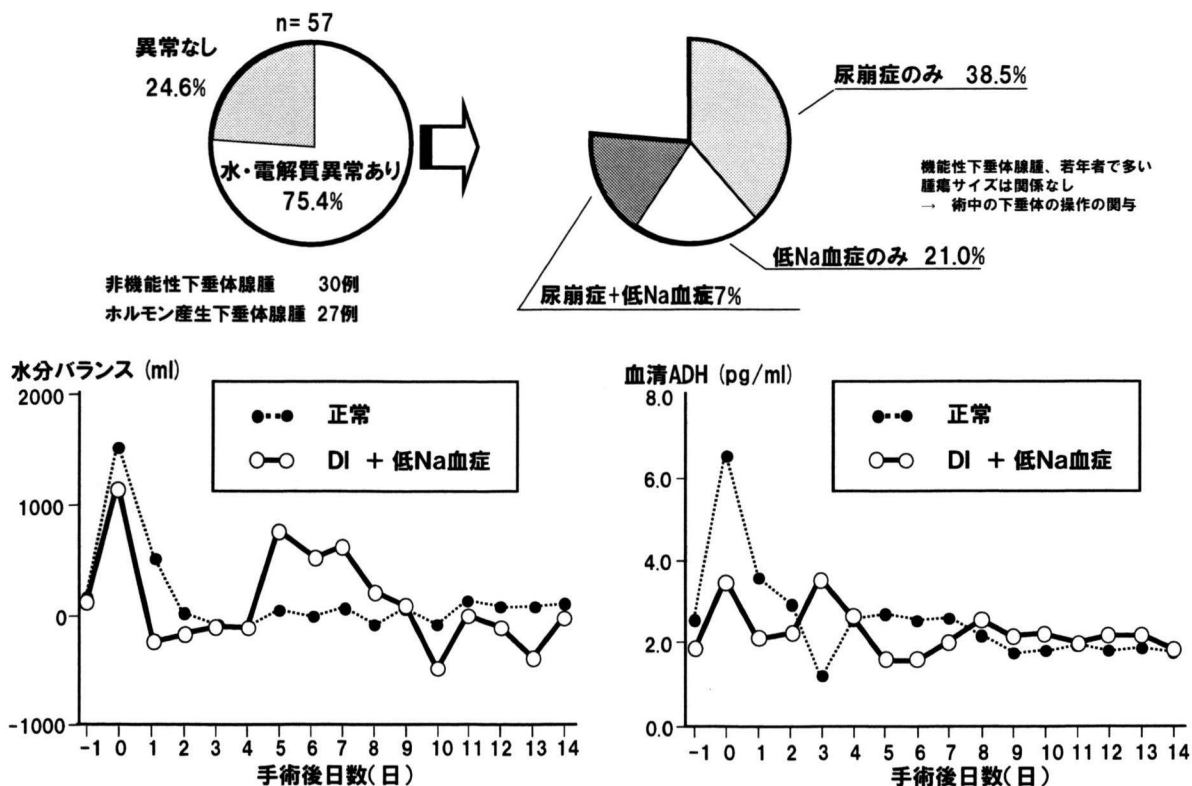


図9. 症例3の臨床経過表

Date (術後日数)	9/15	9/24 (1)	9/27 (4)	9/28 (5)	9/29 (6)	10/2 (9)	10/4 (11)	10/6 (13)	10/13 (20)	10/22 (29)	10/31 (38)	11/18 (56)
	9/23手術 ▼ 9/23~9/28 Hydrocortisone 9/24~9/26 DDAVP 9/29~10/6 4.5 6 3 NaCl (g/day) 9/29~10/4 700ml/day 飲水制限 10/28~ DDAVP 11/4退院 ▼											
Na (mEq/l)	141	145	144	139	134	120	146	141	145	146	141	142
K (mEq/l)	3.6	3.6	2.9	3.5	3.6	3.3	3.5	3.6	3.8	4.0	4.1	3.8
Cl (mEq/l)	104	108	102	102	98	87	105	103	108	109	104	106
尿酸 (mg/dl)	3.2	2.3				1.8		4.0				4.1
ADH (pg/ml)	1.1	1.9				1.9		1.5	0.6	0.6		
血漿浸透圧(mOsm/l)	285		289			240	286	282	292	293		
Cortisol (μg/dl)	18.1					12.1		8.1				9.8
尿中Na (mmol/l)	130					173		61				
尿中K (mmol/l)	35					22		13				
尿浸透圧(mOsm/l)	555					560		262	172	159		
尿量(ml/day)	720	2710	1876	800	950	1980	2450	2040	3080	3850	1780	

図10. 下垂体腺腫術後に認められる水・電解質異常 (文献1より引用改変)



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

研究代表者 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
研究分担者 有馬 寛 名古屋大学医学部附属病院糖尿病・内分泌内科

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(FNDI)においては生後数ヶ月から数年で緩徐進行性に尿崩症が発症するが、その詳細な機序は未だ明らかではない。我々が作成した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Cys98stopを導入したノックインマウス(FNDIマウス)は、尿崩症の進展とともに視床下部バゾプレシンニューロンの小胞体内に封入体が発現する特徴を有する。本マウスに高塩分(2% Na)食を6ヶ月間投与したところ、尿量が増加し、バゾプレシンニューロン内の封入体の増加を認めた。一方、バゾプレシンのアナログであるdDAVPの投与は多尿の進行を遅延させ、封入体を減少させた。今回の検討より、FNDIにおいてバゾプレシンニューロンを刺激するような状態ではニューロフィジンの変異に起因する異常蛋白の蓄積が生じ、多尿の進行が早まることが示唆された。

A. 研究目的

バゾプレシンは視床下部視索上核(SON)もしくは室傍核で産生される抗利尿ホルモンで、血漿浸透圧の上昇や循環血漿量の減少により産生および分泌が刺激される。バゾプレシンは水バランスにおいて重要な役割を担っており、その欠乏により多尿を特徴とする尿崩症を呈する。その中で家族性中枢性尿崩症(FNDI)は常染色体優性遺伝の稀な疾患で生後数ヶ月から数年で進行性に多尿を呈するようになる。多尿が進行する機序は未だ明らかにされていないが、我々が作成した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Cys98stopを導入したノックインマウス(FNDIマウス)は、尿崩症の進展とともに視床下部バゾプレシン細胞の小胞体内に封入体が発現する特徴を有する。このことから小胞体内にバゾプレシン前駆体に由来する凝集体が蓄積することがFNDIの病因である可能性

が示唆される。また、FNDIにおいては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り、環境因子がその発症に影響を与えている可能性も考えられる。本研究ではバゾプレシンニューロンの活性化がFNDIモデルマウスの尿崩症進行と封入体形成に関与するか否かを明らかにする目的でバゾプレシンの長時間作用型アナログであるdDAVPを用いバゾプレシン合成を抑制する実験と塩分過剰摂取によりバゾプレシン分泌を亢進させる実験を行い尿崩症の進展に与える影響を検討した。

B. 研究方法

《実験1》

1ヶ月齢FNDIマウスの雌を用いて、浸透圧ポンプにより30日間dDAVP(0.168 μ g/kg/day)または0.2M酢酸(コントロール)を皮下投与し尿量、飲水量を測定した後、浸透圧ポンプを取り除きさらに30日間観察した。別

のマウスを用いて同様にdDAVPを30日間投与の後、浸透圧ポンプを取り除くと同時に採血し、脳を取り出し視床下部視索上核(SON)のバゾプレシン産生細胞の封入体の長径および数を測定した。また、3ヶ月齢FNDIマウスの雌にdDAVP(0.168 μ g/kg)もしくは0.2M酢酸(コントロール)を単回皮下投与し24時間尿量を測定した。

《実験2》

1ヶ月齢FNDIマウスおよび野生型マウスの雄を用いて、それぞれ0.2%Na食、2.0%Na食を投与し、摂食量、体重、尿Na排泄量、尿量、飲水量、尿中バゾプレシン排泄量を7ヶ月齢まで測定した後、脳を取り出しSONのバゾプレシン産生細胞の封入体の長径および数を測定した。

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織換え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

《実験1》dDAVP持続投与によるバゾプレシン産生抑制

コントロール群で尿量と飲水量は経時的に増加したが、dDAVP投与群ではdDAVP投与期間を通じてコントロール群に比して有意に尿量と飲水量が減少していた。浸透圧ポンプ除去後にはdDAVP投与群でも尿量と飲水量の増加が見られたが44日目までコントロール群との有意差を認めた(Fig.1)。dDAVP単回投与では12時間後に尿量がコ

ントロール群に比して減少したが、24時間後には両群の尿量に有意差は認めなかった。dDAVP30日間投与群の血清ヘマトクリットはコントロール群に比し有意に低値を示した(Fig.2A)。一方、血清Na値は両群間で有意差を認めなかった(Fig.2B)。SONのバゾプレシンmRNA発現はdDAVP投与群でコントロール群に比し有意に低下がみられた(Fig.2C)。封入体の長径は両群間で有意差を認めなかったが(Fig.3D)、数はdDAVP投与群でコントロール群に比して有意な減少を認めた(Fig.3C)。

《実験2》高塩分食投与によるバゾプレシン産生亢進

昨年度の報告の通り、野生型、FNDIマウスともに0.2%Na食群と2%Na食群と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、FNDI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。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。一方、FNDI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。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、FNDI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ヶ月齢まで飲水量、尿量の経時的な増加を認めた。またFNDIマウスにおけるバゾプレシン産生細胞内の封入体は2.0%Na群で0.2%Na群に比し

て大きさ有意差を認めなかったが(Fig.4B)、数の増加を認めた(Fig.4A)。

D. 考察

実験1では臨床的に用いられる量のdDAVP投与を用い、血清Na値の変化は起こらなかったが、血清ヘマトクリットが低下したことからdDAVP投与によりFNDIマウスの脱水が改善されたことが示された。したがって、dDAVP投与群においてバゾプレシン前駆体産生量はコントロール群よりも少ないと考えられる。また、dDAVP投与群では尿量、飲水量とも投与終了後も継続して14日間減少が続いた。同量のdDAVP単回投与にて24時間以内に効果が消失することを確認しており、これはdDAVPの影響が残存したものではないことを示唆している。以上よりhydrationはFNDIの進行を抑制しうることが示唆された。

実験2では野生型マウスの高Na群では実験終了時まで継続して尿中バゾプレシンがコントロール群に比して増加しており高Na食がバゾプレシン産生刺激となること、FNDIマウスでは2.0%Na群の尿中AVP排泄量は0.2%Na群と比較して2ヶ月齢でのみ高く以降減少しており、それに伴い尿量は増加することを昨年度に既に確認しているが、今年度はバゾプレシン産生細胞内の封入体は2.0%Na群で0.2%Na群に比して増加することを見出した(Fig.4A)。

このように、dDAVP投与は封入体を減少させ、一方高Na食は封入体を増加させることから、封入体は変異バゾプレシン前駆体から構成されていると推測されるが、変異NP II抗体による免疫染色では染色されなかった。これはエピトープがマスクされているか分解されてしまったためではないかと考えら

れる。

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り主に調節されているが、塩分の摂取は視床下部に存在する浸透圧レセプターを介して口渇およびバゾプレシン分泌を促進すると考えられる。また口腔内や門脈にも浸透圧レセプターが存在し、バゾプレシンを分泌することが示唆されている(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)。一方、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ている。昨年度の報告通り、FNDI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FNDI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FNDI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、FNDI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FNDI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。さらに今年度の研究によりこうしたバゾプレシンの分泌の低下および多尿の進行がバゾプレシンニューロンの機能障害によるものである

ことが示唆された。

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

FNDIモデルマウスにおいてバゾプレシンニューロンの活性化は尿崩症を進行させる。また、バゾプレシン産生細胞内凝集体はバゾプレシン合成に関連して形成され、家族性中枢性尿崩症の多尿の進行に密接に関与している。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

1) Hiroi M, Morishita Y, Hayashi M, Ozaki N, Sugimura Y, Nagasaki H, Shiota A, Oiso Y, Arima H. Activation of vasopressin neurons leads to phenotype progression in a mouse model for familial neurohypophysial

diabetes insipidus. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. in press

2) Hayashi M, Arima H, Ozaki N, Morishita Y, Hiroi M, Ozaki N, Nagasaki H, Kinoshita N, Ueda M, Shiota A, Oiso Y. Progressive Polyuria without Vasopressin Neuron Loss in a Mouse Model for Familial Neurohypophysial Diabetes Insipidus. 2009 Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 296(5):R1641-9.

2. 学会発表

1) 森下啓明, 有馬 寛, 廣井麻依子, 林正幸, 大磯ユタカ. 家族性中枢性尿崩症モデルマウスに対するデスマプレシン持続投与は視床下部バゾプレシン産生細胞内の凝集体形成を抑制する. 第82回日本内分泌学会学術総会(2009年4月23-25日, 群馬)

2) 廣井麻依子, 有馬 寛, 森下啓明, 林正幸, 大磯ユタカ. 脱水負荷は家族性中枢性尿崩症モデルマウスにおいてバゾプレシンニューロンの細胞死を惹起する. 第36回日本神経内分泌学会学術集会(2009年9月4・5日, 北九州)

3) 森下啓明, 有馬 寛, 廣井麻依子, 林正幸, 梶村益久, 長崎 弘, 大磯ユタカ. 家族性中枢性尿崩症モデルマウスにおけるバゾプレシンmRNA発現調節機序の検討. 第36回日本神経内分泌学会学術集会(2009年9月4・5日, 北九州)

4) 森下啓明, 有馬 寛, 廣井麻依子, 林正幸, 尾崎信暁, 梶村益久, 長崎 弘, 大磯ユタカ. 家族性中枢性尿崩症におけるバゾプレシンmRNA発現調節機序-モデルマウスを用いた検討. 第20回バゾプレシン研究会(2010年1月9日, 東京)

5) Morishita Y, Arima H, Hiroi M,

Hayashi M, Oiso Y. Administration of desmopressin suppressed aggregate formation in vasopressin cells of a mouse model for familial neurohypophysial diabetes insipidus. 8th World Congress on Neurohypophysial Hormones (2009. September 4-8, Kitakyushu)

5) Hiroi M, Arima H, Morishita Y, Hayashi M, Oiso Y. Effects of high salt diet on

the progression of polyuria in a mouse model for familial neurohypophysial diabetes insipidus. 8th World Congress on Neurohypophysial Hormones (2009. September 4-8, Kitakyushu)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

Fig.1

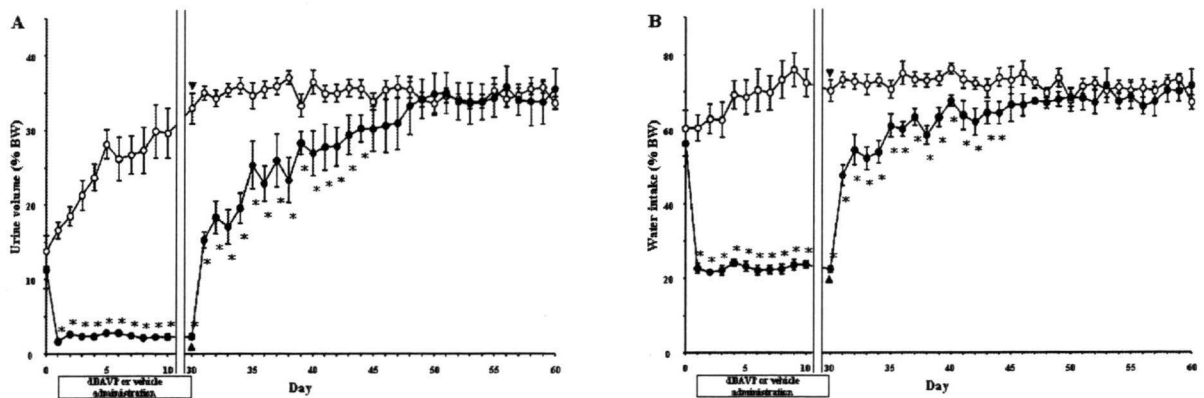


Fig.2

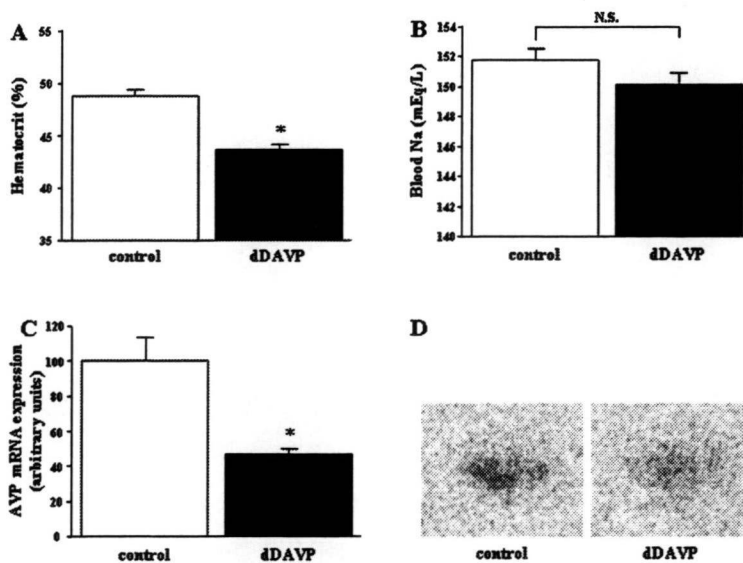


Fig.3

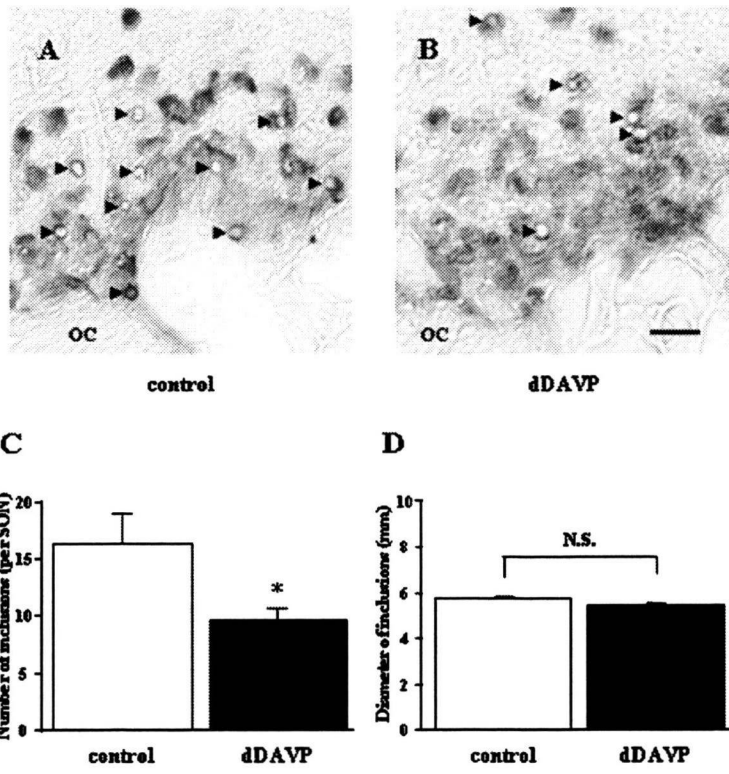
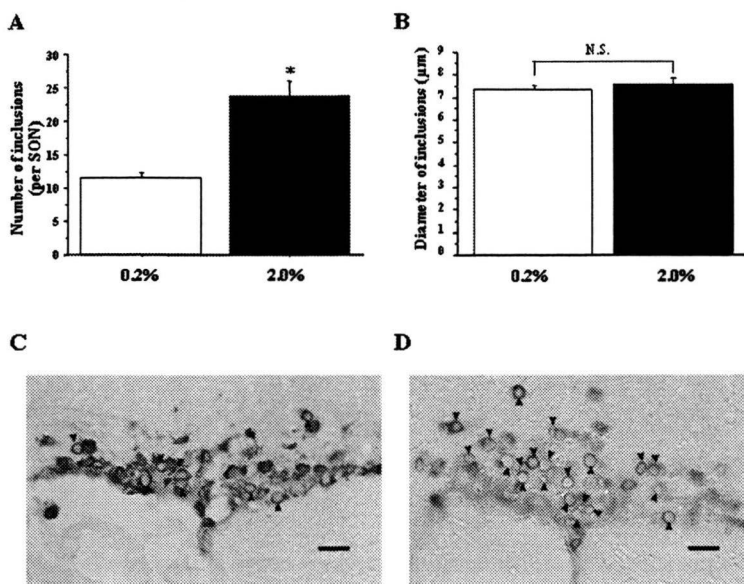


Fig.4



クッシング病モデルマウスにおける摂食行動異常の解析

研究分担者	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
	中山 修一	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
	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：クッシング症候群などグルココルチコイド過剰状態では過食を呈することが知られているが、その機序は明らかにされていない。今回我々はクッシング病のモデル動物であるCorticotropin-releasing hormone (CRH) 過剰発現マウス(CRH-Tg)を用いて、摂食行動および視床下部摂食関連神経ペプチド発現量を解析した。CRH-Tgでは野生型マウス(WT)と比較して血中コルチコステロン濃度の著明な上昇とともに、摂餌量(WT 3.9 ± 0.1 , CRH-Tg 5.1 ± 0.1 g/day, $p < 0.05$)および体脂肪量の有意な増加を認めた。In situ hybridization法による解析では、CRH-Tgで視床下部弓状核AgRP mRNA発現量が有意に増加していたが、NPY mRNA、POMC mRNA量は変化しなかった。以上の結果より、グルココルチコイド過剰による過食には、視床下部AgRPの増加が少なくとも部分的に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

クッシング症候群などの病態下でグルココルチコイド過剰状態が持続すると、過食や中心性肥満を来することが知られている。しかしその発症メカニズムについては、いくつか仮説が提唱されているものの、未だに不明な点が多い。

今回我々は、グルココルチコイドによる摂食異常の発症機序を解明する目的で、クッシング症候群の表現型を呈するCorticotropin-releasing hormone (CRH) 過剰発現マウスを用いて、摂食行動および視床下部摂食関連ペプチドの発現量を検討した。

B. 研究方法

6週および14週齢の雄性CRH過剰発現トランスジェニックマウス(CRH-Tg;Dr.

Stenzel-Poore, Oregon Health and Science Universityより分与)および野生型マウスを用いて、体重、精巣周囲脂肪重量および摂餌量を測定した。また、視床下部弓状核におけるNeuropeptide Y (NPY), Proopiomelanocortin (POMC), Agouti-related protein (AgRP) それぞれのmRNA発現量を、既報のin situ hybridization法により比較検討した。血中コルチコステロン濃度はRIAキット(MP Biomedicals)にて測定した。

C. 研究結果

6週齢のCRH-Tgはグルココルチコイド過剰による成長障害のため野生型と比較して小さく、低体重であったが、摂餌量は野生型と同程度であった(表1)。一方、14週齢のCRH-Tgは野生型と比較して摂餌量の増加を

認めた。また体重には有意な差を認めなかったが、興味深いことに脂肪量は著明に増加していた。CRH-Tgの血中コルチコステロン濃度は、いずれの週齢においても野生型と比較して有意に高値であった。

視床下部弓状核の摂食関連ペプチドmRNA発現は、予想に反してCRH-Tg(14週齢)でNPY mRNA発現量は有意に低下していた。POMC mRNA発現量には差を認めなかった。一方AgRP mRNA発現量は、いずれの週齢においてもCRH-Tgにおいて有意な増加が認められた(表2および図1-3)。

D. 考察

クッシング病のモデルマウスであるCRH-Tgでは、不安行動やストレス反応に関する詳細な解析結果は過去に報告されているが、糖脂質代謝や摂食・肥満に関する検討はほとんど行われていない。今回の我々の検討結果より、本マウスは成熟期に達すると過食や内臓脂肪蓄積による肥満など、ヒトのクッシング症候群と同様の表現型を示すことが明らかになった。

グルココルチコイドにより過食を呈する機序の一つとして、視床下部弓状核のNPY発現増加が指摘されている。しかしCRH-Tgではグルココルチコイド過剰状態にあるにもかかわらずNPY mRNA発現の低下を認めた。CRHの作用により視床下部NPYは減少するとの報告があり、今回認められたCRH-Tgにおける視床下部NPYの減少は、CRHの直接作用である可能性も考えられる。以上検討結果より、少なくとも本マウスにおける過食の要因としてNPYの関与は少ないことが示唆された。

POMCおよびその産物である α -MSHは摂食調節に重要な役割を果たし、特にレプチン

による摂食抑制に深く関与することが明らかにされている。グルココルチコイドにより下垂体POMCの発現が負の制御を受けることはよく知られているが、弓状核POMCの発現に対する作用に関しては、一定の見解は得られていない。今回の検討では、同部位のPOMC mRNA発現に変化は認められなかった。

AgRPは内因性メラノコルチン受容体アンタゴニストで、 α -MSHと競合的に作用することにより摂食促進作用を発揮する。今回の検討においてCRH-Tgで弓状核AgRPの増加が見られたことから、本マウスではAgRPの増加が過食をきたす要因の一つと考えられた。従来の報告では、NPYとAgRPは弓状核の同一ニューロンに存在し、両者の発現は共通の機序で調節を受ける可能性が示されている。しかし今回の検討では、NPYとAgRPは異なる方向に制御を受けており、興味深い結果と考えられた。実際、グルココルチコイドが弓状核AgRPを増加させるとする報告もあり、これがグルココルチコイドによる過食の一因とも考えられる。

今回の検討により、CRH-Tgにおける過食には、グルココルチコイド過剰による弓状核AgRPの増加が関与する可能性が示唆された。一方でAgRPの発現亢進がCRHの過剰により惹起された可能性も否定はできず、今後本マウスにおける副腎摘除の影響を検討する必要があると考えられる。

E. 結論

成熟CRH過剰発現マウスは過食と内臓脂肪の増加を来すことを明らかにした。また過食をきたす要因として、弓状核AgRPの増加が関与する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

2. 学会発表

- 1) 中山修一, 西山 充, 品原正幸, 岡崎瑞穂, 岩崎泰正, 寺田典生. クッシング病動物モデル (CRH過剰発現マウス) を用いたグルココルチコイによる摂食行動異常の解析. 第30回日本肥満学会学術総会 (浜松) 2009年
- 2) Mitsuru Nishiyama, Shuichi Nakayama, Masayuki Shinahara, Yasumasa Iwasaki,

Mizuho Okazaki, Takafumi Taguchi, Shinya Makino, Kozo Hashimoto, Mary P Stenzel-Poore and Yoshiø Terada. Corticotropin-releasing hormone (CRH) transgenic mice show hyperphagia with increased Agouti-related protein mRNA in the arcuate nucleus. Keystone Symposia: Neuronal control of appetite, metabolism and weight (Keystone, Colorado), 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 体重, 脂肪量, 摂食量および血中コルチコステロン濃度

	6-w old		14-w old	
	Wild type	CRH-Tg	Wild type	CRH-Tg
Body weight (g)	20.8±0.5	16.6±0.5*	29.0±0.6	30.0±2.1
Epididymal fat/ BW (%)	1.1±0.1	1.0±0.1	1.4±0.1	3.7±0.4*
Food intake (g/day)	4.3±0.3	4.7±0.2	3.9±0.1	5.1±0.3*
Plasma CORT (ng/ml)	14.5±4.7	99.5±33.3*	13.5±2.7	175.3±36.5*

*p<0.05 vs. wild type

表2. 弓状核におけるNPY, POMC, AgRP mRNA発現量

	6-w old		14-w old	
	Wild type	CRH-Tg	Wild type	CRH-Tg
NPY (dpm/mg)	2129±102	1886±118	1571±111	949±139*
POMC (dpm/mg)	322±41	261±59	190±61	313±89
AgRP (dpm/mg)	627±82	1052±48*	444±110	660±87*

*p<0.05 vs. wild type

図1. 弓状核におけるNPY mRNA発現 (Autoradiography)

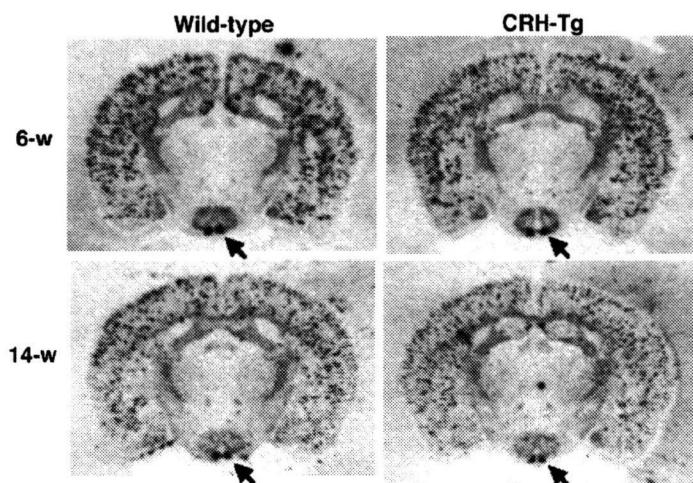


図2. 弓状核におけるPOMC mRNA発現 (Autoradiography)

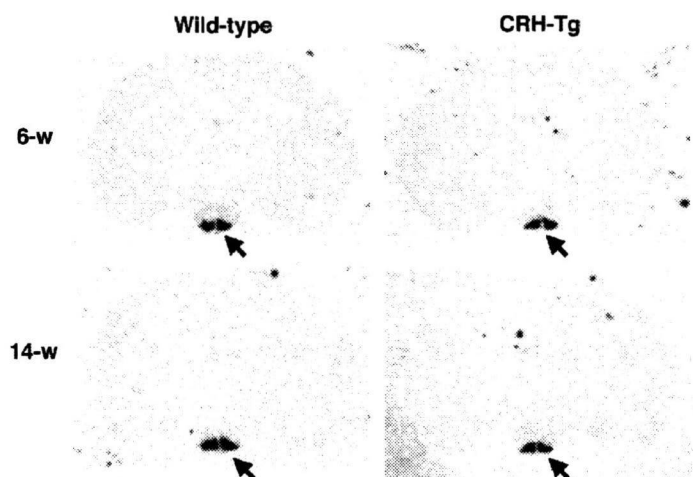
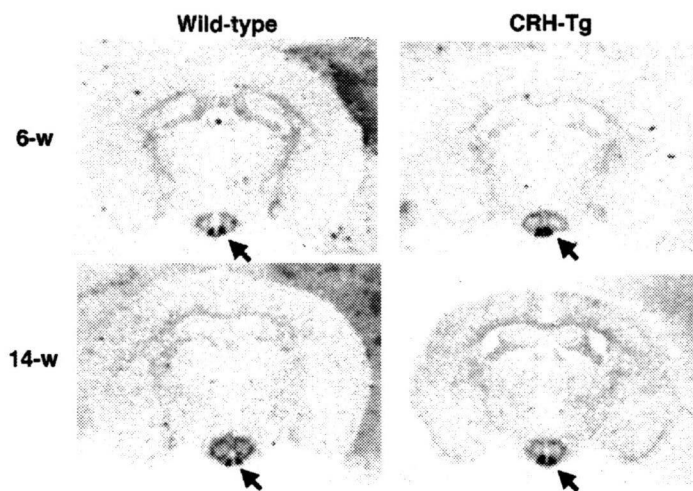


図3. 弓状核におけるAgRP mRNA発現 (Autoradiography)



レチノイドX受容体(RXR)がACTH分泌・POMC 遺伝子発現に及ぼす影響に関する検討

研究分担者	菅原 明	東北大学大学院医学系研究科生物化学 東北大学大学院医学系研究科先端再生生命科学
研究協力者	宇留野 晃	東北大学大学院医学系研究科腎・高血圧・内分泌学 東北大学大学院医学系研究科先端再生生命科学
	松田 謙	東北大学大学院医学系研究科腎・高血圧・内分泌学
	箱田 明子	東北大学大学院医学系研究科小児病態学
	工藤 正孝	東北大学大学院医学系研究科腎・高血圧・内分泌学
	岩崎 泰正	高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科学
	伊藤 貞嘉	東北大学大学院医学系研究科腎・高血圧・内分泌学

研究要旨:【目的】レチノイン酸(RA)は、そのクッシング病治療に対する有効性が複数報告されているが、我々は昨年度の本会議においてRA受容体がPOMC遺伝子転写活性をむしろ増加させることを報告した。しかしながら、RAはレチノイドX受容体(RXR)も強力に活性化することから、RXRによるPOMC発現調節を検討した。【成績】マウス下垂体由来ACTH産生細胞であるAtT20細胞において、合成RXRアゴニストHX630はAtT20細胞のPOMC mRNA発現およびその遺伝子転写活性を抑制し、AtT20細胞から培養上清へのACTH分泌を抑制した。さらに、RXR α の過剰発現は、HX630によるPOMC遺伝子転写抑制作用を増強した。RXR α の持続性活性体であるRXR α F318A変異体の過剰発現は、リガンド非依存性にPOMC遺伝子転写活性を強力に抑制した。【結論】RXR α はPOMC遺伝子転写活性およびACTH分泌を抑制した。

A. 研究目的

レチノイン酸(RA)は核内受容体を介して生体内で多彩な作用を発揮する生理活性物質であり、その投与がクッシング病の治療に有効である可能性が近年報告されている。しかしながら、我々は昨年度の本会議において、RA受容体(RAR)がPOMC遺伝子発現をむしろ増加させることを報告した。全トランス型RA(ATRA)はRARに結合することに加え、生体内でより安定な9-シス型RA(9cRA)に変換された後に、RARのみならずレチノイドX受容体(RXR)にも結合し、この結果RARおよびRXR両者を活性化することが知

られている。今回我々はRXRに注目し、そのPOMC遺伝子発現に及ぼす影響に関して検討を行った。

B. 研究方法

細胞はマウス下垂体由来ACTH産生細胞であるAtT20細胞を、薬剤は合成RXRアゴニストであるHX630を使用した。同細胞におけるPOMC mRNA発現はリアルタイムPCR法にて解析した。POMC遺伝子転写活性は、ルシフェラーゼ遺伝子上流にラットPOMCプロモーター(-703/+58)を組み込んだレポータープラスミドを同細胞へトランス

フェクションした後のルシフェラーゼアッセイにて検討した。同細胞から培地へのACTH分泌はELISA法にて測定した。

C. 研究結果

合成レチノイドHX630の薬理学的特性を明らかにする目的で、GAL4-とRXR α リガンド結合ドメインの融合タンパクによるGAL4-UASシステムを用いてRXR α 活性を検討した。HX630は、AtT20においてRXR α を濃度依存性に活性化した一方で、RAR α は全く活性化を受けなかった(data not shown)。AtT20細胞におけるレチノイド受容体の発現を検討したところ、RXR α 、 β およびRAR α 、 γ の発現が認められたのみならず、HX630刺激によりRAR β 、 γ の発現増加が認められた(data not shown)。図1Aに示される様に、AtT20細胞におけるPOMC mRNA発現は、HX630投与(4日間)により濃度依存性に抑制された。同様に、CRH刺激下(2時間)でのACTH分泌増加は、HX630の前処置(4日間)により抑制された(図1B)。POMC遺伝子転写活性をルシフェラーゼアッセイにて検討したところ、低濃度HX630($\sim 1 \mu\text{M}$)投与にて転写活性は若干増加したものの、高濃度HX630(10 μM)投与にて著明な転写活性の抑制が認められ(図2 Mock)、さらにRXR α の過剰発現により、HX630による濃度依存的な転写抑制も認められた(図2 mRXR α vector)。RXR α 過剰発現による転写抑制は用量依存性であった(data not shown)。1 μM のHX630による24時間刺激では、POMC遺伝子転写活性は若干の増加を示したが、RXR α 過剰発現下でのHX630刺激では転写活性は抑制された(data not shown)。HX630刺激がAtT20 cell viabilityに与える影響をWST-8により

検討したところ、高濃度HX630による96時間刺激にても、viabilityの変化は認められなかった(data not shown)。次に我々は、RXR α の第318アミノ残基をフェニルアラニンからアラニンへと置換したRXR α 持続性活性体(F318A変異体)の発現vector(図3)を作製し、その効果を検討した。RXR α F318A変異体は、RXR応答領域であるdirect repeat 1配列を強く活性化したが、HX630によるリガンド結合ドメインの活性化は認められず(data not shown)、RXR α F318A変異体はAtT20細胞においてリガンド非依存性の持続性活性を示すことが明らかとなった。RXR α F318A変異体の過剰発現は、低用量から強力にPOMC遺伝子転写活性を抑制した(図4)。次に、野生型RXR α とRXR α F318A変異体との間で転写抑制作用の比較を行った。図5に示される様に、野生型RXR α 過剰発現によるPOMC遺伝子転写抑制はHX630添加によりさらに増強したが、RXR α F318A変異体の過剰発現にてより強い転写抑制が認められた。HX630の添加は、RXR α F318A変異体による転写抑制に影響を及ぼさなかった。

D. 考察

HX630は、高濃度でPOMC遺伝子転写活性ならびにACTH分泌を抑制したが、より低濃度のHX630がPOMC遺伝子転写活性を抑制するためには、RXR α の過剰発現が必要であった。この様に、POMC遺伝子転写抑制のためには充分量のRXR発現が必要であることから、各症例におけるRXR発現量により効果の差異が生じる可能性も推定された。さらに、高用量のHX630全身投与は、安全性に問題が生じる可能性も否定出来ないことから、薬物療法のみならずRXRによる

遺伝子治療を視野に入れた検討が必要であると考えられた。リガンド非依存性の持続性活性を示すRXR α F318A変異体を用いた検討にて、POMC遺伝子転写活性が強く抑制されたことから、同変異体がクッシング病の新規治療法につながる可能性が期待される。

E. 結論

RXR α はPOMC遺伝子転写活性およびACTH分泌を抑制した。

F. 研究発表

1. 論文発表

英文雑誌 (2009～2010)

- 1) Yamauchi A, Takahashi I, Takasawa S, Nata K, Noguchi N, Ikeda T, Yoshikawa T, Shervani NJ, Suzuki I, Uruno A, Unno M, Okamoto H, Sugawara A. Thiazolidinediones inhibit REG I α gene transcription in gastrointestinal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 379: 743-748.
- 2) Takahashi I, Noguchi N, Nata K, Yamada S, Kaneiwa T, Mizumoto S, Ikeda T, Sugihara K, Asano M, Yoshikawa T, Yamauchi A, Shervani NJ, Uruno A, Kato I, Unno M, Sugahara K, Takasawa S, Okamoto H, Sugawara A. Important role of heparan sulfate in the morphogenesis, β -cell proliferation, and insulin secretion of mouse pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 383: 113-118.
- 3) Nakamura Y, Suzuki T, Sugawara A, Arai Y, Sasano H. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) in human prostate carcinoma. *Pathol Int.* 2009; 59: 288-293.

- 4) Kaur S, Kumar TR, Uruno A, Sugawara A, Jayakumar K, Kartha CC. Genetic engineering with endothelial nitric oxide synthase improves functional properties of endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease: an in vitro study. *Basic Res Cardiol.* 2009; 104: 739-749.
- 5) Sato W, Hoshi K, Kawakami J, Sato K, Sugawara A, Saito Y, Yoshida K. Assisting the diagnosis of Graves' hyperthyroidism with Bayesian-type and SOM-type neural networks by making use of a set of three routine tests and their correlation with free T4. *Biomed Pharmacother.* 2010; 64: 7-15.

和文雑誌・著書 (2009～2010)

- 1) 菅原 明, 宮田正弘, 佐藤 博, 伊藤貞嘉: 糖尿病性腎症の病理組織像を示した境界型 (IGT) の一例. *日本内分泌学会雑誌* 85 (Suppl): 166-167, 2009
- 2) 菅原 明, 村上 治, 佐藤文俊, 宇留野晃, 森本 玲, 工藤正孝, 伊藤貞嘉: クッシング病「放射線治療」. 平田結喜緒, 成瀬光栄 編: クッシング症候群診療マニュアル. Pp.99-101, 診断と治療社, 2009
- 3) 宇留野晃, 菅原 明, 岩崎泰正, 伊藤貞嘉: レチノイン酸受容体 α がACTH分泌・POMC遺伝子発現に及ぼす影響に関する検討. 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20年度 総括・分担研究報告書: 38-42, 2009

2. 学会発表

国際学会 (2009～2010)

- 1) Yoshikawa T, Ikeda T, Sakai K, Noguchi N, Takahashi I, Shervani NJ, Uruno A, Yamauchi A, Sakai E, Onogawa T, Okabe

- M, Ando T, Kinouchi M, Miura K, Unno M, Emura T, Fujiwara M, Takasawa S, Okamoto H, Sugawara A. Predominant role of REG I α among the REG gene family in the proliferation of human colorectal adenocarcinoma. American Association for Cancer Research 100th Annual Meeting 2009. Denver 4/22/2009
- 2) Kaneiwa T, Yamada S, Sugahara K, Takahashi I, Noguchi N, Nata K, Okamoto H, Sugawara A. Structural characterization of heparan sulfate in conventional and conditional Extl3-deficient mice. Hokkaido University-Mahidol University Joint Symposium. 札幌 5/12/2009
- 3) Kudo M, Sugawara A, Saito A, Satoh F, Uruno A, Ito S. Prostacyclin analogs rapidly induce nitric oxide production through endothelial nitric oxide synthase phosphorylation in vascular endothelial cells. 10th International Symposium on Mechanisms of Vasodilatation. 松島 6/2/2009 (J Vasc Res. 2009; 46 Suppl 1: 157-157.)
- 4) Uruno A, Matsuda K, Noguchi N, Yoshikawa T, Kudo M, Satoh F, Rainey WE, Ito S, Okamoto H, Sugawara A. PPAR γ suppresses angiotensin II- and potassium-induced CYP11B2 expression and aldosterone production in adrenocortical carcinoma H295 cells. The 35th International Aldosterone Conference. Washington, DC 6/8-9/2009
- 5) Uruno A, Noguchi N, Nata K, Yoshikawa T, Takahashi I, Shervani NJ, Chikamatsu Y, Kagechika H, Harigae H, Ito S, Okamoto H, Sugawara A. All-trans retinoic acid and a novel synthetic retinoid tamibarotene (Am80) differentially regulate CD38 expression in human leukemia HL-60 cells: possible involvement of protein kinase C- δ . The Endocrine Society 91st Annual Meeting. Washington, DC 6/10-13/2009
- 6) Uruno A, Sugawara A, Iwasaki Y, Saito A, Kudo M, Ito S. Retinoic acid receptor- α positively regulates ACTH secretion and POMC gene expression in AtT20 corticotroph cells. The Endocrine Society 91st Annual Meeting. Washington, DC 6/10-13/2009
- 7) Shervani NJ, Noguchi N, Ikeda T, Takahashi I, Yoshikawa T, Uruno A, Nata K, Takasawa S, Okamoto H, Sugawara A. Autoantibodies to REG family proteins in Japanese diabetes patients. 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes. Vienna 9/29-10/2/2009 (Diabetologia. 2009; 52 Suppl 1: S114-S114.)
- 8) Shervani NJ, Nata K, Noguchi N, Takahashi I, Ikeda T, Yamauchi A, Yoshikawa T, Uruno A, Takasawa S, Okamoto H, Sugawara A. Autoimmunity against REG family antigens in Japanese diabetes patients. The 20th World Diabetes Congress. Montreal 10/18-22/2009
- 国内学会(2009~2010)
- 1) 宇留野晃, 菅原 明, 岩崎泰正, 伊藤貞嘉: レチノイン酸受容体 α がACTH分泌・POMC遺伝子発現に及ぼす影響に関する検討. 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20年度班会議 2009年1月9日 東京
- 2) 菅原 明, 中山恵輔, 佐藤 博, 伊藤貞嘉: 腎血管性高血圧が当初疑われたSLEの一

- 例. 第19回臨床内分泌代謝Update 2009年3月13~14日 東京
- 3) 菅原 明, 宮田正弘, 佐藤 博, 伊藤貞嘉: 糖尿病性腎症の病理組織像を示した境界型(IGT)の一例. 第19回臨床内分泌代謝Update 2009年3月13~14日 東京
 - 4) 菅原 明, 佐藤 博, 伊藤貞嘉: 高カルシウム血症を示した2症例. 第19回臨床内分泌代謝Update 2009年3月13~14日 東京
 - 5) 宇留野晃, 松田 謙, 野口直哉, 吉川雄朗, 工藤正孝, 佐藤文俊, 伊藤貞嘉, 岡本 宏, 菅原 明: チアゾリジン誘導体はPPAR γ およびCa²⁺/カルモジュリン依存性キナーゼ(CaMK)を介して副腎皮質癌H295R細胞におけるアルドステロン分泌を抑制する. 第20回間脳・下垂体・副腎系研究会 2009年3月28日 東京
 - 6) 宇留野晃, 菅原 明, 松田 謙, 岩崎泰正, 斉藤明子, 工藤正孝, 伊藤貞嘉: レチノイド受容体によるPOMC転写調節機構. 第20回間脳・下垂体・副腎系研究会 2009年3月28日 東京
 - 7) 宇留野晃, 松田 謙, 野口直哉, 吉川雄朗, 工藤正孝, 佐藤文俊, 伊藤貞嘉, 岡本 宏, 菅原 明: チアゾリジン誘導体はPPAR γ およびCa²⁺/カルモジュリン依存性キナーゼ(CaMK)を介して副腎皮質癌H295R細胞におけるアルドステロン分泌を抑制する. 第63回東北内分泌研究会 2009年4月4日 仙台
 - 8) 宇留野晃, 菅原 明, 松田 謙, 岩崎泰正, 斉藤明子, 工藤正孝, 伊藤貞嘉: レチノイド受容体によるPOMC転写調節機構. 第63回東北内分泌研究会 2009年4月4日 仙台
 - 9) 菅原 明, 宇留野晃, 斉藤明子, 工藤正孝, 岡本 宏, 伊藤貞嘉: 血管新生に関するスタチン系薬剤とレチノイドの新知見. 第82回日本内分泌学会学術総会(シンポジウム) 2009年4月23日 前橋
 - 10) 佐藤文俊, 森本 玲, 工藤正孝, 宇留野晃, 菅原 明, 村上 治, 伊藤貞嘉: デキサメサゾン抑制試験でのサブクリニカルクッシング症候群診断基準~ms/msデータ100症例で本邦の汎用測定キットの低濃度コルチゾール測定の信頼性を検証する~. 第82回日本内分泌学会学術総会(シンポジウム) 2009年4月24日 前橋
 - 11) 工藤正孝, 佐藤文俊, 森本 玲, 松田 謙, 宇留野晃, 菅原 明, 村上 治, 伊藤貞嘉: 過去八年間の当科におけるCushing病・Cushing症候群の治療成績の検討. 第82回日本内分泌学会学術総会 2009年4月23~25日 前橋
 - 12) 宇留野晃, 菅原 明, 岩崎泰正, 斉藤明子, 工藤正孝, 伊藤貞嘉: レチノイン酸受容体 α はACTH分泌およびPOMC遺伝子発現の正の調節因子である. 第82回日本内分泌学会学術総会 2009年4月23~25日 前橋
 - 13) 宇留野晃, 菅原 明, 工藤正孝, 斉藤明子, 伊藤貞嘉: シロスタゾールの血管内皮細胞における遺伝子発現に及ぼす影響. 第82回日本内分泌学会学術総会 2009年4月23~25日 前橋
 - 14) 宇留野晃, 菅原 明, 松田 謙, 箱田明子, 工藤正孝, 岩崎泰正, 伊藤貞嘉: レチノイドX受容体(RXR)がACTH分泌・POMC遺伝子発現に及ぼす影響に関する検討. 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に関する調査研究班平成21年度班会議 2010年1月8日 東京

15) 須田俊宏, 崎原 哲, 平田結喜緒, 寺本 明, 柳瀬敏彦, 大関武彦, 沖 隆, 岩崎泰正, 菅原 明: クッシング病およびサブクリニカルクッシング病診断基準

の改訂について。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に関する調査研究班平成21年度班会議 2010年1月8日 東京

図 1. RXR アゴニスト HX630 による POMC 発現・ACTH 分泌抑制

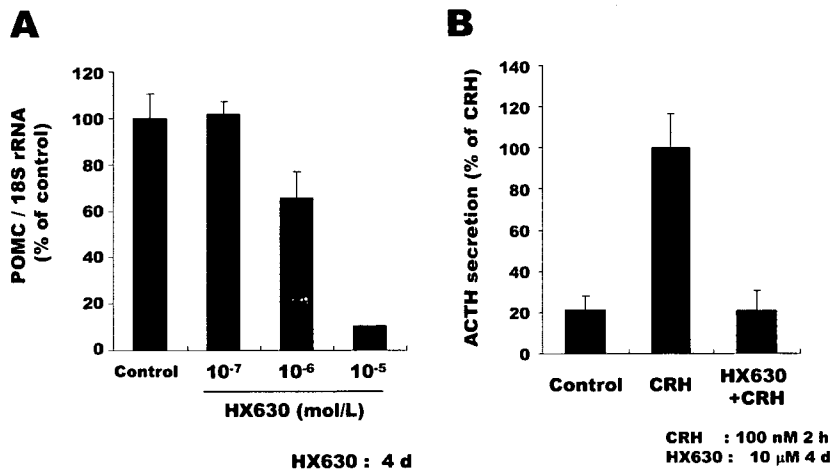


図 2. HX630 の POMC 遺伝子転写抑制の RXR α 過剰発現による増強

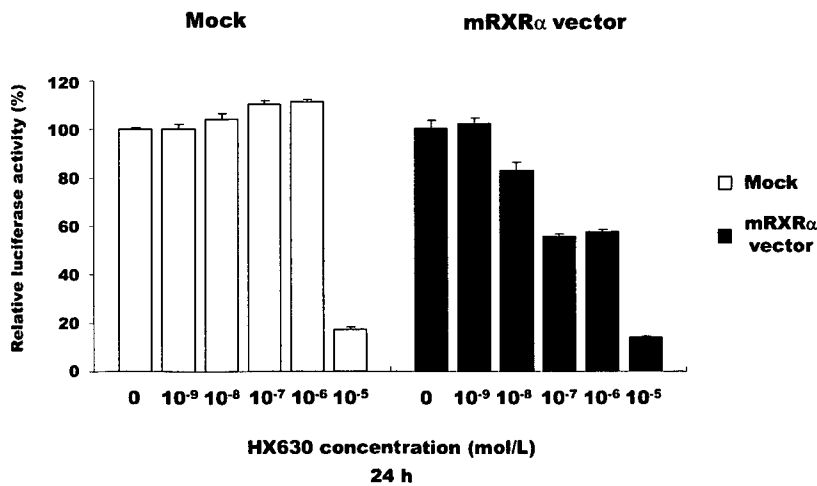


図 3. RXR α 持続性活性体の構造

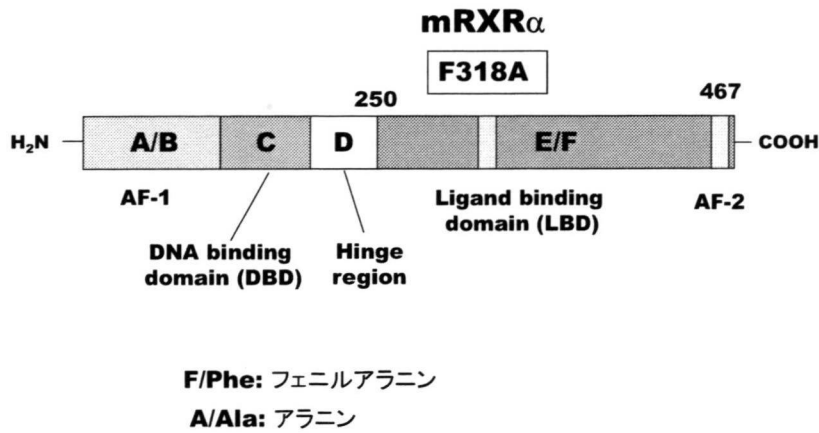


図 4. RXR α F318A変異体によるPOMC遺伝子転写抑制

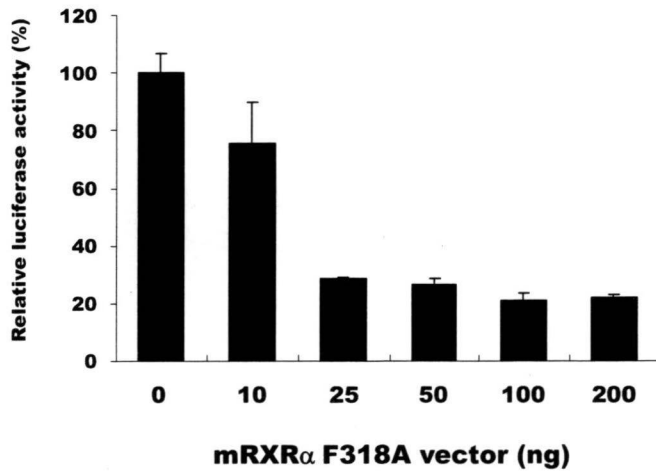
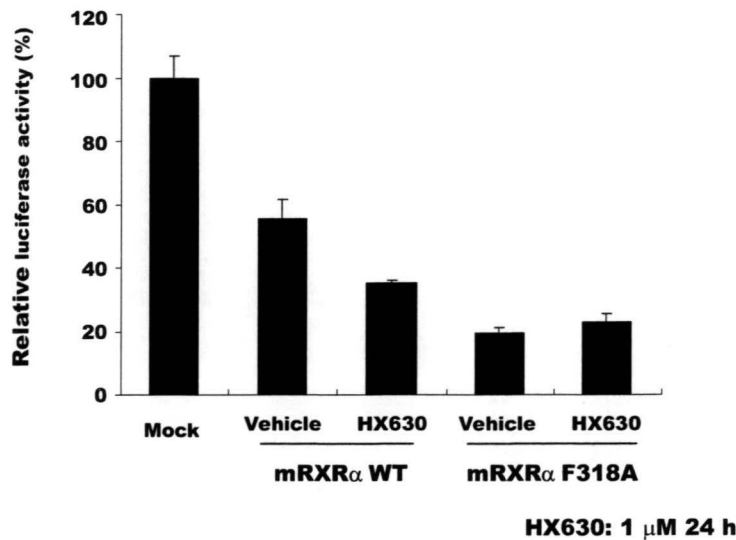


図 5. 野生型RXR α とRXR α F318A変異体によるPOMC転写抑制



クッシング病およびサブクリニカルクッシング病診断基準 の改訂について

研究分担者	須田 俊宏	弘前大学内分泌代謝感染症内科
研究協力者	崎原 哲	弘前大学内分泌代謝感染症内科
	平田結喜緒	東京医科歯科大学内分泌代謝内科
	寺本 明	日本医科大学脳神経外科
	柳瀬 敏彦	福岡大学内分泌・糖尿病内科
	大関 武彦	浜松大学小児科
	沖 隆	浜松医科大学第二内科
	岩崎 泰正	高知大学内分泌代謝腎臓内科
	菅原 明	東北大学大学院先端再生生命科学

研究要旨:クッシング病およびサブクリニカルクッシング病の、新たな診断の手引き(案)を提示する。2007年に改定・提示された同診断の手引きを基に、日本人症例のデータから得られたエビデンスを根拠として改定を加えた。

クッシング病については、スクリーニング検査において、17-OHCS測定的项目を削除し、新たに深夜唾液中コルチゾール測定による基準を加えた(各施設における正常者平均値の1.5倍以上を異常とした)。なお、深夜血中および唾液中コルチゾール値は複数日において検査を行い判断することを必要とし、血中コルチゾールはRIAで測定した値を用いることとした。

サブクリニカルクッシング病については、まず名称を従来のプレクリニカルから変更した。また、スクリーニング検査において、深夜睡眠時の血中コルチゾール値のカットオフ値を、2.5 µg/dlから5 µg/dlに変更した。さらにクッシング病と同様、深夜唾液中コルチゾール測定による基準を加えた。

A. 研究目的

ACTH-コルチゾール分泌は日内変動を有し、ストレス暴露にも強く影響を受けるホルモンである。単回の検査だけでは、その分泌状態を把握することはできないため、ACTH-コルチゾール分泌異常を示すクッシング病の診断法は複雑である。このため近年まで、本疾患の診断、特に軽微な症例の判断は各施設の医師に委ねられた状態で、しばしば高血圧や糖尿病といったcommon diseaseの中で見落とされがちだった。2003年に厚

労省の間脳下垂体機能障害調査研究班より、はじめて本邦におけるクッシング病の診断の手引きが提示された。2007年にはその一部が改定され、さらに、特徴的な身体所見を欠くプレクリニカルクッシング病の診断の手引きも提示された。これらの手引きにより、クッシング病/プレクリニカルクッシング病は、どの施設でも均しく診断され得る疾患となった。しかし、実際にこの診断の手引きが用いられるようになって3年が経過した現在、臨床上、幾つかの問題も生じている。これらの

点について改定を加え、また、各検査の判定基準については、日本人のクッシング病症例のデータから得られたエビデンスを根拠として、今回新たな診断の手引き(案)を提示する。

B. 研究結果

1) クッシング病の診断手引き

新たな診断の手引き(案)は、2007年に改訂・提示されたクッシング病の診断の手引きを基に改訂を加えた(表1)。主な変更点は、検査技術の発達により検査項目や判定基準を見直したことによるものが多い。また今回は、各検査の判定基準について、根拠となったエビデンスを参考文献に加えた。

1.の主症候に変更点はない。

2.の検査所見には、従来、(1)血中 ACTH とコルチゾール(同時測定)が高値～正常を示すことと、(2)尿中遊離コルチゾールまたは 17-OHCS 値が高値～正常を示すことが示されていた。このうち(1)は必須である。新たな診断の手引き(案)では、血中コルチゾールの値をRIAで測定したものに限定し、注釈に加えた。現在、血中コルチゾールの測定にはRIA、EIA、LC-MS/MSなど多くの方法があり、各方法により測定値が異なることが知られている。このばらつきは、クッシング病やサブクリニカルクッシング病と健常者を鑑別するのに必要な、デキサメサゾン抑制試験における低濃度血中コルチゾールの測定値付近で顕著である。このため、本来は測定方法を最も正確であるといわれているLC-MS/MS法に統一する必要がある。しかし本方法は多くの検体を同時に検査することには不適で、臨床の現場では現実的でない。一方、比較的LC-MS/MS法の測定値に近く、かつ効率よく多くの検体を扱えるのはRIAであるため、ここではRIAで測定したコルチゾール

値を用いることにした。しかし昨今は測定法が自動化による非RIA法になりつつあり、今後は非RIA法による測定値のばらつきを少なくするため、標準物質を定め、各測定値をLC-MS/MS法に近づけるための換算式を設定する必要がある。(2)の17-OHCSは、現在本邦で測定することができなくなったので、今回はこの検査項目を削除した。

3.のスクリーニング検査は、クッシング病の診断において極めて重要な部分であるため、感度・特異度とも高い値を示す方法・基準値を検討し採用した^{1)~3)}。(1)一晩少量デキサメサゾン抑制試験の方法/基準は従来の手引きと同じである。前日深夜に0.5 mgのデキサメサゾンを服用した翌朝の血中コルチゾール値が5 µg/dl以上を示したとき、異常とみなす。我々はこの基準によりACTH依存性クッシング症候群(クッシング病、サブクリニカルクッシング病、異所性ACTH産生腫瘍を含む)を感度94.8%、特異度100%で診断できることを明らかにした¹⁾。副腎性クッシング症候群の診断には1 mg服用後の血中コルチゾール値が採用されているが、Okiらの報告では0.5 mgを服用する方法の方が高い感度を示したことから(0.5 mg法では94.8%、1 mg法では89.4%)、この量を採用した(図1、表2)²⁾。(2)の血中コルチゾール日内変動については、おそらく採血時のストレス暴露の影響から、深夜血中コルチゾール値の再現性が不良であることが示されたため(図2)、複数日において検査を行い判断することを必要とした³⁾。異常と判断する基準値は5 µg/dl以上で、これまでと変わらない。(3)のDDAVP試験の方法/基準は従来通りである。『ACTHのピーク値が前値の1.5倍以上』をカットオフ値にすると、86%の感度で診断できる(図3)¹⁾。さらに(4)として、深夜唾