

図1. インスリンによるGH分泌刺激試験の結果

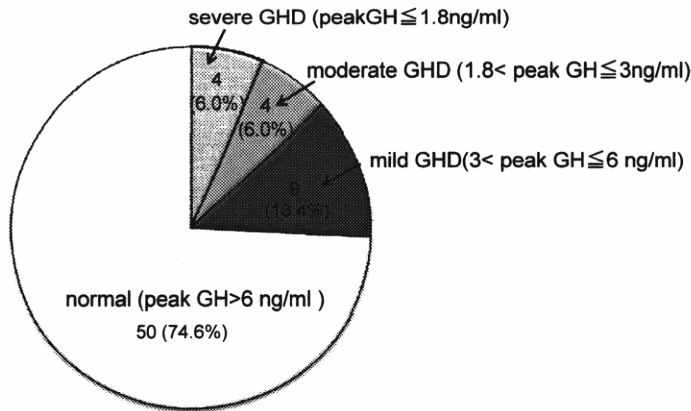


図2. 先端巨大症群と非機能性下垂体腺腫群におけるGH分泌障害の頻度

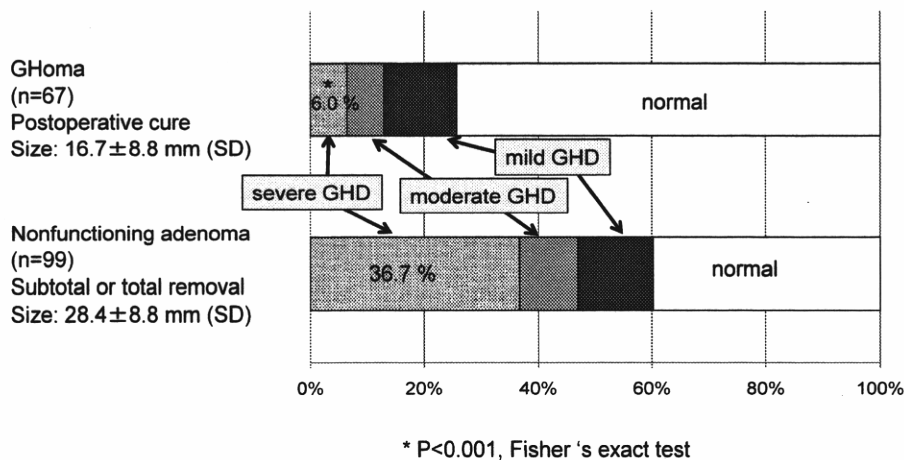


図3. 腫瘍サイズ15～24mmの患者でのGH分泌障害の頻度(先端巨大症群と非機能性下垂体腺腫群)

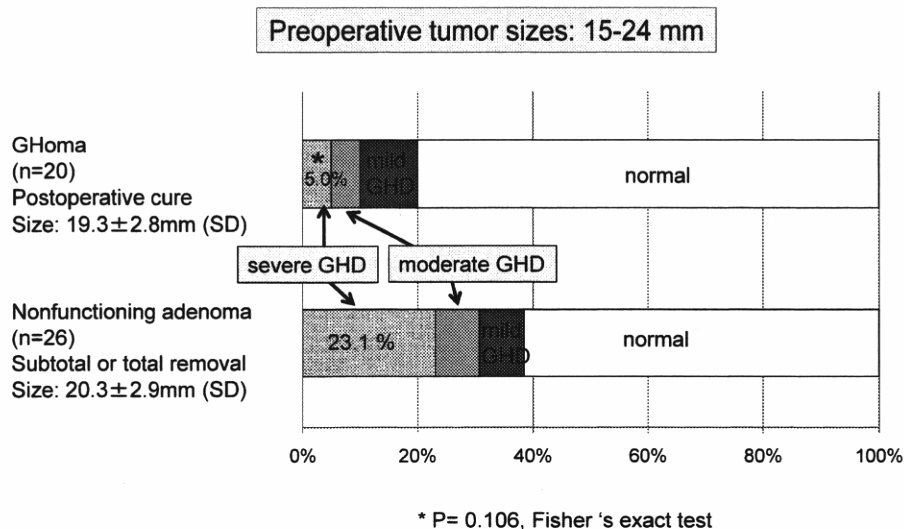


図4. 先端巨大症群と非機能性下垂体腺腫群におけるLH分泌障害の頻度

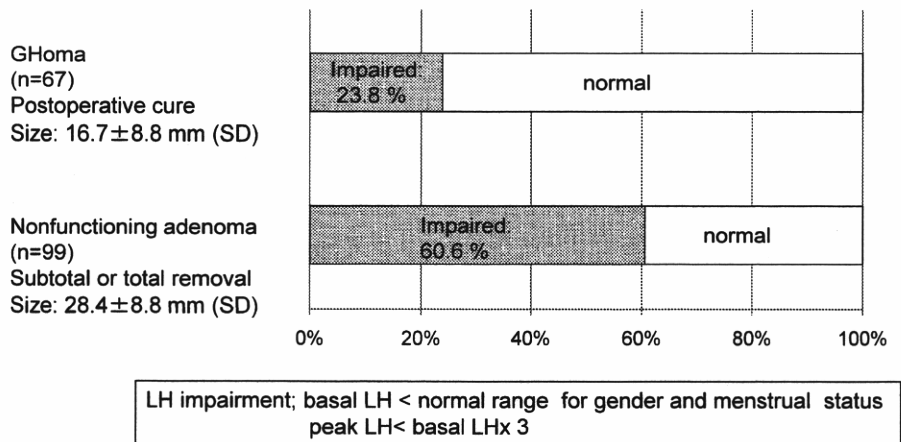


図5. 腫瘍サイズ15～24mmの患者でのLH分泌障害の頻度(先端巨大症群と非機能性下垂体腺腫群)

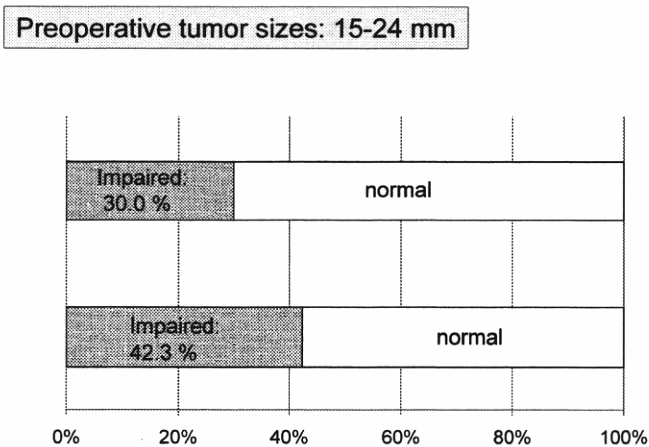


図6. Severe GHD、moderate GHD患者のIGF-1 SD値(先端巨大症群と非機能性下垂体腺腫群)

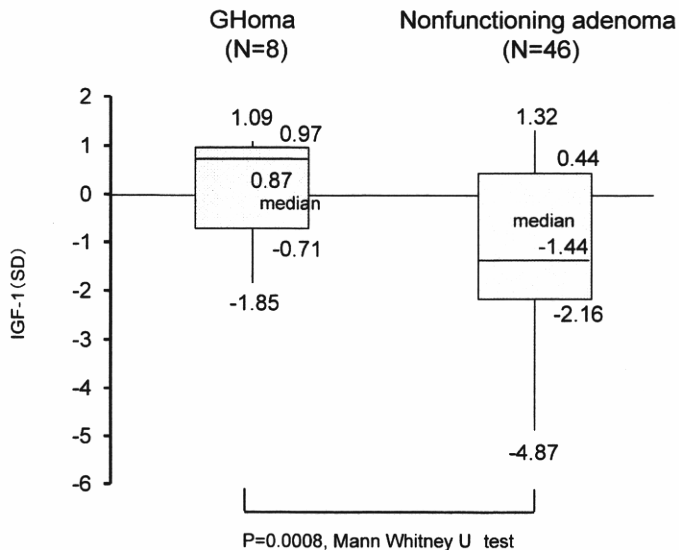


図7. Mental component summary (MCS) scoreとITTにおけるGH頂値との関係

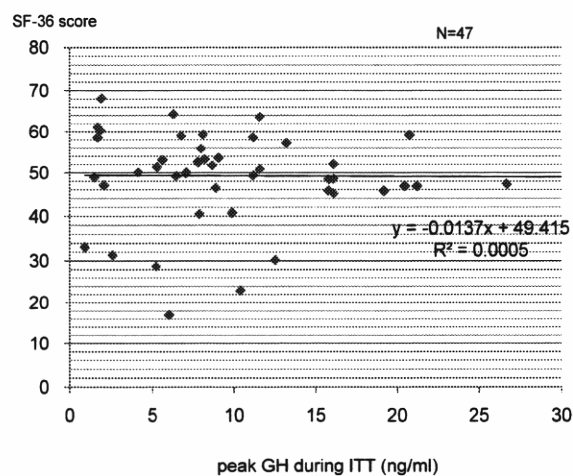


図8. Physical component summary (PCS) scoreとITTにおけるGH頂値との関係

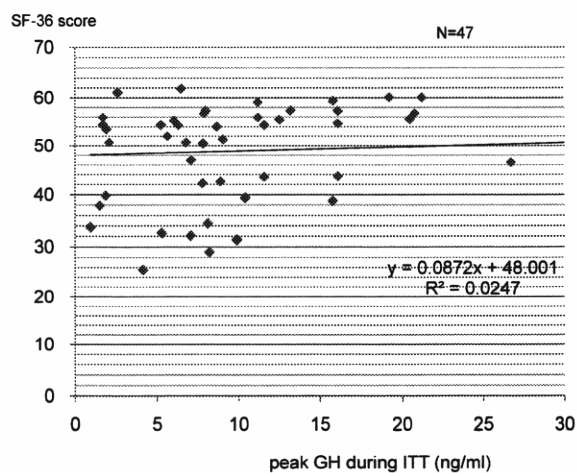


図9. Severe GHD群とGH頂値が10ng/mlを超える群とのPCS scoreの比較

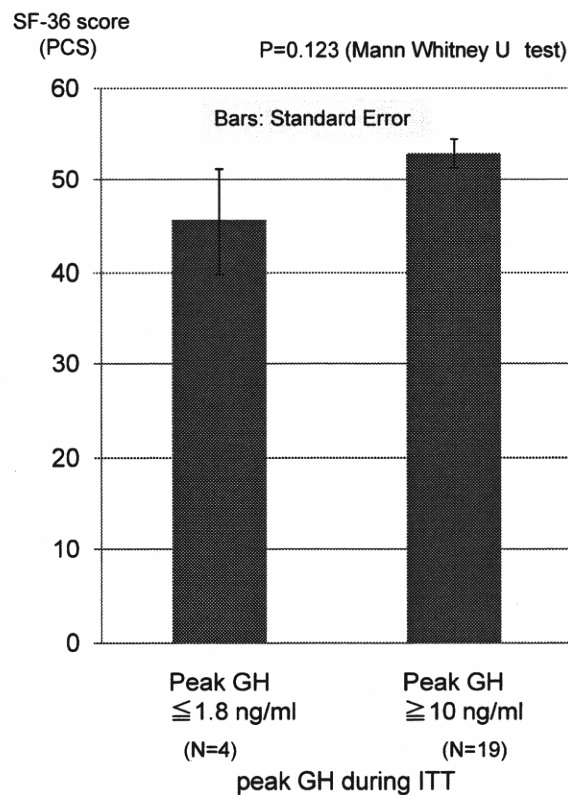


図 10. 先端巨大症を除く下垂体腺腫患者におけるGH分泌障害の頻度(術前、術後)

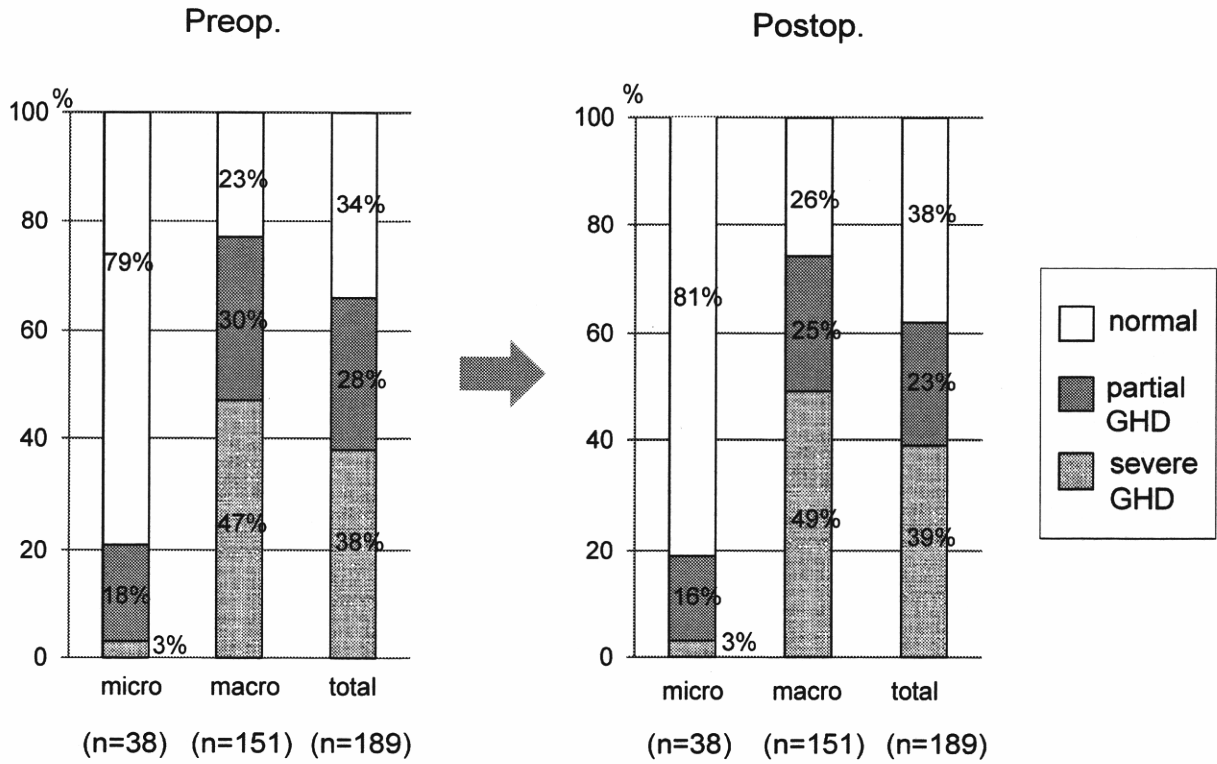


図 11. 非機能性下垂体腺腫群における術後のGH分泌障害の頻度と腫瘍サイズとの関係

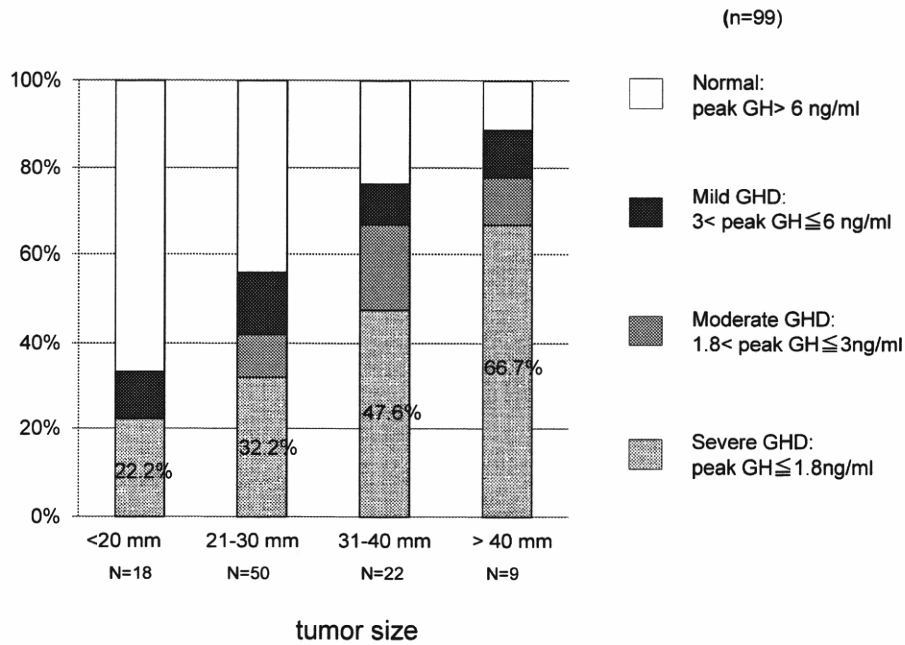


図 12. 先端巨大症群における術後のGH分泌障害の頻度と腫瘍サイズとの関係

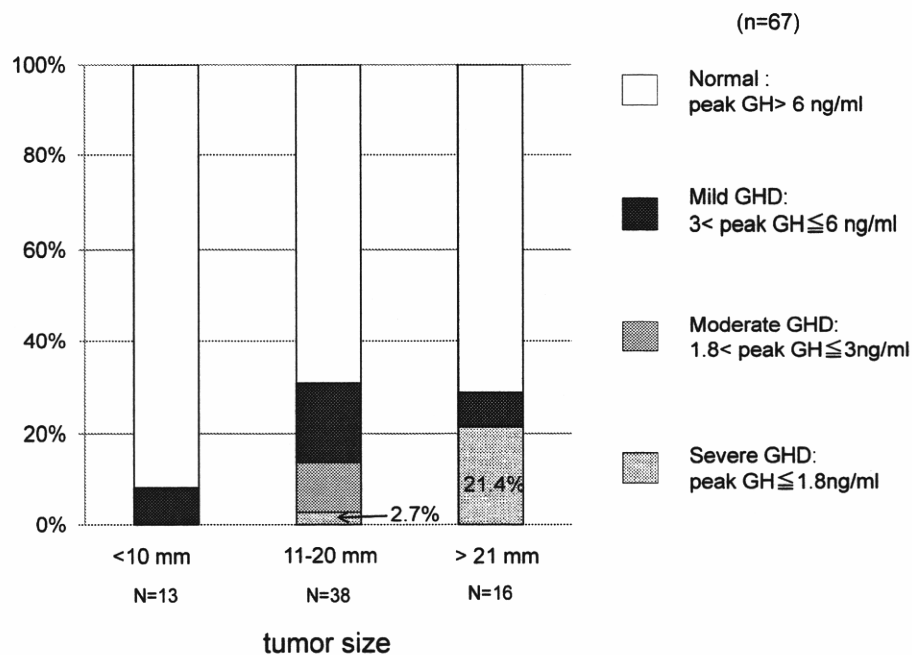
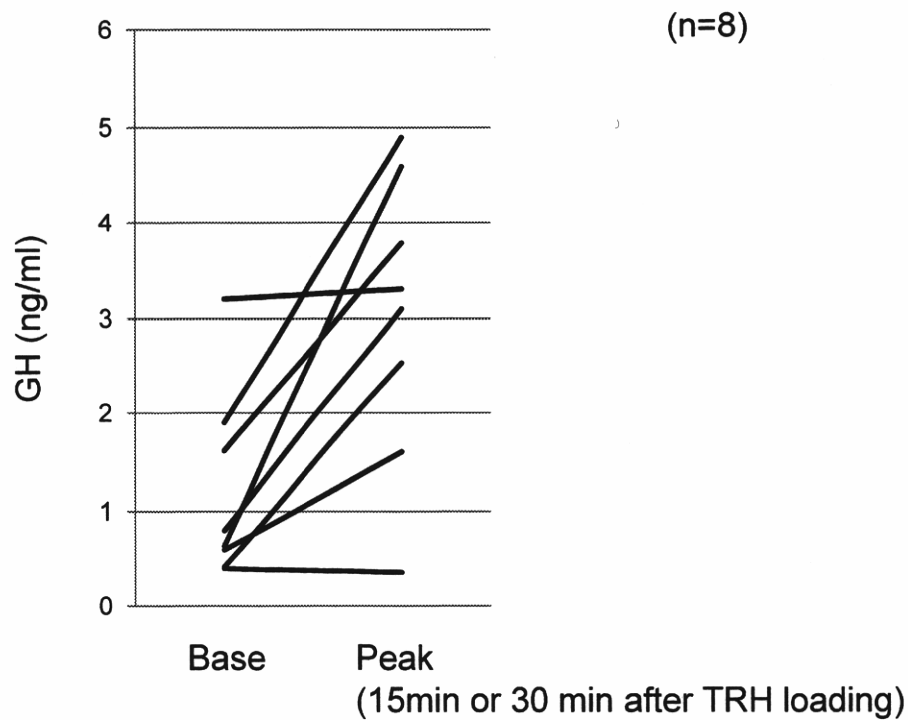


図 13. Severe GHD、moderate GHD 患者に対する TRH 負荷試験結果



成人GH分泌不全症(GHD)における肝機能障害と GHの治療効果に関する検討

研究分担者	肥塚 直美	東京女子医科大学医学部第二内科
研究協力者	栗本真紀子	東京女子医科大学医学部第二内科
	福田いずみ	東京女子医科大学医学部第二内科
	田中 聡	東京女子医科大学医学部第二内科
	山門 佑有	東京女子医科大学医学部第二内科
	村岡 東子	東京女子医科大学医学部第二内科

研究要旨：成人GHDに非アルコール性脂肪肝障害(NAFLD)や非アルコール性脂肪肝炎(NASH)を合併することを報告してきた。NASHは肝硬変にも到る予後不良の病態であり推奨される治療法が十分確立していないが、成人GHDに合併するNASHではGH治療が有効であるとの報告があり、GH治療により肝機能障害が改善することが示唆されている。今回、成人GHDに対しGH治療を行った症例における肝機能の推移について検討した。成人GHDではGH治療開始前に約50%の症例で肝機能障害を合併し、GH治療後、肝機能障害は有意に減少した。GH治療前には腹部エコーで28例中20例で脂肪肝を認め、脂肪肝を呈していた20例中13例にGH治療後再検査を行ったところ、8例で脂肪肝が消失した。成人GHDでは肥満、脂質代謝異常とともに肝機能障害を高頻度に合併し、この肝機能障害はNAFLD・NASHと考えられ、GH治療により改善することを認めた。

A. 研究目的

最近、成人GHDに非アルコール性脂肪肝障害(non alcoholic fatty liver disease; NAFLD)や非アルコール性脂肪肝炎(non alcoholic steatohepatitis; NASH)の合併が報告されている。NASHは肝硬変にも到る予後不良の疾患であるが、推奨される治療法が十分確立していない。しかし、成人GHDに合併するNASHではGH治療が有効であるとの報告があり、GH治療により肝機能障害が改善することが示唆されている。

今回、成人GHDに対しGH治療を行った症例における肝機能の推移について検討した。

B. 研究方法

当科に定期的に通院しGH治療を1年以上受けている重症成人GHD48例(39歳; 21-66歳, 男/女; 23/25)を対象とした。発症時期は小児期発症30例, 成人期発症18例であり, 原疾患は頭蓋咽頭腫14例, 周産期異常11例, 胚細胞腫10例, 非機能性下垂体腺腫5例, Sheehan症候群3例, プロラクチノーマ1例, その他5例であった。重症成人GHDの診断はインスリン低血糖試験(3例)およびGHRP-2 負荷試験(45例)で行った。先端巨大症, Cushing病, TSH産生腫瘍術後の症例, アルコール飲酒量が20g/日以上 の症例および肝炎ウイルス陽性, 自己免疫性肝炎, 薬剤性肝炎など他の肝機能障害を来たす

疾患を持つ症例は除外した。

GH治療開始前後の肝機能および肝の超音波所見について検討した。

C. 研究成果

GH治療前には48例中23例(48%)で肝機能障害を認め、AST, ALTの上昇は各々16例(33%), 23例(48%)に認められた。肝機能障害の有無でGHDの発症時期, 性別, 年齢, IGF-ISDSに差は認めなかったが, BMIは肝機能障害を認める群で高い傾向であった(BMI 27.2 vs 25.1)(表1)。

GH治療後, AST, ALTの上昇は各々AST 4例(8%), ALT 9例(19%)と有意に減少した。GH開始前に腹部超音波を施行した28例中20例で脂肪肝を認めた。図1に治療前に肝障害, 腹部超音波で脂肪肝を認め, 肝生検でNASHと診断され, GH治療により脂肪肝が消失した1例を示す。脂肪肝を呈した20例中13例にGH開始後, 腹部超音波検査を行ったところ, 8例で脂肪肝が消失した。

脂質異常に関してLDL-C, HDL-C, TGの異常を各々16例(33%), 11例(23%), 30例(63%)に認め, 治療後はLDL-C異常が11例(22%)に減少したものの, HDL-C, TG異常は変化を認めなかった。

D. 結論

成人GHDでは肥満, 脂質代謝異常とともに肝機能障害を高頻度に合併し, この肝機能障害は腹部超音波を行った症例ではNAFLDと考えられた。今回の検討ではGH治療後脂質異常症の明らかな改善は見られなかったが, 肝機能障害は有意に改善を認めた。これは脂質代謝の改善を介さないGH/IGF-Iの作用によるものと考えられた。今後, 更なる検討

が必要である。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Morita J, Hakuno F, Hizuka N, Takahashi SI, Takano K: Growth hormone (GH) or insulin-like growth factor (IGF)-I represses 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (HSD1) mRNA expression in 3T3-L1 cells and its activity in their homogenates. *Endocr J* 56:561-570, 2009.
- 2) Tanaka S, Fukuda I, Hizuka N, Takano K: Gender differences in serum GH and IGF-I levels and the GH response to dynamic tests in patients with acromegaly. *Endocr J* 57:477-83, 2010.

2. 学会発表

- 1) Kurimoto M, Fukuda I, Hizuka N, Tanaka S, Yamakado Y, Yasumoto K, Takano K: Clinical characteristics of adult growth hormone deficiency associated with non-alcoholic fatty liver disease. 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto, March, 2010.
- 2) Ishikawa Y, Morita J, Hizuka N, Fukuda I, Hakuno F, Takahashi S-I, Takano K: Insulin-like growth factor (IGF)-I represses 11 β -HSD1 activity via regulation of hexose-6-phosphate dehydrogenase (H6PDH) mRNA in 3T3-L1 adipocytes. 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto, March, 2010.

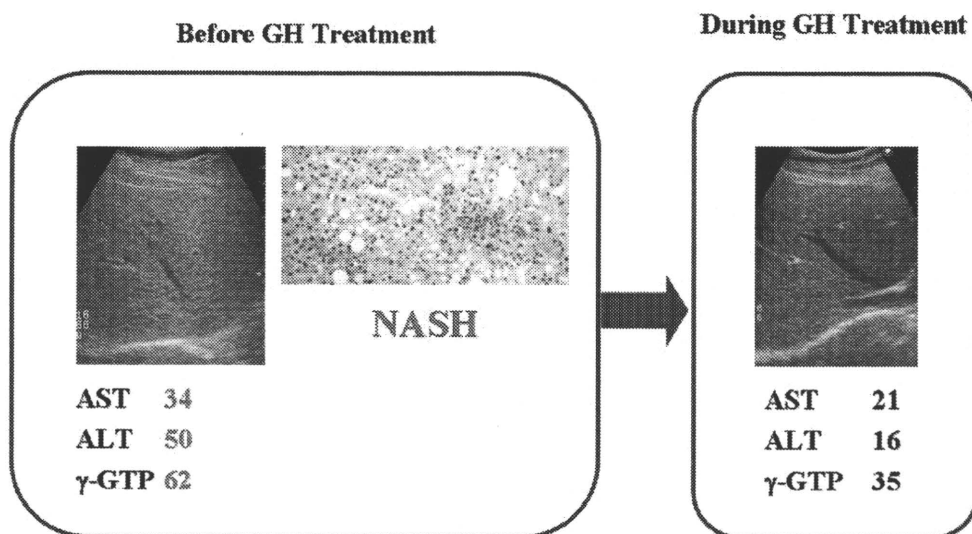
F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 肝障害の有無による成人GHDの臨床像

	Total	Liver dysfunction	
		+	-
N	48	23	25
Onset (C/A)	30/18	15/8	15/10
Sex (M/F)	23/25	13/10	10/15
Age (Median)	39	36	40
(Range)	21 - 66	21 - 66	23 - 63
IGF-I SDS	-3.3	-3.2	-3.3
BMI	26.4	27.2	25.1

図1. GH治療前にNASHと診断され、GH治療後に肝機能の改善および脂肪肝が消失した成人GHDの1例



GH 産生腺腫の自発開口分泌と病理像の関連

研究分担者 高野 幸路 東京大学大学院医学系研究科腎臓・内分泌内科学

研究要旨: 2光子励起法により GH 産生腺腫の自発分泌を解析しその存在を証明し、腫瘍ごとの自発分泌の違いをもたらす病理学的特徴を検討した。51例のGH産生下垂体腺腫を術後5時間以内に2光子励起法で観察し、自発分泌と high K による脱分極刺激での顆粒分泌を記録し、各腺腫におけるホルモン染色性を調べた。fibrous body、*gsp* 変異の有無、および臨床データとの関連についても解析中した。51例中21例に自発分泌を認めた。自発分泌のなかった30例中 highK の効果を見た30例中24例で顆粒分泌があった。顆粒放出の時間経過でも差はなく、数秒以内の短い full fusion であった。自発分泌の有無と病理所見、GH/IGF-I 基礎値、*gsp* 変異の有無には一定の関連はなく、予想よりも複雑な要因が関与していると考えられた。Hardy 分類で grade I の腺腫はすべて自発分泌があり、腺腫が小さい場合は自発開口分泌が観察される可能性が考えられた自発分泌の見られる腺腫はすべて高Kにより分泌が促進された。分泌が著明に促進される腺腫8例はすべて densely granulated adenoma であった。分泌促進は *gsp* 変異のある腺腫で有意に多く見られた。

A. 研究目的

先端巨大症ではGH産生腺腫からの過剰なGH分泌が生じ、代謝障害、臓器障害により生命予後、QOLの低下をもたらす。ホルモン過剰分泌のしくみを解明することは新しい治療法を模索するために必要である。

GH産生腺腫におけるGH過剰分泌は電位依存性カルシウムチャネルブロッカーによる抑制を受けるため、調節性分泌経路、すなわち顆粒分泌の調節障害が関係すると考えられてきた。しかしヒト腺腫細胞からの開口分泌を、蛍光蛋白質の導入などの人為的な操作を行わずに観察する手法が限られていたため、腺腫における実際の開口分泌現象の詳細はほとんど知られていない。

Two-photon extracellular polar tracer 法 (TEP法)¹⁾²⁾ は、水溶性の蛍光物質を細胞外液に分布させ、開口分泌によって細胞膜と分泌顆粒膜が融合して生じるΩ型の分泌顆粒

内に細胞外液の蛍光物質が流入したものを2光子励起蛍光顕微鏡によって輝点として検出するものである(図1)。TEP法は観察対象の細胞に事前処置(蛍光物質との融合蛋白のトランスフェクションなど)を必要としないため、インタクトな細胞における開口分泌現象の観察も可能である。

われわれは最近この方法を用いて、ヒト下垂体腺腫の開口分泌を解析して来た。これまでの検討で①GH産生腺腫の半数以上に自発性開口分泌があり、②この自発性開口分泌はニトレンジピンやオクトレオチドで抑制されることから調節性の開口分泌が恒常的に生じたものである、③開口分泌様式は腺腫の種類によって異なり、GH産生腺腫では full fusion が中心であるのに対し、PRL産生腺腫では kiss-and-stay が主である、などを観察している。

一方、GH産生腺腫は多様性に富む。病

理学的には、分泌顆粒が豊富で正常細胞の形態をよく保持した *densely-granulated type* (DG) と、分泌顆粒が乏しく正常細胞との構造上の類似性が低い *sparsely-granulated type* (SpG) がそれぞれ約半数ずつを占める、SpGは細胞質内にサイトケラチンの凝集した *fibrous body* が存在することが特徴的である。ホルモン産生性の点では、GHのみを産生するものと、PRLも産生するものがある。病因的にはGs α の活性化変異である *gsp* 変異を有するものと有しないものがあり、有するものが約半数に認められる³⁾⁻⁵⁾。

これらの性質の違いによって、自発開口分泌は異なってくるのか、そしてそれが腺腫の臨床的活動性に関係するのかを調べることで、GH産生腺腫の病因、病態生理についての洞察が得られ、治療法の発展に寄与できる可能性があり、このことを多数の症例を対象に検討した。

われわれはGH産生腺腫の自発開口分泌と、これらのGH産生腺腫の特性との関連について、以下の仮説を考えた。すなわち、①自発開口分泌をする腺腫は形態的にはDGタイプである、②GHRH-PKAシグナル伝達系が活性化状態にあると考えられる *gsp* 変異例では自発開口分泌を認める、③自発開口分泌をする腺腫は、臨床的にはGH・IGF-Iの基礎値が高く、また小さい腫瘍が多い、というものである。

この仮説を検証するため、我々はGH産生腺腫の自発開口分泌と病理所見、*gsp* 変異の有無、臨床像との関連を調べた。

B. 研究方法

〈対象〉

臨床的にGH産生下垂体腺腫と診断され、

免疫染色で診断が確定した51症例。これらは2施設の脳神経外科で手術された症例で、患者の承諾を得て用いたものである。

〈方法〉

①TEP法による開口分泌の観察

細胞外液に0.5mMのsulphorhodamine B (Sigma社)を分布させ、TEP法により原則として術後5時間以内に自発分泌と30mMの高カリウム外液による脱分極刺激下の開口分泌を室温で観察した。

②病理所見

GH, PRLおよびサイトケラチンに対する免疫染色によりGH産生腺腫を病理学的に分類した。切除標本は10%緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋した。免疫染色はlabeled streptavidin biotin (LSAB)法で行った(LSABキット、Dako社、Carpinteria、CA、USA)。1次抗体には、抗GHポリクローナル抗体(1:400)(Dako社)、抗PRLモノクローナル抗体(1:250)(Neomarker社、Freemont、CA、USA)、また低分子量サイトケラチンモノクローナル抗体(CAM5.2、希釈済みのもの)(Becton Dickinson、San Jose、CA、USA)を用いた。抗体は室温で60-80分インキュベートした。標本はメチルグリーンまたはヘマトキシリンで対比染色を行った。

以上の免疫染色により、PRL陽性細胞のないものをpureGH産生腺腫、PRL細胞陽性率が5%以上のものをGH-PRL産生腺腫と分類した。またCAM5.2が細胞質内でドット状に染まるものをSpGタイプに特有の *fibrous body* と判断し、SpGタイプと判定した。CAM5.2に陽性であっても染色パターンがキャップ状、または核周囲パターンが中心のものはDGタイプと判定した。

③ *gsp* 変異の解析

凍結腫瘍検体からmRNAを抽出し、RT-

PCR法後に直接塩基配列決定を行った。Gs α のPCRのプライマーは既報⁶⁾のものを用い、コドン201と227をともに解析した。

④臨床データ。

診療録からホルモン値を、またMRIおよび術中所見により腫瘍の大きさ・浸潤性を調べた(Hardy分類)。

C. 研究結果

1) 開口分泌、病理所見、*gsp*変異、臨床所見 それぞれの結果

解析可能であった51例中21例に標準外液中での自発性開口分泌を認めた(41.2%)。自発分泌が見られた21例中12例で高カリウム外液下の開口分泌を調べたところ、いずれも高カリウム外液下で分泌が促進された(100%)。自発分泌のなかった30例中24例で高カリウム刺激に対する反応を調べ、うち13例で高カリウム外液下での顆粒分泌が見られた(54.2%)。顆粒放出の時間経過でも差はなく、数秒以内の短いfull fusionであった。

PRL染色を行った45例中、PRL染色陰性のpure GH産生腺腫は13例、PRL陽性細胞が5%以上存在するGH-PRL産生腺腫は16例、PRL陽性細胞が5%未満の腺腫は16例(うち2例はTSH陽性細胞も混在)であった。

サイトケラチン染色を行った46例中、DGタイプは32例、SpGタイプは11例、DG(SpG混在)は2例、SpG(DG混在)は1例であった。

*Gsp*変異は48例を解析し33例に*gsp*変異を認めた(68.3%)。その内容はArg201Cys 27例、Arg201His 1例、Arg201Ser 1例、Glu227Leu 2例、Glu227Arg 2例であった。

患者の手術時年齢は43.7 \pm 12.9歳、性別は女性30人、男性28人であった。GHの基礎値【随時値】は22.2 \pm 25.8 ng/ml、IGF-Iの値

は698 \pm 300 ng/mlであった(平均 \pm SD)。腫瘍の大きさ、浸潤性はHardy分類に準じて行い、評価しえた51例について、Grade I 4例、grade II 28例、grade III 10例、grade IV 9例であった。

2) 開口分泌と、病理所見、*gsp*変異および臨床所見の関連性

開口分泌とDGタイプ/SpGタイプとの関連は表1Aのとおりであった。DGでは自発分泌のあるものが14例、自発分泌のないものも14例であった。SpGでは自発分泌のあるものが4例、自発分泌のないものが6例であった。従って、DGとSpGで自発分泌の有無には差が認められなかった。

サイトケラチン染色を行った腺腫のうち、高カリウム刺激で分泌促進が見られたものは20例であった。このうち8例は分泌の促進が顕著であった。この8例はDGタイプ(7例)またはSpGの混在したDGタイプ(1例)であった(表1A)。

Pure GH産生腺腫では、自発分泌は解析した13例中6例に認めた。PRL陽性細胞を5%以上含むGH-PRL産生腺腫では、自発分泌は解析した16例中7例に認めた。したがってPure GH産生腺腫とGH-PRL産生腺腫で自発分泌の有無には有意差が認められなかった(P=1.00、Fisher検定)。また、GH-PRL産生腺腫における開口分泌様式も、full-fusionであった。

*Gsp*変異と自発分泌との関連を表2にまとめた。*Gsp*変異の有無と自発分泌の有無には有意な関連は認められなかった(P=0.336、Fisher検定)。*Gsp*変異と高カリウム刺激下の開口分泌については、*gsp*変異のある腺腫で高カリウム刺激による開口分泌が有意に起こりやすいことが示された(P=0.026、Fisher検定)。*Gsp*変異の有無を調べた腺腫のうち

に、高カリウム刺激による開口分泌促進の著明なものが6例存在した。うち4例は *gsp* 変異があり、2例は *gsp* 変異を認めなかった(表1B)。

手術時年齢は自発分泌のあった症例で 45.1 ± 3.1 歳 ($n=21$)、自発開口分泌のなかった症例で 43.6 ± 2.3 歳 ($n=30$) であった。性別は自発分泌のあった症例で男性11人、女性10人であり、自発開口分泌のなかった症例で男性13人、女性17人であった。自発分泌の有無と手術時年齢、性別には有意な関係はなかった(年齢は *t* 検定で $P=0.69$ 、性別は Fisher 検定で $P=0.58$)。

また、GH値、IGF-I値にも有意な関係は認められなかった(図2)。腫瘍の大きさ・浸潤性と自発分泌との関連を表臨床データとの関連を表3に示す。Hardyの grade Iでは、症例数は限られるものの全例自発分泌が認められた(表1C)。Grade II~IVについては特定の傾向は認められなかったが、Grade IVのものにも自発分泌が著名なものや、高カリウム刺激による分泌促進が著明なものが含まれていた。

D. 考察

4-1) 自発分泌と病理学的特徴

自発分泌をする腺腫の頻度は半分程度であったが、生理的な温度 37°C であれば、より多くの腺腫で自発開口分泌が見られた可能性もある。これについては今後加温する方法を工夫して検討する必要がある。

自発分泌をする腺腫はすべて高カリウム刺激で分泌が促進され、中には顕著に促進されるものがあった。

サイトケラチン染色で SpG パターンと判断された腺腫の少なくとも1例は高カリウム刺激で分泌が顕著に促進され、細胞質内に分

泌顆粒が少なくても刺激に応じて顆粒分泌が促進されることが判明した。

なお、PRL陽性細胞を5%以上含むGH-PRL産生腺腫もその開口分泌様式は速やかな full fusion であり、kiss-and-stay が中心の Pure prolactinoma とではなく Pure GH産生腺腫と同様であった。また、GH-PRL産生腺腫と pure GH産生腺腫とで自発分泌をする腫瘍の頻度に有意差はなく、両者は開口分泌の点ではよく類似したグループであることがわかった。

4-2) 自発分泌と *gsp* 変異

我々は以前に *gsp* 変異のないGH産生腺腫にも電気生理学的にPKAが基礎の状態では活性化しているものがある(通常であればGHRH刺激による開口分泌の促進の際に活性化される非選択性陽イオン電流および電位依存性カルシウム電流が基礎の状態では活性化している)ことを観察し *gsp* 変異陰性例にも自発分泌するものがあることは予測されていたが、この事が確認できた。

Gsp 変異と自発分泌そのものについては有意な関連はなかったが、高カリウム刺激に対する著明な分泌促進は *gsp* 変異例で有意に多いことがわかり、特定の病因は開口分泌に一定の特性を与えることが判明した。

4-3) 自発分泌と臨床的特徴

自発分泌の有無と手術時年齢、性別、随時GH値、IGF-I値には関連は認められなかった。

Hardy分類のグレードと自発分泌の有無については、グレードIの腺腫にすべて自発分泌が見られ、ほかのグレードでは自発分泌をするものとしらないものが1:1~1.5程度であることと対照的であった。このことから、腺

自発開口分泌が強い腺腫は小さいうちに臨床症状を呈して診断される可能性が示唆された。

E. 結論

以上より、当初の仮説に対する本研究の結論としては、①DGおよびSpGはいずれも自発分泌をすることもしないこともあり、自発分泌をする腫瘍の頻度に有意差はなかった、②*gsp*変異を有する腺腫にも自発分泌をしないものがあり、*gsp*変異の有無で自発分泌をする腫瘍の頻度に有意差はなかった、③自発分泌をする腺腫とそうでない腺腫とでGH・IGF-I値の基礎値に有意差はなかった。大きさについては、Hardy分類で grade I の腺腫は4例すべて自発分泌があった。

ペプチドホルモンの調節性分泌の最終過程は開口分泌である。TEP法はこの開口分泌を intact な細胞で直接観察できる手法であり、GH産生細胞を初めとする内分泌細胞およびその腺腫において開口分泌と分泌調節機構、病理像、臨床像について基礎的な解析を進める意義は大きいと考えられる。

参考文献

- 1) Nemoto T, et al: Nat Cell Biol, 3: 253, 2001.
- 2) Takahashi N & Kasai H: Endocr J, 54: 337, 2007.
- 3) Landis CA, et al: J Clin Endocrinol Metab, 71:1416, 1990.
- 4) Spada A, et al: J Clin Endocrinol Metab, 71:1421, 1990.
- 5) Yasufuku-Takano J, et al: Clin Endocrinol (Oxf), 64:91, 2006.
- 6) Yasufuku-Takano J, et al: Endocrinology, 140:2018, 1999.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究成果発表

1. 論文発表

- 1) Murakami M, Mizutani A, Asano S, Katakami H, Ozawa Y, Yamazaki K, Ishida Y, Takano K, Okinaga H, Matsuno A, A mechanism of acquiring temozolomide resistance during transformation of atypical prolactinoma into prolactin-producing pituitary carcinoma. Neurosurgery in press, 2011
- 2) Bakhtiar Y, Hirano H, Arita K, Yunoue S, Fujio S, Tominaga A, Sakoguchi T, Sugiyama K, Kurisu K, Yasufuku-Takano Y and Takano K. Relationship between cytokeratin staining patterns and clinicopathological features in somatotropinomas. Eur. J. Endocrinol. 163:531-539, 2010
- 3) Takano K, Yasufuku-Takano J, Mori S, Yamada S, Teramoto A, Sano T, Fujita T. GH receptor His49Arg mutation was not detected in Japanese acromegalics. Endocr. J. 57Suppl.2:S530, 2010

2. 学会発表

〈招待講演〉

- 1) 2010/2/16 機能性下垂体腺腫の病態の基礎と臨床 聖マリアンナ医科大学内分泌代謝研究会
- 2) 2010/5/10 GH分泌障害の基礎とGH補充療法の効果 四国下垂体研究会
- 3) 2010/05/22 GH産生下垂体腺腫の病態生理 東北信内分泌懇話会
- 4) 2010/5/30 機能性神経内分泌腫瘍の治療の基礎 広島神経内分泌治療研究会
- 5) 2010/06/24 神経内分泌腫瘍のホルモン過

6) 2010/10/13 機能性下垂体腺腫の最新治療

とその原理 北関東間脳下垂体疾患研究会

7) 2010/11/18 GH分泌障害の基礎と臨床

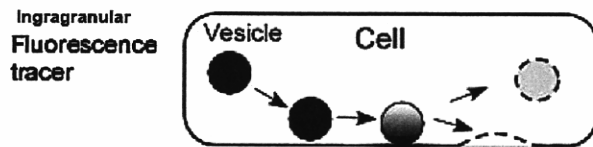
H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

図1. Two-photon extracellular polar tracer 法 (TEP 法)

- (A) 分泌顆粒を可視化する通常の方法は、分泌顆粒の内容物や顆粒膜を蛍光物質で標識し、開口分泌を蛍光物質で染色された分泌顆粒の消失として観察するものである。この方法では通常の蛍光顕微鏡で観察できるが、分泌顆粒を蛍光させるために人為的な融合蛍光蛋白をトランスフェクションするなどの操作が必要であり、臨床検体の観察には適さない。
- (B) TEP法では細胞外に水溶性蛍光性物質を分布させ、分泌顆粒膜が細胞膜に融合した以降に分泌顆粒が蛍光する (post-fusion labeling)。このため臨床検体でも観察可能である。ただし開口分泌の検出には2光子励起顕微鏡が必要である。(文献²より改変引用。)

A. 通常の画像



B. TEP画像

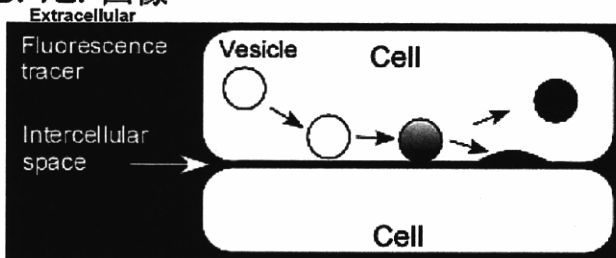


表1. 自発分泌および高カリウム刺激による分泌促進の有無と(A) DG/SpG (B) gsp 変異 (C) Hardy分類 (A)

	自発分泌		高Kでの分泌	
	なし	あり	なし	あり
DG	14	14	6	14 (7)
SpG	6	4	2	5 (0)
DG (SpG混在)	1	1	1	1 (1)
SpG (DG混在)	1	0	1	0
合計	22	19	10	20

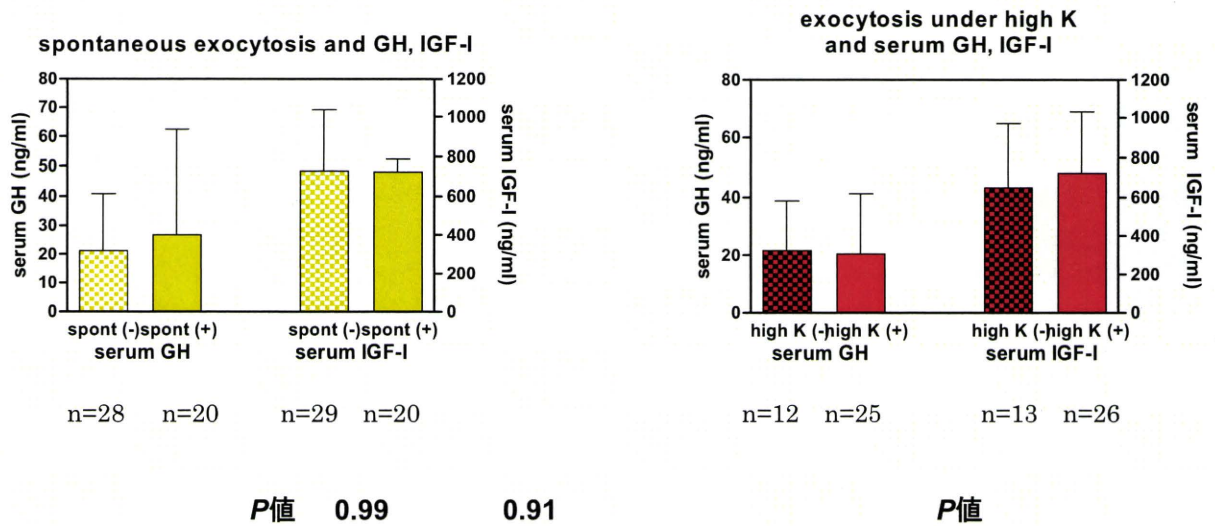
(B)

		自発分泌		高Kでの分泌	
		なし	あり	なし	あり
g s p	あり	17	14	5	18
	なし	11	4	7	4
Fisher検定		P=0.34		P=0.026 *	

(C)

	自発分泌		高Kでの分泌	
	なし	あり	なし	あり
I	0	4	0	3
II	15	8	7	12
III	6	4	3	3
IV	4	5	2	5
合計	25	21	12	23

図2. 自発分泌および高カリウム刺激による分泌促進の有無と臨床データ



gsp 変異と MLL/p27^{Kip1} 経路

研究分担者 森 昌朋 群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科
研究協力者 山田 正信 群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科
堀口 和彦 群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科

研究要旨: 私達は散発性GH産生下垂体腫瘍において、MLL/p27^{Kip1}経路の発現低下があり、ソマトスタチン製剤であるオクトレオチド治療によりこれらが回復することを報告した。これらの多数例の解析から、このオクトレオチドの効果に抵抗性を示す群があることが判明した。一方、gsp変異が散発性GH産生腫瘍の30-40%で報告されている。そこで今回、オクトレオチドのMLL/p27^{Kip1}経路への作用とgsp変異の関係について検討するため、散発性GH産生腫瘍41例のgsp変異を検索し、MLL、p27^{Kip1}mRNA発現量とgsp変異の関係について解析した。その結果、41例中39%の16例(Arg201Cys変異9例、Gln227Leu変異4例、Gln227Arg変異3例)にgsp変異を認めた。gsp変異のない腫瘍群では、術前オクトレオチド治療群と未治療群でMLLとp27^{Kip1}mRNA発現量を比較すると治療群で有意に高値だった。一方、gsp変異を伴う腫瘍群では、両群間で有意差を認めなかった。以上より、GH産生腫瘍の約40%にgsp変異を認め、gsp変異を伴う症例ではオクトレオチドによるMLL/p27^{Kip1}経路の活性化に抵抗性を示した。

A. 研究目的

細胞周期関連蛋白質のサイクリン依存性キナーゼ阻害因子であるp27^{Kip1}は、種々の腫瘍で低下しており細胞周期が活性化することにより腫瘍発生に関与していると考えられている。実際、p27^{Kip1}のノックアウトマウスでは、下垂体腫瘍や全身臓器の過形成が発生する。そして、これまでp27^{Kip1}は主に蛋白質レベルでの制御機構が主であると報告されてきた。しかし、最近になりp27^{Kip1}遺伝子発現を、多発性内分泌腫瘍症1型(MEN1)の原因遺伝子Men1の遺伝子産物であるmeninと白血病の発症に関与するMLL(mixed lineage leukemia)とがヒストンのメチルトランスフェラーゼ活性を持つ核内蛋白質複合体を形成しp27^{Kip1}を転写レベルで制御していることが明らかとなった。そしてMEN1ではmeninの変異によりp27^{Kip1}発現が低下し腫瘍

が発生する可能性があることが報告されている。

一方、散発性GH産生腫瘍の30-40%においてGNAS1遺伝子の体細胞変異が認められ、3量体Gタンパク質のGs α サブユニットの恒常的な活性化を引き起こすgsp変異が認められることが報告されている。また、私達は下垂体手術検体を用いた検討から散発性GH産生腫瘍においてMLL/p27^{Kip1}経路の発現が低下しており、ソマトスタチンアナログ製剤であるオクトレオチド治療によりこの経路の異常が回復することを報告した。さらに、これらの多数例の解析から、このオクトレオチドの効果に抵抗性を示す群があることが判明した。そこで今回、オクトレオチドのMLL/p27^{Kip1}経路への作用とgsp変異の関係について検討するため、散発性GH産生腫瘍41例のgsp変異を検索し、MLL、p27^{Kip1}

mRNA 発現量と gsp 変異の関係について解析した。

B. 研究方法

- 1) 当院並びに虎ノ門病院間脳下垂体外科で手術を受け、インフォームドコンセントの得られた下垂体GH産生腫瘍41例を対象とした。
- 2) GNAS 遺伝子のエクソン7に forward primer を、エクソン10に reverse primer を設計し、GH産生腫瘍より得られたcDNAを鋳型としPCRを行いgsp変異の有無を検索した。
- 3) GH産生腫瘍における MLL、p27^{Kip1}mRNA 発現量を、リアルタイムPCRを用いて定量的に測定し、gsp変異との関連性について検討した。

C. 研究結果

- 1) GH産生腫瘍41例中、16例(39.0%)にgsp変異を認めた。この16例の内訳は、Arg201Cys変異9例、Gln227Leu変異4例、Gln227Arg変異3例であった
- 2) gsp変異の有無による性別差、平均年齢、血清GH値・IGF値はいずれも有意差を認めなかった。
- 3) gsp変異を伴わないGH産生腫瘍群では、術前オクトレオチド治療群と未治療群とを比較すると、MLL mRNA 発現量が中央値で1.41と1.00、p27^{Kip1}mRNA 発現量が3.46と1.05と治療群でいずれも有意な高値を認めた(p<0.05)。
- 4) gsp変異を伴うGH産生腫瘍群では、オクトレオチド治療群と未治療群で、MLLとp27^{Kip1}mRNA 発現量ともに有意な差は認めなかった。

D. 考察

ソマトスタチンアナログであるオクトレオチドによる下垂体腫瘍に対する抗腫瘍効果はホルモン分泌障害と腫瘍縮小効果に分けられる。前者は、主にオクトレオチドによるcAMPの減少とCa²⁺の細胞内流入を阻害することによるが、後者については不明な点が多い。これまでの報告では、オクトレオチドがMAPKを介してp27^{Kip1}発現を増加させることや、p53やbcl-2 associated proteinを増加させること、TNF- α 、DR4などを増加させ、アポトーシス誘導することなどが報告されている。さらに、ラットのインスリン α 細胞では、オクトレオチドはPI3K/Akt経路を介して、mTOR、p70S6Kのリン酸化を減少させ細胞周期を制御すること、下垂体腫瘍細胞ではPI3K/Akt経路を介してZac1を増加させ細胞周期を制御することなどが報告されている。最近、私達もこれらMAPKとPI3K系を介してオクトレオチドがMLL遺伝子発現の転写を促進し、さらに下流にあるp27^{Kip1}の発現を増加させることにより細胞周期ならびに増殖を制御していることを報告した。

3量体Gタンパク質のGs α サブユニットの持続的活性化変異であるgsp変異は、内分泌腺腫の病因と考えられる遺伝子変異として初めて同定された変異であり、散発性GH産生腫瘍の30-40%において認められることが報告されている。Gs α のコドン201または227のアミノ酸はGs α に内在するGTPaseに必須のアミノ酸であるが、これらが変異するとGs α はGTPase活性を失い、Gs α はGTPと結合した活性型の状態を解除できなくなるため、Gs α の恒常的な活性化を引き起こす。本研究においては、散発性GH産生腫瘍41例中、39%にgsp変異を認め、これまでの報告と同頻度であった。さらに、こ

のgsp変異の有無と、MLL、p27^{Kip1} mRNA発現量の解析では、gsp変異を伴わない群において、オクトレオチド治療群にてMLLとp27^{Kip1} mRNA発現量ともに有意な高値を認められた。一方、gsp変異群では、治療群と未治療群において、MLLとp27^{Kip1} mRNA発現量ともに有意差は認めなかった。以上の結果から、gsp変異がGsαの持続的活性化を引き起こすことにより、オクトレオチドのソマトスタチン受容体の下流のMAPKやPI3K経路を介するMLL/p27^{Kip1}経路の活性化も抑制されていることが示唆された。

E. 結論

下垂体GH産生腫瘍の約40%でgsp変異を認め、gsp変異を伴う症例ではソマトスタチン製剤であるオクトレオチドによるMLL/p27^{Kip1}経路の活性化に抵抗性を示すことが判明した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Horiguchi K, Hashimoto K, Hashizume M, Masuo T, Suto M, Okajo J, Handa H, Kaneko Y, Yokoo H, Sasaki A, Okada S, Yamada M, Tsukamoto N, Nojima Y, Nakazato Y, Mori M. Primary bilateral adrenal diffuse large B-cell lymphoma demonstrating adrenal failure. *Intern Med.* 2010;49:2241-2246.
- 2) Nakajima Y, Yamada M, Horiguchi K, Satoh T, Hashimoto K, Tokuhira E, Onigata K, Mori M. Resistance to thyroid hormone due to a novel thyroid hormone receptor

mutant in a patient with hypothyroidism secondary to lingual thyroid and functional characterization of the mutant receptor. *Thyroid.* 2010 Aug;20(8):917-26

- 3) Yamada M, Horiguchi K, Umezawa R, Hashimoto K, Satoh T, Ozawa A, Shibusawa N, Monden T, Okada S, Shimizu H, Mori M. Troglitazone, a ligand of peroxisome proliferator-activated receptor- γ , stabilizes NUCB2 (Nesfatin) mRNA by activating the ERK1/2 pathway: isolation and characterization of the human NUCB2 gene. *Endocrinology.* 2010;151:2494-2503.
 - 4) Hashimoto K, Ishida E, Miura A, Ozawa A, Shibusawa N, Satoh T, Okada S, Yamada M, Mori M. A liver X receptor (LXR)-beta alternative splicing variant (LXRBSV) is preferentially expressed in the pituitary. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 394:548-552.
- ### 2. 学会発表
- 1) Yamada M, Horiguchi K, Ishii S, Hashimoto K, Satoh T, Mori M, Aberrant histone modifications involved in resistance to thyroid hormone, 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto Japan, 2010
 - 2) Satoh T, Ishizuka T, Yoshino S, Tomaru T, Nakajima Y, Katano A, Shibusawa N, Ozawa A, Hashimoto K, Yamada M, Mori M, Differential roles of 19S regulatory particles of 26S proteasome in the positive and negative gene regulation by thyroid hormone receptor, 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto Japan, 2010
 - 3) Hashimoto K, Ishida E, Shibusawa N, Satoh T, Yamada M, Fredric E, Mori M, An HDAC inhibitor, valproate improves

- the abnormalities in resistance to thyroid hormone, 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto Japan, 2010
- 4) Yoshino S, Satoh T, Tomaru T, Shimizu H, Ariyama Y, Ishizuka T, Hashimoto K, Yamada M, Mori M, Molecular mechanisms of hypotriglyceridemia and resistance to high-fat-diet induced obesity in PDIP1 knockout mice, 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto Japan, 2010
 - 5) Horiguchi K, Yamada M, Taguchi R, Ozawa A, Shibusawa N, Hashimoto K, Satoh T, Tosaka M, Yamada S, Mori M, Gsp mutations and the MLL-p27 pathway in pituitary adenoma, 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto Japan, 2010
 - 6) Ishida E, Hashimoto K, Sato T, Okada S, Yamada M, Shimizu H, Mori M, Melanocortin 3/4 receptor is essential to the intracellular signaling pathway of Nesfatin-1, 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto Japan, 2010
 - 7) Taguchi R, Yamada M, Horiguchi K, Ozawa A, Hashimoto K, Sato T, Mori M, Profile of gene in cells expressing wild-type and A242V menin, 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto Japan, 2010
 - 8) Garay Guerrero J, Shibusawa N, Horiguchi K, Nakajima Y, Ishida E, Hashimoto K, Satoh T, Yamada M, Mori M, Thyrotropin-releasing hormone affects gene expression in the islets of Langerhans of the pancreas, 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto Japan, 2010
 - 9) Yamada M, Horiguchi K, Hashimoto K, Sato T, Yamada S, Mori M, Hypothalamic-pituitary-thyroid axis in patients with pituitary adenoma: Analysis of 345 patients pre- and post- operation, International Thyroid Congress, Paris, 2010
 - 10) 山田正信, 堀口和彦, 梅澤良平, 田口亮, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 岡田秀一, 清水弘行, 森昌朋. チアゾリジン誘導体の新たな non-genomic 効果 ERK1/2 経路を介した NUCB2 mRNA 安定性制御機構, 第 53 回日本糖尿病学会学術集会, 岡山, 2010
 - 11) 渋谷信行, Garay Guerrero J, 中島康代, 石田恵美, 小澤厚志, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 清水弘行, 山田正信, 森昌朋. TRH の膵臓 β 細胞に対する作用解析, 第 53 回日本糖尿病学会学術集会, 岡山, 2010
 - 12) 小澤厚志, 山田正信, 渋谷信行, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 森昌朋. MEN1 遺伝子ヘテロ欠損マウスにおいて発症する膵内分泌腺腫瘍の定量的解析, 第 53 回日本糖尿病学会学術集会, 岡山, 2010
 - 13) 吉野聡, 佐藤哲郎, 登丸琢也, 片野明子, 清水弘行, 有山泰代, 石塚高広, 小澤厚志, 渋谷信行, 橋本貢士, 岡田秀一, 山田正信, 森昌朋. PPAR γ -DNA-binding domain-interacting protein 1 (PDIP1) ノックアウトマウスはメタボリック症候群抵抗性を示す, 第 53 回日本糖尿病学会学術集会, 岡山, 2010
 - 14) 石田恵美, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 岡田秀一, 山田正信, 清水弘行, 森昌朋. 摂食抑制ペプチド nesfatin-1 の細胞内シグナル伝達機構の解析, 第 53 回日本糖尿病学会学術集会, 岡山, 2010
 - 15) 片野明子, 佐藤哲郎, 吉野聡, 登丸琢也, 石塚高広, 小澤厚志, 渋谷信行, 橋本貢士, 山田正信, 森昌朋. マウス PPAR γ -DNA-binding domain-interacting protein

- 1 (PDIP1) のクローニングとその発現および *in vitro* 機能解析, 第53回日本糖尿病学会学術集会, 岡山, 2010
- 16) 山田正信, 堀口和彦, 梅澤良平, 田口亮, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 岡田秀一, 清水弘行, 森昌朋. チアゾリジン誘導体の NUCB2 mRNA 安定性制御機構, 第31回日本肥満学会学術集会, 前橋, 2010
- 17) 佐藤哲郎, 吉野聡, 片野明子, 登丸琢也, 石塚高広, 小澤厚志, 渋沢信行, 橋本貢士, 山田正信, 森昌朋. メタボローム解析を用いた PDIP1KO マウスにおける高脂肪食誘導性脂肪肝抵抗性の分子病態解析, 第31回日本肥満学会学術集会, 前橋, 2010
- 18) 渋沢信行, 小澤厚志, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 山田正信, 森昌朋, 副腎腫瘍摘出術により肥満, 糖尿病の著明な改善を認めた拡張型心筋症合併クッシング症候群の一例, 第31回日本肥満学会学術集会, 前橋, 2010
- 19) 小澤厚志, 斎藤従道, 橋本貢士, 渋沢信行, 佐藤哲郎, 岡田秀一, 山田正信, 森昌朋, 肥満・糖尿病コントロール不良の Prader-Willi 症候群に下肢蜂窩織炎を合併した一症例, 第31回日本肥満学会学術集会, 前橋, 2010
- 20) 吉野聡, 佐藤哲郎, 登丸琢也, 片野明子, 清水弘行, 有山泰代, 石塚高広, 小澤厚志, 渋沢信行, 橋本貢士, 岡田秀一, 山田正信, 森昌朋. PDIP1 ノックアウトマウスは低TG血症および高脂肪食誘導性肥満抵抗性と脂肪肝抵抗性を示す, 第31回日本肥満学会学術集会, 前橋, 2010
- 21) 石田恵美, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 岡田秀一, 山田正信, 清水弘行, 森昌朋. 摂食調節ペプチド nesfatin-1 に対する細胞内シグナル伝達と melanocortin Receptor の関連, 第31回日本肥満学会学術集会, 前橋, 2010
- 22) 片野明子, 佐藤哲郎, 吉野聡, 石塚高広, 登丸琢也, 小澤厚志, 渋沢信行, 橋本貢士, 山田正信, 森昌朋. 核内受容体 PPAR γ の転写共役活性化因子 PDIP1 結合蛋白の同定, 第31回日本肥満学会学術集会, 前橋, 2010
- 23) 田口亮, 山田正信, 中島康代, 堀口和彦, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 森昌朋, わずかなコルチゾールの過剰分泌は肥満症と脂質異常症を誘発する, 第31回日本肥満学会学術集会, 前橋, 2010
- 24) Garay Guerrero J, 渋沢信行, 堀口和彦, 石田恵美, 小澤厚志, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 山田正信, 森昌朋, TRH affects gene expression in the islet of Langerhans of the pancreas, 第31回日本肥満学会学術集会, 前橋, 2010
- 25) 小澤厚志, 山田正信, 堀口和彦, 田口亮, Stephen J Marx, 森昌朋, 多発性内分泌腫瘍症1型の腫瘍発生分子メカニズムの解明: モデルマウスの解析, 第37回日本神経内分泌学会学術集会, 京都, 2010
- 26) 田口亮, 山田正信, 堀口和彦, 小澤厚志, 渋沢信行, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 森昌朋. 下垂体腫瘍など内分泌臓器特異的腫瘍発生を規定する *menin/MLL-p27^{Kip1}* の発現, 第37回日本神経内分泌学会学術集会, 京都, 2010
- 27) 橋本貢士, 石田恵美, 片野明子, 田口亮, 堀口和彦, 吉野聡, 中島康代, 小澤厚志, 渋沢信行, 佐藤哲郎, 岡田秀一, 山田正信, 清水弘行, 森昌朋. Stearoyl-CoA desaturase-1 遺伝子発現は甲状腺ホルモンで負に調節されている, 第53回日本甲