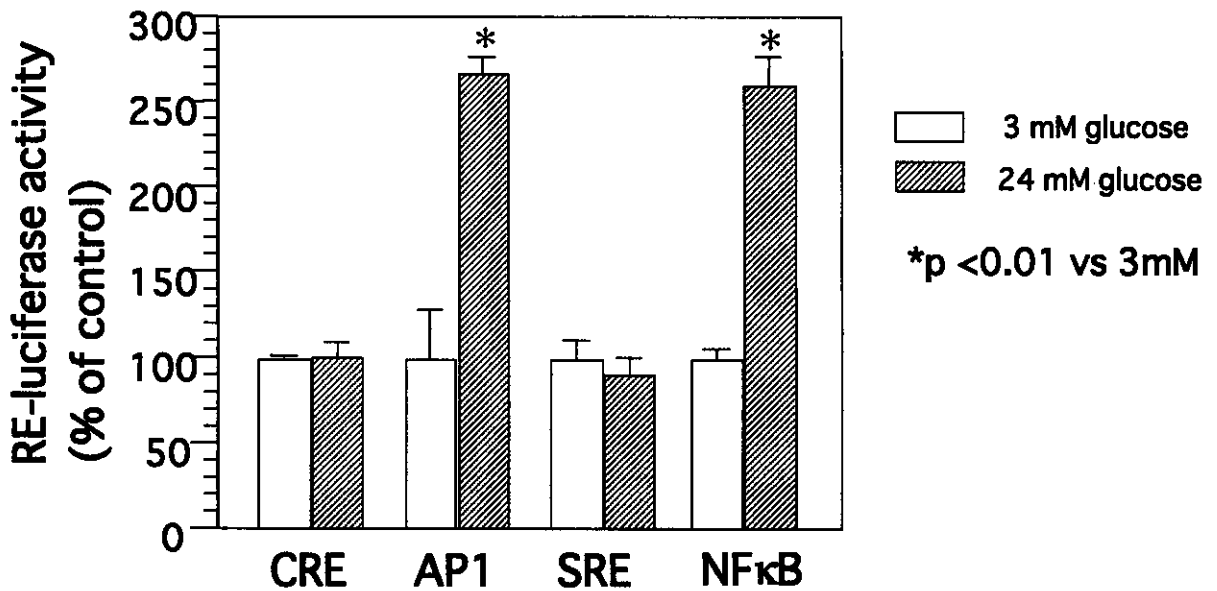


図4 高グルコースによる転写促進作用のプロモーター特異性。24 mM グルコース medium によりAP1及びNFκBのプロモーター活性は有意に亢進した。