

視床下部障害にもとづく高ナトリウム(Na)血症の病態解析

分担研究者 石川 三衛 自治医科大学附属さいたま医療センター内分泌代謝科
 協力研究者 浅野 智子 自治医科大学附属さいたま医療センター内分泌代謝科
 齊藤 智之 自治医科大学附属さいたま医療センター内分泌代謝科

研究要旨: 著しい高Na血症を呈する視床下部障害8例について水代謝異常の特徴を解析した。対象8例の年齢は20-67歳、男性4例、女性4例。脱水群5例と非脱水群3例の2群に分けて対比検討した。血清Naは156.4vs.150.3mmol/l、尿浸透圧は246.8vs.738.7mmol/Kgと非脱水群で尿濃縮力が保持されていた。随時血清Naとヘマトクリットの間、脱水群では2例で正相関を認めたが、非脱水群では両者に有意の関係がみられなかった。脱水群ではバソプレッシン(AVP)分泌が無反応で中枢性尿崩症に加え著しい渴障害を認めたが、非脱水群ではAVP分泌、渴中枢機能が部分的に残存し、sporadicなAVP分泌を示した。視床下部障害による高Na血症には、AVP分泌と渴中枢の障害程度により体液喪失型と体液保持型の2病態が存在することが示唆される。

A. 研究目的

体内Na含量の90%は細胞外液に存在する。いくつかの病的状態では体液量の減少がおこると細胞外液が濃縮され血清Na濃度の上昇が起こる。血清Na 150mmol/l以上の高Na血症を呈する病態ではほとんどの症例が体液量の減少と関連している[1]。著しい高Na血症は視床下部占拠性病変による中枢性尿崩症と渴障害からおこりうる。これに対して原発性アルドステロン症やクッシング症候群のようにNa保持性の病態でも血清Naの上昇がみられるが、血清Naは150mmol/l以下にとどまることが多い。血清Na 150mmol/l以上の上昇にもかかわらず循環血漿量の減少が見られない病態はまれと考えられる[2-3]。

最近私たちは脱水を伴わない慢性的な高Na血症の症例を経験した[4]。この症例の高Na血症にはクモ膜のう胞による部分型尿崩症と渴中枢閾値の上昇が深く関連していた。視床下部占拠性病変における高Na血症には循環血漿量の減少を伴うものと伴わないもの

の2型が認められるが中枢性尿崩症、渴中枢障害、下垂体前葉機能障害などの障害が循環血漿量の喪失に深く関与することが想定される。今回の研究では視床下部占拠性病変における高Na血症の循環血漿量維持機構の破綻についての病態解析を行った。

B. 研究方法

視床下部占拠性病変のある8例(男性4例及び女性4例、年齢20-67歳、 32.2 ± 18.5 歳)を対象とした。病因は胚芽腫3例、視神経膠腫1例、ランゲルハンス組織細胞腫1例、頭蓋咽頭腫1例、クモ膜のう胞1例であった。それぞれ胚芽腫3例では放射線治療、1例で手術後放射線療法、頭蓋咽頭腫、視神経膠腫、ランゲルハンス組織細胞腫では手術を、クモ膜のう胞ではV-Pシャントが施行された。これらの症例を脱水のある群(脱水群)5例とない群(非脱水群)3例の2群に分けた。脱水の有無は外来時の臨床所見で判断した。患者の外来時の血清Naの範囲はさまざまであった

がすべての症例で自由飲水下で高Na血症を認めた。

脱水群、非脱水群における外来通院時のHtとNaの関係、AVPの分泌能、尿濃縮能、渴中枢機能、下垂体前葉機能について検討した。外来時のHtとNaについては外来受診時自由飲水下での採血(8-10時)を施行した。AVP分泌能の評価のため5%高張食塩水負荷試験(0.05ml/kg/min, 2時間)を施行し尿量、尿浸透圧、血漿浸透圧、血清Na、血漿AVP値を測定した[5]。また対照として5人の健康者(年齢21-36歳、男3人及び女性2人)に高張食塩水負荷試験を施行した。下垂体前葉機能の評価は基礎値と4者負荷試験(CRH, GRH, TRH, LH-RH)の結果で判断した。

C. 研究結果

①外来通院時のHtとNaの関係(図1)

脱水群では5例中2例で血清NaとHtに正の相関がみられた。非脱水群では3例中いずれの症例でも正の相関は見られなかった。

②AVPの分泌能(図2、図3)

入院時両群ともに血清Na(脱水群156.4vs. 非脱水群150.3mmol/l)と血漿浸透圧(300.3vs. 324.2mmol/Kg)は著しく上昇していたが、血漿AVP値はいずれの群でも相対的に低値であった(脱水群 0.7 ± 0.1 , 非脱水群 0.7 ± 0.1 pg/ml)。高張塩水負荷試験では健康者で血漿浸透圧の上昇に対してAVP分泌の上昇がみられた。脱水群では血漿浸透圧の上昇にもかかわらず血漿AVP値の上昇は全く見られなかった。完全型中枢性尿崩症と診断され全例でDDAVPが必要であった。非脱水群3例では血漿浸透圧の上昇に対するAVP分泌の反応が僅かに残存していた。非脱水群の1症例では臨界浸透圧は健康者と比較してかなり高値であったが血漿浸透圧と血漿AVPの間に正

の相関がみられた。非脱水群の残り2例ではAVPの分泌能はわずかに保たれていたが正の相関は見られなかった。これらの症例は部分型尿崩症と診断されたが2例は無治療で管理可能で、残り1例のみでDDAVPが使用された。

③尿濃縮能

自由飲水下の尿浸透圧は脱水群の 246.8 ± 46.7 mmol/kgに対し非脱水群では 738.7 ± 237.1 mmol/kgと尿濃縮能は保たれていた。

④渴中枢機能

脱水群5例では口渇感は完全に消失し、非脱水群では口渇感の残存を軽度認めた。

⑤下垂体前葉機能障害(表1)

下垂体前葉機能は脱水群3例、非脱水群2例で障害されており、2群間で有意な差は見られなかった。血清PRL値は7例で上昇していた。

D. 考察

すべての8症例で視床下部占拠性病変が存在し、原疾患はそれぞれ胚芽腫、視神経膠腫、ランゲルハンス組織細胞腫、頭蓋咽頭腫などであった。私たちはこれらの高Na血症の症例が臨床的に脱水を呈する群と呈さない群の2群に分かれることを見出した。視床下部障害の程度は視床下部占拠性病変の病因とは関連しておらず占拠性病変の範囲と関連しているように思われた。中枢性尿崩症の程度は症例によってさまざまであったがすべての症例で認められていた。これに対して下垂体前葉機能は5例でかなり障害されていたが3例ではほぼ正常であった。血清PRL値はほとんどの症例で視床下部障害を反映して高値であった。これらの結果は高Na血症が視床下部障害を反映していることを示している。高Na血症患者の脱水群と非脱水群との違い

について検討した。図1で示したように脱水群では2例で血清NaとHtは正の相関を示しているが、非脱水群では相関関係は見られなかった。今回の症例では多量の出血や細胞外液のNa含量の変化はないので、Htは細胞外液量の増減と密に関連していると考えられる。したがってHtとNaの相関は脱水の存在を示すことが示唆される。また2群間での検査成績にいくつかの違いがある。尿浸透圧は非脱水群で脱水群よりはるかに高く、非脱水群では尿浸透圧は730mmol/kgであった。また非脱水群ではAVPの反応性がわずかに保たれていた。高張食塩水負荷に対して健常者のAVP分泌の増加反応に比べて少なかったが3例においてわずかな血漿AVPの上昇が認められた。血漿浸透圧に対するAVPの分泌閾値は右方へ偏位していた。このことは血漿浸透圧に対するAVPの分泌閾値がresetされていることを示唆する。事実、1症例で血漿浸透圧と血漿AVPの関連は正の相関を示していた。また非脱水群では部分型尿崩症を示しており血漿AVP値に対する腎臓の反応性が增大していたことも循環血漿量を維持できたことにつながったと想定される。血清NaとHtは相関していなかったため非脱水群では散発的なAVP分泌が維持されていた可能性がある。また飲水行動は弱いものの軽度の渇感が残存していた。このように非脱水群の高Na血症の患者は少なくとも循環血漿量を保持することができたのに対して、脱水群の高Na血症患者は血漿浸透圧の上昇や循環血漿量の減少に対してAVPの反応性や飲水行動が消失し、体液の喪失に対しての適切な防御ができなかったものと考えられる。

次に下垂体前葉機能低下症が高Na血症に関与しているかどうかについて検討した。今回の高Na血症患者のうち5例に下垂体前葉

機能低下症がみられた。下垂体—甲状腺系と下垂体—副腎皮質系は水代謝に影響を与えるが、これらの障害はいずれもコルチゾールや甲状腺ホルモンによるAVP分泌の抑制系を解除するためAVP分泌が増加し水利尿不全を引き起こすことになる。下垂体前葉機能低下では低Na血症を引き起こす。したがって下垂体前葉機能障害は脱水を伴う高Na血症の病態には関わらないと考えられる。

E. 結論

視床下部障害にもとづく高Na血症の患者では体液保持が拙劣となる。AVP分泌能と渇中枢の障害の程度により、脱水群と非脱水群に大別される。非脱水群では、浸透圧変化に対するAVP反応閾値のresetが存在しAVP反応性と軽度の渇感が残存するため、体液保持が可能となることが明らかとなった。

文 献

- 1) Berl T, Schrier RW (2003) Disorders of water metabolism. In: Schrier RW (ed) Renal and Electrolyte Disorders, 6th Edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 1-63.
- 2) Avioli L, Earley LE, Kashima HK (1962) Chronic and sustained hypernatremia, absence of thirst, diabetes insipidus and adrenocorticotrophin insufficiency, resulting from widespread destruction of the hypothalamus. *Ann Intern Med* 56: 131-140.
- 3) Pearce SH, Argent NB, Baylis PH (1991) Chronic hypernatremia due to impaired osmoregulated thirst and vasopressin secretion. *Acta Endocrinol* 125: 234-239.
- 4) Fukagawa A, Ishikawa S, Saito T, Kusaka I, Nakamura T, Higashiyama M, Nagasaka

S, Kusaka G, Matsuzawa T, Saito T (2001) Chronic hypernatremia derived from hypothalamic dysfunction: Impaired secretion of arginine vasopressin and enhanced renal water handling. *Endocr J* 48: 233-239.

5) Saito T, Ishikawa S, Sasaki S, Nakamura T, Rokkaku K, Kawakami A, Honda K, Marumo F, Saito T (1997) Urinary excretion of aquaporin-2 in the diagnosis of central diabetes insipidus. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 1823-1827.

図1. 脱水群、非脱水群におけるHtとNaの関係

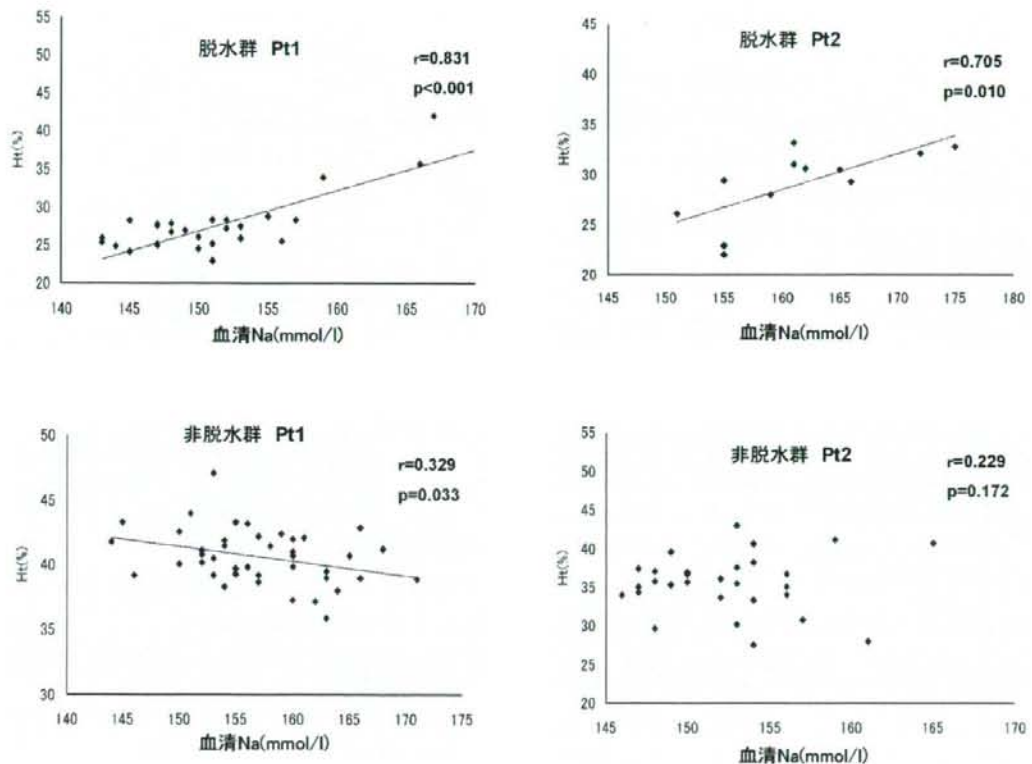


表1. 下垂体前葉ホルモン分泌障害の症例数

	n	LH	FSH	GH	TSH	ACTH	PRLの上昇
脱水群	5	3	3	3	1	1	5
非脱水群	3	2	2	2	1	1	2

図2. 脱水群における高張食塩水負荷試験によるAVPの分泌

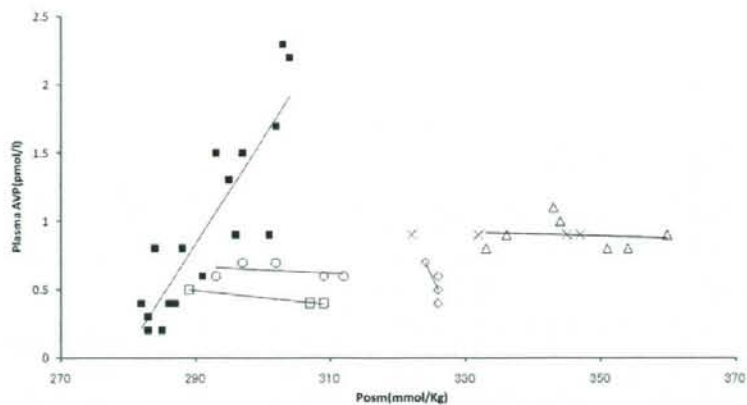
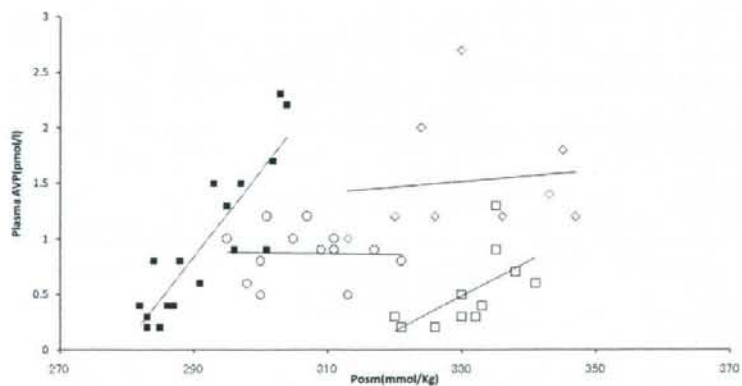


図3. 非脱水群における高張食塩水負荷によるAVPの分泌



SIADHの標準治療法の設定に向けた検討 第2報 —橋中心髄鞘崩壊(CPM)回避におけるミノサイクリンの有効性—

主任研究者	大磯ユタカ	名古屋大学大学院医学系研究科糖尿病・内分泌内科学
分担研究者	梶村 益久	名古屋大学大学院医学系研究科糖尿病・内分泌内科学
	鈴木 陽之	名古屋大学大学院医学系研究科糖尿病・内分泌内科学
	岩間信太郎	名古屋大学大学院医学系研究科糖尿病・内分泌内科学
	有馬 寛	名古屋大学大学院医学系研究科糖尿病・内分泌内科学

A. 研究目的

昨年の当会議で我々はSIADHの標準治療法を本班で設定することを目的とした横断的な臨床研究を提案し、その骨子として、急性期における血清ナトリウム補正に伴う橋中心髄鞘崩壊(CPM)を回避する治療法の確立に向けたデキサメサゾンの基礎研究の結果を提示した。しかし、デキサメサゾンの投与量、投与時間の有効な範囲が狭く、より普遍的に臨床応用可能な治療法開発を目的とした基礎的検討をすすめ、急速補正早期に脱髄病変部に集積し各種炎症性サイトカインを発現する活性化ミクログリアが脱髄の発症、進展に関与している可能性を見出した。そこでミクログリアの活性化を阻害することが知られているミノサイクリンの予防効果を検討するとともに、その予防効果や機序を従来検討したデキサメサゾンと比較した。

B. 研究方法

CPMの動物モデルである浸透圧性脱髄ラットモデルは、従来の報告と同様にAVP V2受容体アゴニストであるデスマプレシンと液体食投与によってSIADHによる低Na血症を誘導した後、高張食塩水(1.0M NaCl, 1.5ml/100g body weight)を投与し血清Naを急速補正することによって作成した。急速補正2日後、5日後に脳を摘出し、それぞれ

early phase群、late phase群とした。また血清Na非補正群をnon-corrected群とした。神経症状はneuroscoreを用い定量的に評価した。脳スライド切片を作製し脱髄病変とミクログリアを観察するために、髄鞘のマーカーとして抗myelin basic protein (MBP)抗体、およびミクログリアのマーカーとして抗IB4抗体を用いた免疫組織化学を施行し、共焦点顕微鏡を用い観察した。また脱髄病変を含む凍結脳切片からRNAを抽出し、定量的RT-PCR法でTNF- α , iNOS, IL-1 β などの各種炎症性サイトカインの遺伝子発現を解析した。またBBBの破綻は血管から漏出した抗IgG抗体を用いた免疫組織化学、またEvans Blueを静脈内投与し脳内のEvans Blue濃度を測定するEvans Blue色素法を用い定量的に評価した。
(倫理面への配慮)

実験動物に対する配慮は、名古屋大学が定めているガイドラインに厳しく準拠し、動物に対する無用な実験を回避した。

C. 研究結果

脱髄病変とミクログリアの分布と形態(図1)

non-corrected groupでは脱髄病変は認められなかったが、early phase(上段)では比較的軽度な脱髄病変(上段左図)が認められ、IB4陽性ミクログリアの脱髄部での集積が観察された(上段中央図、上段右図)。高倍率像で

これらのIB4陽性ミクログリアは形態学的に活性化したミクログリアと考えられた。一方late phase(下段)では重篤な脱髄が認められ(下段左図)、著明に多くのミクログリアの脱髄病変内での集積が観察された(下段中央図、下段右図)。高倍率像ではlate phaseのミクログリアはearly phaseのものより大きく形態学的に、phagocytosisに関与しているものが多いと考えられた。

ミクログリアの炎症性サイトカインの蛋白発現

免疫組織化学法で検討した結果、early phaseのミクログリアはTNF- α , iNOS, IL-1 β といった炎症性サイトカインを発現していることが認められた。Late phaseのミクログリアではほとんど炎症性サイトカインの発現は認められなかった。図1の結果とともにearly phaseの脱髄部で活性化したミクログリアが炎症性サイトカインを発現し病態に関与していると考えられた。

ミノサイクリン投与の神経症状への効果(図2)

(1) ミノサイクリンの投与時間依存性効果(図2-a)。

今までの結果より、ミクログリアは急速補正2日後にすでに活性化し、5日後に活性化が見られなかったことより、早期のミクログリアの活性化を抑制すれば脱髄は防止できるのではないかと仮説をたてた。そこでミクログリアの活性化を阻害することが知られているミノサイクリン(MINO)を急速補正時、補正12時間後、補正24時間後の3回投与するMINO(0,12,24h)群を作成し神経症状への効果を検討した。急速補正群のラットは補正後重篤な神経症状を呈するのに対し、MINO群では著明な神経症状の改善が認められた。昨年報告したデキサメサゾン(DEX)の効果に

ついては、DEX(0,6h)群では著明な改善効果が認められたが、DEX(0,24,24h)の3回パルス投与群では、ほとんど有効性は認められず、デキサメサゾンでは有効な投与方法の幅が狭いのではないかと問題と考えられた。しかしミノサイクリンでは様々な投与時間で検討を行った結果、有効な投与時間の広範性が認められた。またデキサメサゾン投与群では神経症状が一旦出現すると症状は経時的に悪化するに対し、ミノサイクリン投与では症状出現後も症状の悪化の進行を抑制する効果が認められ、ミノサイクリンとデキサメサゾンのCPM防止機序が異なる可能性が示唆された。

(2) ミノサイクリンの投与量依存性効果

(図2-b)

デキサメサゾンは投与量が減少すると神経症状の改善効果がかなり減弱するのに対し、ミノサイクリンはヒトでの常用量とほぼ同量の4.5 mg/kg BWの投与量でもcorrected群に比し著明な改善効果が認められた。

ミノサイクリンのミクログリアに対する影響の免疫組織学的検討

corrected群ではミクログリアはIB4抗体、TNF- α 抗体で強く染色されたが、MINO群ではIB4、TNF- α の免疫活性が低下し、ミクログリアの活性が抑制されたことが示唆された。

ミノサイクリンの炎症性サイトカイン遺伝子発現に対する影響(図3)

ミノサイクリンはearly phaseでのiNOS(図3-a)、TNF- α (図3-b)、IL-1 β (図3-c)の遺伝子発現を有意に低下させた。前述の免疫組織学的検討の結果とともに、ミノサイクリンがearly phaseでミクログリアの活性化を抑制し

たことが強く示唆された。

ミノサイクリンのBBB透過性に対する影響

(1) IgG免疫染色による検討

一方、CPMの発症機序にBBBの破綻が関与することが広く知られている。我々は、急速補正後のBBBの破綻をDEXが防止することによってCPMを予防している可能性が高いことを報告した。今回、ミノサイクリンの脱髄発症の機序にBBBの破綻の予防が関与しているか否かを検討するためにIgG免疫染色を施行した。IgGは分子量の大きく通常BBBは通過しないのでnon-corrected群では脳内でIgG染色はほとんど認められないのに対し、corrected群ではBBBの破綻が起こっているため血管周囲にIgG染色が観察された。MINO群でもcorrected群と同様血管周囲にIgGの漏出が認められ、BBBが破綻していると考えられた。

(2) Evans blue法による定量的評価(図4)

脳内のevans blue濃度はcorrected群においてnon-corrected群に比し上昇し、またMINO群でもcorrected群と同等でnon-corrected群に比し上昇することが認められた。つまりIgG免疫染色の結果とともにミノサイクリンは急速補正後のBBBの破綻を防止しないことが示された。

D. 考察

従来CPMの発症機序は低Na血症下で血清Na濃度が急激に上昇するに伴い血液脳関門の破綻がおり、血液中の補体などの細胞毒性因子の脳内侵入や浸透圧ストレスなどによりオリゴデンドロサイトに障害が起こり、脱髄が発症・進展すると考えられている。我々はデキサメサゾンがCPMの発症を予防する機序として主にBBB破綻を予防することが

考えられると報告しているが、ミノサイクリンのCPMの発症予防機序にはBBBの破綻の防止は介さず、ミクログリアの活性化を阻害することによって脱髄病変の進展を抑制する可能性が考えられた。また逆にミノサイクリンの効果が著明であったことより、BBBの破綻後は前述したようにいくつかの機序によってCPMが惹起されると考えられているが、その機序においてミクログリアの活性化が大きな役割を演じていることが示唆された。

臨床応用においては、ミノサイクリンのCPM発症予防・進展防止効果は、以下の理由によりDEXより有効性、安全性が高いと考えられた。

1. 神経症状の著明な改善効果
2. 有効な投与時間幅の広範性、及び常用量の投与量で十分な効果が期待できること
3. 主な作用点が髄鞘の障害に直接関与すると考えられているミクログリアであること
4. 血清Naや血糖上昇などの副作用が少ないこと

以上より、SIADHのよる重症低Na血症の患者に対して高張食塩水を用い積極的なNa補正治療を施行する際、CPMを回避するためミノサイクリンを使用すべきと考えられた。

E. 結語

我々はすでに今回提示した結果に基づき、「SIADHに伴う重症慢性低ナトリウム血症治療時における浸透圧性脱髄予防に対するミノサイクリンの効果の検討」のテーマで名古屋大学生命倫理委員会の認可を受け臨床研究を開始した。その内容は、厚生労働省の平成18年度バゾプレシン分泌過剰症(SIADH)の診断の手引きに準じSIADHと診断され、慢

性低Na血症が認められ、かつ血清Na濃度が120 mEq/L以下の低Na血症によって神経学的症状を呈する患者を研究対象とするものであり、治療方法は従来から提唱されているstandardな治療を行い、それに加えミノサイクリンを血清Naの補正開始時、12時間後、

24時間後にそれぞれ常用量の100mg 静脈投与しその効果を検討するというものである。今後症例を重ね、浸透圧性脱髄予防に対するミノサイクリンの安全性・効果について本誌で報告してゆきたい。

図1. 脱髄病変とミクログリア

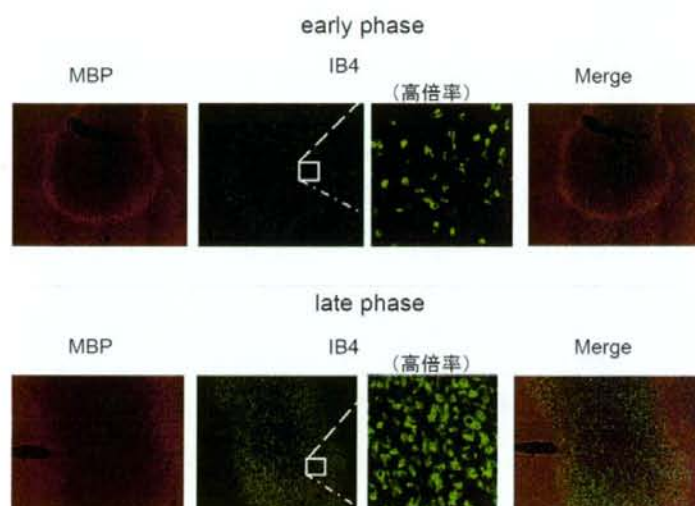


図2-a. ミノサイクリンの神経症状に対する投与時間依存性効果

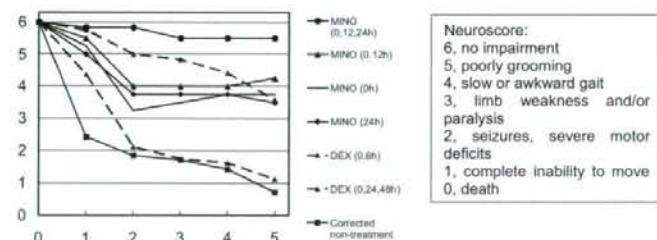


図2-b. ミノサイクリンの神経症状に対する用量依存性効果

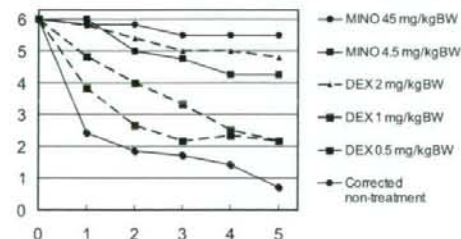


図3. ミノサイクリンの各種炎症性サイトカイン遺伝子発現に対する影響

図3-a. iNOS遺伝子発現

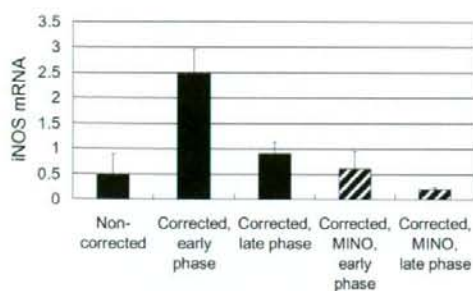


図3-b. TNF- α 遺伝子発現

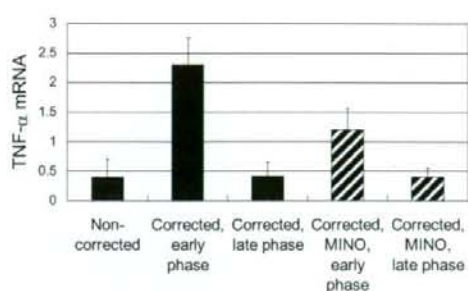


図3-c. IL-1 β 遺伝子発現

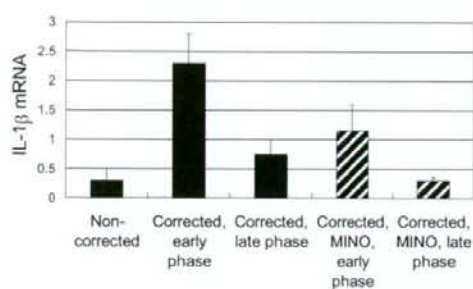
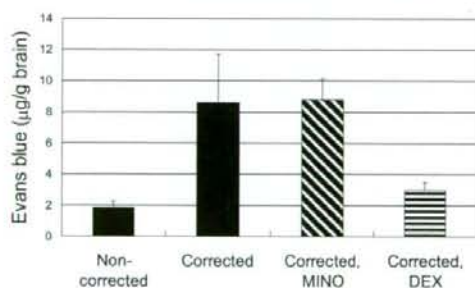


図4. ミノサイクリンのBBB透過性に対する影響



家族性中枢性尿崩症における食事療法の確立に関する研究

分担研究者 有馬 寛 名古屋大学医学部附属病院糖尿病・内分泌内科講師

研究要旨: 常染色体優性遺伝性疾患である家族性中枢性尿崩症においては生後数ヶ月から数年で緩徐進行性に尿崩症を発症するが、同じ変異を有する個体間においても発症時期に差異があることより環境因子が尿崩症の発症に影響を与えている可能性が考えられる。家族性中枢性尿崩症における多尿の発症および進展に塩分摂取量が影響を与えるか否かを明らかにする目的で以下の実験を行った。実験はバゾプレシンのキャリアプロテインであるニューロフィジンの点突然変異の一つであるCys67stopを導入したノックインマウス(ヘテロ変異体)および野生型マウスの雄を用いて行った。生後1ヶ月齢からそれぞれ0.2%Na食または2%Na食を投与し、体重、摂食量、尿量、飲水量、尿中Na排泄量、尿中バゾプレシン排泄量を7ヶ月齢まで測定した。野生型、ヘテロ変異体マウスともに0.2%Na食群と2%Na食群の間で摂食量および体重に有意な差を認めなかった。尿中Na排泄量は飼料のNa含有量を反映して野生型、ヘテロ変異体マウスともに2%Na食群において0.2%Na食群に比して有意に増加し、野生型マウスの2%Na食群で尿中バゾプレシン排泄量が0.2%Na食群に比して有意に増加していた。野生型マウスの2%Na食群は2ヶ月齢の時点で0.2%Na食群に比して有意に飲水量、尿量の増加を認めたが、以後経時的な増加を認めなかった。一方、ヘテロ変異体マウスの2%Na食群では2ヶ月齢の時点で野生型マウスと同様に飲水量、尿量の増加を認め、以後7ヶ月齢まで経時的な増加を認めた。今回の検討より、家族性中枢性尿崩症において塩分過剰摂取はバゾプレシン分泌刺激を介し尿崩症の進行を早める可能性が示唆された。

A. 研究目的

家族性中枢性尿崩症は生後数ヶ月から数年で緩徐進行性に多飲多尿を呈する常染色体優性遺伝性疾患である。現在までに50以上の点突然変異の報告があるが、その変異部位はバゾプレシン領域よりも輸送蛋白であるニューロフィジン領域に圧倒的に多く、また正常な一つのalleleを持ちながら進行性に尿崩症を発症する病態は未だ十分には解明されていない。家族性中枢性尿崩症においては同じ変異を有する個体間においても多尿の発症時期に差異があることより環境因子が尿崩症の発症に影響を与えている可能性も考えられる。また小児期に多尿が発症した場合の水電

解質バランスのコントロールは困難であるため、家族性中枢性尿崩症における多尿の発症を遅らせることは臨床的にも重要であると考えられる。

家族性中枢性尿崩症の遺伝子変異の一つであるニューロフィジン領域のナンセンス変異のCys67stopを導入することにより我々が作製したノックインマウスは、ヘテロ変異体マウスの視床下部バゾプレシン産生核に特異的に変異ニューロフィジンが発現し、生後1ヶ月齢以降経時的な尿崩症の進行を認めるというヒトに近い表現型を示す疾患モデルである。本研究では家族性中枢性尿崩症における尿崩症の発症および進展に塩分摂取量が影響

を与えるか否かを明らかにする目的で以下の検討を行った。

B. 研究方法

実験はバゾプレシンのキャリアプロテインであるニューロフィジンの点突然変異の一つであるCys67stopを導入したノックインマウス(ヘテロ変異体)および野生型マウスの雄を用いて行った。我々は変異ニューロフィジンを特異的に認識する抗体を作成し、ヘテロ変異体マウスの視床下部バゾプレシン産生核に特異的に変異ニューロフィジンが発現することを既に確認している。生後1ヶ月齢からヘテロ変異体マウスおよび野生型マウスのそれぞれにNaを0.2%含有する食餌(0.2%Na食)または2%含有する食餌(2%Na食)を投与し、体重、摂食量、尿量、飲水量、尿中Na排泄量、尿中バゾプレシン排泄量を7ヶ月齢まで測定した。尿中バゾプレシン排泄量は蓄尿して得られたサンプルを希釈してradioimmuno assay法を用いて測定した。なおノックインマウスを用いた実験に関しては名古屋大学医学部組換えDNA実験安全委員会において承認を受けており、マウスの飼育および実験は各種実験動物の取り扱いに関して厳しい基準を満たした名古屋大学の実験動物施設にて行った。実験に際しては名古屋大学の動物実験指針を遵守するとともに、ノックインマウスを扱う時は遮蔽版を設置し、マウスの逃亡を防止した。

C. 研究結果

野生型、ヘテロ変異体マウスともに0.2%Na食群と2%Na食群との間で摂食量(7ヶ月齢野生型マウス:0.2%Na食群;15.88±2.58%BW、2%Na食群;21.63±2.48%BW、7ヶ月齢ヘテロ変異体マウス:0.2%Na食群;12.65±

0.57%BW、2%Na食群;14.62±0.73%BW)および体重(7ヶ月齢野生型マウス:0.2%Na食群;30.47±0.76g、2%Na食群;30.12±0.79g、7ヶ月齢ヘテロ変異体マウス:0.2%Na食群;32.05±0.78g、2%Na食群;30.23±0.61g)に有意な差を認めなかった。尿中Na排泄量は飼料のNa含有量を反映して野生型、ヘテロ変異体マウスともに0.2%Na食群に比して2%Na食群において有意に増加していた(7ヶ月齢野生型マウス:0.2%Na食群;4.35±0.29mg/day、2%Na食群;63.15±2.87mg/day、 $p<0.05$ 、7ヶ月齢ヘテロ変異体マウス:0.2%Na食群;4.56±0.37mg/day、2%Na食群;55.05±4.00mg/day、 $p<0.05$)。野生型マウスの2%Na食群においては尿中バゾプレシン排泄量が0.2%Na食群に比して実験期間を通じて有意に増加していた(7ヶ月齢野生型マウス:0.2%Na食群;93.02±24.25pg/day、2%Na食群;559.78±125.27pg/day、 $p<0.05$)。一方、ヘテロ変異体マウスにおいては0.2%Na食群に比して2%Na食群の尿中バゾプレシン排泄量は最初の2ヶ月間のみ増加していた(3ヶ月齢ヘテロ変異体マウス:0.2%Na食群;35.05±11.25pg/day、2%Na食群;72.26±19.59pg/day、 $p<0.05$)が、4ヶ月齢以降は0.2%Na食群と2%Na食群の間に有意な差を認めなかった(7ヶ月齢ヘテロ変異体マウス:0.2%Na食群;15.58±5.91pg/day、2%Na食群;18.82±3.89pg/day)。野生型マウスの2%Na食群は2ヶ月齢の時点で0.2%Na食群に比して有意に飲水量(data not shown)、尿量(2ヶ月齢野生型マウス:0.2%Na食群;6.35±0.56%BW、2%Na食群;21.77±1.40%BW、 $p<0.05$)の増加を認めたが、以後経時的な増加を認めなかった。一方、ヘテロ変異体マウスの2%Na食群では2ヶ月齢の時点で野生型マウスと同様に飲水量(data not

shown)、尿量(2ヶ月齢ヘテロ変異体マウス: 0.2%Na食 群; $38.07 \pm 3.19\%$ BW、2%Na食 群; $52.69 \pm 3.53\%$ BW、 $p < 0.05$)の増加を認め、以後7ヶ月齢まで飲水量(data now shown)、尿量(7ヶ月齢ヘテロ変異体マウス: 0.2%Na食 群; $25.00 \pm 3.49\%$ BW、2%Na食 群; $71.13 \pm 11.89\%$ BW、 $p < 0.05$)の経時的な増加を認めた。

D. 考察

バゾプレシン分泌は血漿浸透圧と循環血液量の変化により主に調節されているが、塩分の摂取は口腔内や門脈の浸透圧レセプターを介してバゾプレシンを分泌することが示唆されており(Stricker EM et al., 2002 Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 282:R1710, Akaishi T et al., 1993 Ann N Y Acad Sci 689:455)、塩分摂取によるバゾプレシン分泌は血漿浸透圧と循環血液量の変化による調節機構とは独立していると考えられている。また蓄尿をして得られたサンプルから測定した尿中バゾプレシン値は一日のバゾプレシン分泌量を反映していることが報告されており(Tausch A et al., 1983 J Clin Endocrinol Metab 57:777)、今回の検討においても塩分の過剰摂取がバゾプレシンの分泌刺激になることが野生型のマウスにおいて確認された。一方ヘテロ変異体マウスにおいても塩分の過剰摂取によって尿中バゾプレシン値が投与開始2ヶ月間上昇していたことからヘテロ変異体マウスにおいても塩分負荷によりバゾプレシン分泌が刺激されていたと考えられる。しかしながらこうしたバゾプレシンの分泌の亢進はヘテロ変異体マウスにおいて塩分負荷3ヶ月目以降は認められなかった。経時的なバゾプレシン分泌の変化はヘテロ変異体マウスにおいてのみ認められたことより、ヘテロ変異体マ

ウスにおいてはバゾプレシン分泌能が塩分負荷により経時的に低下することが明らかとなった。またバゾプレシン分泌能の低下に伴い尿量も増加したことからヘテロ変異体マウスにおいては塩分負荷によりバゾプレシン分泌能の低下による多尿が進行することが確認された。我々はこれまでに組織学的検討を行い、ヘテロ変異体ではバゾプレシンニューロンの粗面小胞体内腔に封入体の発現を認めること、封入体のサイズおよび封入体を発現する細胞数は多尿の進行とともに増加することを確認している。こうした封入体の出現は変異ニューロフィジンの蓄積に起因すると考えられるが、興味深いことに封入体は正常ニューロフィジン、変異ニューロフィジン、バゾプレシンのいずれに対する抗体を用いた免疫染色においても陰性であった。これはバゾプレシン前駆体の抗原性が封入体内で失活しているか、あるいは異常バゾプレシンの前駆体の折り畳みが障害されて抗原性を示すエピトープが封入体内でマスクされている可能性を示唆している。今回の検討においてもヘテロ変異体マウスにおいては塩分の過剰摂取により変異バゾプレシン前駆体の合成が亢進し、粗面小胞体内腔における封入体の蓄積を生じた結果、細胞機能障害が進展したと推察されるが、免疫組織学的手法を用いたバゾプレシンニューロンの変化は今後検討が必要である。

家族性中枢性尿崩症は生後数ヶ月から数年で多尿を発症するが、小児期の水電解質バランスを保つことは容易ではない。また小児期に脱水発作を繰り返すことが中枢神経に不可逆的な影響を与えることも報告されている(Hoekstra JA et al., 1996 Am J Med Genet 61:81)ことから、家族性中枢性尿崩症における多尿の発症を遅らせることは臨床的に極め

て重要である。同じく多尿を示す遺伝性疾患である家族性腎性尿崩症においては小児期から塩分制限を施行することが既に提唱されているが、私たちの検討から家族性中枢性尿崩症においても塩分を過剰に摂取することで多尿の発症・進展を生じることが示唆される。

E. 結論

家族性中枢性尿崩症の患者においては多尿発症前に塩分を過剰摂取することによりバゾプレシニューロンの機能障害を進展させる可能性がある。多尿を小児期に発症した場合には水電解質コントロールが困難であることを考慮すると家族性中枢性尿崩症の患者において小児期から塩分制限を施行することが必要である。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし。

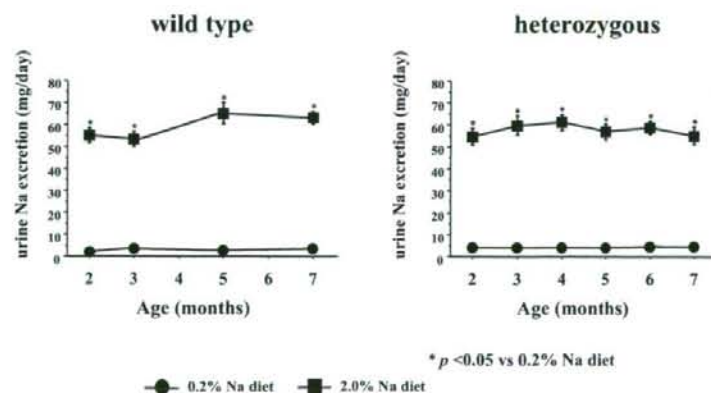
2. 学会発表

- 1) 第81回日本内分泌学会学術総会(2008年5月16-18日, 青森)
- 2) 塩分摂取量が家族性中枢性尿崩症における多尿の進行に与える影響 - ノックインマウスモデルを用いた検討 - 廣井麻依子, 有馬 寛, 森下啓明, 林 正幸, 大磯ユタカ

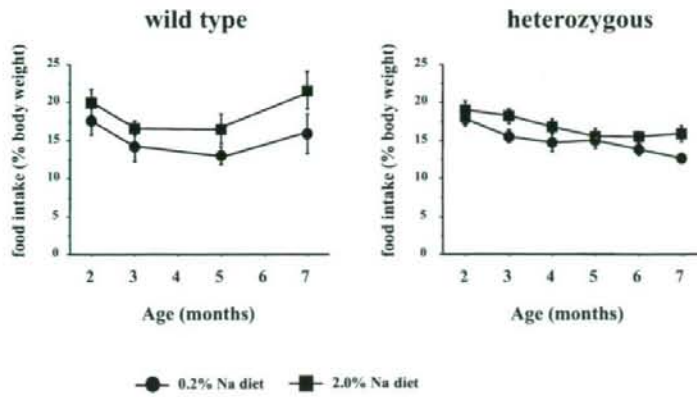
H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

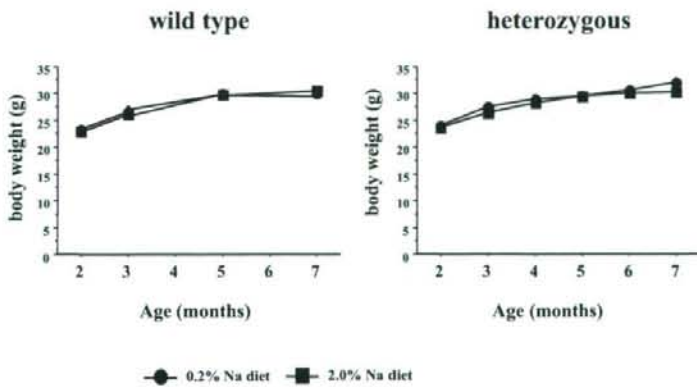
尿中Na排泄量の経時的変化



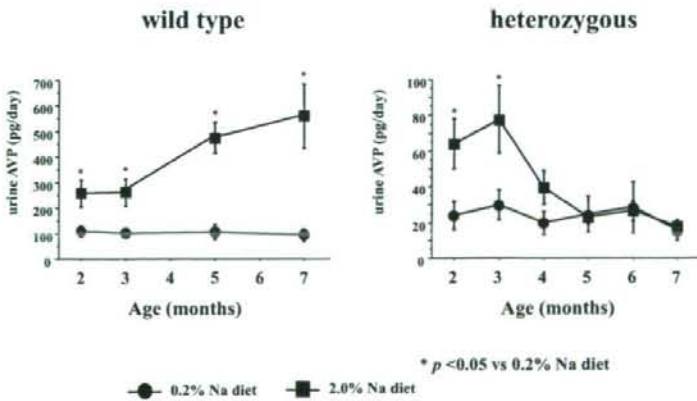
摂食量の経時的変化



体重の経時的変化

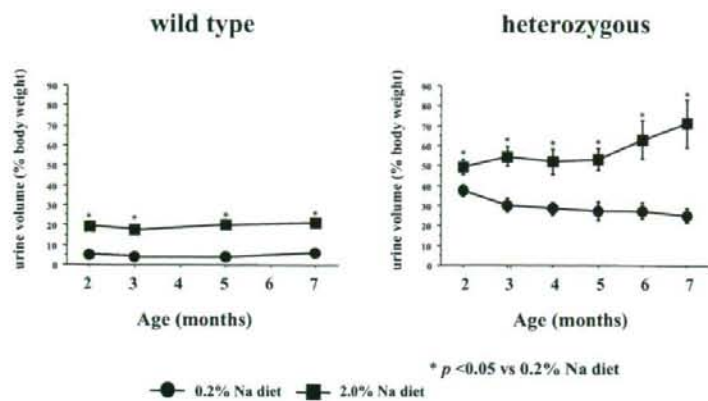


体重の経時的変化



* $p < 0.05$ vs 0.2% Na diet

尿中Na排泄量の経時的变化



クッシング病モデルマウスにおける インスリン抵抗性発症機序の解析

分担研究者	岩崎 泰正	高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科
研究協力者	西山 充	高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科
	品原 正幸	高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科
	中山 修一	高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科
	田口 崇文	高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科
	寺田 典生	高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科

研究要旨: グルココルチコイド(GC)過剰によるインスリン抵抗性の発症機序は明らかでない。今回我々はクッシング病モデルであるCorticotropin-releasing hormone過剰発現マウス(CRH-Tg)を用いて、アディポネクチン(AdN)がGC過剰によるインスリン抵抗性の発症に関与するか否かを検討した。CRH-Tgは体脂肪量増加、血中GC濃度の著明高値を呈し、ipGTTにて耐糖能障害、ITTにてインスリン抵抗性を示した。また野生型マウス(WT)と比較して脂肪組織におけるAdN発現量は減少したが、逆に血中AdN濃度は有意に増加していた。この増加は副腎摘除により消失した(AdN: WT 0.93 ± 0.04 , CRH-Tg 1.57 ± 0.20 , CRH-Tg/ADX 0.85 ± 0.04 mg/dl)。これらの結果より、GC過剰により惹起されるインスリン抵抗性にAdNの関与は少ない可能性が示唆された。

A. 研究目的

クッシング病では高頻度に糖尿病や耐糖能障害を合併するが、グルココルチコイド(GC)の過剰によるインスリン抵抗性の発症機序は明らかにされていない。一方、近年注目されているアディポネクチン(AdN)は脂肪組織から分泌されるアディポカインのひとつであり、インスリン感受性を改善する作用を持つことが知られている。しかしGC過剰時のインスリン抵抗性にAdNが関与するか否かは不明である。今回我々はクッシング病のモデル動物であるCorticotropin-releasing hormone過剰発現マウス(CRH-Tg)を用いて、GC過剰によるインスリン抵抗性とAdNとの関連につき検討した。

B. 研究方法

CRH-TgはDr. Stenzel-Poore (Oregon Health and Science University) から分与されたものを、当教室にて繁殖させて使用した。

実験1: CRH-Tgの耐糖能検査、インスリン感受性検査

雄性12週齢CRH-Tgおよび野生型マウス(WT)を用いて、耐糖能検査(ipGTT: 一晩絶食後に2g/kg体重のグルコースを腹腔内注射)、およびインスリン感受性検査(ITT: 一晩絶食後に0.7unit/kg体重のインスリンを腹腔内注射)を行い、経時的に血中グルコース濃度を測定した。

実験2: CRH-TgのAdN発現量(脂肪組織)および血中AdN濃度

雄性6または14週齢CRH-Tgおよび野生型マウス(WT)を用いて、脂肪重量、脂肪

組織におけるAdN mRNA量(リアルタイムPCR)、AdN蛋白量(ウエスタンブロット)、血中ホルモン濃度(RIAまたはELISAキット: コルチコステロン、インスリン、AdN)を検討した。

実験3: CRH-Tgに対する副腎摘除の影響

雄性12週齢CRH-Tgに対して、両側副腎摘除または偽手術を行い、実験2と同様のパラメーターにつき解析した。

C. 研究結果

CRH-Tgでは野生型マウスと比較すると耐糖能障害およびインスリン抵抗性が認められた(図1)。

CRH-TgではGC過剰に伴う成長障害を認めるため、6週齢では野生型と比較して体重が低値であったが、その後14週齢になると体重は野生型と同等となり、脂肪量は明らかな増加が認められた。またCRH-Tgでは血中コルチコステロンは著明に高値であり、これに伴い胸腺重量の低下が見られた。血中インスリン濃度も高値であり、インスリン抵抗性を反映したものと考えられた(表1)。脂肪組織でのAdN発現量を検討したところ、CRH-TgではAdN mRNA、蛋白レベルともに、野生型と比較して有意な減少が認められた(図2)。しかしながら、CRH-Tgにおける血中AdN濃度は(局所での発現とは逆に)野生型マウスと比較して有意な増加が見られた(図3)。

CRH-Tgに副腎摘除を行うと、血中コルチコステロン濃度の減少および胸腺重量の回復が見られた。また同時に、脂肪量過剰、高インスリン血症についても著明な低下が認められ、血中GC低下に伴いクッシング病の表現型が改善したものと考えられた(表2)。CRH-Tgの血中AdN濃度は、野生型と比較して高値を示したが、副腎摘除により野生型

のレベルまで低下した(図4)。

D. 考察

クッシング病モデルであるCRH-Tgは、血中GCの著明な上昇に伴い、肥満、耐糖能障害、高インスリン血症、インスリン抵抗性を呈していた。一方、CRH-Tgの脂肪組織におけるAdN発現量は、mRNA、蛋白レベルともに減少していたが、血中AdN濃度は逆に上昇が見られた。またCRH-Tgの高AdN血症は副腎摘除により低下が見られた。

AdNはインスリン感受性を改善するアディポカインと考えられており、肥満者などインスリン抵抗性が存在する状態では血中AdNは低下が見られる。CRH-Tgでは肥満、インスリン抵抗性が存在するにも関わらず、血中AdN濃度は増加が見られ、興味深い肥満モデルと考えられる。ヒトのクッシング症候群では血中AdNレベルは健常人と同等との報告があるが、血中AdNレベルは体重、栄養状態、AdN遺伝子多型(SNP276)などによっても影響を受けるため、ヒトでの解析ではもっと大きな母集団が必要なかもしれない。健常人に対して外因性GCを投与した検討では、ステロイドパルス療法により血中AdNレベルが有意に増加するという報告も見られる。今回の結果と合わせると、GC過剰状態では血中AdN濃度は増加することが示唆された。また、AdNはインスリン抵抗性改善因子であることより、GC過剰に伴うインスリン抵抗性惹起にAdNの関与は少ないことが示された。

*In vitro*の検討ではGC投与は脂肪細胞におけるAdN発現を減少させることが報告されている。その他にもTNF α 、IL-6などの炎症性サイトカインやインスリンの投与もAdN発現を減少させることが知られている。

今回、CRH-Tgの脂肪組織でAdN発現量が減少していたことは、脂肪細胞を用いた検討と合致するものであり、GCの直接作用とも考えられる。

脂肪組織でのAdN発現量低下と血中AdNレベル上昇との乖離が生ずる機序は不明であるが、一つにはGC過剰下ではAdNの代謝が遅延する可能性が考えられる。またはGC過剰下ではAdN分泌が亢進する結果、局所ではAdN発現量低下が観察されるのかもしれない。これらを明らかにするには今後さらなる検討が必要と考えられる。

E. 結論

クッシング病モデルであるCRH-TgではGC高値、肥満、インスリン抵抗性の存在にも関わらず、血中AdNレベルは上昇が認められた。このためGC過剰に伴うインスリン抵抗性惹起にAdNの関与は少ないと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsugita M, Iwasaki Y, et al. Glucocorticoid receptor plays an indispensable role in mineralocorticoid receptor-dependent transcription in GR-deficient BE (2) C and T84 cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 2009, in press.
- 2) Tsugita M, Iwasaki Y, et al. Differential regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type-1 and -2 gene transcription by proinflammatory cytokines in vascular smooth muscle cells. *Life Sci* 2008;83:426-432.
- 3) Nishiyama M, Makino S, Iwasaki Y, et al. CRH mRNA expression in the hypothalamic paraventricular nucleus is inhibited despite the activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during starvation. *Brain Res* 2008;1228:107-112.
- 4) He J, Iwasaki Y, et al. Multisignal regulation of the rat NMDA1 receptor subunit gene—a pivotal role of glucocorticoid-dependent transcription. *Life Sci* 2008; 82:1137-1141.
- 5) Maruyama H, Iwasaki Y, et al. Rathke's cleft cyst with short-term size changes in response to glucocorticoid replacement. *Endocr J* 2008; 55:425-428.
- 6) Iwasaki Y, et al. Lipopolysaccharide stimulates proopiomelanocortin gene expression in AtT20 corticotroph cells. *Endocr J* 2008;55:285-290.
- 7) Iwasaki Y, et al. Is the metabolic syndrome an intracellular Cushing state? Effects of multiple humoral factors on the transcriptional activity of the hepatic glucocorticoid-activating enzyme (11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1) gene. *Mol Cell Endocrinol* 2008;285:10-18.
- 8) Iwasaki Y, et al. Activation of AMP-activated protein kinase stimulates proopiomelanocortin gene transcription in AtT20 corticotroph cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;292:E1899-E1905.
- 9) Yamamori E, Iwasaki Y, et al. Molecular mechanisms for corticotropin-releasing hormone gene repression by glucocorticoid in BE (2) C neuronal cell line. *Mol Cell Endocrinol.* 2007;264:142-148.
- 10) Asaba K, Iwasaki Y, et al. High glucose activates pituitary proopiomelanocortin

gene expression: possible role of free radical-sensitive transcription factors. *Diabetes Metab Res Rev* 2007;23:317-323.

2. 学会発表

- 1) Shinahara M, Nishiyama M, Iwasaki Y, Noguchi T, Hashimoto K: Glucocorticoid increases plasma adiponectin levels in mice. The Endocrine Society's 89th Annual Meeting, June 2008, Toronto
- 2) 品原正幸, 西山 充, 岩崎泰正, 野口 徹, 橋本浩三. グルココルチコイドは *in vivo*

で血中アディポネクチンを上昇させる. 第80回日本内分泌学会学術総会(東京)

- 3) 品原正幸, 西山 充, 岩崎泰正, 中山修一, 岡崎瑞穂, 橋本浩三. Corticotropin-releasing hormone (CRH) 過剰発現マウスはグルココルチコイドは高アディポネクチン血症を呈する. 第28回日本肥満学会学術総会(東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図 1. CRH 過剰発現マウス, 野生型マウスの耐糖能およびインスリン感受性

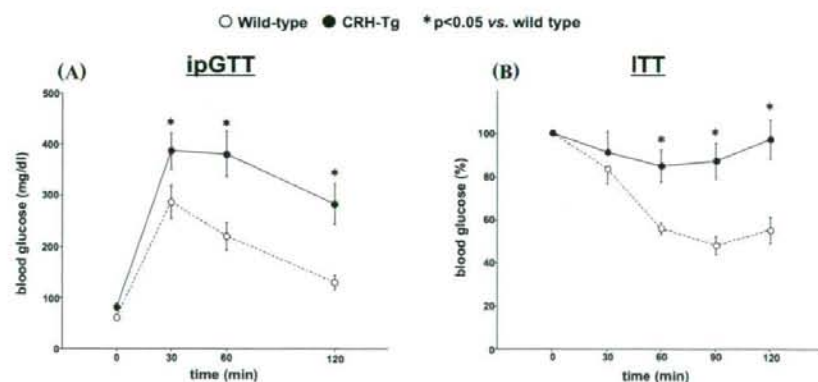


図 2. CRH 過剰発現マウス, 野生型マウスの脂肪組織におけるアディポネクチン mRNA, 蛋白量

