

プレクリニカルクッシング病

分担研究者	柳瀬敏彦	九州大学大学院医学研究院病態制御内科
	岡部泰二郎	九州大学大学院医学研究院病態制御内科
	野村政壽	九州大学大学院医学研究院病態制御内科
	後藤公宣	九州大学大学院医学研究院病態制御内科
	中垣博之	新小倉病院脳外科
	名和田新	九州大学大学院医学研究院病態制御内科

研究要旨：プレクリニカルクッシング症候群のうち、下垂体性のものは下垂体偶発腺腫の発見頻度が低いこともあり、病態の存在についても議論されることが比較的少ない。我々は少なくとも3症例において内分泌学的に下垂体 ACTH の自律性分泌を認めたが、臨床的にはクッシング徴候を欠く症例を経験した。うち1例は0.5 mg dexamethasone (DEX) 抑制試験がきっかけとなり発見され、下垂体腺腫摘出後、0.5 mg DEX 抑制試験の正常化と高血圧の改善を認めた。本症例は下垂体精査の機会がなければ臨床的には単純性肥満並びに本態性高血圧の範疇に入る症例であり、本病態の早期発見は臨床的にも重要と考えられる。

A. 研究目的

プレクリニカルクッシング症候群とはコルチゾールの自律的分泌がクッシング症候群に特徴的な症候を示すに至らない状態をさし、主に近年の副腎偶発腫の発見頻度の増加に伴い広く認識されるに至った疾患概念である。一方、下垂体性のものは下垂体偶発腺腫の発見頻度が低いこともあり、病態の存在についても議論されることが比較的少ない。我々は少なくとも3症例において内分泌学的に下垂体 ACTH の自律性分泌を認めたが、臨床的にはクッシング徴候を欠く症例を経験し、いわゆる Preclinical Cushing 病の概念に相当する症例と考え報告する。

B. 症例提示

（症例1）

32歳女性、軽度高血圧(140-150/90-100mmHg)と肥満を主訴に入院。身長165cm、体重85.2Kg。クッシング徴候なし。血中ACTH基礎値は30 pg/mlと正常でCRF負荷に対する反応性も2.5倍と正常範囲内、他の下垂体ホルモン基礎値並びに刺激試験における反応性も正常であった。血中cortisol値は10 µg/dlで日内変動を認め、1 mg dexamethasone (Dex) 抑制試験は正常であった。尿中17OHCS値は10mg/dayと正常上限、17-KS値は6.0 mg/dayとほぼ正常であったが、尿中free cortisol値は91.6

μg/day と正常高値であった。その後、0.5mg dexamethasone (DEX) 抑制試験を追加検査したところ、まったく抑制を認めなかったことから下垂体 MRI 検査施行。下垂体右側に明瞭な腺腫所見を認め、下垂体系静脈サンプリングでも同側の ACTH 高値を認めたことから、Hardy 手術を行った。病理学的にも ACTH 産生下垂体腺腫と診断された。術後は血圧も 120-130/80mmHg 程度に正常化し、0.5mg Dex 抑制試験の完全正常化を認めた。本症例は下垂体精査の機会がなければ臨床的には単純性肥満並びに本態性高血圧の範疇に入る症例としておそらく経過観察対象になったと考えられ、preclinical Cushing 症候群のスクリーニングにおける 0.5mg dexamethasone 試験の有用性並びに本病態の早期発見の臨床的重要性が示唆された。

(症例 2)

74 歳女性、高血圧にて近医にてフォローを受けていたが、頭重感、耳鳴りも認めるようになり精査目的で当科入院。身長 142.9cm、体重 48Kg。血圧 164/80 mmHg。クッシング徴候なし。血液生化学的には軽度の高コレステロール血症(239 mg/dl)を認める以外異常なし。内分泌学的検査では尿中 17OHCS 15.8 mg/day、遊離コルチゾール 115 μg/day といずれも高値を認めたが、尿中 17KS 値は 4.8 mg/day と正常であった。血中コルチゾールの基礎値は 11.4 μg/dl と正常で日内変動も保たれていたが、dexamethasone 0.5 mg 及び 1mg で抑制が認められず、2 mg、8mg 投与にて抑制を認めた。また、血中 free T3 の低下と TSH の上昇を認め、原発性甲状腺機能低下症の存

在を認めた。下垂体前葉機能検査では CRF 試験で血中 ACTH、コルチゾールの反応性はいずれも正常であった。TRH 試験で血中 TSH の過剰反応が認められ、原発性甲状腺機能低下症に合致する所見であった。下垂体 MRI の dynamic study では下垂体右下部に径 4 mm の遅れて増強される領域を認め、microadenoma の存在が疑われた。また下垂体静脈サンプリングにて右下垂体静脈洞および右海綿静脈洞にて有意の ACTH の上昇を認めた。以上の検査成績より原発性甲状腺機能低下症に下垂体の microadenoma を伴った preclinical Cushing 病を合併した 1 例と考えられた。Hardy 手術を施行したが、摘出組織に ACTH 陽性の下垂体腺腫の存在を証明することができず、また手術後も dexamethasone 1mg テストにおいて血中コルチゾールは 16.7 μg/day と抑制が認められていない。腺腫取り残しの可能性が高いが、臨床的問題点が少ないため、現在、経過観察中である。

(症例 3)

61 歳女性。昭和 63 年甲状腺腫を指摘され、甲状腺細胞診にて甲状腺乳頭癌の診断にて甲状腺全摘手術およびアイソトープ治療を受けた。この頃より周囲から顔貌の変化を指摘されるも放置。平成 8 年、血尿と右腎腫瘍も指摘され精査目的で当科入院。身長 151 cm、体重 48 Kg。血圧 120/70mmHg と正常。acromegaloid 顔貌を認めるもクッシング徴候なし。一般検査成績では空腹時血糖 155 mg/dl、HbA1C 7.7 %と糖尿病を認めた。下垂体機能検査では GH 5.1 ng/ml と軽度高値を認め、IGF-I の値も 580 ng/ml と高値であった。血中 GH は TRH、LH-RH、75g

糖負荷試験のすべてに対し GH の奇異性反応を認め、また GRF 負荷試験に対しては過剰反応を示した。血中 ACTH 42 pg/ml と正常範囲であったがやや高値を示し、CRF 負荷試験に対して5倍とやや過大な反応を示した。他の下垂体ホルモン基礎値では血中 prolactin (PRL) が 17.8 ng/ml と上昇を示した。血中コルチゾール基礎値は 9.2 µg/dl と正常であったが、日内変動を認めず、dexamethasone 1mg 抑制試験でも血中コルチゾールは 13.2 µg/dl と抑制を認めなかった。また、尿中 17OHCS, 17KS はそれぞれ 2.0mg/day, 0.4mg/day と正常であったが、尿中 free cortisol 値が 86 µg/day と正常範囲やや高めであった。頭部 MRI では径 3 mm の腺腫病変を認め、Hardy 手術施行。免疫染色より、GH/PRL/ACTH 同時産生下垂体腺腫と診断された。術後の内分泌学的検査では血中 GH, IGF-1 基礎値の改善と 75 g 糖負荷試験に対する奇異性反応の消失を認めた。また血中 cortisol の日内変動の出現、dexamethasone 1 mg 抑制試験の正常化 (1.5 µg/dl) を認めた。なお、右腎腫瘍に関しては腎細胞癌と診断され、転移所見なく摘出手術がなされた。

(倫理面への配慮)

いずれの症例においても病態を説明の上、患者同意のもとで、診断のための検査並びに治療を行った。

C. まとめ

(1) いわゆる pre (or -sub) Clinical Cushing 病に該当する病態を呈した 3 症例を提示した。3 症例とも女性で年齢は 32 歳、61 歳、74 歳であった。3 症例とも血

中 ACTH, cortisol の基礎値は正常であったが、ACTH-cortisol 系の分泌調節異常の所見を示した。3 症例とも尿中 free cortisol 値が正常上限からやや高値の傾向を示した。うち 2 症例は dexamethasone 抑制試験における異常反応性を契機に下垂体腺腫の存在が検索されたが、ほか 1 例は acromegaly の精査過程で発見され、最終的に GH/PRL/ACTH 同時産生腫瘍と診断された。CRF 負荷試験に対する ACTH の反応性は正常からやや亢進の程度を示した。

(2) 32 歳症例は、当初 1 mgDEX 抑制試験では異常を示さず、単純性肥満、本態性高血圧の範疇の症例と考えられたが、0.5mg dexamethasone 抑制試験の追加施行を契機に病態が発見され、下垂体腺腫摘出後、0.5mg dexamethasone 抑制試験の正常化と高血圧の改善を認めた。

D. 参考論文

1. 大江賢治、後藤公宣、生山祥一郎、柳瀬敏彦、高柳涼一、名和田 新：甲状腺乳頭癌、腎細胞癌、子宮筋腫を合併した末端肥大症に下垂体の GH/PRL/ACTH 産生腫瘍を認めた 1 例。ホルモンと臨床 (増刊号) 内分泌 興味ある症例 46 : 35-40、1998
2. 下田聖子、後藤公宣、生山祥一郎、柳瀬敏彦、高柳涼一、名和田 新：Preclinical Cushing 病が疑われた 1 例。ホルモンと臨床 (増刊号) 47 : 50-53, 1999

E. 研究発表

1. Saito M, Takayanagi R, Goto K, Fukamizu A, Tomura A, Yanase T, Nawata H: The presence of the amino- and carboxy-terminal domains in androgen receptor is essential for the completion of a transcriptionally active form with coactivators and intranuclear compartmentalization common to the steroid hormone receptors : A three-dimensional imaging study. *Mol Endocrinol* 16: 694-706, 2002
 3. Zhao Y, Goto K, Saitoh M, Yanase T, Nomura M, Okabe T, Takayanagi R, Nawata H: Activation function-1 domain of androgen receptor contributes to the interaction between subnuclear splicing factor compartment and nuclear receptor compartment; Identification of the p102 U5 snRNP binding protein as a coactivator for the receptor *J Biol Chem* 277 : :30031-9, 2002
 4. Nawata H, Goto K, Morinaga H, Yanase T, Yanagisawa J, Kato S, Nomura M, Okabe T, Takayanagi R: Molecular mechanisms underlying the action of environmental endocrine-disrupting chemicals. *Environmental Sciences* 9: 57-70, 2002
 4. Yanase T, Mu Yi-M, Nishi Y, Goto K, Nomura M, Okabe T, Takayanagi R, Nawata H: Regulation of aromatase by nuclear receptors. *J Steroid Biochem Molec* 79 : 187-192, 2002
 5. Nawata H, Yanase T, Goto K, Okabe T, Ashida K: Mechanism of action of anti-aging DHEA-S and the replacement of DHEA-S *Mechanism Aging & Dev.* 79: 151-157, 2002
 6. Fujii A, Harada T, Yamauchi N, Iwabe T, Nishi Y, Yanase T, Nawata H, Terakawa N. : Interleukin-8 gene and protein expression are up-regulated by interleukin-1beta in normal human ovarian cells and a granulosa tumor cell line. *Fertil Steril.* 79 : 151-7, 2003
 7. Mukasa C, Nomura M, Tanaka T, Tanaka K, Nishi Y, Okabe T, Goto K, Yanase T, Nawata H: Activin signaling through type IB receptor stimulates aromatase activity in the ovarian granulosa cell-like KGN cells. *Endocrinology* in press 2003
- F. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし

高齢者の低 Na 血症に占める鉱質コルチコイド反応性低 Na 血症 (MRHE) の重要性

分担研究者 石川三衛 自治医科大学附属大宮医療センター総合医学第一
研究協力者 加園恵三 同上
為本浩至 同上

研究要旨：高齢者にみられる低 Na 血症に占める鉱質コルチコイド反応性低 Na 血症 Mineralocorticoid-responsive hyponatremia of the elderly (MRHE) の病態解析を行った。MRHE の病因として、腎での Na 保持能の減弱に加えて、レニン-アルドステロン系の活動性の鈍化が低 Na 血症を惹起するものと考えられる。またバソプレッシン (AVP) の分泌亢進は代償的なもので、腎の水再吸収を高めて体液保持に傾く。AVP 分泌亢進の観点から、MRHE は臨床上 AVP 不適切分泌症候群 (SIADH) との鑑別がきわめて重要である。

[背景]

高齢者にみられる低 Na 血症の大部分は脱水や浮腫のない euvolemic hyponatremia に属する。低 Na 血症の病態では、水利尿不全を伴い血漿 AVP 濃度が高いことから、Schwartz-Bartter の診断基準に合致して SIADH と診断されやすい¹⁾。これは、高齢者で脱水所見が分かりにくいことに加え、SIADH の診断基準が甘いことによると考えられる。私たちは、65 歳以上の高齢者の低 Na 血症の原因として SIADH は僅かで、これ以外の病態が大部分を占めることを報告した²⁾。AVP の分泌亢進が適切か否かを正確に把握することが肝要である。今回の研究では、高齢者の鉱質コルチコイド反応性低 Na 血症 MRHE と SIADH の相違点を比較し、MRHE の診断への道筋を検討した。

[対象と方法]

対象は、1995 年から 2002 年にかけて自治医科大学附属病院および附属大宮医療センターで見い出された低 Na 血症 130 mmol/l 以下の患者で、MRHE 12 例 (62 - 86 歳、男 6 例、女 6 例)、65 歳以上の SIADH 10 例 (65 - 79 歳、男 6 例、女 4 例) および健常高齢者 6 例 (65 - 85 歳、男 2 例、女 4 例) であった。MRHE 12 例のうち 6 例で皮膚や舌の軽い乾燥を認め、体液量減少の所見が示唆された。腎機能・副腎機能の障害はなく、血中 ACTH、コルチゾールは基準値内であった。MRHE をきたした基礎疾患は、頭部外傷 4 例、膠原病 1 例、アミロイドーシス 1 例、脳梗塞 2 例、原因の同定できない症例 4 例であった。MRHE 3 例は、SIADH と鑑別ができず、SIADH と

して水制限を施行した。これらは水制限に無反応で、フルドロコルチゾン(0.05-0.3 mg/day)に反応して血清 Na の改善した症例で、最終的に MRHE とした。

SIADH 10 例は、いずれも Schwartz-Bartter の診断基準に合致した症例で、原因疾患は異所性産生腫瘍 3 例、頭部外傷 1 例、脳梗塞 2 例、カルバマゼピン乱用 1 例、原因の同定できない症例 3 例であった。

これらの患者で、早朝空腹時採尿、採血して血中電解質、血漿浸透圧、血漿レニン活性、血漿アルドステロン濃度、血漿 AVP 濃度、尿中電解質、尿浸透圧、尿中 AQP-2 排泄、クレアチニンを測定した。

MRHE の患者に対して、フルドロコルチゾン(0.05-0.3 mg/day)と高食塩食(10-12 g)で治療を行った。1 ヶ月後、血清 Na 値、ヘマトクリット、血漿 AVP 濃度、尿中 AQP-2 排泄を測定して、フルドロコルチゾンの有効性を検討した。本研究は、自治医科大学倫理委員会の承認に加え、対象患者の同意を得て施行された。

[結果]

血清 Na 値は MRHE 群 115.8 ± 2.0 mmol/l、SIADH 群 115.2 ± 2.3 mmol/l といずれも著しい低 Na 血症を認め、健常者の 139.8 ± 0.7 mmol/l に比較して有意に低値を示した。血清 K 値は、MRHE 群 4.6 ± 0.1 mmol/l と、SIADH 群の 3.8 ± 0.2 mmol/l に比べて高値であった ($P < 0.05$)。また血清尿酸値は MRHE, SIADH 群とも 2.1 ± 0.3 , 2.7 ± 0.3 mg/dl と低値を示した。尿中 Na 排泄は MRHE 群で著しい低 Na 血症にもかかわらず

145.5 ± 23.1 mmol/day に達した。この他、MRHE 群では収縮期血圧が SIADH 群に比べて有意に低下していた。

血漿レニン活性は、健常者 0.7 ± 0.3 ng/ml/h と加齢に伴い低下傾向がみられた。MRHE 群では 0.4 ± 0.1 ng/ml/h と著しく低下したが、SIADH 群では 1.0 ± 0.3 ng/ml/h であった。これに対して、血漿アルドステロン濃度は MRHE, SIADH 群で基準値上限にあり、MRHE 群では低血漿レニン活性と解離する所見を呈した。

血漿 AVP 値は、SIADH, MRHE 群とも低 Na 血症・低血漿浸透圧にもかかわらず抑制されなかった。さらに、尿中 AQP-2 排泄は MRHE, SIADH 群それぞれ 597.2 ± 88.8 , 605.2 ± 137.4 fmol/mg creatinine で、健常者の 158.1 ± 18.0 fmol/mg creatinine に比べて有意に高値であった。したがって、MRHE, SIADH 群では血漿 AVP 濃度は低血漿浸透圧に比し相対的高値であることが明らかとなった。

MRHE 12 例に対してフルドロコルチゾン療法(0.05-0.3 mg/day)を行った。治療後 1 ヶ月の成績を治療前のそれと比較すると、血清 Na 値は 124.5 ± 1.7 から 134.6 ± 1.0 mmol/l へ増加 ($P < 0.01$)、血漿 AVP 濃度は 2.4 ± 0.7 から 1.3 ± 0.2 pg/ml へ、尿中 AQP-2 排泄は 692.0 ± 152.6 から 213.8 ± 39.0 fmol/mg creatinine へ減少した ($P < 0.01$)。この間のヘマトクリット値から換算した入院時の循環血液量の減少は $6.7 \pm 0.8\%$ と考えられた。

[考察]

MRHE は高齢者にみられる低 Na 血症の

1型として新たに加えられる病態と考えられる。大部分の患者は高齢者で、軽い体液量減少を伴う低 Na 血症であることを特徴とする。MRHE は、著しい尿中 Na 排泄をともなう低 Na 血症で、血清尿酸値の低下、血清 K 値の増加、血漿レニン活性の抑制、血漿 AVP 値の相対的増加などの所見を呈する。

MRHE の病態形成はおそらく加齢に伴う腎における Na 保持能の減退が主要因と想定される。尿中 Na 排泄は低 Na 血症にもかかわらず持続的に増加する。低血漿レニン活性にもかかわらず、血漿アルドステロン濃度は基準値上限で、また薬理的用量のフルドロコルチゾンの効果から、腎のアルドステロン反応性の低下が重要と思われる。さらに、レニンの反応性がなく低 Na 血症の補完機構がうまく作動せず、体液量の減少が惹起されるのではないか。したがって、AVP の分泌亢進は代償的なもので、腎での水再吸収を高めて体液量を保持することになる。

MRHE は、AVP の分泌亢進からみると臨床的には SIADH に近い病態と誤認されやすいが、その病態は全く別個で SIADH との鑑別が本症生命予後にきわめて重要である²⁻³⁾。SIADH に比較して MRHE にみられる特徴は、収縮期血圧の低下、血清 K 値の増加、尿中 Na 排泄の相対的増加、血漿レニン活性の著しい抑制、循環血液量の減少などである。また、MRHE はフルドロコルチゾン治療によく反応して血清 Na 値の改善が認められる。このように、MRHE は体液量の減少を伴う低 Na 血症であるため、水制限は禁忌で、腎における Na 保持

能を回復させる治療が選択される。

[文献]

1. Bartter, F.C., Schwartz, W.B.: The syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone. *Am. J. Med.* 42: 790-806, 1967.
2. Ishikawa, S., Saito, T., Fukagawa, A., Higashiyama, M., Nakamura, T., Kusaka, I., Nagasaka, S., Honda, K.: Close association of urinary excretion of aquaporin-2 with appropriate and inappropriate arginine vasopressin-dependent antidiuresis in hyponatremia in elderly subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 1665-1671, 2001.
3. Ayus, J.C., Arieff, A.I.: Chronic hyponatremic encephalopathy in postmenopausal women: Association of therapies with morbidity and mortality. *JAMA* 281: 2299-2304, 1999.

**ACTH 産生下垂体腫瘍細胞株 AtT20 のグルココルチコイド抵抗性と
11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD) との関連について**

分担研究者	岩崎泰正	名古屋大学医学部附属病院検査部
	二川原 健	名古屋大学医学部附属病院検査部 弘前大学医学部第三内科
	浅井真人	名古屋大学大学院分子細胞内科学
	吉田昌則	名古屋大学大学院分子細胞内科学
	大磯ユタカ	名古屋大学大学院分子細胞内科学
	須田俊宏	弘前大学医学部第三内科

研究要旨：クッシング病の原因となる下垂体 ACTH 産生腫瘍ではグルココルチコイド(GC)抵抗性が認められるが、その分子機序の詳細は明らかでない。近年この腫瘍において、代表的な GC 代謝酵素である 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD) type 2 が異所性に発現していることが報告された。今回我々はこの腫瘍のモデルである AtT20 細胞株を用いて、この酵素と GC 抵抗性の関連について検討を行った。RT-PCR 法にて 11 β -HSD type 2 が発現していることが確認された。また carbenoxolone によりこれらの酵素を阻害すると、GC がより低濃度で POMC 遺伝子の転写活性を抑制すること、すなわち GC 抵抗性が減弱されることが観察された。以上より、ACTH 産生下垂体腺腫での 11 β -HSD の発現は GC 抵抗性と関連している可能性が示唆された。臨床的には 11 β -HSD の阻害剤がクッシング病の内科的治療薬として有用である可能性が今回の *in vitro* の系から示唆された。

A. 研究目的

クッシング病の主たる原因である ACTH 産生下垂体腺腫に対して、現在治療として経蝶形骨洞的手術が多く選択されている。これにより緩解に至る例が多数ある一方、再発例や手術困難例も少なからず存在する。このためクッシング病に対しては内科的治療法の必要性が依然として存在している。

ACTH 産生下垂体腺腫は、グルココルチコイド(GC)によるネガティブフィードバックに対する抵抗性という重要な特徴を持つ。高コルチゾール血症下では正常な ACTH 産生細胞は分泌を低下させ、細胞自体も変性するのに対して、ACTH 産生腺腫は分泌を続け、細胞も増殖をつづける。この点に関する機序は現在に至るまで不明である。最近 Stewart ら¹⁾はコルチゾール

の不活化酵素である 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11β -HSD2)が、ヒト ACTH 産生下垂体腺腫において異所性発現していることを報告した。このことは、 11β -HSD2 が GC のネガティブフィードバックを回避する因子として腫瘍の ACTH 自律性分泌に関与している可能性を示唆する。逆に 11β -HSD2 を阻害することで腫瘍からの ACTH 分泌を減弱させることが可能ならば、 11β -HSD2 阻害剤はクッシング病の治療薬としての価値を持つ可能性がある。この点を踏まえ、 11β -HSD2 が実際に GC 抵抗性に関与しているのか否かを明らかにする目的で、マウス下垂体 ACTH 産生腫瘍細胞株 AtT20 を用いた *in vitro* の系を用いて以下の実験を行った。

B. 研究方法

(1) RT-PCR 法により、AtT20 細胞における 11β -HSD type 2 の発現の有無を検討する。

(2) 11β -HSD の阻害剤 carbenoxolone (CBX) の前処置がグルココルチコイド抑制性に与える影響を、proopiomelanocortin (POMC; ACTH をコードする) 遺伝子の転写活性を指標として検討する。具体的には、AtT20 に POMC promoter-luciferase fusion gene を安定的に導入した細胞株 (AtT20PL 細胞²⁾) を用い、 $10 \mu\text{M}$ の forskolin で刺激した状態から、種々濃度のコルチゾールがどの程度 POMC promoter 活性を低下させるかを luciferase assay にて評価する。これに CBX の前投与を種々濃度で加え、抑制程度の変化を観察する。

C. 研究結果

(1) AtT20 細胞には 11β -HSD2 が発現していることが、二つの異なるプライマーセットを用いた RT-PCR で確認された (Fig. 1)。

(2) CBX 非存在下では、コルチゾールは 10 nM 以上の濃度で POMC の転写を有意に抑制したのに対し、CBX $1 \mu\text{M}$ および $5 \mu\text{M}$ の存在下ではより低濃度 (それぞれ 1 nM , 100 pM) で有意に抑制した。すなわち CBX は濃度依存性に GC 抵抗性を減弱させた (Fig. 2)。

D. 考察

11β -HSD2 はコルチゾールの 11 位水酸基をケト基に酸化し、GC 活性のほとんどないコルチゾンへと変換する。これに対し 11β -HSD1 は主として逆の還元反応を触媒するが、わずかに酸化反応をも触媒するとされている³⁾。生体内で 11β -HSD2 は腎のミネラルコルチコイド受容体 (MR) の存在する細胞に局在し、GC を不活化して GC が MR に illicit に結合することを防止している。このほか大腸、唾液腺、汗腺、胎盤、血管内皮にも発現が認められる。 11β -HSD1 は肝、脳、肺などで発現が確認されている。

正常の下垂体 ACTH 産生細胞には 11β -HSD2 ではなく 11β -HSD1 が発現しており、これが細胞内のコルチゾールを増加させ、ネガティブフィードバックの作用しやすい環境を造出しているものと考えられている^{1,4)}。一方 Stewart ら¹⁾は、クッシング病患者の下垂体 ACTH 産生腫瘍では 11β -HSD2 が強発現しており、これが細胞内のコルチゾールを不活化することにより GC

による ACTH 分泌抑制の減弱に寄与している可能性がある」と報告している。我々の今回のデータは、これを POMC 遺伝子の発現という側面から更に裏付けるものである。マウスの下垂体 ACTH 産生腫瘍には 11 β -HSD 2 が発現しており、それらを阻害することにより GC による POMC 遺伝子発現の抑制性が増強されること、すなわち GC 抵抗性が減弱することが示された。

なお今回データは示されていないが、我々は AtT20 細胞においての実験系において 11 β -HSD1 の発現も確認している。CBX の 11 β -HSD 阻害作用には isozyme 選択性がなく、type 1, type 2 をともに阻害する。したがって今回の実験系における CBX は厳密にコルチゾールの不活化反応（主として 11 β -HSD2 の作用）のみを阻害しているとは言えない。しかし 11 β -HSD の反応基質として今回はコルチゾールのみを与えており、濃度勾配があきらかにコルチゾール優位と考えられることから、11 β -HSD1, 2 を含めた全体の反応の向きは酸化（コルチゾールからコルチゾンへ）に流れるものと考えられる。したがってこの条件においては CBX は酸化反応を阻害しているものと解釈して支障ないと考えられる。

今回のデータは、in vitro の検討に限られたものであるが、クッシング病における薬物治療に対する示唆に富むものであると我々は考える。現在標準的に選択されるクッシング病の治療法は経蝶形骨洞的アプローチによる腫瘍切除術であるが、局在特定の困難な微小腺腫の多いこと、そのため切除不能になる例や再発例のあることから、非外科的な治療法が必要と

される場合は多い⁵⁾。放射線療法も選択されるが、効果発現までに時間を要することや遅発性の汎下垂体機能低下症がおこることなどから、不利な点がある。ステロイド合成阻害薬であるメチラボンや o,p'-DDD はその副作用や、ことに前者においては大量頻回服用という用法が患者に容易に忍容されない原因となっている。またシプロヘプタジンやプロモクリプチンは効果が限定的であったことから、既に過去のものとなっている。これらに代わる、腫瘍の病態の根源的な部分を操作する薬剤が存在すれば、外科治療への補助として、また手術不能例においては主たる治療法として、有用性を発揮することが十分に考えられる。この意味で 11 β -HSD の阻害剤はクッシング病の内科的治療薬として有力な候補となる可能性が考えられる。

E. 結論

今回の in vitro の系では 11 β -HSD 阻害剤が ACTH 産生腫瘍細胞の GC 抵抗性を減弱させ、GC によるネガティブフィードバックを回復させる方向へ導くことが示された。今後 in vitro では 11 β -HSD 阻害剤が AtT20 細胞の生存性に影響を与えうるか否か、in vivo ではクッシング病モデル動物において実際の 11 β -HSD 阻害剤投与が腫瘍の ACTH 分泌能や増殖能に影響を与えるか否かについて検討をすすめる必要がある。

【文献】

- 1 Korbonits M, Bujalska I, Shimojo M,

- et al. Expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase isoenzymes in the human pituitary: induction of the type 2 enzyme in corticotropinomas and other pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86**: 2728-2733.
- 2 Aoki Y, Iwasaki Y, Katahira M, et al. Regulation of the rat proopiomelanocortin gene expression in AtT-20 cells. I: effects of the common secretagogues. *Endocrinology* 1997; **138**: 1923-1929.
- 3 Sandeep TC, Walker BR. Pathophysiology of modulation of local glucocorticoid levels by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Trends Endocrinol Metab* 2001; **12**: 446-453.
- 4 Seckl JR, Walker BR. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1- a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology* 2001; **142**: 1371-6.
- 5 Morris M, Grossman A. The medical management of Cushing's syndrome. *N Y Acad Sci USA* 2002; **970**: 119-133.

【Figure legends】

Fig. 1. RT-PCR 法による, AtT20 細胞での 11 β -HSD2 の発現有無の検討. 二つの異なるプライマーセットを用いて行った (primer set 1: forward 5'-ctagaactgcgtgacctctg-3' and reverse 5'-tggatgaaatacatgagccc-3'; set 2: forward 5'-gagacagctaagaaactggatg-3' and reverse 5'-gccaggcttgataatgctgac-3').

Fig. 2. 11 β -HSD の阻害がコルチゾールの POMC 遺伝子発現抑制に及ぼす影響. ラットの POMC プロモーター活性が種々濃度の CBX (0, 1 および 5 μ M) の存在下で, luciferase assay により定量された. 各々の薬剤を加えたのちの incubation 時間は, CBX 24 時間, コルチゾール 5 時間, forskolin 5 時間とした.

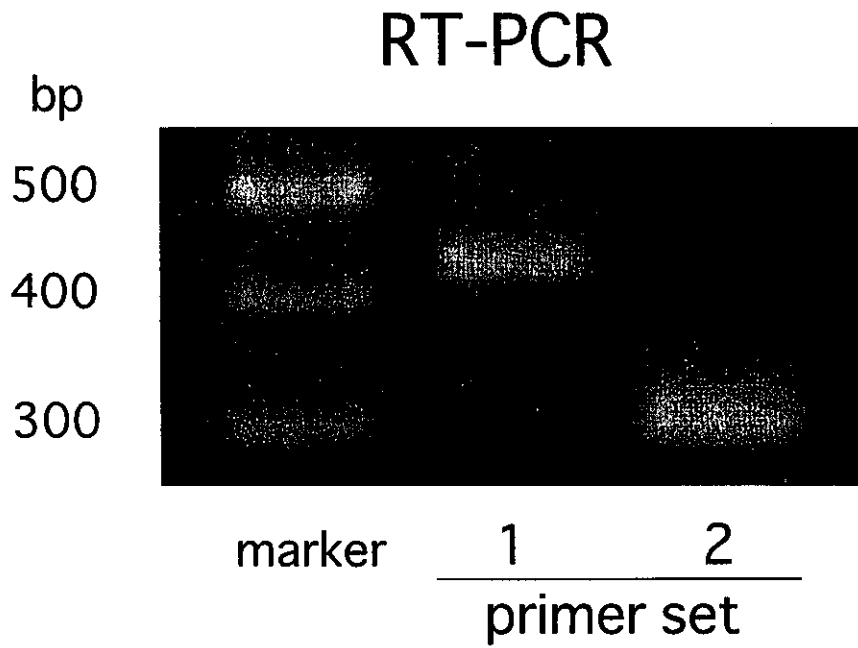


Fig. 1

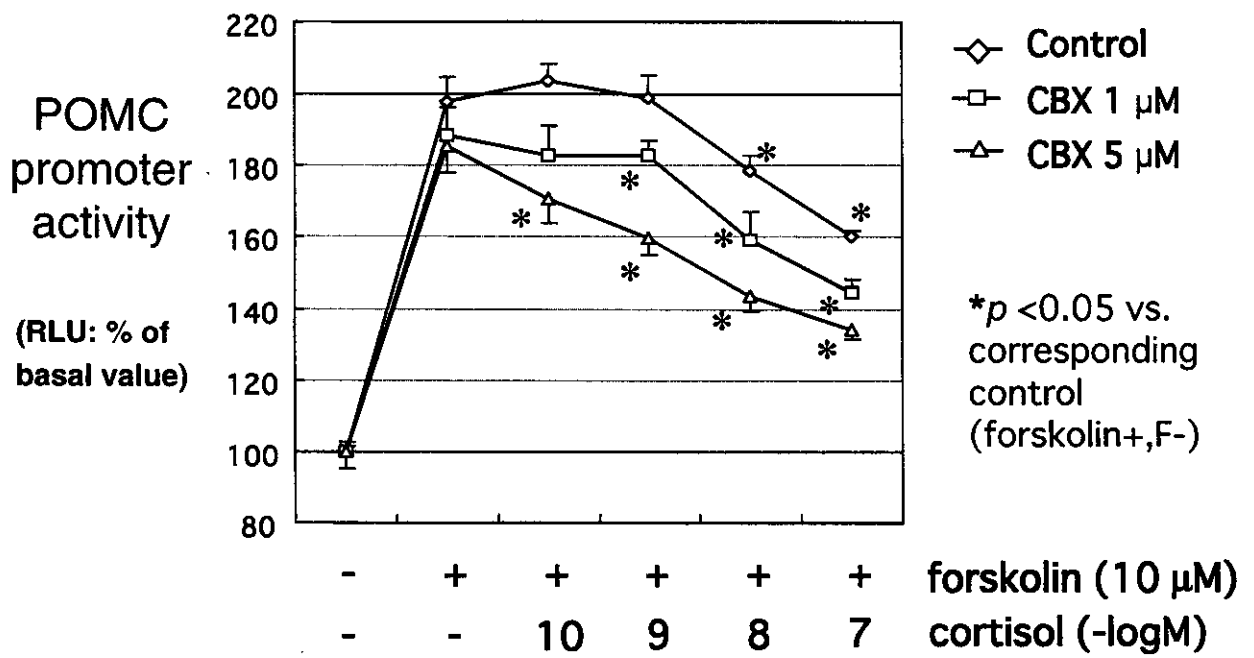


Fig. 2

胃に由来するグレリンの GH 分泌における意義

分担研究者 置村康彦 神戸大学医学部保健学科

研究要旨：下垂体から成長ホルモン（GH）は脈動的に分泌される。末梢血中グレリンの脈動的 GH 分泌に果たす役割を明らかにするため、以下の検討を行なった。無麻酔無拘束ラットの右心房に留置したカニューレから採血し、血漿グレリン値を測定したところ、採血時刻に関わらず、血漿グレリン値に明確な変動は認められなかった。同一ラットにおいて、血漿 GH 値とグレリン値を測定したとき、血漿 GH 高値（100 ng / ml 以上）の時点と、低値（10 ng / ml 以下）の時点における血漿グレリン値は、N 端グレリン測定系でも C 端グレリン測定系でも差が認められなかった。さらに、グレリン作用を抑制する GH secretagogue（GHS）拮抗薬 [D-Lys-3]-GHRP-6 を投与しても、GH の脈動的分泌は保たれていた。以上の成績から、胃で産生され循環血液を介して下垂体に到達するグレリンが GH の脈動的分泌に関与している可能性は小さい。一方、最近、胃で産生されたグレリンが迷走神経を介して GH 分泌を促進する可能性が指摘されているが、ヒトにおいても、このような機構が存在するか確認するため、胃切除、迷走神経切断術後患者におけるグレリンの GH 分泌反応を調べた。しかし、グレリンの GH 分泌反応に、胃切除、迷走神経切断術後患者と健常者とで差異は見出せなかった。

A 研究目的

下垂体からの成長ホルモン（GH）分泌は、睡眠、ストレス、運動などの要因、ブドウ糖、脂肪酸、アミノ酸などの栄養的因子、さらに神経伝達物質、神経ペプチドなどによって影響をうける。これらの因子は、最終的には GH 放出ホルモン（GHRH）と GH 分泌抑制性のソマトスタチン（SRIF）の2つの視床下部ホルモンの分泌を変動させることによって、GH 分泌に影響を与えたと考えられてきた。

生理的状況下では GH は下垂体から脈動

的に分泌される。この現象はヒトにおいても観察されるが、雄性ラットにおいても著明であり、この GH の脈動的分泌は、GHRH、SRIF の分泌とそれらを制御する GH のフィードバック機構によって制御されていることがこれまでの実験成績から明らかになっている。

1999年、児島、寒川らによって同定されたグレリンは、オーファンレセプターであった GH secretagogue（GHS）受容体の内因性リガンドであり、強力な GH 分泌促進活性を有する。胃切除によって、

末梢血中グレリンは半減することから、末梢血のグレリンは主に胃に由来すると考えられている。グレリンを外因性に投与した場合、成長ホルモン分泌は促進されるが、この末梢血中に存在するグレリンが脈動的 GH 分泌に影響を及ぼしているか否かはこれまでのところ明らかではない。そこで、今回、無麻酔無拘束ラットの脈動的 GH 分泌に末梢血中グレリンが関与するか否か検討した。

また、最近、迷走神経を切断したラットでは、グレリンに対する GH 分泌反応が対照群に比べ低下していることが報告されており、胃で産生されたグレリンが迷走神経を介して GH 分泌を促進する可能性がある。ヒトにおいても、同様の迷走神経を介する機構が存在するか確認するため、胃切除、迷走神経切断術後患者におけるグレリンの GH 分泌反応を調べた。

B 研究方法

I. 無麻酔無拘束ラットの脈動的 GH 分泌における末梢血グレリンの意義

無麻酔無拘束ラットの作製

9 週齢のウィスター系雄性ラットの腹腔内にペントバルビタール (50 mg/kg) を投与し、麻酔下で右心房内に採血・薬物投与用カニューレを埋め込み留置した。術後 1 週間目に以下の実験を行なった。

無麻酔無拘束ラットにおけるグレリン分泌の測定

11:00、13:30、16:00 に、無麻酔無拘束ラットの右心房内に留置したカニューレから、グレリン測定用として 1 ml 採血し、直ちに EDTA・アプロチニンと混和した後、血漿を分離し、グレ

リン抽出まで -70℃ で保存した。グレリンの抽出は Ariyasu, Hosoda らの方法 (Ariyasu, H. et al, J Clin Endocrinol Metab 86:4753-4758, 2001) でおこない、実際の測定は細田博士 (国立循環器病センター) に依頼した。

無麻酔無拘束ラットにおける脈動的 GH 分泌と末梢血中グレリン値の相関

10:30 より 30 分おきに、無麻酔無拘束ラットの右心房内に留置したカニューレから 0.3 ml 血液を採取し、直ちに血漿を分離し -70℃ で保存した。ラット GH スタンダードとして NIDDK-rGH-RP-2 を使用した点を除き、既報の RIA 法 (Sato et al. Neuroendocrinology 50:139-151, 1989) に従い、後日 GH を一括測定した。同一のラットより、グレリン測定用として、11:00、13:30、15:30 に 1 ml 採血し、直ちに EDTA・アプロチニンと混和した後、血漿を分離し、グレリン抽出まで -70℃ で保存した。

GHS 拮抗薬 [D-Lys-3]-GHRP-6 の血漿 GH 値に及ぼす効果

9:00 より 30 分おきに、無麻酔無拘束ラットから血液を採取し GH 分泌リズムを観察した。GHS 拮抗薬処置群には、13:00 からは 30 分おきに GH 測定用採血終了後に GHS 拮抗薬 [D-Lys-3]-GHRP-6 を 750 ng ずつ投与した。対照群には、生理的食塩水を同量投与した。血液採取後、血漿を分離し GH を測定、[D-Lys-3]-GHRP-6 の GH 分泌に及ぼす効果について検討した。

検定法

2 群間の比較には Mann-Whitney の U 検定を使用した。

II. 胃切除、迷走神経切断術後患者におけるグレリンのGH分泌反応

胃切除、迷走神経切断術をうけた胃癌患者(男2名、女1名、年齢 58 ± 13 、BMI 20.4 ± 2.1)に、グレリン $0.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ を静脈内投与し、経時的に採血、血漿GHを測定し、健常者(7名)と比較した。また、GHRHのGH分泌効果についても両者で比較した。

なお、この研究は神戸大学医学部附属病院倫理委員会に申請し、許可を得たものであり、申請書に記した方法で、被験者には十分に内容を説明した後、参加の同意を得た。従って、倫理面での問題は無いと判断した。

C 研究結果

I. 無麻酔無拘束ラットの脈動的GH分泌における末梢血グレリンの意義

無麻酔無拘束ラットにおける末梢血中グレリン値

生物活性を有するグレリンを認識するN端測定系では、 $23.7 \pm 1.87 \text{ pM}$ (平均値 \pm 標準誤差、 $n=22$)であり、総グレリンを認識するC端測定系では $219.8 \pm 11.4 \text{ pM}$ であった。血漿グレリンは明確な変動を示さなかった。

無麻酔無拘束ラットにおける血中GH値と血中グレリン値の相関

無麻酔無拘束ラットでは脈動的GH分泌が認められ、そのGH頂値は $154.1 \pm 46.9 \text{ ng}/\text{ml}$ 、底値は $3.8 \pm 0.95 \text{ ng}/\text{ml}$ であった($n=5$)。ラット血漿GH値が $100 \text{ ng}/\text{ml}$ 以上であったときの血漿グレリン値($n=5$)と、 $10 \text{ ng}/\text{ml}$ 以下のときのそれ($n=6$)を比較すると、N端

測定系ではそれぞれ 21.6 ± 8.5 、 $16.5 \pm 4.5 \text{ pM}$ (平均 \pm 標準誤差)であり、両群に有意差は認められなかった。C端測定法を使用したときも、それぞれ 315.5 ± 67.5 、 $342.1 \pm 29.8 \text{ pM}$ であり、両群間に差を認めなかった。

GHS拮抗薬[D-Lys-3]-GHRP-6のGH分泌に及ぼす効果

同一ラットを用いて検討したところ、GHS拮抗薬[D-Lys-3]-GHRP-6投与前に認められたGHの脈動的分泌は、[D-Lys-3]-GHRP-6投与後も観察された。

GH分泌総量の指標としてarea under the curve (AUC)を算出、[D-Lys-3]-GHRP-6投与群($n=8$)、対照群($n=8$)間で比較した。[D-Lys-3]-GHRP-6投与群では、投与前AUC $17089 \pm 2935 \text{ ng} \cdot \text{min}/\text{ml}$ 、投与後AUC $17672 \pm 2101 \text{ ng} \cdot \text{min}/\text{ml}$ 、対照群では投与前AUC $19796 \pm 4092 \text{ ng} \cdot \text{min}/\text{ml}$ 、投与後AUC $23415 \pm 4024 \text{ ng} \cdot \text{min}/\text{ml}$ であり、両群とも、投与前後でAUCに変化はみられなかった。

ラットによりGH頂値をとる時刻は異なるので、GH頂値に及ぼす[D-Lys-3]-GHRP-6の効果の検討では、[D-Lys-3]-GHRP-6あるいは生理的食塩水(対照群)投与後に観察された血中GH最高値を頂値として、両群で比較した。その値は[D-Lys-3]-GHRP-6投与群では $357 \pm 64 \text{ ng}/\text{ml}$ 、対照群では $469 \pm 96 \text{ ng}/\text{ml}$ であり、有意差は認められなかった。

II. 胃切除、迷走神経切断術後患者におけるグレリンのGH分泌反応

胃切術後の患者において、グレリンはGH分泌を明らかに亢進させ(前値 1.6 ± 1.0

ng / ml、頂値 27.7 ± 11.8 ng / ml)、GH 反応に健常者（前値 0.4 ± 0.4 ng / ml、頂値 22.9 ± 20.8 ng / ml）と差異を認めなかった。同様に、GHRH に対する GH 反応も、胃切者（前値 2.1 ± 1.4 ng / ml、頂値 18.4 ± 9.7 ng / ml）、健常者（前値 0.4 ± 0.4 ng / ml、頂値 9.6 ± 1.4 ng / ml）であり、両者に差を認めなかった。

D 考察

無麻酔無拘束ラットにおいて、約 3 時間周期の脈動的 GH 分泌が観察される。この脈動的 GH 分泌に血中グレリンが同期するか否かはグレリンの GH 分泌における役割を理解する上で重要である。当初、GH のリズムを検討する時と同様に、30 分間隔でグレリン測定用血液を採取しようとしたが、グレリン測定用に 1 ml の血液をラットから採取すると、血漿を分離した後、血球浮遊液をラット静脈内に返しても、しだいに GH の脈動的分泌は抑制されることが予備実験で観察された。そこで、採血量を減らすため、通常 GH 分泌の頂値、底値およびその中間値を示すことが多い 3 時点において、無麻酔無拘束ラットから採血しグレリン値を測定した。いずれに時点でも、血漿グレリン値に大差はなく、全測定結果を合算しても、血漿グレリンの標準誤差は平均値の 10% 以内であり、GH と異なり変動に乏しいことが明らかとなった。

ついで、無麻酔無拘束ラットで血漿 GH の脈動的分泌の検討を行なう一方、グレリン測定用採血を同一ラットにおいて 3 時点で併せて行ない、GH 値の高低とグレリン値が関連するか検討した。血漿 GH 値

100 ng / ml 以上の時点と、10 ng / ml 以下の時点におけるグレリン値を比較したが、N 端グレリン測定系でも C 端グレリン測定系でも両者の間に差は認められなかった。これらの成績は、末梢血中グレリンは GH の脈動的分泌を形成する主な因子ではないことを示唆している。

さらに、末梢血中グレリンの GH 分泌における意義を明らかにするため、GHS 拮抗薬 [D-Lys-3]-GHRP-6 を使用した。[D-Lys-3]-GHRP-6 使用量は下垂体細胞初代培養系におけるグレリンの活性を抑制する [D-Lys-3]-GHRP-6 量を基に算出した。13 : 00 に [D-Lys-3]-GHRP-6 を投与し、個々のラットにおいて、その前後で脈動的な GH 分泌に影響がみられるか検討したが、いずれのラットにおいても、脈動的 GH 分泌は保たれていた。GH 分泌総量の指標として GH AUC を算出し比較したが、[D-Lys-3]-GHRP-6 の影響はみられなかった。また、GH 頂値にも [D-Lys-3]-GHRP-6 は影響を与えなかった。以上の成績から、末梢血中グレリンは脈動的 GH 分泌に関与していないことが示唆された。

一方、GHRH 抗血清をラット静脈内に投与すると GH の脈動的分泌はまったく認められなくなることから、私どもは GHRH がこれを規定する因子であることをすでに報告した。今回の結果とあわせ、脈動的 GH 分泌を引き起こす因子は GHRH であり、胃で産生された後、循環血液を介して下垂体に到達するグレリンは脈動的 GH 分泌に大きな役割を果たしていないものと考えられる。

一方、最近、迷走神経を切断したラットでは、麻酔下においてグレリンに対す

る GH 分泌反応が対照群に比べ低下していることが報告されており、胃で産生されたグレリンが迷走神経を介して GH 分泌を促進する可能性がある。そこで、ヒトにおいても、同様の迷走神経を介する機構が存在するか確認するため、胃切除、迷走神経切断術後患者におけるグレリンの GH 分泌反応の検討をおこなったが、ラットとは異なり、今回のグレリン投与の条件下では、迷走神経切除群と対照群においてグレリンの GH 分泌促進反応に違いを見出せなかった。しかし、胃に由来するグレリンによる迷走神経を介する GH 分泌調節機構は新たな概念であり、栄養状況と GH 分泌、身体発育を結び付ける可能性をもつものであるため、今後、さらに検討する必要がある。

E 結論

GH の脈動的分泌とは異なり、血漿グレリン値に経時的変動は認められなかった。さらに、GHS 拮抗薬 [D-Lys-3]-GHRP-6 を投与したときも、GH の脈動的分泌は保たれており、胃で産生され循環血液を介して下垂体に到達するグレリンは GH の脈動的分泌に大きな役割を果たしているとは考えがたい。一方、胃で産生されたグレリンが迷走神経を介して GH 分泌に影響を与える可能性が最近指摘されている。今回のヒトにおける予備的検討では、これを支持する成績は得られなかった。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

論文発表

The role of circulating ghrelin in growth hormone (GH) secretion in freely moving male rats. Okimura Y, Ukai K, Hosoda H, Murata M, Iguchi G, Iida K, Kaji H, Kojima M, Kangawa K, Chihara K. Life Sciences in press, 2003

Mutant form of Pit-1 (R271W) does not act as a dominant inhibitor of Pit-1 action to activate the promoters of growth hormone and prolactin genes. Kishimoto M, Okimura Y, Fumoto M, Iguchi G, Iida K, Kaji H, Chihara K. Euro J Endocrinol in press, 2003

Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells.

Murata M, Okimura Y, Iida K, Matsumoto M, Sowa H, Kaji H, Kojima M, Kangawa K, Chihara K. J Biol Chem 277:5667-5674, 2002

A novel heterozygous T51I mutation of growth hormone receptor is not associated with short stature. Sakurai T, Iida K, Takahashi Y, Kaji H, Takakuwa S, Sumita R, Okimura Y, Chihara K. Growth Horm IGF Res 12:411-7, 2002

Adult growth hormone deficiency in Japan: Results of Investigation by questionnaire

Kaji H, Sakurai T, Iguchi G, Murata M, Kishimoto M, Yoshioka S, Iida K, Okimura Y, Chihara K. Endocrine J 49:597-604,

2002

Novel function of transactivation domain of the pituitary specific transcription factor, Pit-1.

Kishimoto M, Okimura Y, Yagita K, Iguchi G, Fumoto M, Iida K, Kaji H,

Okamura H, Chihara K. J Biol Chem 277:45141-45148, 2002

H 知的財産権の出願・登録状況
該当無し

V. 間脳下垂体機能異常症の診断と治療の手引き

(2003 年)

間脳下垂体機能異常症の診断と治療の手引き（2003）

下記のガイドラインは、間脳下垂体疾患の病態の解明、新しい診断や治療の確立を目的とした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の研究者が共同で作成した最新のものである。

下垂体機能障害は、視床下部または下垂体の病変によって生じ臨床的には下垂体ホルモン分泌過剰症または分泌低下症として認められる。疾病の早期発見が治癒率の向上に重要な意義を持つことからスクリーニング法や診断基準が見直されてきている。また、長期予後を調べた疫学調査結果から治療後の治癒基準にも大きな変化が現れている。我が国における長期予後調査はまだ不十分と言わざるを得ないが、欧米での成績も参考にしながら日本独自の長期予後調査に基づく日本人での基準も必要かもしれない。また、わが国においては保険医療の制約から採用されていない医療や医薬品が、既に先進国では普及している現実も明らかにされている。

本年度は下記に示す4つの疾病について診断と治療のガイドラインを記載する。

1. 先端巨大症・下垂体性巨人症
2. TSH 産生下垂体腫瘍
3. 下垂体前葉機能低下症
4. Cushing 病

なお、上記の各疾患についての最新の診断と治療のガイドラインを作成するにあたって、既に通常の保険診療に使用されているもののみでなく、治験段階である医薬品、また国際的にみて近く医療の現場に採用される可能の高い医薬品も参考として含めたことを付記しておきたい。