

液中コルチゾール測定による判定基準を加えた。唾液中コルチゾール測定は、検体採取が簡便で、その値は血中遊離コルチゾール値を良好に反映する。近年、クッシング症候群の診断における高い有用性が報告され、2008年に発表された米国のクッシング症候群の診断ガイドラインにも採用された⁴⁾。昨年の本研究班会議においても、本邦でのクッシング症候群の診断に利用するための判定基準について提案された。これらを基に、本邦の手引きにも深夜唾液中コルチゾールの測定を加えることとした。現在のところ、唾液中コルチゾールには多くの測定キットが存在し、キットごとに正常範囲が異なり、その差は幅広い。絶対値による判断基準は設定しにくいいため、本邦では、各施設における健常者の平均値の1.5倍以上を異常とする基準を設けた。この基準を用いると、クッシング病を感度96%、特異度88%、サブクリニカルクッシング病を感度100%、特異度88%で診断できる(図4)³⁾。また、唾液中コルチゾールも血液中コルチゾールと同様、検体採取時の環境により大きな影響を受けるため、複数日に測定する必要性を注釈に加えた。

4.の確定診断については、方法/基準については従来通りである。ただ、(2)大量デキサメサゾン抑制試験についての注釈(注7)から、尿中17-OHCS測定が削除された。理由は前述の通りである。また(3)下垂体MRIについて、従来の1.5テスラMRIでは病変を指摘できるのは60-80%に限られていたので、病変を発見できない場合は3テスラMRIを推奨することを注釈に加えた。

2) サブクリニカルクッシング病の診断の手引き

サブクリニカルクッシング病についても、

クッシング病と同様、2007年に提示された診断の手引きに改訂が加えられた(表2)。

まず名称であるが、以前はプレクリニカルクッシング病と呼ばれた。それはこのような不顕性のクッシング症候群が最初は副腎偶発種から見つかり、将来顕性クッシング症候群になるだろうと予測し、副腎性プレクリニカルクッシング症候群と命名された。また同様な疾患群が下垂体性クッシング症候群にも見られることから、このような不顕性のクッシング病をプレクリニカルクッシング病と呼ぶようになった。しかしその後副腎性プレクリニカルクッシング症候群の予後を調べてみると、顕性クッシング症候群に移行する例は少ないことがわかった。そこで今回副腎班と協議の上、潜在性で顕性に移行するかどうかはわからないという意味でのサブクリニカルクッシング症候群と名称を変更することになった。そのため下垂体性の場合はサブクリニカルクッシング病ということになった。

Iの「本症の存在を疑う場合(契機)」については、従来と変わらないが、今回はクッシング病に特異的な徴候を記載した。

IIのスクリーニング検査は、クッシング病と同様、本症の診断においてきわめて重要な部分であり、最近のエビデンスを基に、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)の一晚0.5 mg デキサメサゾン抑制試験の判定基準は、3 µg/dl以上で異常とした。サブクリニカルクッシング病は特徴的な身体所見を欠くため、疾患の見逃しを避けるためには高い感度のスクリーニング検査を要する。Okiらの報告では、一晚0.5 mg デキサメサゾン抑制試験の感度は、カットオフを5 µg/dlにすると94.8%に留まるが、3 µg/dlにすると99.1%まで高くなる²⁾。さらに前回の全国調査で3-5 µg/dlの領域の症例

ではクッシング病の特徴的な徴候が少なかったことから、今回本疾患での基準は3 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 以上とした。(2)の深夜睡眠時の血中コルチゾール値は5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 以上で異常とした。ここでもクッシング病と同じく、複数日での測定を推奨した。2007年に提示された診断の手引きでは、高い感度を求めるためカットオフ値を2.5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ まで下げた。しかし実際にこの基準を当てはめると、疑陽性率が高くスクリーニング検査に適さないとの意見が多かった。カットオフ値について再検討したところ、3 $\mu\text{g}/\text{dl}$ にしても感度は変わらない(特異度は高まる)ことが示された。一方5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ にするとサブクリニカルと顕性クッシング病の間には差がないが、健常者との鑑別に感度、特異度が高いことがわかりクッシング病と同じ値を採用した。(3)のDDAVP試験については従来と変わらない。(4)に深夜唾液中コルチゾール測定による基準を加えた。前述の通り深夜唾液中コルチゾール値は、各施設における健常者の平均値の1.5倍以上を異常とすると、サブクリニカルクッシング病を感度100%、特異度88%で診断できる(図4)。以上4つのスクリーニング検査のうち、(1)の一晩少量デキサメサゾン抑制試験の基準を満たし、かつ(2)-(4)、すなわち深夜睡眠時血中コルチゾール値、DDAVP試験、深夜唾液中コルチゾール値、いずれか一つの基準を満たしたとき、ACTHの自律的分泌に依存するコルチゾール分泌異常と判断することとした。これ以外に深夜の随時尿中コルチゾール値についても検討したが、健常者とサブクリニカルまたは顕性クッシング病症例との間に有為なカットオフ値が設定できなかった。

IIIの確定診断、つまり下垂体性と異所性ACTH症候群の鑑別に必要な検査/基準は2007年に提示された手引きと同じである。

C. 結論

最近のエビデンスを基に新たな検査項目を加え、また判定基準を一部変更し、クッシング病/サブクリニカルクッシング病の診断の手引き(改訂案)を提示した。今後、本疾患が、より高い感度・特異度で診断されることが期待されると同時に、新しい診断基準による全国疫学調査が必要になるものと思われる。

D. 参考文献

- 1) Suda T, Kageyama K, Nigawara T, Sakihara S. Evaluation of diagnostic tests for ACTH-dependent Cushing's syndrome. *Endocr J*. 56:469-76. 2009
- 2) Oki Y, Hashimoto K, Hirata Y, Iwasaki Y, Nigawara T, Doi M, Sakihara S, Kageyama K, Suda T. Development and validation of a 0.5 mg dexamethasone suppression test as an initial screening test for the diagnosis of ACTH-dependent Cushing's syndrome. *Endocr J*. 56:897-904. 2009
- 3) Sakihara S, Kageyama K, Oki Y, Doi S, Iwasaki Y, Takayasu S, Moriyama T, Terui K, Nigawara T, Hirata Y, Hashimoto K, Suda T. Evaluation of plasma, salivary and urinary cortisol levels for diagnosis of Cushing's disease. *Endocrine J* in press
- 4) Nieman LK, Biller BM, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, Montori VN. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 93:1526-1540, 2008.

E. 研究発表

- 1) Oki Y, Hashimoto K, Hirata Y, Iwasaki Y, Nigawara T, Doi M, Sakihara S, Kageyama

- K, Suda T. Development and validation of a 0.5 mg dexamethasone suppression test as an initial screening test for the diagnosis of ACTH-dependent Cushing's syndrome. *Endocr J.* 56:897-904.2009
- 2) Suda T, Kageyama K, Nigawara T, Sakihara S. Evaluation of diagnostic tests for ACTH-dependent Cushing's syndrome. *Endocr J.* 56:469-76. 2009
- 3) Sakihara S, Kageyama K, Oki Y, Doi S, Iwasaki Y, Takayasu S, Moriyama T, Terui K, Nigawara T, Hirata Y, Hashimoto K, Suda T. Evaluation of plasma, salivary and urinary cortisol levels for diagnosis of Cushing's

disease. *Endocrine J* in press

- 4) Sakihara S, Kageyama K, Matsumoto A, Ikeda H, Tsushima Y, Naraoka M, Terui K, Nigawara T, Suda T. Exaggerated response of adrenocorticotrophic hormone to growth hormone-releasing peptide-2 test in Cushing's disease. Case report. *Neurol Med Chir (Tokyo)*.49:365-9. 2009
- 5) Kageyama K, Kushibiki M, Hanada K, Sakihara S, Yasujima M, Suda T. Growth hormone-releasing peptide-2 stimulates secretion and synthesis of adrenocorticotrophic hormone in mouse pituitary. *Regul Pept.* 158:116-20. 2009

図1. 低容量DSTのROC解析

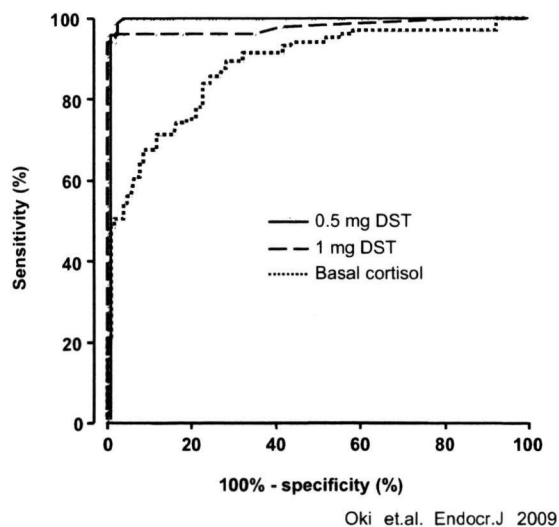


図2. 健常人における深夜コルチゾール値の再現性

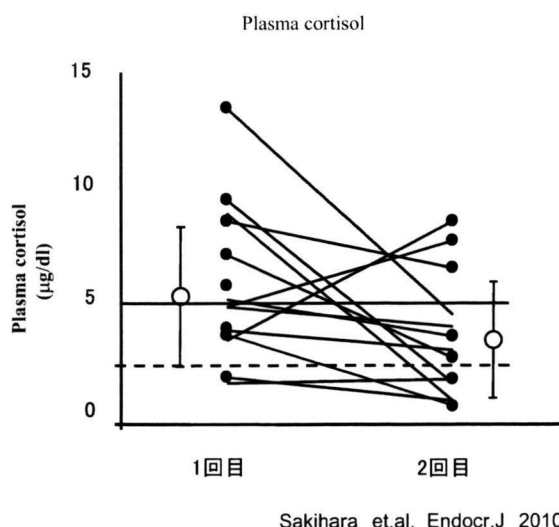


表2. Various cut-off values in 0.5 mg and 1 mg DSTs

0.5 mg DST				1 mg DST			
cut-off value cortisol µg/dl	sensitivity (%)	specificity (%)	+LR	cut-off value cortisol µg/dl	sensitivity (%)	specificity (%)	+LR
2.95	100.0	96.9	32.0	0.99	100.0	15.1	1.2
3.00	99.0	98.4	63.3	1.70	96.2	98.1	51.0
3.05	99.0	98.4	63.3	3.00	94.2	100.0	-
5.00	94.8	100.0	-	5.00	89.4	100.0	-

DST; dexamethasone suppression test, +LR; positive likelyhood ratio

Oki et.al. *Endocr.J* 2009

図3. DDAVP tset

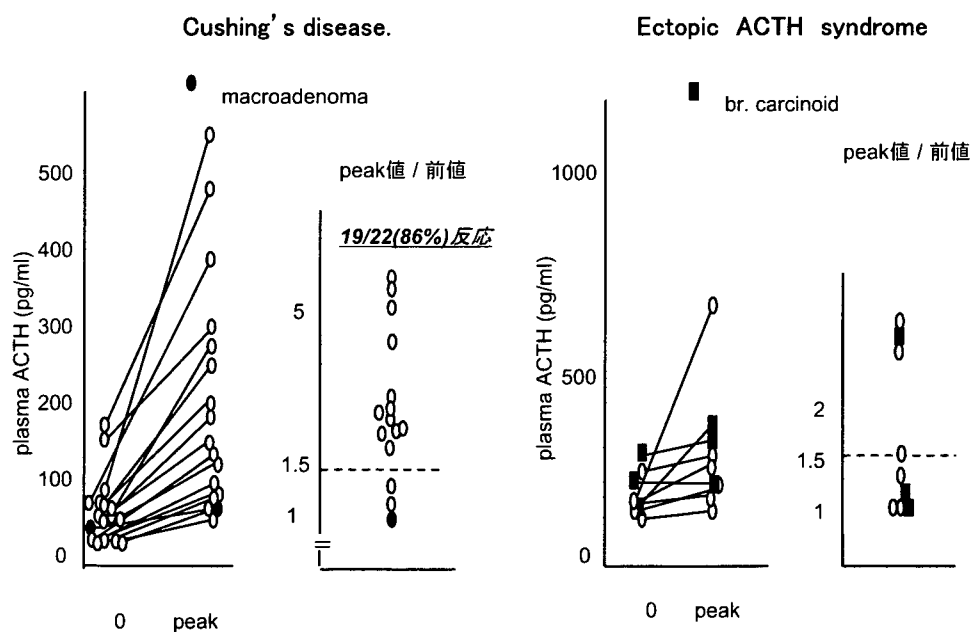
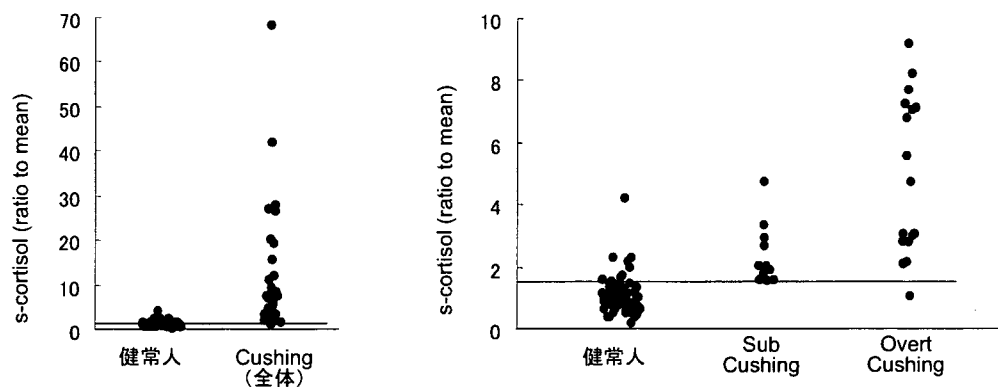


図4. 深夜唾液中コルチゾール値によるCushing 症候群のスクリーニング

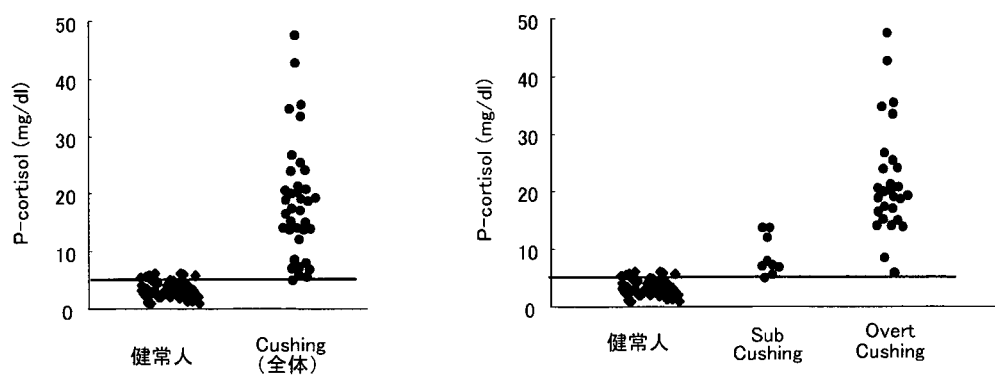


唾液中コルチゾールによる (Sub)Cushing 症候群診断の感度・特異度

		Cut off Sal F. ratio			
		1.0	1.5	2.0	2.3
Sub-Cushing	感度 (%)	100	100	54	36
Overt-Cushing	感度 (%)	100	96	96	76
Cushing 全体	感度 (%)	100	97	81	76
	特異度 (%)	61	88	95	98

Sakihara et.al. Endocr.J 2010

図5. 深夜血中コルチゾールによるCushing 症候群のスクリーニング



血中コルチゾールによる (Sub)Cushing 症候群診断の感度・特異度

	Cut off p-cortisol ($\mu\text{g/dl}$)	2.5	3	4	4.5	5	6.5
		Sub-Cushing	感度 (%)	100	100	100	100
Overt Cushing	感度 (%)	100	100	100	100	100	98
Cushing 全体	感度 (%)	100	100	100	100	97	92
	特異度 (%)	31	48	68	80	88	100

Sakihara et.al. Endocr.J 2010

下垂体腺腫の機能分化に関する研究

研究分担者 長村 義之 東海大学基盤診療学系病理診断学

研究要旨: nestin は中枢神経の分化において発現が認められている中間径フィラメントであり、近年さまざまな臓器や腫瘍において stem cell marker になると考えられている。方法: 今回我々はヒト下垂体腺腫における nestin の発現を下垂体腺腫のタイプ別に免疫組織学的に解析した。

ヒト下垂体腺腫 44 例と正常下垂体 5 例に対し免疫染色を行なったところ ACTH 産生腺腫の 13/16 (81.25%) 例で nestin の発現を認めた。しかしその他の腺腫においては発現を認めず、また正常下垂体においても ACTH 産生細胞にのみ共存を認めたため、nestin が ACTH 産生細胞に特異的に発現すると考えられた。ヒト下垂体において ACTH 産生細胞は一番早く分化する細胞として知られており、一部の細胞が未分化な状態を保持し nestin を発現しているとも推察される。一部の ACTH 産生腺腫の症例では nestin の発現と Mib-1 陽性率にも関連を示し、増殖能を含めた臨床像との関連についても更なる検討が必要であると思われる。

A. 研究目的

nestin とは中間径フィラメントの一種で、Hockfield らにより 1985 年に胎生期ラットの神経組織ではじめてその発現が報告された。当初神経幹細胞に特異的に発現するとされていたが、近年では骨格筋や膵臓などの幹細胞でもその発現が報告され、さまざまな臓器における stem cell marker としても用いられている。

mouse 下垂体の発生においては胎生 11.5 日で初めてラトケ囊の腹側に発現が認められる。Rosenfeld らはこの nestin 陽性細胞が stem cell としての働きを持ち、通常は下垂体腔に並び必要に応じてホルモン産生細胞に分化すると報告している。

また、nestin は正常組織だけでなく glioma や glioblastoma、メラノーマ、Gastrointestinal mesenchymal tumor (GIST)、前立腺癌などの腫瘍や癌においても同様にその発現が報告され、cancer (tumor) stem cell marker とし

ても用いられるようになっている。glioma などではその発現が予後因子となるとも報告されている。

下垂体腺腫は良性腫瘍であるものの再発を繰り返すなど治療に難渋する症例も多く、近年では腫瘍形成の成因や予後因子としての tumor stem cell の存在・役割についても関心が寄せられている。

本研究では下垂体腺腫における nestin の発現を各腺腫ごとに免疫組織学的に検討し、また nestin の stem cell marker としての立場から、腫瘍サイズや増殖能も含めた臨床的事項との関連についてもまとめた。

B. 研究方法

虎ノ門病院で経蝶形骨洞手術を行った下垂体腺腫 (GH-producing adenomas 8 例, PRL-producing adenomas 8 例, TSH-producing adenomas 4 例, ACTH-producing adenomas 16 例, gonadotropin-producing adenomas 5

例, null cell adenomas 3例)計44例について nestinの発現を検討した(Table.1)。

また正常下垂体(剖検例)5例についても nestinの染色を行い、下垂体ホルモンとの二重染色についても検討した。使用した抗体は Table.2に示す。

C. 研究結果

nestin陽性細胞は各腺腫のうちACTH産生腺腫(ACTHoma)の16例中13例(81.25%)で認められた(Fig.1)。その他の腺腫においては全く発現を認めず、nestinの発現はACTHoma特異的であった。nestin陽性細胞の数は腫瘍細胞のごく一部(約5%程度)に限られ、一部の症例では陽性細胞によるclusterを認めた。

正常下垂体においては下垂体前葉細胞全体の数%程度にnestin陽性細胞が散在し、一部にclusterを認めた(Fig.2)。

下垂体腺腫における検討ではnestinの発現がACTHomaに特異的であったため、正常下垂体における各ホルモン・S100との共存についても検討したところ、ACTHとのみ共存が確認された。nestinと共存している細胞はACTH産生細胞の約10-20%程度であった。

更に、nestinがACTHoma特異的に発現していたことよりその発現と臨床像について16例につき検討を行った(Table.3)。これらの症例ではnestinの染色像とCushing徴候の有無や腫瘍サイズについて明らかな相関は認めなかった。しかし、このうち8例の症例においてMib-1の発現を検討したところ、nestin陽性の症例でMib-1陽性率が高い傾向を認めた。特にnestin陽性細胞によるcluster形成を認める症例においてMib-1の陽性率が高かった(Table.4)。

D. 考察

今回の免疫染色ではヒト下垂体腺腫、正常下垂体においてnestinがACTH産生細胞の一部に特異的に発現するという結果が得られた。これまでにヒト下垂体腺腫におけるnestinの発現について免疫組織学的に検討した報告は一件あり、その中では正常下垂体のACTH産生細胞にnestinの発現を認めるものの、すべての下垂体腺腫でその発現を認めないとされている。本研究ではACTH産生腺腫の一部にnestinが陽性であり、この点が前の報告と異なっていた。

一方、mouseやRatなどのげっ歯類でもnestinの発現を検討した報告がいくつかある。Ratの正常下垂体で検討した報告では、nestinはどの下垂体ホルモンとも共存せずS100陽性細胞にのみ共存を認めた。またnestin-GFP transgenic mouseでは、nestin陽性細胞がすべてのホルモン産生細胞へ分化したとの報告もあり、動物種によりその発現パターンに違いを認めている。

このような相違の原因の一つとしてヒトとげっ歯類の下垂体発生・分化の違いが予想される。ヒトではげっ歯類と異なり、下垂体前葉細胞の中でACTH産生細胞が最も早く分化すると考えられている。このためACTH産生細胞はより未分化な状態に近く、その一部がstem cellとしての性質を保持し、stem cell markerであるnestinを発現しているのではないかと推察された。

今回の結果ではACTH産生細胞の中にnestin陽性と陰性の2種類の細胞を認めたが、両者は形態的に明らかな違いを認めず、なぜnestinの発現が一部のACTH産生細胞に限定されるのかは不明であった。神経幹細胞におけるnestinの発現が細胞周期に依存するという報告もあり、ヒト下垂体においても細胞周

期との関連も含め、nestin発現のメカニズムや意義について更なる検討が必要であると思われる。

また、本研究における限られた症例の中ではnestinの発現とACTH産生腺腫の臨床徴候について明らかな相関は認められなかったが、一部の症例の中ではnestin陽性、特にclusterを形成するものでMib-1陽性率が高い傾向を示し、nestinの染色像と腫瘍増殖能との関連が示された。今後更なる症例を蓄積し、下垂体腫瘍におけるnestin発現と予後、再発などの臨床像との関連について解析を行っていく必要がある。

E. 結論

ヒト下垂体腺腫の中でACTH産生腺腫にのみ特異的にnestinの発現を認めた。

今後更に症例数を増やすことで、診断や臨床像・増殖能など示す新たなBiomarkerとなり得る可能性が示された。

また、ヒト下垂体におけるnestinのstem cell markerとしての意義については更なる検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Osamura RY, Egashira N, Kajiya H, Takei M, Tobita M, Miyakoshi T, Inomoto C, Takekoshi S, Teramoto A: Pathology, pathogenesis and therapy of growth hormone (GH)-producing pituitary adenomas: technical advances in histochemistry and their contribution. *Acta Histochem Cytochem* 2009, 42:95-104.

2) Miyakoshi T, Kajiya H, Miyajima K, Takei

M, Tobita M, Takekoshi S, Osamura RY: The Expression of Wnt4 Is Regulated by Estrogen via an Estrogen Receptor Alpha-dependent Pathway in Rat Pituitary Growth Hormone-producing Cells. *Acta Histochem Cytochem* 2009, 42:205-213.

3) Kajiya H, Takekoshi S, Takei M, Egashira N, Miyakoshi T, Serizawa A, Teramoto A, Osamura RY: Selection of buffer pH by the isoelectric point of the antigen for the efficient heat-induced epitope retrieval: re-appraisal for nuclear protein pathobiology. *Histochem Cell Biol* 2009, 132:659-667.

4) 松野 彰, 中島美智, 高野幸路, 高野順子, 水谷晃子, 長村義之, 竹井麻生, 田原重志, 寺本 明, 山田正俊, et al: 【内分泌病理学 最近の進歩2008】下垂体GH産生腫瘍 GH産生下垂体腺腫におけるoctreotideによるGHの低下に関する多変量解析 Ki-67 staining index, gsp mutation, SSTR immunohistochemistry. *ホルモンと臨床* 2009, 57:28-32.

2. 学会発表

1) 飛田麻耶, 長村義之, 東條克能, 田嶋尚子: 下垂体腺腫の病理と臨床-最近の話題をめぐって“若手研究者による新発見” ACTH産生下垂体腺腫におけるACTH分泌の変動. 第13回日本内分泌病理学会学術総会. 2009

2) 飛田麻耶, 梶谷華子, 江頭 登, 竹腰 進, 長村義之, 東條克能, 田嶋尚子, 山田正三: ヒト下垂体腺腫におけるstem cell markerの免疫組織学的解析. 第82回日本内分泌学会学術総会. 2009

3) 飛田麻耶, 梶谷華子, 江頭 登, 伊東良子, 伊東丈夫, 竹腰 進, 長村義之, 東條克能, 田嶋尚子: 数回にわたるHardy術の経過中、

血中ACTH/コルチゾール比の解離と組織細胞像の変化を認めたSilent corticotroph adenomaの1例. 第82回日本内分泌学会学術総会. 2009

- 4) 田原重志, 石井雄道, 竹井麻生, 喜多村孝幸, 山王直子, 長村義之, 寺本 明: 下垂体腫瘍の治療と成績 先端巨大症の治療 外科的立場から. 第82回日本内分泌学会学術総会. 2009
- 5) 竹井麻生, 田原重志, 梶谷華子, 石井雄道, 野村竜太郎, 井野元智恵, 長村義之, 寺本 明: Clinico-pathological examination of ACTH producing pituitary adenoma with crooke cell. 第82回日本内分泌学会学術総会. 2009
- 6) 竹井麻生, 石井雄道, 田原重志, 長村義之, 寺本 明: 下垂体腺腫の病理と臨床-最近の話題をめぐって“若手研究者による新知見”下垂体腺腫におけるソマトスタチンレセプター (SSTR) 発現と薬物療法の治療選択. 第13回日本内分泌病理学会学術総会. 2009
- 7) 石井雄道, 田原重志, 竹井麻生, 喜多村孝幸, 長村義之, 寺本 明: ACTH産生下垂体microadenomaに対する内視鏡下経鼻下垂体手術の治療成績. 第82回日本内分泌学会学術総会. 2009
- 8) 高野幸路, 高野順子, 盛田幸司, 森 茂俊, 竹井麻生, 長村義之, 寺本 明, 藤田敏

郎: PRKARIAの不活化変異とLOHを伴うCarney complex症例のGH産生腺腫におけるPKAの恒常的活性化. 第82回日本内分泌学会学術総会. 2009

- 9) 宮腰隆史, 梶谷華子, 美谷島克宏, 竹井麻央, 竹腰 進, 長村義之: ラット下垂体におけるWnt4の制御機構. 第82回日本内分泌学会学術総会. 2009
- 10) 宮腰隆史, 梶谷華子, 竹井麻央, 竹腰 進, 長村義之: ラット下垂体のWnt4発現に及ぼすエストロゲンの影響. 第98回日本病理学会総会. 2009
- 11) 井野元智恵, 松前光紀, 長村義之: 下垂体腺腫の病理と臨床-最近の話題をめぐって“若手研究者による新知見”下垂体腺腫の“aggressive” behaviorについての病理組織学的特徴の解析. 第13回日本内分泌病理学会学術総会. 2009
- 12) Maya Tobita, Hanako Kajiya, Noboru Egashira, Susumu Takekoshi, Robert Y Osamura, Katsuyoshi Tojo, Naoko Tajima and Syozo Yamada: Immunohistochemical expressions of multiple stem cell markers in pituitary adenomas. ENDO 2009: The 91nd Annual Meeting & Expo

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table.1 The type of pituitary adenomas.

The types of pituitary adenomas	Cases (No)
GH-producing adenomas	8
Prolactin-producing adenomas	8
TSH-producing adenomas	4
ACTH-producing adenomas	16
Gonadotropin-producing adenomas	5
total	44cases

Fig.1 The nestin positive cases in pituitary adenomas.

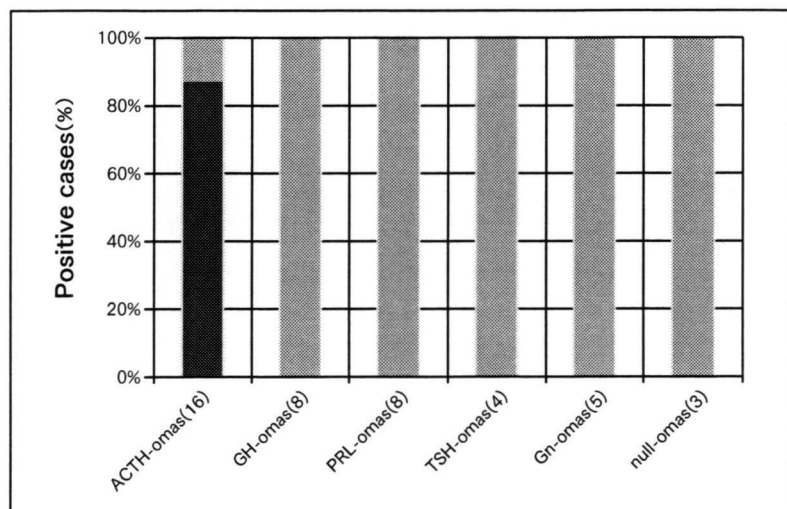


Fig.2 The nestin positive cells in ACTH-producing adenoma and normal pituitary.

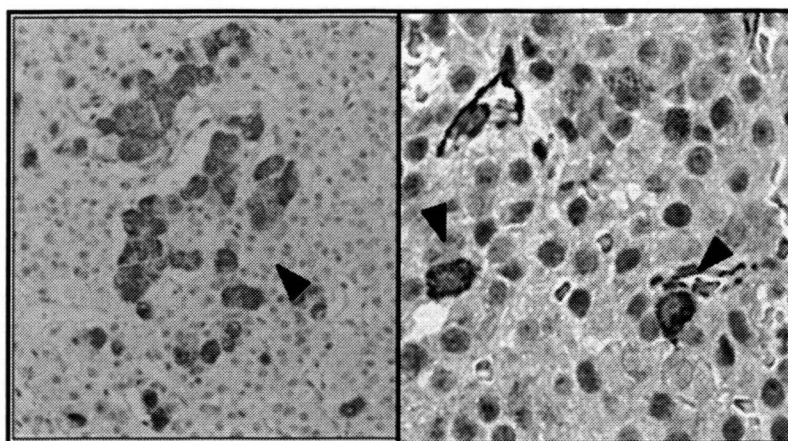


Table.2 List of primary antibodies used.

Anti-bodies	Source	Dilution	Nature of antibodies
Nestin	IBL	1:500	Polyclonal (rabbit)
GH	Dako Cytomation	1:400	Polyclonal (rabbit)
PRL	Dako Cytomation	1:400	Polyclonal (rabbit)
TSH β	Dako Cytomation	1:100	Monoclonal (mouse)
ACTH	Dako Cytomation	1:200	Monoclonal (mouse)
LH β	Dako Cytomation	1:200	Monoclonal (mouse)
FSH β	Dako Cytomation	1:100	Monoclonal (mouse)
α -subunit	Dako Cytomation	1:200	Polyclonal (rabbit)
S100	Dako Cytomation	1:200	Polyclonal (rabbit)

Table.3 Clinical characteristics of ACTH-producing adenomas.

Case	Cushing's sign	ACTH (Basal Level)	Cortisol (Basal Level)	Tumor Size	Expression of nestin
1	+	137	29.6	Macro	+ cluster
2	+	109.2	16.6	Micro	+ sparsely
3	+	70.9	24.1	Micro	+ diffuse, cluster
4	+	92.5	15.3	Micro	+ cluster, sparsely
5	-	28.5	1.4	Macro	+ sparsely
6	+	418.9	22.8	Macro	+ sparsely
7	+	160	18.1	Micro	+ cluster
8	+	82.1	23.8	Micro	+ sparsely
9	+	172.6	21.5	Macro	+ sparsely
10	-	273	14.9	Macro	+ sparsely
11	-	130	21.8	Macro	+ diffuse
12	+	76.7	39.5	Micro	+ diffuse, cluster
13	-	160	17.8	Macro	+
14	+	161	47	Macro	-
15	+	104.6	21.4	Macro	-
16	+	110	18	Micro	-
16cases	positive:negative=5:11	142.9 (\pm 92.3)	22.1 (\pm 10.31)	Macro:Micro=9:7	positive:negative=13:3

Table.4 The Mib-1 positive rate in ACTH-producing adenomas.

case	size	Expression pattern of nestin	mib-1
1	Macro	+cluster	+++
2	micro	+cluster	+++
3	Macro	+sparsely	++
4	micro	+sparsely	++
5	Macro	+sparsely	++
6	Macro	+sparsely	++
7	Macro	-	+
8	Macro	-	+

Mib-1 陽性
 + : <5cells/1 視野
 ++ : 5-20cells/1 視野
 +++ : >20cells/1 視野

下垂体及び非下垂体 ACTH 産生腫瘍における 転写因子と受容体遺伝子発現の違い

研究分担者 平田結喜緒 東京医科歯科大学大学院分子内分泌内科学
(内分泌・代謝内科)

研究協力者 谷 祐至 東京医科歯科大学大学院分子内分泌内科学
(内分泌・代謝内科)

研究要旨:我々は、先にACTH産生下垂体腫瘍であるCushing病(CD), silent corticotroph adenoma (SCA)及び非機能性下垂体腫瘍(NFT)における種々の遺伝子発現の違いを明らかにした。しかし、非下垂体ACTH産生腫瘍での転写因子や各種受容体の遺伝子発現の違いは明らかでない。そこで異所性ACTH産生気管支カルチノイド(EAS)での腫瘍組織における各種遺伝子(POMC, T-pit, NeuroD1, IKAROS family zinc finger 1 (IKZF1), CRH-R, V1bR, SSTR2,5, D2R)の発現をRT-PCR法で解析した。EASでは、NFTと比べて有意なPOMC, T-pit, V1bR, SSTR5の発現亢進及びNeuroD1の発現低下を認め、NFTやCDと比べて有意なIKZF1の発現亢進を認めた。以上の結果、異所性ACTH産生腫瘍での転写因子の発現の違いがPOMCの発現や細胞分化に関与している可能性が示唆され、また本症の薬物治療にSSTR5型により高い親和性を有するソマトスタチンアナログの効果が期待される。

A. 研究目的

H18, 19年度の班研究で我々はACTH産生下垂体腫瘍であるCushing病(CD), silent corticotroph adenoma (SCA)ならびに非機能性下垂体腫瘍(NFT)でのPOMCの発現・転写因子、ネガティブフィードバック機構、プロセッシング、細胞内輸送、ソマトスタチン及びドパミン受容体サブタイプの遺伝子発現の違いを明らかにした(Tateno et al: Eur J Endocrinol 157: 717, 2007; Tateno et al: Endocr J 56: 579, 2009.)。しかし、非下垂体ACTH産生腫瘍での転写因子や受容体の遺伝子発現の違いは明らかでなく、今回異所性ACTH産生気管支カルチノイド(EAS)でのPOMC転写因子と各種受容体の発現プロフィールを検討し、CDおよびSCAと比較した。

B. 研究方法

EAS(4例)、CD(9例)、SCA(11例)、対照としてNFT(20例)の腫瘍組織より全RNAを抽出、cDNAを作成し、POMCの転写因子(T-pit, NeuroD1, IKAROS family zinc finger 1 (IKZF1))、受容体(CRH-R, V1bR, SSTR2,5, D2R)の遺伝子発現をreal-time RT-PCR法で解析した。なお、POMC, T-pit, NeuroD1, IKZF1の遺伝子発現は絶対定量(RNA1 μ g中のgene copy number)で、ほかの遺伝子発現はGAPDH mRNAの相対的比率で検討した。本研究は各施設での倫理委員会で承認され、各患者からICを得た上で実施された。

C. 研究結果

POMC mRNAの発現はNFTと比べ、CD(2400倍)、EAS(200倍)で著明な発現亢進

を認めたが、SCAではほぼ同程度であった。T-pit mRNAの発現は、CD(31倍)、EAS(7倍)、SCA(24倍)と亢進していた。NeuroD1 mRNAの発現はSCAやNFTよりもCDやEASで低下(14~61倍)していた。IKZF1 mRNAの発現はEASで亢進(8倍)していたが、CDとSCAはNFTとほぼ同程度であった(図1)。CRH-R mRNAの発現はEASとSCAで同程度であった。V1bR mRNAの発現はNFTと比べ、CD(50倍)、EAS(17倍)、SCA(15倍)と発現亢進を認めた(図2)。SSTR2 mRNAの発現はNFTと比べ、CDで低下(4倍)していたが、EASとSCAはほぼ同程度であった。SSTR5 mRNAの発現はNFTと比べ、CD(6倍)、EAS(22倍)と発現亢進を認めた。D2R mRNA発現はCDとSCAで発現低下していたが、EASはNFTと同程度であった(図3)。

D. 考察

POMCのmRNA発現調節には、転写因子であるT-pit, NeuroD1, Pitx1, NAK-1/Nur77が関与している。T-pitはPOMCプロモーターのT-box elementに結合し、近傍に結合するPitx1と相乗的に作用しPOMC遺伝子発現を活性化する。近年、下垂体ACTH分泌細胞での転写因子Ikarosの役割も注目されている。Ikarosは本来リンパ球の発育を制御する転写因子として同定され、7つのエクソンからなり、alternative splicingにより8つのアイソフォーム(IKZF1-8)が生成される。IkarosはPOMCプロモーターのT-pit/Pitx1の結合部位近傍(~70bp)し、中でもIKZF1はPOMCの発現を亢進し、ACTH分泌を促進する(Ezzat S. et al., J Clin Invest 115: 1021, 2005.)。ほかにも、corticomelanotrophの細胞増殖、LDL受容体を介した細胞分化にも関与すると報告されている。これまでにEASでのT-pit遺

伝子発現の増加が知られているが、その他の転写因子(NeuroD1, Pitx1, NAK-1/Nur77)とPOMCの転写制御については不明な点が多い(Messenger M et al., Eur J Endocr 154: 159, 2006.)。本研究から、T-pit mRNAの発現はNFTと比較して、下垂体ACTH産生腫瘍(CD, SCA)およびEASの両方で発現が亢進し、IKZF1はEASでのみ発現亢進を認めた。CDではPOMCの転写亢進にT-pitの関与が大きいと見られるが、EASではT-pitとIKZF1の両者が関与している可能性が示唆される。また、IKZF1の発現亢進がEASの腫瘍増殖や細胞分化に関与する可能性も考えられた。一方、NeuroD1遺伝子発現はCDと同様にEASでは低く、POMCへの関与は少ないものと考えられる。

EASでのCRH-RとV1bR mRNA発現は、CDと比較すると低いもののSCAと同程度であった。すなわちEASでは必ずしもCRHやAVP不応性とはいえない。またSSTR2 mRNAの発現はCDよりEASとSCAと同程度に多く発現し、SSTR5 mRNAの発現はEASで最も亢進していた。EAS 3例中2例でオクトレオチド投与にてACTHは低下しSSTR2やSSTR5を介している可能性が示唆される。今後はEASの薬物治療としてSSTR5選択性アナログ(SOM230)の効果が期待される。

E. 結論

非下垂体ACTH産生腫瘍での転写因子の発現の違いがPOMCの発現や細胞分化に関与している可能性が示唆される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tateno T, Kato M, Tani Y, Yoshimoto T, Oki Y, Hirata Y. Processing of high molecular weight form ACTH in human ACTH-secreting tumor cell line (DMS-79) after transfection of prohormone convertase 1/3 gene. *J Endocrinol Invest* 2009 Sep 11. [In press]
- 2) Tateno T, Kato M, Tani Y, Oyama K, Yamada S, Hirata Y. Differential expression of somatostatin and dopamine receptor subtype genes in adrenocorticotropin (ACTH)-secreting pituitary tumors and silent corticotroph adenomas. *Endocr J* 56(4):579-84. 2009.
- 3) Tsuchiya K, Yoshimoto T, Hirata Y. Endothelial dysfunction is related to aldosterone excess and raised blood pressure. *Endocr J* 56(4):553-9. 2009.
- 4) Tsuchiya K, Akaza I, Yoshimoto T, Hirata Y. Pioglitazone improves endothelial function with increased adiponectin and high-density lipoprotein cholesterol levels in type 2 diabetes. *Endocr J* 56(5):691-8. 2009.
- 5) Akaza I, Yoshimoto T, Tsuchiya K, Hirata Y. Endothelial dysfunction associated with hypercortisolism is reversible in Cushing's syndrome. *Endocr J* 2009 Dec 20. [Epub ahead of print]
- 6) Gotyo N, Kida M, Horiuchi T, Hirata Y. Torsade de pointes associated with recurrent ampulla cardiomyopathy in a patient with idiopathic ACTH deficiency. *Endocr J* 56(6):807-15. 2009.
- 7) Sekizawa N, Hayakawa E, Tsuchiya K, Yoshimoto T, Akashi T, Fujii T, Yamada S, Hirata Y. Acromegaly associated with multiple

tumors. *Intern Med* 48(15):1273-8. 2009.

- 8) Akaza I, Tsuchiya K, Akaza M, Sugiyama T, Izumiyama H, Doi M, Yoshimoto T, Hirata Y. Improvement of congestive heart failure after octreotide and transsphenoidal surgery in a patient with acromegaly. *Intern Med* 48(9):697-700. 2009.
- 9) Nakayama C, Shichiri M, Sato K, Hirata Y. Expression of prosalusin in human neuroblastoma cells. *Peptides* 30(7):1362-7. 2009.
- 10) Sakurada M, Yoshimoto T, Sekizawa N, Hirono Y, Suzuki N, Hirata Y. Vasculoprotective effect of cilostazol in aldosterone-induced hypertensive rats. *Hypertens Res* 2009 Dec 18. [Epub ahead of print]
- 11) Ikeda M, Kawata A, Nishikawa M, Tateishi Y, Yamaguchi M, Nakagawa K, Hirabayashi S, Bao Y, Hidaka S, Hirata Y, Hata Y. Hippo pathway-dependent and independent roles of RASSF6. *Sci Signal* 29;2(90):ra59. 2009.
- 12) Oki Y, Hashimoto K, Hirata Y, Iwasaki Y, Nigawara T, Doi M, Sakihara S, Kageyama K, Suda T. Development and validation of a 0.5 mg dexamethasone suppression test as an initial screening test for the diagnosis of ACTH-dependent Cushing's syndrome. *Endocr J* 56(7):897-904. 2009.

2. 学会発表

- 1) Y. Tani, M. Kato, T. Tateno, M. Shichiri, K. Oyama, S. Yamada and Y. Hirata. Differential gene expression of transcription factors in adrenocorticotropin (ACTH)-secreting pituitary and non-pituitary tumors. The 14th International Congress of Endocrinology.

Kyoto, Japan (2010.3発表予定)

International Pituitary Pathology Society
(IPPS) Meeting. Hyogo, Japan (2009.10)

2) M. Kato, T. Tateno, K. Oyama, S Yamada,
T. Sano, M. Shichiri, Y. Hirata. Differential
gene expression in sparsely-granulated
and densely-granulated growth hormone-
producing pituitary adenomas. The 11th

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

図1. POMC及び転写因子の遺伝子発現

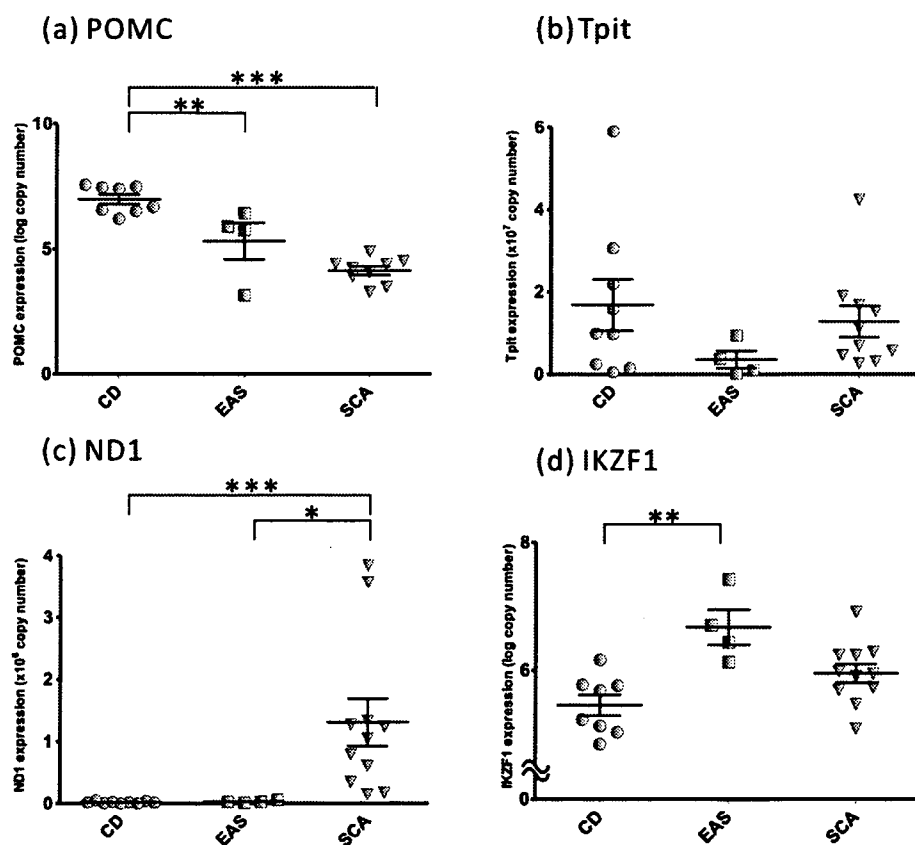


図2. CRH受容体及びバソプレシン受容体

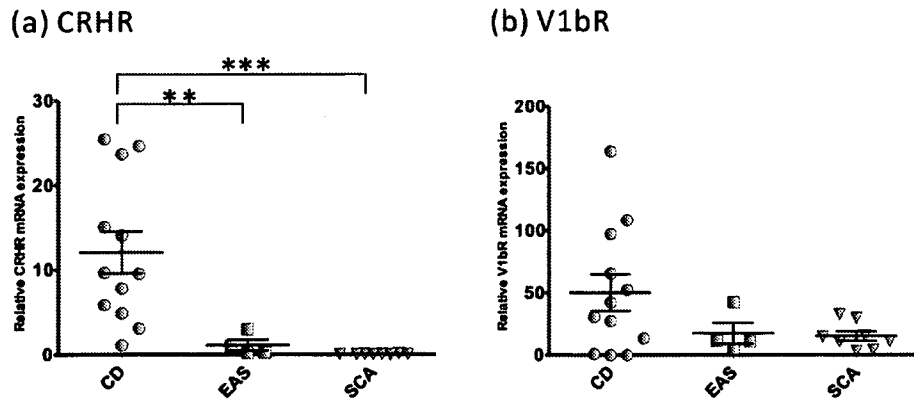
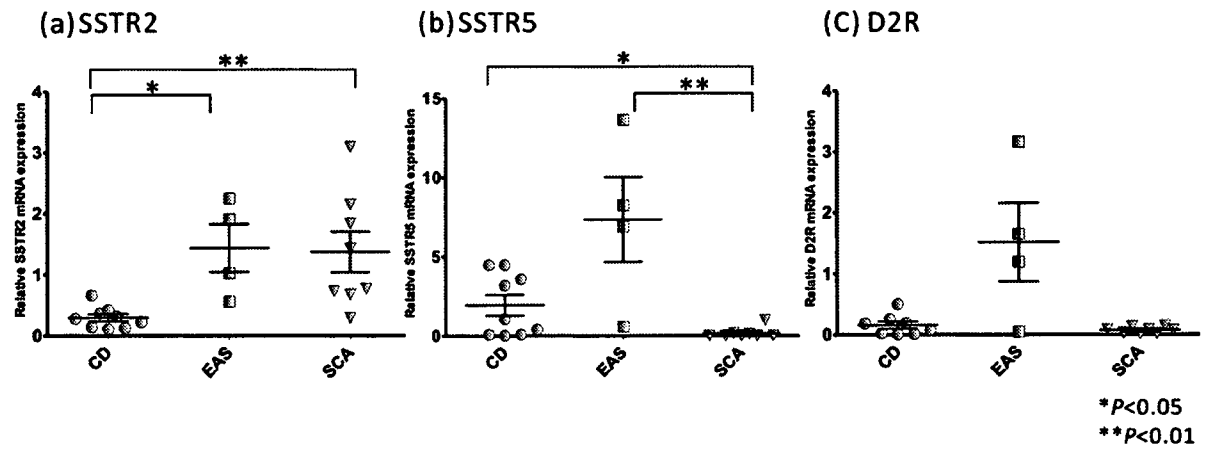


図3. ソマトスタチン受容体及びドパミン受容体



DAX1 遺伝子の新規変異を有する可能性をもつ副腎低形成の 1 兄弟例における 間脳下垂体—副腎系の検討

研究分担者	大関 武彦	浜松医科大学小児科
研究協力者	松下 理恵	浜松医科大学小児科
	中川 祐一	浜松医科大学小児科
	中西 俊樹	浜松医科大学小児科
	永田 絵子	浜松医科大学小児科
	佐竹栄一郎	浜松医科大学小児科
	佐野伸一朗	浜松医科大学小児科
	山口 理恵	浜松医科大学小児科
	藤澤 泰子	浜松医科大学小児科
	中野 貴司	(独) 国立病院機構三重病院小児科
	范 呉強	九州大学大学院医学研究院病態制御内科
	柳瀬 敏彦	福岡大学医学部内分泌・糖尿病内科

研究要旨: 間脳下垂体機能障害の治療においては生活習慣病と称される疾患群との関連が生命予後やQOLとの関連から注目され、治療法の進歩に伴い経過の長い若年発症例においてより重要となる。DAX1は視床下部腹内側核、下垂体前葉、副腎皮質、性腺での発現が強いが、我々はこれまでに報告のないDAX1遺伝子の変異(NR0B1,1-RPINS, 568G)を有する兄弟例につき間脳下垂体系の機能を中心に検討した。兄18歳、弟15歳で、ハイドロコルチゾン・フルドコロチゾンにて4歳時から補充療法を継続し、臨床的に明らかな副腎不全症状は認めないものの、全身の色素沈着があり、標準的なヒドロコルチゾン 20 mg/日の投与ではACTHは600-5000pg/mlと高値であった。DEX負荷試験で抑制があり、ACTHの日内変動も認めることより、間脳下垂体におけるフィードバックシステムは保たれていると考えられた。DAX1異常症による下垂体-副腎皮質などの患者においては、遺伝子変異、年齢を含む個人差により投与量が変動する可能性がある。症例に見合ったステロイドの種類・投与量の選択が長期予後を良好にすることが示唆される。

A. 研究目的

間脳下垂体機能障害はその特異的なホルモン分泌異常に伴う病態・症状のみならず、長期的には近年増加している生活習慣病の発症・進行にかかわる可能性が考えられる。このうち若年例では長期的な予後への関与、治療薬の年齢的な変動など、より適切な治

療が求められる。我々は間脳下垂体機能障害における下垂体—副腎系の変動や、それと関連する糖質コルチコイド代謝酵素である11 β 水酸化ステロイド脱水素酵素(11 β HSD)の動態を検討し、昨年度は成長ホルモンによる調節について報告した。今年度の研究としては新規のDAX1遺伝子変異と考

えられる症例において、ACTH-副腎系について検討し、病態・治療の再考査を行うことを目標とした。

DAX1は視床下部腹内側核、下垂体前葉、副腎皮質、性腺での発現が強く、内分泌腺の形成やホルモン分泌に関与している。DAX1遺伝子異常症はX連鎖性で副腎低形成および低ゴナドトロピン性性腺機能低下を合併し、その頻度は10000～15000出生に1人と多く、これまで80を超える遺伝子異常が報告されており、この遺伝子異常に対しての研究をおこなうことは今後の間脳下垂体疾患機能障害に対する研究において有用であると考えられる。長期的な治療が必要な本症において、未だ治療方針においても検討の余地があり、特に薬物療法との関連から間脳下垂体機能についての評価を行った。

B. 研究方法

副腎低形成の2症例(兄弟例)につきゲノムよりのDirect Sequencing法にて遺伝子解析を行った。遺伝子解析においては、浜松医科大学倫理委員会による遺伝子解析への説明・同意書への書面による承諾を得たのち解析を行った。

同症例につき、DEX(1mg)負荷試験・Overnight法、四者負荷試験(CRH, TRH, LH-RH, GRF)、フロセミド立位負荷試験により間脳下垂体機能、副腎機能を測定した。ACTHの日内変動(連続3日間症例1.2ともHydrocortison AM8:00 10mg, PM8:00 10mg経口投与)および、内服方法変更(症例1, Hydrocortison AM7:00 10mg Dexmethason 0.5mg PM8:00, 症例2 Hydrocortison AM7:00 10mg, AM12:00 5mg, PM8:00 5mg経口投与)によるACTH値の変化(連続2日)を観察した。

C. 研究結果

〈症例〉

症例1:18歳男児。4歳時に嘔吐・腹痛・色素沈着にて副腎不全を発症した。ハイドロコルチゾン・フルドコルチゾンにて補充療法を継続し、臨床的に明らかな副腎不全症状は認めないが、1週間に1回程度の朝の腹痛、及び、ロタ胃腸炎罹患時に副腎クリーゼの既往を有する。また、全身、口唇、歯肉、爪にも強く色素沈着があり、ACTHは600～5000pg/mlと高値であった。

DAX1遺伝子異常症の特徴である2次性徴の欠如があり、陰莖長6cm、精巣容量4ml/4ml恥毛の生育は認めない。本症例は成長ホルモン分泌不全症の合併もあり、治療歴を有する。症例1は成長曲線上、明らかな成長抑制や過体重はなく、強い副腎不全症状も認めておらず、総ステロイド投与量としては適正であると考えられた。

症例2:15歳男児(症例1の同胞)。4歳時に嘔吐・色素沈着にて副腎低形成と診断され、症例1と同様に、ハイドロコルチゾン・フルドコルチゾンにて補充療法を継続し、臨床的に明らかな副腎不全症状は認めないが、ロタ胃腸炎罹患時に副腎クリーゼの既往を有する。全身、口唇、歯肉、爪にも強く色素沈着を認め、症例1と同様に高ACTH(600～5000pg/ml)を呈す。

症例2においても2次性徴の欠如があり陰莖長4.5cm、精巣容量3ml/3ml、恥毛の生育は認めない。症例2は成長曲線明らかな成長抑制や過体重はなく、副腎不全症状も認めず、総ステロイド投与量としては適正であると考えられた。

〈遺伝子解析結果およびACTH-副腎機能系検査結果〉

遺伝子解析結果について:両症例とも、同じ遺伝子異常を有しており、翻訳開始メチオニン(ATG)より568塩基目より始まるGGGがGGGGに変異し、フレームシフトをおこすため、以降の蛋白は正常と全く異なり、1490bp付近でPremature stop codonを生じていた。

下垂体機能・副腎機能検査について:4者負荷試験では、ACTHは非常に高値で(症例1、頂値5420pg/ml、症例2頂値4060pg/ml)CRFへの反応は認めなかった。他の下垂体ホルモンについては、TSH、GH分泌能は追加のGH分泌刺激試験も含めて両症例とも正常であった。LH、FSHについては低反応であった。

フロセミド負荷試験ではアルドステロンは両症例とも正常に近い反応を認めた(症例1、アルドステロン負荷前34.2、負荷後50.1pg/ml、レニン活性、負荷前1.2、負荷後7.3 ng/ml/hr、血圧負荷前109/64負荷後105/77mmHg。症例2、アルドステロン負荷前35.1、負荷後47.8pg/ml、レニン活性、負荷前7.3、負荷後>20 ng/ml/hr、血圧負荷前89/56負荷後102/54mmHg。

HCG負荷試験では、テストステロンの反応は良好で(症例1、前<0.5、24時間後244、72時間後367ng/dl、症例2、前<0.5、24時間後62、72時間後109ng/dl)。2次性徴の遅延は低ゴナドトロピン性と診断した。

デキサメサゾン(1mg)負荷試験ではACTHは症例1では1830から15.2pg/ml、症例2は3730から19.2ng/mlと抑制された。

ACTH・コルチゾールの日内変動、内服変更に伴う日内変動について:症例1及び2の3日間のACTHの日内変動及び、コルチゾールの変動を示す(図1)。両症例とも、ハイ

ロコルチゾン10mgを午前8時及び午後8時に内服させた。両症例とも朝は非常にACTHが高値だが、コートリル内服後、コルチゾールの血中濃度が上昇している正午は比較的ACTHが低下し、18時頃、コルチゾールの血中濃度が低下すると再度ACTHが上昇した。20時にコートリルを内服し、22時はコルチゾールの血中濃度が低い状態で、ACTHはほぼ正常範囲だが、午前1時は、コルチゾールが基準値以下でもACTHは正常範囲であった。

次に両症例につき、内服方法の変更を行い、ACTHの変動を観察した(図2)。症例1についてはハイドロコルチゾン10mgを午前7時、デキサメサゾン0.5mgを午後8時に内服としたところ、早朝の高ACTHの抑制が観察された。症例2についてはコートリルを1日に3分服とし、午前7時に10mg、12時に5mg午後8時に5mgとしたところ、早朝の高ACTHの抑制は不十分だが、日中の高ACTHについては比較的改善された。

両症例につき、同様の内服方法を継続しており、現在4カ月経過しているが、医原性クッシングや過体重などの症状はなく、症例1に関しては朝の倦怠感、腹痛が若干軽減したようであった。色素沈着に関しても、軽減を認めた。

D. 考察

DAX1はXp21.2-21.3に位置する遺伝子として単離された。約3kbの遺伝子で2つのエクソンからなりヒトでは470アミノ酸をコードしている。これまでに、80を超える遺伝子異常が報告されており、その多くはナンセンス変異とフレームシフト変異で翻訳領域全体に認められており、いわゆるHot spotは存在しないとの記載もある。DAX-1遺伝子異