

るいは痙攣性疾患に罹患している患者等では、インスリン負荷は禁忌である。インスリンの他に、GH分泌刺激試験において、アルギニン、グルカゴン、L-DOPA、クロニジン、GHRHなど数多くのものが刺激物質として用いられるが、総じてGH反応における再現性、刺激の強さ、GH反応の鈍さによる所要検査時間などの問題がある。以上のことを鑑み、インスリン負荷試験と同程度以上の精度で重度のGH分泌不全症を鑑別でき、再現性、安全性に優れ、使用上の制約や患者への負担が少ない負荷試験開発をめざし、GH分泌不全診断薬としてのKP-102の可能性を検討した。

今回、過去に完全型GH分泌不全症と診断され、インスリン負荷試験による血中GH頂値が3.0 ng/mL以下と診断された患者に対して行ったKP-102負荷試験成績から、インスリン負荷試験における血漿GH 3ng/mlに相当する基準は、15ng/ml であると考えられた。実際にKP-102投与後のCmax散布図解析からもこの基準の妥当性が確認できた。また、健常者において検討した結果、再現性も良好であった。また、血清GH濃度のTmaxはKP-102投与後が18.2分で、インスリン投与後のTmaxの約1/2であり、短い拘束時間で検査可能な診断薬になり得ると考えられた。

副作用が軽微である点からも、KP-102は有用である、インスリン負荷試験は、低血糖を起こし、虚血性心疾患を誘発する可能性があり、GH分泌不全診断のゴールドスタンダードではあるものの、高齢者に対しては行い難い検査である。これに対し、KP-102による副作用は、熱感、腹鳴、発汗など軽微なものであり、いずれの症状も一過性で無処置にて回復した。この点は、成人GH分泌不全症の診断においては極めて大きな利点である。

以上の点を総合すると、インスリン負荷試

験と比べて、安全性、簡便性、再現性などすべてにおいてKP-102負荷試験が優れており、KP-102負荷試験は、重症GH分泌不全症の診断をする上で、インスリン負荷試験に取って代わる可能性がある有用な試験であると思われる。

#### E. 結論

KP-102負荷試験は、重症GH分泌不全症の診断をする上で、インスリン負荷試験と比べて、安全性、簡便性、再現性などすべてにおいて優れており、インスリン負荷試験に取って代わる可能性がある有用な試験である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

Up-regulation of mitochondrial transcription factor I mRNA levels by GH in VSMC  
Yoshioka S, Y Okimura, Y Takahashi, K Iida, H Kaji, M Matsuo, K Chihara  
Life Sciences 74:2097-2109, 2004

Direct causes of death in Japanese patients with hypopituitarism as analyzed from a nation-wide autopsy database

Kaji H and K Chihara  
European Journal of Endocrinology 150:149-152,2004

Long-term improvement of quality of life during growth hormone (GH) replacement therapy in adults with GH deficiency, as measured by questions on life satisfaction-hypopituitarism (QLS-H)

Myriam R, W F.Blum, D J. Edwards, E

P.Shavrikova, D valle, S W. J. Lamberts, E M Erfurth, S M. Webb, R J. Ross, K Chihara, G Henrich P Herschbach and A F. Attanasio

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 89:1684-1693, 2004

Metabolic effects of 20-kilodalton human growth hormone (20K-hGH) for adult with growth hormone deficiency : results of an exploratory uncontrolled multicenter clinical trial of 20K-hGH

Hayakawa M, Y Shimazaki, T Tsushima, Y Kato, K Takano, K Chihara, A Shimatsu and M Irie

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 89:1562-1571, 2004

Adult GH deficiency in Japanese patients:effects of GH treatment in a randomized, placebo-controlled trial

Chihara K, E Koledova, A Shimatsu, Y Kato, H Kohno, T Tanaka, A Teramoto, P C Bates and A F Attanasio

Eur J Endocrinol 151:343-350, 2004

Intravenous administration of ghrelin stimulates growth hormone secretion in vagotomized patients as well as normal subjects

Takeno R, Y Okimura, G Iguchi, M Kishimoto, T Kudo, K Takahashi, Y Takahashi, H Kaji, M Ohno, H Ikuta, Y Kuroda, T Obara, H Hosoda, K Kangawa and K Chihara

Eur J Endocrinol 151:447-450, 2004

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

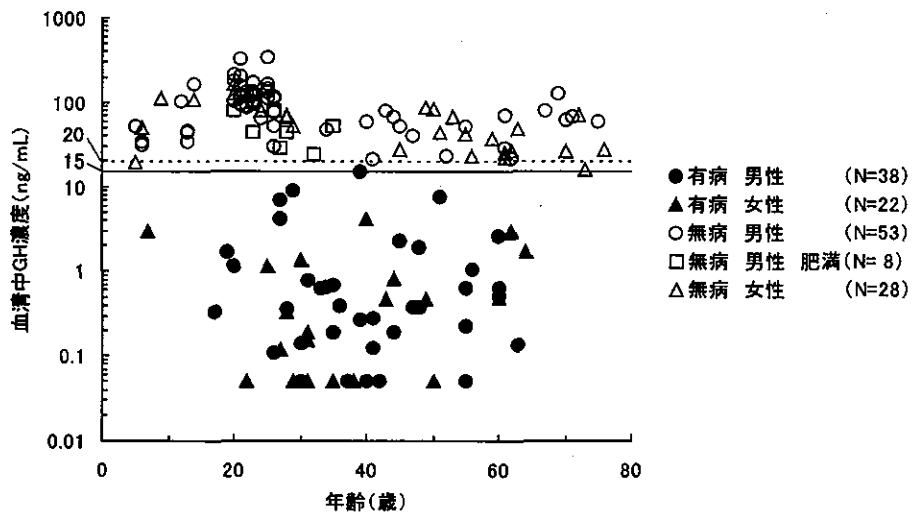
1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

インスリン負荷試験との診断一致率

血清中 GH 濃度の Cmax		KP-102 の検査結果		合計	一致率	κ 係数 (95%信頼 区間)	的中率
		検査陽性 ( $\leq 3.0$ ng/mL*)	検査陰性 ( $3.0$ ng/mL* $<$ )				
インスリン負荷 試験の結果	疾患群 ( $\leq 3.0$ ng/mL*)	32例 (感度:0.865) (陽性予測度:1.00)	5例	37例 (有病率:0.881)	88.1% (37/42)	0.604 (0.304 ~0.903)	93.7%
	非疾患群 ( $3.0$ ng/mL* $<$ )	0例	5例 (特異度:1.00) (陰性予測度:0.50)	5例			
合計		32例	10例	42例			

\*:小児では、Cmaxを5ng/mLで区分する。

KP-102投与後の血清中GH濃度のCmax散布図



## 成人下垂体機能低下症の高コレステロール血症と肥満に關与する因子に關する研究

分担研究者 加藤 讓 島根大学医学部附属病院長

研究協力者 村上 宜男 島根大学医学部内分泌代謝・血液腫瘍内科学 助教授

**研究要旨：**2001年度施行の成人下垂体機能低下症全国疫学調査のデータを用いて成人下垂体機能低下症における高コレステロール血症と肥満に關与する因子について解析した。成人下垂体機能低下症患者の高コレステロール血症に寄与する因子は女性、年齢およびTSH分泌低下症であった。一方、肥満に寄与する因子は男性、TSH分泌低下症およびADH分泌低下症であった。高度の肥満は40歳未満の若年群で高頻度にみられた。成人下垂体機能低下症患者では高コレステロール血症と肥満が高頻度にみられること、および両者の成因には異なる因子が關与することが示唆された。

### A. 研究目的

2001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、多数のホルモン分泌障害を有する成人下垂体機能低下症患者ではトルコ鞍外の病変の有無や性腺ホルモン補償の有無にかかわらず、高脂血症は約50%、肥満は20~30%の高い頻度で認められた。これらの病態は、甲状腺や性腺機能低下症、グルココルチコイドの補償、成長ホルモン分泌低下症のほか視床下部障害など体成分組成や脂質代謝に影響する他の因子によっても修飾される。

今回は、より軽症例も含めて高コレステロール血症と肥満に關与する因子について解析した。

### B. 研究方法

GHおよびACTH産生下垂体腺腫を除外した1272例を検討の対象とした。このうち、ホルモン補償療法中の血清コレステロール値は903例で、肥満度は654例で得られた。

ACTH、TSHおよびAVP欠損症の大部分ではホルモンの補償投与が行われていた。ゴナド

トロピンは、欠損症例737例のうち459例でホルモンの補償投与が行われていた。GH分泌刺激試験は555例で行われていた。インスリン、アルギニン、グルカゴンおよびL $\mu$ ドーパ刺激試験の頂値が5 $\mu$ g/Lを越えない例をGH欠損症、GHRHを含む刺激試験の頂値が5 $\mu$ g/Lを越える場合にはResponderとした。717例においてはいずれの刺激試験も行われていなかった。

### C. 研究結果

男性の13.7%は高脂血症治療薬を服用し、服用しない例の19.5%で血清総コレステロール値は240mg/dL以上であった。女性の18.7%は高脂血症治療薬を服用し、服用しない例の27.1%で血清総コレステロール値は240mg/dL以上であった。すなわち、男性の30.5%と女性の40.7%が高コレステロール血症を呈すると考えられた。性、年齢、ゴナドトロピン、GH、TSH、およびADH分泌低下症、ならびに糖質コルチコイド補償の有無別に高コレステロール血症の頻度をみた場合には、女性、4

0歳以上、補償療法を受けないゴナドトロピン分泌低下症およびTSH分泌低下症の群で高頻度であった。各因子の独立した寄与について、Logistic回帰分析を用いて解析した。独立して寄与する因子は女性、年齢およびTSH分泌低下症であった。ゴナドトロピン分泌低下症と補償両方の有無については、全体としては推計学的有意には達しなかった。

肥満（BMI 25以上）は男性、TSH分泌低下症およびADH分泌低下症の群で高頻度であった。年齢群間で肥満の頻度には差を認めなかったが、BMIが30以上の高度肥満は40歳未満の若年群で高頻度に認められた。GH分泌能についてみると、GH欠損症とGH分泌能が評価されていない群ではResponderに比較して頻度が高い傾向を認めたが、有意ではなかった。BMIが25以上の肥満に独立して寄与する因子は男性、TSH分泌低下症およびADH分泌低下症であった。

#### D. 考察

2001年度に施行の成人下垂体機能低下症全国疫学調査においては、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った。ホルモン補償療法中に出現した主な合併症として狭心症などの心疾患、脳梗塞の発症はそれぞれ6例のみであったが、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。これらの症例を含めて、高脂血症治療薬は170以上の例で、循環器用薬は120以上の例で用いられていた。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。

今回の検討では、男性の30.5%と女性の40.7%が高コレステロール血症と考えられた。肥満は約30%に認められた。

高コレステロール血症に寄与する因子は女性、年齢のほかTSH分泌低下症であった。原発性甲状腺機能低下症では、甲状腺ホルモンの血中濃度が基準範囲内であってもTSHが高値を呈する軽度の欠乏状態において高コレステロール血症の原因となることが知られている。また、TSH分泌低下症は独立して肥満に寄与する因子でもあった。甲状腺機能低下症では水およびナトリウムの貯留のために体重が増加する。したがって、本邦における下垂体機能低下症患者の多くにおいて、甲状腺ホルモンの補償量が過少である可能性が示唆される。

男性とADH欠乏症が肥満に寄与する因子であった。BMI 30以上の高度の肥満は若年者に多く認められたことから、頭蓋咽頭腫や胚芽腫などの視床下部由来の腫瘍で肥満の頻度が高いことを反映すると推定される。GH分泌能についてみると、GH欠損症とGH分泌能が評価されていない群ではResponderに比較して頻度が高い傾向を認めたが、多変量解析においては有意ではなかった。負荷試験でGH分泌能が評価されていない報告例が多いため、推計学的に十分な検出力が得られなかった可能性が考えられる。

#### E. 結論

成人下垂体機能低下症患者の高コレステロール血症に寄与する因子は女性、年齢およびTSH分泌低下症であった。肥満に寄与する因子は男性、TSH分泌低下症およびADH分泌低下症であった。高度の肥満は40歳未満の若年群で高頻度に認められた。成人下垂体機能低下症患者では高コレステロール血症と肥満が高頻度にみられること、および両者

の成因には異なる因子が関与することが示唆された。

#### **F. 健康危険情報**

該当なし

#### **G. 研究発表**

##### **1. 論文発表**

Murakami Y, Kato Y: Hypercholesterolemia and obesity in adult patients with hypopituitarism: a report of a nation-wide survey in Japan. *Endocrine J* 50: 759-765, 2003.

##### **2. 学会発表**

村上宜男、千原和夫、加藤 讓：成人下垂体機能低下症の高コレステロール血症と肥満に関与する因子－全国疫学調査から－ 第76回日本内分泌学会学術総会、2003年5月

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況**

該当なし

## 先端巨大症の長期予後に関する研究

分担研究者 島津 章 国立病院機構京都医療センター臨床研究センター長  
研究協力者 高橋 潤 京都大学大学院医学研究科脳神経外科  
橋本 信夫 京都大学大学院医学研究科脳神経外科  
臼井 健 国立病院機構京都医療センター臨床研究センター  
中尾 一和 京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科

**研究要旨：**厚生省研究班(平成元年度)により先端巨大症患者の長期予後調査が行われたが、GH/IGF-1値と合併症や予後の関連は明らかでなかった。先端巨大症自験125例において平均8.9年間観察し、生命予後と合併症について解析した。観察期間中の死亡は10例、死亡時年齢 $54 \pm 16$ (SD)歳、悪性腫瘍5例、解離性大動脈瘤による心不全1例、腎不全1例、肝硬変症1例、側頭葉てんかんによる事故死1例、糖尿病性ケトアシドーシス1例の内訳で、いずれも最終GH/IGF-1値は高値で活動性と考えられた。最終GH/IGF-1が高値例における標準化死亡比は4.38(95%信頼区間: 2.96-5.79)であった。高血圧や顕性糖尿病の合併頻度は治療後のIGF-1正常化群で明らかに低率であった。悪性腫瘍は、経過中20例(16%)に発見され、活動期18例、寛解期2例であった。死因に関連する合併症として悪性腫瘍は無視できず、寛解した先端巨大症でも注意深い観察が必要である。

### A.研究目的

先端巨大症患者の治療を考える上で、疾病の自然歴や生命予後を知ることは重要である。平成元年度の厚生省特定疾患間脳下垂体機能障害調査研究班(班長清水直容)により本邦における先端巨大症患者の長期予後調査1)が行われたが、GH/IGF-1値と合併症や生命予後との関連は明らかでなかった。その後、欧米において比較的規模の大きい先端巨大症の疫学調査2-7)が行われ、予後とGH/IGF-1の関連について報告されている。生活習慣が異なる日本人の先端巨大症患者において、長期予後とGH/IGF-1の関連が欧米人と同様であるかどうかは明らかでない。そこで、先端巨大症の自験例において長期予後と最終観察時の合併症、GH/IGF-1値について後方視的解析を行った。

### B.研究方法

#### 1)対象症例

1980年から2002年に経験し、診断から0.5年以上の経過観察をした活動性先端巨大症患者125例を対象とした。対象患者の内訳は男性63例、女性62例であり、平均年齢は44.4歳、平均観察期間は8.9年であった。122例に下垂体腺腫摘出術が実施され、3例は手術が困難または拒否された。プロモクリプチンまたはオクトレオチドによる薬物療法は60例、放射線療法は10例に実施した。

#### 2)調査方法

Kaplan-Meierによる生存曲線、死亡例における死因調査、最終観察時の合併症(心疾患、高血圧症、糖尿病、悪性腫瘍、関節症など)の頻度、GH/IGF-1値について診療記録に基づき解析を行った。高血圧は、血圧が140/90mmHg以上と確認された例および降圧治療中の例とした。顕性糖尿病は、空腹時血糖

126mg/dl以上またはHbA1c6.5%以上を示した例、および経口剤またはインスリンなどで治療中の例とした。血中GHとIGF-1値は、第一ラジオアイソトープ研究所のIRMA法によるキットにて測定した。低栄養や肝硬変などを伴わない場合で日本人標準の年齢性別IGF-1基準範囲を超えるIGF-1値を示した場合に、先端巨大症の活動性ありと判定した。

### C. 研究結果

#### 1) 先端巨大症の死亡例

観察期間中の死亡例は10例で死亡時年齢は54±16(SD)歳であった。死因の内訳では、悪性腫瘍5例、解離性大動脈瘤による心不全1例、腎不全1例、肝硬変症1例、側頭葉てんかんによる事故死1例、糖尿病性ケトアシドーシス1例であり、全例とも最終GH/IGF-1値は高値を示した(表1)。

#### 2) 先端巨大症患者の標準化死亡比

先端巨大症125例の生存率は92.0%で、日本人年齢性別で調整した標準化死亡比は、2.26と計算された。最終GH/IGF-1が高値例における生存率は83.3%であり、標準化死亡比は4.38(95%信頼区間:2.96-5.79)であった(図1)。

#### 3) 先端巨大症の全身合併症と活動性の関連

全身合併症のうち心疾患は、虚血性心疾患4例、大動脈弁閉鎖不全症(AR)3例、拡張型心筋症および心不全3例、不整脈3例などがみられた。高血圧症は、最終観察時のIGF-1値が高い57例中23例(40.4%)、IGF-1値が正常な60例中11例(18.3%)にみられた( $p<0.01$ : $\chi^2$ 検定)。顕性糖尿病は、活動性の57例中19例(33.3%)、寛解中の60例中9例(15.0%)に合併した( $p=0.02$ : $\chi^2$ 検定)。一方、重度な関節障害は、活動性の9例(15.0%)、寛解中の7例(12.3%)にみられた。

悪性腫瘍は、経過中20例(16%)に発見され

たが、活動期に18例、寛解期に2例であった。部位別では結腸・直腸癌8例、甲状腺癌4例、乳癌3例、胃癌3例、脳腫瘍2例、肝細胞癌1例、腎細胞癌1例であり、同一例において甲状腺癌と結腸癌、乳癌と結腸癌の合併がみられた。悪性腫瘍の発見時期について、先端巨大症の診断前またはほぼ同時期の症例が12例であり、診断後5年以内は2例、診断後5-10年で発見された例は5例、10年後以降に発見された例が3例あった。

### D. 考察

先端巨大症の生命予後は一般人と比較して不良であり、死亡率は約2-3倍高いと報告されていた。最近の欧米における予後調査(2,3,4,7)では1.2-1.8倍とやや低率である。今回、先端巨大症125例全体の標準化死亡比は2.26、最終GH/IGF-1が高値例における標準化死亡比は4.38であった。これらはカナダおよびニュージーランドにおける成績(5,6)とほぼ同様の結果であった。しかし死因に関し悪性腫瘍が半数を占め、心血管障害による死亡例は少ない点が異なっている。Aritaら(8)は、広島大学脳外科における先端巨大症患者154例の長期予後について検討し、平均10年間の観察期間で標準化死亡比は1.17と良好な成績を示し、GH値に大きく影響されなかったと報告している。死因別の標準化死亡比を検討するため、多数例の先端巨大症患者コホートを用いた今後の研究が待たれる。放射線療法を多用している英国(7)において、脳血管障害による死亡例が多いと指摘されている。

先端巨大症の全身合併症には、高血圧症、糖尿病、心疾患、関節症、睡眠時無呼吸症候群などがあげられるが、治療でどの程度可逆的か、GH/IGF-1値との関連性などまだ十分明らかではない(9,10)。今回、活動性先端巨大症



と比較して寛解例では高血圧症および顕性糖尿病の合併頻度は有意に減少しており、一部可逆的と考えられた。全例が必ずしも二次性の原因で合併症を起こしているわけではなく、遺伝素因など家族歴を含めた検討が必要である。

先端巨大症と悪性腫瘍の関係については多くの報告があり、大腸ポリープの発生率が高いものの大腸癌の発生率については議論が多い。疫学調査では一般人においても血中 IGF-1 濃度が正常範囲内高値では結腸癌や乳癌などの危険性が増すと報告され、IGF-1 の関与が注目されている。スウェーデンとデンマークにおける先端巨大症患者 1643 例のコホートを用いて住民癌登録と連関させた疫学調査研究<sup>11)</sup>では、先端巨大症における悪性腫瘍全体の標準化発生率は 1.5 倍と計算された。なかでも小腸、結腸、直腸の消化器癌 (2.1 倍)、脳腫瘍 (2.7 倍)、甲状腺癌 (3.7 倍)、腎臓癌、骨腫瘍のリスクが高いことが報告されている。今回、悪性腫瘍の発生率の計算はできなかったが、結腸・直腸癌、甲状腺癌、乳癌の合併が目立った。さらに、先端巨大症の診断治療後 5-10 年以上経過し寛解状態に至った患者においても悪性腫瘍が発見されていることから、長期にわたる注意深い経過観察は必須である。

## E. 結論

先端巨大症自験 125 例を平均 8.9 年間にわたり観察し、10 例の死亡を確認した。いずれの GH/IGF-1 が高値で活動性と考えられた。GH/IGF-1 高値例の標準化死亡比は 4.38 (95% 信頼区間: 2.96-5.79) であった。高血圧や顕性糖尿病の合併頻度は治療後の IGF-1 正常化群で明らかに低率であった。先端巨大症の死因に関連する合併症として悪性腫瘍はやはり無視できず、寛解例においても長期にわたり十分な経過観察が必要である。

## 参考文献

- 1) 清水直容、斎藤史郎、横越浩. 間脳下垂体疾患長期予後調査報告. 厚生省特定疾患間脳下垂体機能障害調査研究班平成元年度総括研究事業報告書, 1990: 227-45
- 2) Orme SM, McNally JB, Cartwright RA, Belchetz PE. Mortality and cancer incidence in acromegaly: a retrospective cohort study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83: 2730-4
- 3) Abosch A, Tyrell JB, Lamborn LT, Applebury CB, Wilson CB. Transsphenoidal microsurgery for growth hormone-secreting pituitary adenomas: initial outcome and long-term results. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83: 3411-8
- 4) Swearingen B, Barker FG, Katznelson L, Biller BMK, Grinspoon S, Klibanski A, Moayeri N, Black PM, Zervas NT. Long-term mortality after transsphenoidal surgery and adjunctive therapy for acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83: 3419-26
- 5) Beauregard C, Truong U, Hardy J, Serri O. Long-term outcome and mortality after transsphenoidal adenectomy for acromegaly. *Clin Endocrinol. (Oxf.)*. 2003; 58: 86-91
- 6) Holdaway IM, Rajasoorya RC, Gamble GD. Factors influencing mortality in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 667-74
- 7) Ayuk J, Clayton RN, Holder G, Sheppard MC, Stewart PM, Bates AS. Growth hormone and pituitary radiotherapy, but not serum insulin-like growth factor-1 concentrations, predict excess mortality in patients with acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 1613-7
- 8) Arita K, Kurisu K, Tominaga A, Eguchi K, Iida K, Uozumi T, Kasagi. Mortality in 154 surgically treated patients with acromegaly - a 10-year

follow-up survey. *Endocrine J.* 2003; 50: 163-72

9) Holdaway IM, Rajasoorya RC, Gamble GD, Stewart AW. Long-term treatment outcome in acromegaly. *Growth Hormone IGF Research.* 2003; 13: 185-92

10) Serri O, Beauregard C, Hardy J. Long-term biochemical status and disease-related morbidity in 53 postoperative patients with acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 658-61

11) Baris D, Gridley G, Ron E, Weiderpass E, Mellekjaer L, Ekblom A, Olsen JH, Baron JA, Fraumeni Jr JF. Acromegaly and cancer risk: a cohort study in Sweden and Denmark. *Cancer Causes Control.* 2002; 13: 395-400

図1. 活動性先端巨大症患者の生存曲線

縦軸は生存率、横軸は診断からの経過年数、実線は活動性先端巨大症患者を、点線は年齢性を合わせた対照群を示す。

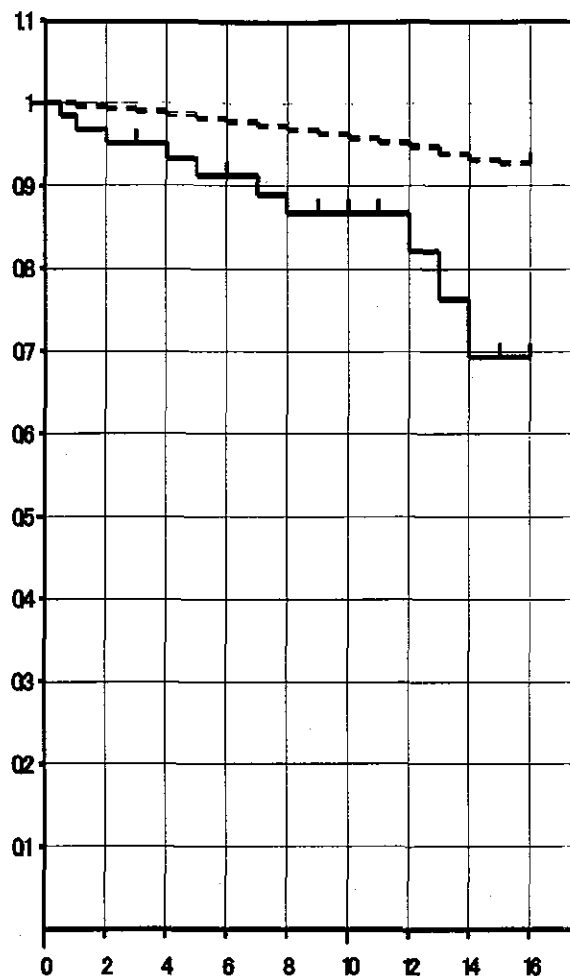


表1. 先端巨大症の死亡例

Age at death	Sex	Follow-up years after diagnosis	Activity	Cause of death
21	M	1	Active	Diabetic ketoacidosis
41	M	14	Active	Temporal epilepsy, Suicide
43	M	8	GH elevated	Hepatocellular carcinoma
50	F	2	Active	Pituitary carcinoma
58	M	4	Active	Colon cancer, Metastasis
58	M	7	GH elevated	Liver failure
60	F	5	Mildly active	Brain tumor
65	M	1	Active	Renal failure
67	M	14	Active	Colon cancer, Metastasis
78	F	12	Mildly active	Dissecting aneurysm of aorta

## マウス下垂体腫瘍細胞(AtT20)におけるDHEAとparthenolideの腫瘍増生及びACTH・Corticosterone分泌に及ぼす影響

分担研究者	橋本浩三	高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科学教授
研究協力者	田口崇文	高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科学
	高尾俊弘	高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科学
	西山充	高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科学
	岩崎泰正	高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科学
	浅羽宏一	高知県立安芸病院 内科

**研究要旨:**我々は、副腎性アンドロゲンであるdehydroepiandrosterone(DHEA)及びNF $\kappa$ B阻害剤であるparthenolide(PRT)が、マウス下垂体腫瘍細胞株AtT20細胞の増生及びproopiomelanocortin(POMC)遺伝子転写活性、ACTH・corticosterone分泌に及ぼす効果を、in vitro及びin vivoの系において検討した。In vitroの実験ではPOMC、NF $\kappa$ Bの各gene promoter-luciferase fusion geneを導入したAtT-20細胞に、DHEA及びPRTを添加し、24時間後の遺伝子転写活性をluciferase assay systemを用いて検討した。さらにMTTアッセイ及びフローサイトメトリーによりDHEA添加時のアポトーシス誘導性を評価した。In vivoの実験ではヌードマウスにAtT20細胞を皮下移植し、腫瘍を形成させた上で、DHEA及びPRTを単独または同時に連日皮下投与(21days)後断頭し、腫瘍重量及び血中ACTH・corticosterone値を検討した。In vitroではDHEA及びPRTの単独添加はPOMC、NF $\kappa$ B各々の遺伝子転写活性を減弱させ、両剤の併用添加ではいずれも相加的な抑制が認められた。In vivoではDHEA/PRT併用群ではvehicle投与群、DHEA群、PRT群に比し、断頭後の腫瘍重量が有意に減少していた。また血中corticosterone値はDHEA群、DHEA/PRT併用群で有意な減弱を認めた。以上の結果よりDHEAは、少なくとも一部は転写活性NF $\kappa$ Bの抑制を介して、POMC遺伝子の発現抑制ならびにアポトーシスの誘導を生じ、PRTとの併用下において腫瘍の増殖に対し抑制的に作用した可能性が示唆された。

### A 研究目的

DHEAは副腎皮質からACTHに反応して分泌されるホルモンである。DHEAには、抗腫瘍効果、心血管保護効果、免疫刺激作用、NF $\kappa$ Bのシグナル伝達阻害を介した抗酸化作用などが報告されている(1)。しかしながら、DHEAの生理学的作用機序などは明らかにされておらず、またPOMC遺伝子、ACTH、corticosterone分泌といった下垂体機能に及ぼす影響も明確ではない。

我々はDHEAの内分泌学的影響とともに、近年報告されつつあるDHEAのNF $\kappa$ B阻害作用、アポトーシスへの関与、さらには腫瘍増生に及ぼす影響の有無につき注目した。近年、Apoptosisの制御は癌治療をはじめとした臨床応用に期待されている。NF $\kappa$ Bを阻害しApoptosisを誘導することは、癌細胞に対して細胞死・腫瘍縮小に繋がりうることから、近年siRNAをはじめとして、抑制的にコントロールする手法の標的として捉えられると共に、

NF $\kappa$ B阻害剤は癌・炎症治療薬として最も重要な薬剤と考えられている。

今回、我々は有効な薬物療法に乏しいクッシング病をはじめとした内分泌腫瘍に対する新たな薬物療法の可能性及び治療戦略を探るべく、DHEA及びNF $\kappa$ B阻害剤による腫瘍増殖に及ぼす影響を、*in vitro*、*in vivo*の系を用いて、POMC遺伝子転写活性・ACTH分泌などへの内分泌学的影響と共に検討した。

## B.研究方法

### I. *in vitro*の実験

マウス下垂体ACTH産生細胞株であるAtT-20細胞にrat POMC gene promoter-luciferase fusion geneを安定性に導入したAtT20PL細胞を用いて、DHEA、17 $\beta$  estradiol(E<sub>2</sub>)、testosterone(T)の単独及び、DHEAとNF $\kappa$ B阻害剤であるPRTを同時に添加し、24時間後のPOMC遺伝子転写活性をluciferase assay systemを用いて検討した。さらに、上記条件下でのmedium中のACTHをIRMAキット(三菱化学)で測定した。NF $\kappa$ B binding activityはelectrophoretic mobility-shift assayで評価した。またNF $\kappa$ B遺伝子5'promoter領域をluciferase遺伝子の上流に組み込んだplasmidを作製し、AtT20細胞に導入することで、DHEA/PRT添加時のNF $\kappa$ B遺伝子転写活性を評価した。またDHEA100 $\mu$ M、E<sub>2</sub>1 $\mu$ M添加時のアポトーシスの評価としてMTT assay及びフローサイトメトリーを行った。

### II. *in vivo*の実験

BALB/Cヌードマウス(週令8週、雄16匹(日本SLC))にAtT20細胞を背部に皮下移植し、約7日後に腫瘍を形成させた後、4群に分け、それぞれVehicle、DHEA(8mg/mouse/day)、PRT(200 $\mu$ g/mouse/day)、DHEA+PRTを21日間連日皮下投与後、断頭屠殺した。評価項目として、マ

ウス体重の推移、断頭時腫瘍重量、マウス血清中のACTH、corticosterone濃度を測定した。

## C.研究結果

### I. *in vitro*の実験

DHEA単独添加群では濃度・時間依存性にPOMC5'プロモーター活性を減弱させた(図1 A.B)が、E<sub>2</sub>及びTはPOMC遺伝子転写活性に影響を与えなかった(図1 C.D)。NF $\kappa$ B阻害剤であるPRTはPOMC遺伝子転写活性を阻害し、さらにDHEAとの併用添加において相加的に減弱効果を認めた(図2 A)。またmedium中のACTH濃度についても、DHEA及びPRTの添加により減少を認めた(図2 B)。

次にDHEA、PRT、TNF $\alpha$ 添加によるNF $\kappa$ B遺伝子転写活性に及ぼす影響を検討した。DHEA50 $\mu$ M添加によりNF $\kappa$ B転写活性は約80%程に減弱した。またTNF $\alpha$ 10nM添加によりNF $\kappa$ B遺伝子転写活性は約4倍に亢進するも、DHEA、TNF $\alpha$ 同時添加によりほぼ完全に抑制された。さらにPRT単独添加によるNF $\kappa$ B遺伝子転写活性の減弱は、DHEAとの併用添加により相加的な減弱効果を認めた(図3A)。EMSAにおいてもDHEA・PRT単独添加はp50/p65のNF $\kappa$ B DNA binding activityを減弱させ、さらに併用添加時に相加減弱効果を認めた(図3 B)。またフローサイトメトリーではDHEA100 $\mu$ M添加によりアポトーシスを示唆するアネクチンV陽性細胞の増加が認められ(図4A)、MTTアッセイでは、DHEA添加により細胞死を示唆する%Viabilityの有意な低下を認めた(図4B)。E<sub>2</sub>では有意な低下は認められなかった。

### II. *in vivo*の実験

断頭時腫瘍重量はDHEA/PRT併用群のみが他群に比し有意に小さい結果であった(図5A)。DHEA/PRT投与開始時から断頭時までのマウ

ス体重減少量は、Control群に比しDHEA群及びDHEA/PRT併用群が有意に少ない結果であった(図5B)。

さらにcorticosterone値はControl群に比しDHEA、DHEA/PRT併用群はいずれも有意な減弱を認めた(図5D)。

#### D. 考察

本研究において、DHEAはPOMC遺伝子転写活性を時間容量依存性に減弱したが、 $17\beta$  estradiol, testosteroneは影響を及ぼさず、DHEAのPOMC遺伝子転写活性減弱機構はこれら性ステロイドへの転換を介したのではないことが推測された。

TNF $\alpha$ をはじめとしたサイトカイン刺激はI $\kappa$ B活性化を介して、I $\kappa$ B・NF $\kappa$ Bをリン酸化し、さらにI $\kappa$ Bのユビキチン化・degradationがNF $\kappa$ Bを核内に移行させる。NF $\kappa$ B binding siteの下流にはPOMC遺伝子転写領域が存在し、転写の活性化はACTHなどの蛋白合成を促進する。このNF $\kappa$ B pathwayにおいて、PRTはI $\kappa$ Bの活性化を抑制することで、アポトーシス阻害蛋白を減弱させ、相対的にカスパーゼ系を活性化して癌細胞のアポトーシス誘導に働くとされている(2)。DHEAがPRTとの間にNF $\kappa$ B阻害作用において相加効果を示した結果の一要因として、DHEAとPRTのNF $\kappa$ B阻害機序に違いがある可能性が推測される。本結果においては、EMSAでのNF $\kappa$ B DNA binding activityの減弱を認めたことから、DHEAの作用部位としてDNA binding levelよりも上流での作用が考えられた。これはDHEAがユビキチン化活性を減弱させることで、酸化ストレスに対しNF $\kappa$ B活性化に対し阻害的に作用しているのではないかとするAragnoらの見解に合致している(3)。

またDHEAとPRTの併用効果はvivoにおいては、腫瘍重量、マウス体重減少量、corticosterone濃

度において確認された。これら併用効果の一要因としてNF $\kappa$ B作用機序の相違以外に、DHEAがPPAR $\alpha$ リガンドであることが関与しているかもしれない(4)。PPARリガンドにおいては、過去にPPAR $\gamma$ リガンドであるrosiglitazoneが我々の報告と同様に、ヌードマウスでのAtT20腫瘍を縮小させ、さらにACTH・corticosterone分泌を抑制したと報告されている(5)。近年PPAR $\alpha$ リガンドには、trefoil factor2の発現を抑制するといった、PPAR $\gamma$ と同様の抗炎症作用や抗腫瘍作用を有すのではないかとする報告が散見される(6)。Trefoil proteinは胃癌、大腸癌、膵癌など種々のヒト腫瘍細胞で増加し、PRTと同様アポトーシスには阻害的に働く蛋白ではないかと考えられている(7)。さらにtrefoil factorはこれら消化管上皮のみならず、下垂体に発現していることが報告されており(8)、PPAR $\alpha$ リガンドであるDHEAがtrefoil factorを介して下垂体に何らかの影響を与えた可能性もある。これに対してPRTはアポトーシスを誘導する純粋なNF $\kappa$ B阻害剤であり、これら両剤の併用がNF $\kappa$ B・PPARなど種々のカスケードを介して強力な抗腫瘍効果・アポトーシス誘導性を発揮し、相加作用につながった可能性がある。

さらにin vivoの結果においてDHEAは顕著にcorticosterone分泌を抑制したが、この機序においてはACTHを介さない直接作用の可能性もある。Paulusらは、我々の結果と同じくDHEAにはACTHを介さないcorticosteroneに対す直接的な抑制作用があり、その機序としてDHEAはcAMPのpathway以後、STAR、 $3\beta$ -HSD、 $21$ -Hydroxylase、 $11\beta$ -Hydroxylaseいずれも阻害・抑制的に作用し、結果としてcorticosterone分泌を直接的に抑制するのではないかと推測している(9)。

ACTH産生腫瘍に対しては有効な薬物療法に

乏しく、手術療法が第一選択であると共に、再発例・手術不能例も多く、新たな薬物療法が望まれている。ホルモン産生腫瘍の治療においては、他の臓器腫瘍のごとく腫瘍の縮小を期待するばかりではなく、その産生されたホルモンのコントロールも重要となる。治療により腫瘍の縮小・癌の活動性の低下からホルモン産生性が減少する結果はもちろんであるが、腫瘍の縮小効果と共に直接的なホルモン拮抗作用を有せば最良の治療薬となりうる。

我々は本研究にて、DHEAとPRTとの併用によるNF $\kappa$ Bの抑制を介した腫瘍増殖抑制効果及びPOMC遺伝子転写活性抑制と共に、DHEAがACTH非依存性の直接的なコルチコステロン分泌抑制作用を有する可能性があることを報告した。これら腫瘍増殖抑制とホルモン分泌抑制の二面性を持ち合わせる薬剤の開発研究、もしくはコンビネーション効果が、有効な薬物療法に乏しいホルモン産生腫瘍に対す新たな治療戦略の1つの鍵となるかもしれない。

## E. 結論

DHEAは、少なくとも一部は転写活性NF $\kappa$ Bの抑制を介して、POMC遺伝子の発現抑制ならびにアポトーシスの誘導を生じ、parthenolideとの併用は腫瘍の増殖に対しても抑制的に作用することが示された。

## 【参考文献】

1. Iwasaki, Y, Asai, M, Yoshida, M, Nigawara, T, Kambayashi, M, and Nakashima, N Dehydroepiandrosterone-sulfate inhibits nuclear factor-kappaB-dependent transcription in hepatocytes, possibly through antioxidant effect. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004; 89(7): 3449-3454.
2. Sinha, S, Perdomo, G, Brown, NF, and O'Doherty, RM Fatty Acid-induced Insulin Resistance in L6 Myotubes Is Prevented by Inhibition of Activation and Nuclear Localization of Nuclear Factor {kappa}B. *J Biol Chem*, 2004; 279(40): 41294-41301.
3. Aragno, M, Mastrocola, R, Brignardello, E, et al. Dehydroepiandrosterone modulates nuclear factor-kappaB activation in hippocampus of diabetic rats. *Endocrinology*, 2002; 143(9): 3250-3258.
4. Kochan, Z and Karbowska, J Dehydroepiandrosterone up-regulates resistin gene expression in white adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol*, 2004; 218(1-2): 57-64.
5. Heaney, AP, Fernando, M, Yong, WH, and Melmed, S Functional PPAR-gamma receptor is a novel therapeutic target for ACTH-secreting pituitary adenomas. *Nat Med*, 2002; 8(11): 1281-1287.
6. Tanaka, T, Kohno, H, Yoshitani, S, et al. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma inhibit chemically induced colitis and formation of aberrant crypt foci in rats. *Cancer Res*, 2001; 61(6): 2424-2428.
7. Kinoshita, K, Taupin, DR, Itoh, H, and Podolsky, DK Distinct pathways of cell migration and antiapoptotic response to epithelial injury: structure-function analysis of human intestinal trefoil factor. *Mol Cell Biol*, 2000; 20(13): 4680-4690.
8. Hinz, M, Schwegler, H, Chwieralski, CE, et al. Trefoil factor family (TFF) expression in the mouse brain and pituitary: changes in the developing cerebellum. *Peptides*, 2004; 25(5): 827-832.
9. Chang, LL, Wun, WS, Ho, LL, and Wang, PS Effects of dehydroepiandrosterone on corticosterone release in rat zona fasciculata-reticularis cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2003; 368(6): 487-495.

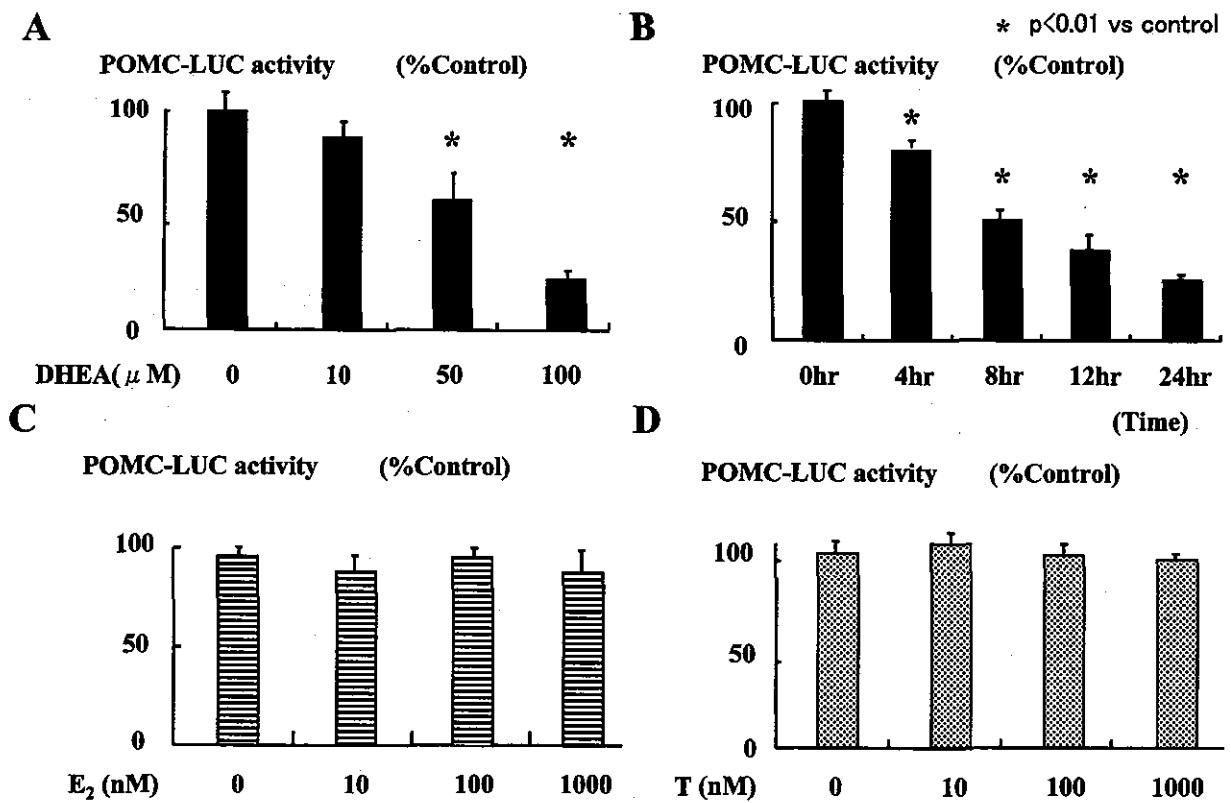


図1. AtT20細胞におけるDHEA(A), E<sub>2</sub>(C), T(D)のPOMC遺伝子転写活性に及ぼす影響

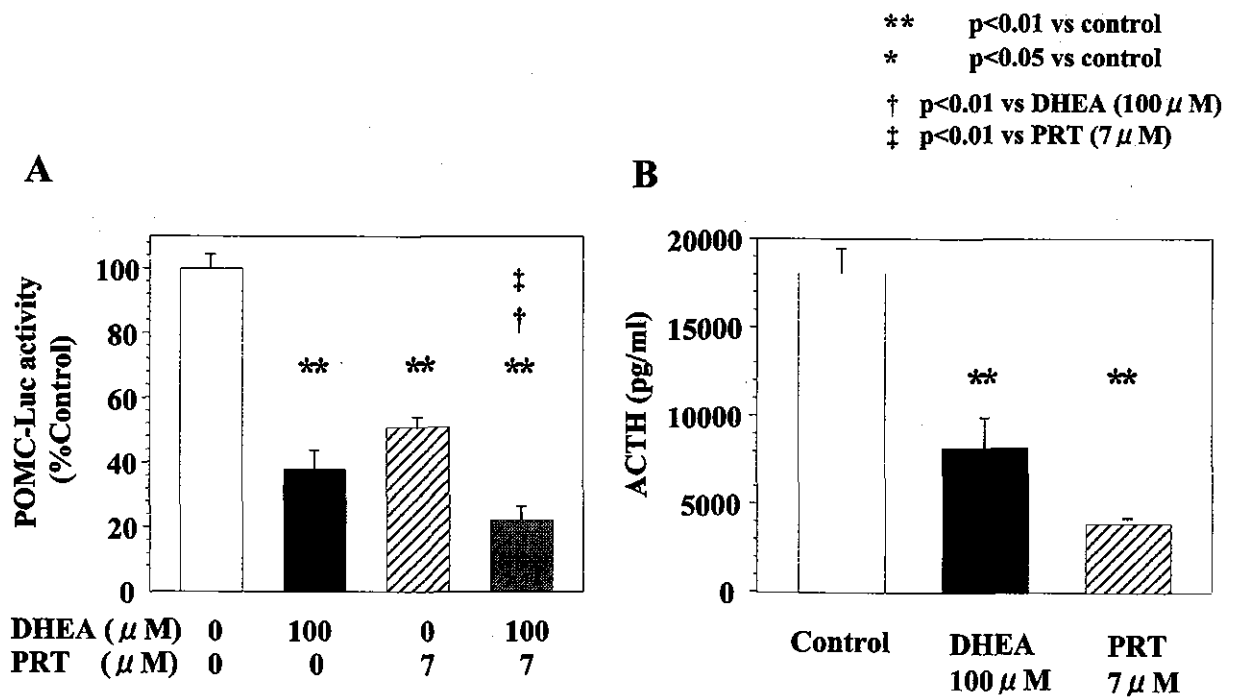


図2. DHEA・PRT添加時の(A)POMC遺伝子転写活性および(B)ACTH分泌に及ぼす影響

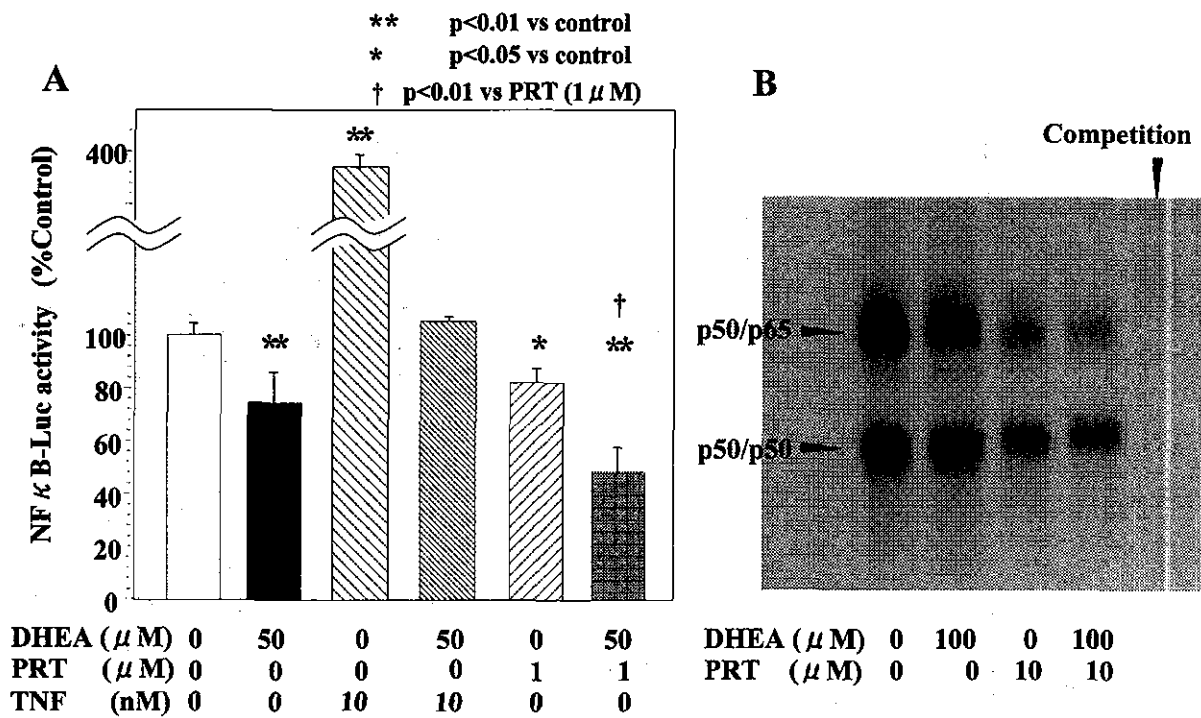


図3. DHEA・PRT添加時の(A)NFκB遺伝子転写活性及び(B)NFκB DNA binding activityに及ぼす影響

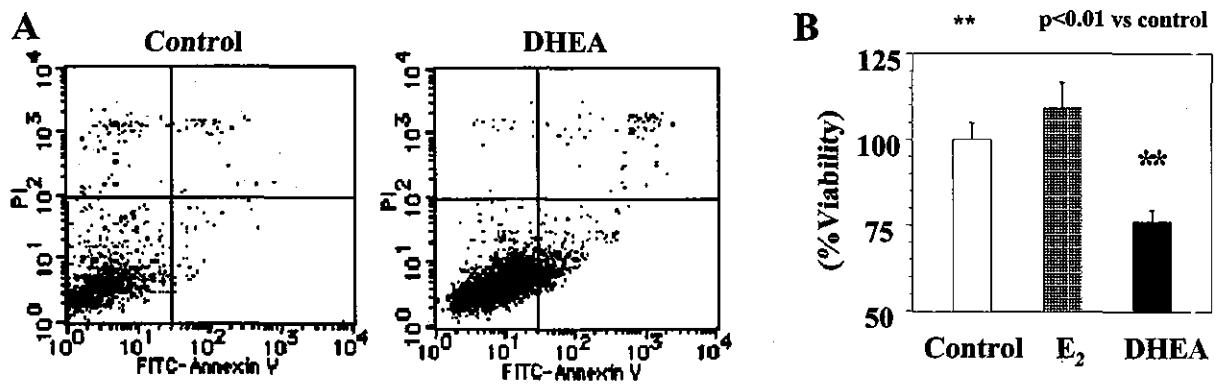


図4. (A)フローサイトメトリー、(B)MTTアッセイによるDHEA添加の及ぼす影響



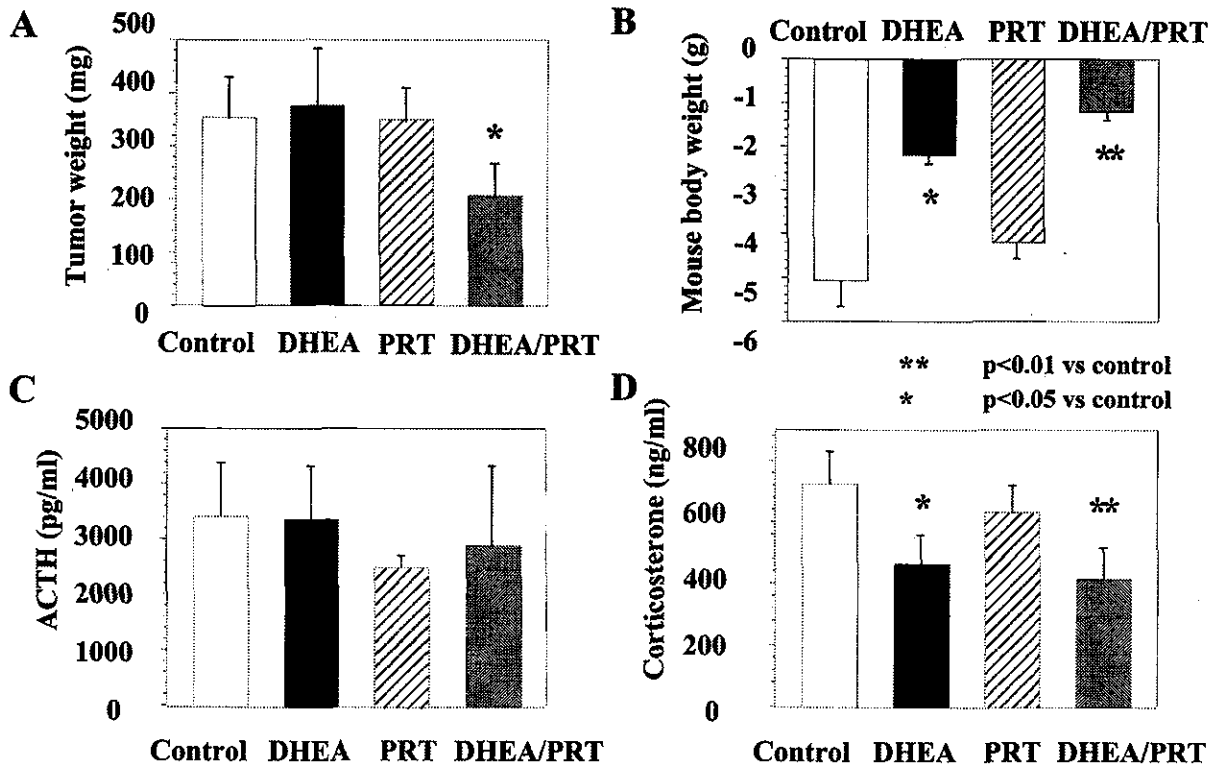


図5. 断頭時の(A)腫瘍重量及び(B)マウス体重減少量, マウス血清(C)ACTH・(D)corticosterone濃度

## MENINのプロラクチン抑制機構

分担研究者 森 昌 朋 群馬大学大学院病態制御内科教授  
研究協力者 山 田 正 信 群馬大学大学院病態制御内科講師

**研究要旨:** 多発性内分泌腫瘍症1型の原因遺伝子MEN1は、610個のアミノ酸からなる蛋白MENINをコードする。このMENINの機能についての詳細は不明である。今回我々は、MENINのプロラクチン遺伝子の転写抑制機構について焦点をあて検討した。野生型MENINは、下垂体腫瘍細胞株GH4C1細胞においてプロラクチンプロモーター活性を約40%に抑制し、A176P、A242V変異体は野生型より強い抑制効果を示した。この抑制は、ヒストン脱アセチル化酵素と結合し核内受容体を介した転写抑制に関与しているNcoRにより拮抗され、HDAC1を強発現することにより回復した。また、この転写抑制効果は、ヒストン脱アセチル化阻害剤であるトリコスタチンAにより濃度依存性に抑制され、さらに、GST pull down法によりMENINとHDAC1との結合が認められた。以上より、MENINのプロラクチン転写抑制は、その一部にHDAC1を介したヒストンの脱アセチル化に関与していることが示唆された。

### A. 研究目的

多発性内分泌腫瘍症1型は、下垂体、副甲状腺、膵臓に多発的に腫瘍を形成する常染色体優性遺伝疾患であり、その原因遺伝子としてMEN1がクローニングされた。MEN1の遺伝子産物であるMENINは、JunD、Replication protein Aなどの蛋白質と結合し、その機能の一つとして遺伝子の転写に関与し、変異によりその機構が破綻し腫瘍を発生する癌抑制遺伝子と考えられている。我々は、MENIN並びに変異MENINが、プロラクチンのプロモーター活性を抑制することを昨年までに報告してきた。本研究では、そのMENINの転写抑制作用の分子機構について検討した。

### B. 研究方法

1) ラット下垂体腫瘍細胞株GH4C1細胞を用い、野生型MENIN、A176P、A242V変異体を発現し、プロラクチンプロモーター活性への影響を検討した。

2) NcoR、NcoRの変異体、SMRTを上記の系に強発現し、MENINの転写抑制作用への影響について検討した。

3) 2)の系にHDAC1、HDAC2、HDAC3を発現し、その影響を検討した。

4) ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチンAを $10^{-8}$ 、 $10^{-7}$ Mで上記の系に添加しMENINの転写抑制効果への影響を検討した。

5) 野生型MENINのGSTの融合蛋白質を作製し、 $^{35}$ SでラベリングしたHDAC1と結合するか、GST pull-down法にて検討した。

### C. 研究結果

1) GH4C1細胞にて野生型MENINを強発現させると、プロラクチンプロモーター活性は約40%に抑制された。JunDへの結合能を欠く2つの変異体A176P、A242V変異体は、約18%、20%といずれも野生型よりも強い転写抑制効果を示した。MENINのN端側108アミノ酸のみを発現させると、さらに強い抑制効果

を示した。

2) MENINの転写抑制機構についてさらに解析するために、核内受容体コリプレッサー NcoRを共発現させ、プロラクチンプロモーター活性への影響について検討した。MENINが NcoRを介して転写を抑制しているのであれば、NcoRの添加によりその転写抑制作用は強調され、もし、共通の機構を介していれば、抑制作用は解除されるはずである。NcoR、そのsplicing variantであるNcoRI、さらにNcoR C端側の核内受容体とのinteraction domainのみにした変異体を作製し、MENINとともに強制発現させたところ、いずれもMENINによる転写抑制化能を解除した。このことから、MENINの転写抑制作用は、NcoR C端側と共通の機構を介していることが予想された。

3) NcoRはヒストン脱アセチル化酵素を介し、核内受容体の転写を抑制している。そこで、2)の系にNDAC1、HDAC2、HDAC3をそれぞれ強発現し、NcoRによる拮抗作用が回復するか検討したところ、HDAC1を発現したときのみ、NcoRの拮抗作用が消失した。従って、NcoRは、HDAC1をMENINと競合することにより、MENINの転写抑制効果に拮抗していることが示唆された。

4) さらに、HDACの関与を検証するため、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である、トリコスタチンAのMENINのプロラクチンプロモーター抑制効果に与える影響について検討した。10<sup>-8</sup>M、10<sup>-7</sup>MのトリコスタチンAを添加したところ、プロラクチンプロモーター活性の基底状態は増強され、MENINの転写抑制効果は明らかに濃度依存性に抑制された。従って、MENINの転写抑制効果は、ヒストン脱アセチル化が関与していることが強く示唆された。

5) 上記の結果より、MENINとヒストン脱ア

セチル化酵素(HDAC)、特にHDAC1との関与が強く示唆されたため、HDAC1とMENINとの直接の結合があるか検討した。GST-野生型MENINは、GST-pull downアッセイにおいて、<sup>35</sup>SにてラベリングしたHDAC1と直接結合していることが明らかとなった。

#### D. 考察

多発性内分泌腫瘍症 (multiple endocrine neoplasia, MEN) 1型は、下垂体、副甲状腺、膵臓に多発的に腫瘍を形成する常染色体優性遺伝疾患である。下垂体病変は主に腺腫であり、プロラクチノーマが多く、成長ホルモン産生腺腫、非機能性腺腫がこれに続く。

1997年にクローニングされた多発性内分泌腫瘍症1型の原因遺伝子 (MEN1) は11番染色体長腕上に位置し、約9 kb長で10個のエクソンを含み、610個のアミノ酸からなる蛋白 (MENIN) をコードしている。MEN1型家系の遺伝子変異の検索では、現在まで200種以上の変異が報告されており、frameshift、nonsense mutation、missense mutationなど症例により様々である。これらの変異はhot spotはなくエクソン2からエクソン10にかけて広く存在する。さらに変異の約30%は、missense変異であり、変異がいかに腫瘍発生と関与しているか、また変異と臨床像との相関は未だ明らかになっていない。

MENINの生体における機能については、これまでに、MENINがAP1 complexであるJunDと核内で結合し、その転写活性を抑制していることや、Replication Protein Aや最近では (mixed lineage leukemia) MMLなど多くの因子との相互作用が報告されているが、その詳細は不明である。

本研究では、MENINの持つ転写抑制作用、特にプロラクチンプロモーターへの作用に焦

点をあてその分子機構について検討した。その結果、野生型MENINには、プロラクチンプロモーターの強い転写抑制作用があることが判明し、この転写抑制作用は、JunDとの結合能を欠く変異体A176P、A242Vにおいて、より強くなることから、JunDを介するものではないことが示唆された。また、欠失変異体を用いた解析により、MENIN1-108が最も強い転写抑制作用を示したことから、N端側に強力な転写抑制作用があり、その作用は通常C端側により抑制されていることが判明した。以上より、多発性内分泌腺腫症の多く認められる欠失変異あるいはmissense変異でもその転写抑制効果は、野生型MENINと比較して増強され、転写抑制が強くなることが腫瘍発生機構に關与する可能性も考えられた。

核内受容体などにおける転写抑制機構にはNcoRあるいはSMRTといったコリプレッサーが結合し、さらにSin3Aを介してあるいは直接にヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）が結合し、このHDAC活性によりヒストンが脱アセチル化されて、クロマチン構造が凝集し転写が抑制されることが明らかとなっている。そこで、MENINの転写抑制機構を検討するためNcoRを強発現させたところ、MENINの転写抑制作用はNcoRによって拮抗された。このことから、両者が共通の機構を介している可能性が示唆された。さらに、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤、トリコスタチンAによってMENINの転写抑制作用が減弱すること、さらにHDAC1の発現により、NcoRの拮抗作用が消失することから、HDACのうち特にクラス1に属するHDAC1の関与が強く示唆された。また、GST-pull down法により、HDAC1とMENINの直接の結合が認められ、MENINによる転写抑制はMENINがHDAC1と直接結合し、HDAC1のヒストン脱アセチル化活性によりプ

ロラクチンプロモーター部位のヒストンが脱アセチル化されクロマチンが凝集することによることが示唆された。

近年、ヒストン脱アセチル化阻害剤が、血液系、神経系をはじめとした悪性腫瘍に腫瘍抑制効果があることが報告されている。従って、ヒストン脱アセチル化阻害剤は、下垂体腺腫の新たな治療薬になることが期待される。

## E. 結論

MENINは、プロラクチンの転写に強い抑制作用を示し、変異MENINはより強い抑制作用を示した。この転写抑制効果は、少なくともその一部はヒストン脱アセチル化酵素特にHDAC1を介するものであることが示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Seki K, Hashimoto K, Hisada T, Maeda M, Satoh T, Uehara Y, Matsumoto H, Oyama T, Yamada M, Mori M. A patient with classic severe primary hyperparathyroidism in whom both Tc-99m MIBI scintigraphy and FDG-PET failed to detect the parathyroid tumor.

Intern Med. 2004, 43:816-823.

2) Ishii S, Yamada M, Satoh T, Monden T, Hashimoto K, Shibusawa N, Onigata K, Morikawa A, Mori M. Aberrant dynamics of histone deacetylation at the thyrotropin-releasing hormone gene in resistance to thyroid hormone. Mol Endocrinol. 2004, 18:1708-1720.

### 2. 学会発表

1) 松本俊一, 山田正信, 渋谷信行, 橋田哲, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 森昌朋. 遺伝子診断よ