

値のばらつきの変化を(図1)に示す。コルチゾール濃度がおよそ5~10 $\mu\text{g}/\text{dl}$ の血清において、校正前日常検査法による測定値とLC/MS/MSによる測定値の差は、いずれの検体でも $\pm 2.5\mu\text{g}/\text{dl}$ 程度であった。これに対し校正後日常検査法による測定値とLC/MS/MSによる測定値の差は、 $\pm 1.5\sim 2.0\mu\text{g}/\text{dl}$ 程度に減少した。CV値も校正前は12~16%とやや高めだったが、校正後は7~12%(一検体だけ15%と高値だったが)と低下した。

技能試験でも校正後の測定値は、LC/MS/MSの測定値と相関しており、ばらつきも小さかった。対象は、コルチゾール濃度が3~9 $\mu\text{g}/\text{dl}$ と低濃度域にある4検体で、先の検討と同様7つの日常検査用コルチゾール測定キットで測定し、LC/MS/MSの測定値と比較した。いずれの検体でもCV値はほぼ10%以下だった(図2)。

このように新たに作成した低濃度域血清コルチゾール測定用標準物質により各キットで校正を行うことで、低濃度域での測定値はimmunoassayの誤差としては良好とされる $\text{CV} \leq 10\%$ を確保することが出来た。そこで我々はCV 10%の誤差を考慮し、当科で最近4年間に施行したDex抑制試験のCD/subCD診断の感度・特異度を再検討した。subCDでは、Dex 0.5mg抑制試験におけるコルチゾールのカットオフ値について、2.4~3.6までのまでの変動域を考慮すると、感度が58.6まで、特異度が75.5まで低下した。一方CDでは、同じDex 0.5mg抑制試験でコルチゾールのカットオフ値を4~6までの変動域を考慮したが、感度は100のまま変わらず、特異度も97.7と殆ど低下しなかった。Dex 1mg抑制試験においては、コルチゾールのカットオフ値1.8 $\mu\text{g}/\text{dl}$ でsubCDの数例が見落とされ、もともと感度が高い検査とは言えず、

さらに変動域を考慮すると感度・特異度ともに更に低下しまい、スクリーニングには適さない可能性があった(図3)。

## E. 結論

nonRI法でも測定値の校正によりCV 10%程度が確保された。このことから、non-RIAの測定誤差はコルチゾール値3 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 付近では $\pm 0.6\mu\text{g}/\text{dl}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 付近では $\pm 1\mu\text{g}/\text{dl}$ と考えられた。

Dex 0.5mg抑制試験は、高い感度・特異度でCD/subCDを診断でき、有用性の高い検査と考えられた。しかしnon-RIAによるコルチゾールの測定誤差を考慮すると、CDの診断には影響なかったが、subCDの診断能力がやや低下した。subCD診断の際は、測定誤差を考慮して慎重に判断する必要がある。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

- 1) Sakihara S, Kageyama K, Oki Y, Doi M, 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 syndrome. *Endocr J.* 57 (4) :331-7. 2010
- 2) Murakami H, Nigawara T, Sakihara S, Kageyama K, Yamashita M, Matsuki K, Tanabe J, Matsui J, Tamasawa N, Suda T. The frequency of type 2 diabetic patients who meet the endocrinological screening criteria of subclinical Cushing's disease. *Endocr J.* 57 (3) :267-72. 2010

図1. 日常測定法による測定値のばらつき

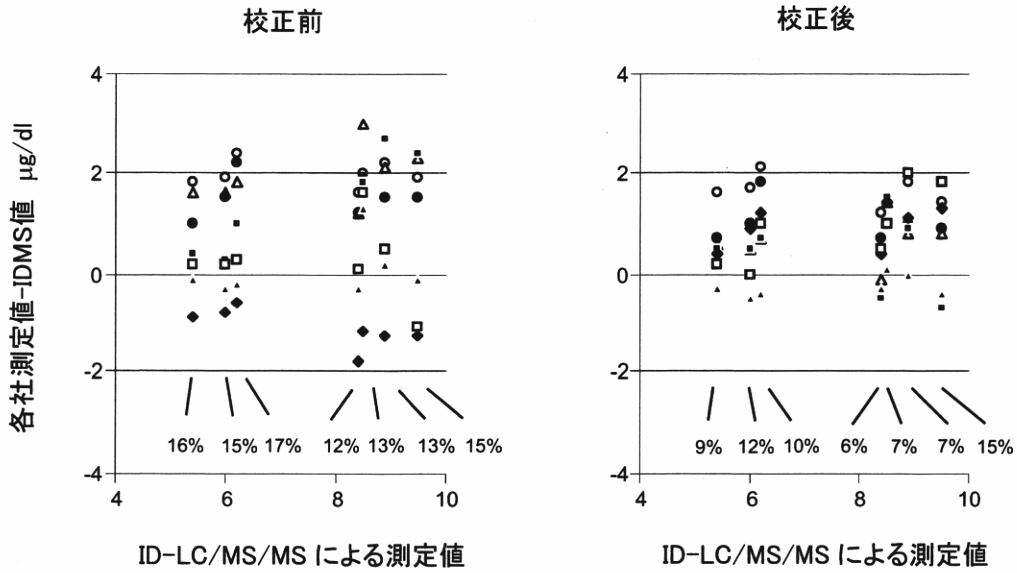


図2. 臨床検体についての日常検査法による測定値（校正後）とLC/MS/MSによる測定値の関係

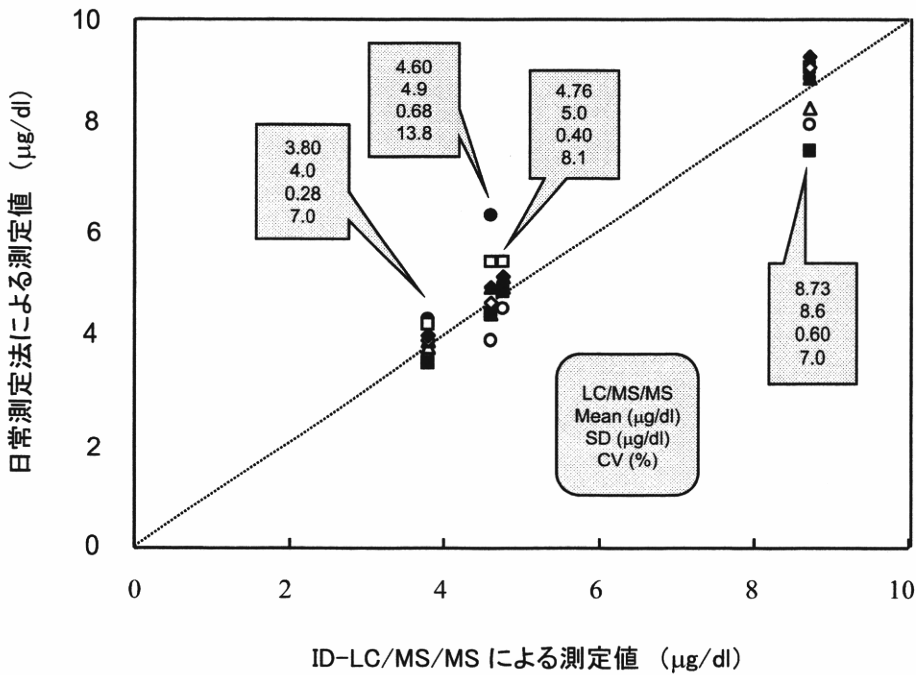
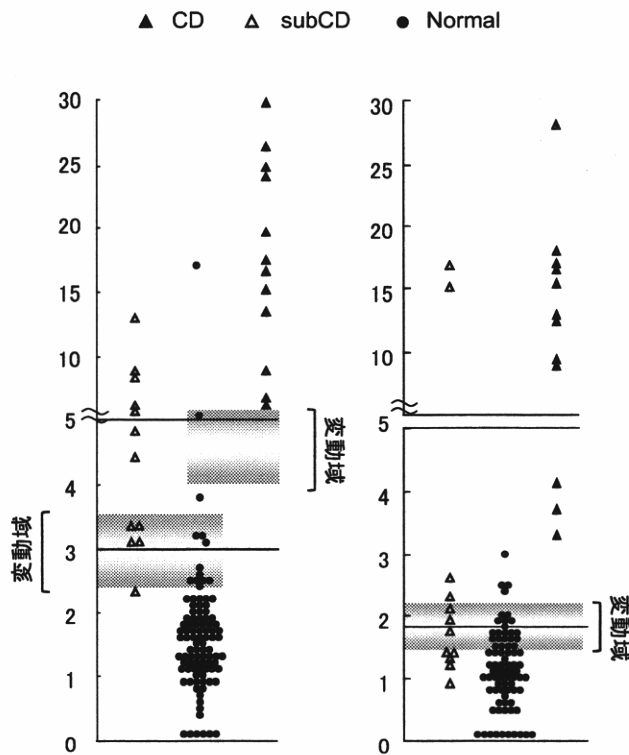


図3. Dex 抑制試験による感度・特異度



DST(0.5)による subCD 診断の感度・特異度

F 測定値	2.4	3.0	3.6
感度	91.7	91.7	58.3
特異度	75.5	93.0	96.5
陽性予測値	45.8	64.7	70
陰性予測値	98.6	98.8	96.5

DST(0.5)による CD 診断の感度・特異度

F 測定値	4.0	5.0	6.0
感度	100	100	100
特異度	97.7	97.7	98.8
陽性予測値	85.7	85.7	92.3
陰性予測値	100	100	100

DST(1)による CD / subCD 診断の感度・特異度

F 測定値	1.4	1.8	2.2
感度	79.2	75.0	66.7
特異度	69.2	87.2	80.8
陽性予測値	44.2	64.3	57.1
陰性予測値	91.5	91.9	94.0

## レプチン・CRHダブルノックアウトマウスの表現型解析

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
	岡崎 瑞穂	高知大学医学部内分泌代謝・腎臓内科
	次田 誠	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：**視床下部-下垂体-副腎系の最終産物である糖質コルチコイドが過剰になると肥満や過食を伴うクッシング症候群を呈するが、その機序は明らかにされていない。今回我々は糖質コルチコイド過剰に伴う肥満・過食の分子機序を解明するために、レプチン・CRHダブルノックアウト(DKO)マウスを作出して、その表現型および視床下部肥満関連遺伝子発現につき解析した。DKOマウスは野生型マウスと比較すると明らかな肥満を呈するが、ob/obマウスと比較すると肥満の軽減が認められ(WT 26.0±0.5, ob/ob 49.4±0.3, DKO 38.1±1.6 g)、摂食量についても同様の変化が観察された。PCRアレイによる検討では、DKOマウスではob/obマウスと比較して視床下部AgRP mRNAの減少が認められた。さらにDKOマウスにコルチコステロンを補充することにより視床下部AgRP mRNAの増加が見られた。これらの結果より、グルココルチコイド過剰による肥満・過食には視床下部AgRPの増加が関与することが示唆された。

### A. 研究目的

視床下部-下垂体-副腎系の最終産物である糖質コルチコイドが過剰になると肥満や過食を伴うクッシング症候群を呈するが、その機序の詳細は明らかにされていない。一方で、レプチン欠損により著明な肥満をきたすob/obマウスでは糖質コルチコイドの上昇が認められることから、ob/obマウスにおける肥満・過食形成にも糖質コルチコイド過剰の関与が示唆される。

今回我々は糖質コルチコイド過剰に伴う肥満・過食の分子機序を解明するために、レプチン・CRHダブルノックアウト(DKO)マウスを作出して、その表現型および視床下部肥満関連遺伝子発現につき解析した。

### B. 研究方法

ob/obマウスとCorticotropin-releasing hormone (CRH)欠損により糖質コルチコイド低下をきたすCRHノックアウトマウス(CRH-KO)との交配を行い、レプチン・CRHダブルノックアウト(DKO)マウスを作出した。

10週齢雄性DKOマウスおよびob/obマウスの体重、摂食量を比較検討した。次に、これらのマウスより視床下部組織を採取、total RNA抽出後に視床下部肥満関連遺伝子発現についてDKOマウスとob/obマウスとの間で比較検討した(PCRアレイ: Mouse Obesity, SA Biosciences)。PCRアレイについては、対照と比較して3倍以上の増加、また

は1/3以下への低下を有意と判定した。

さらにDKOマウスに対して飲水中に生理量コルチコステロン補充(10 $\mu$ g/ml $\times$ 4週間)を行った際の、体重、摂食量、視床下部肥満関連遺伝子発現の変化についても検討を行った。

### C. 研究結果

10週齢においてob/obマウスおよびDKOマウスの体重・摂食量は野生型マウスと比較して明らかな増加が認められたが、DKOマウスにおける体重・摂食量の増加はob/obマウスと比較すると有意に軽減していた(表1)。また同時に比較した野生型マウスとCRH-KOマウスとの間では体重・摂食量の差は見られなかった。

DKOマウスに対して生理量コルチコステロンを補充した検討では、対照群と比較して、体重、摂食量、脂肪重量の有意な増加が認められ、胸腺重量の減少も観察された(表2)。

PCRアレイによる検討では、DKOマウスではob/obマウスと比較して摂食促進ペプチドであるAgRP mRNAおよびgalanin mRNAの減少が認められた(図1)。またDKOマウスに対してコルチコステロン補充を行うことにより、対照群と比較してAgRP mRNAの増加が認められた(図2)。

### D. 考察

今回の検討により、レプチン・CRHダブルノックアウト(DKO)マウスはob/obマウスと比較して肥満、過食が軽減されることが明らかにされた。またDKOマウスに糖質コルチコイドを生理量補充することにより、肥満、過食の有意な促進が認められた。これらの結果より、ob/obマウスにおける肥満・過食形成の少なくとも一部には、糖質コルチ

コイド上昇が寄与するものと考えられた。以前よりob/obマウスでは血中糖質コルチコイドが高値であることが知られており、レプチンによる視床下部-下垂体-副腎系に対する抑制作用の存在が指摘されているが、その機序の詳細は明らかにされていない。この点については今後さらなる検討が必要である。

糖質コルチコイドによる過食形成の分子機序については、摂食促進ペプチドである視床下部Agouti-related protein (AgRP) や neuropeptide Y (NPY) の増加が関与するという報告が見られる。AgRPは内因性のメラノコルチン受容体アンタゴニストであり、 $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) と競合的に作用することで摂食促進作用を発現する。今回の検討では、AgRP mRNAはDKOマウスにおいてob/obマウスと比較して有意な減少、またDKOマウスへのコルチコステロン補充により有意な増加が認められた。すなわち糖質コルチコイドによる過食とAgRP発現の変化は一致していると考えられ、糖質コルチコイドによる過食形成の分子標的として、視床下部AgRPは有力な候補であると考えられた。なお有意ではないものの、NPYについてもAgRPの変化と同様の傾向が見られた(図1, 2)ことより、視床下部NPYも糖質コルチコイドの標的として矛盾しないと考えられる。

Proopiomelanocortin (POMC) および $\alpha$ -MSHは摂食調節に重要な役割を果たすことが明らかにされており、特にレプチンによる摂食抑制作用に深く関わっている。糖質コルチコイドにより下垂体POMCが負の制御を受けることは広く知られているが、視床下部POMC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、POMC mRNA発現の有意な変化は見られな

かった。

摂食促進ペプチドのひとつである galanin mRNA についても DKO マウスにおいて ob/ob マウスと比較して有意な減少が認められた(図1)が、DKO マウスに対する糖質コルチコイド補充では変化が見られなかった。糖質コルチコイドが下垂体における galanin 発現を増加させる報告はあるが、視床下部 galanin への効果は不明であり、今後の検討が必要と考えられる。

以上のことから、糖質コルチコイドによる肥満・過食の形成には、視床下部 AgRP の増加が関与する可能性が示された。今後は、DKO マウス視床下部における AgRP mRNA、AgRP 蛋白レベルについて、リアルタイム PCR、*in situ* hybridization、Western blotting などを用いた解析を追加する必要がある。

## E. 結論

今回の検討により、ob/ob マウスにおける

肥満・過食形成(の少なくとも一部)には糖質コルチコイドが必要であることが示された。また糖質コルチコイド過剰に伴う肥満・過食形成には視床下部 AgRP 増加が関与することが示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 2. 学会発表(予定)

- 1) 西山 充, 中山修一, 岡崎瑞穂, 次田 誠, 田口崇文, 岩崎泰正, 寺田典生: レプチン・CRH ダブルノックアウトマウスの表現型解析, 第84回日本内分泌学会学術総会(神戸), 2011年

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. ob/ob マウスおよび leptin/CRH-DKO マウスの体重、摂食量



	wild-type	CRH-KO	ob/ob	leptin-CRH-DKO
Body weight (g)	26.0±0.5	26.1±2.2	49.4±0.3*	38.1±1.6**
Food intake (g/day)	3.8±0.1	3.9±0.2	7.1±0.4*	4.7±0.2**
Leptin	→	→	↓↓	↓↓
Corticosterone	→	↓↓	↑	↓↓

\* p<0.05 vs. wild-type, # p<0.05 vs. ob/ob

表2. leptin/CRH-DKO マウスに対するコルチコステロン補充の効果

	leptin・CRH-DKO	leptin・CRH-DKO + Cort
Body weight (g)	38.4±1.7	44.5±2.2*
Food intake (g/day)	5.5±0.2	7.4±0.8*
Epididymal fat / BW (× 10 <sup>4</sup> )	25.7±1.2	40.2±0.7*
Thymus / BW (× 10 <sup>4</sup> )	3.0±0.2	1.8±0.2*

\*p<0.05 vs. leptin・CRH-DKO

図1. 視床下部肥満関連遺伝子発現の比較 (DKO vs.ob/ob)

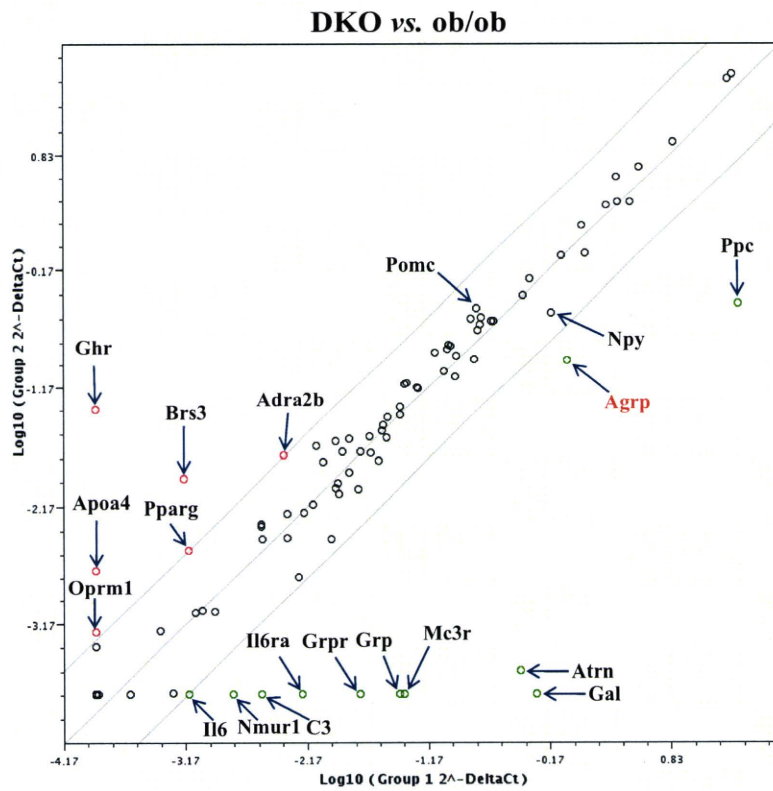
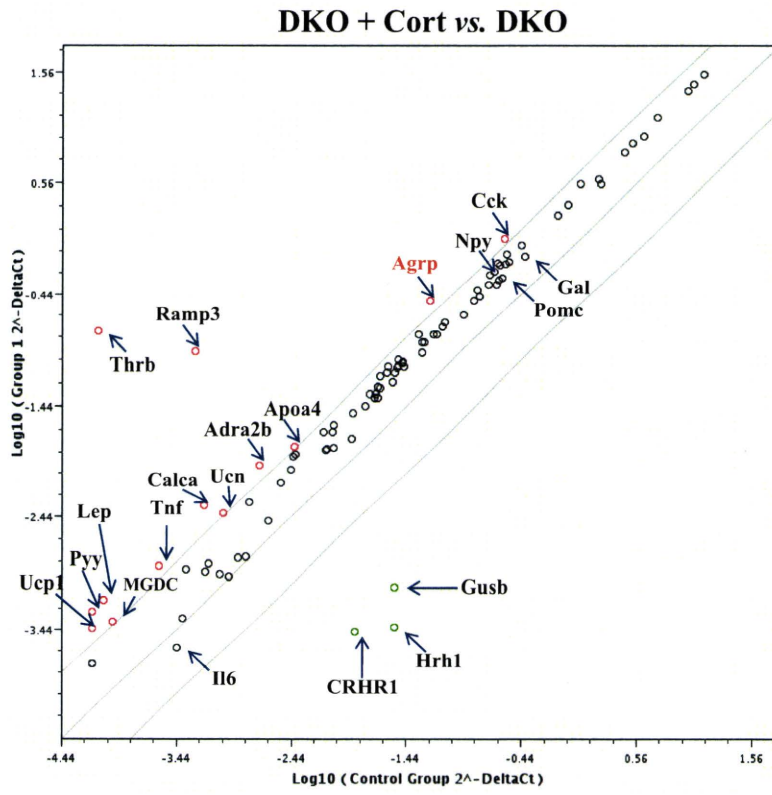


図2. 視床下部肥満関連遺伝子発現の比較 (DKO+Cort vs. DKO)



## レチノイン酸受容体 (RAR) による POMC 遺伝子発現における 転写因子 NeuroD1 および Tpit の役割

研究分担者	菅原 明	東北大学大学院医学系研究科医化学分野 東北大学大学院医学系研究科生物化学
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医化学
	松田 謙	東北大学大学院医学系研究科腎・高血圧・内分泌学
	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】レチノイン酸がクッシング病に対する治療に有効であることが報告されている。我々は一昨年の本会議において、レチノイン酸受容体 (RAR) が POMC 遺伝子発現をむしろ増加させることを報告したが、その機序は不明であったことから、以下の検討を行った。【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、RAR  $\alpha$  は転写因子 NeuroD1 と相互作用を引き起こし、さらに RAR  $\alpha$  アゴニスト Am80 は転写因子 Tpit の発現を増加させた。NeuroD1 ドミナントネガティブ変異体は Am80 による POMC 転写活性化を抑制した。Tpit 過剰発現は POMC 転写活性を増加させた。POMC プロモーターの NeuroD1 および Tpit 結合部位を変異させると Am80 による POMC 転写増加反応は消失した。【結論】RAR  $\alpha$  による POMC 遺伝子発現増加作用は、NeuroD1 と RAR  $\alpha$  の相互作用および Tpit 発現を増加させることによるものであった。

### A. 研究目的

天然のビタミン A 誘導体であるレチノイン酸 (RA) は、核内受容体である RA 受容体 (RAR) を介して生体内で多彩な作用を発揮する。RA は、クッシング病実験モデル (Páez-Pereda M, et al.: Retinoic acid prevents experimental Cushing syndrome. J Clin Invest 2001; 108: 1123-1131) およびイヌのクッシング病 (Castillo V, et al.: Retinoic acid as a novel medical therapy for Cushing's disease in dogs. Endocrinology 2006; 147: 4438-4444) において、ACTH 分泌を抑制して治療的效果を持つ可能性が報告されている。しかしながら、我々

は一昨年の本会議において、RAR が ACTH 産生細胞である AtT20 細胞における POMC 遺伝子転写活性および ACTH 分泌をむしろ増加させることを報告した。さらに我々は、昨年の本会議において、レチノイド X 受容体が RAR とは反対に POMC 遺伝子転写活性および ACTH 分泌を抑制する事を報告した。今回我々は、RAR による POMC 遺伝子転写活性亢進の分子メカニズムの検討を行った。

### 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 細胞を使用した。AtT20 細胞

における POMC mRNA 発現はリアルタイム PCR 法にて、POMC 遺伝子転写活性はラット POMC プロモーター (-703/+58)/キメラ発現ベクターを用いたルシフェラーゼアッセイにて、それぞれ検討した。AtT20 細胞から培養上清への ACTH 分泌は ELISA 法にて測定した (Poenix Pharmaceuticals)。AtT20 細胞内でのタンパク質間相互作用は、Mammalian Two-Hybrid システムを用いて検討した。レチノイドとして、合成 RAR  $\alpha$  /  $\beta$  アゴニストである Am80 を使用した。

### C. 研究結果

Am80 は、培養上清への ACTH 分泌 (CRH 存在下)、POMC の mRNA 発現、および POMC 遺伝子転写活性を著明に増加させた (data not shown)。興味深い事に、CRH と Am80 は、相乗的に POMC 遺伝子転写活性を亢進させた (図 1)。また、タイムコースの実験から、CRH は添加後 4 時間で転写活性亢進のピークに達するのに対し、Am80 は添加後 48 時間まで転写活性を徐々に増加させた (data not shown)。RAR  $\alpha$  の siRNA を用いた検討から、基礎および Am80 刺激下での POMC 遺伝子転写活性は、RAR  $\alpha$  依存性であることが明らかとなった (data not shown)。ラット POMC プロモーターの deletion mutants および point mutants を用いた検討を行ったところ、RAR  $\alpha$  は POMC 遺伝子プロモーター上における転写因子 NeuroD1 の結合部位 (E box) と Tpit の結合部位のそれぞれを介して転写亢進を誘導することが明らかとなった (data not shown)。NeuroD1 および Tpit は発生の過程における ACTH 産生細胞への分化の key molecule であり (Zhu X, et al.: Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiol*

*Rev* 2007; 87: 933–963)、ともに ACTH 産生下垂体腺腫での発現が報告されている (Oyama K, et al.: Expression of neuro D1 in human normal pituitaries and pituitary adenomas. *Mod Pathol* 2001; 14: 892–899, Tateno T, et al.: Differential gene expression in ACTH -secreting and non-functioning pituitary tumors. *Eur J Endocrinol* 2007; 57: 717–724)。そこで我々は、RAR  $\alpha$  依存性の POMC 遺伝子転写亢進における NeuroD1・Tpit の関与の有無に関して検討を行った。Am80 は Tpit の mRNA 発現を亢進させた一方で、NeuroD1 の mRNA 発現には影響を及ぼさなかった (data not shown)。さらに、Tpit の過剰発現により、POMC 遺伝子転写活性の増加が認められた (data not shown)。一方、Mammalian Two-Hybrid システムを用いた検討にては、Am80 は NeuroD1 と RAR  $\alpha$  との間での相互作用を誘導する事が明らかとなったが、Tpit と RAR  $\alpha$  の間での相互作用は認められなかった (data not shown)。NeuroD1 過剰発現が Am80 依存性の POMC 遺伝子転写亢進を増強させた一方で、NeuroD1 ドミナントネガティブ変異体の過剰発現は、Am80 依存性の POMC 遺伝子転写亢進を抑制した (data not shown)。

### D. 考察

以上の結果から、図 2 に示される分子機構が考えられた。1) RAR  $\alpha$  は Tpit の発現を増加させることにより、POMC プロモーター上への Tpit 結合の増加を介して POMC 転写活性を上昇させる (Tpit up-regulation)。一方、2) RAR  $\alpha$  は、Am80 依存性に NeuroD1 との間でのタンパク質間相互作用を誘導することにより、POMC プロモーター上の NeuroD1 結合部位を介して POMC 転写活性を上昇させ

る。1)と2)の両者の作用が相俟って、RAR  $\alpha$  依存性のPOMC遺伝子転写亢進が招来されるものと考えられた。

## E. 結論

RAR  $\alpha$  はNeuroD1およびTpitを介して、POMC遺伝子転写活性を亢進させる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表(2010～2011年)

#### 英文雑誌

- 1) 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.
- 2) Zhou L, Zhang R, Wang L, Shen S, Okamoto H, Sugawara A, Xia L, Wang X, Noguchi N, Yoshikawa T, Uruno A, Yao W, Yuan Y. Up-regulation of REG I  $\alpha$  accelerates tumor progression in pancreatic cancer with diabetes. *Int J Cancer.* 2010; 127: 1795-1803.
- 3) Aoki S, Hoshi K, Kawakami J, Sato K, Sato K, Mori K, Sugawara A, Saito Y, Yoshida K. Assisting the diagnosis of Graves' hyperthyroidism with pattern recognition methods and a set of three routine tests parameters, and their correlations with free T4 levels: extension to male patients. *Biomed Pharmacother.* 2010 Nov 4. [Epub ahead of print]
- 4) Sugawara A, Kudo M, Saito A, Matsuda K, Uruno A, Ito S. Novel effects of beraprost sodium on vasculatures. *Int Angiol.* 2010; 29

(2 Suppl): 28-32.

- 5) Sugawara A, Uruno A, Kudo M, Matsuda K, Yang CW, Ito S. Effects of PPAR  $\gamma$  on hypertension, atherosclerosis, and chronic kidney disease. *Endocrine J.* 2010; 57: 847-852.
- 6) Uruno A, Matsuda K, Noguchi N, Yoshikawa T, Kudo M, Satoh F, Rainey WE, Hui XG, Akahira JI, Nakamura Y, Sasano H, Okamoto H, Ito S, Sugawara A. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  suppresses CYP11B2 expression and aldosterone production. *J Mol Endocrinol.* 2011; 46: 37-49.

#### 和文雑誌・著書

- 1) 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  $\gamma$  およびCa<sup>2+</sup>/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. *ACTH related peptides* 20: 36-37, 2010
- 2) 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. *ACTH related peptides* 20: 25-26, 2010
- 3) 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: レチノイド受容体によるPOMC遺伝子発現調節機構. *ACTH related peptides* 21: 19-20, 2010
- 4) 田島結実, 工藤正孝, 村上 治, 森本 玲, 石井智徳, 宇留野晃, 菅原 明, 佐藤文俊, 伊藤貞嘉: SLEに合併した自己免疫性下垂体炎の2例. *ACTH related peptides* 21: 113-116, 2010

- 5) 菅原 明, 宇留野晃, 松田 謙, 工藤正孝, 伊藤貞嘉: PPAR  $\gamma$  と生活習慣病. ホルモンと臨床 58: 143-148, 2010
- 6) 菅原 明: その他の内分泌疾患. 高久史麿ほか編: 六訂版 家庭医学大全科. Pp.2099-2100, 法研, 2010
- 7) 菅原 明: ビタミンの病気. 高久史麿ほか編: 六訂版 家庭医学大全科. Pp.2100-2106, 法研, 2010
- 8) 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21年度 総括・分担研究報告書: 48-54, 2010
- 9) 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21年度 総括・分担研究報告書: 55-61, 2010
- 10) 菅原 明: ビタミン欠乏症・過剰症・依存症. 吉岡成人編: 今日の治療指針2011年版-私はこう治療している. Pp.659-660, 医学書院, 2011
2. 学会発表(2010~2011年)
- 国際学会
- 1) Uruno A, Matsuda K, Noguchi N, Yoshikawa T, Kudo M, Satoh F, Rainey WE, Okamoto H, Ito S, Sugawara A. PPAR  $\gamma$  down-regulates CYP11B2 expression and aldosterone production in adrenocortical carcinoma H295R cells by suppression of Ca<sup>2+</sup>-CaMK signals. International Symposium for Aldosterone and Related Substances in Hypertension. Sendai 3/23-24/2010
- 2) Kudo M, Satoh F, Morimoto R, Murakami O, Sugawara A, Uruno A, Yamashita K, Numazawa M, Ito S. Measurements of aldosterone in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS): comparison to radioimmunoassays. International Symposium for Aldosterone and Related Substances in Hypertension. Sendai 3/23-24/2010
- 3) Kudo M, Satoh F, Morimoto R, Murakami O, Sugawara A, Uruno A, Yamashita K, Numazawa M, Ito S. Measurements of aldosterone in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS): comparison to radioimmunoassays. 14th International Congress of Endocrinology. Kyoto 3/28/2010
- 4) Kudo M, Sugawara A, Saito A, Satoh F, Uruno A, Ito S. Prostacyclin analogs rapidly stimulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through cAMP/PKA pathway in vascular endothelial cells. 14th International Congress of Endocrinology. Kyoto 3/30/2010
- 5) Uruno A, Sugawara A, Matsuda K, Iwasaki Y, Saito A, Kudo M, Ito S. Role of retinoic acid receptor on ACTH secretion and POMC gene expression in AtT20 corticotroph cells. 14th International Congress of Endocrinology. Kyoto 3/28/2010
- 6) Uruno A, Matsuda K, Noguchi N,

- Yoshikawa T, Kudo M, Satoh F, Rainey WE, Ito S, Okamoto H, Sugawara A. Negative regulation of CYP11B2 expression and aldosterone production in adrenocortical carcinoma H295R cells by PPAR  $\gamma$ . 14th International Congress of Endocrinology. Kyoto 3/29/2010
- 7) Kudo M, Satoh F, Morimoto R, Murakami O, Sugawara A, Uruno A, Yamashita K, Numazawa M, Ito S. Measurements of aldosterone and cortisol in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS): comparison to radioimmunoassays or immunoassays. The Endocrine Society 92nd Annual Meeting. San Diego 6/20/2010
- 8) Yoshikawa T, Takayanagi S, Noguchi N, Uruno A, Okamoto H, Sugawara A, Yanai K. Role of heparan sulfate in glucose-induced insulin secretion in MIN6 cells. American Diabetes Association 70th Scientific Sessions. Orlando 6/26/2010
- 9) Yoshikawa T, Takayanagi S, Noguchi N, Zhang D, Ariyama Y, Uruno A, Okamoto H, Sugawara A, Yanai K. Role of heparan sulfate in glucose-induced insulin secretion in mouse pancreatic  $\beta$ -cell line MIN6 cells. 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology. Copenhagen 7/20/2010
- 10) Kaneiwa T, Yamada S, Sugahara K, Takahashi I, Noguchi N, Nata K, Okamoto H, Sugawara A. Structural characterization of heparan sulfate in the Ext13 knockout mice and the pancreatic  $\beta$ -cell specific Ext13 knockout mice. 25th International Carbohydrate Symposium. Tokyo 8/2/2010
- 11) Peterson K, Guo X, Haque R, Mondal D, Sugawara A, Petri W. The role of regenerating gene 1 in *Entamoeba histolytica* colitis. 48th Annual Meeting of Infectious Diseases Society of America. Vancouver 10/21-24/2010
- 国内学会(2009～2010)**
- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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: レチノイド受容体によるPOMC遺伝子発現調節機構. 第21回間脳・下垂体・副腎系研究会 2010年3月27日 東京
- 4) 田島結実, 工藤正孝, 村上 治, 森本 玲, 石井智徳, 宇留野晃, 菅原 明, 佐藤文俊, 伊藤貞嘉: SLEに合併した自己免疫性下垂体炎の2例. 第21回間脳・下垂体・副腎系研究会 2010年3月27日 東京
- 5) 菅原 明, 宇留野晃, 工藤正孝, 箱田明子, 伊藤貞嘉: レチノイドと血管系. 第13回循環器再生医療研究会 東京 5/22/2010
- 6) 菅原 明, 伊藤貞嘉, 西條 茂: がん患

者における糖尿病合併症例—宮城県立がんセンターにおける現況—, 第53回日本糖尿病学会年次学術集会 岡山5/27-29/2010

7.) 菅原 明, 伊藤貞嘉: アリスキレンの追加投与が有効であった高齢者高血圧の1

例. 第33回日本高血圧学会総会 福岡 10/15-17/2010

8) 菅原 明, 伊藤貞嘉: バルサルタン/ヒドロクロロチアジド合剤への変更が有効であった高齢者高血圧の1例. 第33回日本高血圧学会総会 福岡 10/15-17/2010

図 1. Am80とCRHの相乗的POMC転写亢進作用

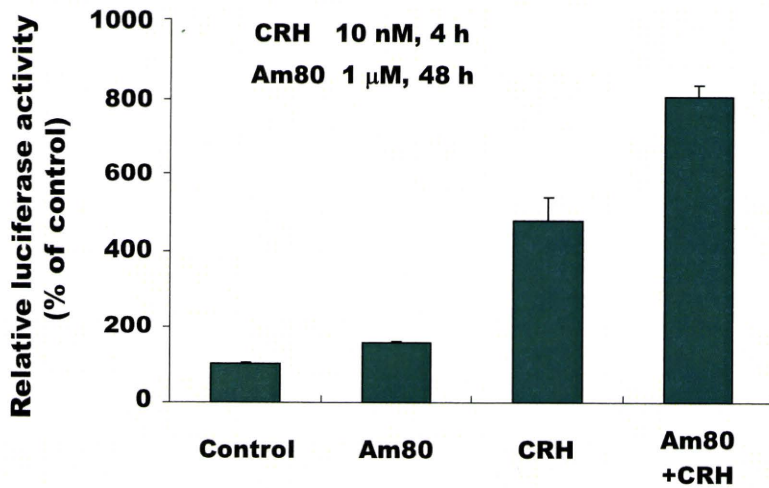
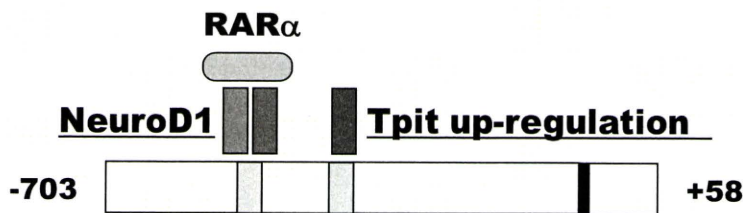


図 2. RAR αによるPOMC遺伝子転写亢進機構



## Corticotroph hyperplasiaによる 高齢 Cushing 症候群の一例

研究分担者	柳瀬 敏彦	福岡大学医学部内分泌・糖尿病内科学
研究協力者	明比 祐子	福岡大学医学部内分泌・糖尿病内科学
	辰元 亜希	福岡大学医学部内分泌・糖尿病内科学
	吉田 亮子	福岡大学医学部内分泌・糖尿病内科学
	二村 聡	福岡大学医学部病理部
	重川 誠二	福岡大学医学部脳神経外科
	継 仁	福岡大学医学部脳神経外科
	鍋島 一樹	福岡大学医学部病理部
	井上 亨	福岡大学医学部脳神経外科

**研究要旨:** ACTH依存性のCushing症候群の病因のほとんどは、異所性ACTH産生腫瘍とACTH産生下垂体腺腫に大別される。しかしながら、極めて稀にcorticotroph hyperplasiaの報告があり、異所性CRF産生腫瘍を病因とする症例が多いが、病因不明の症例もありCRF過剰産生を介さない病態の可能性もある。本症例は72歳の女性で、ACTH依存性のCushing症候群と診断した。内分泌学的負荷試験および画像検査の結果、ACTH産生下垂体腺腫と診断し、経鼻的下垂体腫瘍摘出術を施行したが、高コルチゾール血症は改善せず、緑膿菌による敗血症性ショックで死亡した。剖検で、下垂体前葉細胞の40～50%にACTH陽性細胞を認め、下垂体全体にまだらだがび漫性に分布していた。さらに胞巣構造が保たれていたことより、corticotroph hyperplasiaと診断した。血中CRHは正常範囲で、下垂体からのCRF産生は免疫染色より否定され、明確な病因は不明であった。

### A. 研究目的

今回、ACTH依存性のCushing症候群と診断し、剖検でcorticotroph hyperplasiaが疑われた症例を経験した。CRH免疫染色等の結果をもとに病因について文献的考察を踏まえ、検討した。

### B. 症例呈示

症例は72歳、女性。46歳時より高血圧、糖尿病で内服加療していた。200X年3月頃より全身倦怠感や下腿浮腫が出現。200X年8月頃より口内炎、急激な四肢近位筋の筋力

低下を自覚し、歩行困難となり、また同時期より血圧および血糖のコントロールが徐々に悪化した。中心性肥満、満月様顔貌を呈し、白血球数増多、好酸球消失、低カリウム血症、高コルチゾール血症を認めたため、200X年9月精査目的で入院となった。現症は、身長156cm、体重66.4 kg、BMI27.0 kg/m<sup>2</sup>。降圧剤服用下で血圧174/90mmHg。中心性肥満、皮膚の萎縮と溢血、満月様顔貌を認め、臀部と四肢近位筋は著明に委縮していた。口腔内には白斑やう歯を認めた。

入院時検査成績では、白血球数16,200/ $\mu$ l

と増加し、分画は好酸球とリンパ球の減少を認めた。生化学検査上、ALT 51 IU/l、ALP 725 IU/l、 $\gamma$  GTP 401 IU/lと肝逸脱酵素・胆道系酵素が上昇し、K製剤内服下でK 2.8 mEq/lと低下していた。また空腹時血糖270 mg/dl、HbA1c 9.8%と著明高値を認めた。内分泌学的検査では、血漿ACTH 223 pg/ml、血清コルチゾール54.9  $\mu$ g/dlと上昇し、尿中17-OHCS 41 mg/日、尿中17-KS 17.9 mg/日、尿中遊離コルチゾール1491  $\mu$ g/日と高値を認め、ACTH依存性の高コルチゾール血症の所見であった。また後日測定した入院時の血中CRFは10.2 pg/ml(基準値3.2~14.7三菱化学、RIA)と正常範囲内であった。

ACTHとコルチゾールの日内変動は消失し、デキサメタゾン1 mgおよび8 mg抑制試験のいずれでも抑制されず(表1)、コルチゾールの自律性分泌を認めた。

異所性ACTH産生腫瘍とCushing病の鑑別のため、CRH負荷とDDAVP負荷試験を行い、CRH負荷ではACTH1.4倍、コルチゾール1.24倍の増加反応をDDAVP負荷ではACTH1.9倍、コルチゾール1.33倍の増加を認め、いずれもCushing病を示唆する所見であった(図1、2)。またACTH以外の下垂体前葉系ホルモンについては、GRF + TRH + GnRHの3者負荷に対し、PRL以外のGH、TSH、LH、FSHはいずれも低反応を示し、高コルチゾール血症に伴う病態と考えられた。下垂体MRIでは、T1強調画像で下垂体左側部に造影効果の弱い低信号領域を認め、dynamic MRIで、同部位での造影効果のなだらかな立ち上がりが確認され、微小腺腫が疑われた(図3)。また胸腹部造影CT、消化管内視鏡、PET-CTで明らかな腫瘍性病変は認めず、下垂体微小腺腫によるCushing病と診断した。200X年11月当院脳神経外科にて経鼻的下垂

体腫瘍摘出術を施行したが、術後、ACTHとコルチゾールの低下は認めず、むしろ増悪を示した。術前より抗真菌剤、ST合剤は投与していたが、肺炎、肺塞栓を併発し、ICU管理下での治療にて軽快した。引き続き高コルチゾール血症に対して、メチラポン1.5g/日の投与を開始したが、投与開始日に緑膿菌による敗血症性ショックで死亡した。

### C. 病理結果

下垂体を左から7枚にスライスし、各断面でACTH免疫染色を施行した(図4)。各スライスで下垂体前葉細胞の40~50%がACTH陽性細胞であり、また分布はまだらだがびまん性に認めた。さらに銀染色ではACTH陽性細胞の胞巣構造が保たれており(図5)、corticotroph hyperplasiaが疑われた。同疾患の報告は稀だが、原因として異所性CRF産生腫瘍の報告がある。本症例では、さまざまな画像検査を施行したが胸腹部に腫瘍性病変を認めず、また血中CRF値も正常範囲内であった。下垂体内のCRF産生病変を疑い、LSBio社のヒトCRF抗体(C末端のペプチドに対するポリクローナル抗体)を用いCRF免疫染色を追加施行したが、前葉に陽性細胞を認めなかった。

### D. 考察

本症例は高齢のCushing病であり、病状が比較的急激に進行し、入院当初は異所性ACTH産生腫瘍を疑った。しかしながら、CRFやDDAVP負荷試験、PETを含む様々な画像検査の結果より、異所性ACTH産生腫瘍は否定的で、最終的には下垂体全体にACTH陽性細胞を40~50%認めた病理組織所見により、corticotroph hyperplasiaと診断した。通常、ACTH産生細胞は下垂体前葉

細胞の15～20%であり、その2/3は中間葉に存在すると報告されている<sup>1)</sup>。corticotroph hyperplasiaの場合、結節性、びまん性に下垂体の一部または全体に及ぶものがあり、腺腫と異なる点は正常な組織構造が保たれていることである。病因としては、Addison病などを除くと、異所性CRF産生腫瘍が挙げられ、甲状腺髄様癌、前立腺癌、肺小細胞癌、神経節(細胞)腫瘍、気管支カルチノイド、膵島腫瘍、下垂体腺腫などの報告がある<sup>2, 3)</sup>。CRFは生理的に様々な臓器で産生されることが知られており、CRFの血中濃度は視床下部や産生腫瘍由来のみを反映しているわけではないが、これまで報告された多くの産生腫瘍では、血中濃度がやはり高値であり、正常範囲の本例で、末梢臓器の異所性CRF産生腫瘍の存在は考えにくい。

PET等の画像検査においても末梢臓器に腫瘍性病変は認められず、病理学的には下垂体内にはCRF陽性細胞は認めなかった。本症例のcorticotroph hyperplasiaの発症機序は明確ではないが、下垂体原発に発症した可能性も否定できない。corticotroph hyperplasiaはmultifocal hyperplasia typeが多いとされる<sup>4)</sup>。興味深いことにACTHを産生するadenomaとhyperplasiaが併存症例の存在<sup>5)</sup>から、adenomaがhyperplasiaから発生する可能性も示唆されており、病因を考える上で、大変、興味深い。

## E. 結論

高齢発症のACTH依存性Cushing症候群を経験した。病理学的にはcorticotroph hyperplasiaの稀な一例であったが、病因として種々の画像検査およびCRF免疫染色で、CRFの過剰産生を示唆する所見を認めなかった。今後、症例の集積により、corticotroph

hyperplasiaの病因の解明が期待される。

## F. 参考文献

- 1) McNicol A.M, Perez E.C.: Aspects of anterior pituitary growth, with special reference of corticotrophs. Pituitary, 1:257-268, 1999
- 2) Zarate A, Kovacs K et al.: ACTH and CRF-producing bronchial carcinoid associated with Cushing's syndrome. Clin Endocrinol, 24 (5):523-529, 1986
- 3) Suda T.: Synthesis and release of CRF and ACTH in ectopic CRF/ACTH-producing tumors. Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi. 70 (1):17-24, 1994.
- 4) Horvath E, Kovacs K et al.: Pituitary hyperplasia. Pituitary, 1:169-180, 1999
- 5) Haap M, Gallwitz B et al.: Cushing's disease associated with both pituitary microadenoma and corticotroph hyperplasia. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 117:289-293, 2009.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yoh J, Nishi Y, Hosoda H, Tajiri Y, Yamada K, Yanase T, Doi R, Yonemot K, Kangawa K, Kojima M, Tanaka E, Kusukawa J Plasma levels of n-decanoyl ghrelin, another acyl- and active-form of ghrelin, in human subjects and the effect of glucose- or meal-ingestion on its dynamics. Regul Pept in press
- 2) Kwintkiewicz J, Nishi Y, Yanase T, Giudice LC. Peroxisome Proliferator Activated Receptor-gamma Mediates Bisphenol A Inhibition of FSH-Stimulated IGF-1, Aromatase, and Estradiol in Human

- Granulosa Cells. *Environ Health Perspect.* 18 (3) :400-406, 2010
- 3) Nagaishi R, Akehi Y, Ashida K, Higuchi-Tubouchi K, Yokoyama H, Nojiri T, Aoki M, Anzai K, Nabeshima K, Tanaka M, Ono J, Yanase T. Acute inflammatory syndrome and intrahepatic cholestasis caused by an interleukin-6-producing pheochromocytoma with pregnancy. *Fukuoka Acta Med.* 101 (1) :10-18, 2010
  - 4) Qiu Y, Yanase T, Hu H, Tanaka T, Nishi Y, Liu M, Sueishi K, Sawamura T, Nawata H. Dihydrotestosterone suppresses foam cell formation and attenuates atherosclerosis development. *Endocrinology* 151:3307-16, 2010
  - 5) Miyazawa M, Yasuda M, Fujita M, Hirabayashi K, Hirasawa T, Kajiwara H, Muramatsu T, Miyazaki S, Harasawa M, Matsui N, Ogane N, Murakami M, Mikami M, Yanase T, Osamura RY. Granulosa cell tumor with activated mTOR-HIF-1 $\alpha$ -VEGF pathway. *J Obstet Gynaecol Res* 36 (2) :448-53, 2010
  - 6) Zhang Y, Huang Q, Cheng JC, Nishi Y, Yanase T, Huang HF, Leung PC. Homeobox A7 increases cell proliferation by up-regulation of epidermal growth factor receptor expression in human granulosa cells. *Reprod Biol Endocrinol* 14: 8:61, 2010
  - 7) Bao B, Jiang J, Yanase T, Nishi Y, Morgan JR. Connexon-mediated cell adhesion drives microtissue self-assembly. *FASEB J.* (in press)
  - 8) Akehi Y, Mitsuyoshi Y, Tatsumoto A, Yoshida R, Ohkubo K, Kudo T, Ashida K, Anzai K, Yamashita T, Kawashima H, Ono J, Yanase T. Serum gamma-glutamyltransferase, triglyceride and total cholesterol are possible prediabetic risk markers in young Japanese men. *Endocrine J* 57 : 981-989, 2010
  - 9) Nawata H, Watanabe T, Yanase T, Nomura M, Ashida K, Min L, Fan W. Sex hormone and neuroendocrine aspects of the metabolic syndrome. *Prog Brain Res* 182:175-87, 2010
  - 10) 柳瀬敏彦, 蘆田健二, 明比祐子. 特集「高血圧治療Up-Date」[二次性高血圧：内分泌高血圧としての原発性アルドステロン症]. *Angiology Frontier* 9: 18-22, 2010
  - 11) 柳瀬敏彦. 副腎性器症候群. 今日の治療指針 2010 pp631, 2010
  - 12) 柳瀬敏彦, 蘆田健二, 明比祐子. III. 内分泌 B. 臨床分野での進歩「4. アンチエイジングとホルモン」. *Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌* 2010 pp242-245, 2010
  - 13) 坂井義之, 柳瀬敏彦. 特集：すべての医師のための骨粗鬆症診療ガイド2010「ステロイド性骨粗鬆症」. *総合臨床* 59:552-557, 2010
  - 14) 柳瀬敏彦, 村瀬邦崇. 特集・アンチエイジング医学の進歩 アンチエイジングとしてのホルモン補充療法：GH, DHEA, テストステロン. *臨床と研究* 87:515-520, 2010
  - 15) 高柳涼一, 明比祐子, 柳瀬敏彦：Subclinical Cushing症候群の診断基準と臨床的意義. *医学のあゆみ* 232:887-891, 2010
  - 16) 明比祐子, 蘆田健二, 柳瀬敏彦. 特集：内分泌疾患におけるEvidenceに基づいた治療とは？原発性副腎不全におけるミネラルコルチコイド補充療法. *内分泌・糖尿病・代謝内科* 30:456-460, 2010

2. 学会発表

会(名古屋)2010年11月27日

- 1) 柳瀬敏彦, ステロイド性糖尿病の病態と治療. 第10回日本内分泌学会九州地方会(鹿児島) 2010年8月28日
- 2) 明比祐子, 柳瀬敏彦, 慢性副腎皮質機能低下症に対する補充療法とQOL評価. 第18回日本ステロイドホルモン学会学術集

I. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし

表1.

1) ACTH・コルチゾール 日内変動

	7時	16時	23時
ACTH (pg/ml)	223	216	214
コルチゾール (μg/dl)	54.9	50.1	49.3

2) デキサメタゾン抑制試験 (1mg・8mg)

	前	1mg	8mg
ACTH (pg/ml)	214	229	246
コルチゾール (μg/dl)	49.3	46.5	58.9

図1. CRH負荷試験

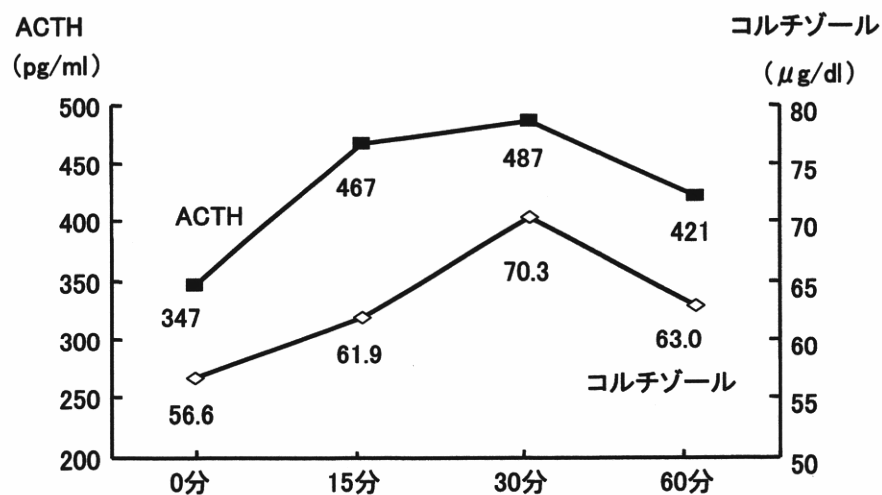


図2. DDAVP 負荷試験

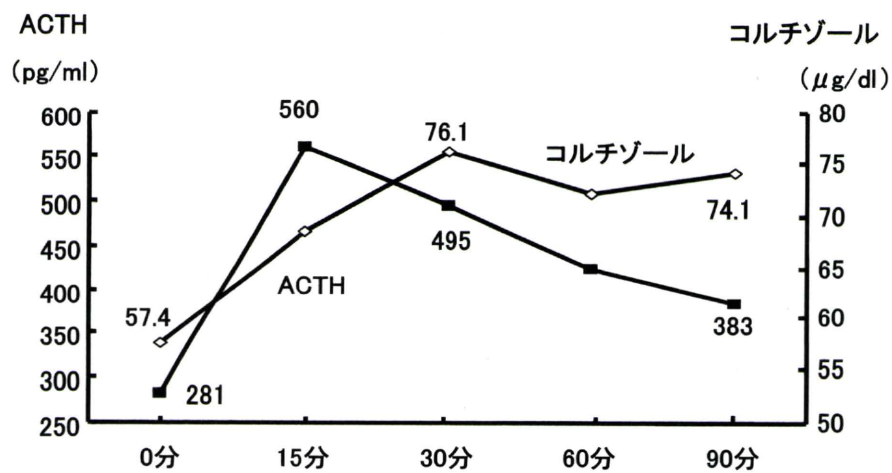


図3. 下垂体 Dynamic MRI

