

図5 高グルコースによる POMC 遺伝子プロモーター活性促進に及ぼす細胞内シグナル伝達阻害剤の影響。NFkB阻害剤であるPDTCにより、24 mM グルコースによって亢進したPOMC 遺伝子プロモーター活性が有意に抑制された。

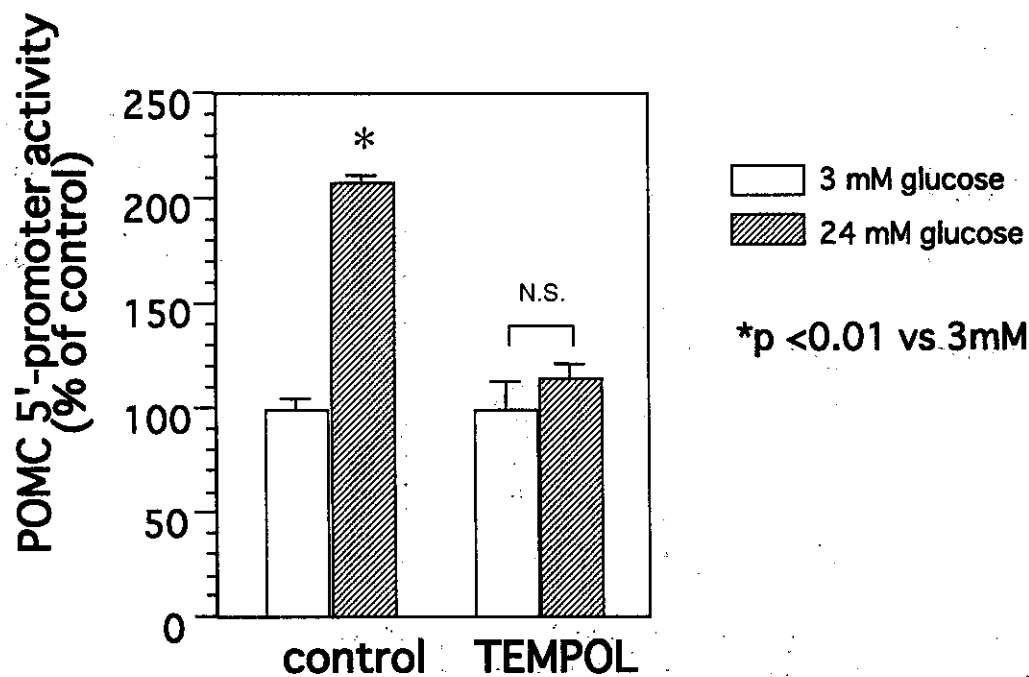


図6 高グルコースの POMC 遺伝子プロモーター活性促進作用に及ぼすラジカル消去剤前処置の影響。24 mM グルコースにより亢進したPOMC 遺伝子プロモーター活性は、ラジカル消去剤TEMPOLにより抑制された。

下垂体腺腫における PrRP 受容体発現

分担研究者	森昌朋	群馬大学医学部第一内科
研究協力者	山田正信	群馬大学医学部第一内科
	佐藤哲郎	同上
	門伝剛	同上

研究要旨：私たちは、多くの下垂体腺腫で PrRP 受容体 mRNA が高発現しているが、ドーパミン 2 (D2) 受容体の刺激薬であるプロモクリプチンで加療された患者の腺腫ではその発現が、極度に抑制されていることを見いだした。その機構を解明するため、PrRPR 遺伝子をクローニングし、その全構造を明らかとし、プロモーター領域を解析した。その結果、プロモクリプチンは PrRPR 遺伝子発現を負に制御し、この制御には-650 領域の CCCACATCAT 配列が責任配列であることが判明した。さらに、この領域には CREB が直接結合するのではなく、未知の転写因子が結合することが明らかとなった。

【背景】

Prolactin-releasing peptide (PrRP) は、下垂体の orphan 受容体 (hGR3) のリガンドとしてクローニングされたペプチドで、下垂体のプロラクチンを特異的に分泌することが報告されている (1、2)。私たちは、各種下垂体腺腫における PrRP 受容体 (PrRPR) mRNA 発現を検討し、多くの下垂体腺腫で PrRPR mRNA が高発現していることを明らかとした。さらに症例を重ねると、ドーパミン 2 (D2) 受容体の刺激薬であるプロモクリプチンで加療された患者の腺腫ではその発現が、極度に抑制されていることが判明した。本研究では、その機構を解明するため、PrRPR 遺伝子をクローニングし、プロモーター領域を解析した。

【方法と結果】

1, ヒト genomic DNA ライブラリーより、PCR にて増幅した PrRP 受容体 cDNA をプローブとしてヒト PrRP 受容体 (PrRPR) 遺伝子をクローニングした。PrRPR 遺伝子は全長約 2 kb で 2 個のエクソンと 1 個のイントロンより構成されていた (図 1)。翻訳開始部位は、エクソン 2 に認め、ポリ A 付加配列はストップコドンから、510 ならびに 714 塩基下流に 2 カ所存在した。転写開始点は、翻訳開始点より 139, 140 そして 161 塩基上流に 3 カ所存在した。プロモーター領域には、典型的な TATA あるいは CAAT 配列は認められず、AP1, SP-1, Pit-1 などの結合すると考えられる配列が認められた。

2, このプロモーター領域をルシフェーレスレポーターへと結合し、プロモータ

一活性を検討すると、下垂体由来の GH4C1 細胞で最もその活性が強く、-697 から-596 領域を含むもののみ、フォルスコリンならびに CREB により活性が増強した (図 2)。同様の領域で、ブルモクリプチン単独ではプロモーター活性に変化を与えないが、フォルスコリン、CREB により刺激された活性を低下させた (図 3A、B)。また、この影響は、時間依存性ならびに容量依存性だった (図 3C、D)。

3、次に、この責任領域に CREB が直接結合するか EMSA 法にて検討した。ドーパミン受容体 2 の存在する NB41A3 細胞から抽出した核蛋白質を用いると、この責任領域には、ある核蛋白が結合した。しかし、この核蛋白質は、CREB、SP-1、AP-1 いずれの抗体でも Supershift しなかった。また、この蛋白質の結合量は、ブルモクリプチンにより減少した (図なし)。従って、PrRPR 遺伝子のブルモクリプチンへの責任領域は、ある核内蛋白質が結合するが、CREB、SP-1、AP-1 いずれでもないことが明らかとなった。

4、さらに、この責任領域を詳細に解析するため、順次この領域に変異を作製した。その結果、3) で認められた核内蛋白質の結合には、-651 から-641 領域が必要であり、この部分に変異を作製したプロモーターではブルモクリプチンによる抑制が認められなくなった (図 4A、B)。

5、-656 から-636 領域に結合する核内蛋白質を ABC 法にて回収して SDS-PAGE にて解析すると、約 60kDa の蛋白質が特異的に結合することが判明した (図 5)。

【考察】

ブルモクリプチンは、プロラクチノーマーばかりでなく種々の下垂体腺腫の治療に用いられている。このブルモクリプチンは、ドーパミン受容体 (D2) の Agonist であり、Gi 蛋白質を介して細胞内 cAMP 濃度を低下させることが知られている。しかし、ブルモクリプチンの標的遺伝子を始めとしてその詳細な作用機構は不明である。

また、ブルモクリプチンの治療により、実際に下垂体腺腫が縮小すること、D2 受容体ノックアウトマウスでは下垂体腫瘍ができる事実などから、D2 受容体は下垂体腺腫の発生にも直接関与していることが示唆される (3、4)。従って、D2 受容体に制御される転写因子群を決定することは、今後の新たな下垂体腺腫の治療法、診断法開発への端緒となると考えられる。

今回の私達の結果により、PrRP 受容体遺伝子はブルモクリプチンによりその発現が負に制御されていること、この制御には-650 領域の CCCACATCAT 配列が責任配列であることが判明した。さらに、この領域には CREB が直接結合するのではなく、未知の転写因子が結合することも明らかとなった。現在、酵母 One-hybrid 法などにてこの特異的蛋白質を単離している。

【結論】

PrRP 受容体遺伝子は、ブルモクリプチンにより負に制御され、その責任領域は転写開始点から-650 塩基領域である。

【文献】

1. Welch S.K., O'Hara BF, Kilduff TS,

- Heller HC 1995 Sequence and tissue distribution of a candidate G-coupled receptor cloned from rat hypothalamus.
Biochem Biophys Res Commun 209: 606-613
2. Hinuma S, Habata Y, Fujii R, Kawamata Y, Hosoya M, Fukusumi S, Kitada C, Masuo Y, Asano T, Matsumoto H, Sekiguchi M, Kurokawa T, Nishimura O, Onda H, Fujino M 1998 A prolactin-releasing peptide in the brain.
Nature 393: 272-276
3. Bevan JS, Webster J, Burke CW, Scanlon MF 1992 Dopamine agonists and pituitary tumor shrinkage.
Endocr Rev 13: 220-240
4. Asa SL, Kelly MA, Grandy DK, Low MJ 1999 Pituitary lactotroph adenomas develop after prolonged lactotroph hyperplasia in dopamine D2 receptor-deficient mice.
Endocrinology 140: 5348-5355
- Sasaki T and Mori M. Transcriptional regulation of the human prolactin-releasing peptide (PrRP) receptor gene by a dopamine 2 receptor agonist: cloning and characterization of the human PrRP receptor gene and its promoter region.
Mol Endocrinol. 2002 Apr ; 16(4): 785-98.
- 2、学会発表
1) 小澤厚志、山田正信、石井角保、橋本貢士、門伝剛、佐藤哲郎、森昌朋。
Prolactin-releasing peptide(PrRP) 遺伝子および PrRP 受容体遺伝子の転写制御機構の解明。
第 75 回日本内分泌学会学術集会 2002. 6.28-30 大阪
日本内分泌学会雑誌 第 78 巻第 1 号 183 頁 2002 年
2) Ozawa A, Yamada M, Monden T, Satoh T, Mori M.
A novel 60kDa protein for transcriptional regulation of the human prolactin-releasing peptide receptor (PrRPR) gene by a dopamine 2 receptor agonist.
26th International Congress of Internal Medicine, Kyoto, Japan, 26-29 May 2002.
3) 小澤厚志、山田正信、橋本貢士、門伝剛、佐藤哲郎、森昌朋。
Bromocriptine による Prolactin-releasing peptide 受容体(PrRPR) 遺伝子の転写制御に関与する新たな脳・下垂体特異的核蛋白 P65 の同定。
第 28 回日本神経内分泌学会 2001. 10. 26-27. 東京
日本内分泌学会雑誌 第 77 巻第 2 号 307 頁 2001 年
4) 小澤厚志、山田正信、橋田哲、石井角保、門伝剛、佐藤哲郎、森昌朋。
Dopamine receptor agonist による下垂体腺腫における PrRP 受容体遺伝子の転写制御機構の解明。
第 74 回日本内分泌学会学術集会 2001. 6.29-7.1. 横浜
日本内分泌学会雑誌 第 77 巻第 1 号 75 頁 2001 年
5) 小澤厚志、山田正信、橋田哲、石井角保、門伝剛、佐藤哲郎、森昌朋。

【健康危険情報】

なし

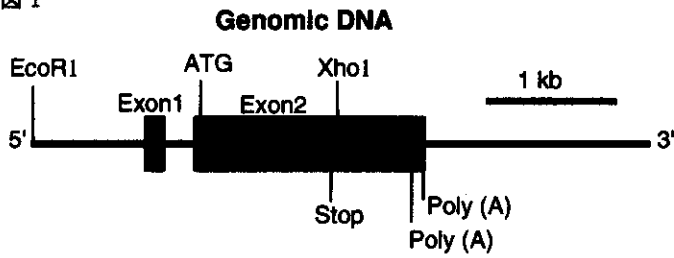
【研究発表】

1、論文発表

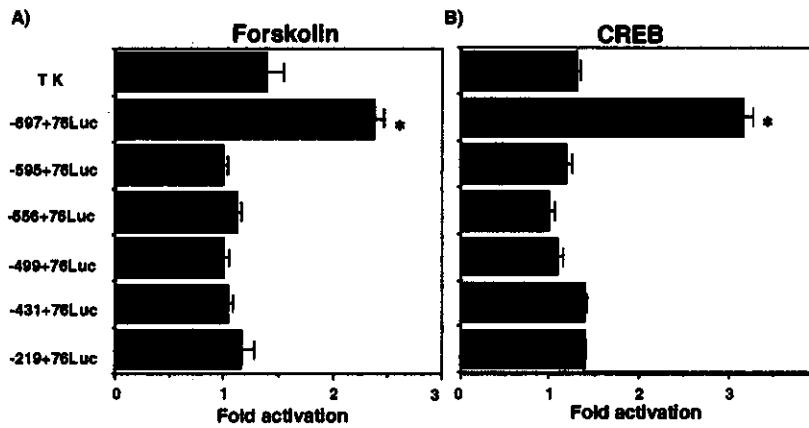
- 1) Ozawa A, Yamada M, Satoh T, Monden T, Hashimoto K, Kohga H, Hashiba Y,

- Prolactin-releasing peptide (PrRP) 受容体遺伝子の下垂体特異的転写因子 Pit-1 による発現調節機構。
第 27 回日本神経内分泌学会 2000. 10. 13-14. 神戸
日本内分泌学会雑誌 第 76 巻第 2 号 322 頁 2000 年
- 6) Ozawa A, Yamada M, Ishii S, Hosoya T, Ishizuka T, Monden T, Satoh T, Mori M.
Genomic organization and promoter function of the human prolactin-releasing peptide receptor gene.
11th International Congress of Endocrinology, Sydney, Australia, 29 October-2 November 2000. Abstract book p. 429.
- 7) 小澤厚志、山田正信、橋田哲、石井角保、門伝剛、小林聡、甲賀英明、佐藤哲郎、森昌朋。
PrRP 受容体遺伝子のクローニングとプロモーター領域の解析
第 73 回日本内分泌学会学術総会 2000. 6. 16-18. 京都
日本内分泌学会雑誌 第 76 巻第 1 号 76 頁 2000 年
- 8) 小澤厚志、山田正信、橋田哲、渋沢信行、石井角保、門伝剛、佐藤哲郎、甲賀英明、森昌朋。各種下垂体腺腫における Prolactin-releasing peptide(PrRP)受容体 mRNA の発現
第 26 回日本神経内分泌学会 1999. 10. 29-30. 東京
日本内分泌学会雑誌 第 75 巻第 2 号 329 頁 1999 年
- 【知的財産権の出願、登録状況】
なし

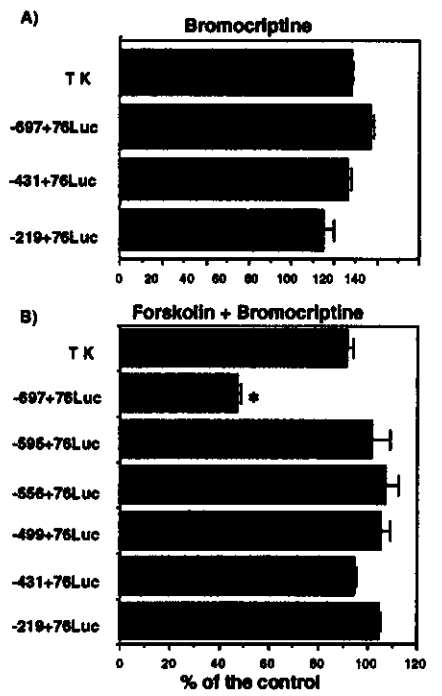
☒ 1



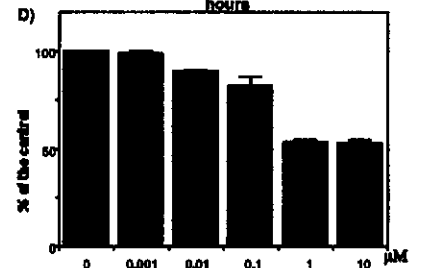
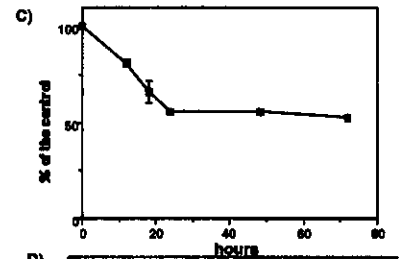
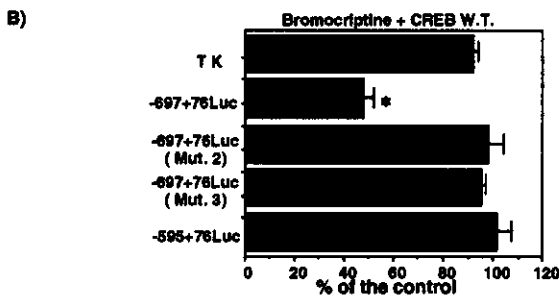
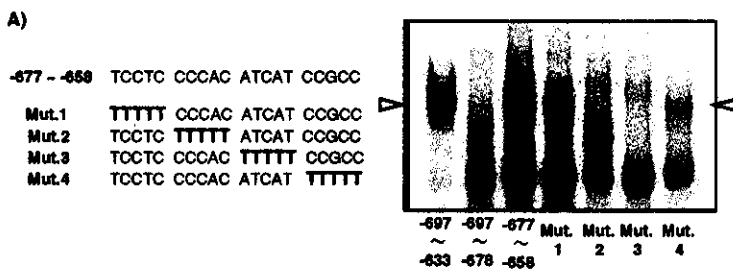
☒ 2



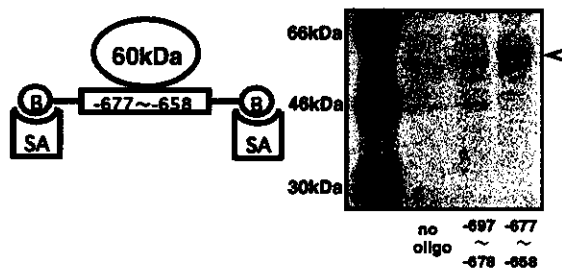
☒ 3



☒ 4



☒ 5



摂食促進物質オレキシンとグレリンの生殖機能に対する作用

分担研究者	苛原稔	徳島大学医学部発生発達医学講座女性医学分野
共同研究者	清川麻知子	徳島大学医学部発生発達医学講座女性医学分野
	松崎利也	徳島大学医学部発生発達医学講座女性医学分野
	田中尚子	徳島大学医学部発生発達医学講座女性医学分野
	尾形理江	徳島大学医学部発生発達医学講座女性医学分野

研究要旨：摂食促進物質オレキシン(ORX)とグレリン(GHR)は視床下部において GnRH 分泌を抑制し、LH 分泌を抑制する。今回は ORX、GHR の脳室内投与が性周期に与える影響を検討した。まず、両側卵巢摘出後の成熟雌ラットの第 3 脳室内に ORXA 3nmol、GHR1nmol、生理食塩水を投与し、投与 2 時間後の摂食量、投与 30 分後の血清 LH 濃度、LH パルス状分泌を検討した。次に ORXA(3nmol/日)と GHR(250pmol、2.5nmol/日)、生理食塩水を脳室内に 14 日間持続投与し、摂食量、性周期の観察を行った。急性投与では ORX 群、GHR 群の摂食量は有意に多く、平均 LH 値、LH パルス状分泌の頻度は有意に低下した。慢性投与では、GHR 群で有意な摂食量増加と体重増加を認め、ORX 群でも同様の傾向が見られた。一方、膣スメアの周期性は保たれていた。摂食制限で観察される慢性的な性機能抑制は、GHR または ORX の単独作用では起こらず、複数の因子の総合的作用で発現するものと考えられた。

A. 研究の目的

生殖機能と摂食機能との関連は密接であり、生殖機能は様々な摂食調節因子の影響を受けることが報告されている。視床下部外側野から産生される摂食促進物質オレキシンは、脳内に広範な神経投射をしており 1)、摂食促進作用の他に覚醒維持作用や交感神経刺激作用を有しているが、我々はすでに、オレキシンの脳室内投与が両側卵巢摘出後のラットにおいて LH のパルス状分泌を抑制すること 2)、6) を報告し、生殖機能にも影響を及ぼ

していることが推定される。

一方、グレリンは最近発見された内因性の摂食促進物質 3) で、胃壁と視床下部弓状核において産生され、下垂体からの GH 分泌を強力に促進する作用を持つ 4)。生殖機能への影響においても、両側卵巢摘出後エストラジオールを補充したラットでグレリンの脳室内投与すると、LH のパルス状分泌を抑制するとの報告 5) がされている。

しかし、これらの研究は短時間の作用を検討したものであり、実際の長期間の

摂食制限時において、オレキシンやグレリンの分泌の亢進が生殖機能に与える影響についての報告はまだされていない。

そこで今回我々は、オレキシンおよびグレリンの脳室内投与が、急性および慢性的に生殖機能に与える影響について検討した。

B. 研究方法

実験材料として Wistar 系成熟雌ラットを用いた。

- 1) 急性投与実験：8 週齢時に両側卵巣摘出、10 週齢時に第 3 脳室内投与針留置の前処置を行った。これらのラットに、11 週齢時に生理食塩水を投与する control 群、グレリン 1nmol 群、オレキシン A 3nmol 群に分け、以下の摂食および生殖実験を行った。摂食に関しては、暗期において脳室内投与後 2 時間の摂食量を測定し、生殖については明期に脳室内投与 30 分後の採血を行い、RIA にて血清 LH 値を測定した。さらに右心房内にカテーテルを留置し、翌日、生理食塩水およびグレリン 1nmol、オレキシン A 3nmol を脳室内に投与し、6 分毎に 2 時間にわたり採血を行い、LH のパルス状分泌を検討した。
- 2) 慢性投与実験：11 週齢時に第 3 脳室内投与針留置を行い、浸透圧ミニポンプに接続して背部の皮下に埋め込んだ。2 週間持続的に薬液を注入投与した。薬液注入は生食、グレリン 250pmol/日投与群と 2.5nmol/日投与群、オレキシン A 3nmol/日投与群の 4 群に分けて行った。2 週間、毎日同

時刻に摂食量と体重を測定するとともに膣スメアにより性周期を観察した。また、最終日に採血を行い、血清 LH 値を測定した。

C. 研究結果

- 1) 急性投与実験：グレリン、オレキシン A 投与群の摂食量は、 $2.767 \pm 0.555/2h$ 、 $2.033 \pm 0.300 g_/2h$ (Mean \pm S.E.) と Control 群 ($0.225 \pm 0.225 g_/2h$) に比べて有意に多く、また脳室内投与 30 分後の血清 LH 値はグレリン、オレキシン A 投与群ともに有意に低かった。また、脳室内投与後は LH のパルス状分泌の頻度、平均 LH 値も減少した (図 1)。
- 2) 慢性投与実験：グレリン群で有意な摂食量増加と体重増加を認め、オレキシン群でも同様の傾向が見られた。しかし、膣スメアによるラットの性周期の周期性は、グレリン群、オレキシン群においても Control 群と同様に保たれており、Estrus の出現回数 (図 2)、最終日の血清 LH 値も、各群間に差は認めなかった。

D. 考察

食欲中枢と性中枢は、共に視床下部において近接して存在しており、神経解剖学的にも、互いに密接に関わっていることが示されている。摂食調節因子には、促進因子と抑制因子の両者が存在し、これらの因子が血糖値やレプチン値などの末梢情報と高位中枢からの伝達を受けながら、バランスを取り合っており、視床下部においては、これらの因子が複雑な

ネットワークを形成して、巧みに調節しあっていることが示されている。ダイエットなどによって摂食量が減少したとき、血糖値や体脂肪の減少などの末梢からの情報を受けると、視床下部において摂食促進因子であるニューロペプチド Y やグレリン、オレキシンなどの産生が増加することにより食行動の活性化し、摂食量を増加させようすると調節が働く。

一方、生体防御反応の一つとして、減食期間中のエネルギー消費を抑えるため、また当面不必要な機能を休止するために、生殖機能を抑制して月経が休止すると考えられている。そうした生殖機能抑制作用に摂食促進因子が作用する機序を調べる一環として本研究を行なった。

オレキシンおよびグレリンの脳室内投与によって、自由摂食下のラットの摂食量は急性期、慢性期ともに増え、慢性的には体重を増加させるという摂食促進作用が一貫して認められた。

他方、生殖機能に関しても、急性期では脳室内投与後の GnRH のパルス状分泌を抑制する効果を認めた。にもかかわらず、慢性期においては性周期は不変で生殖機能への影響は認められなかった。これらのことから摂食促進物質グレリンおよびオレキシン A が視床下部レベルで GnRH 分泌に対して抑制的に作用する経路は存在するが、単独の作用では GnRH 分泌を持続的に抑制し続けることはできないことが明らかになった。グレリンおよびオレキシン A の GnRH 抑制作用は、実際の絶食時に生体内で変動する他の因子、例えば血糖値、体脂肪量、血中レプチン値などの変動を欠くことにより、他の要素によっ

て補完されたと考えられる。すなわち、絶食時に起きる生殖機能抑制はグレリン、オレキシン A の単独の作用で維持されるのではなく、そこにさらに複数の要因が加わることによってはじめて生じるものと考えられる。

E. 結論

摂食制限で観察される慢性的な性機能抑制は、グレリンまたはオレキシンの単独作用では起こらず、摂食制限によって変動する複数の因子の総合的作用で発現するものと考えられた。

F. 文献

- 1) Van den Pol, A. N., Gao, X. B., Obrietan, K., Kilduff, T. S., and Belousov, A. B. : Presynaptic and postsynaptic actions and modulation of neuroendocrine neurons by a new hypothalamic peptide, hypocretin/orexin. *J. Neurosci.* 18:7962-7971, 1998
- 2) Tamura T, Irahara M, Tezuka M, Kiyokawa M, Aono T. Orexins, orexigenic hypothalamic neuropeptides, suppress the pulsatile secretion of luteinizing hormone in ovariectomized female rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 264:759-762, 1999.
- 3) Nakazato M et al. : A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409:194-

198, 2001.

4) Kojima M et al.: Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature 402:656-650, 1999.

5) Furuta M, Funabashi T, Kimura F.: Intracerebroventricular administration of ghrelin rapidly suppresses pulsatile luteinizing

hormone secretion in ovariectomized rats. Biochem Biophys Res

Commun. 288(4):780-5, 2001

6) Irahara M, Tamura T, Toshiya Matsuzaki et al.: Orexin-A Suppresses the

Pulsatile Secretion of Luteinizing Hormone via β -Endorphin.

Biochem Biophys Res Commun. 281:232-236, 2001.

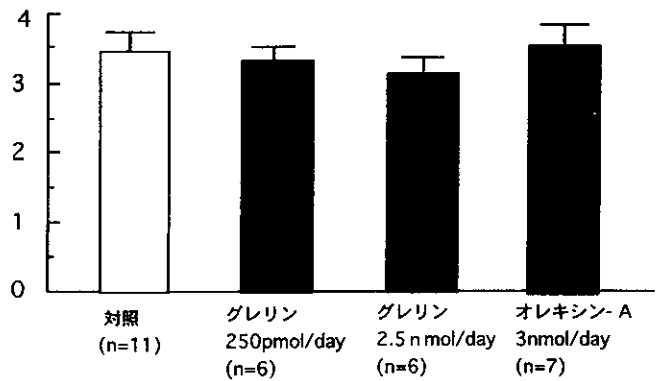
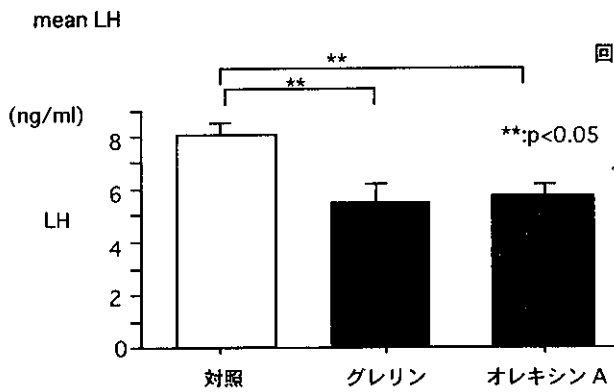


図2 慢性投与期間中のEstrusの出現回数

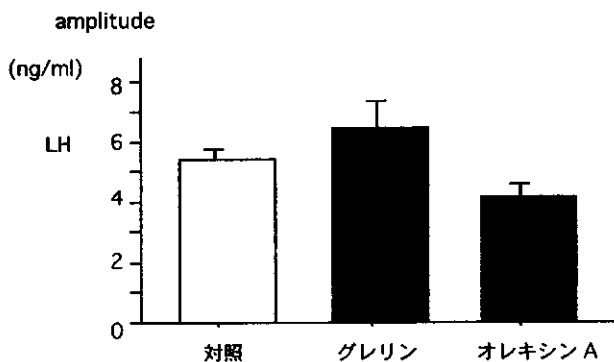
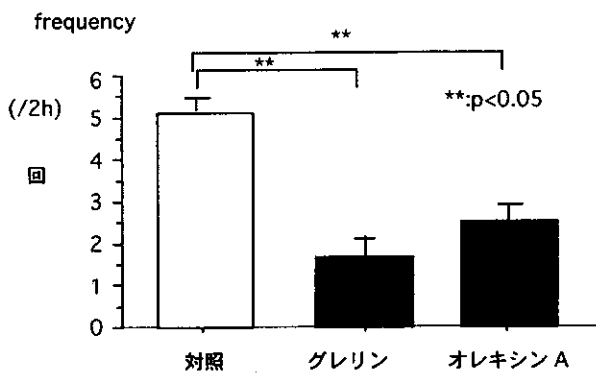


図1 脳室内投与後のLHパルス状分泌の変動

SIADH 治療に向けた基礎的検討(第2報)

---CPM(橋中心髄鞘崩壊)の有効な予防法の開発---

に関する研究

分担研究者 大磯ユタカ 名古屋大学大学院代謝病態内科学

研究要旨：橋中心髄鞘崩壊（CPM）はSIADHに代表される低Na血症の急速補正により中枢神経系に脱髄性病変を生じる重篤な合併症であるが、その発症予防に有効な治療薬剤は未だ知られていない。今回我々は、血液脳関門(BBB)透過性亢進を防止する作用が報告されている各種薬剤が、CPM発症予防に有効か否かを検討した。SIADHのマウスモデルにおいて、血清Naの急速補正により脱髄性病変が惹起されマウスは重篤な神経症状を呈したが、aminoguanidine, cimetidine, indomethacin, dexamethasoneの各薬剤投与により、神経症状と生存率の著明な改善が認められた。さらにラットを用いた検討でdexamethasoneが急速補正後のBBB透過性亢進を防止したことが示された。以上の結果、これら薬剤がCPM発症予防に有効であることが示唆され、今後実際の臨床への応用を検討する予定である。

A. 研究目的

橋中心髄鞘崩壊(Central Pontine Myelinolysis, CPM)はADH分泌過剰症(SIADH)に代表される低Na血症の過剰な急速補正により中枢神経系に脱髄性病変を生じる重篤な合併症である。しかし、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。我々は既にCPMの動物モデルにおいて、非選択的一酸化窒素合成酵素(NOS)阻害薬であるL-NAMEが脱髄性病変の発症予防に非常に有効であり、その作用が主として急速補正後の血液脳関門(BBB)の破綻防止によるものであることを報告している。しかし、L-NAMEは臨床的に使用した場合、血圧上昇などの

副作用が問題となる可能性がある。そこで今回我々は、臨床的に広く用いられており、各種病態における血中物質のBBB透過性亢進を防止する作用が報告されている薬剤が、CPMの発症予防に有効か否かを、SIADHの動物モデルを用いて検討した。

B. 研究方法

雄ICRマウス(体重25-30g)に、液体食とバゾプレシンV2アゴニストであるDDAVPを投与して水負荷し、低Na血症を誘導した。液体食投与4日間後、高張食塩水を腹腔内投与して血清Naを急速補正し、脱髄性病変を惹起した。実験群では補正時にaminoguanidine(選択的iNOS阻害剤, 200mg/kg), cimetidine(histamine H2受容体

阻害剤, 10 mg/kg), indomethacin (prostaglandin 合成酵素阻害剤, 7mg/kg), dexamethasone (glucocorticoid, 2 mg/kg) を投与し、補正後の神経症状及び生存率を対照群と比較した。さらに、dexamethasone の脱髄性病変発症予防作用が BBB の破綻防止によるものであるかどうかをラットにおいて検討した。マウスと同様の方法で低 Na 血症を誘導した後、急速補正して脱髄性病変を惹起し、急速補正後の BBB 破綻に対する dexamethasone の効果を抗ラット IgG 抗体を用いた免疫染色により組織学的に、また Evans Blue 色素法により定量的に観察した。なお、本研究は動物愛護に関し名古屋大学実験委員会の承認のもとに行っており、倫理面の問題はない。

C. 研究結果

DDAVP と液体食投与によりマウスは著明な低 Na 血症を呈し、高張食塩水投与により血清 Na は 24 時間で 116 から 135 mEq/l へと急速に補正された。これに伴い、対照群のマウスは重篤な神経症状を呈し 24 時間以内に 75%が死亡した。補正 3 日後の脳では各部位に顕著な脱髄性病変が認められた。これに対し、各薬剤投与群では、いずれも神経症状と生存率の著明な改善が認められた(図 1)。ラットを用いた検討でも、急速補正後、対照群のラットは重篤な神経症状を呈し 5 日以内に全例が死亡したのに対し、dexamethasone 投与群では神経症状が著明に改善し、完全な生存率が得られた。急速補正 4 日後の脳組織で、対照群では大脳皮質、中脳赤核部を中心に広範な脱髄が観察された。さらに、脱髄部位に一致して 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。一方、dexamethasone 投与群では脱髄病変、IgG 染色共にほとんど認められなかった(図 2)。また、非補正群に比べ補正 24 時間後では Evans Blue 色素の BBB 透過性が著明に亢進していたが、dexamethasone 投与によりその有意な減少が認められた(図 3)。

D. 考察

CPM の発症機序は低 Na 血症の急速補正により血清 Na が急激に上昇した結果、BBB が破綻して脳浮腫と体液性攻撃因子の脳内浸入が生じ、oligodendrocyte の傷害から脱髄に至ると想定されている。低 Na 血症の急速補正により発症する疾患であるが、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。上述のように CPM の発症には急速補正後の BBB の破綻が非常に重要であり、BBB の破綻を阻止できれば、CPM の発症予防が可能と考えられる。そこで今回我々は、各種病態において血中物質の BBB 透過性亢進を防止する作用が報告されている薬剤の、CPM 発症予防における有効性を SIADH の動物モデルを用いて検討した。今回用いた aminoguanidine, cimetidine, indomethacin, dexamethasone は、それぞれ髄膜炎、高体温、脳虚血、高血圧などの病態において BBB の透過性が亢進するのを防止する作用が報告されている。今回の検討で、これら薬剤が SIADH マウスモデルにおいて実験的に惹起された脱髄性病変の発症予防に非常に有効であることが示された。続いて、この発症予防作用が BBB の破綻防止によるものであるかどうかを、dexamethasone について、ラットを用いて

検討した。対照群では脱髄病変部位に一致して BBB の破綻を示す IgG の強い染色が認められたが、dexamethasone 投与群ではほとんどみられなかった。また、dexamethasone 投与により急速補正後の Evans Blue 色素の BBB 透過性亢進が有意に防止された。これらの結果より dexamethasone の脱髄性病変発症予防作用が、主として急速補正後の BBB の破綻防止によるものであることが示唆された。

E. 結論

今回用いた各薬剤が、SIADH の動物モデルにおいて低 Na 血症の急速補正により惹起される脱髄性病変の発症予防に有効であることが示された。これら薬剤は各種疾患に対し临床上広く使用されているものであり、今後 CPM 発症予防薬として実際の臨床への応用を検討する予定である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yoshohisa Sugimura, Takashi Murase, Shin Hoshino, Shizu Hayasaka, Yutaka Oiso, Yoshiharu Murata: Prevention of demyelination induced by rapid correction of hyponatremia in mice. *Environmental Medicine*, 46:58-61, 2002.

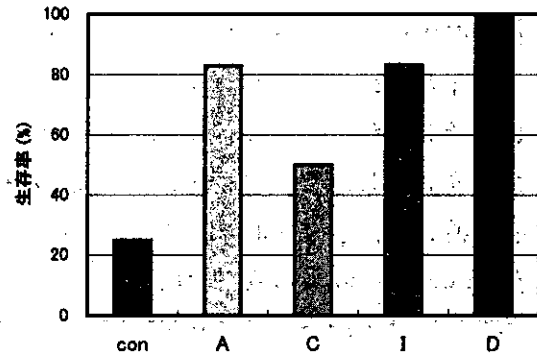
2. 学会発表

高木博史, 村瀬孝司, 相村益久, 有馬寛, 大磯ユタカ, 村田善晴: 橋中心性髄鞘崩壊の発症予防に有効な薬剤の検討. 第 29 回日本神経内分泌学会, 11, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

図 1. 急速補正後 24 時間の生存率



con: control, A: aminoguanidine, C: cimetidine, I: indomethacin, D: dexamethasone

図 2. 急速補正後の大脳皮質脱髄病変

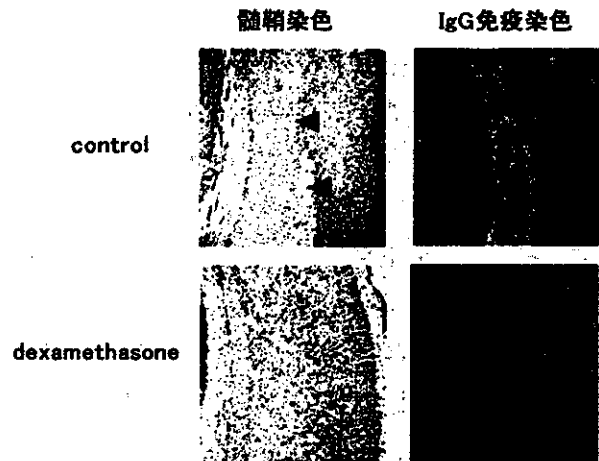
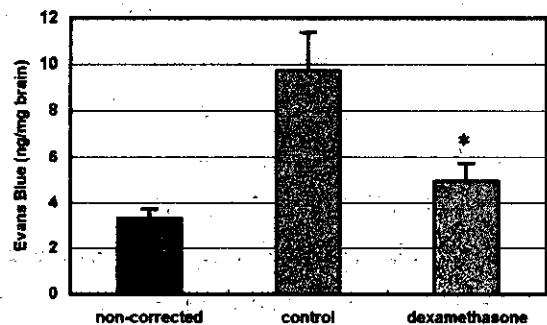


図 3. 急速補正 24 時間後の血液脳関門透過性



*p<0.05 vs. control

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

いわゆる'low GH acromegaly'に関する臨床病理学的検討

分担研究者 寺本 明 日本医科大学脳神経外科主任教授

研究要旨

活動性の先端巨大症で GH 基礎値が比較的低値(basal GH 5ng/ml 未満)を示すものを low GH acromegaly(LGA)と称し、臨床病理学的検討を行った。LGA の頻度は 8.7%であり、一般の acromegaly と比較し、年齢が高い傾向が見られた。腺腫は小さく、また enclosed type が大部分を占め、手術のみで完全緩解が得られることが多い。また、LGA の中には長期にわたり病気が発見されず比較的臨床経過が長い症例も含まれている可能性が示唆され、早期診断および適切な治療が必要と思われた。

いわゆる'low GH acromegaly'に関する臨床病理学的検討

日本医科大学脳神経外科
田原 重志、大山 健一、山王 直子、
寺本 明

平成 7 年度の厚生省特定疾患対策研究事業間脳下垂体機能障害調査研究班にて報告された、先端巨大症診断の手引きに基づき診断された患者で、当科で手術を施行され病理学的・免疫組織学的に GH 産生下垂体腺腫と診断された症例を検索した。これらの症例の中で、IRMA 法にて早朝空腹時の bGH (3 回測定) の平均が 5ng/ml 未満であった患者を今回の対象とした(表 1)。

C. 研究結果

1995 年 6 月より 8 年間に当施設にて経験した Acromegaly、GH 産生腺腫手術症例 127 例中 LGA は 11 例(8.7%)であり、男性 4 例(男性患者の 8.0%)、女性 7 例(女性患者の 9.1%)

A. 研究目的

近年、臨床的に活動性の acromegaly であっても、GH 基礎値(bGH)が比較的低値の症例の報告が散見される。今回これらの症例を low GH acromegaly と称し、臨床病理学的検討を行った。

B. 研究方法

であった。そして患者の平均年齢は 55.5 ± 10.0 (M \pm SD) であった。LGA 以外の群の平均年齢は 48.0 ± 10.0 であり、明確な統計学的有意差は認めなかったものの LGA の群の方が平均年齢が高い傾向が認められた (表 2)。

1) 初発症状

acral enlargement が 11 例中 9 例 (81.8%) と大部分を占めた。その他、体重増加 1 例 (9.1%)、sleep apnea 1 例 (9.1%) であった。

2) 内分泌学的検査

LGA 群での bGH の平均値は 3.3 ± 0.8 ng/ml、IGF-1 は 509.3 ± 233.6 ng/ml であった。LGA 以外の群での IGF-1 の平均値は 852.4 ± 298.7 ng/ml であり、後者が有意に高かった。一方、IGF-1/GH に関しては LGA 群で 162.8 ± 83.4 、LGA 以外の群では 38.6 ± 29.4 と、前者が有意に高く、LGA 群では GH 値が低いにもかかわらず、IGF-1 は高値を示すことが判明した (表 3)。75g-OGTT で GH は全例で 1 ng/ml 未満に抑制されず、TRH (500 μ g)、LHRH (100 μ g) 負荷での GH の奇異性上昇はそれぞれ 8 例 (72.7%)、3 例 (27.3%) に認められた。また bromocriptine (2.5 mg) に対する抑制は 8 例 (72.7%) で見られた (表 4)。

3) 画像所見

tumor size は 5.7 ± 1.3 mm であり、すべて microadenoma であった。8 例 (72.7%) は enclosed type の腺腫であ

り、2 例 (18.2%) は腺腫が正常下垂体の下方に進展し、下垂体硬膜に浸潤していた。さらに 1 例 (9.1%) で海綿静脈洞への浸潤が疑われた (図 1)。また特徴的な所見として、4 例 (36.4%) に partial-empty sella が認められた。

4) 合併症

高血圧が 5 例 (45.5%)、心肥大が 3 例 (27.3%)、高脂血症が 2 例 (18.2%) に認められた。また糖尿病は 1 例 (9.1%) のみであったが、境界型を含めると 7 例 (63.6%) と最も高率に見られた。

5) 手術病理所見

腺腫の本体は全例で軟らかく、白色調であり、2 例に硬膜への浸潤が、また 1 例に CS への浸潤が認められた。摘出標本の病理・免疫組織化学的検討では GH、PRL は全例陽性、 α -SU は 8/11 (72.7%) に陽性であり、LGA 以外の群と比較し、明確な違いは認められなかった (表 5)。しかし、これらの症例の中で 1 例特異なケースが見られた。患者は 60 歳男性で、先端部の巨大を近医内分泌内科にて指摘され、精査の後、acromegaly と診断され手術目的にて当科紹介となった患者である。図 2a に示す様に、頭部単純写真側面像にてトルコ鞍内に calcification を認め、また下垂体部 CT では下垂体左側に calcification を疑う high density の mass を認めた (図 2b)。同部位は MRI 冠状断にて low signal を呈していた (図 2c)。術中所見では図 2d のごとく、一部壊死を起こした

腺腫に囲まれるように、**pituitary stone** と呼ばれる厚い **calcification** が認められた。

6)術後成績

年齢性別にマッチする IGF-1 値の正常化は 11 例中 10 例(90.9%)に認められた。また手術後の 75g-OGTT にて GH が 2ng/ml 未満に抑制された症例は 10 例(90.9%)、1ng/ml 未満に抑制された症例は 7 例(63.6%)という結果であった。IGF-1 値の正常化および 75g-OGTT での GH 抑制が見られなかった 1 症例は同一患者であり、画像・手術所見上海綿静脈洞への浸潤が認められた症例である。この症例に関しても、術後ガンマナイフ療法を施行し、完全緩解に至っている。

D. 考察

1970～80 年代前半、**acromegaly** の治癒基準は bGH が 10ng/ml 未満であるとされてきた。その後 1990 年代になり bGH5ng/ml 未満が治癒基準となり、さらに年齢・性別にマッチした IGF-1 の正常化が付け加えられた。しかし近年、臨床的に活動性の **acromegaly** であっても、bGH が 5ng/ml 未満の症例が存在することが知られるようになってきた。Dimaraki らのグループも GH が正常範囲内でも IGF-1 高値の **acromegaly** が約 25% 存在すると述べている。我々の検討でも 8.7%と頻度は若干低いものの、同様の症例が存在し、LGA 以外の症例群と比較し、IGF-1/GH 比が有意に

高いことから、GH が低値の割に IGF-1 は高値を示すことが特徴的である。

LGA の初発症状であるが、**acral enlargement** が 81.8%と大部分を占め、全例が内分泌内科からの紹介患者であった。**Acromegaly** の患者の場合、自分自身で顔や手足の異常に気付く病院を受診することは極めて稀である。従って今後、社会に対しての啓発活動が必要であり、また医学生に対する教育も重要と思われる。

一方、内分泌学的検査所見であるが、必ずしも **acromegaly** に特徴的な所見がそろっているわけではない。しかし、その中でもブドウ糖負荷試験で GH 底値が 1ng/ml 未満に抑制されない所見は全例で認められており、LGA を見逃さない上で特に重要な検査と思われる。

また、LGA の画像所見として特徴的なことは、すべて **microadenoma** であった点である。さらに **enclosed type** が 72.7%と多く、的確な診断により、手術療法のみで治癒可能である。また、画像上 **partial empty sella** を示す症例があり、以前より腺腫が縮小した状態で発見された可能性も否定できない。さらに前述の様な **pituitary stone** の症例を見ても、LGA の中には比較的臨床経過が長いケースが含まれている可能性が示唆される。LGA の群の平均年齢が高いのもこれが影響しているのかもしれない。

LGA の治療成績は前述の様に極めて良好である。LGA の場合、腺腫は

小さいものの臨床的には活動性であることから、患者の QOL を考えるうえで積極的な治療が必要である。したがって早期発見に努め、適切な治療を受けることが重要であり、そのためにも、この様な症例群を踏まえた新たな acromegaly の診断基準を設ける必要があるかもしれない。

E. 結論

GH が低値 (basal GH 5ng/ml 未満) を示す acromegaly を LGA と称し、臨床病理学的検討を行った。LGA の頻度は 8.7% であり、一般の acromegaly と比較し、平均年齢が高い傾向が見られた。腺腫は小さく、また enclosed type が大部分を占め、手術のみで完全緩解が得られること

が多い。また、LGA の中には比較的臨床経過が長い症例も含まれる可能性が示唆され、早期診断および適切な治療が必要と思われた。

F. 文献

- 1) 加藤 譲: 先端巨大症および下垂体性巨人症診断の手引き. 厚生省特定疾患 間脳下垂体機能障害調査研究班 平成 7 年度総括研究事業報告書, pp. 197-198, 1995.
- 2) Dimaraki EV, Jaffe CA, Demott-friberg R, Chandler WF, Barkan AL: Acromegaly with apparently normal GH secretion: Implications for diagnosis and follow-up. J Clin Endocrinol Metab 87(8): 3537-3542, 2002.

表1 対象症例

- 1) IRMA法にて早朝空腹時のGH値の平均(3回測定)が5.0ng/ml未満。
- 2) 先端部肥大の主症状あり
- 3) 病理学的、免疫組織学的にGHが陽性。
- 4) 血中ソマトメジンC(IGF-1)高値。
- 5) 以下のうち2つ以上をみとす。

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1.ブドウ糖75g(50~100g)経口負荷で抑制されない。 2.夜間睡眠中の分泌増加が欠如している。 3.TRHまたはLH-RHに反応して増加する。 4.L-DOPAまたはBromocriptineに対する増加反応なし。 |
|--|

表2 LGA患者の年齢 GH \geq 5ng/mlの症例との比較

	LGA (n=11)	others (n=116)	t-test
Age	55.5 \pm 10.0*	48.0 \pm 12.8	p<0.0637

*Mean \pm SD

表3 LGA患者のIGF-1値およびIGF-1/GH比 GH \geq 5ng/mlの症例との比較

	LGA (n=11)	others (n=116)	t-test
IGF-1	509.3 \pm 233.6	852.4 \pm 298.7	p<0.001
IGF-1/GH	162.8 \pm 83.4	38.6 \pm 29.4	p<0.001

表4:対象症例の内分泌学的所見

	Age	Sex	Basal GH	75g OGTT	TRH	LH-RH	Bromocriptine
1.	51	M	3.4	-	+	-	+
2.	60	M	1.3	-	+	+	-
3.	43	M	3.3	-	+	-	-
4.	64	F	2.7	-	+	-	+
5.	64	F	4.4	-	+	-	+
6.	64	F	4.1	-	-	+	+
7.	53	F	3.6	-	-	+	+
8.	56	F	4.0	-	+	-	+
9.	64	F	2.8	-	+	-	+
10.	33	M	3.4	-	+	-	+
11.	58	F	3.5	-	-	-	+
	33±0.8		100%	72.7%	27.3%	81.8%	

75g-OGTT: - : 1ng/mL未満に抑制されない, TRH, LH-RH刺激試験: + : 奇異性上昇あり, - : なし
Bromocriptine試験: + : 抑制あり, - : なし.

表5: LGAの免疫組織学的所見

	Age	Sex	GH	PRL	ACTH	FSHβ	LHβ	TSHβ	αSU
1.	51	M	+++	+++	-	-	-	-	-
2.	60	M	++	++	-	-	-	-	+
3.	43	M	+++	++	-	-	-	-	++
4.	64	F	+++	+++	-	-	-	-	++
5.	64	F	++	++	-	-	-	-	+
6.	64	F	+++	+++	-	-	-	-	+
7.	53	F	+++	++	-	-	-	-	-
8.	56	F	++	+	-	-	-	-	-
9.	64	F	+++	++	-	-	-	-	+
10.	33	M	++	+	-	-	-	-	++
11.	58	F	+++	++	-	-	-	-	+

Grading: reactive: -, percentage of positive cells ~25% + 25~50% ++ 50%~; +++ αSU 8/11(72.7%)で陽性.

図1: LGAの画像所見

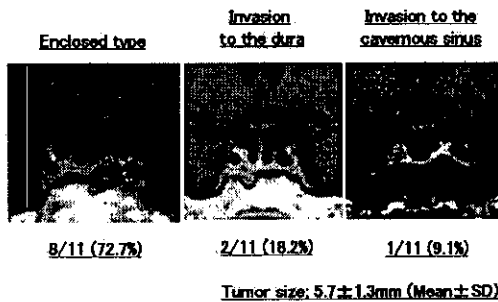
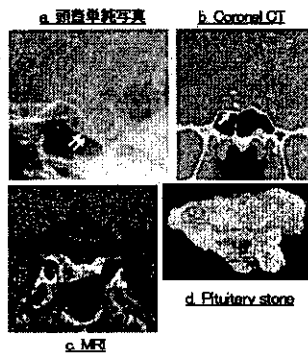


図2: pituitary stoneを伴ったLGA



自己免疫性視床下部下垂体炎におけるホルモンプロセシング酵素に対する自己抗体の検討

分担研究者 巽 圭太 大阪大学 大学院医学系研究科・講師

研究要旨

自己免疫性視床下部下垂体炎(LH)と他の下垂体疾患の非侵襲的な鑑別診断の一助とすべく、ホルモンプロセシング酵素と関連蛋白に対する自己抗体の診断的価値を検討した。ホルモンプロセシング酵素と関連蛋白に対する自己抗体は、PC2とCPEに対しては出現せず、PC1/3と7B2に対してはNFにおいてLHに比べ高頻度に出現した。PC1/3と7B2に対する自己抗体は二次的に出現しやすいと考えられ、NFとLHの鑑別の一助になりうることを示唆された。

A. 研究目的

自己免疫疾患の一つである自己免疫性視床下部下垂体炎の確定診断には下垂体生検による組織学的な検索が不可欠である。一般に自己免疫疾患の非侵襲的な診断法としては、患者の血清中に存在するであろう特異的自己抗体の検出がある。自己免疫性視床下部下垂体炎では、これまで下垂体組織や下垂体抽出物に対する免疫学的解析が数多くなされ、また、下垂体ホルモンを中心とした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もなされてきたが、診断的価値の高い下垂体特異的な自己抗原の検出には至っていない。

そこで、我々は診断的価値の高い下垂体特異的な自己抗原を得ることを一つの目的として、BodyMap法により、下垂体に特異的に発現する2つの新規遺伝子産物、PGSF1a、PGSF2を同定し、これらに対する自己抗体をラジオリガンド法で検討し、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ことを示してきた。

今回は既知のホルモンプロセシング酵素と関連蛋白を新たな候補抗原としたラジオリガンド法を用いて、自己免疫性視床下部下垂体炎と関連疾患の患者の血清で抗体価を測定し、診断的価値を検討した。

B. 研究方法

1. 候補抗原

視床下部下垂体で発現し、視床下部下垂体ホルモンのプロセシング酵素としてPC1/3、PC2、CPE/Hが報告され、PC1/3、PC2の活性調節蛋白としてSAAS、7B2報告されている。このうち、今回は遺伝子異常による病態が報告されている、PC1/3、PC2、CPE、7B2を候補抗原とした。また、 α -enolaseは組織特異性は無いものの、最近、Crockらが自己免疫性視床下部下垂体炎で自己抗体を50%と健常人や下垂体腫瘍に比べ高頻度に認めた下垂体細胞質分画の49kDa蛋白抗原として報告したので併せて測定した。

2. 対象症例

1) 自己免疫性視床下部下垂体炎	14例
リンパ球性下垂体前葉炎	4例
リンパ球性漏斗下垂体後葉炎	10例
2) 他の下垂体ホルモン欠損症	
ACTH単独欠損症	10例
TSH単独欠損症	4例
Sheehan症候群	3例
非機能性下垂体腺腫	11例
3) 対照	
健常人	36例

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 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により³⁵S-Met標識した抗原を作製し、カラム精製した。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した。血清中の抗体をProtein G Sepharoseに結合させ、96-well filtration system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β counterで計測した。標準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、健常人36例に対するmean +3 SD以上を自己抗体陽性とした。

(倫理面への配慮)

主治医が患者に血清検体の解析に関する説明を行い、解析に同意の得られた症例を対象とした。

C. 研究結果と考察

抗PC1/3抗体はリンパ球性下垂体前葉炎1例、リンパ球性漏斗下垂体後葉炎1例と非機能性下垂体腺腫5例で認めた(図1)。抗7B2抗体はリンパ球性漏斗下垂体後葉炎2例、Sheehan症候群1例と非機能性下垂体腺腫6例で陽性で認めた(図2)。PC2とCPEに対する自己抗体は全症例陰性であった(図3, 4)。併せて行った抗α-enolase抗体はリンパ球性下垂体前葉炎1例、リンパ球性漏斗下垂体後葉炎3例、Sheehan症候群2例と非機能性下垂体腺腫3例で認めた(図5)。

次に、抗PC1/3抗体と抗7B2抗体の陽性例に注目した。この2種の抗体陽性例を合わせると、非機能性下垂体腺腫で11例中10例で陽性となり、LHで11例中4例で陽性であったのに比し有意に陽性率が高くなった(表)。従って、抗PC1/3抗体と抗7B2抗体は組織破壊に伴い二次的に出現しやすい

と考えられ、目的とは逆の結果であるものの、非機能性下垂体腺腫とLHの鑑別診断に有用である可能性がある。非機能性下垂体腺腫で高率に陽性になった理由としては、腫瘍組織の壊死や下垂体組織浸潤による下垂体抗原の提示が自己抗体の生成に働いたと考えられる。

α-enolaseに対する自己抗体は、ラジオリガンド法では自己免疫性視床下部下垂体炎(4/14, 28.6%)と非機能性下垂体腺腫(3/11, 27.3%)で同程度の頻度で認め、Crockらが1998年までに報告したイムノプロットティング法の主要抗原とは異なると考えられた。

その理由として次の2つのことが考えられる。1つは、Crockらが1998年までに報告した組織抽出物を用いたイムノプロットティング法では一度のアッセイで測定できる検体数が限られ、反応温度、時間などの反応条件がアッセイ間で少しずつ異なる上に結果の評価が主観的であるために、自己免疫性視床下部下垂体炎で70%認められた49kDa蛋白に対する抗体が再現性がない可能性がある。また、イムノプロットティング法で認められた49kDaのバンドから精製されたのがα-enolaseであったが、量的に多いだけの非特異反応であった可能性もある。これらのことに対し、我々の行ったラジオリガンド法は、健常人36例より客観的に得られた平均+3SDのカットオフ値に対して判定しており、個別抗原に対する反応性を見ているので信頼性が高い。

今回の抗PC1/3抗体と抗7B2抗体の陽性例では、両者共に陽性になったのは非機能性下垂体腺腫1例のみで、他の14例は一方のみ陽性であった。また、抗PC1/3抗体か抗7B2抗体が陽性となったのは抗α-enolase抗体の陽性例9例中では5例、前回報告したPGSF1a、PGSF2、hGHの3種に対する抗体の何れか陽性例8例中では1例のみで、抗hGH抗体以外の5種の抗体は独立した診断価値を持つと考えられた。

D. 結論

1. ホルモンプロセッシング酵素と関連蛋