

図4. 下垂体ACTH免疫染色

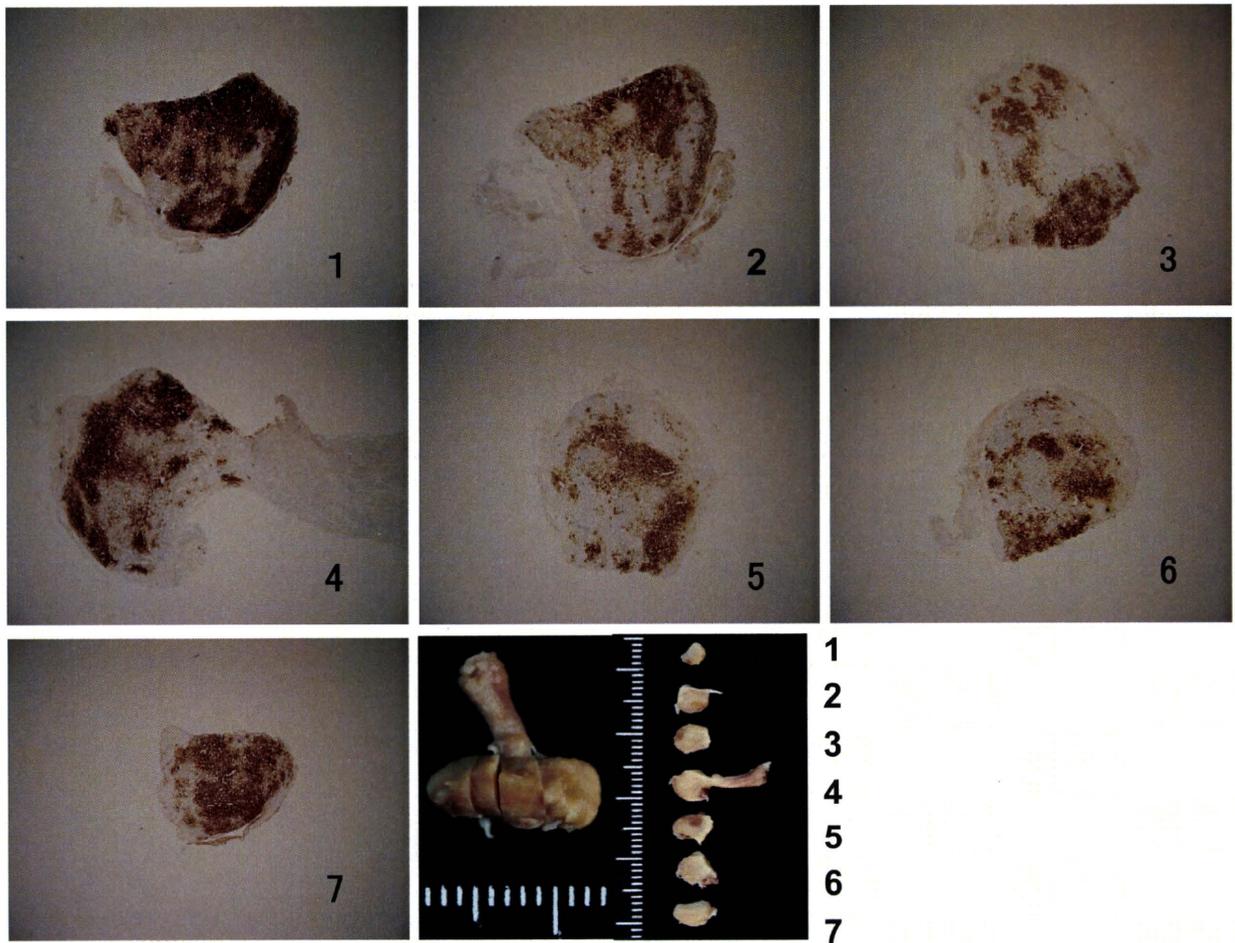
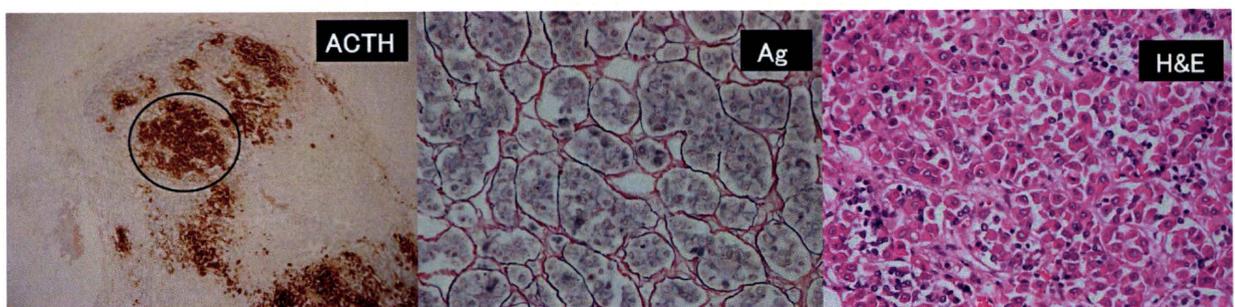


図5. 下垂体前葉のACTH陽性部位のHE染色と銀染色(Ag)



小児のGHRP2負荷試験 —HPA系の評価における有用性—

研究分担者 横谷 進 国立成育医療研究センター第一専門診療部
研究協力者 堀川 玲子 国立成育医療研究センター内分泌代謝科

研究要旨: 小児の間脳視床下部副腎系の評価は、現在インスリン負荷試験(ITT)、CRF負荷試験(CRFT)、メチラポン負荷試験が用いられているが、いずれも負担のある検査である。そこで、より簡便で負担の少ない評価方法として、GHRP2を用いた負荷試験の有用性を検討した。正常低身長児と頭蓋内腫瘍症例に対しGHRP2負荷を行い、コルチゾールとACTHを測定した。GHRP2に対し、ACTH、コルチゾールは上昇反応を示し、CRFテストの頂値とGHRP2負荷の頂値はいずれも有意な正の相関を示した。続発性副腎不全症例では両負荷試験の結果が一致しており、GHRP2負荷試験のHPAaxis評価における有用性が小児においても示された。

A. 研究目的

小児の間脳視床下部副腎系の評価は、現在インスリン負荷試験(ITT)、CRF負荷試験(CRFT)、メチラポン負荷試験が用いられている。ITTは低血糖を伴うため、小児にとって負担が大きい。CRFTはより生理的な刺激であるが、2時間半を要し、視床下部障害を見逃す可能性がある。そこで、より簡便で負担の少ない評価方法として、GHRP2を用いた負荷試験の有用性を検討した。

B. 研究方法

【対象と方法】

24名の頭蓋内腫瘍症例と59名の特発性低身長児、83名の小児を対象とした。

特発性低身長児は、内分泌学的に異常のない者であり、正常コントロールとした。

GHRP2負荷試験は朝空腹時に床上安静を保ち行った。前腕に留置針を挿入し、0からGHRP2 2 μ g/kg体重(上限100 μ g)静脈内投与後60分まで15分ごとに採血を行った。検体は氷上保存し、冷却遠心後ACTH、コルチゾール、成長ホルモンを測定した。

ル、成長ホルモンを測定した。

同じ対象にCRFテストを行った。CRFテストは既報の方法で行い、ACTH,CRFを測定した。

C. 研究結果

1) 低身長児におけるGHRP2テストの結果

低身長児においてACTHの頂値は13.5~532 pg/mlに分布した。ACTHの頂値/基礎値の比は1~28、頂値と基礎値の差は0.5から513 pg/mlだった。コルチゾールの頂値は12~29.7 μ g/dlに分布し、頂値/基礎値比は1~10.6、頂値と基礎値の差は0~18.9 μ g/dlだった。頂値に至る時間は、ACTHが89.1%で15分、コルチゾールは15分が36.9%、30分が52.2%であった。

CRFテストとの比較では、ACTHにおいては外れ値をスミルノフ検定にて除外した後でも $R^2=0.1645$ 、 $P=0.0026$ の有意な正の相関を示した。

コルチゾールは $R^2=0.1976$ 、 $P=0.0005$ とこれも有意な正の相関を示した。

4例がGHRP2とCRFテストでACTHの外れ値(集団から特に離れた値)を示した。2例はGHRP2にてACTH頂値が350、532 pg/ml (CRFにて408, 41.2pg/ml)、2例はCRFにてACTH頂値が261, 475pg/ml (GHRP2ではそれぞれ37.1, 25.3pg/ml)だった。それぞれの症例の背景を見ると、いずれも3~5歳の低年齢児で、両方の負荷試験でACTHが高値であった症例は片側の神経芽細胞腫による副腎摘出術後であった。他の3例は特発性低身長児であるが、一例はCorpus callosumの低形成、一例はケトン性低血糖症の合併があった。

ACTH頂値は、年齢と共に低下する傾向があり、コルチゾールは年齢と共に有意に低下した。

2) 頭蓋内腫瘍症例におけるGHRP2テストの反応性

頭蓋内腫瘍(ICT)のある症例では、ACTHの反応頂値はCRFテストと有意な相関は認めなかったが、コルチゾールの反応は外れ値を除外すると有意な正の相関を示した($R^2=0.3932$, $P=0.0041$)。

続発性副腎不全が明らかである症例3例では、コルチゾール共にGHRP2負荷に対する反応は低値で、CRFテストと一致した。

D. 考察

GHRP2負荷試験は、副作用もなく、短時間で終わるため、小児にとって負担の少ない負荷試験である。小児においてもGHRP2負荷によりACTH-Cortisolが上昇することが確認された。年少児ではより高反応を示した。GHRP2に対する反応性が高いか、空腹や採血のストレスの影響、可能性が考えられた。

GHRP2は視床下部性の刺激と考えられているが、ACTHの反応性がCRFテストの結

果と一致しない症例では、下垂体性の刺激も有すると考えられた。

GHRP2テストは、HPA axisを評価する上で、CRH負荷と同等の有用性が考えられるが、基準値の設定はさらに検討が必要である。また、HPAaxisは、いずれの負荷試験でも単独で評価するよりも、尿中フリーコルチゾールとの組み合わせや他の負荷試験との組み合わせで総合的に評価することが望ましいと思われる。ただし、視床下部下垂体腫瘍の術前など、一般状態不良の症例においてはGHRP2負荷試験は負担も少なく、簡便に行える評価法である。

E. 結論

小児におけるHPA axis評価において、GHRP2負荷試験の有用性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究成果発表

1. 論文発表

- 1) Dateki S, Kosaka K, Hasegawa K, Tanaka H, Azuma N, Yokoya S, Muroya K, Adachi M, Tajima T, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, Sato N, Fukami M, Ogata T: Heterozygous orthodenticle homeobox 2 mutations are associated with variable pituitary phenotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(2):756-764
- 2) Dateki S, Fukami M, Uematsu A, Kaji M, Iso M, Ono M, Mizota M, Yokoya S, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, Ogata T: Mutation and gene copy number analyses of six pituitary transcription factor genes in 71 patients with combined pituitary

hormone deficiency: identification of a single patient with LHX4 deletion. J Clin Endocrinol Metab 2010;95 (8) ;4043-4047

3) Isojima T, Yokoya S, Ito J, Naiki Y, Horikawa R, Tanaka T: Proposal of New Auxological Standards for Japanese Girls with Turner Syndrome. Clinical Pediatric Endocrinology 2010;19;69-82

2. 原著 (和文)

1) 藤枝憲二, 田中敏章, 横谷進, 清野佳紀, 戸莉創, 三科潤: 日本人SGA性低身長症児に対する2年間の成長ホルモン治療の有効性・安全性評価. 小児科臨床 2010; 63(1): 157-168

2) 望月貴博, 藤田敬之助, 横谷進: 成人

Turner症候群の長期フォローアップについて 本人・家族の会アンケートによる現状調査. 日本小児科学会雑誌 2010; 114: 43-47

3) 田中敏章, 伊藤純子, 神崎晋, 島津章, 田中弘之, 寺本明, 永井敏郎, 長谷川奉延, 羽二生邦彦, 藤田敬之助, 堀川玲子, 向井徳男, 和田尚弘, 横谷進: 成長ホルモン分泌不全性低身長症における成長ホルモンによる前思春期の治療開始年齢別治療効果. 日本成長学会雑誌 2010; 16: 23-29

4) 横谷進, 堀川玲子, 内木康博, 田中敏章: 成長ホルモンによる短期的成長促進作用とコレステロール代謝作用. 日本成長学会雑誌 2010; 16: 77-83

図1

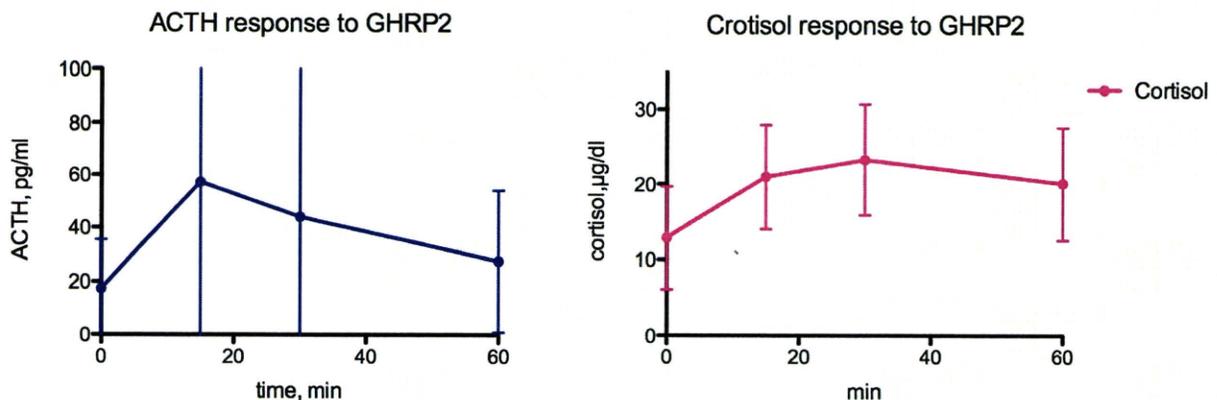
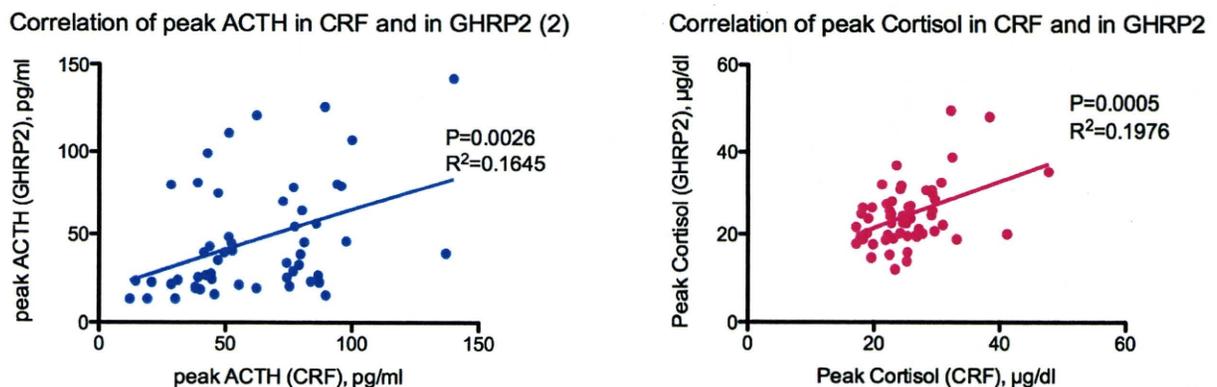
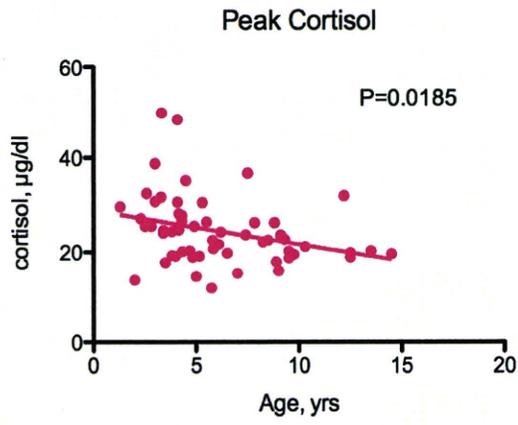


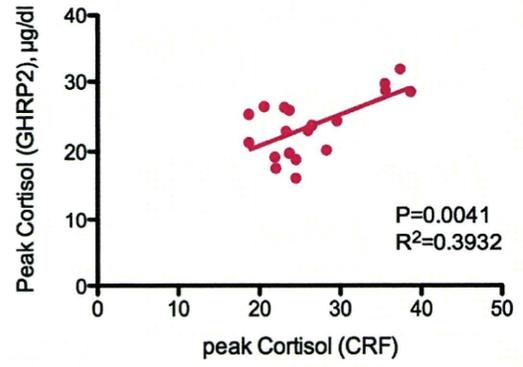
図2



3



Correlation of peak Cortisol in CRF and in GHRP2



自己免疫機序による間脳下垂体機能障害の病態の解明

研究分担者 高橋 裕 神戸大学大学院医学研究科内科学講座
糖尿病・内分泌・腎臓内科学分野
糖尿病・内分泌内科学

研究要旨：本研究では後天性に発症した自己免疫機序が疑われる間脳下垂体機能障害症例の自己抗体のスクリーニングによりその病態を明らかにすることを目的として研究を行った。そして後天性にGH,PRL,TSH特異的欠損症を呈した3例において、抗PIT-1抗体が存在することを見出した。抗PIT-1抗体はこの3例に極めて特異的だった。下垂体におけるPIT-1陽性細胞、GH陽性細胞、PRL陽性細胞、TSH陽性細胞が特異的に消失しており、自己免疫性甲状腺炎、1型糖尿病、副腎炎、胃炎、肝炎を合併していたことから自己免疫性内分泌腺症候群(APS)類縁疾患と考えられた。転写因子PIT-1はGH、PRL、TSH産生に必須であることより、PIT-1発現細胞に対する免疫寛容の破綻が本病態を引き起こした可能性が考えられ、新たなAPS関連の疾患概念として「抗PIT-1抗体症候群」と名付け報告した(J Clin Invest 2011 121 113)。

A. 研究目的

間脳下垂体機能障害は、腫瘍、炎症、肉芽腫、血流障害、放射線など様々な原因で引き起こされるが、後天性に間脳下垂体機能障害をきたす原因のひとつに自己免疫的機序によるものがある。ACTH単独欠損症やリンパ球性下垂体炎などが代表的な病態と考えられているが、その機序については不明な点が多い。一方自己免疫的機序によって複数の内分泌腺を含む臓器障害をきたす疾患は、自己免疫性内分泌腺症候群(Autoimmune polyglandular syndrome; APS)と呼ばれている。APS-Iは、皮膚粘膜カンジダ症、副甲状腺機能低下症、アジソン病をきたし、AIRE遺伝子の異常によって引き起こされる。APS-IIは1型糖尿病、自己免疫性甲状腺疾患、アジソン病をはじめ自己免疫性下垂体炎や白斑、脱毛など様々な臓器障害を伴うヘテロな症候群であり、HLA遺伝子との関連が示唆されている。APSにおいては、1型糖尿病に

おける抗GAD抗体、インスリンやIA-2抗体、アジソン病における抗21水酸化酵素抗体、副甲状腺機能低下症における抗Ca-sensing受容体抗体など種々の自己抗体が認められる。これらの自己抗体の多くは、マーカーと考えられているが、一部は原因となっている可能性が示唆されている。自己免疫性下垂体炎においても抗GH、 α エノラーゼ、セクレトグラニンII、TDRD-6抗体などが報告されているが、やはり多くは組織破壊の結果として産生されたマーカーであると考えられている。最近、私たちは自己抗体のスクリーニング法としてマウス組織に対して患者血清を一次抗体としてウエスタンブロッティングをすることにより、様々な臓器に対する自己抗体を同定できる実験系を樹立した。本研究では後天性に発症した自己免疫機序が疑われる間脳下垂体機能障害症例の血清を用いた自己抗体のスクリーニングによってその病態を明らかにすることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

マウス組織を用いたウエスタンブロッティングによる種々の臓器に対する自己抗体のスクリーニング法を用いて、後天性に間脳下垂体機能障害をきたし、自己免疫的な機序が疑われる症例を対象に解析を行った。自己抗体の存在が疑われた場合にはその自己抗原の同定、自己抗体の病態における意義を明らかにするための *in vitro* における抗体による細胞機能への影響の解析、*in vivo* における抗体移入実験を行った。今回はさらに私たちが経験した後天性にGH,PRL,TSH特異的欠損症を呈した3例を対象にした自己抗体のスクリーニング、病態の解析を行った。

(倫理面での配慮)

本研究計画の実施に際して臨床検体を使用する場合には、患者からインフォームドコンセントを得た上で神戸大学医学部倫理委員会の規約を遵守し、研究を実施した。患者の個人情報機関外に漏洩しないよう資料や解析データは厳重に管理している。また成果のとりまとめを行い、内外の学会や学術雑誌に積極的に研究成果の発表を行ったが、発表に際しては個人情報漏洩することがないように、また患者や家族に不利益が生じないように十分配慮した。なお本研究計画に基づき実施する遺伝子組換え実験は、神戸大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得たものであり、カルタヘナ法に則して神戸大学遺伝子組換え実験実施規則に基づき、これを遵守して行った。また、動物実験においては学内の動物実験倫理委員会の承認を得た上で、学内規則に則り動物愛護の精神を持って行った。

C. 研究成果

検討した17例の中で、視床下部性下垂体機能低下症を伴った empty sella 症候群において

患者血清特異的な自己抗体を認めた。また後天性にGH,PRL,TSH特異的欠損症を呈した3例においては、興味深いことに3例いずれにおいても血中に抗PIT-1抗体が存在することを見出した。さらに患者血清中には抗Tg抗体、抗TPO抗体、抗胃壁細胞抗体など種々の自己抗体を認めた。さらに1例の剖検所見では、下垂体におけるPIT-1陽性細胞、GH陽性細胞、PRL陽性細胞、TSH陽性細胞が特異的に消失していた。また自己免疫性甲状腺炎、1型糖尿病、副腎炎、胃炎、肝炎の所見を認め、これらの病理所見から自己免疫性内分泌腺症候群 (APS) 類似疾患と考えられた。抗PIT-1抗体特異的ELISAを樹立しスクリーニングしたところ、抗PIT-1抗体は190名のコントロール、下垂体腫瘍、下垂体炎、APS-II、1型糖尿病、その他のSLA, RAなどの自己免疫疾患には認めず本症候群に極めて特異的と考えられた。さらに本症候群における自己免疫寛容破綻の原因について解析を進めたところ、自己免疫寛容調節に重要な役割を果たしている分子において3例に一致した変異を認めた。

D. 考察

PIT-1がGH, PRL, TSH産生細胞の分化、維持、ホルモン産生に必須の転写因子であることを考えると、抗PIT-1抗体の存在、PIT-1発現細胞の特異的消失を示した下垂体病理組織の結果から、PIT-1発現細胞に対する免疫寛容の破綻が本病態を引き起こした可能性が考えられた。本症候群はAPSの定義を満たすものの、これまでのAPSの病型であるAPS-I, II, IPEX症候群とは明らかに異なることから、新たなAPS関連疾患と考えられ、「抗PIT-1抗体症候群」と名付け報告した (J Clin Invest 2011,121,113)。また本症候群で同定した遺伝子変異については、病態における意

義を明らかにするための機能解析を進めている。

E. 結論

本研究では新たな疾患概念である「抗PIT-1抗体症候群」を同定し報告した。本研究で行ったマウス組織を用いたウエスタンブロッティングによる自己抗体のスクリーニングは有用であった。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

(英文論文)

- 1) Handayaningshi AE, Iguchi G, Fukuoka H, Nishizawa H, Takahashi M, Yamamoto M, Herningtyas HE, Okimura Y, Kaji H, Chihara K, Seino S, Takahashi Y Reactive oxygen species play an essential role in IGF-I signaling and IGF-I-induced myocyte hypertrophy in C2C12 myocytes *Endocrinology*, in press
- 2) Hashimoto N, Kawamura Y, Nakamura T, Murawaki A, Nishiumi T, Hirota Y, Sakagushi K, Kurahashi T, Miyake H, Fujisawa M, Sasano H, Takahashi Y A case of primary aldosteronism caused by multiple adrenocortical macronodules *Intern Med*, in press
- 3) Yamamoto M, Iguchi G, Takeno R, Okimura Y, Sano S, Takahashi M, Nishizawa H, Handayaningshi AE, Fukuoka H, Tobita M, Saitoh T, Tojo T, Mokubo A, Morinobu A, Iida K, Kaji H, Seino S, Chihara K, Takahashi Y Adult combined GH, prolactin

and TSH deficiency associated with circulating PIT-1 antibody in humans *J Clin Invest* 121; 113-9, 2011

- 4) Nakajima H, Nakajima K, Nagano Y, Yamamoto M, Tarutani M, Takahashi M, Takahashi Y, Sano S Circulating level of chemerin is upregulated in psoriasis. *J Dermatol Sci* 60; 45-47, 2010
- 5) Shibahara H, Ikeshita N, Sugiyama Y, Toda K, Yamamoto D, Herningtyas EH, Maki T, Kubota E, Iguchi G, Iida K, Takahashi Y, Kaji H, Chihara K, Okimura Y. W194XProp1 and S156insTProp1, both of which have intact DNA-binding domain, show a different DNA-binding activity to the Prop1-binding element in human Pit-1 gene. *Mol Cell Endocrinol* 323; 167-171, 2010
- 6) Fukuoka H, Iida K, Nishizawa H, Imanaka M, Takeno R, Iguchi G, Takahashi M, Okimura Y, Kaji H, Chihara K, Takahashi Y. IGF-I stimulates reactive oxygen species (ROS) production and inhibits insulin-dependent glucose uptake via ROS in 3T3-L1 adipocytes. *Growth Horm IGF Res* 20; 212-219, 2010
- 7) Yamamoto D, Maki T, Herningtyas EH, Ikeshita N, Shibahara H, Sugiyama Y, Nakanishi S, Iida K, Iguchi G, Takahashi Y, Kaji H, Chihara K, Okimura Y. Branched-chain amino acids protect against dexamethasone-induced soleus muscle atrophy in rats. *Muscle Nerve* 41; 819-827, 2010

(和文論文)

- 1) 高橋 裕：成人GH分泌不全症とGH補充療法 *Annual Review：糖尿病・代謝・内分泌* 233-241, 2010

2) 有村愛子, 橋本尚子, 井口元三, 廣田勇士, 高橋 裕: 副腎偶発腫で発見され、典型的な症候を欠いた褐色細胞腫の3例 内科 106 158-161, 2010

2. 学会発表 (国際学会)

1) Takahashi Y. Novel syndrome of hypopituitarism (invited speaker) 2010 HYPOCCS Investigators meeting

2) Yamamoto M, Iguchi G, Fukuoka H, Takahashi M, Nishizawa H, Handayaningsih AE, Okimura Y, Kaji H, Chihara K, Seino S, Takahashi Y. 2010 The 5th international congress of the GRS and the IGF society

(国内学会)

1) 高橋 裕: 成人GH分泌不全症をきたす新たな疾患概念 - 後天性GH, PRL, TSH欠損症 - (スポンサードセッション), 2011, 第20回臨床内分泌代謝Update

2) 高橋 裕: 成人GHDの合併症としてのNAFLD/NASH - トランジションに関する問題点 - (シンポジウム), 2011, 第20回臨床内分泌代謝Update

3) 高橋 裕: 新たな多腺性自己免疫症候群: 抗PIT-1自己抗体と関連した後天性GH、PRL、TSH欠損症, 2011, 第6回KOPEM-MDC (慶応大学医学部セミナー)

4) 高橋 裕: 成人GH分泌不全症の新たな病態 (特別講演), 2010, 第23回小児成長障害研究会

5) 高橋 裕: 成人GH分泌不全症の新たな病態 (特別講演) 2010 内分泌を学ぶ会

6) 高橋 裕: 成人GH分泌不全症における代謝異常 - 非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) / 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) を中心に - (研究奨励賞受賞講

演), 2010, 第20回日本間脳下垂体腫瘍学会

7) 高橋 裕: 先端巨大症の治療戦略 内科の立場から (ランチョンセミナー), 2010, 第83回日本内分泌学会学術総会

8) 高橋 裕: 寿命調節の制御機構 オーバービュー (シンポジウム), 2010, GH/IGF-I & Longevity Meeting 2010

9) 高橋 裕: 脳神経外科疾患と成人GH分泌不全症 - QOLと合併症を改善するために重要なこと - (特別講演), 2010, 播磨, 下垂体機能低下症学術講演会

10) 高橋 裕: 内分泌代謝疾患における精神症状 (イブニングセミナー), 2010, 第7回日本うつ病学会総会

11) 高橋 裕: 成人GH分泌不全症をきたす新たな疾患概念 多腺性自己免疫症候群 後天性GH、PRL、TSH欠損症 (特別講演), 2010, 成人成長ホルモン分泌不全症学術講演会

12) 橋本尚子, 隅田健太郎, 神野 歩, 有村愛子, 西海智子, 廣田勇士, 井口元三, 梶 博史, 坂口一彦, 高橋 裕, 清野 進, 小川 渉: 糖尿病合併妊娠および妊娠糖尿病症例の検討, 2010, 第53回日本糖尿病学会年次学術集会

13) 西海智子, 廣田勇士, 隅田健太郎, 神野 歩, 有村愛子, 橋本尚子, 井口元三, 梶 博史, 坂口一彦, 高橋 裕, 清野 進, 小川 渉, インスリン治療歴のある患者におけるインスリン抗体結合率とScatchard解析の検討, 2010, 第53回日本糖尿病学会年次学術集会

14) 神野 歩, 廣田勇士, 隅田健太郎, 有村愛子, 西海智子, 橋本尚子, 井口元三, 梶 博史, 坂口一彦, 高橋 裕, 清野 進, 小川 渉: 1型糖尿病患者における

インスリン持続皮下注入療法 (CSII) の検討2010 第53回日本糖尿病学会年次学術集会

- 15) 小川 渉, 廣田勇士, 神野 歩, 東内雄亮, 橋本尚子, 西海智子, 井口元三, 高橋裕, 坂口一彦, 清野 進: ジアゾキサイドにより心不全が誘発された多発肝転移を伴う2型糖尿病合併インスリノーマ, 2010, 第191回日本内科学会近畿地方会
- 16) 廣田勇士, 隅田健太郎, 坂口一彦, 西海智子, 橋本尚子, 井口元三, 梶 博史, 高橋 裕, 清野 進, 小川 渉: インス

リン治療中止によりインスリン抗体の性質改善を認めた2型糖尿病の1例, 2010, 第192回日本内科学会近畿地方会

- 17) 井上喜文, 廣田勇士, 浜口哲矢, 高部倫敬, 松田友和, 橋本尚子, 井口元三, 高橋裕, 坂口一彦, 清野 進, 小川 渉: BMI低値飲酒者において生じたアルコール性ケトアシドーシスおよび低血糖症の一例, 2010, 第192回日本内科学会近畿地方会

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

成長ホルモン産生腺腫におけるプロレニン受容体の意義

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:プロレニン受容体(PRR)は組織RASで重要な役割を担うと共に、V-ATPaseやWnt受容体の結合蛋白として多彩な作用を持つ。PRRは広範な組織での発現が報告されているが、ヒト下垂体での発現を検討した報告は乏しく、またその意義については全く不明であった。本研究でPRRが下垂体で発現し、主に切断された可溶性受容体であり、成長ホルモン産生腺腫(GHoma)に高頻度に発現することを明らかにした。PRRの免疫染色強陽性群ではGHの基礎値が高く、Octreotideの反応性が高かった。ラットGH3細胞での検討で、PRRがV-ATPaseの機能を介し、GH分泌に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

レニンの不活性型前駆体であるプロレニンは、N末側の43個のアミノ酸残基からなるプロセグメントが切断され(蛋白分解的活性化)、成熟型レニンとなり腎臓より分泌されている。プロレニンは腎臓以外にも脳、網膜、副腎、性腺などで産生され、血中にはレニンの5-10倍存在する。一方、2002年ヒト腎臓から同定されたプロレニン受容体(PRR)は、結合したプロレニンの分子量を変えずに酵素活性を発揮し(非蛋白分解的活性化)、組織RASで重要な役割を担うとともに、アンジオテンシンIIとは独立した細胞内シグナルを介して線維化をきたす可能性がある。PRRは別に、細胞内小胞体H⁺-transporting ATPase (V-ATPase)やWnt受容体の結合蛋白としての機能も報告されている。これまでPRRの下垂体での発現を検討した報告は乏しく、またその意義については全く不明である。今回我々は、PRRの下垂体での発現と存在様式や、GHomaでの病態生理学的意義

について検討した。

B. 研究方法

ヒトPRR過剰発現HEK細胞を対照として、非機能性下垂体腺腫(NFA)組織でのPRR蛋白発現をヒト全長PRRに対する特異的抗体によるWesternプロットで検討した。次に、ヒト下垂体腺腫組織(特にGHoma)でのPRR発現を、同抗体を用いた免疫組織化学で半定量的に解析し、染色強度と内分泌データとの関連性を検討した。さらにラットGH3細胞を用いPRRをsiRNAで抑制し、GH分泌への影響と細胞内pHの変化を検討した。

(倫理面への配慮)

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

正常ラット下垂体前葉細胞の免疫染色でPRRは主に細胞質内に淡い局在を認めた。ラット下垂体組織のWesternプロットでは、

ヒト PRR 過剰発現 HEK 細胞の全長型 (fl-PRR (37kDa)・可溶型 (s-)PRR (28kDa) に一致した発現を認め、切断された s-PRR が多く存在していた (図1)。ヒト NFA でも大部分は切断された s-PRR であることが明らかとなった (図2)。

下垂体腺腫組織 (73例) の免疫染色では、約半数 (37例) で PRR 陽性となり、特に GHoma (23例中) で高頻度 (20例) に認めた。GHoma の免疫染色では、PRR は主に細胞質内の局在を示し、ゴルジ・リソソーム様、顆粒状パターンを示した。GHoma をサイトケラチン染色で densely granular type (DG) と sparsely granular type (SG) に分類したところ、PRR 染色陰性 (3例) ~弱陽性群 (6例) はすべて SG type であり、強陽性群 (14例中) のほとんどが DG type (12例) であった。

GH 基礎値は、PRR 陰性 ~弱陽性群 (14.9 ± 7.0 ng/ml) と比べて、強陽性群 (51.8 ± 16.8 ng/ml) で有意 ($P < 0.05$) に高く、Octreotide による GH 低下率は、PRR 陰性 ~弱陽性群 ($69.3 \pm 6.3\%$) と比べて、強陽性群 ($86.0 \pm 4.7\%$) で有意 ($P < 0.01$) に高かった。一方、IGF-I 値と Bromocriptine での GH 低下率は両群間で差を認めなかった。

ラット GH3 細胞を用いた検討では、蛍光免疫染色で細胞質内を主体とした PRR の発現を認めた。Western ブロットでは全長型・可溶型両者の発現を認め、ラット下垂体組織とは異なり GH3 細胞は s-PRR より fl-PRR の比率が高かった。PRR を siRNA で抑制すると、細胞溶解液中の GH 発現は変わらないが、培地中への GH 分泌が低下していた。また V-ATPase 阻害薬 (bafilomycin A1: 100nM) の添加で培地中への GH 分泌は低下した。さらに PRR を siRNA で抑制した GH3 細胞は、酸性オルガネラの減少を認めたことから、PRR

は V-ATPase の付属蛋白として機能し、 H^+ (プロトン) の輸送を介して GH 分泌に関連していることが示唆された。

D. 考察

本検討で PRR が下垂体で発現し、GH 分泌に関連することを初めて明らかにした。fl-PRR (37kDa) は 350 個のアミノ酸残基で構成される 1 回膜貫通型の蛋白質である。細胞内トランスゴルジネットワークに存在する furin が細胞外領域の膜貫通領域近傍 (RXXX 配列) を認識し、s-PRR (28kDa) と膜貫通領域を含む Atp6ap2 (8.9kDa) に切断し、3 種の形態が存在する (図4)。

PRR は受容体と命名されているが、以下のような多彩な機能を有するとされる: 1) プロレニンの非蛋白融解的活性化、2) プロレニンと PRR 結合による細胞内シグナル伝達、3) V-ATPase の付属蛋白、4) Wnt 受容体の付属蛋白。このうち 1)~4) は fl-PRR、s-PRR は 1)、Atp6ap2 は 3)、の機能を有するとされる。

今回の検討でヒト下垂体では fl-PRR の大部分が切断されていることを明らかにした。Atp6ap2 は V-ATPase の膜貫通領域 (V0 ドメイン) の集合体形成に必須の蛋白質であり、細胞質領域 (V1 ドメイン) で ATP のエネルギーを利用し、V0 ドメインで H^+ を運び、膜輸送・膜癒合・外分泌に必須な細胞内小器官の酸性環境を維持している。fl-PRR と切断された C 末領域 (Atp6ap2) は共に V-ATPase の機能を有している。今回のヒト GHoma の免疫染色で、分泌顆粒が多い DG type に PRR が強発現し、血中 GH が高いこと、GH3 細胞で PRR の siRNA で GH 分泌が低下したことから、PRR の V-ATPase の機能による H^+ の輸送が GH 分泌に関与する可能性が示唆され

た。

V-ATPaseのV0ドメインは6種のサブユニット(a, c, c', d, e, Ac45)からなる。aサブユニットには4つのアイソフォーム(a1~4)からなる。このうちa3は豚島でインスリン分泌に関係し、下垂体では特にGHと共局在を示すことが報告されていることから(Cell Tissue Res 329: 239, 2007.)、GHomaでのPRRの高発現との関連性が示唆される。

最近、PRRがWnt受容体の結合蛋白として機能することが報告された(Science 327: 459, 2010.)。アフリカツメガエル胚でPRRをモルフォリノオリゴでノックアウトすると頭部欠損をきたし、以前よりPRRノックアウトマウスは胎生致死であることから、PRRが細胞生命の維持や発達分化に重要なWntシグナルの機能を担っている可能性がある。Wntシグナルは癌や腫瘍増殖と関連することから、下垂体腺腫の腫瘍発生や増殖におけるPRRの役割にも興味を持たれる。

E. 結論

PRRはヒト下垂体で発現し、主にプロセッシングされたs-PRRであることを初めて明らかにした。PRRのC末端はV-ATPaseの結合蛋白(Atp6ap2)と共通分子とされることから、細胞内pHを介してGH分泌に関与す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 33: 113-7, 2010.

2) Sakurada M, Yoshimoto T, Sekizawa N, Hirono Y, Suzuki N, Hirata Y: Vasculoprotective effect of cilostazol in aldosterone-induced hypertensive rats. Hypertens Res 33: 229-35, 2010.

3) Akaza I, Yoshimoto T, Tsuchiya K, Hirata Y: Endothelial dysfunction associated with hypercortisolism is reversible in Cushing's syndrome. Endocr J 57: 245-52, 2010.

4) Yamazaki Y, Kamei Y, Sugita S, Akaike F, Kanai S, Miura S, Hirata Y, Troen B.R., Kitamura T, Nishino I, Suganami T, Ezaki I, Ogawa Y: The cathepsin-L gene is a direct target of FOXO1 in skeletal muscle. Biochem J 427: 171-8, 2010.

5) Ito T, Sasano H, Tanaka M, Osamura R.Y., Sakai I, Kimura W, Takano K, Obara T, Ishibashi M, Nakao K, Doi R, Shimatsu A, Nishida T, Komoto I, Hirata Y, Nakamura K, Igarashi H, Jensen RT, Wiedermann B, Imamura M: Epidemiological study of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors in Japan. J Gastroenterol 45: 234-43, 2010.

6) 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: 331-7, 2010.

7) Wago T, Yoshimoto T, Akaza I, Tsuchiya K, Izumiyama H, Doi M, Hirata Y: Improvement of endothelial function in patients with hypertension and type 2

- diabetes after treatment with telmisartan. *Hypertens Res* 33: 796-801, 2010.
- 8) Sugiyama T, Kouyama R, Tani Y, Izumiyama H, Akashi T, Kishimoto S, Arii S, Hirata Y: Giant malignant insulinoma from non-functioning pancreatic tumor over a long period of time. *Intern Med* 49: 1573-9, 2010.
- 9) Tani Y, Sugiyama T, Hirooka S, Izumiyama H, Hirata Y: Ectopic ACTH syndrome caused by bronchial carcinoid tumor indistinguishable from Cushing's disease. *Endocr J* 57: 677-84, 2010.
- 10) Tani Y, Inoshita N, Sugiyama T, Kato M, Yamada S, Shichiri M, Hirata Y: Upregulation of CDKN2A and suppression of cyclin D1 gene expressions in ACTH-secreting pituitary adenoma. *Eur J Endocrinol* 163: 523-9, 2010.
- 11) Sugiyama M, Sugiyama T, Yamaguchi M, Izumiyama H, Yoshimoto T, Kishino M, Akashi T, Hirata Y: Successful localization of ectopic ACTH-secreting bronchial carcinoid by selective pulmonary artery sampling. *Endocr J* 57: 959-64, 2010.
- 12) Gotyo N, Hiyama M, Adachi J, Watanabe T, Hirata Y: Respiratory failure with myxedema ascites in a patient with idiopathic myxedema. *Intern Med* 49: 1991-6, 2010.
- 13) Sekizawa N, Yoshimoto T, Izumiyama H, Hirata Y: District uptake of 18F-fluorodeoxyglucose by brown adipose tissue in catecholamine-secreting tumor. *Intern Med* 49: 2363, 2010.
- 14) Doi M, Sugiyama T, Izumiyama H, Yoshimoto T, Hirata Y: Clinical features and management of ectopic ACTH syndrome at a single institute in Japan. *Endocr J* 57: 1061-9, 2010.
2. 学会発表
- 1) Tani Y, Kato M, Tateno T, Shichiri M, Oyama K, Yamada S, Hirata Y. Differential gene expression of transcription factors in adrenocorticotropin (ACTH) -secreting pituitary and non-pituitary tumors. 第14回国際内分泌学会学術総会 (ICE2010), 京都, 2010年3月
- 2) 谷 祐至, 杉山 徹, 吉本貴宣, 井下尚子, 山田正三, 平田結喜緒. ACTH産生下垂体腫瘍における腫瘍増殖とRB経路の関連性. 第14回日本内分泌病理学会学術総会, 京都, 2010年10月
- 3) 谷 祐至, 杉山 徹, 吉本貴宣, 井下尚子, 山田正三, 平田結喜緒. 成長ホルモン産生腺腫におけるプロレニン受容体の意義. 第21回日本間脳下垂体腫瘍学会, 東京, 2011年3月発表予定
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

図1. ラット下垂体とヒトPRR遺伝子導入HEK細胞でのPRR形態

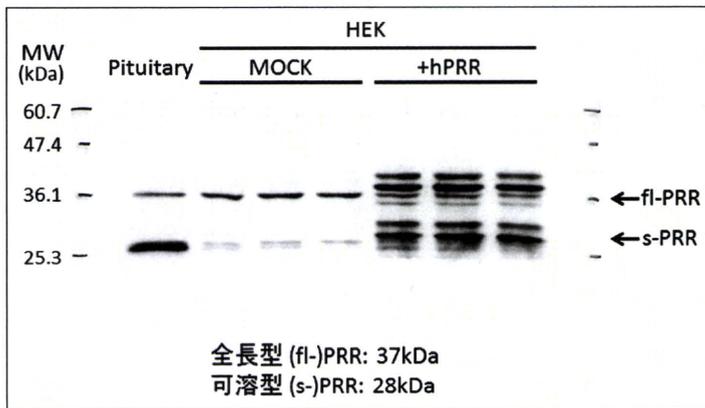


図2. ヒト非機能性下垂体腺腫でのPRR形態

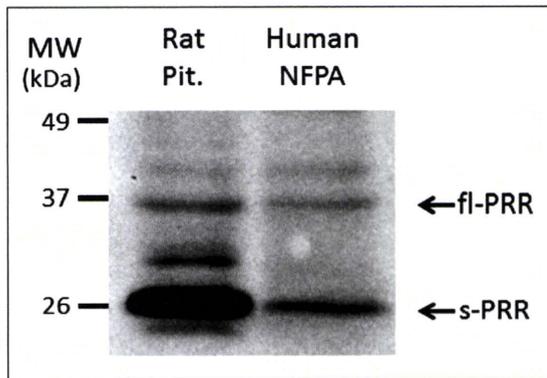


図3. PRR染色強度と内分泌データの比較

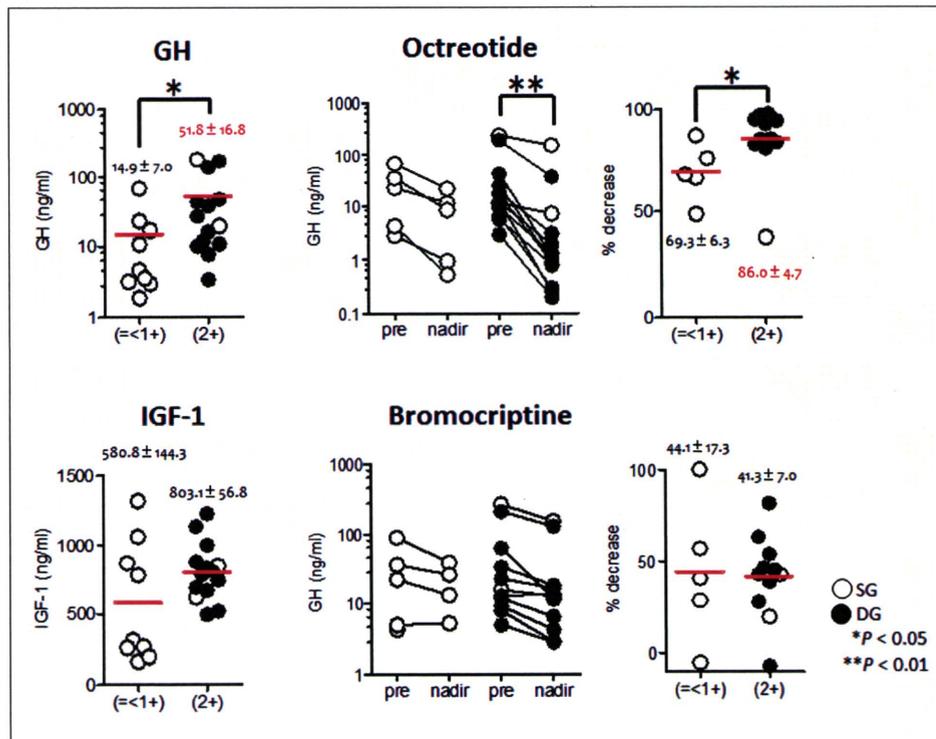
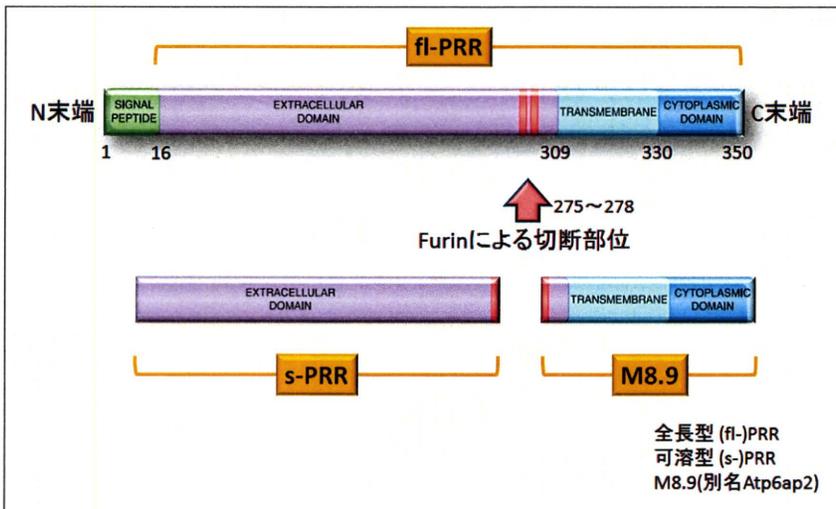


図4. プロレニン受容体の形態



手術後治癒と判定された成長ホルモン産生腺腫患者における成長ホルモン分泌能

研究分担者	有田 和徳	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科脳神経外科学
研究協力者	藤尾 信吾	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科脳神経外科学
	平野 宏文	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科脳神経外科学
	湯之上俊二	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科脳神経外科学
	有村 洋	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科循環器・呼吸器・代謝内科学
	木村 崇	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科循環器・呼吸器・代謝内科学
	中崎 満浩	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科循環器・呼吸器・代謝内科学
	富永 篤	広島大学大学院医歯薬総合研究科脳神経外科学
	木下 康之	広島大学大学院医歯薬総合研究科脳神経外科学

研究要旨:近年、先端巨大症治療後のGH分泌不全症が注目されている。自験の手術例を対象に先端巨大症術後寛解例における成長ホルモン分泌能を評価し、非機能性下垂体腺腫術後症例と比較した。またQOLとの相関についても調査した。

対象は手術後治癒と判定された先端巨大症患者のうち術後ITTが施行され、有効低血糖刺激が得られた67例。対照群は全摘出あるいは亜全摘出術が施行された非機能性下垂体腺腫患者のうち術後ITTが施行された99例。

先端巨大症患者におけるGH分泌不全症の発生頻度は、軽度なものを含めると25%程度であったが、重症GHDの頻度は6%と、非機能性下垂体腺腫群と比較すると有意に低く、LH分泌障害の頻度も同様であった。先端巨大症群ではGHD症例でもIGF-1-SD値は比較的保たれており、微量な腫瘍細胞の残存が示唆された。ITTでのGH頂値とQOLとの間には有意な相関は認めていないが、severe GHD患者では身体的健康度が低下している症例があった。

先端巨大症術後治癒群では、非機能性腺腫群に比較してGHDの頻度は低く、IGF-1濃度も保たれている。しかし、術後GHD症例における代謝異常やQOLについては長期にわたって綿密な観察が必要と思われる。

A. 研究目的

昨今、手術手技の向上や薬物療法の発達により、多くの先端巨大症患者が寛解に至るようになった。成長ホルモン(GH)の正常化は、耐糖能、脂質代謝を改善させ、生命予後の延長につながっている。実際、Holdawayらはニュージーランドにおける先端巨大症患者の生命予後について、最終追跡時GHが低い

ほど生命予後が改善していると報告している¹⁾。しかしながら、GHの働きは多様な臓器、代謝システムにわたり、先端巨大症治癒患者群においても、ある一定のGH分泌は必須である。一方、長期間高GH血症に曝された身体が、身体ならびに精神の健康を維持するために必要なGH分泌量については明かではない。

我々は、術後寛解に至った先端巨大症患者のGH分泌能を調査し、GHDの頻度、非機能性下垂体腺腫群との比較、そしてQOLとの関係について検討を行った。

B. 研究方法

【対象】

本研究は鹿児島大学病院脳神経外科と広島大学病院脳神経外科にて経蝶形骨洞手術を受けた先端巨大症患者に対する後方視的研究である。また、使用した評価項目、測定項目は通常の臨床で用いる必須項目であり、患者に不利益は生じないため、特に同意を必要としない。また各患者のデータは個人情報保護の観点から、情報の流出がないよう留意した。さらに、得られたデータは連結不可能匿名化し、解析を行った。

【方法】

先端巨大症に対して手術療法が施行され、術後Cortina consensus criteriaを満たした症例のうち、術後インスリンによるGH分泌刺激試験(ITT)が施行され、血糖の最低値が50 mg/dl以下の67例を対象とした。使用したインスリンは0.1~0.15U/kgであり、低血糖負荷試験中のGH頂値が1.8 ng/ml以下の場合をsevere GHD、1.8から3.0 ng/mlまでをmoderate GHD、3から6ng/mlまでをmild GHDと定義した。また、他の下垂体前葉機能評価のためLH-RH、TRH負荷試験も施行した。対象患者にはSF-36を郵送し、自己記入式によるQOL調査を行った。得られた結果は点数化し、国民標準値を50点、標準偏差(SD)を10点と換算した。

一方、同時期に手術を行い、全摘もしくは亜全摘し得た非機能性下垂体腺腫患者99例を対照群として、同様に内分泌学的検査を施

行した。

C. 研究結果

対象とした67例の内訳は男性24名、女性43名である。年齢は18~66歳(平均±SD, 以下同: 49.8±12.5歳)、腫瘍サイズは5~46mm(16.7±8.6mm)、BMIは17.2~34.9(23.8±3.3)であった。ITTの結果、severe GHDと判定された症例は4例(6.0%)であった。Moderate GHDも4例(6.0%)、mild GHDは9例(13.4%)であった(図1)。非機能性下垂体腺腫群の内訳は男性49例、女性50例、年齢は14~71歳(51.5±12.5歳)、腫瘍サイズは11~51mm(28.4±8.8mm)であった。この非機能性下垂体腺腫群と比較すると、severe GHDの発生頻度は先端巨大症群が有意に低かった(図2)。非機能性下垂体腺腫と先端巨大症では治療対象となる腫瘍サイズに違いがあるため、腫瘍サイズが15~24mmの患者に限って比較を行った(図3)。先端巨大症群の腫瘍サイズは平均19.3±2.8mm、非機能性下垂体腺腫群は20.3±2.9mmであった。severe GHDの発生頻度は、このように腫瘍サイズをそろえた場合でも先端巨大症群のほうが低かった。LH-RH負荷試験でLH分泌能を評価すると、先端巨大症群での分泌障害率は23.8%、非機能性下垂体腺腫群では60.6%との結果であった(図4)。腫瘍サイズが15~24mmの症例に限ると、先端巨大症群でのLH分泌障害率は30.0%、非機能性下垂体腺腫群では42.3%であった(図5)。LH分泌障害に関しても先端巨大症群の方がその発生頻度は低いが、この差は先ほどのGH分泌障害よりは小さかった。一方、ITTでsevere GHD、moderate GHDとの診断に至った症例のIGF-1 SD値は、先端巨大症群が非機能性下垂体腺腫群に比較して有意に

高かった(図6)。SF-36を使用したQOL調査では、精神的健康度を示すMental component summary (MCS)はGH頂値との相関は認めていない(図7)。身体的健康度を示すPhysical component summary (PCS)も有意な相関は認めていないが(図8)、重症GHD群とGH頂値が10ng/mlを超える群と比較すると、重症GHD群のほうがPCSスコアは低値であった(図9)。

D. 考察

下垂体腺腫によるGH分泌障害は高い頻度で発生することが知られている。2005年にまとめた自験のデータでは、先端巨大症を除く下垂体腺腫患者の中で、GHDと診断された症例は術前で6割を超えており、その頻度は術後も改善することはなかった(図10)。GHDは、体組成異常、代謝障害だけでなく、易疲労感、気力低下、集中力低下といった精神症状も引き起こし、患者のQOLを大きく損なう疾患であるが、2006年に保険認可されたGH補充療法がこれらの症状改善に寄与している。

一方、先端巨大症はGHの過剰分泌から生じる疾患であり、手術療法や薬物療法、放射線療法によりGHの正常化を図ることが治療目標である。GHが十分に低下すると、耐糖能、脂質代謝、睡眠時無呼吸症候群などの改善を認め、生命予後も延長する。そのため治療基準は年々厳格化され、現在ではCortina consensus criteriaが広く普及している。先端巨大症の治療判定はOGTtによるGHの最大抑制値とIGF-1値で評価されるため、これまで先端巨大症術後患者に対するGH分泌刺激試験は一般的ではなかった。しかし近年、寛解に至った先端巨大症患者のGH分泌能について注目が集まりつつある。Ronchiらは治

療後に寛解と判定された先端巨大症患者の中で、手術単独群で54%、放射線療法を追加すると70%の患者にsevere GHDが発生したと報告している²⁾。またConceiçãoらはITTとGHRH + arginineの2種類のGH分泌刺激試験を行い、どちらの試験でも寛解に至った先端巨大症患者のうち75%の患者がGHDと診断されたと報告している³⁾。この高いGHDの発生頻度は、先端巨大症患者の長期予後に影響を与える可能性も否定できない。幸いなが、我々の施設におけるGHDの発生頻度はこれらの報告に比べ大幅に低いものであった。この差を説明する因子を同定することは困難であるが、BMIや判定時期、判定基準の違いなどが原因として考えられる。もちろん、外科医の立場からすれば、手術手技そのものが影響を与えている可能性を否定できない。

自験の非機能性下垂体腺腫における検討結果では腫瘍サイズが大きいほど、術後のGH分泌障害率は上昇していた(図11)。先端巨大症でも同様に、腫瘍サイズとGH分泌障害の頻度は相関を示している(図12)。腫瘍サイズを揃えた2群間の比較では先端巨大症群が非機能性下垂体腺腫群に比較してGHDの発生頻度は低かった。これはLH分泌能でも同様の傾向が示されたが、先のGH分泌障害頻度の差と比較するとその差は小さい。

ITTによりGHDと診断された患者の中でも、先端巨大症患者の多くはIGF-1値が正常範囲内にあったことから、微量の腫瘍細胞が存在し、GH分泌が続いている可能性が示唆される。このことは、GHDと診断された先端巨大症患者の大部分で、TRH負荷に対するGHの反応が多少とも残存している結果からも支持される(図13)。

GHDは患者のQOLを低下させる一因であ

る。Wexlerらは、寛解に至った先端巨大症患者の中で、GHD群と、非GHD群とに分け、QOL調査を行ったところ、多くの調査項目で、GHD群のほうがQOLが低下していたと報告している⁴⁾。今回、我々はSF-36を使用してQOL調査を行った。SF-36は健康状態を測る質問紙として世界中で普及している調査票で、スコアリングにより国民標準値との比較が容易にできる。我々の調査では、PCSもMCSもITTでのGH頂値との間に有意な相関は認められなかった。しかしながら重症GHD群と、ITTでの反応が良好と思われるGH頂値10ng/ml以上の群とを比較すると、GHD群でのPCS低下は否めない。ただし、このQOL調査は個人差が大きく、さらに症例を集めて検討する必要がある。

自検例では先端巨大症GHD患者に対するGH補充の経験はないが、欧米ではすでにGH補充療法が開始されている。まだ報告数は少ないが、特に大きな副作用なく、通常のGHD患者と同様に、体組成の改善、QOLの改善が得られている⁵⁾。今後、明らかな症状を呈する先端巨大症寛解後のGHD患者に対するGH補充療法も検討すべき課題である。

E. 結論

自験の先端巨大症患者におけるGHDの発生頻度は過去の報告に比較すると低い結果であった。また患者QOLもGH頂値との相関は認めず、先端巨大症GHDという病態を詳細に理解するには至っていない。術後ITTにおけるGH値の変化が正常化下垂体からのGH分泌のみを反映しているのか、また長期間、高GH血症に適応していた先端巨大症患者の身体と精神にとって最も適切な術後GH分泌環境は何かなど、解明すべき課題は残っている。今後、さらに症例を蓄積するととも

に、GHD患者に対するGH補充療法の適応を検討する必要がある。

F. 参考文献

- 1) Holdaway IM, Rajasoorya RC, Gamble GD: Factors influencing mortality in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 667-74, 2004
- 2) Ronchi CL, Giavoli C, Ferrante E, Verrua E, Bergamaschi S, Ferrari DI, Corbetta S, Montefusco L, Arosio M, Ambrosi B, Spada A, Beck-Peccoz P: Prevalence of GH deficiency in cured acromegalic patients: impact of different previous treatments. *Eur J Endocrinol* 161: 37-42, 2009
- 3) Conceição FL, Fisker S, Andersen M, Kaal A, Jørgensen JO, Vaisman M, Christiansen JS: Evaluation of growth hormone stimulation tests in cured acromegalic patients. *Growth Horm IGF Res* 13: 347-352, 2003
- 4) Wexler T, Gunnell L, Omer Z, Kuhlthau K, Beauregard C, Graham G, Utz AL, Biller B, Nachtigall L, Loeffler J, Swearingen B, Klibanski A, Miller KK: Growth hormone deficiency is associated with decreased quality of life in patients with prior acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 2471-7, 2009
- 5) Miller KK, Wexler T, Fazeli P, Gunnell L, Graham GJ, Beauregard C, Hemphill L, Nachtigall L, Loeffler J, Swearingen B, Biller BM, Klibanski A: Growth hormone deficiency after treatment of acromegaly: a randomized, placebo-controlled study of growth hormone replacement. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 567-77, 2010