

り高齢で発見された多発性内分泌腫瘍 (MEN2A)の1例の治療について. 第47回日本甲状腺学会学術集会, 2004.11.11-13, 前橋

2) 橋田哲, 山田正信, 渋谷信行, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 小山徹也, 森昌朋. 無症候性褐色細胞腫に対して腹腔鏡下副腎摘出術を施行した MEN2Aの1例. 第5回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会, 2005.2.26-27, 宇都宮

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

「多嚢胞性卵巣症候群に対するゴナドトロピン療法の最適化の試み」 に関する研究

分担研究者	苛原 稔	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 女性医学分野 教授
研究協力者	松崎 利也	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 発生発達医学講座女性医学分野 講師
	田中 尚子	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 発生発達医学講座女性医学分野
	岩佐 武	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 発生発達医学講座女性医学分野

研究要旨：ゴナドトロピンの分泌異常は、女性において排卵障害による月経異常と不妊を引き起こす。その不妊治療として排卵誘発が行われるが、従来よりゴナドトロピン製剤を用いる治療は多胎妊娠などの副作用が発生しやすいことが問題とされてきた。今回の検討では、これらの副作用を予防する効果が期待されるFSH-GnRHパルス療法とFSH低用量漸増療法の二法を、ゴナドトロピン分泌異常を来す多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)を対象とした無作為前方視的な比較検討を行い検討した。

PCOS 9症例を対象に、FSH-GnRHパルス療法とFSH低用量漸増療法をそれぞれ1周期ずつ行い、排卵率、妊娠率、多胎率、OHSS発症率、発育卵胞数、卵胞発育に要した日数などの臨床成績と、治療中の血中ホルモン濃度について検討した。その結果、FSH-GnRHパルス療法とFSH低用量漸増療法は、排卵率、妊娠率、単一卵胞発育率などにおいて同等の優れた臨床成績が得られ、多胎妊娠、卵巣過剰刺激症候群(OHSS)の副作用に関しても同等の優れた抑制効果が得られ、ともに有用な治療法であると考えられた。しかし、治療に要する日数では、FSH低用量漸増療法はFSH-GnRHパルス療法の2倍以上と有意に長く、長期連日の通院を要する点が実施上の問題点として挙げられる。また、FSH-GnRHパルス療法には保険適応が無く、現状では一般化は困難である。これらの二法を普及させ不妊治療の安全性を高めるためには、GnRH製剤の保険適応の拡大、長期連日の通院に対する解決策としてFSH製剤の自己注射の導入が今後の課題である。

A 研究目的

近年の生殖医療の進歩は著しく、特にFSH製剤やhMG製剤などのゴナドトロピン製剤の普及に伴い、不妊治療の成績は飛躍的に向上した。その一方で、ゴナドトロピン製剤の副作用として、多胎妊娠や卵巣過剰刺激症候群の発生が増加し、医学的、社会的、経済的な問題となっている。特に多胎妊娠は、早産、

妊娠中毒症などの母体合併症の発生頻度が高く、低出生体重児や周産期死亡の増加など、児の予後にも影響を与えていることから、これらの副作用の予防法の確立は、不妊治療において克服すべき最重要課題の一つとなっている。体外受精では移植胚数の制限により、近年は4胎以上の多胎妊娠の発生する割合が低下しているのに比べ、排卵誘発では未だに4胎以

上の多胎妊娠の発生が十分に制御できていない。日本における4胎以上の多胎妊娠の約3分の2は排卵誘発で発生していることから、排卵誘発法の改良は重要なテーマである。

排卵誘発治療による多胎妊娠は、ゴナドトロピン製剤の過量使用による多発排卵に起因するため、ゴナドトロピン製剤の使用量を可及的少量に抑え、排卵個数を少数に調節するよう、排卵誘発法を工夫する必要がある。そのために、我々が考案したFSH-GnRHパルス療法と、欧米で一般化してきたFSH低用量漸増療法が期待される。FSH-GnRHパルス療法は、FSH製剤により短期間で卵胞発育を促進した後、自動間歇注入ポンプを用いてGnRH製剤を投与することによって、生理的な単一卵胞発育を起こす治療法であり、FSH低用量漸増療法は、FSH濃度の閾値に近いFSH濃度で卵巣刺激を行うためFSH製剤の投与量を少量から開始する治療法である。

多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)は、ゴナドトロピン分泌異常があり、排卵誘発で特に多発排卵を起こしやすい特徴がある。PCOSを今回の治療対象として、FSH-GnRHパルス療法とFSH低用量漸増療法の二法につき無作為前方視的な比較を行い、治療成績、副作用に関して検討し、普及のための問題点を考察した。

B. 研究方法

1. 対象

日本産科婦人科学会の診断基準に基づいて診断した多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)9症例。

2. 方法

FSH-GnRHパルス療法とFSH低用量漸増療法をPCOS 9症例にそれぞれ1周期ずつ行った。いずれの治療法を先行するかは、症例毎に封筒法により無作為に決定した。第1周期に妊娠し出産した症例では、第2周期を行なってい

ない。

1) FSH-GnRHパルス療法の投与方法 (図1)

月経あるいは消腿出血の5日目からFSH (フェルティノームP^R、セローノ株式会社) 150単位を連日単回筋肉内投与し、主席卵胞の平均径(3方向平均径)が11 mmに達した時点で、自動間歇注入ポンプ(SP3I、ニプロ)を用いて、GnRH製剤(ヒポクライン^R、田辺製薬)を120分間隔で20 μgパルス状に皮下投与した。主席卵胞の平均径が16~18 mm以上に達した時点で、GnRHのパルス状投与を中止し、hCG 5000単位を単回筋肉内投与して排卵を誘起した。なお、平均径が16 mm以上の卵胞が4個以上認められた場合は、hCGの投与をキャンセルした。黄体賦活として、高温相の2~3日目からhCG 3000単位を隔日3回筋肉内投与した。

2) FSH低用量漸増療法の投与方法 (図2)

月経あるいは消腿出血の5日目からFSH 75単位を連日単回筋肉内投与し、投与15日目に主席卵胞の平均径が11 mm未満の場合、1日投与量を37.5単位増量し(合計112.5単位)、11 mm以上の場合は投与量の変更は行わなかった。投与22日目に主席卵胞の平均径が11mm未満の場合、1日投与量をさらに37.5単位増量し(合計150単位)、11 mm以上の場合は投与量の変更は行わなかった。主席卵胞の平均径が16~18 mm以上に達した時点で、hCG 5000単位を単回筋肉内投与して排卵を誘起した。なお、平均径が16 mm以上の卵胞が4個以上認められた場合は、hCGの投与を中止した。29日目に卵胞発育が認められない場合は、FSHの投与を中止した。29日目に11 mm以上の卵胞を認めた場合はそのまま数日間FSHの投与を継続した。

黄体賦活として、高温相の2~3日目からhCG 3000単位を隔日3回筋肉内投与した。OHSSが発生した場合は、hCGの投与を中止した。

3. 検討項目

排卵率、妊娠率、多胎率、OHSS発症率、hCGキャンセル率、発育卵胞数、単一卵胞発育率、卵胞発育に要した日数（FSH投与開始日から排卵誘起のためのhCG投与前日までの日数）、通院日数、各時期のLH、FSH、E₂、P₄値をFSH-GnRHパルス療法、FSH低用量漸増療法で比較検討した。

4. 倫理面への配慮

本研究計画は学内の倫理委員会にて検討を行い承認を受けた。排卵誘発治療にあたっては、治療の適応のある患者に研究計画の主旨、治療の効果と副作用について十分に説明し書面で同意を得た。また、研究結果の解析、結果の報告等に際しては、個人が特定できないよう十分に配慮した。

C. 研究結果

排卵率、妊娠率に関しては、FSH-GnRHパルス療法では排卵率88.9%、妊娠率30% (3/9)、FSH低用量漸増療法では排卵率75.0%、妊娠率25.0%と、両療法ともに良好で有意差を認めなかった。発育卵胞数は、FSH-GnRHパルス療法では 1.8 ± 0.8 個（平均±標準偏差）、FSH低用量漸増療法では 1.5 ± 1.2 個であり、単一卵胞発育率は、FSH-GnRHパルス療法で44.4%、FSH低用量漸増療法で50%と、発育卵胞数、単一卵胞発育率に関しても有意差を認めなかった。また、4個以上の多数の卵胞が発育したためにhCG投与をキャンセルした周期は、FSH-GnRHパルス療法で0% (0/9)、FSH低用量漸増療法で12.5% (1/8)と有意差を認めず、両療法とも安全に排卵させることが可能であった。多胎率は、FSH-GnRHパルス療法で33.3% (1/3、双胎妊娠)、FSH低用量漸増療法で0% (0/2)、OHSS発症はFSH-GnRHパルス療法、FSH低用量漸増療法とも発生せず、両療法と安全性が高かった。

卵胞発育に要した日数は、FSH低用量漸増療法では有意に長く、通院日数で計算すると、FSH-GnRHパルス療法で 8.9 ± 1.4 日、FSH低用量漸増療法で 18.2 ± 6.4 日 ($p < 0.01$)と、FSH低用量漸増療法ではFSH-GnRHパルス療法に比べて約2倍と有意に長かった。排卵期FSH濃度は、FSH-GnRHパルス療法で有意に低値であったが、卵胞発育を反映する排卵期E₂ (pg/ml)、黄体期P₄ (ng/ml)には両治療法間に有意差を認めなかった (表1)。

D. 考察

今回、ゴナドトロピン分泌異常に対する不妊治療の安全性を高めるための排卵誘発治療の検討を目的として、FSH-GnRHパルス療法とFSH低用量漸増療法に注目し、PCOSを対象とした無作為前方視的比較検討試験を行った。

FSH-GnRHパルス療法とFSH低用量漸増療法は、どちらも排卵率、妊娠率、単一卵胞発育率などの治療成績が良好であり、さらに多胎妊娠、OHSSなどの副作用に関しても抑制効果に優れていることから、ゴナドトロピン製剤を用いた治療法として、ともに有用な方法であることが明らかとなった。FSH低用量漸増療法は欧米では一般化しているが、製剤の過剰投与を回避するためにFSH製剤を少量より投与する治療法であるため、卵胞発育の開始に必要なFSH濃度の閾値が高い症例あるいは周期では、必然的に治療・通院期間が長期に及ぶことになる。ゴナドトロピン製剤の自己注射が認められていない日本では、連日の通院で注射を受けるしかなく、治療に要する日数の長期化は患者にとって負担が大きいためFSH低用量漸増療法は十分に普及していない。一方、我々の考案したFSH-GnRHパルス療法は、FSH製剤により短期間で卵胞発育を促進した後、自動間歇注入ポンプにてGnRH製剤を投与すること

で卵胞刺激の内分泌環境を自然周期に近づけ、連日かつ長期の通院を要しない。FSH-GnRHパルス療法は、FSH低用量漸増療法と同等に有効かつ安全である上、通院日数が少ない点で、至便性の高い治療法と考えられるが、残念ながら排卵誘発に対する保険適応は無いために一般化は不可能である。

FSH-GnRHパルス療法やFSH低用量漸増療法などの安全性の高い排卵誘発治療が普及すれば、不妊治療の安全性が高まり不妊治療によって妊娠する母体の合併症、児の転帰が改善されると考えられる。これら治療法の普及のためには、FSH-GnRHパルス療法に関しては、保険適応の拡大を検討することが今後の課題であり、各方面へ働きかけて臨床応用の可能性を探る必要がある。一方、FSH低用量漸増療法に関しては長期連日の通院が課題であり、その解決策となるFSH製剤の自己注射について、現在の日本の医療状況でいかに安全に行うかを早急に検討する必要があると考えられる。

E. 結論

FSH-GnRHパルス療法とFSH低用量漸増療法は、ゴナドトロピン分泌異常による排卵障害患者に対し、共に有効かつ安全性の高い優れた治療法であることが明らかとなった。これらの方法を用いると、ゴナドトロピン製剤の使用量が減少し、現在の不妊治療でなお問題となっている多胎妊娠の発生を減らすことが可能となる。今後これらの方法を普及させ、不妊治療の安全性を高めるためには、FSH-GnRHパルス療法では、排卵誘発に対する保険適応の拡大、FSH低用量漸増療法では、長期連日の通院に対する解決策としてFSH製剤の自己注射の導入が課題である。

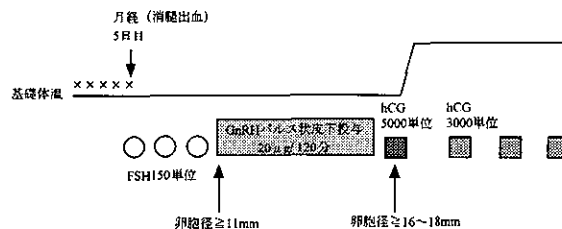


図1 FSH-GnRHパルス療法の投与方法

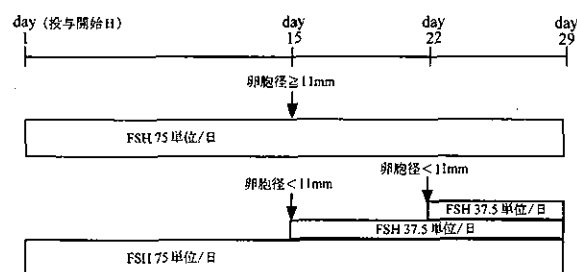


図2 FSH低用量漸増療法の投与方法

表1 FSH-GnRHパルス療法とFSH低用量漸増療法の治療成績

治療法	FSH-GnRHパルス療法	FSH低用量漸増療法
周期数(周期)	9	8
通院日数(日)	8.9±1.4*	18.2±6.4
卵胞発育に要した日数(日)	8.2±1.6**	13.7±6.9
発育卵胞数(個)	1.8±0.8	1.5±1.2
単一卵胞発育率(%)	44.4 (4/9)	50.0 (4/8)
hCG キャンセル率(%)	0 (0/9)	12.5 (1/8)
排卵率(%)	88.9 (8/9)	75.0 (6/8)
妊娠率(%)	30.0 (3/9)	25.0 (2/8)
多胎妊娠率(%)	33.3 (1 [§] /3)	0 (0/2)
OHSS 発症率(%)	0 (0/9)	0 (0/8)
排卵期 FSH (mIU/ml)	4.8±1.3*	8.1±1.5
排卵期 E2 (pg/ml)	617.2±448.5	493.2±570.4
黄体期 P4 (ng/ml)	41.8±27.5	21.9±5.8

(平均±標準偏差、*p<0.01、**p<0.05、[§]双胎妊娠)

F. 健康危険情報

今回の研究結果内に、報告すべき健康危険情報は無かった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 苛原 稔、松崎利也、桑原 章：排卵誘発法の選択 臨床婦人科産科56(10):1221-1225,2002
- 2) 苛原 稔、桑原 章、松崎利也、前川正彦：妊娠・児の転帰Hormone Frontier in Gynecology

9(3):283-288,2002

3) 苛原 稔、松崎利也、桑原 章：多嚢胞性卵巣症候群の治療 産婦人科治療 85(3):359-364,2002

4) 松崎利也、三浦尚子、尾形理江、清川麻知子、桑原 章、苛原 稔：ゴナドトロピン療法の副作用防止 産婦人科の実際 51(12):,2002

5) 岩佐 武、松崎利也、田中尚子、清水扶美、尾形理江、苛原 稔：ARCHTECTアナライザーi2000を用いた血中LH、FSHおよびPRLの全自動測定システムの臨床的検討 産婦人科治療 87(2):243-251,2003

6) 苛原 稔、松崎利也、桑原 章、前川正彦：多胎防止のための排卵誘発法 産科と婦人科 70(2):197-203,2003.

7) 松崎利也、田中尚子、岩佐 武、尾形理江、清川麻知子、斎藤誠一郎、苛原 稔：フォリスタチン 産婦人科の世界 55(増刊):33-41,2003

8) 苛原 稔、松崎利也、桑原 章、檜尾健二、前川正彦：不妊治療と多胎妊娠 産婦人科治療 87(1):30-35,2003

9) 松崎利也、田中尚子、岩佐 武、桑原 章、苛原 稔：PCOSの排卵誘発は？ 臨床婦人科産科 57(11):1363-1368,2003

10) 苛原 稔、松崎利也、桑原 章、前川正彦：排卵誘発法の変遷 産婦人科の世界 55(11):1177-1188,2003

11) 松崎利也、苛原 稔：EBMからみた不妊治療の実際 1. 日本における不妊治療の現状 産婦人科治療 87(1):108-115,2003

12) 松崎利也、苛原 稔：EBMからみた不妊治療の実際 7. 排卵障害の治療産婦人科治療 88(1):109-118,2004

13) 苛原 稔、Bruno Lunenfeld：排卵誘発法の新たな展開 ギナドトロピン低用量漸増投与方法の期待と可能性 臨床婦人科産科 56(12):1465-1471,2002

14) 苛原 稔、桑原 章：ARTにおける多胎妊娠予防のための工夫 日本産科婦人科学会雑誌 88(8):1103-1112,2003

15) Nakagawa K, Yamano S, Tsutsumi Y, Matsumoto M, Hinokio K, Irahara M, Aono T, Naroda T, Kagawa S. The scheduled ovarian hyperstimulation method makes it easy to perform ICSI with fresh testicular sperm (ICSI/TESE). Archives of Andrology 48(5):329-36,2002

16) Tokumura A, Kanaya Y, Miyake M, Yamano S, Irahara M, Fukuzawa K Increased production of bioactive lysophosphatidic acid by serum lysophospholipase D in human pregnancy. Biology of Reproduction 67(5):1386-92,2002

17) Tezuka M, Irahara M, Ogura K, Kiyokawa M, Tamura T, Matsuzaki T, Yasui T, Aono T. Effects of leptin on gonadotropin secretion in juvenile female rat pituitary cells. European Journal of Endocrinology 146(2):261-6,2002

18) Maegawa M, Kamada M, Irahara M, Yamamoto S, Yoshikawa S, Kasai Y, Ohmoto Y, Gima H, Thaler CJ, Aono T. A repertoire of cytokines in human seminal plasma. Journal of Reproductive Immunology 54(1-2):33-42,2002

19) Kimura M, Irahara M, Yasui T, Saito S, Tezuka M, Yamano S, Kamada M, Aono T. The obesity in bilateral ovariectomized rats is related to a decrease in the expression of leptin receptors in the brain. Biochemical and Biophysical Research Communications 290(4):1349-53,2002

20) Maegawa M, Kamada M, Yamamoto S, Yamano S, Irahara M, Kido H, Aono T. Involvement of carbohydrate molecules on zona pellucida in human fertilization. Journal of Reproductive Immunology 53(1-2):79-89,2002

2. 学会発表

- 1) 第55回日本産科婦人科学会総会ランチョンセミナー、産婦人科領域におけるGnRHアンタゴニストの臨床応用、第55回日本産科婦人科学会、平成15年4月12～15日、福岡
- 2) 苛原 稔、シンポジウム「High Quality Egg & Embryo」卵巣機能とART、第48回日本不妊学会第21回日本受精着床学会合同6) 開催、平成15年10月1日～3日、東京
- 3) 松崎利也、ワークショップ「EBMからみた不妊治療」EBMからみた排卵誘発法の評価、第48回日本不妊学会第21回日本受精着床学会合同開催、平成15年10月1日～3日、東京
- 4) 三浦尚子、松崎利也、桑原 章、尾形理江、清川麻知子、前川正彦、安井敏之、苛原 稔、排卵障害患者に対する低用量FSH漸増療法の有用性の検討、第55回日本産科婦人科学会、平成15年4月12～15日、福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

I. 特許取得

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

遺伝子組換えマウスを用いた家族性中枢性尿崩症(FNDI)の病態解析とその発症予防に向けた検討

分担研究者	大磯 ユタカ	名古屋大学大学院代謝病態内科
	林 正幸	同上
	有馬 寛	同上
	長崎 弘	同上
	尾崎 紀之	名古屋大学大学院機能組織学
	杉浦 康夫	同上

研究要旨：家族性中枢性尿崩症(FNDI)の発症機構を明らかにする目的で、バゾプレシン(AVP)遺伝子のニューロフィジン(NP)領域の変異遺伝子を導入したノックインマウスを作製した。生後、経時的に、尿量、尿浸透圧、下垂体AVP含有量を測定し、免疫組織化学法により、AVP産生核および軸索におけるNPの発現および染色細胞数の検討を行い、またAVP mRNA発現レベルを観察した。ホモ変異体は生後早期に死亡したため、ヘテロ変異体を用い検討した。生後経時的に尿量は増加、尿浸透圧・下垂体AVP含有量は低下し、正常・異常NPの軸索染色とAVP陽性染色細胞数の減少を認めた。AVP mRNAの発現レベルは生後3ヶ月より低下した。以上から、多尿の発症段階に異常AVP前駆体蛋白によるドミナントネガティブ効果、AVP mRNA発現レベルの低下等の関与が明らかとなり、従来示唆されていた細胞死は発症に必須ではない可能性が考えられた。本モデルはFNDI発症機構解明、発症予防検討に有用であると考えられた。

A. 研究目的

家族性中枢性尿崩症(FNDI)は生後数ヶ月から数年で進行性に多飲、多尿を呈する常染色体優性遺伝の疾患である。FNDIに関連して現在までに50以上の遺伝子変異が報告されているが、そのほとんどがバゾプレシン(AVP)のキャリアプロテインであるニューロフィジン(NP)領域に存在している。われわれはin vitroの検討により、異常AVP前駆体蛋白が細胞内輸送の障害をもたらす成績を報告し、AVP産生細胞に異常蛋白が蓄積し細胞死が発生することがFNDIの病態形成の一因である可能性を示した。

また、正常、変異遺伝子由来の前駆体がヘテロダイマーを形成し、正常蛋白の輸送も小胞

体レベルで障害されるドミナントネガティブな機構が尿崩症の発症に関与する可能性も同様にin vitroの成績から示唆されている。しかし、こうしたin vitroの検討には前葉系細胞系を使用せざるをえないなど限界があるため、われわれはFNDIの変異遺伝子を導入したノックインマウスを作製し、in vivoの解析系を用いFNDIの発症機構の解明を現在進めている。

B. 研究方法

(1) われわれが日本のFNDI家系において見出したNP領域のナンセンス変異であるCys67stopの点突然変異を有するノックインマウスをジーンターゲット法により作製(図1)、遺伝子解析はサザンブロッティング法により行った。

NPのCysteinをstop codonに置換したターゲッティングベクターを構築し、マウスのES細胞に導入して相同組換えが行なわれたES細胞株を選択した。この相同組換えしたES細胞株にCre発現ベクターを一過性に導入・発現させてAVP遺伝子の発現に影響を及ぼす可能性のあるPGK-Neomycinセレクションマーカーを除去し、変異型AVP遺伝子のノックイン-ES細胞株を樹立した。これらのノックインES細胞株をマウスの胚盤胞に注入して、キメラマウスを作製後、野生型マウスと交配させてF1、続けてF2マウスを得た。

(2) ノックインマウスを代謝ケージに入れ、体重、尿量、飲水量、摂食量、尿浸透圧を経時的に測定した。

(3) Radioimmunoassay法により下垂体AVP含有量を経時的に測定した。

(4) 免疫組織化学法により、異常NPに対するポリクローナル抗体、正常NPに対するポリクローナル抗体、AVPに対する抗体を用いAVP産生核(視索上核(SON)、室旁核(PVN))におけるNPの発現および染色細胞数を検討した。

(5) in situ hybridization法を用い、AVP産生核におけるAVP mRNAの発現レベルを検討した。

C. 研究結果

実験1

キメラマウスはサザンブロッティング法によりノックインアレルが標的部位に挿入されたことを確認した。キメラマウスを野生型と交配させ、F1ヘテロ変異体同士を交配させF2マウスを生後1日の時点で遺伝子解析を行ったところ、産子数はホモ：ヘテロ：野生型は19:41:17と、メンデルの法則通り概ね1:2:1の割合で得られた。また、ホモ変異体は生後7日時点での遺伝子解析において、1個体も確認できなかったことから妊娠中ではなく生後一週間

以内に死亡することが明らかとなった。

実験2

体重は野生型、ヘテロ変異体ともに同様の体重増加を認めた。尿量は生後1ヶ月齢時点においてヘテロ変異体は野生型に比べ3倍程度の多尿を示した。特に、メスにおける尿量の増加はオスに比べ顕著であり、生後18ヶ月齢までの検討において経時的に増加し野生型に比べメスは約10倍、オスは約5倍程度の多尿を示した(図2)。また、尿浸透圧も生後1ヶ月時点においてヘテロ変異体は野生型に比べ、有意に低値を認め、その後も経時的に低下傾向を認めた。ヘテロ変異体のメスはオスに比べ尿浸透圧は低い傾向を認めた。

実験3

下垂体AVP含有量は生後1ヶ月時点において、ヘテロ変異体は野生型に比べ1/8程度と有意に低値を認め、その後経時的に減少傾向を認めた。

実験4

AVPに対するポリクローナル抗体を用いた免疫組織学的検討において、SON、PVNともに1ヶ月齢においてヘテロ変異体は野生型と比し陽性細胞数に有意差は認めなかった。しかしながら、3ヶ月齢より有意にメスが低下し6ヶ月齢よりオスが低下し、以後12ヶ月齢まで経時的に減少傾向を認めた。

また、正常NPを認識する抗体を用いた検討において、ヘテロ変異体において細胞体の染色は野生型に比較し細胞体に比べ軸索の染色は低下していることが確認された。一方、Cys67stopの遺伝子変異から合成される異常NPの断端部のみを認識するポリクローナル抗体をウサギに免疫し作製した。この抗体を用いた免疫組織学的検討において、野生型では染

色されず異常NPに特異的な抗体であることが確認された。ヘテロ変異体では、正常NP同様、細胞体に比べ軸索の染色が低下していた。

実験5

AVP産生核(SON, PVN)における遺伝子転写産物であるAVP mRNAの発現量を*in situ* hybridization法を用いて検討したところ、生後3ヶ月齢においてヘテロ変異体は野生型に比し有意に低下しており、生後6ヶ月齢においてはさらに低下した。

D.考察

FNDIは常染色体優性遺伝形式をとり、幼少期に進行性に多飲多尿を呈する疾患である。発症機構については、以前より異常AVP前駆体蛋白がAVP産生細胞に蓄積することにより進行性に細胞が脱落することが病因であるとする報告がある一方で、正常、変異遺伝子由来の前駆体がヘテロダイマーを形成し、正常蛋白の輸送も小胞体レベルで障害されるという、いわゆるドミナントネガティブな機構が尿崩症の発症に関与する可能性も示唆されている。今回導入したCys67stopの遺伝子変異は、1995年に当科の長崎らが報告したものであり、4歳時に発症し1日尿量は10Lに及びFNDIの他の遺伝子変異と比較しても表現型が顕著である。また、*in vitro*の系においてこの変異遺伝子をトランスフェクションした細胞は、他の遺伝子変異に比べ有意に*viability*が低下したとの報告がある。このような理由により、FNDI発症機構解明の目的で、本遺伝子変異を導入したノックインマウスを作製した。今回、F2マウスの検討において、生後1ヶ月齢より経時的に多尿が進行し、尿浸透圧の経時的な低下傾向が認められたことからヒトのFNDIに近いモデル動物であるといえる。

ホモ変異体は生後1週間以内に死亡することが確認されたが、AVPの輸送蛋白であるNPの欠損状態にあることから、AVPの分泌不全により強力な脱水に曝されたことが原因ではないかと考えられる。ヘテロ変異体における多尿の発症時期については、多尿は生後1ヶ月齢より確認されたが、それ以前の検討はマウスを代謝ケージに入れることが困難であるため難しい。

ヘテロ変異体が多尿を呈した生後1ヶ月齢において、AVPに対する免疫組織学的検討において、染色細胞数は野生型との間に有意差を認めないこと、正常NPおよび異常NPの軸索の染色がヘテロ変異体において低下していること、下垂体AVP含有量がヘテロ変異体で有意に低値を認めることより、多尿発症初期の段階においては細胞死が必須ではないことを示唆するものと考えられる。また、異常AVP前駆体蛋白の存在により正常AVP前駆体蛋白をも小胞体内でtrapされ、ゴルジ小体から軸索への輸送が障害されるというドミナントネガティブ機構の存在を示唆する結果であるといえる。また経時的にAVPに対する抗体に染色細胞数が低下したが、これは蛋白発現レベルの低下に起因する可能性もあり、必ずしも細胞脱落を意味するものではないと考えられる。

近年種々の神経変性疾患の発症機構の一つに遺伝子転写活性の低下が関与することが示唆されている。そこで我々は*in situ* hybridization法を用いて、AVP mRNAの発現レベルの経時変化を比較検討したところ、ヘテロ変異体では免疫染色法による染色細胞数の減少に先行する形で、生後3ヶ月齢よりAVP mRNAの発現レベルが低下することが明らかとなった。このことから、遺伝子転写活性の低下が関与している可能性を示唆するものと考えられるが、生後1ヶ月齢の検討が必要なこ

となど詳細なメカニズムについて今後更なる検討が必要であると考えられる。

本モデルにおいては、ヘテロ変異体の中でも特にメスにおいて多飲、多尿傾向が顕著であった。ヒトにおけるFNDIでは性差は報告されておらず、同じ遺伝子変異を持つにも関わらずこの差異は興味深い点である。AVP産生核の大細胞ニューロンにおいて、エストロゲン受容体の発現が浸透圧刺激により変化するなど、以前よりAVP産生核におけるエストロゲンの作用が報告されている。ヒトの尿崩症が完成される生後数ヶ月から数年は思春期以前であり性周期は存在しないが、マウスでは発症段階である生後1-2ヶ月から性周期が生じる。マウスの雌雄差は生後1ヶ月では存在しないが、生後3ヶ月前後から確認されることとあわせて考えると、性周期の発現と雌雄差の顕著化の時期は矛盾しないように思われ、エストロゲンの影響が示唆される。この点については、現在ヘテロ変異体の卵巣摘出術を施行し、Sham群との比較検討を予定している。

現段階では、細胞死の有無やドミナントネガティブ機構の関与といった発症メカニズムにまだ不明な点が多く、その解明に取り組んでいる。発症予防についての具体的な方策については、今後検討していく予定である。

E. 結論

1. 今回作製したノックインマウスは経時的に多飲多尿、浸透圧の低下を示し、ヒトにおけるFNDIの発症機構解明に有用なモデルであると考えられた。
2. 本モデルにおいて、多飲、多尿の発症段階に神経細胞死は関与しておらず、AVP転写レベルの低下および軸索輸送障害が関与していることが示唆された。
3. 雌雄差の原因については今後更なる検討が

必要である。

4. これらの結果をもとに今後FNDIの発症予防も視野に入れた検討を進めていく予定である。

学会発表

第77回日本内分泌学会 一般演題43

日本内分泌学会雑誌Vol.80 No.1 April 20.2004

「家族性中枢性尿崩症の変異遺伝子を導入したノックインマウスの作製」

林正幸^{*1)}、有馬寛^{*1)}、尾崎紀之^{*2)}、塩田明^{*3)}、木下憲明^{*4)}、中嶋光代^{*4)}、長崎弘^{*1)}、上田正次^{*3)}、杉浦康夫^{*2)}、大磯ユタカ^{*1)}

*1) 名古屋大学大学院医学系研究科・代謝病態内科学

*2) 名古屋大学大学院医学系研究科・機能組織学

*3) ワイエス研究所

*4) 免疫生物研究所・研究開発部

図1. ジーンターゲッティング

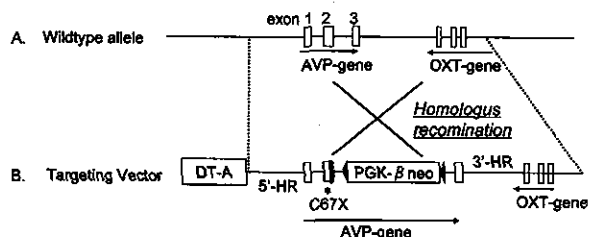
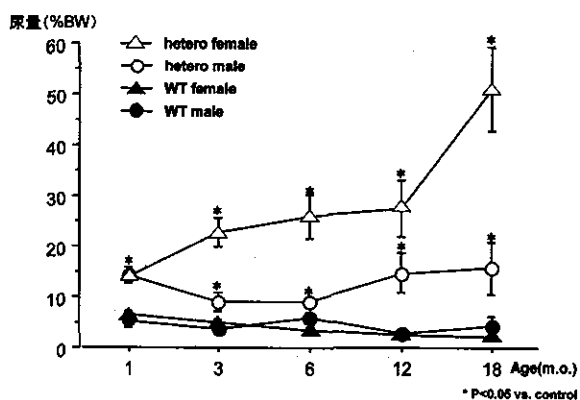


図2. 尿量の経時変化



本邦における先端巨大症のheel pad thicknessの基準値に関する考察

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：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が、本邦における基準値は不明である。今回、acromegalyのheel pad thickness (HPT)の再評価を昨年の症例に加え行い、本邦における基準値につき考察した。当院で治療したacromegalyのうちHPTを測定しえた症例は112例(男性39例、女性73例)で、平均年齢は男性44.7±13.4、女性51.5±12.1であった。HPTの平均値は男性25.7±3.1mm、女性25.0±3.4mmで男女間に差は見られなかった。またHPTと体重、さらに女性において年齢にわずかな正の相関を認めた。内分泌学的に異常を認めない臨床的非機能性下垂体腺腫(NFA)に対しても同様の検討を行い、acromegalyにおける偽陰性率とNFAにおける偽陽性率をそれぞれ検討すると、男性で23mm、女性で22mmにおいてその和が最も小さくなった。以上の結果より、現時点ではHPTの基準値は男性23mm、女性22mmが望ましいと思われた。

A. 研究目的

本邦における先端巨大症の診断の手引きには1)手足の容積の増大、2)先端巨大症様顔貌、3)巨大舌という3つの主症候が含まれている。検査所見においても、頭蓋単純写真での副鼻腔の拡大と突出、外後頭隆起の突出、下顎角の開大と下顎の突出などが認められ、さらに手指レントゲンで手指末節骨の花キャベツ様変形などが見られる。足底部軟部組織肥厚も認められるが、それを定量的に明確なものとしたheel pad thickness(HPT; 足底軟部組織の厚み)の測定は先端巨大症の補助的診断法として位置づけられている。この診断の手引きには、検査所見の項目にHPTが22mm以上と明記されているが、この基準は欧米人のものとされており、その診断の目安を日本人にそのまま用いることができるのかは不明であり、議論の多いところである。今回、本邦における先端巨大症のHPTの基準値を確立するために、昨年度に引き続き当施設で経験した先端巨大症患者のHPTをretrospectiveに再評価した。

B. 研究方法

1)対象症例

当教室で1995年度より現在まで経験した先端巨大症患者のうち、HPTの測定が可能であった患者112例を対象にした。これらの患者は、先端巨大症の診断の手引き(2003年; 厚生労働省間脳下垂体機能障害に関する調査研究: 平成14年度総括・分担研究報告書)により診断された症例である(GHおよびIGF-1の測定にはそれぞれ東ソー、および第一のキットを使用した)。そして、全例当施設で手術を施行され、病理学的、免疫組織学的にもGH産生下垂体腺腫が確認されている。患者の内訳であるが、男性39例、女性73例であり、平均年齢は男性41±14.6、女性48.4±14.3(M±SD)であった。また、当科で加療した、臨床的非機能性下垂体腺腫39例(男性20例、女性19例)についても同様の検討を行った。これらの患者はすべて、HPTに影響のある合併症を認めず、また年齢・性別にマッチしたIGF-1値も正常範囲内であった症

例で、検査施行時にはすべての患者に同意を得ている。

2)撮影および測定方法

HPTの測定は昨年同様Kho KMらの方法に従った(Kho KM, et al: Br J Radiol 43: 119-125, 1970.)。すなわち、測定部位の皮膚のしわや歪みを避けるために、患者を椅子に乘せて座らせ、足関節と膝を垂直にして、足の先端を発泡スチロールの上に乗せ、踵を浮かせた状態で側面撮影を行った。撮影条件は57kV, 250mA, 撮像時間は0.03秒ですべてデジタルによる画像処理を行った。実際の測定方法は、踵骨上部の前端(図1;点a)と後端(図1;点b)を結んだ線を引き(図1;A)、その線に平行で踵骨の下縁(図1;点c)を通過する線を作成する(図1;A')。最後に点cから直線Aに垂直な線を降ろし、点cと皮膚の間を実際の測定値(X)として採用した。HPTは左右それぞれ0.5mm単位で測定し、左右の平均値を患者のHPTとした。

C. 研究結果

1)先端巨大症患者のHPT

当教室にて経験した先端巨大症患者のHPTを検討したところ、男性 25.7 ± 3.1 、女性 25.0 ± 3.4 mm(mean \pm SD)であり男女間の大きな差異は認められなかった。また、性別ごとに最大値と最小値を検討したところ、男性では最大値30.8mm、最小値19.5mm、女性では最大値36.3mm、最小値15.8mmであった(表1)。この群でHPTが22mm未満であった症例、すなわち偽陰性率は男性15.4%、女性15.1%であり、合計で15.2%であった。

2)先端巨大症患者のHPTと様々な因子との関連

先端巨大症患者のHPTと様々な因子(身長・体重・年齢・IGF-1値)との関連について調べた。

これらのうち、体重($R_s=0.25$)と、女性において年齢($R_s=0.29$)にはわずかな正の相関を認めた(図2)。身長($R_s=0.10$)、IGF-1値($R_s=0.10$)、さらに男性例における年齢($R_s=0.08$)については明らかな相関は認められなかった(図3)。

3)臨床的非機能性下垂体腺腫患者のHPT

当教室における臨床的非機能性下垂体腺腫患者のHPTを検討したところ、男性 20.4 ± 2.4 、女性 20.2 ± 1.6 mm(mean \pm SD)であった。これに関しても男女差は認めず、先端巨大症患者群と比較し、5mm程小さい値であった。また、性別ごとの最大値と最小値については、男性では最大値27.3mm、最小値17.3mm、女性では最大値23.0mm、最小値15.8mmであった。さらに非機能性下垂体腺腫群でHPTが22mm以上の症例、すなわち偽陽性率につき検討したところ、男性例の30%、女性例の5.3%に認められ、合計17.9%の偽陽性率であった(表2)。

4)本邦におけるHPTの基準値について

HPTの基準値を21mmより1mm単位で設定した場合の、先端巨大症患者の偽陰性率と非機能性腺腫群の偽陽性率につき検討した。これによると男性例では23mm、女性例では22mmにおいて、偽陰性率と偽陽性率との和が最も低くなった(表3)。

D. 考察

先端巨大症患者におけるHPTの肥厚は1964年のRadiology誌にSteinbachとRussellらによって示された(Steinbach HL, et al: Radiology 82: 418-423, 1964.)。これによると103名のcontrol groupと29名の先端巨大症患者のHPTを測定し、これを分析した結果、正常人の上限は男女とも21mmであったとしている。そして、このデータが現在の22mm以上という基準に関連して

いると思われる。しかしこの報告は、X線の撮像方法や、HPTの測定方法もまちまちであった。そこで1970年Khoらはこれらの点を改良したHPTの測定方法を示した(Kho KM, et al: Br J Radiol 43: 119-125, 1970.)。この測定法による結果では男性で23mm、女性で21.5mmを超える場合、先端巨大症のグループに分けられるとし、また測定値と体重とは正の相関があるが、年齢との相関は低かったとしている。今回の我々の検討でも体重とHPTには、わずかに正の相関が認められ、この報告と同様の結果であった。しかし、女性例において年齢とHPTとの相関が認められたことは、以前の報告とは異なり、今後の検討を要すると思われる。

また昨年も報告したとおり、人種間でHPTが異なることが示唆されている。そして、平成5年度の間脳下垂体機能障害調査研究班の報告書における先端巨大症および下垂体性巨人症のHPTについての記載では従来の22mmという診断基準に当てはめると、男女とも約半数で先端巨大症の診断基準を下回っている。しかし、今回我々の施設での独自の調査ではHPTの偽陰性率は男性で15.4%、女性で15.1%、合計で15.2%であり、欧米の基準を満たす症例が多かった。この原因として、全国調査では測定者がまちまちであり、測定方法も統一されていなかった可能性があるためではないかと推測された。そして、先端巨大症群とコントロール群について、偽陰性率と偽陽性率を検討すると、男性23mm、女性22mmにおいて、この和が最も小さくなることから、現時点ではこの値を基準値にするのが良いと考えられた。そしてこの結果は従来のKhoらの報告とほぼ一致するものと思われた。

HPTと先端巨大症の治療との関係についてであるが、これに対して、前述のKhoらの報告では、放射線治療によりGH値が前値の50%未

満となった患者の中でHPTの減少が認められた症例があったとしている。しかし、同じグループの後の検討で、先端巨大症患者25例を治療後5~20年と長期にフォローした結果、HPTは先端巨大症の治療指標にはならないとし(Macsweeney JE, et al: Clin Radiol 42: 348-350, 1990)、またPaiseyらも同様の結果を示している(Paisey R, et al: Br J Radiol 57: 561-564, 1984.)。しかし、これらの結果についても、より厳密な現在の治療基準に沿って、長期にわたりフォローする必要があると思われる。現在、外来で簡便に行うことができるエコーを用いた方法で、これらについて追跡調査をしており、今後の検討課題としたい。

E. 結論

当教室における先端巨大症患者の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、欧米の基準である22mmを下回ったものが男性15.4%、女性15.1%に見られた。またHPTと体重、さらに女性において年齢にわずかな正の相関を認めた。さらに、臨床的非機能性腺腫症例をコントロール群として考えると、現時点では先端巨大症の基準値は男性23mm、女性22mm以上が妥当であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Teramoto A, Sanno N, Tahara S, Osamura RY. Pathological study of thyrotropin-secreting pituitary adenoma: plurihormonality and medical treatment. Acta Neuropathol (Berl). 2004 Aug;108(2):147-53.

Takada K, Yamada S, Teramoto A: Correlation between tumor vascularity and clinical findings in patients with pituitary adenomas. *Endocr Pathol.* 2004 Summer;15(2):131-9.

Osamura RY, Egashira N, Miyai S, Yamazaki M, Takekoshi S, Sanno N, Teramoto A. Molecular pathology of the pituitary. Development and functional differentiation of pituitary adenomas. *Front Horm Res.* 2004;32:20-33.

Sanno N, Oyama K, Tahara S, Teramoto A. Clinical aspects of pituitary incidentalomas. *Nippon Rinsho.* 2004 May;62(5):946-50.

2. 学会発表

Tahara S, Teramoto A, et al.: Clinico pathological analysis for low GH acromegaly. *ICE 2004,* 2004. 9.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

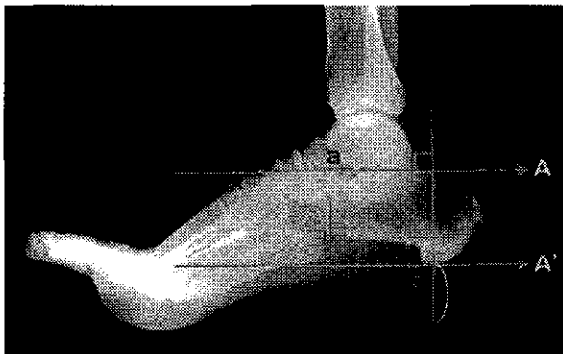
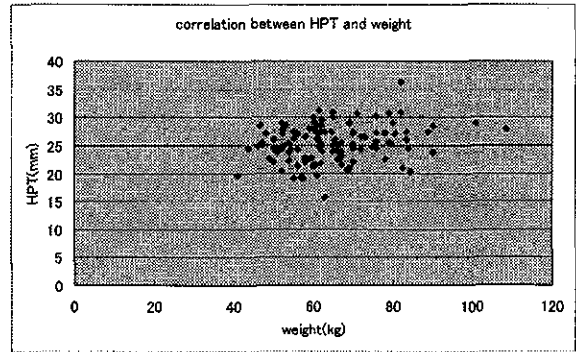
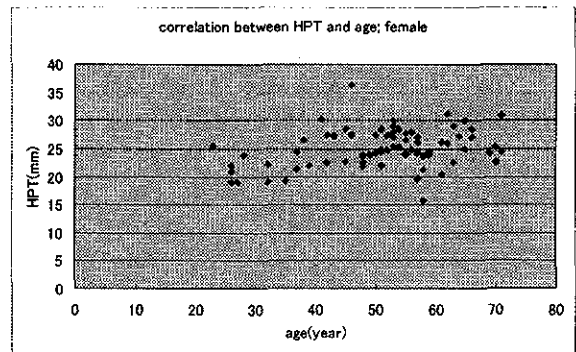


図1



correlation coefficient=0.25



correlation coefficient=0.29

図2

	No. samples	Mean±SD (mm)	Max (mm)	Min (mm)
Male	39	25.7±3.1	31.0	19.5
Female	73	25.0±3.4	36.3	15.8
Total	112	25.3±3.3	36.3	15.8

表1 先端巨大症患者のheel pad thickness

	No. samples	Mean±SD (mm)	Max (mm)	Min (mm)	22mm≤ (%)
Male	20	20.4±2.4	27.3	17.3	6/20 (30%)
Female	19	20.2±1.6	23.0	15.8	1/19 (5%)
Total	39	20.3±2.0	27.3	15.8	7/39 (17.9%)

表2 Clinically non-functioning pituitary adenoma患者のheel pad thickness

Male	Acromegaly false negative(%)	NFA false positive(%)
21mm \leq	7.7	40.0
22mm \leq	15.4	30.0
23mm \leq	17.9	5.0

Female	Acromegaly false negative(%)	NFA false positive(%)
21mm \leq	8.2	31.6
22mm \leq	15.1	5.3
23mm \leq	28.8	5.3

表3 heel pad thicknessの基準値に対する偽陰性・陽性率

in silico での下垂体特異的遺伝子の解明

分担研究者 大阪大学 巽 圭太 大学院医学系研究科 生体情報医学 講師

研究要旨: 我々は、これまで下垂体ホルモン複合欠損症の病因となりうる新規の下垂体特異的な遺伝子を候補遺伝子としてBodyMap法を用いて単離と、下垂体複合欠損症例での解析を行ってきた。ところで近年、正常組織の大規模な遺伝子発現レベルのデータベースとして、EST (cDNA断片)、PCR、マイクロアレーを用いたものが公開されてきて、BodyMap法に比べてより低発現の組織特異的遺伝子が解析可能になってきた。本年度はこのようなデータベースを用いて、in silico での下垂体特異的遺伝子の解明を行った。その結果、新規の下垂体特異的遺伝子は見いだされなかったが、マウスとヒトで共に下垂体で高発現する遺伝子として、昨年度我々が報告したPi-a(Mab1)の他、6個の遺伝子を新たに認めた。この内、2つの配列情報が明らかになっているが機能が全く解析されていない遺伝子の1つ(FLJ30058)がX連鎖性の汎下垂体機能低下症の責任領域に位置し、病因候補遺伝子が得られた。

A. 研究目的

先天性下垂体複合欠損症や自己免疫性視床下部下垂体炎の診断と病因解明には下垂体特異的な遺伝子が有用である。我々は、これまで下垂体ホルモン複合欠損症の病因となりうる新規の下垂体特異的な遺伝子を候補遺伝子としてBodyMap法を用いて単離と、下垂体複合欠損症例での解析を行い、下垂体に特異的に発現する2つの新規遺伝子産物、PGSF(pituitary gland specific factor)1、PGSF2と、下垂体で高発現する新規遺伝子Pi-aを同定し、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。

今回は下垂体に特異的に発現する新たな遺伝子の同定のため、公開されている遺伝子発現データベースを解析して、新たな下垂体で高発現する遺伝子を探索した。

B. 研究方法

現在公開されている遺伝子発現データベース・解析ソフトには、表1に挙げたものがある。

この内、ヒトの正常下垂体組織を扱った生データは、我々がこれまで解析してきたBodyMap法の他は、NCBIのUnigene部門が集計したESTデータ、Novartis Research Foundationが行ったMicroArrayの結果のみである。今回は、Novartis Research Foundationが行ったMicroArrayの結果をNovartis Research Foundationが提供しているSymAtlas (<http://symatlas.gnf.org/SymAtlas/> (Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 2004))を用いて、全ての組織と比較して下垂体で高レベルで発現しているヒトとマウスの遺伝子を抽出した。これらの中から、まず下垂体での発現が知られているものを抽出し、残る遺伝子について、ヒトとマウスで共通して高レベルで発現しているものを個々に検討して、個別に組織間での発現レベルを改めて確認し、ヒトとマウスで共通して下垂体で高発現が未知の遺伝子を求めた。

C. 研究結果

SymAtlasを用いて、調べた全ての組織に比

較して下垂体で高レベルで発現しているヒトとマウスの遺伝子を各々、172と179種抽出した。この内、下垂体での高発現が既知か、未知であるがヒトとマウスで共通して下垂体で特に高発現している遺伝子を表2に挙げた。下垂体特異的に高発現したのは下垂体前葉ホルモン遺伝子 (CGA、TSHB、FSHB、LHB、GH1、PRL、POMC) であった。胎盤ホルモン (CSH1、CSH2、CSHL1、GH2)、ガラニン、一部の視床下部ホルモン受容体 (GHRHR、GNRHR)、分泌顆粒蛋白 (CHGA、CHGB、SCG2、Scg3、SGNE1、GNAS)、ホルモンプロセシング酵素 (CPE、PCSK1、PCSK1N、Pcsk2)、一部のシナプス蛋白のホルモン関連遺伝子は下垂体で高発現していた。

この他の遺伝子で、ヒトとマウス共に高発現を認めた遺伝子で下垂体で高発現するのが既報の遺伝子として、下垂体特異的転写因子のPit1、Pitx1、Pitx2と、我々が以前にBodyMap法で明らかにしたPGSF1(IGSF1)、Pi-a(KIAA1324/maba1)を認めた。

この他の遺伝子に関して、ヒトとマウスで共通して抽出された18種類に関して、組織特異性をさらに検証し、共通して下垂体で高発現が未知の遺伝子を求めたところ、DLK1、PLAGL1、PEG3、NNAT、SEZ6L2、FLJ30058の6種類を認めた。

D. 考察

全ての組織の発現レベルに比較して下垂体で高レベルで発現しているヒトとマウスの遺伝子、172と179種について組織特異性を検討した。これらの内、BodyMap法でも認めた発現の絶対頻度が高いものは、下垂体ホルモン、分泌顆粒蛋白とホルモンプロセシング酵素の遺伝子と、PGSF1(IGSF1)、Pi-a(KIAA1324/maba1)であった。視床下部ホル

モン受容体、シナプス蛋白、下垂体特異的転写因子は、BodyMap法でも認めたこれらより低頻度であるが、下垂体で高発現する遺伝子であった。

下垂体での発現状態が未知であるこの他の遺伝子に関して、ヒトとマウスで共通して抽出されたものが18種類あったが、多くは脳の各部位でも高発現し、下垂体で比較的特異的に高発現する遺伝子は、DLK1、PLAGL1、PEG3、NNAT、SEZ6L2、FLJ30058の6種類であった。

この内、DLK1とPLAGL1は癌関連遺伝子として、PEG3とNNATはゲノム刷り込み遺伝子として既に単離、解析されている。SEZ6L2とFLJ30058については機能が全く解析されていない。予想蛋白構造を見ると、SEZ6L2は補体C3b/C4b結合部位であるCCP、CUBドメインを計5個持つ膜タンパクで、ヒト910アミノ酸、マウス923アミノ酸で96%一致し、アミノ酸で46.47%一致するSEZ6、SEZ6Lは脳で発現する。また、FLJ30058はRhoGAP (GTPase-activator protein for Rho-like GTPases)ドメインを持つシグナル伝達に関与する可能性のある蛋白で、ヒト547アミノ酸、マウス590アミノ酸で84%一致する。このように、種間で保存されており、機能ドメインを持つので機能する遺伝子と想定される。これらの遺伝子の染色体座をみると、FLJ30058は、Xq26.1に位置し、X連鎖性の汎下垂体機能低下症 (OMIM:312000)の責任領域Xq26.1-q27.3に位置する。従って、本遺伝子は、日本で2家系報告されている、男児同胞例の汎下垂体機能低下症の病因候補遺伝子として今後、解析の重要な対照となる。

今回解析したdatabaseでは、ヒト、マウスゲノムプロジェクトより明らかになった3万種以上の遺伝子を対照にしたと謳っている。また、BodyMap法に比べてより低発現の組織特異的

遺伝子が解析可能になったものの、例えば下垂体特異的転写因子のPROP1の発現が非特異の結果になっているように、遺伝子発現レベルが更に低いものやプローブが不適切なものについては十分な結果が得られていない。この他、蛋白の一次配列が相同であってもヒトとマウスの遺伝子名が付いていないものや、まだ遺伝子構造が十分確定してないものもあり、今後も引き続き検討を続けていく必要がある。

E. 結論

公開されている遺伝子発現データベースを解析することにより、下垂体に特異的に発現する遺伝子を6個新たに認め、X連鎖性の汎下

垂体機能低下症の病因候補遺伝子を1つ (FLJ30058) 発見した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tatsumi, K., Kikuchi, K., Tsumura, K., and Amino, N. (2004). A novel PROP1 gene mutation (157delA) in Japanese siblings with combined anterior pituitary hormone deficiency. Clin Endocrinol (Oxf) Vol.61, 635-640.

2. 巽 圭太 (2004). 最新医学講座 転写因子 転写因子と内分泌疾患 下垂体および甲状腺転写因子異常症のモデル疾患 -PIT1 異常症-. 臨床検査 Vol.48, 1051-1057.

表1. 公開されている遺伝子発現データベース・解析ソフト

- 1) ESTの発現度数
BodyMap (大阪大学)
Unigene による集計結果表示ソフト (Unigene, NCBI)
Digital Differential Display (DDD), EST ProfileViewer
- 2) MicroArray
SymAtlas (Novartis Research Foundation)
- 3) RT-PCR, DNA Arrays
H-Angel (生物情報解析研究センター(JBIRC))
- 4) MicroArray, SAGE
GEO profiles (Gene Expression Omnibus, NCBI)
ArrayExpress (EBI)

表2. 下垂体で高発現する遺伝子

下垂体で特異的に発現している遺伝子：ホルモン遺伝子

hum	mus
CGA	Cga
TSHB	Tshb
FSHB	Fshb
LHB	Lhb
GHI	Gh
PRL	Pr1
POMC	Pomc1

下垂体でも高発現するホルモン関連遺伝子

hum	mus	
CSH1		chorionic somatomammotropin hormone 1 (placental lactogen)
CSH2	Csh2	chorionic somatomammotropin hormone 2
CSHL1		chorionic somatomammotropin hormone-like 1
GH2		growth hormone 2
GAL	Gal	galanin
GHRHR	Ghrhr	growth hormone releasing hormone receptor
GNRHR		gonadotropin-releasing hormone receptor
CHGA	Chga	
CHGB	Chgb	
SCG2	Scg2	
	Scg3	
SGNE1	Sgne1	7B2 protein
GNAS		
CPE		carboxypeptidase E
PCSK1	Pcsk1	proprotein convertase type 1
PCSK1N		proprotein convertase type 1 inhibitor
	Pcsk2	proprotein convertase type 2
SNAP25	Snap25	
	Synpr	
	Syt1	
	Syt13	
SYT4	Syt4	

この他の下垂体で高発現することが既報の遺伝子

hum	mus	
POU1F1	Pit1	POU domain, class 1, transcription factor 1
PITX1	Pitx1	paired-like homeodomain transcription factor 1
	Pitx2	paired-like homeodomain transcription factor 2
IGSF1	Igsf1	immunoglobulin superfamily, member 1/PGSF1
KIAA1324	5330417C22Rik	mab1/Pi-a

新たに下垂体で高発現することが分かった遺伝子

hum	mus	
DLK1	Dlk1	delta-like 1 homolog (Drosophila)
PLAGL1	Plagl1	pleiomorphic adenoma gene-like 1
PEG3	Peg3	paternally expressed 3
NNAT	Nnat	neuronatin/paternally expressed 5
SEZ6L2	Sez6l2	seizure related 6 homolog (mouse)-like 2
FLJ30058	1100001E04Rik	hypothetical protein FLJ30058