

あてた研究からGH欠乏患者では内臓脂肪蓄積や脂質代謝異常が高頻度に合併することが報告されており、心血管疾患による早期死亡の原因と考えられる有力な証拠としてとらえられている。わが国における下垂体機能低下患者の疫学調査は、平成4年ならびに平成13年に本研究班よりなされている。前者では下垂体機能低下症の死亡年齢が平均約55歳であること、死亡原因については副腎不全を除いては一定の傾向がなかったことが報告され、後者の報告では、ホルモン補充療法中に高脂血症、糖尿病、高血圧症などの心血管イベントのリスクを高める疾病の合併が多数報告されたが、狭心症などの心疾患や脳梗塞の発症はわずかであった（對馬ら、厚生労働省特定疾患間脳下垂体機能障害調査研究班平成7年度総括研究事業報告書、61-64、1996、村上ら、同平成13年度研究事業報告書、170-176、2002）。このようにわが国における下垂体機能低下症患者においては欧米に比し心血管系疾患の発症やこれらの死亡は多くないことがあきらかにされたが、この相違の原因は明らかではない。

2005年4月日本動脈硬化学会を中心に8学会合同でMSの診断基準が公表された。MSの概念は内臓肥満とそれに伴うインスリン抵抗性の悪化を背景とし、脂質代謝異常、高血圧、耐糖能異常等の危険因子が相互作用し動脈硬化症の発症に寄与しているとするものである。診断基準では内臓脂肪蓄積の評価としてウエスト周囲径が基準を上回ることを必須とし、それに加え高TG血症かつ/または低HDL-C血症の存在、高血圧の有無、空腹時血糖高値を満たしているかどうかでMSを診断するものであるが、疫学調査にも利用できるような簡便な検査項目になっているのが特徴である。

ITTは、同時にGHおよびACTHの分泌機能を

評価できる負荷試験として従来より用いられてきたが、低血糖という患者に負担を強いること、狭心症や痙攣の既往を持つ患者に対してはこれらを誘発する可能性があること、さらに症例においては投与したインスリン量では十分な低血糖が得られないことが実地臨床上しばしば経験される点が問題となっている。今回の研究から、MS合併例では通常推奨されているインスリン量では有効刺激を得られる症例が少数であることが明らかとなり、MS合併の有無によりインスリン量を調節する必要性が示唆された。

GH分泌能とMS構成因子との関連性に関する検討では、AGHDでは非AGHDと比較して、有意にBMI、ウエスト径、TGで高値を示し、HDL-Cが低値を示した。また、GH頂値とウエスト径間には有意な負の相関を、HDL-Cで有意な正の相関を示した。これらの結果からGH分泌低下は動脈硬化症発症のリスクファクターを増加させる方向に働くことが再確認された。

今後MS合併下垂体機能低下症患者に対してITTを施行する際のインスリン量の決定を検討する必要があるとともに、GH分泌が低下している症例に対しては食事指導や薬物治療により肥満の是正や高脂血症に対する注意深い観察が重要であると考えられた。

E. 結論

ITTにおいてMSの診断基準に合致するかどうかを検討することが有効低血糖刺激を得るための一助になる可能性が示唆された。また、AGHDにおいては、内臓脂肪の蓄積や脂質代謝異常を介して心血管イベントのリスクが増大することが確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakamura A, Shimizu C, Nagai S, Taniguchi S, Umetsu M, Atsumi T, Yoshioka N, Ono Y, Tajima T, Kubo M, Koike T: A rare case of Gitelman's syndrome presenting with hypocalcemia and osteopenia. *J Endocrinol Invest* 28: 464-468, 2005
2. Bando H, Atsumi T, Nishio T, Niwa H, Mishima S, Shimizu C, Yoshioka N, Bucala R, Koike T: Phosphorylation of the 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose 2, 6-bisphosphatase/PFKFB3 Family of Glycolytic Regulators in Human Cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:5784-5792
3. Lee YC, Higashi Y, Luu C, Shimizu C, Strott CA: Sp1 elements in SULT2B1b promoter and 5'-untranslated region of mRNA: Sp1/Sp2 induction and augmentation by histone deacetylase inhibition. *FEBS Lett.* 2005 Jul 4;579(17):3639-45.
4. Atsumi T, Nishio T, Niwa H, Takeuchi J, Bando H, Shimizu C, Yoshioka N, Bucala R, Koike T: Expression of Inducible 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase/PFKFB3 Isoforms in Adipocytes and Their Potential Role in Glycolytic Regulation. *Diabetes* 2005;54:3349-3357
5. Matsumoto R, Shimizu C, Nagai S, Taniguchi S, Umetsu M, Kimura Y, Atsumi T, Yoshioka N, Kubo M, Koike T. Cat-eye Syndrome with Isolated Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism *Intern Med* 2005;44(10):1069-1073.
6. Niwa H, Koumoto C, Shiga T, Takeuchi J, Mishima S, Segawa T, Atsumi T, Shimizu C, Koike T, Yoshioka N: Clinical analysis of cognitive function in diabetic patients by MMSE and SPECT. *Diabetes Res and Clin Prac* (in press)
7. Nagai S, Shimizu C, Kimura Y, Umetsu M, Tani-

guchi S, Takeuchi J, Atsumi T, Yoshioka N, Kubo M, Koike T: A case of reversed pituitary dysfunction with intrasellar mass. *J Endocrinol Invest* (in press)

8. Nakamura A, Shimizu C, Nagai S, Taniguchi S, Umetsu M, Atsumi T, Wada N, Yoshioka N, Ono Y, Sasano H, Koike T: Unilateral adrenalectomy improves insulin resistance and polycystic ovaries in a middle-aged woman with virilizing adrenocortical adenoma complicated with Cushing's syndrome. *J Endocrinol Invest* (in press)

9. Nakamura A, Shimizu C, Nagai S, Taniguchi S, Umetsu M, Atsumi T, Wada N, Yoshioka N, Ono Y, Tanizawa Y, Koike T: A novel mutation of WFS1 gene in a Japanese man of Wolfram syndrome with positive diabetes-related antibodies. *Diabetes Res and Clin Prac* (in press)

10. 永井 聡、谷口 聡、梅津正明、三島慎也、瀬川竜二郎、田原 たづ、坂井恵子、西尾太郎、渥美敏也、清水 力、吉岡成人、小池隆夫：先端巨大症患者の耐糖能におよぼす酢酸オクトレオチドの長期効果の検討。 *糖尿病* 48(5):317-323 2005

11. 中村昭伸、清水 力、小野百合、吉岡成人、内田信一、佐々木 成、小池隆夫：2型糖尿病発症を契機に発見された腎性尿崩症の一例。 *日本内分泌学会雑誌* 81 suppl: 10-12 2005

12. 石井伸明、小林浩之、岩崎喜信、谷口 聡、梅津正明、清水 力：先端巨大症術後の成長ホルモンとIGF-1の正常化に要する期間についての検討：いつ判定し薬物療法を導入するか、 *日本内分泌学会雑誌*、81(suppl)：85-88 (2005)

2. 学会発表

1. 先端巨大症患者における左室形態変化：拡張機能との関係：小野塚久夫、三神大世、加賀早苗、後藤数智、小松博史、山田 聡、井

- 上真美子、横山しのぶ、清水 力、筒井裕之、北畠 顕 日本超音波医学会北海道地方会、旭川、2005年2月26日
2. 先端巨大症患者における左室形態と拡張機能との関係：小野塚久夫、三神大世、加賀早苗、後藤数智、井上真知子、横山しのぶ、小松博史、小室 薫、山田 聡、清水 力、筒井裕之、北畠 顕 日本心エコー図学会、大阪、2005年4月21～23日
3. 先端巨大症術後の治療効果判定ならび薬物治療時法開始時期についての検討：石井伸明、小林浩之、岩崎喜信、清水 力 第15回日本間脳下垂体腫瘍学会、東京、2005年2月11, 12日
4. 著明な低蛋白血症を呈したGraves病の一例：谷口 聡、梅津正明、竹内 淳、丹羽祐勝、田原たづ、清水 力、吉岡成人、小池隆夫、久保光正、山根康昭 第15回臨床内分泌代謝Update、札幌、2005年3月12, 13日
5. ASVSが診断に有効であったインスリンローマの一例：竹内 淳、丹羽祐勝、梅津正明、田原たづ、谷口 聡、永井 聡、和田典男、清水 力、柳澤克之、吉岡成人、久保光正、小池隆夫 第15回臨床内分泌代謝Update、札幌、2005年3月12, 13日
6. 7年間の経過後に診断しえたプレクリニカルクッシング症候群の1例：梅津正明、竹内 淳、丹羽祐勝、田原たづ、谷口 聡、清水 力、吉岡成人、小池隆夫、久保光正、秋川和聖 第15回臨床内分泌代謝Update、札幌、2005年3月12, 13日
7. 2型糖尿病発症を契機に発見された腎性尿崩症の一例：中村昭伸、清水 力、小野百合、吉岡成人、内田信一、佐々木成、小池隆夫 第15回臨床内分泌代謝Update、札幌、2005年3月12, 13日
8. マウスペリリピン遺伝子の転写調節機構の解析：永井聡、柳澤克之、清水力、渥美敏也、吉岡成人、小池隆夫 第34回北海道リポ蛋白・代謝研究会、札幌、2005年4月23日
9. 先端巨大症の左室拡張障害：高血圧の合併および左室形態との関係：小野塚久夫、三神大世、加賀早苗、後藤数智、村木睦子、井上真美子、横山しのぶ、帆苺紗香、小松博史、山田聡、清水 力、筒井裕之、北畠顕 第53回日本心臓病学会学術集会、大阪、2005年9月19日～21日
10. 新規WFS1遺伝子変異を認めた抗GAD抗体、抗IA-2抗体陽性のWolfram症候群の一例：中村昭伸、小野百合、永井 聡、和田典男、渥美敏也、清水 力、吉岡成人、矢澤幸生、小池隆夫 第48回日本糖尿病学会年次学術集会、神戸、2005年5月12日～14日
11. 骨格筋における誘導型6-phosphofructo-2-kinaseの発現：丹羽祐勝、渥美敏也、三島慎也、清水 力、吉岡成人、小池隆夫 第48回日本糖尿病学会年次学術集会、神戸、2005年5月12日～14日
12. 平滑筋細胞の遊走におけるマクロファージ遊走阻止因子の役割：岡本敏也、渥美敏也、清水 力、吉岡成人、小池隆夫 第48回日本糖尿病学会年次学術集会、神戸、2005年5月12日～14日
13. 先端巨大症における糖負荷試験時の遊離脂肪酸（FFA）の推移：竹内 淳、丹羽祐勝、伊藤政典、瀬川竜二郎、田原たづ、梅津正明、谷口 聡、岡本敏也、永井 聡、西尾太郎、渥美敏也、清水 力、吉岡成人、小池隆夫 第48回日本糖尿病学会年次学術集会、神戸、2005年5月12日～14日
14. 腎臓内科から見た糖尿病腎症の検討～どこまで管理可能なのか～：伊藤政典、竹内 淳、

丹羽祐勝、渥美敏也、清水 力、望月俊雄、吉岡成人、小池隆夫 第48回日本糖尿病学会年次学術集会、神戸、2005年5月12日～14日

15. 先端巨大症に対する持続性ソマトスタチンアナログ徐放性製剤の使用経験：清水 力、梅津正明、谷口 聡、田原たづ、竹内 淳、丹羽祐勝、渥美敏也、吉岡成人、小池隆夫、久保光正、秋川和聖 第78回日本内分泌学会学術総会、東京、2005年7月1日～3日

16. 先端巨大症63例における心血管合併症に関する検討：谷口 聡、梅津正明、清水 力、渥美敏也、吉岡成人、和田典男、木島弘道、秋川和聖、山根康昭、小野塚久夫、小池隆夫 第78回日本内分泌学会学術総会、東京、2005年7月1日～3日

17. 家兎cytosolic sulfotransferase(SULT2B1)のクローニング：田原たづ、清水 力、竹内 淳、梅津正明、谷口 聡、吉岡成人、小池隆夫、久保光正 第78回日本内分泌学会学術総会、東京、2005年7月1日～3日

18. 腫瘍摘出後に高アンドロゲン血症、インスリン抵抗性、多嚢胞性卵巣が改善したCushing症候群の一例：中村昭伸、清水 力、永井 聡、小野百合、和田典男、吉岡成人、小池隆夫、笹野公伸 第78回日本内分泌学会学術総会、東京、2005年7月1日～3日

19. インスリン低血糖試験における有効刺激とメタボリックシンドロームとの関連性について：中村昭伸、清水 力、中垣 整、吉田昌弘、竹内 淳、丹羽祐勝、梅津正明、谷口 聡、渥美敏也、吉岡成人、小池隆夫 第5回日本内分泌学会北海道地方会、札幌、平成17年10月15日

20. 先端巨大症患者に対するオクトレオチド徐

放製剤の治療経験：梅津正明、竹内 淳、丹羽祐勝、田原たづ、谷口 聡、渥美敏也、清水 力、吉岡成人、小池隆夫、石井伸明、澤村 豊、久保光正、山根康昭 第5回日本内分泌学会北海道地方会、札幌、平成17年10月15日

21. 先端巨大症に対するオクトレオチド徐放性製剤使用時における耐糖能の変化について：清水 力、梅津正明、永井 聡、谷口 聡、田原たづ、竹内 淳、丹羽祐勝、中垣 整、中村昭伸、吉田昌弘、渥美敏也、吉岡成人、小池隆夫 第39回日本糖尿病学会北海道地方会、旭川、平成17年10月16日

22. 2型糖尿病における血清マグネシウムとmetabolic syndrome構成因子との関連性について：中村昭伸、中垣 整、吉田昌弘、竹内 淳、丹羽祐勝、渥美敏也、清水 力、吉岡成人、和田典男、松崎純子、小野百合、小池隆夫 第39回日本糖尿病学会北海道地方会、旭川、平成17年10月16日

23. オクトレオチド徐放性製剤による先端巨大症の治療経験：清水 力、梅津正明、谷口 聡、田原 たづ、竹内 淳、丹羽祐勝、渥美敏也、吉岡成人、小池隆夫、石井伸明、澤村 豊、久保光正 第1回アクロメガリーフォーラム、東京、平成17年10月29日

24. ジアゾキサイド投与により低血糖が改善したインスリンノーマと疑われた2例：田島一樹、吉田昌弘、亀田 啓、中村昭伸、竹内 淳、丹羽祐勝、渥美敏也、清水 力、吉岡成人、小池隆夫 第237回日本内科学会地方会、札幌、平成17年11月5日

表1. 対象背景 (1)

下垂体機能低下症25例の疾患内訳

| | |
|-----------------------------|-----|
| 下垂体腺腫 | 11例 |
| 非機能性下垂体腺腫 | 8例 |
| プロラクチノーマ | 1例 |
| silent corticotroph adenoma | 1例 |
| 詳細不明 | 1例 |
| 頭蓋咽頭腫 | 6例 |
| 胚細胞腫 | 4例 |
| ラトケ嚢胞 | 2例 |
| Sheehan症候群 | 1例 |
| リンパ球性下垂体前葉炎 | 1例 |

表4. 成人GH分泌不全に関する検討

対象の疾患内訳

| | |
|-----------------------------|----|
| 下垂体腺腫 | 6例 |
| 非機能性下垂体腺腫 | 4例 |
| プロラクチノーマ | 1例 |
| silent corticotroph adenoma | 1例 |
| 胚細胞腫 | 4例 |
| 頭蓋咽頭腫 | 3例 |
| ラトケ嚢胞 | 1例 |
| リンパ球性下垂体前葉炎 | 1例 |

表2. 有効刺激群と非有効刺激群との各因子の比較

| | 有効刺激群 | 非有効刺激群 | p value |
|--------------------------|------------|------------|---------|
| 性別(男/女) | 8 / 11 | 5 / 1 | |
| 年齢(歳) | 50.2±14.6 | 48.7±11.5 | 0.82 |
| BMI (kg/m ²) | 23.0±2.8 | 28.6±2.9 | <0.001 |
| ウエスト径 (cm) | 83.6±9.5 | 95.5±4.9 | <0.01 |
| 収縮期血圧 (mmHg) | 112.4±14.0 | 139.8±9.9 | <0.001 |
| 拡張期血圧 (mmHg) | 68.6±9.0 | 90.5±10.4 | <0.0001 |
| 空腹時血糖 (mg/dl) | 89.0±9.2 | 104.3±15.9 | 0.07 |
| 空腹時IRI (μU/ml) | 5.1±6.9 | 30.6±34.0 | 0.13 |
| HOMA-R | 1.2±1.8 | 8.7±10.6 | 0.14 |
| 中性脂肪 (mg/dl) | 149.3±94.4 | 211.7±68.4 | 0.15 |
| HDLコレステロール(mg/dl) | 58.2±14.4 | 52.8±19.7 | 0.47 |
| 検査時最小血糖 (mg/dl) | 35.3±7.5 | 65.8±15.0 | <0.01 |

(平均値±標準偏差)

表5. 対象背景 (2)

下垂体機能障害の割合

| | | |
|----------|-----|-----|
| ACTH分泌障害 | 5例 | 33% |
| TSH分泌障害 | 10例 | 67% |
| Gn分泌障害 | 10例 | 67% |
| ADH分泌障害 | 7例 | 47% |
| GH分泌障害 | 11例 | 73% |

下垂体機能障害の程度の割合

| | | | |
|-----|---|----|-----|
| 障害数 | 1 | 2例 | 13% |
| | 2 | 6例 | 40% |
| | 3 | 0例 | 0% |
| | 4 | 6例 | 40% |
| | 5 | 1例 | 7% |

表3. 有効刺激の有無の識別能

MS構成因子及びMSの有無を基準とした識別能

| | 感度 (%) | 特異度 (%) |
|------------|--------|---------|
| MS構成因子 | | |
| ウエスト径 | 100 | 79.0 |
| 高血圧 | 83.3 | 79.0 |
| 空腹時血糖 | 50.0 | 94.7 |
| 高TG/低HDL血症 | 83.3 | 52.6 |
| MS | 83.3 | 94.7 |

表6. 臨床・検査所見の比較

| | AGHD(+) | AGHD(-) | P |
|--------------------------|-------------|------------|--------|
| peak GH (μg/l) | 0.53±0.63 | 7.04±2.61 | <0.01 |
| 性別(男/女) | 11(5/6) | 4(2/2) | |
| 年齢(歳) | 48.3±15.8 | 44.5±14.0 | 0.33 |
| 罹病期間(年) | 7.1±7.4 | 12.0±10.6 | 0.22 |
| BMI (kg/m ²) | 23.8±2.9 | 20.3±2.0 | <0.02 |
| ウエスト径 (cm) | 84.8±8.4 | 72.8±2.8 | <0.001 |
| 収縮期血圧 (mmHg) | 111.7±14.5 | 103±11.4 | 0.13 |
| 拡張期血圧 (mmHg) | 67.7±9.0 | 62.8±7.6 | 0.16 |
| 空腹時血糖 (mg/dl) | 86.5±8.4 | 87.8±6.8 | 0.40 |
| 総コレステロール(mg/dl) | 218.8±58.6 | 194.5±36.4 | 0.18 |
| 中性脂肪 (mg/dl) | 188.6±104.5 | 93.5±39.0 | <0.02 |
| HDLコレステロール(mg/dl) | 49.9±6.1 | 67.0±6.7 | <0.01 |
| LDLコレステロール(mg/dl) | 137.1±43.9 | 115.5±35.8 | 0.18 |
| IGF-I (μg/l) | 105.3±56.0 | 135.5±89.9 | 0.28 |

(平均値±標準偏差)

表7. GHT頂値と各因子との相関

| | r | p value |
|------------|-------|---------|
| 年齢 | -0.13 | 0.63 |
| 罹病期間 | 0.06 | 0.84 |
| ウエスト径 | -0.52 | <0.05 |
| 空腹時血糖 | 0.21 | 0.46 |
| 収縮期血圧 | -0.16 | 0.56 |
| 拡張期血圧 | -0.25 | 0.37 |
| 中性脂肪 | -0.40 | 0.14 |
| HDLコレステロール | 0.76 | <0.001 |
| IGF-I | 0.48 | 0.07 |

グレリンの血管内皮細胞における遺伝子発現に及ぼす影響 —マイクロアレイを用いた解析—

分担研究者 菅原 明 東北大学病院総合診療部
共同協力者 斉藤明子 東北大学大学院小児病態学
宇留野 晃 東北大学病院腎・高血圧・内分泌科
工藤正孝 東北大学病院腎・高血圧・内分泌科
伊藤貞嘉 東北大学大学院腎・高血圧・内分泌学

研究要旨: 近年グレリンの心血管病変に対する有効性に注目が集まっているが、その血管内皮に対する作用は未だ不明の点が多い。今回我々は、グレリンの血管内皮細胞 (EC) の遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。80%コンフルエントとなったヒト臍帯静脈 (HUV) ECに3nMのグレリンを添加し、24時間インキュベーションした後にRNAを抽出し、ヒト遺伝子が約3万5千種類搭載されたオリゴDNAマイクロアレイとの間でCy5を用いた単色ハイブリダイゼーションを施行した。グレリン投与により5359遺伝子が2.0倍より大きな発現増加を、5335遺伝子が0.5倍未満の発現減少を示した。発現増加を示した遺伝子群ではFGF、VEGF-Cやプロスタサイクリン受容体等の、発現減少を示した遺伝子群ではカベオリンやアンジオポエチン-2等のEC作動性遺伝子が認められた。本研究から、グレリンがECにおいて多くの遺伝子の発現変動を誘導することが明らかとなった。グレリンの心脈管作動物質としての作用機序に、これらの遺伝子発現の変動が関与している可能性が強く示唆された。

A. 研究目的

グレリンはオーファン受容体GHS-Rの内在性リガンドとしてラット胃より単離された28残基からなる新規ペプチドであり、そのSer-3のn-オクタノイル化が活性発現に必須であることが特徴とされている。グレリンの作用としてはGH分泌促進作用や食欲亢進作用がよく知られているが、近年その心血管系保護作用も明らかとされつつあり、グレリンは心筋梗塞・心不全の治療薬としても注目を集めている。グレリンの血管系に対する作用としても、グレリンの健常者への経静脈的投与が血圧を低下させた、グレリンの健常者への経動脈的投与がNO非依存的に前腕血流量を増加させた、等の報告がなされているが、これらはグレリン

の血管平滑筋細胞への直接作用による血管拡張作用に伴うものと考えられている。その一方で、グレリンの血管内皮に対する作用は不明の点が多いが、その血管内皮機能改善作用がごく最近報告されつつある。本研究においては、グレリンの血管内皮に対する作用を解明する目的で、その血管内皮細胞 (EC) の遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。

B. 実験方法

80%コンフルエントとなったヒト臍帯静脈 (HUV) ECに10ng/ml (3nM) のグレリンを添加し、24時間インキュベーションした後にトリゾールを用いてRNAを抽出した。グレリン投与濃度は、健常者への経静脈的投与時 (10 μ g/kg)

の血中濃度を参考とした。ヒト遺伝子が約3万5千種類搭載されたオリゴDNAマイクロアレイ（OPERON社Genome Oligo Set AROS）と得られたサンプル間でCy5を用いた単色ハイブリダイゼーションを施行しデータ解析を行った。

C. 研究結果および考察

24時間のグレリン投与により、HUVECにおける5359遺伝子が2.0倍より大きな発現増加を、5335遺伝子が0.5倍未満の発現減少を示した。2.0倍より大きな発現増加を示した主な遺伝子群を表1に、0.5倍未満の発現減少を示した主な遺伝子群を表2に記す。グレリン投与により、インスリン様成長因子（IGF）-1およびその受容体、ソマトスタチン（タイプ2および5）受容体、さらにはプロラクチン受容体の発現増加（表1）が認められ、内分泌学的に非常に興味深い。また、プロスタグランジンE2（EP1）受容体、プロスタサイクリン受容体やカリクレインの発現増加（表1）が認められた一方で、カベオリン-1の発現減少（表2）も認められており、グレリンによるこれらの遺伝子変動が血管内皮機能改善に関与する可能性も推定される。一方、TIMP-3の発現増加（表1）やマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）-7および-10の発現減少（表2）が認められたことから、グレリンが抗動脈硬化作用を示す可能性も示唆される。さらに、IRS-2やPI3キナーゼp110 δ の発現増加（表1）が認められたことから、グレリンがインスリン作用を増強する可能性も考えられる。興味深いことに、血管内皮増殖因子（VEGF）-C や、線維芽細胞増殖因子（FGF）-11および-19およびFGF（タイプ3）受容体の発現増加（表1）が認められた一方、アンジオポエチン-2の発現減少（表2）が認められたことから、グレリンが血管新生を促進する可能性も示唆される。

表1 グレリン投与により2.0倍より大きな発現増加を示した主な遺伝子

| | |
|--|------|
| Insulin-like growth factor I receptor | 2.3倍 |
| Insulin-like growth factor IA precursor | 5.1倍 |
| Somatostatin receptor type 2 (SS2R) | 2.4倍 |
| Somatostatin receptor type 5 (SS5R) | 2.4倍 |
| Prolactin receptor precursor | 3.6倍 |
| Prostaglandin E2 receptor, EP1 subtype | 4.2倍 |
| Prostacyclin receptor | 4.9倍 |
| Kallikrein 11 precursor | 3.7倍 |
| Kallikrein 6 precursor | 4.3倍 |
| Metalloproteinase inhibitor 3 precursor (TIMP-3) | 5.2倍 |
| Insulin receptor substrate-2 (IRS-2) | 2.8倍 |
| PI3-kinase p110 subunit delta | 2.7倍 |
| Fibroblast growth factor-11 | 4.4倍 |
| Fibroblast growth factor-19 precursor | 2.4倍 |
| Fibroblast growth factor receptor 3 precursor | 6.0倍 |
| Vascular endothelial growth factor C precursor | 2.0倍 |

表2 グレリン投与により0.5倍未満の発現減少を示した主な遺伝子

| | |
|------------------------------------|-------|
| Caveolin-1 | 0.33倍 |
| Protein kinase C, iota type | 0.28倍 |
| Mitogen-activated protein kinase 6 | 0.46倍 |
| Angiopoietin-2 precursor | 0.44倍 |
| Matrix metalloproteinase-10 | 0.34倍 |
| Matrix metalloproteinase-7 | 0.41倍 |

D. 結語

本研究から、グレリンが血管内皮細胞において多くの遺伝子の発現変動を誘導することが明らかとなった。グレリンの心脈管作動物質としての作用機序に、これらの遺伝子発現の

変動が関与している可能性が強く示唆された。定量PCRを用いたRNAの解析も含め、今後更なる検討が必要と考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

英文雑誌 (2005~2006)

1. Hongo M, Kanatsuka H, Sugawara A, Nagasaki Y, Endo Y, Karahashi K, Shoji T, Sagami Y, Aoki I. Primary care in the treatment of functional gastrointestinal symptoms in Japan: prescription preferences and impression of results. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005; 21 Suppl 2: 47-54.

2. Chung BH, Li C, Sun BK, Lim SW, Ahn KO, Yang JH, Choi YH, Yoon KH, Sugawara A, Ito S, Kim J, Yang CW: Rosiglitazone protects against cyclosporine-induced pancreatic and renal injury in rats. *Am J Transplant.* 2005; 5: 1856-1867.

3. Uruno A, Sugawara A, Kanatsuka H, Kagechika H, Saito A, Sato K, Kudo M, Takeuchi K, Ito S: Up-regulation of nitric oxide production in vascular endothelial cells by all-trans retinoic acid through the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Circulation.* 2005; 112: 727-736.

4. Chung BH, Lim SW, Ahn KO, Sugawara A, Ito S, Choi BS, Kim YS, Bang BK, Yang CW: Protective effects of peroxisome proliferators activated receptor gamma agonists on diabetic and non-diabetic renal diseases. *Nephrology.* 2005; 10: S40-S43. (review)

5. Suzuki T, Hayashi S, Miki Y, Ono K, Nakamura Y, Moriya T, Sugawara A, Ishida T, Ohuchi N, Sasano H: Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in human breast carcinoma: a possible modulator of estrogenic actions. *Endocr Relat Cancer.* (In press)

6. Sato M, Sugawara A, Egawa N, Yajima Y,

Kawashima S, Kagechika H: Competitive RXR antagonists enhance transactivation of PPAR and ST 13 preadipocyte differentiation. *J Biol Chem.* (In revision)

7. Matsuda Y, Hoshikawa Y, Suzuki S, Tabata T, Suzuki T, Ameshima S, Okada Y, Sugawara A, Voelkel NF, Kondo T: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands attenuate pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* (Submitted)

8. Hoshi K, Kawakami J, Sato W, Sato K, Sugawara A, Saito Y, Yoshida K. Assisting the diagnosis of thyroid disease with a neural network making use of routine test data: identification of highly suspected patients with hyperthyroidism. *Thyroid.* (Submitted)

和文雑誌 (2005~2006)

1. 工藤正孝、菅原 明、斉藤明子、宇留野晃、伊藤貞嘉：プロスタサイクリンによる血管内皮細胞でのNO産生亢進作用および血管新生促進作用。 *血圧*12: 343-345, 2005

2. 菅原 明：脂肪細胞分化とPPAR。 *医学のあゆみ*213: 1096-1100, 2005

3. 菅原 明：「臨床で出遭う内分泌疾患」10. 検血、血液生化学検査。 *Medicina*42: 1158-1160, 2005

4. 菅原 明：東北大学医学部附属病院第二内科を受診したクッシング病・クッシング症候群の解析。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調査研究班 平成16年度 総括・分担研究報告書：97-104, 2005

5. 工藤正孝、菅原 明、宇留野晃、伊藤貞嘉：脂肪細胞特異的核受容体であるPPAR γ 2のTNF α による発現抑制機構：インスリン抵抗性発症要因の分子メカニズムの解明。 *血圧*12:

923-925, 2005

6. 菅原 明、金塚 完、長崎 裕、本郷道夫、川島孝一郎：東北大学医学部における在宅医療実習。日本在宅医学会雑誌7: 57, 2005

7. 菅原 明、笹野公伸、井上 実、鈴木 貴、伊藤貞嘉：両側性副腎腺腫によるクッシング症候群の一例。ACTH related peptides16: 209-214, 2005

8. 菅原 明、栗田主一、深澤 洋、松岡洋夫、伊藤貞嘉：ステロイド補充治療中に激越うつ病を発症したアジソン病の一例。ACTH related peptides16: 279-283, 2005

9. 菅原 明、伊藤貞嘉：東北大学医学部附属病院第二内科を受診したクッシング病・クッシング症候群の解析。ACTH related peptides16: 151-156, 2005

10. 菅原 明：ペラプロストナトリウムはNO産生増加のみならず、血管新生も促進する。血栓と循環13: 418-419, 2005

11. 菅原 明、斉藤明子、宇留野晃、今泉益栄、工藤正孝、影近弘之、本郷道夫、伊藤貞嘉：全トランス型レチノイン酸および合成レチノイドAm80の血管内皮細胞における遺伝子発現に及ぼす影響-マイクロアレイを用いた検討-。血圧13, 2006 (掲載予定)

12. 菅原 明、伊藤貞嘉：血管新生促進作用。日本臨床2006年増刊 高血圧 (上) -最新の研究動向-, 2006 (掲載予定)

13. 菅原 明、宇留野晃、斉藤明子、工藤正孝、伊藤貞嘉：抗動脈硬化作用を有する心血管作動物質としてのレチノイン酸：その血管内皮機能および血管新生に及ぼす影響の検討。脈管学46, 2006 (掲載予定)

14. 菅原 明：平成17年度医学部奨学賞金賞ホルモン核内受容体の活性化を介した脈管系調節機構の解明。東北医学雑誌118, 2006 (掲載予定)

和文書籍 (2005~2006)

1. 長崎 裕、金塚 完、菅原 明、石井誠一、本郷道夫 編：平成17年度医学教育研修会 (OSCE・臨床医学教育) - Faculty Development2005-記録集 東北大学病院総合診療部・東北大学医学部教育評価センター発行, 2005

2. 石井誠一、菅原 明 編：東北大学医学部医学科1年次2005年度医療入門ワークショップ報告書 東北大学医学部教務委員会・東北大学医学部カリキュラム委員会・東北大学大学院医学系研究科医学部教育評価センター発行, 2005

3. 菅原 明：ホルモンおよびその関連物質。シンプル生化学 (改訂第5版)：林 典夫、広野治子 編、南江堂, 2006 (掲載予定)

4. 菅原 明：脂肪組織。シンプル生化学 (改訂第5版)：林 典夫、広野治子 編、南江堂, 2006 (掲載予定)

2.学会発表

国際学会 (2005~2006)

1. Uruno A, Sugawara A, Saito A, Kudo M, Ito S. Co-operative effects of hepatocyte growth factor and statin on in vitro angiogenesis. The Endocrine Society 87th Annual Meeting. San Diego 6/4/2005

2. Sugawara A, Saito A, Uruno A, Kudo M, Ito S. Stimulatory effects of prostacyclin analog beraprost sodium on in vitro angiogenesis. The Endocrine Society 87th Annual Meeting. San Diego 6/4/2005

3. Saito A, Sugawara A, Uruno A, Kudo M, Hoshi Y, Imaizumi M, Iinuma K, Ito S. Stimulatory effects of low dose all-trans retinoic acid on in vitro angiogenesis. The Endocrine Society 87th Annual Meeting. San Diego 6/4/2005

国内学会 (2005~2006)

1. 菅原 明、伊藤貞嘉：東北大学医学部附属病院第二内科を受診したクッシング病・クッシング症候群の解析。厚生労働省難治性疾患克服研究事業間脳下垂体機能障害調査研究班平成16年度班会議 東京1/14/2005
2. 菅原 明：インフォームド・コンセントと医療情報/医療倫理と患者の権利。第2回宮城県放射線技師会医療学セミナー 仙台1/22/2005
3. 菅原 明、工藤正孝、斉藤明子、竹内和久、宇留野晃、伊藤貞嘉：血管内皮細胞におけるプロスタサイクリンによるNO産生亢進作用および血管新生促進作用。第34回日本心臓血管作動物質学会 京都2/4/2005
4. 菅原 明、金塚 完、長崎 裕、本郷道夫、川嶋孝一郎：東北大学医学部における在宅医療実習。第7回日本在宅医学会大会 仙台2/12/2005
5. 工藤正孝、菅原 明、宇留野晃、伊藤貞嘉：脂肪細胞特異的核受容体であるPPAR γ 2のTNF α による発現抑制機構：インスリン抵抗性発症要因の分子メカニズムの解明。21世紀フォーラム 心血管病とリスクファクター3rd 東京2/19/2005
6. 菅原 明、笹野公伸、井上 実、鈴木 貴、伊藤貞嘉：両側性副腎腺腫によるクッシング症候群の一例。第15回臨床内分泌代謝Update 札幌3/12~13/2005
7. 菅原 明、粟田主一、深澤 洋、松岡洋夫、伊藤貞嘉：ステロイド補充治療中に激越うつ病を発症したアジソン病の一例。第15回臨床内分泌代謝Update 札幌3/12~13/2005
8. 菅原 明、伊藤貞嘉：ピタバスタチンが唯一忍容性を示した二次性高脂血症の一例。第15回臨床内分泌代謝Update 札幌3/12~13/2005
9. 菅原 明、伊藤貞嘉：東北大学医学部附属病院第二内科を受診したクッシング病・クッシング症候群の解析。第16回CRH・ACTH研究会 大阪3/26/2005
10. 菅原 明、笹野公伸、井上 実、鈴木 貴、伊藤貞嘉：両側性副腎腺腫によるクッシング症候群の一例。第16回CRH・ACTH研究会 大阪3/26/2005
11. 菅原 明、粟田主一、深澤 洋、松岡洋夫、伊藤貞嘉：ステロイド補充治療中に激越うつ病を発症したアジソン病の一例。第16回CRH・ACTH研究会 大阪3/26/2005
12. 斉藤明子、菅原 明、今泉益栄、星 能元、宇留野晃、伊藤貞嘉、飯沼一字：レチノイン酸とAm80の血管新生に対する作用。第108回日本小児科学会学術集会 東京4/23/2005
13. 菅原 明、伊藤貞嘉：低機能性副腎皮質腺腫を有する非糖尿病患者におけるインスリン分泌能・抵抗性の動態。第48回日本糖尿病学会年次学術集会 神戸5/12~14/2005
14. 長崎 裕、菅原 明、金塚 完、本郷道夫：当院総合診療外来の動向。第13回総合診療学会学術集会 京都5/28~29/2005
15. 菅原 明：高血圧と高脂血症の最近の話題。角田医師会定例研修会「特別講演」 角田6/16/2005
16. 菅原 明、斉藤明子、宇留野晃、工藤正孝、伊藤貞嘉：プロスタサイクリンによる血管新生促進作用の検討。第78回日本内分泌学会学術総会 東京7/1~3/2005
17. 宇留野晃、菅原 明、斉藤明子、工藤正孝、伊藤貞嘉：血管新生における肝細胞増殖因子とスタチン系薬剤の協調作用。第78回日本内分泌学会学術総会 東京7/1~3/2005
18. 斉藤明子、菅原 明、宇留野晃、工藤正孝、星 能元、今泉益栄、飯沼一字、伊藤貞嘉：低濃度レチノイン酸による血管新生促進作用の検討。第78回日本内分泌学会学術総会 東京7/1~3/2005

19. 佐藤眞友美、菅原 明、影近弘之：特異的機能を有するRXRアンタゴニストの同定。第78回日本内分泌学会学術総会 東京7/1~3/2005
20. 森本 玲、佐藤文俊、村上 治、菅原 明、鈴木恵綾、種本雅之、阿部高明、中川晴夫、徳山 聡、石戸谷滋人、山下慎一、相馬文彦、笹野公伸、荒井陽一、伊藤貞嘉：副腎皮質癌治療におけるmitotane療法の意義：術後再発自験例の検討。第78回日本内分泌学会学術総会 東京7/1~3/2005
21. 菅原 明、宇留野晃、竹内和久、工藤正孝、伊藤貞嘉：抗メタボリックシンドローム作用を有する核内受容体：PPAR γ およびレチノイン酸受容体の作用および意義。第78回日本内分泌学会学術総会「シンポジウム」 東京7/3/2005
22. 菅原 明、宇留野晃、斉藤明子、工藤正孝、伊藤貞嘉：抗動脈硬化作用を有する心脈管作動性物質としてのレチノイン酸とプロスタサイクリン：それらの血管内皮機能および血管新生に及ぼす影響。第24回日本臨床化学会夏期セミナー「シンポジウム1 生活習慣病と臨床化学」 蔵王7/7/2005
23. 石井誠一、本郷道夫、金塚 完、加賀谷豊、菅原 明：臨床実習における基本的臨床能力の実施頻度とOSCEの課題としての妥当性に関するアンケート調査。第37回日本医学教育学会総会および大会 東京7/29~30/2005
24. 菅原 明：インフォームド・コンセントと医療情報/医療倫理と患者の権利。第3回宮城県放射線技師会医療学セミナー 仙台8/7/2005
25. 菅原 明：積極的脂質降下療法の意義。第4回総合診療フォーラム「講演」 仙台8/30/2005
26. 菅原 明、斉藤明子、工藤正孝、宇留野晃、本郷道夫、伊藤貞嘉：ACE阻害剤およびアンジオテンシンII受容体拮抗薬の血管内皮細胞における遺伝子発現に及ぼす影響-マイクロアレイを用いた検討-。第41回高血圧関連疾患モデル学会学術総会 札幌9/2~3/2005
27. 菅原 明、工藤正孝、斉藤明子、宇留野晃、本郷道夫、伊藤貞嘉：血管内皮細胞におけるプロスタサイクリンによるNO産生亢進作用および血管新生促進作用。第41回高血圧関連疾患モデル学会学術総会 札幌9/2~3/2005
28. 菅原 明、工藤正孝、斉藤明子、宇留野晃、本郷道夫、伊藤貞嘉：プロスタサイクリンの血管新生および血管内皮細胞における遺伝子発現に及ぼす影響の検討。第28回日本高血圧学会学術集会 旭川9/15~17/2005
29. 菅原 明、斉藤明子、工藤正孝、宇留野晃、本郷道夫、伊藤貞嘉：ACE阻害剤およびアンジオテンシンII受容体拮抗薬の血管内皮細胞における遺伝子発現に及ぼす影響-マイクロアレイを用いた検討-。第28回日本高血圧学会学術集会 旭川9/15~17/2005
30. 斉藤明子、菅原 明、宇留野晃、今泉益栄、工藤正孝、影近弘之、本郷道夫、伊藤貞嘉：全トランス型レチノイン酸および合成レチノイドAm80の血管内皮細胞における遺伝子発現に及ぼす影響-マイクロアレイを用いた検討-。第14回分子高血圧研究会 東京10/15/2005
31. 角田宇衣子、檜尾好徳、鈴木 進、菅原 明、善積信介、山田高弘、平井完史、高橋和眞、萩原健英、片桐秀樹、岡 芳知：CVポート埋め込みにより、頻回入院が改善した1型糖尿病の一症例。第43回日本糖尿病学会東北地方会 仙台11/5/2005
32. 斉藤明子、菅原 明、工藤正孝、宇留野晃、今泉益栄、影近弘之、伊藤貞嘉：レチノイン酸とAm80の血管新生に対する効果。日本レチノイド研究会 第16回学術集会 東京11/11/2005
33. 斉藤明子、菅原 明、今泉益栄、工藤正孝、

- 宇留野晃、伊藤貞嘉：レチノイン酸の血管新生に対する作用。第21回日本小児がん学会 宇都宮11/25/2005
34. 菅原 明、伊藤貞嘉：糖尿病を有しない低機能性副腎皮質腺腫患者におけるインスリン分泌能・抵抗性の動態。第13回日本ステロイドホルモン学会 名古屋11/12/2005
35. 齊藤明子、菅原 明、今泉益栄、工藤正孝、宇留野晃、本郷道夫、伊藤貞嘉：レチノイン酸の血管内皮細胞における遺伝子発現に及ぼす影響-マイクロアレイを用いた検討-。第13回日本ステロイドホルモン学会 名古屋11/12/2005
36. 鈴木 貴、三木康宏、森谷卓也、石田孝宣、菅原 明、林 慎一、大内憲明、笹野公伸：ヒト乳癌におけるperoxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ の発現意義：エストロゲン作用調節因子の可能性。第11回日本内分泌学会東北地方会（第56回東北内分泌研究会） 青森11/12/2005
37. 齊藤明子、菅原 明、今泉益栄、宇留野晃、工藤正孝、影近弘之、本郷道夫、伊藤貞嘉：レチノイン酸および合成レチノイドAm80の血管内皮細胞における遺伝子発現に及ぼす影響-マイクロアレイを用いた検討-。第9回日本心血管内分泌代謝学会 東京11/18~19/2005
38. 齊藤明子、菅原 明、今泉益栄、宇留野晃、工藤正孝、大和田祐二、伊藤貞嘉：レチノイン酸の血管新生に対する作用。第9回日本心血管内分泌代謝学会 東京11/18~19/2005
39. 菅原 明、齊藤明子、工藤正孝、宇留野晃、本郷道夫、伊藤貞嘉：ピオグリタゾンの血管内皮細胞における遺伝子発現に及ぼす影響-マイクロアレイを用いた検討-。第9回日本心血管内分泌代謝学会 東京11/18~19/2005
40. 菅原 明、宇留野晃、齊藤明子、工藤正孝、本郷道夫、伊藤貞嘉：フルバスタチンの血管内皮細胞における遺伝子発現に及ぼす影響-マイクロアレイを用いた検討-。第9回日本心血管内分泌代謝学会 東京11/18~19/2005
41. 滝山由美、三代川齊之、菅原 明、伊藤公一、羽田勝計：甲状腺癌細胞におけるproteasome inhibitorの抗腫瘍効果。第48回日本甲状腺学会 東京11/23/2005
42. 菅原 明：血管内皮でのレチノイン酸による一酸化窒素合成酵素（eNOS）の発現調節機構。日本応用酵素協会平成17年（第31回）研究発表会 大阪11/28/1005
43. 菅原 明、宇留野晃、齊藤明子、工藤正孝、伊藤貞嘉：抗動脈硬化作用を有する心血管作動物質としてのレチノイン酸：その血管内皮機能および血管新生に及ぼす影響の検討。第46回日本脈管学会総会「徹底討論8. 高血圧と脈管疾患；心血管作動物質研究の新展開」 大阪12/2/2005
44. 菅原 明：生活習慣病の対策。泉地区ミニ勉強会 仙台12/6/2005
45. 菅原 明：インフォームド・コンセントと医療情報/医療倫理と患者の権利。日本放射線技師会医療学セミナー 福島12/11/2005
46. 菅原 明、齊藤明子、宇留野晃、工藤正孝、伊藤貞嘉：グレリンの血管内皮細胞における遺伝子発現に及ぼす影響-マイクロアレイを用いた解析-。厚生労働省難治性疾患克服研究事業間脳下垂体機能障害調査研究班平成17年度班会議 東京1/13/2006
47. 菅原 明：ホルモン核内受容体の活性化を介した脈管系調節機構の解明。平成17年度東北大学医学部奨学賞授与式・第360回東北医学会例会 仙台1/20/2006
48. 菅原 明：生活習慣病の対策。県北内科医小グループ研究会 古川1/26/2006
49. 菅原 明、工藤正孝、齊藤明子、宇留野晃、伊藤貞嘉：ACE阻害剤およびアンジオテンシ

ンII受容体拮抗薬の血管内皮細胞における遺伝子発現に及ぼす影響の検討。第11回アンジオテンシンカンファランス 東京2/4/2006

ソマトスタチンアナログによるヒトGH産生下垂体腺腫の縮小機構に関する研究

分担研究者 高野 幸路 東京大学医学部腎臓・内分泌内科 特任講師

研究要旨：ソマトスタチンアナログによるヒトGH産生下垂体腺腫の縮小機構を透過電子顕微鏡を用いた初代培養細胞の観察と生化学的方法で研究した。臨床用量のソマトスタチンアナログを1週間作用させると、GH産生下垂体腺腫細胞の細胞質が面積で約半分に縮小し、核の面積は変化しなかった。この縮小機構には、百日咳毒素感受性G蛋白質が関与し、セリンスレオニンフォスファターゼ2A（PP2A）による脱リン酸化過程によりp70S6kinaseが不活化されて生じることが明らかになった。この機構により蛋白質合成が抑制されて、著明な腫瘍縮小を比較的短期間に引き起こすと考えられた。

A. 研究目的

先端巨大症患者をソマトスタチンアナログであるoctreotideで治療すると、約50%の患者でGH分泌の抑制がみられ、約50%の患者で下垂体腺腫の縮小が認められる。

臨床では数週間と短い期間でも著しい腫瘍縮小効果が得られ（図1）、頭痛や視力障害などの自覚症状の改善が認められる。このような短期間での腫瘍縮小は、細胞個々の大きさの縮小による効果が大いと考えられる。また、ソマトスタチンは細胞増殖を抑制することが知られており、長期間投与した場合の腫瘍縮小には、個々の細胞容積縮小に加え細胞増殖抑制効果が働いていると考えられる。

ヒトGH産生下垂体腺腫細胞における腫瘍縮小の機序を知るために透過電子顕微鏡を用いて初代培養GH産生細胞に対するソマトスタチンアナログの作用を検討し、その作用機構を生化学的方法で研究した。細胞容積の刺激伝達経路について主にp70 S6 kinaseに対するソマトスタチンアナログの作用を調べた。

B. 研究方法

(1) ヒト下垂体腺腫細胞の培養

対象は、octreotide負荷試験によりGH分泌が前値の半分以下に低下した先端巨大症患者のGH産生下垂体腺腫4例である。手術によって得られた下垂体腺腫細胞は、東京大学医学部倫理委員会の承認および患者本人の同意に基づいて使用した。患者背景を表1に示す。

摘出された腺腫組織を、各片が径1mm以下程度になるまで鋏で細断した後、ディスパーゼ1000U/ml（合同酒精）を用い、各細胞がほぼ単離されるまで処理し、ディッシュにまいた。ウエスタンブロッティングへの使用にはこれを60mmプラスチックディッシュに、細胞免疫染色においては、径22mmの円形カバーグラス上に細胞を付着させカバーグラスごと35mmプラスチックディッシュに浸した。

培養液には10%ウシ胎児血清（FCS）含有のダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）を用い、37度・5%CO₂・湿度100%下で培養した。

GH産生下垂体腺腫4例（腫瘍1～4）はそれぞれ次の各群に分け試薬を投与した。

腫瘍1は対照群、octreotide（oct）群、rapamycin（rapa）群、rapa+oct群の4群に分け、電子顕微鏡による観察に使用した。

腫瘍2は対照群、oct群、百日咳毒素（PTX）群、

PTX+oct群、okadaic acid (OA) 群、OA+oct群の6群に分け、免疫染色およびphospho-p70 S6 kinase抗体、p70 S6 kinase抗体、phospho-mTOR抗体、mTOR抗体、phospho-p44/42 MAPK抗体およびp44/42 MAPK抗体を用いたウエスタンブロッティングに使用した。

腫瘍3は対照群、oct群の2群に分け、免疫染色に使用した。

各群は以下のように試薬を投与した。

対照群は8日間連日で10%FCS含有DMEMによる培養液の交換を行った。

Octreotide (oct) 群は1日目に10%FCS含有のDMEMによる培養液の交換を行い、その後、7日間連日で臨床用量(1 ng/ml)^{75), 76)}のoctreotideを投与した。

PTX群は3日毎にPTX (50 ng/ml) を投与した。

PTX + oct群は1日目にPTXを投与し、その後3日毎にPTXを、また7日間連日でoctreotideを投与した。

Okadaic acid (OA) 群は8日間連日でokadaic acid (1nM) を投与した。

OA + oct群は1日目にokadaic acidを投与し、その後7日間連日でokadaic acidおよびoctreotideを投与した。

Rapamycin (rapa) 群は1日目に10%FCS含有のDMEMによる培養液の交換を行い、その後、7日間連日でrapamycin (20nM) を投与した。

Rapa+oct群は1日目に10%FCS含有のDMEMによる培養液の交換を行い、その後7日間連日でrapamycinおよびoctreotideを投与した。

(2) 抗体および試薬

抗体は、p70 S6 kinase抗体 (#9202)、phospho-p70 S6 kinase (Thr389)抗体 (#9206)、mTOR抗体 (#2972)、phospho-mTOR (Ser2448)抗体 (#2971)、をCell Signaling Technology社から入手し使用した。

試薬のうち、octreotideはNOVARTIS社から、

PTX、okadaic acidおよびrapamycinはCALBIOCHEM社から、dispaseは合同酒精からそれぞれ入手し実験に用いた。

(3) 透過型電子顕微鏡

35mmディッシュにまいた細胞を、2.5%のグルタルアルデヒドによって4℃で90分間前固定した。0.2%のタンニン酸を含むpH 7.4の0.1Mリン酸bufferを用いて4℃で30分ずつ3回洗浄した。オスミウム酸によって室温で60分間処理した後固定した。その後エタノールで脱水し、Epon 812に包埋した。ウルトラマイクロトーム(REICHET-JUNG社)を用いて80nmの厚さに超薄切片し、連続切片を作成した。酢酸ウラニールおよびクエン酸鉛で二重染色を行った。透過型電子顕微鏡(日本電子 1200EX)を用いて、各群60個ずつの細胞の観察を行った。画像解析には電子顕微鏡画像を画像解析ソフトanalySIS (Soft Imaging System社)に取り込み、各細胞の連続切片の中で核の面積が最大となる面を用いて、核および細胞質の面積を計測した。

組織標本における細胞容積の算出には、連続切片より断面積を積み重ねて算出するCavalieri methodが基本かつ最も信頼できる方法である¹⁰¹⁾。一方、粒子状の細胞では核を通る断面像より平均細胞容積Vは核を通る線の中心から細胞端までの平均距離をlとして、 $V = 4\pi/3 \times l^3$ の式より算出される^{101), 102)}。このように核を通る線の中心から細胞端までの距離を細胞容積の変化としてとらえられることから、断面積の変化も細胞容積の変化としてとらえることができると考えた。

(4) ウエスタンブロッティング

60mmのプラスチックディッシュに初代培養していた下垂体腺腫細胞を、培養液を吸引除去したのちPBS (-) で洗浄し、スクレイパーではがして遠心した。沈殿した細胞にサ

ンプルバッファー (pH6.8、0.5M Tris-HCl 1ml、10% sodium dodecyl sulfate (SDS) 2ml、 β mercaptoethanol 0.6ml、glycerol 1ml、蒸留水5.4ml、1% bromophenolblue (BPB)数滴 in 10ml) を1mlずつ加え溶解し、超音波処理を行った。アクリルアミドゲルに各試料を泳動し、poly vinylidene difluoride (PVDF)メンブレン(Gelman Sciences社)にブロッティングを行った。メンブレンを1×TBS、0.1% Tween20 with 5%スキムミルクでブロッキングしたのちに、各一次抗体を用いて4℃、over nightでインキュベーションを行った。各抗体は以下の濃度で希釈し使用した。Phospho-p70 S6 kinase(Thr389)抗体(1000倍希釈)、p70 S6 kinase抗体(500倍希釈)、phospho-mTOR (Ser2448)抗体(1000倍希釈)、mTOR抗体(1000倍希釈)。二次抗体にはVectastain Elite ABCキット(VECTOR社)のビオチン標識二次抗体を使用し、enhanced chemiluminescence (ECL)キット(Amersham社)によって検出した。得られたバンドの解析には画像解析ソフトScion Imageを使用した。

(5) 免疫染色

35mmディッシュに初代培養していた細胞を、4%のパラホルムアルデヒドで処理し固定した。その後、洗浄してPBS (-) 0.1% BSA・0.3% Triton-Xで15分処理したのちにPBS (-) 1% BSAで15分間ブロッキングを行い抗ヒトKi-67抗体(50倍希釈)で1時間反応させた。その後にLSAB kit (DAKO社)を用いてビオチン化二次抗体で20分処理、streptavidin-peroxidaseで10分処理し、ABC法により染色した。

(6) 統計解析

実験で得られたデータは平均±標準誤差で表記し、各群間の有意差検定にはANOVAを用い、更に群間比較にはTurkey testを用いた。p<0.05を有意と判定した。

C. 研究結果

(1) 細胞容積縮小の機構

octreotideを7日間投与した細胞は対照群と比較して核の面積は有意差を認めなかったが、細胞質の面積は49~52%に有意に縮小した。この縮小は百日咳毒素処理により消失したことから百日咳感受性G蛋白質が関与することが明らかになった。細胞質縮小のほかに、粗面小胞体の著しい消失も認められたため、タンパク質合成機構に対する抑制が起こっていることを仮定した。タンパク質合成の調節を中心的につかさどるp70S6kinaseの活性化を調べたところ、p70S6kinaseの総蛋白質量は変わらないものの、リン酸化p70S6kinaseは、著しく減少していた。Octreotideがp70S6kinaseの活性化を抑制することで、タンパク質合成を抑制したことが考えられた。この、Octreotideによるp70S6kinaseの活性化の抑制も百日咳毒素処理で解除され、百日咳感受性G蛋白質を介する反応であると判明した。百日咳感受性G蛋白質の下流の機構について各種のリン酸化経路を検討したところ、PP2Aに阻害薬である低濃度のオカダ酸処理により、octreotideによるp70S6kinaseの活性化の抑制は解除された。以上から、octreotideは、百日咳感受性G蛋白質、PP2Aを介して、p70S6kinaseの活性化を抑制し、その結果細胞質の縮小を生じることが示唆された。

p70 S6kinase上流に存在するmTORへのoctreotideの作用を検討するためヒトGH産生下垂体腺腫細胞を初代培養し、mTORのinhibitorであるrapamycinを投与し細胞容積の変化を電子顕微鏡で観察した。

Rapamycinを7日間投与した細胞は対照群と比較して核の面積は有意差を認めなかったが、細胞質の面積は49~52%に有意に縮小した(対照群 $57.5 \pm 1.3 \mu m^2$, n=60、rapamycin群 $29.9 \pm$

0.7 μm^2 、n=60、 $p < 0.001$)。また、octreotideを投与した細胞も細胞質の面積が53~54%に縮小した(対照群 $57.5 \pm 1.3 \mu\text{m}^2$ 、n=60、octreotide群 $31.2 \pm 0.7 \mu\text{m}^2$ 、n=60、 $p < 0.001$)。そしてrapamycinとoctreotideの両方を投与した細胞は細胞質の面積が58~61%に縮小した(対照群 $57.5 \pm 1.3 \mu\text{m}^2$ 、n=60、rapa+oct群 $35.0 \pm 0.8 \mu\text{m}^2$ 、n=60、 $p < 0.001$) (図13、14)。

Rapamycinを投与した細胞において細胞質の縮小がみられたことから細胞容積の制御機構にmTORが関与することが明らかとなった。さらに、octreotideを投与した細胞においても細胞質の縮小がみられたが、rapamycinとoctreotideを両方投与しても、それぞれを単独で投与した以上の細胞質の縮小を認めなかったことよりoctreotideはmTOR、もしくはその下流に作用し細胞質の縮小に働いていると考えられた。

次にoctreotideの作用点がp70 S6 kinaseなのかmTORであるのかを確認するためphospho-p70 S6 kinase抗体およびphospho-mTOR抗体を用いたウエスタンブロッティングを行いoctreotideによるp70 S6 kinase活性およびmTOR活性の変化を検討した。

phospho-p70 S6 kinase抗体によるウエスタンブロッティングでは、octreotide群は対照群と比較してp70 S6 kinase活性の抑制を認めた。百日咳毒素やokadaic acidで処理を行った群では、octreotideによるp70 S6 kinase活性の抑制が消失した。一方、phospho-mTOR抗体によるウエスタンブロッティングでは、octreotide群は対照群と比較しmTOR活性の抑制を認めなかった(図15、16)。これらの結果より、octreotideは百日咳毒素感受性G蛋白質、PP2Aを介してp70 S6 kinase活性を抑制するが、p70 S6 kinaseの上流にあるmTORには作用しないと考えられた(図

17)。

D. 考察

p70 S6 kinaseの上流に存在するmTORへのoctreotideの作用を検討するため、mTORのinhibitorであるrapamycinを投与し細胞容積の変化を観察した。Rapamycinを投与した細胞は対照群と比較して細胞質の面積は有意に減少し、細胞容積の制御機構にmTORが関与することが明らかとなった。Octreotideを投与した細胞でも細胞質の縮小がみられたが、rapamycinとoctreotideを両方投与してもそれぞれを単独で投与した以上の細胞質の縮小を認めなかったことよりoctreotideはmTOR、もしくはその下流に作用し細胞質の縮小に働いていると考えられた。

次にoctreotideの作用点を確認するためphospho-p70 S6 kinase抗体およびphospho-mTOR抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。Phospho-p70 S6 kinase抗体によるウエスタンブロッティングではoctreotide群でのp70 S6 kinase活性抑制を認めるも、phospho-mTOR抗体によるウエスタンブロッティングでは対照群と比較し、octreotide群でのmTOR活性の抑制を認めなかった。これらの結果からmTORはoctreotideの作用点ではなく、octreotideは百日咳毒素感受性G蛋白質とserine/threonine phosphataseの一つであるPP2Aを介してp70 S6 kinaseの脱リン酸化を介して活性を抑制して細胞容積縮小に働くと考えられた。

p70 S6 kinaseは8つのリン酸化部位をもち、これらすべてがリン酸化することで活性化する。特にThr 389およびThr 229のリン酸化がp70 S6 kinaseの活性化に重要である⁵⁵⁾。Thr389はmTORにより直接リン酸化される⁵⁶⁾が、mTORがserin/threonin phosphataseであるPP2Aの活性化を抑制し、p70 S6 kinaseを活性化すると報

告されている^{53), 54)}。今回の結果からは octreotideはPP2Aを介してp70 S6 kinaseの活性化を抑制すると考えられ、p70 S6 kinase活性制御機構のひとつにPP2Aが存在することを示唆する結果となった。

このように今回の実験ではGH産生下垂体腺腫の初代培養細胞にoctreotideを一週間投与したところ細胞質の面積が約半分に縮小した。さらに、その作用機構の検討によりp70 S6 kinase活性の抑制による蛋白質合成の抑制が細胞質縮小の一因であると考えられた。一方、個々の細胞は周囲の浸透圧変化により収縮・膨張が強いられた後にもRegulatory Volume Decrease(RVD)やRegulatory Volume Increase (RVI)と呼ばれる能力をもち、もとの細胞容積に復帰することが可能である。この浸透圧性収縮、浸透圧性膨張後の細胞容積調節にはそれぞれNaClおよびKClチャンネルが活性化され、水の流入・流出がもたらされる⁹⁶⁾。Octreotideの投与により一週間という短期間に細胞容積が著明に縮小した原因にはoctreotideが蛋白質合成抑制以外に、このような細胞容積調節に関与するイオンチャンネルに作用した可能性も考えられる。

Octreotideに最も親和性の強いSSTR2はGH産生下垂体腺腫以外にも脳、腎臓⁹⁷⁾、下垂体前葉⁹⁸⁾、消化管⁹⁹⁾、膵臓¹⁰⁰⁾に分布する。octreotideの投与によりこれらの臓器においても細胞容積が縮小することが予想されるが、臨床における使用では重篤な副作用は認めていない。約半数の症例に嘔気、腹痛、腹痛などの消化器症状を認め、数%にインスリンおよび甲状腺刺激ホルモンの分泌抑制などをきたすがいずれも一過性であることが多く2~3週間で消退する。長期投与による副作用には胆のう収縮の減弱によるコレステロール結石の形成が15%に認められるが、ほとんどが無症候性で

ある。一方、膵内分泌腫瘍ではoctreotideにより一時的にホルモン分泌低下や臨床症状の改善を認めるも、その効果は数週間から数ヶ月で消失してしまう¹⁰¹⁾。この原因としてソマトスタチンソマトスタチン受容体のdown regulationが考えられているが¹⁰²⁾、正常組織においてはソマトスタチン受容体のdown regulationが生じることで重篤な副作用が回避されている可能性も考えられる。

従来細胞成長(容積)と細胞増殖(数)は密接に関係し、細胞容積が十分に大きくなると細胞分裂は起こらないと考えられてきた⁹²⁾。1999年にMontagneら⁵²⁾はp70 S6 kinaseを変異させたショウジョウバエについて検討し、p70 S6 kinaseを変異したものは野生型よりも約半分の個体サイズであることを確認した。さらに細胞容積と数を検討したところ、容積のみが減少し細胞の数は変化していないことから細胞が小さい状態のまま細胞分裂が起こっていることが証明された。また、p70 S6 kinase変異型は野生型より成体となるのが5日遅く、野生型の細胞周期が12.5時間なのに対し変異型では24時間と細胞周期の遅延が認められた。このようにp70 S6 kinaseは細胞容積だけでなく細胞周期の調節にも関与し、octreotideによる細胞増殖抑制も細胞容積縮小と同様にp70 S6 kinase活性の抑制によって生じている可能性も考えられる。

E. 結論

OctreotideによるヒトGH産生下垂体腺腫の縮小について、林周兵らはoctreotideにより個々の細胞容積が縮小し腫瘍縮小をきたすことを発見し、さらにその機構についてoctreotideは百日咳毒素感受性G蛋白質とPP2Aを介してp70 S6 kinase活性を抑制し細胞容積縮小に働くことを報告した。本研究ではp70 S6 kinaseの上流

に存在するmTORがoctreotideの作用である可能性を考え、検討を行った。ウエスタンブロッティングを行いoctreotideによるmTOR活性およびp70 S6 kinase活性の変化を調べた結果、octreotideによりmTOR活性は抑制されずp70 S6 kinase活性のみが抑制されたことからmTORはoctreotideの作用点ではなくp70 S6 kinaseが細胞容積縮小効果における作用点であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

J. Yasufuku-Takano, K. Takano, K. Morita, K. Takakura, A. Teramoto, T.Fujita

Does the prevalence of gsp mutations in GH-secreting adenomas differ geographically or racially? Prevalence of gsp mutations in Japanese patients revisited. *Clinical Endocrinology* 64:91-96, 2006

H.Okinaga, K.Takano, S.Hayashi, J.Yasufuku-Takano, A.Teramoto, T.Fujita

Mechanisms of TRH-induced GH release (paradoxical response) in human somatotroph adenoma cells, *Endocrine Journal* 52:763-767, 2005

N.Kimata-Hayashi, K.Takano, J.Yasufuku-Takano, A.Teramoto, T.Fujita

Mechanism of adrenomedullin-induced prolactin release from human prolactin-releasing adenoma cells, *Endocrine Journal* 52:769-773, 2005

Y. Nishina, K.Takano, J.Yasufuku-Takano, A.Teramoto, T.Fujita

Mechanism of D² agonist-induced inhibition of GH secretion from human GH-secreting adenoma cells *Endocrine Journal* 52:775-779, 2005

2. 学会発表

2005年 第二回GPCR研究会 高野幸路 GPCRによる細胞容積調節機構

H. 知的財産権の出願・登録状況

予定はない