

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

間脳下垂体機能障害に関する調査研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 千 原 和 夫

平成 16 年 3 月

目 次

I. 序 文	5
II. 班員名簿	6
III. 総括研究報告書	9
神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座 内分泌代謝 神経 血液腫瘍内科 主任研究者	千原和夫
IV 分担研究報告書	
1 胚性幹細胞 (ES細胞) から成長ホルモン産生細胞への分化に関する研究	21
神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座 内分泌代謝 神経 血液腫瘍内科学教室	千原和夫
2 ヒト大動脈血管内皮細胞の一酸化窒素産生に及ぼす成長ホルモンの直接作用に関する研究	26
島根大学医学部附属病院長	加藤 讓
3 日本人の下垂体機能低下症患者を対象としたQOL尺度の開発 (JAHQ)に関する研究	30
国立京都病院臨床研究センター長	島津 章
4 ACTH分泌過剰に対するtroglitasoneの効果 — in vitro及び実験的Cushing症候群モデルマウスを用いた検討—	34
高知大学医学部内分泌代謝 腎臓内科学教授	橋本 浩三
5 プロラクチンのMENINによる制御機構	38
群馬大学大学院病態制御内科教授	森 昌朋

- 6 LH, FSHおよびPRLの各測定系間における測定値の比較と問題点の検討 42
徳島大学医学部発生発達医学講座女性医学分野教授 苛原 稔
- 7 炎症性疾患に伴うSIADHの発症機序におけるサイトカインの役割に関する研究 —LIFがハプロレシン分泌に与える影響— 51
名古屋大学大学院研究科代謝病態内科学教授 大磯 ユタカ
- 8 本邦における先端巨大症のheel pad thicknessの再評価 55
日本医科大学脳神経外科主任教授 寺本 明
- 9 自己免疫性視床下部下垂体炎における下垂体で高発現する新規遺伝子 Pi-aに対する自己抗体の検討 59
大阪大学大学院医学系研究科講師 巽 圭大
- 10 Sub- (pre-) clinical Cushing病とsilent corticotroph adenomaの全国調査について 62
弘前大学医学部第三内科 須田 俊宏
- 11 先端巨大症の合併症に関する検討 67
東京女子医科大学第二内科 肥塚 直美
- 12 Silent corticotroph adenomaに関する内分泌学的検討(第2報) 70
東京医科歯科大学大学院 体内分子制御学 平田 結喜緒
- 13 初経年齢の標準化 —思春期早発症の診断基準の改定— 74
国立小児病院内分泌代謝研究部 田中 敏章
- 14 GH測定キョト間の較差とその是正 77
国立成育医療センター内分泌代謝科 田中 敏章
- 15 下垂体腺腫における α サブユニット(SU)の発現について 81
東海大学医学部基盤診療学系病理診断学 長村 義之

16	北海道における最近の先端巨大症の臨床像について 北海道大学大学院医学研究科病態内科学講座 第二内科 清水 力	84
17	クッシング病術後の経過中に下垂体炎を発症したと考えられる一例 東北大学病院講師（総合診療部）菅原 明	91
18	末端肥大症におけるインスリン抵抗性 IGT 患者群における 多段階グルコースクランプを用いた評価 九川大学大学院医学研究院病態制御内科 柳瀬 敏彦	97
19	高齢で発見される下垂体前葉機能低下症におけるACTH分泌 不全 低Na血症とオソプレノンンの分泌亢進 自治医科大学付属大宮医療センター総合医学第一 石川 三衛	101
20	細胞移植ないし骨格筋への遺伝子導入を用いた中枢性尿崩症の 遺伝子治療 名古屋大学医学部付属病院検査部 岩崎 泰正	105
21	健常高齢者および軽症疾患罹患高齢者におけるGH分泌反応 神戸大学医学部保健学科 置村 康彦	111
V.	間脳下垂体機能異常症の診断と治療の手引き(2003年)	
	中枢性思春期早発症の診断の手引き(平成15年度改訂)	119
	成長ホルモン分泌不全性低身長症の診断の手引き(平成15年度改訂)	121
	成人GH分泌不全症の診断の手引き(平成15年度改訂)	124
VI.	会議記録 平成15年度研究会議プログラム	129
VII.	研究成果の刊行に関する一覧表	137

I. 序 文

鎮目和夫東京女子医大名誉教授を初代班長とする間脳下垂体機能障害調査研究班が昭和48年度に産声を上げて以来30年余りが経ち、その間、各種間脳下垂体疾患の診断と治療、疫学、病因や病態の解析について多くの有用で価値ある成績を報告してきました。この研究班が対象とする間脳下垂体疾患は発症頻度からすれば希な疾患に分類されますか、希な疾患であるからこそ診断が正確にされていなかったり見落とされたりする頻度の高い疾患でもあります。従って、この研究班の役割の中でまず重要なものは、病因や病態を解析する中で各種間脳下垂体疾患の診断と治療に関する最新のガイドラインを示していくことであると考えます。平成13年度と平成14年度に、主要な間脳下垂体疾患についてその診断と治療に関する最新のガイドラインを作成しました。今年度は、GH測定系が新しい標準物質（リコンビナントGH）を用いる方法に一新される予定であることを受けて、GH分泌不全性低身長症および成人GH分泌不全症の診断の手引きを改訂しました。また、既存の診断基準には合致しない新しい病態の調査研究もこの班の重要な役割です。近年、sub-またはpreclinical Cushing病、silent corticotroph adenoma という病態について学会や論文で報告が次々と為されていますか、これらが均一な疾患概念をもつ病態であるのか、またその頻度はどのくらいか不明なままです。そこで本研究班では、特定疾患の疫学に関する研究班（主任研究者 稲葉 裕教授）の協力の下に全国調査を計画しました。また、間脳下垂体疾患患者では特に長期予後に関する疫学調査研究が重要であることより疫学調査研究班と共同しなからより精密な調査研究を計画しています。さらに、生命に関する予後（寿命）と同時に、あるいはそれ以上に重要なのは健康寿命です。日本人を対象にした間脳下垂体疾患患者のQOLを評価する尺度がないことより、まず成人下垂体機能低下症患者を対象にしたQOL尺度開発に取り組みたいと思います。

本研究班は2年目を迎えました。精力的に活躍して下さった分担研究者の方々に厚く御礼を申し上げます。また、色々ご指導頂いた厚生省保健医療局疾病対策課の方々にも深謝致します。

平成16年3月

間脳下垂体機能障害に関する調査研究班

主任研究者 千 原 和 夫

Ⅱ. 班 員 名 簿

	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	千原 和夫	神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座 内分泌代謝 神経 血液腫瘍内科	教 授
分担研究者	加藤 讓	高根大学医学部内分泌代謝 血液腫瘍内科学	教 授
	島津 章	国立京都病院内分泌代謝臨床研究センター	センター長
	橋本 浩三	高知大学医学部内分泌代謝 腎臓内科学	教 授
	森 昌朋	群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科	教 授
	苛原 稔	徳島大学医学部医学科発生発達医学講座女性医学分野	教 授
	大磯ユタカ	名古屋大学大学院医学系研究科病態内科学講座代謝病態内科	教 授
	寺本 明	日本医科大学脳神経外科学教室	教 授
	巽 圭大	大阪大学大学院医学系研究科生体情報医学	講 師
	須田 俊宏	弘前大学医学部内科学第三講座	教 授
	肥塚 直美	東京女子医科大学第二内科	教 授
	平田結喜緒	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科体内分子制御学	教 授
	田中 敏章	国立成育医療センター内分泌代謝科	医 長
	長村 義之	東海大学医学部基盤診療学系病理診断学	教 授
	横山 徹爾	国立保健医療科学院技術評価部	主任研究官
	清水 力	北海道大学大学院医学研究科病態内科学講座 第二内科	助 手
	菅原 明	東北大学医学部附属病院総合診療部	講 師
	柳瀬 敏彦	九川大学大学院医学研究院病態制御内科学講座	助 授
	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	教 授
岩崎 泰正	名古屋大学医学部附属病院検査部	講 師	
置村 康彦	神戸大学医学部保健学科医療基礎学	助 授	
研究協力者	福原 俊一	京都大学大学院医学研究科健康解析学	教 授
	石井 均	天理よろづ相談所病院内分泌内科	部 長
	羽二生邦彦	羽二生クリニック	院 長
	沖 隆	浜松医科大学第二内科	講 師
	加治 秀介	兵庫県立看護大学栄養代謝学	教 授
	鈴嶋よしみ	京都大学大学院医学研究科健康解析学	助 手
	萱間 真美	東京大学大学院医学系研究科精神看護学分野	助 授
	高野加寿恵	東京女子医科大学第二内科	教 授
事務局	藤原 志穂	神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座 内分泌代謝 神経 血液腫瘍内科 〒650-0017 神戸市中央区楠町7-5-2 Tel 078-382-5880/Fax 078-382-5898	秘 書

Ⅲ. 総括研究報告書

間脳下垂体機能障害に関する調査研究

主任研究者 千原和夫 神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座
内分泌代謝 神経 血液腫瘍内科学教室教授

研究要旨：様々な間脳下垂体機能障害による視床下部ホルモン 下垂体ホルモンの分泌異常症の病因、病態を把握し、その有用な診断治療法を確立することを目的として、本年度は次の研究が行なわれた。

1) SIADHの病態解明を目的とした、炎症性サイトカインであるLIFのAVP分泌に与える影響の検討、2) 中枢性尿崩症の遺伝子治療に関する基礎的検討、3) ACTH過剰分泌に対するtroglitazoneの抑制効果、4) 高齢者の下垂体機能低下症の病態、5) sub-またはpreclinical Cushing病、silent corticotroph adenomaの全国調査計画、6) silent corticotroph adenomaにおけるCushing徴候欠如メカニズム、7) MENINによるプロラクチン発現制御機構、8) α SU陽性細胞のGH- α SU細胞への分化、9) ES細胞から下垂体内分泌細胞への分化、10) ヒト血管内皮細胞におけるNO産生におよぼすGHの直接作用、11) 高齢者におけるGH分泌予備能、12) 我が国における先端巨大症のheel pad thicknessの基準値、13) 多段階グルコースクランプ法を用いた先端巨大症におけるインスリン抵抗性の検討、14) 先端巨大症の合併症および治療前後の耐糖能の変化、15) 北海道における最近の先端巨大症の臨床像、16) GH測定キットの測定値の較差とその是正、17) 初経年齢の標準化—思春期早発症の診断基準の改訂—、18) LH、FSH、およびPRLの各種測定系間における測定値の比較と問題点の検討、19) クノンング病に続発した下垂体炎、20) 自己免疫性視床下部下垂体炎における下垂体で高発現する新規遺伝子Pt-aに対する自己抗体の検討、21) 日本人の成人下垂体機能低下症患者を対象としたQOL尺度開発、22) 間脳下垂体機能障害の長期予後調査。これらの成果は、間脳下垂体機能障害の新たな診断法、治療法を開発するうえで有用であると考えられる。

分担研究者氏名		寺本 明	日本医科大学脳神経外科学教室 教授
加藤 讓	島根大学医学部内分泌代謝 血液腫瘍内科学 教授	巽 圭大	大阪大学大学院医学系研究科 生体情報医学 講師
島津 章	国立京都病院臨床研究センター 部長	須田俊宏	弘前大学医学部内科学第三講座 教授
橋本浩三	高知大学医学部内分泌代謝 腎臓内科学 教授	肥塚直美	東京女子医科大学第二内科 教授
森 昌朋	群馬大学大学院医学系研究科 病態制御内科 教授	平田結喜緒	東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 体内分子制御学 教授
苛原 稔	徳島大学医学部医学科発生発達 医学講座女性医学分野 教授	田中敏章	国立成育医療センター 内分泌代謝科 医長
大磯ユタカ	名古屋大学大学院医学系研究科 病態内科学講座代謝病態内科 教授		

長村義之	東海大学医学部基盤診療学系 病理診断学 教授
横山徹爾	国立保健医療科学院技術評価部 主任研究官
清水 力	北海道大学大学院医学研究科 病態内科学講座 第二内科 助手
菅原 明	東北大学医学部附属病院 総合診療部 講師
柳瀬敏彦	九川大学大学院医学研究院 病態制御内科学講座 助教授
石川三衛	自治医科大学附属 大宮医療センター総合医学 第一教授
岩崎泰正	名古屋大学医学部附属病院 検査部 講師
置村康彦	神戸大学医学部保健学科 医療基礎学 助教授

A 研究目的

本研究の目的は、様々な間脳下垂体機能障害による視床下部ホルモン 下垂体ホルモンの分泌異常症の病因、病態を把握し、その有用な診断治療法を確立することである。間脳下垂体系は、内分泌の中核であるばかりでなく、神経系や免疫系など他の生体制御システムと密接に関連している。したかつて、その障害は身体各所に様々な異常を引き起こし得るし、神経系や免疫系の異常や障害によっても間脳下垂体機能に障害が出現しうる。また、間脳下垂体機能障害は、視床下部 下垂体系自身の制御システム障害と、その結果として生じる、下垂体ホルモンにより調節されている標的臓器の異常、障害の2つに分けて考えることが可能である。この両者に対して、臨床で得られた問題をもとに、新たな視点で詳細に検討し、再び臨床の場にフィードバックすることが必要である。本研究では、この観点から、種々の方法を用いて研究が行なわれた。

さらに、本研究では、全国的な間脳下垂体障害の長期予後調査を行なうことをめざして

いる。間脳下垂体障害は、前述したように、身体各所に多彩な異常が出現し、また経過も長期に渡るものが多いため、経過を単に生命予後のみで把握するだけでなく、症状やQOL、社会的自立等を指標とした健康余命についても評価することか望まれる。また、その結果は臨床医療における治療方針および公衆衛生行政にとって重要な基礎資料となると考えられる。本研究では、この事業を大きな柱として位置付けている。

B 研究方法

大磯らは、炎症性疾患に伴うSIADHの病態解明を目的とし、炎症性サイトカインであるLIFがAVP分泌に与える影響を明らかにするため、無麻酔無拘束下のラットを用いた研究を行なった。

岩崎らは、中枢性尿崩症のモデル動物であるBrattleboro ratに、AVP遺伝子を導入した内分泌細胞の皮下移植、および骨格筋への直接の遺伝子導入を行ない、中枢性尿崩症の遺伝子治療に関する基礎的検討を行なった。

橋本らは、AtT20細胞におけるACTH過剰分泌に対するtroglitazoneの抑制効果に関して、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AtT20細胞に導入したAtT20PL細胞を用いて、in vitro実験、in vivo実験を行なった。

石川らは、65歳以上の下垂体前葉機能低下症患者20例（男性11例、女性9例）において発見の契機となった症状、受診時に認められた全症状、検査所見、低下ホルモンの種類、病因、合併症と、厚生省特定疾患対策事業研究班でまとめられた全年齢（4-88歳 平均49.1歳）の下垂体前葉機能低下症患者のそれとを比較検討した。さらに、新たに発見された続発性副腎皮質機能低下症患者40例（男性17例、女

性23例)の基本検査所見、血清電解質、血漿浸透圧、血漿AVP値が年齢別に比較検討された。

ACTH産生下垂体腺腫を有する症例の中にはCushing病以外にも、その典型的な症状を呈するには至らない状態(sub-またはpreclinical Cushing病)や、ACTHを合成するか分泌はしない腫瘍(silent corticotroph adenoma)が含まれている。須田らは、これらを対象に全国調査を行い、頻度の推定、病態の把握、疾患概念の確立、診断基準および治療指針の策定をめざすことを計画した。

平田らはsilent corticotroph adenomaか、臨床的にCushing徴候を呈さないメカニズムとして、POMCプロセッシングの異常により活性の低いACTHが生成される可能性を考え、POMCのプロセッシング酵素であるprohormone convertases(PC)1/3の腫瘍での発現と血中ACTHの存在様式を検討した。

多発性内分泌腫瘍症1型の原因遺伝子MEN1は、610アミノ酸からなる蛋白MENINをコードする癌抑制遺伝子である。森らは、下垂体腫瘍細胞株GH4C1細胞を用い、MENINのプロラクチンプロモーター活性へ影響を検討し、MENINの変異による下垂体腫瘍発生機構の解明を試みた。

長村らは、ヒト下垂体腺腫、培養細胞を用い、免疫組織学、RT-PCR、アテノウイルスヘクターによるPit-1遺伝子導入実験を施行し、GH- α SU細胞か α SU陽性細胞から分化するか否か検討を行った。

千原らは、下垂体の分化機構を明らかにする目的で、ES細胞から下垂体内分泌細胞への分化について種々の培養条件で検討した。

加藤らは、生理的濃度のGHが血管内皮細胞のNO産生におよぼす効果について明らかにすること、およびGHの血管内皮細胞のNO産生促進効果におけるIGF-1の関与の有無について

明らかにすることを目的に、ヒト血管内皮細胞を用いてNO産生におよぼすGHの直接作用をin vitroで検討した。

GH分泌は加齢とともに低下するか、GH欠乏状態に陥る高齢者の割合は不明である。そこで、置村らは、60歳以上の健常高齢者、および軽症高血圧、糖尿病等で治療を受けているか他に大きな異常所見のない患者(軽症疾患罹患高齢者)に対してGH分泌刺激試験を行ない、GH反応を検討した。

先端巨大症に対するheel pad thickness(HPT)は22mm以上という欧米の基準が採用されているか、本邦における基準値は不明である。寺本らは、自ら経験した先端巨大症患者のHPTの再評価を行った。

先端巨大症では高中性脂肪(TG)血症並びにインスリン抵抗性をきたし、GHとの関連が示唆されているか、その詳細な機序は明らかではない。柳瀬らは、先端巨大症患者においてTG値とGHの関連性について多数症例で再検討するとともに、耐糖能異常(IGT)を示す先端巨大症、ならびに先端巨大症以外でIGTを呈するコントロール患者群において、多段階グルコースクランプ法を施行し両群を比較検討した。

先端巨大症ではGHの過剰分泌が種々の合併症をもたらす。肥塚らは本症の合併症および本症治療前後の耐糖能の変化を検討した。

清水らは、北海道庁に保管されている下垂体機能障害個人調査票に基づき、過去8年間における先端巨大症の臨床像について平成5年度全国調査報告の結果と比較検討した。

田中は、GH分泌不全性低身長症の診断の公正性のために、現在市販されている6種類のGH測定キットの補正式を作成した。また、rhGHを標準品として使用した場合の測定値についても検討した。

思春期早発症の診断基準値を再検討する目

的に、田中らは、初経年齢のわかっている226名の東京の私立女子校生を対象に、初経年齢調査を行なった。

LH、FSH、PRLの測定に関して複数のキントか使用されているか、測定値の直接の比較が困難である。苛原らは、3種類の測定系の比較検討を行なった。

菅原は、クノング病術後の経過中に下垂体炎を発症したと考えられる興味深い一例を報告した。

自己免疫性視床下部下垂体炎の非侵襲的な診断法を開発するため、巽らは、BodyMap法により下垂体で高発現することか示された新規遺伝子Pi-aを新たな候補抗原とした自己抗体の診断的価値を種々の患者血清を用いて検討した。

欧米において成人成長ホルモン分泌不全症を対象とした健康関連QOL尺度が開発され使用されているか、言語や文化的背景の相違から日本人にそのまま適用できるかどうか、疑問がある。島津らは、アウトカム評価に使える、日本人に立脚した成人下垂体機能低下症に特異的なQOL尺度の開発を試みている。

横山は、わか国で過去に実施された他の難病の予後調査の方法と問題点を検討し、間脳下垂体機能障害の予後調査の実施方法についての私案を作成、提示した。

C 研究結果、および D 考察

大磯らは、炎症性疾患に伴うSIADHの病態解明を目的とし、炎症性サイトカインであるLIFかAVP分泌に与える影響を検討した。SDラットを用い、無麻酔無拘束下にLIFを脳室内投与した後、断頭採血して血漿AVPをRIAで測定した。また、LIF中枢投与後の血漿Na、総蛋白、血圧を測定した。さらにLIF静脈内投与後の血漿AVP濃度を測定した。LIFの脳室内投与により、

投与後5分から60分まで血漿AVPの有意な上昇か認められた。LIF投与後、血漿Na、総蛋白及び平均動脈血圧に有意な変化はみられなかった。LIF末梢投与は血漿AVP濃度に有意な影響を与えなかった。LIF中枢投与かAVP分泌を促進し、その作用は血漿浸透圧、循環血漿量あるいは血圧の変化を介した二次的なものではないと考えられた。LIFは各種炎症性疾患で発現の増加か報告されており、炎症性疾患に伴うSIADHの発症機序におけるLIFの関与か示唆された。

岩崎らは、中枢性尿崩症を対象にした遺伝子治療によるホルモン補充療法の基礎的検討を行なった。中枢性尿崩症のモデル動物であるBrattleboro ratに、AVP遺伝子を導入した内分泌細胞の皮下移植、骨格筋への直接の遺伝子導入を行なった。細胞移植では、最大限6ヶ月の尿量正常化を認めた。

橋本らはAtT20細胞におけるACTH過剰分泌に対するtroglitazoneの抑制効果に関して検討した。in vitro実験では、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AtT20細胞に導入したAtT20PL細胞を用いた。in vivo実験では、AtT20細胞をヌートマウスに移植した実験的Cushing症候群マウスを用いた。in vitroでは、troglitazone (3×10^{-6} M)は、POMC遺伝子プロモーター活性及びACTH分泌を低下させたか、in vivoでは、troglitazone (150mg/kg)は、マウス血中ACTH濃度を逆に有意に増加させ、ACTH分泌抑制効果を示さなかった。これらin vitroとin vivoの実験結果の解離の原因は不明であるか、以上の結果よりtroglitazoneのCushing病に対する臨床応用は困難であると思われる。

高齢で発見される下垂体前葉機能低下症は、症状所見に乏しい。石川らは、高齢者において下垂体機能低下症の発見の契機となった

症状 所見を本症の全体例と対比し、さらに低Na血症の特徴を検討した。高齢者（65歳以上）の下垂体機能低下症20例での発見の契機となった症状 所見は、食欲不振、全身倦怠感、意識障害、悪心嘔吐など副腎不全と関連するものであった。検査成績では低Na血症が著しく、ホルモン分泌障害ではACTHが80%に達した。ACTH分泌不全例では、低Na血症が加齢に従って増悪した（ $r = -0.681$ 、 $P < 0.0001$ ）。血漿アノプレノン（AVP）濃度は低浸透圧血症にもかかわらず相対的高値で、AVP依存性水利尿不全による希釈性低Na血症の病態が認められた。特異な症状に乏しい高齢者の下垂体前葉機能低下症では、ACTH分泌不全が主な病態形成に関与することか明らかとなった。

近年ACTH産生下垂体腺腫を有する症例の中にはCushing病以外にも、その典型的な症状を呈するには至らない状態（sub-またはpreclinical Cushing病）や、ACTHを合成するか分泌はしない腫瘍（silent corticotroph adenoma）が含まれることが知られてきた。これら症例の頻度や病態の詳細は未だ明らかでなく、概念や診断基準も確定していないため、症例の取扱いには困難を生している。須田らはこれらの疾患群の全国調査を行い、頻度の推定、病態の把握、疾患概念の確立、診断基準および治療指針の策定をめざすことを計画した。この疾患群の中には非活性型のACTHを分泌しているもの、cortisol代謝が亢進しているためにACTHの過剰分泌による障害が相殺されている例など、複雑で希少な病態を呈するものもこの全国調査により明らかにされていくことが期待される。

平田らは、silent corticotroph adenomaが臨床的にCushing徴候を呈さないメカニズムとして、POMCプロセシングの異常により活性の低い

ACTHが生成される可能性を考え、POMCのプロセシング酵素であるprohormone convertases (PC)1/3の腫瘍での発現と血中ACTHの存在様式を検討した。その結果、silent corticotroph adenomaでは腫瘍中にACTHの存在が証明できるものにも関わらず、臨床症状が欠如している機序の一部に、腫瘍でのPC1/3の発現低下のためにACTHへのプロセシングが障害されるため、活性の低い大分子ACTHが分泌されている可能性が示唆された。

多発性内分泌腫瘍症1型の原因遺伝子MEN1は、610アミノ酸からなる蛋白MENINをコードする癌抑制遺伝子である。今回、MENINの変異による下垂体腫瘍発生機構を解明するため、森らは、MENINのプロラクチン遺伝子への転写制御機構を検討した。下垂体腫瘍細胞株GH4C1細胞を用い、MENINのプロラクチンプロモーター活性へ影響を検討したところ、野生型MENINはプロモーター活性を40%に抑制し、驚いたことにA176P、A242V変異体は、18%、20%と野生型より強い抑制効果を示した。さらに欠失変異体を作製し転写抑制効果を検討したところ、MENIN1-285、278-610はいずれも転写抑制効果を示し、MENIN1-108が最も強い抑制効果を示した。すなわち、MENINには2ヶ所以上の転写抑制トメインが存在し、N端側の強力な転写抑制作用は通常はC端側により抑制されていることが判明した。以上の結果より、MENINの変異により転写抑制が強くなることが腫瘍発生機構に関与する可能性が示唆された。

α サフユニット(SU)はヒト下垂体腺腫において、最も出現頻度の高いホルモンであり、ヒトGH産生腺腫において α SUが高頻度に発現することは、ヒト下垂体細胞腺腫の大きな特徴といえる。長村らは、GH- α SU細胞か α SU陽性細胞から分化することを示すことを目

的とし、ヒト下垂体腺腫、培養細胞を用い、免疫組織学、RT-PCR、アデノウイルスヘクターによるPit-1遺伝子導入実験を施行し、検討を行った。その結果、GH産生腺腫、非機能性腺腫において、 α SUの高率な発現を確認し、 α SU単独陽性症例におけるPit-1陽性症例と陰性症例の存在を確認した。また、 α T3-1細胞にAdeno-FLAG-Pit-1を感染させた結果、Pit-1融合タパクの発現が確認され、さらに、GHの発現が認められた。これにより、ヒト下垂体腺腫における解析結果から、ヒト下垂体細胞の初期分化過程において、 α SU陽性細胞からPit-1を発現することによりGH- α SU陽性細胞を経由しGH細胞へ分化することか示唆された。

千原らは、下垂体の分化機構を明らかにする目的で、ES細胞から下垂体内分泌細胞への分化について検討した。ES細胞はLIF存在下にゼラチンコートデイノシュテフィーダ細胞なしに継代が可能であるマウスZHTc6細胞を使用し、GH産生細胞が誘導されるかをRT-PCRを用いて検討した。ES細胞は、いったんembryoid body (EB) 形成した後、各種細胞に分化することか知られているので、EB形成させた後セラチンコートデイノシュテで培養した。約7日目から成長ホルモン (GH) mRNA発現が認められたか、EB形成の有無で比較したところ、両者同程度にGH mRNAの発現が確認され、EB形成はGH mRNA発現に対し必須条件ではないと考えられた。通常、マウスES細胞はLIF存在下でその多能性が維持され、LIFがない状態では多能性が維持できず分化するとされている一方、一部の臓器においてその発生過程においてLIFが関係しているとの報告もある。そのため、LIF存在下と非存在下で培養を継続し両者を比較したが、LIFの存在下のほうが非存在下に比べて、GHのmRNAの発現が強く認められLIFの存在が必ずしも下垂体分化へ抑制

的に働かない可能性が示唆された。

加藤らは、生理的濃度のGHが血管内皮細胞のNO産生におよぼす効果について明らかにすること、およびGHの血管内皮細胞のNO産生促進効果におけるIGF-Iの関与の有無について明らかにすることを目的に、ヒト血管内皮細胞 (HAEC) を用いてNO産生におよぼすGHの直接作用をin vitro で検討した。生理的濃度のGHはHAECの培養液NO₂濃度を増加させた。IGFBP-Iの同時投与はIGF-IによるNO産生を抑制したか、GHの作用には影響を与えなかった。GHはIGF-Iと同時に血管内皮細胞に直接作用してNO産生を増加させること、この作用は局所IGF-Iを介しないことか示唆された。

GH分泌は加齢とともに低下するか、GH欠乏状態に陥る高齢者の割合は不明である。そこで、置村らは、60歳以上の健常高齢者、および軽症高血圧、糖尿病等で治療を受けているか他に大きな異常所見のない患者 (軽症疾患罹患高齢者) に対してGH分泌刺激試験を行ない、GH反応を検討した。61名 (男性25名、女性36名) の被験者にアルキニンおよびL-トローパを投与したところ、GH反応の頂値が3ng/ml以下の低反応者は各々21% (13/61)、38% (21/55)であった。両試験ともに低反応であった者は16% (9/55)で、このうち2名の血中IGF-Iはともに77ng/mlと低値であった。GH分泌反応、血中IGF-I値から判断すると、一般高齢者のなかに、器質的疾患によるGH分泌不全症患者に匹敵するGH分泌不全者も存在する可能性があり、このようなGH分泌不全者が特有の臨床像を示すのか、今後明らかにする必要があると考えられる。

先端巨大症に対するheel pad thickness(HPT)は22mm以上という欧米の基準が採用されているか、本邦における基準値は不明である。寺本らは、自ら経験した先端巨大症患者の

HPTの再評価を行った。先端巨大症患者のうちHPTを測定しえた症例は112例（男性39例、女性73例）で、平均年齢は 45.8 ± 14.6 （男性 41.6 ± 14.6 、女性 48.4 ± 14.3 ）であった。実際の測定は、Kho KM(Br J Radiol, 1970)らの方法に従った。HPTの平均値は 25.3 ± 3.3 mm（男性 25.7 ± 3.1 mm、女性 25.0 ± 3.4 mm）で、基準値を下回ったものが男性15.4%、女性15.1%に見られた。本邦の疫学調査(H5年)では基準値を下回ったものは約50%であったか、今回は欧米の基準を満たす例が多かった。

先端巨大症では高中性脂肪(TG)血症並びにインスリン抵抗性をきたし、GHとの関連が示唆されているか、その詳細な機序は明らかではない。柳瀬らは、先端巨大症患者においてTG値とGHの関連性について多数症例で再検討するとともに、耐糖能異常(IGT)を示す先端巨大症、ならびに先端巨大症以外でIGTを呈するコントロール患者群において、多段階グルコースクランプ法を施行し両群を比較検討した。先端巨大症では(1)手術前後においてTG値は有意に低下し、手術前後のTGの変化度はGH変化度と相関を認めた。(2)先端巨大症を伴うIGTと先端巨大症を伴わないIGTでは、インスリン分泌能に差は認めなかった。(3)先端巨大症を伴うIGT群では、受容体以降のインスリン抵抗性を示すとされる高濃度インスリン圧入におけるグルコース圧入率が有意の低下を認めたか、インスリン抵抗性とGH分泌能には必ずしも相関を認めなかった。先端巨大症の高TG血症、インスリン抵抗性にGH分泌は関連するか、その程度はGH分泌能のみで規定されるものではないと考えられた。

先端巨大症ではGHの過剰分泌が種々の合併症をもたらす。肥塚らは本症の合併症および本症治療前後の耐糖能の変化を検討した。過去5年間に東京女子医大第2内科に入院した先

端巨大症82例（男/女 30/52、年齢19～82歳）を対象に病歴調査を行った。糖尿病、耐糖能障害を各々45%、33%、高血圧症32%、高脂血症37%、悪性腫瘍9%、大腸ポリープ45%、腺腫様甲状腺腫を46%に認めた。手術前後で耐糖能を検討し得た58例において術前のDM/IGTの比率はControl良好群(G, 33例)、不十分群(I, 6例)、不良群(P, 19例)で各々12/10, 0/5, 10/5例であり術後4/10, 0/1, 4/8例といずれも改善した。一方HOMA-RはG群, I群, P群で 2.50 ± 0.33 , 2.75 ± 0.69 , 3.52 ± 0.76 であり術後、前二者では有意に低下したか非寛解群では明らかな低下には至らなかった。本症の合併症については治療基準に照らした各群の、より長期の予後を検討する必要がある。

清水らは、北海道庁に保管されている下垂体機能障害個人調査票に基づき、過去8年間における先端巨大症の臨床像について平成5年度全国調査報告の結果と比較検討した。検討症例数は108例（男性46例、女性62例）で、平成5年度報告と比較し、年齢構成、臨床所見ならびにGH以外の下垂体機能の障害度に変化は認めなかったか、申請時GHは明らかに低値を示した。また、一般検査および合併症において糖代謝異常、高血圧症、高脂血症の合併頻度が上昇していた。2003年度に公表された先端巨大症治療基準に基づき治療効果を判定し、53例中23例がコントロール良好群に、13例が同不十分、17例が同不良群に分類された（75gOGTTは術後2～3週に施行）。コントロール不十分例のうち3例、同不良例のうち5例で術後75gOGTTにてGH底値が1ng/ml未満に抑制されなかったか、最終確認時のIGF-1は性別・年齢を考慮した基準値内にあった。治療基準の妥当性に加え、効果判定時期の検討の必要性があると考えられた。

田中は、GH分泌不全性低身長症の診断の公正性のために、現在市販されている6種類のGH測定キットの補正式を作成した。一方、rhGHを標準品として用いて検討した場合には、その測定値はほぼ一致し、補正式を用いる必要性はなかった。しかし、今までの測定値の60%になり、GH分泌刺激試験のカノトオフ値6 ng/ml とするのが妥当であるという成績が得られた。

思春期早発症の診断基準値を再検討する目的で、田中らによって、初経年齢のわかっている226名の東京の私立女子校生を対象に、初経年齢の調査が行なわれた。初経年齢は12歳3ヶ月で、±2SDの範囲は10歳5ヶ月から14歳1ヶ月とであった。思春期早発症の診断基準としては10歳6ヶ月とするのか妥当と考えられた。

LH、FSH、PRLの測定に関して複数のキットが使用されているか、測定値の直接の比較が困難である。苛原らは正常月経婦人、各種排卵障害患者、更年期婦人、妊婦からの検体を用いて、3種類の測定系の比較を行なった。その結果、PRLの測定の基準値に相違が大きいことが明らかとなった。

菅原は、クッシング病術後の経過中に下垂体炎を発症したと考えられる一例を報告した。症例は28歳女性。諸検査から下垂体性クッシング病が疑われ、脳外科にて経蝶形骨洞下垂体腺腫摘出術が施行された。免疫染色からACTH産生腺腫が確認された。術後ACTH コルチゾールは完全に低下し、ステロイド補充にて経過は良好であったか、術後一年頃から頭痛が出現した。MRIにて下垂体の腫大が認められたが、ダイナミックMRIの結果から腫瘍の再発は否定的であった。4者負荷試験にてはACTH コルチゾール系が回復途中である他は全て正常値であったか、脱水ピトレシ

ン試験にては尿崩症は否定的であり、非典型的なリンパ球性下垂体炎と考えられた。頭痛が難治性であり視交叉の圧排が認められたことから、プレドニン20mgによる治療を開始した。その後下垂体は縮小し頭痛も軽快した。現在プレドニン2.5mgまで減量したが、経過は良好で外来フォローアップ中である。本症例における下垂体炎の発症機序は不明であるか、ステロイドの減量に伴う免疫賦活の関与か推定された。

巽らは、自己免疫性視床下部下垂体炎(LH)の非侵襲的な診断法を開発するため、BodyMap法により下垂体で高発現することか示された新規遺伝子Pi-aを新たな候補抗原とした自己抗体の診断的価値を検討した。対象症例は、LH14例、ACTH単独欠損症10例、TSH単独欠損症4例、Sheehan症候群3例。Pi-aに対する抗体価を、cDNAを用いたランオリカント法により検討した。抗Pi-a抗体価陽性例は、自己免疫性視床下部下垂体炎14例中5例(35%)、ACTH単独欠損症10例中4例、TSH単独欠損症4例中1例で、これまで検討された抗原の中では陽性率が高く、Pi-aが自己免疫性視床下部下垂体炎の補助診断の一助になりうることを示唆された。

欧米において成人成長ホルモン分泌不全症を対象とした健康関連QOL尺度が開発され使用されているか、言語や文化的背景の相違から日本人にそのまま適用できるかどうか、疑問がある。島津らは、アウトカム評価に使える、日本人に立脚した成人下垂体機能低下症に特異的なQOL尺度を独自に開発し、その妥当性の検証をすすめている。開発手順では、質的研究として下垂体機能低下症患者および専門医を対象に半構造的面接から特有な概念の抽出、整理を行い、概念モデル、下位尺度仮説、QOL質問項目プールを作成する。次に、パイ

ロット研究として質的・量的検討、実施可能性に基づき項目を絞り込んだ後、多数の症例を対象に、信頼性と妥当性について計量心理学的評価を行い、治療前後の反応性を検証し、最終的なQOL尺度として完成させるというものである。本年度は欧米で用いられている既存の疾患特異的QOL尺度が評価され、問題点か指摘された。

間脳下垂体機能障害は、経過が長期に渡るものが多いため、経過を単に生命予後のみで把握するだけでなく、症状やQOL、社会的自立等を指標とした健康余命についても評価することが望まれる。また、その結果は臨床医療における治療方針および公衆衛生行政にとって重要な基礎資料となる。横山は、わが国で過去に実施された他の難病の予後調査の方法と問題点を検討し、間脳下垂体機能障害の予後調査の実施方法についての私案を作成、提示した。この長期予後調査は、本調査研究班における重要事業と位置付けており、追跡調査の方法、高い追跡率をはかる方法等について、横山の発表案をたたき台に分担研究者、研究協力者間で長時間の討論が行なわれた。

E 結論

間脳下垂体機能障害による視床下部ホルモン下垂体ホルモンの分泌異常症の病因、病態を把握し、その有用な診断治療法を確立することを目的とし、様々な臨床研究、*in vivo*、*in vitro*実験が行なわれ、多くの成果が得られた。この成果は、新たな間脳下垂体機能障害の診断法、治療法を開発するうえで有用であると考える。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

論文発表

英文原著 112編

H 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

IV. 分担研究報告書

胚性幹細胞（ES細胞）から成長ホルモン産生細胞への分化に関する研究

主任研究者 千原和夫 神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座
内分泌代謝 神経 血液腫瘍内科学教室

工藤 工 同
井口元三 同
竹野亮子 同
福岡秀規 同
高橋健太郎 同
高橋 裕 同
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

研究要旨 下垂体の分化機構を明らかにする目的で、ES細胞から下垂体内分泌細胞への分化について検討した。ES細胞はLIF存在下にゼラチンコートペトリ dishes にフィーダ細胞なしに継代可能なマウスZHTc6細胞を使用し、GH産生細胞が誘導されるかをRT-PCRを用いて検討した。ES細胞は、いったんembryoid body (EB) 形成した後、各種細胞に分化することが知られているので、EB形成させた後ゼラチンコートペトリ dishes に培養した。約7日目から成長ホルモン（GH）mRNA発現が認められたが、EB形成の有無で比較したところ、両者同程度にGHmRNAの発現が確認され、EB形成はGH mRNA発現に対し必須条件ではないと考えられた。通常、マウスES細胞はLIF存在下でその多能性が維持され、LIFがない状態では多能性が維持できず分化するとされている一方、一部の臓器においてその発生過程においてLIFが関係しているとの報告もある。そのため、LIF存在下と非存在下で培養を継続し両者を比較したか、LIFの存在下のほうが非存在下に比べて、GHのmRNAの発現が強く認められLIFの存在が必ずしも下垂体分化へ抑制的に働かない可能性が示唆された。

A 研究目的

下垂体は、その初期分化機構が比較的良好に検討されている組織であり、分化の各段階に影響を及ぼす種々の転写因子の存在がすでに報告されている。分化後期においても、特徴的なホルモンを産生するため、その機構を検討することが容易であり、器官形成を研究する上でよいモデルとなりうる。また、実際に下垂体分化の各段階の異常による疾患が存在し、

その疾患の発症機序を解明する上でも、下垂体分化の機構を明確にすることは重要である。胚性幹細胞（ES細胞）は多能性を有する細胞として知られ、各種細胞への分化が報告されているが、いまだ下垂体細胞への分化についての報告はない。今回、下垂体前駆細胞から下垂体細胞への分化調節機構を明らかにするために、ES細胞をモデルに使用し、下垂体前駆細胞、特に成長ホルモン（GH）産生細胞へ

の分化を調節する因子について検討した。

B. 研究方法

ES細胞は、ゼラチンコートデイノシユでフィーダ細胞なしに継代培養が可能であるマウス由来のZHTc6細胞を使用した。転写因子の強制発現や、種々の細胞外環境を変動させることによって、ES細胞を分化させ、RT-PCRによる各種mRNAの検出、免疫組織化学法による下垂体ホルモン蛋白の同定、およびFACSを使用した遺伝子発現の検討によりその分化度を評価した。

1) ES細胞に対しヒトPit-1にflag蛋白が結合した蛋白を発現するヘクター (hPit-1-flag) を作成、これES細胞にトランスフェクションし、Pit-1蛋白を強制発現させた。これによるES細胞の分化を種々の下垂体特異的遺伝子の発現を指標にRT-PCRで検討した。また、外因性Pit-1の発現は、抗flag抗体を使用したウェスタンブロットで確認した。

2) ES細胞を三次元的に培養した後、内胚葉、中胚葉、外胚葉それぞれへの細胞分化を誘導するために、Embryoid body (EB) を形成させた。15 μ lにES細胞を500個含む培養液滴を培養デイヌに置き、この培養デイヌを上下転倒させて培養することによって培養液滴の先端部に細胞を集め、EBを形成させた。EB形成の有無、および浮遊培養の下垂体細胞分化に及ぼす効果について、1)と同様の方法で観察した。

3) ES細胞をコラーゲンコートデイシユに接着させた状態で培養し、Leukemia inhibitory factor (LIF) の有無によるGH遺伝子発現の変化を経時的に観察した。

4) ヒトGH遺伝子の組織特異的な発現には転写開始点近傍のプロモーター以外に、より上流に位置する領域 (Locus control region, LCR)

が重要であることが報告されている。Green fluorescent protein (GFP) の上流に、LCRおよびヒトGHプロモーター領域を結合させたレポータープラスミド(LCR-GH-GFP) を作製し、このレポータープラスミドをES細胞にトランスフェクションした。この遺伝子導入ES細胞は、GH発現がおこる状況でGFPを産生することが期待される。この細胞培養液にLIFを添加し、その有無によるGFP産生の差異をFACSで解析した。

なお、本研究はマウス由来のES細胞を使用した研究であり、倫理面での問題はない。

C. 研究結果

1) ES細胞においてRT-PCRにおける発現遺伝子の違いを観察したところ、NeuroD1, PTX1, PTX2などの下垂体形成の初期に見られる遺伝子の発現が、下垂体と比較して少ない量であるか認められた。すてに下垂体形成の初期に発現する遺伝子発現がおこっているため、後期に発現し、直接GH等下垂体ホルモン遺伝子発現を調節するPit-1を発現させて、GH等の発現かみられないか観察した。ES細胞にPit-1を強制発現させたとき、RT-PCRによりPit1mRNAの発現が確認された。また、ウェスタンブロットによりPit-1蛋白の発現も明らかに確認できたか、GH、TSH等Pit-1の直接の制御下にある遺伝子の発現に関して何ら影響は認められなかった。

2) 種々の培養法と下垂体関連遺伝子の発現の関連について検討したか、EB形成、あるいは浮遊培養を行ってもGH関連遺伝子の発現に変化を認めず、むしろEB形成をおこさせた場合のほうが、Ptx1、Ptx2などの発現は少なかった。

3) 通常、ES細胞は、LIF存在で多能性を維持し継代され、LIF非存在下では分化することか知られているため、LIF非存在下でゼラチンコー

トディノシュに培養し、RT-PCRによりGH遺伝子発現を観察した。6日目にはほぼコンフルエントの状態であったか、そのまま継代を行わずに培養を継続した。6~9日目頃からGH mRNAが経時的に増加することが観察された。さらに、一部の細胞ではGH蛋白が免疫組織化学法で陽性であった。また、Pit-1遺伝子発現の増加がGH遺伝子発現の亢進に平行し認められた。Ptx1, Ptx2の遺伝子発現も、経時的に増加することが観察されたが、TSH, NeuroD1の遺伝子発現には変化を認めなかった。

LIFのGH遺伝子発現への影響をRT-PCRで検討した結果、LIFの有無には関わらず、GHの遺伝子発現は経時的に増加するものの、LIF存在下のほうが非存在下に比べてGH遺伝子発現が増加した。Ptx1発現はLIFの有無により変化しなかったか、Ptx2はLIF非存在下において発現が強く認められた。

4) LCR-GH-GFPを持つES細胞を使用した実験でも、LIF存在下で非存在下に比べGFP陽性細胞が多く観察され、3)と同様に、LIF存在下でGH産生細胞への分化が促進されることを示唆する成績が得られた。

D. 考察

私ともは、今回初めて、ES細胞からGHを産生する細胞に分化させることに成功した。NeuroD1, Ptx1, Ptx2などの下垂体形成の初期に見られる遺伝子か、すでにES細胞で発現していたため、GH遺伝子に作用し、その発現を亢進させる下垂体特異的転写因子であるPit-1が直ちに機能するのではないかと考え、Pit-1を強制発現させてみたか、Pit-1蛋白は明らかに検出されるものの、GH遺伝子発現には影響がみられなかった。これは、他の転写制御因子、あるいは遺伝子側の要因が適切ではなく、Pit-1が機能する環境が整っていない可能性を

示唆する。

そこで、ES細胞を種々の条件下で培養しGHを産生する細胞に分化させることを試みた。その結果、ゼラチンコートディノシュでES細胞を増殖させるうちに、一部の細胞はGHを産生するようになること、さらに、驚いたことに、通常分化を維持するために使用されているLIFがGH産生を増加させることを見出した。

LIFはIL-6サイトカインファミリーに属する種々の機能を有するサイトカインであり、さまざまな組織で、種々の、時には相反する役割を果たしていることが知られている。たとえば、胚性幹細胞では分化の抑制、M1マウスのmyeloblastic leukemia cell lineではマクロファーンへの分化の促進、myeloma cellsでは増殖促進が報告されている。また、肝の急性蛋白の活性化、破骨細胞形成の刺激、心筋過形成の促進、交感神経のコリ作動性細胞への分化の促進、胚盤胞の着床の促進、卵巣機能の調節など、種々の細胞において、LIFは細胞分化の促進、あるいは、抑制の役割を担っている。

LIFとそのレセプターは胎児、成人の下垂体においても確認されており、GH産生細胞の20-30%、TSH産生細胞、PRL産生細胞、ゴナトトロピン産生細胞、ACTH産生細胞、ホルモン非産生細胞の10-15%で発現が認められている。ストレス刺激によりPOMC遺伝子発現が増加するが、それとともにLIFの発現が増強されており、ACTH分泌に対してCRHとLIFは共同的に働くことが報告されている。これを裏付けるように、LIF遺伝子のノックアウトマウスではストレスに対するACTH分泌が傷害されている。一方、下垂体において特異的にLIFが過剰発現するトランスジェニックマウスでは、クノン様身体所見となり、基礎コルチゾール分泌の上昇、デキサメサゾンでの抑制が不十分となる一方、GH分泌は低下し発育障害が認