

状腺学会, 長崎, 2010

- 28) 渋谷信行, Garay Guerrero J, 堀口和彦,
小澤厚志, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 山田正
信, 森昌朋, TRHによる睥ランゲルハン
ス島遺伝子発現調節機構, 第53回日本甲

状腺学会, 長崎, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

非浸潤性プロラクチン産生下垂体腺腫に対する 内視鏡単独経鼻的手術による被膜外摘出の治療成績

研究分担者 寺本 明 日本医科大学大学院医学研究科神経病態解析学分野

研究要旨:プロラクチン産生下垂体腺腫(PRLoma)に対する治療の第一選択はドパミン作動薬を中心とした薬物療法であるが、近年の手術技術の進歩により、鞍内に限局する非浸潤性の腫瘍に対しては、手術単独での治療が期待できる。今回内視鏡単独経鼻的手術(eTSS)による治療成績について報告する。過去6年間にeTSSを施行したPRLomaは65例であり、その中で鞍内限局型は47例であった。さらにその中で被膜外摘出を施行した症例は31例であった。PRL測定は術後1,7日目および退院後外来で行った。被膜外摘出を施行した症例について、術後1週間目のPRL値で、治療基準を5ng/ml未満とすると80.6%、10ng/ml未満で90.3%、15ng/ml未満では100%の治療が得られた。合併症は鼻出血が2例、永続的尿崩症が1例、低ナトリウム血症が11例であった。また、手術前後でGH分泌能の悪化は認められなかった。鞍内限局型の非浸潤性PRLomaの場合、被膜外摘出を行うことにより、報告されている薬物療法のコントロール率と同様の成績が得られ、また術前後で下垂体機能低下を示唆する所見は無かった。術後低ナトリウム血症の発現が多かったが、被膜内摘出群と比較し、統計学的有意差は認めなかった。

A. 研究目的

下垂体腺腫は、臨床の場合において時に遭遇する腫瘍であり、頭蓋内腫瘍の約18%を占める。そのほとんどは良性腫瘍であるが、腫瘍の発生部位が脳深部の主要血管、神経に近いことから、その進展様式によっては視神経障害による失明、視力視野障害、外眼筋麻痺による複視、内頸動脈の狭窄、閉塞による脳梗塞などの重度の障害を来す恐れがあり、早期の診断、病態把握、適切な治療が必要不可欠である。治療に関しては、当然のことながら手術が第一選択となる場合が多く、この場合、なるべく再発・再増大を来さない治療が望まれている。ただし、プロラクチン産生下垂体腺腫(Prolactin secreting pituitary adenoma; PRLoma)に限っては、cabergoline、bromocriptine、tergurideによる

薬物療法が第一選択となっており、場合に依りて手術療法が考慮される。手術適応は、薬物抵抗性の場合、また副作用で服用困難な場合が当てはまるが、microadenomaの中でMRIによりenclosed typeとみられる場合で、手術に治療率が高い(90%以上)の場合は、手術療法の有効性を説明し、患者の選択を求めべきとされている。

一方、昨年も報告したように、下垂体腺腫に見られる仮性被膜はBerglandらが1975年に初めて報告した。これによると、仮性被膜は基底膜、コラーゲン線維、線維芽細胞、および圧迫血管の集族したものと記載されている。また、Farnoudらは仮性被膜は腺腫と周囲の正常組織の移行帯であり、腺腫と正常細胞が混在していると報告している。また、著者らも1979年に仮性被膜について言及して

いる。近年、下垂体腺腫における仮性被膜に注目が集まり、機能性腺腫において被膜外摘出が治癒成績を向上させるとの報告が散見される。今回、非浸潤性のPRLomaにおける被膜外摘出の治療成績、合併症について検討した。

B. 研究方法

1. 対象

対象症例は2004年2月から当施設で内視鏡単独経鼻的下垂体腫瘍摘出術(eTSS)を施行した65症例である。その中で、鞍内限局型は47例であり、さらに被膜外摘出を行った症例は31例であった。患者はすべて女性で、年齢は17～44歳(平均28.5歳)であった。

2. 方法

対象症例については術前、および術翌日、術後1週間目にPRLを含め下垂体前葉ホルモンの測定を行った。さらに術前および手術2週間後にTRH500 μ g + LHRH100 μ g + CRH100 μ g + GRH100 μ g 負荷テスト、及びGHRP-2負荷テストを行い、下垂体前葉ホルモンの予備能を評価した。

一方、手術の手順は、まず腫瘍の内減圧を行った後、正常下垂体の残存するサイドから腫瘍被膜をとらえ、これを剥離していった。これらの組織は、ただちに20%のホルマリン固定とした。手術によって得られた下垂体腺腫組織はヘマトキシリン-エオジン染色、および鍍銀染色による形態学的な検索を行うとともに、各種下垂体前葉ホルモンに対する免疫組織学的検討を行った。

3. 手術成績と合併症

非浸潤性のPRLomaの治癒率の評価とし

て、術後1週間目のPRL値を用いた。また各症例において、合併症を評価し、被膜内摘出群との比較を行った。

4. 被膜外摘出と内分泌機能

被膜外摘出が内分泌機能にどのような影響を及ぼすかについて検討した。すなわち、術前後でGHRP-2負荷試験でのGH分泌能の変化を検討した。

C. 研究結果

1. 代表症例

図1は24歳女性で無月経を主訴に発見されたPRLomaの患者である。術前のPRL値は284.9ng/mlと高値を示し、下垂体MRIではトルコ鞍内に限局するliquefied massを認めた(図1a, b)。海綿静脈洞浸潤は無く、腫瘍の実質成分は後方に存在していた。術中、腺腫の液体成分を吸引し、腫瘍を内減圧の後、腫瘍左縁より仮性被膜をとらえ、これを全摘出した(図1c, d)。術後1週間後のPRL値は<1.0ng/mlと測定感度以下となり、合併症なく独歩退院となった。

2. 手術成績

非浸潤性PRLomaに対し、eTSSにより被膜外摘出を行った31例の術前後のPRL値の推移を図2に示す。この結果を図3にまとめると、術後1週間目のPRL値を5ng/ml未満とすると31例中25例(80.6%)で、また10ng/ml未満とした場合28例(90.3%)で、さらに15ng/ml未満で設定した場合、全例で内分泌学的治癒が得られた。

3. 合併症

被膜外摘出群の合併症は3カ月以上継続する尿崩症が2例(6.5%)、鼻出血が1例(3.2%)、

一過性の低ナトリウム血症が11例(35.5%)であった。これらを被膜内摘出群と比較すると、尿崩症が6.3%、鼻出血が6.3%と差はなかった。一方、一過性の低ナトリウム血症は12.5%と被膜内摘出群で低い傾向にあったが、被膜外摘出群と比較すると両群に統計学的有意差は認められなかった(Mann-Whitney検定($p=0.098$))(表1)。

4. 術前後の内分泌機能

図4は非浸潤性PRLoma31例に対する、術前後のGHRP-2負荷試験でのGH頂値を見たものである。GH頂値が15ng/ml以上を正常反応とすると術前全例が正常反応であった。一方、術後GH頂値が15ng/ml未満となった症例に関しても一例も見られなかった。

D. 考察

前述のように、PRLoma治療の第一選択は薬物療法である。しかしながら長期間の投与が必要であることや、治療薬の一つであるCabergolineの心臓弁膜症リスクの増大などの問題があり、薬物療法に注意が払われている。また薬物投与後短期間で妊娠した場合、これを中止することによって腫瘍が再増大し、視力視野障害などの神経症状を来すことがある。そのため、妊娠を早期に望んでいる場合は手術により腫瘍実質容積を減じておくほうが安全とされている。一方、腫瘍が非浸潤性で手術により全摘出が望める場合、術後の薬物療法が不要であることから、近年これらのタイプのPRLomaに対する手術療法が見直されつつある。

下垂体腺腫に見られる仮性被膜はBerglandらによって1975年に初めて報告されたが、これを意識した手術はあまり行われていなかった。しかしながら2005年以

降、仮性被膜を意識した下垂体腺腫の摘出(extracapsular removal)の報告が散見されるようになってきた。この中でLeeらは、意図的に被膜外摘出を行い、仮性被膜を認めた下垂体腺腫343例のうち、しっかりと被膜を認めた症例が180例(52.5%)に認められ、また不完全な発達をした被膜は163例(47.5%)だったとしている。また、その中で機能別に見た仮性被膜を有する頻度ではPRLomaが70.9%と最も多く、GHoma、非機能性腺腫、ACTHomaがそれぞれ55%、50.7%、40%であった。さらにLeeらは、同じ論文で仮性被膜への腫瘍浸潤が43.6%に認められ、これは腫瘍が大型なほど頻度が多かったとしている。またPRLomaに最も腫瘍浸潤が見られたと示している。したがって、PRLomaに対しては被膜外摘出を行わないと、被膜に浸潤した腫瘍を取り残し、術後内分泌学的治癒が得られない可能性があると思われる。今回、積極的な被膜外摘出を行ったことにより、術後一週間目のPRL値が10ng/ml未満を治癒とした場合、治癒率は90.3%と高かった。そもそも、Cabergoline抵抗性のPRLomaは全体の10%程度とされており、手術療法がこれらの薬物療法と同等の結果を示した。

また、手術合併症であるが尿崩症が6.5%、鼻出血が3.2%と最小限に抑えられた。一方、術後1週間前後で生じる低ナトリウム血症が35.5%と多かったことが注目される。そもそも下垂体腫瘍摘出後の低ナトリウム血症は有名であり、その多くの原因がSIADHであるとされている。今回の被膜外摘出群での発症率が高かった原因は不明であるが、被膜内摘出群と比較し、統計学的有意差は認められなかった。

さらに被膜外摘出が内分泌機能に及ぼす影

響であるが、Kawamata、Leeらは、先の論文で、術後下垂体機能悪化に違いは認められなかったとしている。我々も最も障害されやすいGH分泌能について検討したが、術後GH分泌能低下は一例もなかった。

E. 結論

非浸潤性のPRLomaに被膜外摘出を行い、治癒基準を<10ng/mlに設定すると90.3%と薬物療法と同様の治療成績が得られた。手術合併症は最小限に抑えられたが、術後1週間前後に生じる一過性低ナトリウム血症の発現が多い傾向が見られた。また被膜外摘出により、術後GH分泌能の悪化は認められなかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshida D, Koketshu K, Nomura R, Teramoto A. The CXCR4 antagonist AMD3100 suppresses hypoxia-mediated

growth hormone production in GH3 rat pituitary adenoma cells. J Neurooncol 100 (1), 51-64, 2010.

- 2) Teshima T, Hara Y, Taoda T, Teramoto A, Tagawa M. Central Diabetes Insipidus after Transsphenoidal Surgery in Dogs with Cushing's Disease. J Vet Med Sci 20 Aug [Epub ahead of print]
- 3) Hara Y, Teshima T, Taoda T, Ishino H, Nezu Y, Harada Y, Yogo T, Masuda H, Teramoto A, Tagawa M. Efficacy of transsphenoidal surgery on endocrinological status and serum chemistry parameters in dogs with Cushing's disease. J Vet Med Sci.72 (4):397-404, 2010.

2. 学会発表

- 1) Teramoto A. Recent progress of endoscopic transsphenoidal pituitary surgery. The 8th Japan-China Friendship Neurosurgical Symposium. 2010.6 (China).

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表1. 合併症

	被膜外摘出群 (n=31)	被膜内摘出群 (n=16)
DI (>3 month)	2 (6.5%)	1 (6.3%)
Epistaxis	1 (3.2%)	1 (6.3%)
Hyponatremia (transient) *	11 (35.5%)	2 (12.5%)

*Mann-Whitney 検定 (p=0.098)

図1. 24歳女性 非浸潤性PRL産生下垂体腺腫

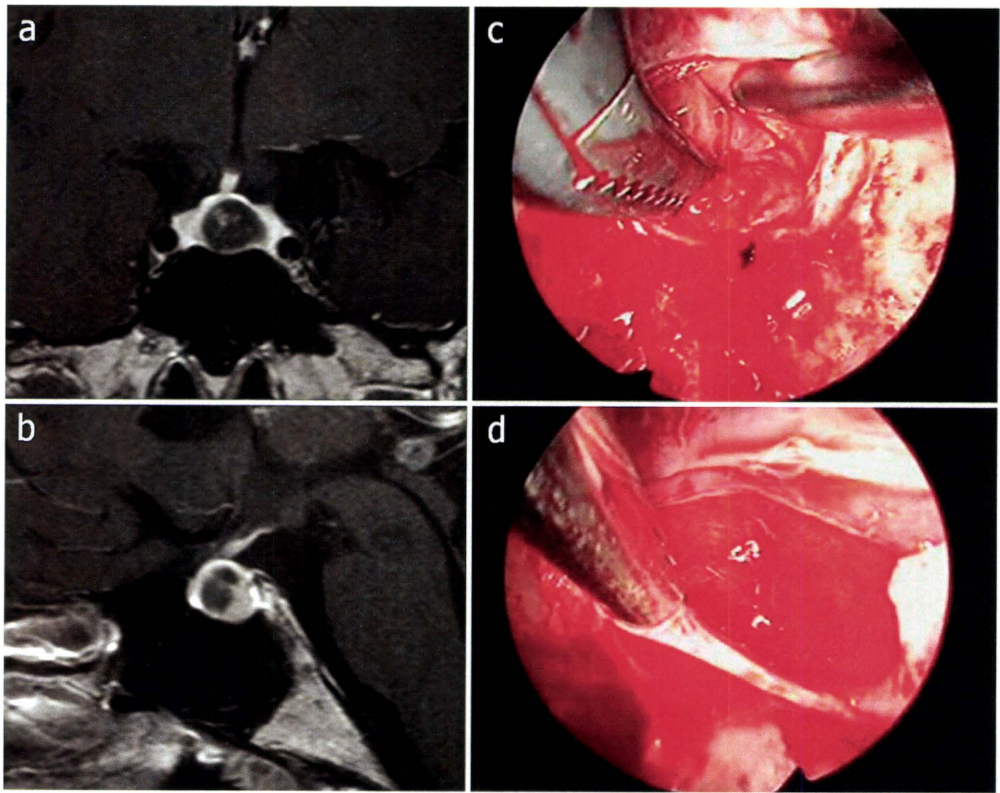
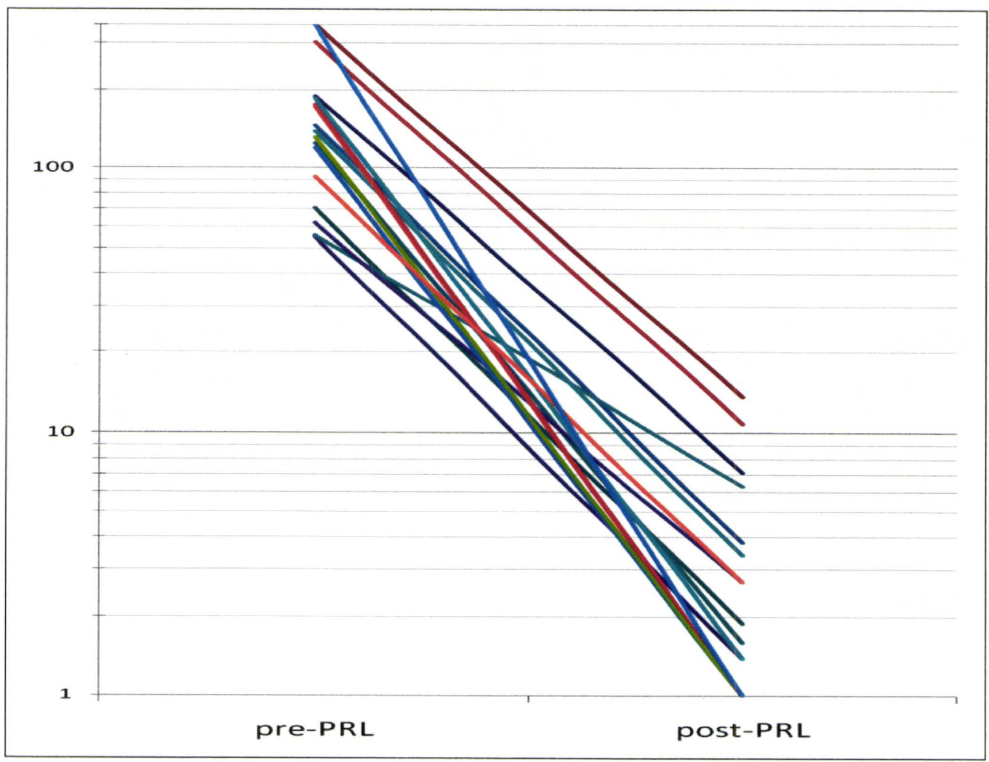


図2. 非浸潤性のPRLomaに対する被膜外摘出(n=31)



マクロプロラクチン血症の頻度と病態に関する研究

研究分担者 島津 章 (独)国立病院機構京都医療センター臨床研究センター
研究協力者 服部 尚樹 立命館大学薬学部臨床薬理学研究室
石原 隆 神戸医療センター中央市民病院内分泌糖尿病内科

研究要旨:高プロラクチン(PRL)血症の新たな病因であるマクロプロラクチン血症の頻度と病態について検討した。マクロプロラクチン血症は、健常成人1330人のスクリーニングで3.68%、高PRL血症292人のスクリーニングで15.1%と高頻度に認められた。マクロプロラクチンの87%がIgG結合PRLであり、67%が自己抗体結合PRLであった。自己抗体はヒトPRLに特異的でlow affinity、high capacityの性質を有していた。血中からのクリアランスの低下により高PRL血症を呈するが、マクロプロラクチン自身の生物活性は低く、臨床症状を欠く症例が多かった。本疾患が真に良性の病態か否かを明らかにし、日本における診断・治療指針を定める必要がある。

A. 研究目的

月経不順や不妊は、女性が産婦人科を受診する際の主要な症状である。高プロラクチン(PRL)血症は月経不順や不妊の原因のひとつであるため、その様な主訴で来院すると血中PRL値の測定が依頼される。高PRL血症があると確かに高頻度に月経不順や不妊をきたすが、月経不順や不妊からすると高PRL血症は原因のひとつにすぎず、むしろストレス、過度の運動やダイエットなど日常ありふれた出来事が原因することが多い。検査所見で血中PRL値が高いとその原因精査が行われる。高PRL血症の原因として、妊娠、PRL産生下垂体腺腫、下垂体茎を圧迫する腫瘍、抗ドパミン作用を有する薬物、胸壁疾患、肝疾患、腎疾患、原因不明の特発性高PRL血症などがあげられる。1980年代はじめ、著しい高PRL血症があるのに月経が正常で乳汁漏出が認められず、血清のゲル濾過で分子量が150kDa以上ある大分子PRLの占める率が高い症例の報告がなされた¹⁾²⁾。通常、下垂体PRLや血清PRLをゲル濾過す

るとほとんど23kDaの位置に溶出されるが、ごく一部が分子量150kDa以上と50kDa付近にも溶出され、それぞれbig-big PRL、big PRLと呼ばれていた。そしてbig-big PRLはPRLの凝集体、big PRLはPRLの二量体と考えられていた。報告症例のbig-big PRLの割合は非常に大きく、いわゆる通常みられるbig-big PRLとは明らかに異なった病態であることが推測されたが、その詳細は不明であった。

我々は、big-big PRLが明らかに増加した「マクロプロラクチン血症」の原因に、PRLに対する自己抗体が関与していることを見出し、その病態生理を明らかにしてきた³⁾⁻¹²⁾。これまで高PRL血症患者におけるマクロプロラクチン血症の頻度に関する研究報告は多いが、一般健常人におけるマクロプロラクチン血症の頻度は明らかではない。また、マクロプロラクチン血症の臨床症状に関しては、高PRL血症の症状に乏しいとする報告と他の高PRL血症と差異を認めないとする報告がある。今回、一般健常人および高PRL血

症患者におけるマクロプロラクチン血症の頻度および臨床症状について検討を加えた¹³⁾¹⁴⁾。

B. 研究方法

1. 対象

HB抗原/抗体検査を受けた1373例の神戸医療センター中央市民病院勤務者のうち、書面によるインフォームドコンセントが得られなかった39例と検体量が不足であった4例を除いた1330例(女性1010例、男性320例;年齢 36.9 ± 12.1 歳)を健常人とした。また、2004年から2009年までに同病院検査部にPRL測定の依頼があった中で、高PRL血症を認めた検体が625検体存在したが、同一患者によるものが多いため、重複を除いた292例(女性252例、男性40例;年齢 40.3 ± 11.5 歳)を高PRL血症の対象とした。長期経過の検討には、2年以上の期間を経て複数回採血を受けた患者12例(うち2例は15年および17年間の間隔)を対象とした。

2. 方法: マクロプロラクチン血症のスクリーニング

マクロプロラクチン血症のスクリーニングは簡便なポリエチレングリコール(PEG)法を用いた。終濃度12.5%のPEGは従来ラジオイムノアッセイ法の1抗体法でリガンドと1次抗体の複合体を沈殿させるために用いられてきたものである。血清50 μ Lを25%PEG 25 μ Lに添加後よく攪拌し、生じた沈殿を10000rpmで分離する。上澄中のfree PRLを高感度酵素免疫測定法(EIA)で測定し、PEGの代わりに同様の操作を水で行った結果をtotal PRLとして沈降率を算出した。IgG結合PRLの測定にはIgGの精製に用いられるProtein Gカラムを用いた。PRL自己抗体の測定は、¹²⁵I-PRLと患者血清を37°Cで1hイ

ンキュベート後、PEGで免疫複合体を沈殿させ、沈殿物の放射活性を γ カウンターで測定して行った。自己抗体の特異性に関する検討は、結合実験において大量のヒト、ブタ、ウシ、ラットPRLおよびヒト成長ホルモン(GH)を反応系に添加し免疫複合体の放射活性の低下率を指標にした。

(倫理面への配慮)

「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、個人情報保護を図るとともに、研究者の所属する施設の倫理規程を遵守している。本研究の実施にあたっては、神戸医療センター中央市民病院臨床研究審査委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1. マクロプロラクチン血症の頻度

健常人におけるマクロプロラクチン血症の頻度を図1に示す。PEGによる血中PRLの沈降率は37%をピークとする正規分布をとったがこれはPEGによる非特異的結合によると思われる。図1に示す様に60%(平均+2SD)以上のPRL沈降率を示す集団があり、マクロプロラクチン血症と定義した。健常人1330例中49例に認められ、その頻度は3.68%であった。男女差は無く、高齢者ほど頻度が高くなる傾向が認められた。

次に、高PRL血症患者でマクロプロラクチン血症のスクリーニングをしたところ、292例中44例にマクロプロラクチン血症が認められ、その頻度は15.1%であった。我々の結果も含めてこれまでに報告されたマクロプロラクチン血症の頻度を表1に示した。全高PRL血症患者の約15~25%にマクロプロラクチン血症が見出されている。

2. マクロプロラクチン血症の臨床症状

健常人のスクリーニングで見出された49例

のマクロプロラクチン血症の内15例(30.6%)に高PRL血症が認められ、マクロプロラクチン血症でない健常人における頻度(2.26%)に比べ有意に高かった。しかし、PEG処理後のfree PRL値はすべて基準範囲内であった。この15例については、HB抗原抗体検査の残血清を用いた研究のインフォームドコンセント上、年齢および性別の情報のみで臨床症状は不明である。高PRL血症のスクリーニングで見出されたマクロプロラクチン血症44例中32例が生殖可能年齢であり、内16例(50%)に月経不順が認められた。また、44例中5例に乳汁漏出が認められた。マクロプロラクチン血症では他の原因による高PRL血症、月経不順や乳汁漏出を合併している例が多く、それらを除いたマクロプロラクチン血症単独における月経不順と乳汁漏出の頻度はそれぞれ22%、2%と他の原因による高PRL血症に比し低かった。44例中12例でfree PRLが高かったが、そのうち8例は薬物やプロラクチノーマなど他の原因による高PRL血症の要因を合併していた。表2に我々の結果も含めたこれまでの主な報告を示した。

3. マクロプロラクチン血症の病態

マクロプロラクチン血症の原因であるIgG結合PRLとPRL自己抗体の頻度について検討した。健常人のスクリーニングで見出されたマクロプロラクチン血症49例全員にIgG結合PRL(9~84%)が検出された。PRL自己抗体は37例(75.5%)が陽性であった。一方、高PRL血症のスクリーニングで見出された39例中34例(87%)にIgG結合PRLが検出され(8~94%)、PRL自己抗体は26例(67%)が陽性であった。PRL自己抗体はヒトPRLに特異的であった。

4. マクロプロラクチン血症の長期経過

高PRL血症のスクリーニングで見出され

たマクロプロラクチン血症44例中、2年以上の間隔をあけて複数回採血された12例(そのうち1例は15年、他の1例は17年の間隔)を対象としてPRL沈降率、IgG結合PRLの割合、PRL自己抗体の割合の変化について検討した。図2に示す様に、PRL沈降率、IgG結合PRLの割合、PRL自己抗体とも大部分の症例で大きな変化を示さなかった。

D. 考察

現在、マクロプロラクチン血症の診断には2つの考え方がある。ひとつは本研究でも採用した、「PEGによるPRLの沈降率が60%以上(上澄中のPRLの回収率が40%以下)をマクロプロラクチン血症とする」というものである。本研究でも明らかになった様に、血中PRL値が正常の健常人の中にもこの定義に合致するマクロプロラクチン血症が多く存在する。これらの例が将来高PRL血症をきたすようになるかどうかは今後の検討課題である。しかしここでいう「正常」とは、これまでの血中総PRL値の基準値の範囲内ということであり、PEG処理によって正常であってもPRLが非特異的に沈降して上澄中のfree PRL値が低くなることから、今後PEG処理後のPRLの基準値の設定も必要となる。

マクロプロラクチン血症のもうひとつの定義として、英国のMcKennaらが提唱する¹⁵⁾「マクロプロラクチン血症とは高PRL血症があり、PEG処理後の上澄中PRL値が正常範囲内にまで低下するものをいう」がある。この考え方は臨床を重視した考え方であり、PEG処理後のfree PRL値が高かったら薬物やプロラクチノーマなど更なる検査や処置、治療が必要な高PRL血症であり、たとえ大分子PRL(マクロプロラクチン)が多く存在してもマクロプロラクチン血症とは言わない

とするものである。しかし、この定義に従うとマクロプロラクチン血症の人がドパミンアンタゴニストを服薬してfree PRL値が高くなったらマクロプロラクチン血症ではなくなってしまうことになり混乱を招く恐れがある。また血清PRL値が正常のマクロプロラクチンを有する集団は完全に無視されることになる。現状ではマクロプロラクチン(+)とfree PRL値の併記が現実的であると思われるが、今後の検討が必要である。

マクロプロラクチン血症の診断でもうひとつの問題は、PRLの測定系によりマクロプロラクチンに対する反応性が大きく異なることである。最近マクロプロラクチンに対する反応性が低いキットも販売されているが、多少の交叉反応はある。またマクロプロラクチンの多くはIgG結合PRLであり、PRL自己抗体が関与する症例が多いが、マクロプロラクチンであってIgG結合型でないもの、IgG結合型であって自己抗体でないものの本態はまだ明らかでない。マクロプロラクチンがヘテロであるため、測定キット間のみならず、個人によってもそのマクロプロラクチンのキット抗体に対する反応性が異なる。このようなキット間、個人間の相違の均一化をはかるためにも、PEG法によるマクロプロラクチンのスクリーニングは必要であると考えられる。

「マクロプロラクチン血症は良性の病態であり、更なる検査や治療は不要である」という考え方は一般的に認められている。しかし、その根拠として、高PRL血症のままに正常に妊娠分娩が可能であったとする我々の症例報告⁷⁾と、ごく最近発表されたWallaceらの「10年の経過でマクロプロラクチン血症患者においてプロラクチノーマは発症せず、頭痛など臨床症状の悪化は無かった」とする

報告¹⁶⁾などが挙げられる。マクロプロラクチン血症における高PRL血症は、いわゆる測定系への干渉による見かけ上の高PRL血症ではない。実際にPRLの多くがIgGと結合し、血中でfree PRLと共存している。すなわち、血中にPRLが分布する2つのコンパートメントがある。IgG結合PRLの生物活性は低い、ストレスなどでPRLが上昇した際、PRLがIgGに結合してマクロプロラクチンとしてもう一つのコンパートメントに貯蔵され、緩徐に排泄されるというホルモン動態が、そうでない場合と同じ生物作用を示す保証はない。大規模な臨床調査を行い、マクロプロラクチン血症の妊娠率は低く、マクロプロラクチン血症であってもドパミンアンタゴニストで治療した方が妊娠率が向上するという結果が得られる可能性は否定できず、今後検討すべき課題である。

もし「マクロプロラクチン血症は良性の病態であって、更なる検査や治療は不要である」という考えが真に正しいことが証明されれば、原因不明の高PRL血症として治療されている多くのマクロプロラクチン血症患者を見出して無駄な治療や検査を中止すべきであろう。患者にとっても医療経済の観点からも推進すべき方向性であろう。この点に関し、マクロプロラクチン血症研究の第一人者である英国のMcKennaから以下のメッセージをいただいた。「米国では97%の検査施設でマクロプロラクチン血症のスクリーニングがなされておらず、そのため高PRL血症患者の約8%が誤診されている。一方、英国では82%の検査施設でマクロプロラクチン血症のスクリーニングが行われ、医療費削減の面で成果があがっている。日本でもマクロプロラクチン血症のスクリーニングが早く始まることを望みます」と。

参考文献

- 1) Whittaker PG, Wilcox T, Lind T. Maintained fertility in a patient with hyperprolactinemia due to big, big prolactin. *J Clin Endocrinol Metab*, 53, 863-866, 1981.
- 2) Jackson RD, Wortsman J, Malarkey WB. Characterization of a large molecular weight prolactin in women with idiopathic hyperprolactinemia and normal menses. *J Clin Endocrinol Metab*, 61, 258-64, 1985.
- 3) Hattori N, Ikekubo K, Ishihara T, Moridera K, Hino M, Kurahachi H. A normal ovulatory woman with hyperprolactinemia: presence of anti-prolactin autoantibody and the regulation of prolactin secretion. *Acta Endocrinol* 126: 497-500, 1992.
- 4) Hattori N, Ishihara T, Ikekubo K, Moridera K, Hino M, Kurahachi H. Autoantibody to human prolactin in patients with idiopathic hyperprolactinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 1226-1229, 1992.
- 5) Hattori N, Ikekubo K, Ishihara T, Moridera K, Hino M, Kurahachi H. Effects of anti-prolactin autoantibodies on serum prolactin measurements. *Eur J Endocrinol* 130: 434-437, 1994.
- 6) Hattori N, Ikekubo K, Ishihara T, Moridera K, Hino M, Kurahachi H. Correlation of the antibody titers with serum prolactin levels and their clinical course in patients with anti-prolactin autoantibody. *Eur J Endocrinol* 130: 438-445, 1994.
- 7) Hattori N. The frequency of macroprolactinemia in pregnant women and the heterogeneity of its etiologies. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 586-590, 1996.
- 8) Hattori N, Inagaki C. Anti-prolactin (PRL) autoantibodies cause asymptomatic hyperprolactinemia: bioassay and clearance studies of PRL-immunoglobulin G complex. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3107-3110, 1997.
- 9) Hattori N, Ikekubo K, Nakayama Y, Kitagawa K, and Inagaki C. Immunoglobulin G subclasses and prolactin (PRL) isoforms in macroprolactinemia due to anti-PRL autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 3036-3044, 2005.
- 10) Hattori N, Nakayama Y, Ishihara T, Saiki Y, Inagaki C. Anti-prolactin (PRL) autoantibody binding sites (epitopes) on PRL molecule in macroprolactinemia. *J Endocrinology* 190: 287-293, 2006.
- 11) Hattori N, Nakayama Y, Kitagawa K, Li T, Inagaki C. Development of anti-PRL (prolactin) autoantibodies by homologous PRL in rats: a model for macroprolactinemia. *Endocrinology* 148: 2465-70, 2007.
- 12) Hattori N, Nakayama Y, Kitagawa K, Ishihara T, Saiki Y, Inagaki C. Anti-prolactin (PRL) autoantibodies suppress PRL bioactivity in patients with macroprolactinaemia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 68, 72-76, 2008.
- 13) Hattori N, Ishihara T, Saiki Y. Macroprolactinaemia: prevalence and aetiologies in a large group of hospital workers. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 71, 702-708, 2009.
- 14) Hattori N, Ishihara T, Saiki Y, Shimatsu A. Macroprolactinaemia in patients with hyperprolactinaemia: composition of macroprolactin and stability during long-

term follow-up. Clin Endocrinol (Oxf), 73, 792-797, 2010.

- 15) Suliman AM, Smith TP, Gibney J, McKenna TJ. Frequent misdiagnosis and mismanagement of hyperprolactinemic patients before the introduction of macroprolactin screening: application of a new strict laboratory definition of macroprolactinemia. Clin Chem, 49, 1504-9, 2003.
- 16) Wallace, I.R., Satti, N., Courtney, H. et al. Ten-year clinical follow-up of a cohort of 51 patients with macroprolactinemia establishes it as a benign variant. J Clin Endocrinol Metab, 95, 3268-3271, 2010.

E. 結論

高プロラクチン(PRL)血症の新たな病因であるマクロプロラクチン血症の頻度と病態について検討した。マクロプロラクチン血症は、健常成人1330人のスクリーニングで3.68%、高PRL血症292人のスクリーニングで15.1%と高頻度に認められた。マクロプロラクチンの87%がIgG結合PRLであり、67%が自己抗体結合PRLであった。血中からのクリアランスの低下により高PRL血症を呈するが、マクロプロラクチン自身の生物活性は低く、臨床症状を欠く症例が多かった。本疾患が真に良性の病態か否かを明らか

にし、日本における診断・治療指針を定める必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hattori N, Ishihara T, Saiki Y, Shimatsu A. Macroprolactinaemia in patients with hyperprolactinaemia: composition of macroprolactin and stability during long-term follow-up. Clin Endocrinol (Oxf), 73, 792-797, 2010.

2. 学会発表

- 1) Hattori N, Ishihara T, Saiki Y, Shimatsu A. Long-term follow-up of macroprolactinaemia. The 92nd Annual Meeting of the Endocrine Society, San Diego, June 21, 2010.
- 2) 服部尚樹, 石原 隆, 才木康彦, 島津 章. 教育講演 マクロプロラクチン血症: その頻度と病態. 第37回日本神経内分泌学会学術集会, 京都, 2010年10月23日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

図1. 健常人におけるマクロプロラクチン血症の頻度

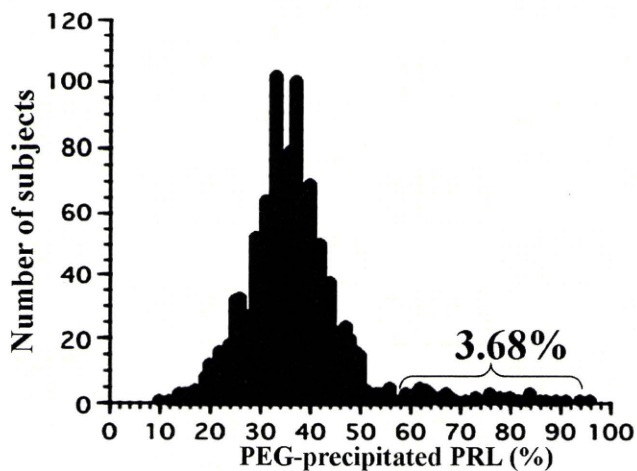


表1. 高PRL血症におけるマクロプロラクチン血症の頻度

マクロプロラクチン頻度 分析方法

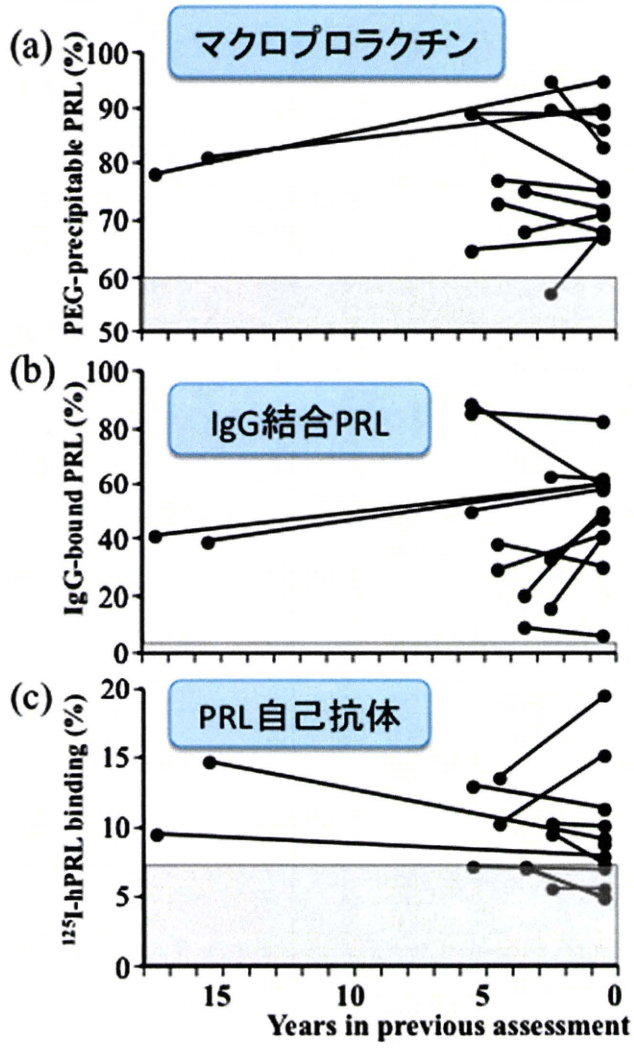
26% (157/605 HP)	Gel chromatography	Bjero <i>et al.</i> 1995
15% (28/188 HP)	PEG	Olukoga <i>et al.</i> 1999
26% (322/1225 HP)	PEG	Leslie <i>et al.</i> 2001
29% (106/368 HP)	Gel chromatography	Vallette <i>et al.</i> 2002
23% (62/270 HP)	PEG	Toldy <i>et al.</i> 2003
21% (58/273 HP)	PEG	Strachan <i>et al.</i> 2003
22% (452/2089 HP)	PEG	Gibney <i>et al.</i> 2005
9.7% (97/1000 HP)	PEG	Ellis <i>et al.</i> 2006
42% (57/135 HP)	PEG	Donadio <i>et al.</i> 2007
15.1% (44/292 HP)	PEG	Hattori <i>et al.</i> 2010

表2. マクロプロラクチン血症と他の原因による高PRL血症の臨床症状

マクロプロラクチン血症 他の原因による高PRL血症

月経不順	乳汁漏出	月経不順	乳汁漏出	
22/55 (40%)	1/55 (2%)			Leslie <i>et al.</i> 2001
15/52 (29%)	7/52 (13%)			Hauache <i>et al.</i> 2002
41/106 (39%)	49/106 (46%)	128/262 (49%)	173/262 (66%)	Vallette <i>et al.</i> 2001
19/32 (59%)	7/32 (22%)	73/100 (73%)	54/100 (54%)	Gibney <i>et al.</i> 2005
16/32 (50%)	5/44 (11%)			Hattori <i>et al.</i> 2010

図2. マクロプロラクチンの長期経過



下垂体で高発現する遺伝子の機能解析

研究分担者 巽 圭太 大阪大学大学院医学系研究科臨床検査診断学
研究協力者 高坂 和芳 大阪大学大学院医学系研究科臨床検査診断学

研究要旨：これまでBodyMap法や他のデータベースから同定した下垂体で高発現する新規遺伝子を解析する。昨年度に引き続きKIAA1324/mab1 (Pi-a/EIG121) をモデルとして、ドキシサイクリン(Dox)存在下でのみ発現して転写を抑制するRNAi用ベクター、あるいは、過剰発現ベクターを各種細胞株に導入し細胞生物学的手法により接着活性を、生化学的手法により分子動態を解析した。遺伝子導入したマウス由来の線維芽細胞株では細胞接着は認められなかったが、遺伝子導入した下垂体由来細胞株と異なり細胞増殖の抑制が示唆された。ウエスタンブロットでKIAA1324/mab1の移動度を観察した結果、非還元SDS-PAGEではマウス由来の線維芽細胞株と下垂体由来細胞株では予想分子量の倍以上で両者が若干異なった分子量で検出された移動度が一方、通常の還元SDS-PAGEでは両者とも予想分子量で検出された。KIAA1324/mab1はS-S結合を介して複合体を形成していると想定され、KIAA1324/mab1の結合因子を同定することにより機能が解析の一助となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

先天性下垂体複合欠損症を始めとする下垂体疾患の診断・病因解明・加療には下垂体で発現する遺伝子の全体像を知ることが望ましい。我々は1997年にBodyMap法で下垂体特異的に発現する新規遺伝子PGSF (pituitary gland specific factor) 1、PGSF2と、下垂体で高発現する新規遺伝子Pi-a (KIAA1324/mab1/EIG121) を同定し、自己免疫性視床下部下垂体炎の補助診断に役立つ可能性があることを示した。2005年には他のデータベースからヒトとマウス共に高発現を認めた遺伝子で、ホルモン遺伝子、ホルモン関連遺伝子以外に、新たにDLK1, PLAGL1, PEG3, NNAT, SEZ6L2, FLJ3005の6つの遺伝子について下垂体が他の全組織と同等以上の高発現する脊椎動物に共通の遺伝子があることを明らかにしてきた。これらの遺伝子の機能は解明する1つの方法として機能解析を行って

いる。本年は、前年に引き続きKIAA1324/mab1/EIG121を細胞生物学的手法により機能解析を、生化学的手法により分子動態を解析した。

B. 研究方法

1) GH3細胞株でのTR-Dox系を用いたRNAiの検証

昨年度行ったGH3細胞株でのTR-DoxでのRNA干渉(RNAi)を用いたKIAA1324/mab1発現抑制実験では培養上清と細胞内のプロラクチン量には有意な変化を認めなかったため、本年度はPRLが減少する陽性対照実験としてPRLの転写調節を促進し、下垂体のPRL分泌細胞の分化・増殖にも必要であるPit1を用いた。

Pit1のcDNA配列よりPit1の発現を抑制するRNAi活性が高いと推定されるsiRNA (small interfering RNA) 配列をRational

siRNA design criteria (Reynolds et al. 2004) によって複数選択した。これらの siRNA (small interfering RNA) 配列の元となるヘアピン状の RNA をドキシサイクリン (Dox) 投与下でのみ発現・生成する TR-Dox 系の RNAi 用ベクターを複数構築した。これらの RNAi 用ベクターを別に構築した pit1 過剰発現ベクターとともに一過的に HEK293 細胞に共導入し RNAi 活性が相対的に高いものを選択した。この RNAi 用ベクターを昨年度樹立した GH3/TR 細胞株に導入してクローン化し、Pit1 発現抑制株 (GH3/TR/ Pit1_siRNA) を数クローン樹立した。

2) KIAA1324/maba1 の接着活性に与える影響の解析

接着活性の検討には L929 マウス線維芽細胞を用いた。L929 細胞は homologous な接着活性が無いことが知られており、かつて cadherin の接着能の実証に用いられた細胞である。昨年度構築した Neo 耐性カセットを持つ KIAA1324/maba1 の過剰発現ベクター (maba1-EGFP) を L929 細胞に導入し、G418 で薬剤選択し、GFP の蛍光を発する細胞集団を探してクローン化し、接着能を検討した。この際、クローニングの陽性対照実験として Neo 耐性カセットを持つ EGFP 発現プラスミドにより同様の実験を行った。

3) KIAA1324/maba1 の分子動態の解析

GH3/TR/maba1-myc-His 株で強制発現される Myc タグおよび His タグを C 末端に融合させた KIAA1324/maba1 (maba1-myc-His) の検出には抗 Myc タグ抗体または抗 His タグ抗体を用いて非還元下、還元下で Western blot した。

我々は昨年度 Dox 添加後に KIAA1324/maba1 の mRNA の減少が顕著なクローン GH3/TR/maba1_siRNA 株を樹立した。市販の抗 KIAA1324/maba1 抗体 (Abcam 社 抗ヒ

ト KIAA1324 抗体 ab81247) と抗 KIAA1324/maba1 抗体 (Santa Cruz ヒト EIG121 抗体 V-14) を用いて非還元下、還元下で Western blot し、この細胞株で内在性に発現する KIAA1324/maba1 が Dox (+) により減少するタンパク質として検出を試みた。

さらに、GH3/TR/maba1-myc-His 株と GH3/TR 株 (陰性対照実験) とを別々に Dox 添加培地で 4 日培養した後に溶解し、Ni ビーズを用いて maba1-myc-His の複合体を回収し、Imidazole 分画溶出後、還元剤を含まない Laemmuli の SDS-PAGE buffer に溶解し SDS-PAGE した後に銀染色した。

C. 研究結果

1) GH3 細胞株での TR-Dox を用いた RNAi 系の検証

まず、ラット pit1 に対する RNAi 用の標的配列を 4 つ選定し、それらに対する RNAi 用ベクターを構築して RNAi 活性を調べた。本研究では Pit1 の ORF が短いために余り RNAi 活性の高い配列は得られなかったが、相対的に RNAi 活性の高い配列を持つ RNAi 用ベクターを用いて最終的に Pit1 が数分の 1 に減少する Pit1 発現抑制株 (GH3/TR/Pit1_siRNA) を数クローン得た (図 1)。これらのクローンでは Dox (+) は培養した Pit1 の発現を抑制したものと Dox (-) で培養したものと間で β tubulin 量に差を認めず、細胞増殖に影響が見られなかった。細胞内のプロラクチン量をウエスタン法で半定量したところ、顕著とはいえないものの幾分減少を認め、TR-Dox 系で PRL が減少するの確認した。

2) KIAA1324/maba1 の接着活性に与える影響の解析

接着活性の検討のため、maba1-EGFP を L929 細胞に安定に導入した KIAA1324/

maba1 過剰発現株 (L929/maba1-EGFP) を樹立した。EGFP を L929 細胞に安定に導入したコントロール実験では、蛍光を発する細胞のコロニーが多数形成された。しかしながら、maba1-EGFP を L929 細胞に安定に導入した実験ではトランフェクション後の数日は蛍光を発する細胞の割合は EGFP と大差なくトランフェクションの遺伝子導入効率は同等であったが、蛍光を発する細胞がその後増殖せず、コロニーを形成したのはわずか 1 クローンと KIAA1324/maba1 過剰発現株を得ることは極めて困難であった。KIAA1324/Maba1 は細胞膜に局在し、細胞接着活性があれば細胞の交わる部分に GFP のシグナルは濃縮して接着する。この細胞株を培養して細胞の交わる部分を注意して観察したが、そうした部分や細胞細胞境界に GFP のシグナルは濃縮しなかった (図1)。また、細胞同士は親株である L929 同様に隙間を空けて存在しており、細胞接着は認められなかった。

3) KIAA1324/maba1 の分子動態の解析

GH3/TR/maba1-myc-His 株で強制発現された KIAA1324/maba1 (maba1-myc-His) を抗 Myc タグ抗体または抗 His タグ抗体を用いて非還元下で Western blot したところ、予想分子量の倍以上の分子量で検出された (図3)。単量体のバンドを検出するため、還元剤としてメルカプトエタノールと DTT とを比較したところ、後者のほうが検出感度が優れ、予想される 110kDa 付近の移動度にバンドを検出できた。この結果は、加熱方法を 55°C1 時間と 98°C5 分の 2 通りの何れでも差を認めなかった。

HEK293 に強制発現させた KIAA1324/maba1 (maba1-myc-His) の非還元 SDS-PAGE での分子量と GH3/TR/maba1-myc-His 株で強制発現された KIAA1324/maba1 の分子量

に差を認めたが、還元剤である DTT を入れて加熱処理したところ、両者に発現させた KIAA1324/maba1 はほぼ同じで予想通りの移動度にバンドを検出した。

GH3/TR/maba1_siRNA 株の内在性の KIAA1324/maba1 は Dox (-) で培養した時に比べ Dox (+) で培養すると減少することを利用して検出を試みたところ、抗 KIAA1324 抗体では、非還元サンプルでは強制発現時と同様の分子量のバンドが検出されたが、抗 EIG121 抗体では強制発現のバンドが検出できなかった。

GH3/TR/maba1-myc-His 株から Ni ビーズを用いて回収した maba1-myc-His の複合体を Imidazole 分画溶出後、還非還元下で SDS-PAGE した後に銀染色した結果、maba1-myc-His を過剰発現した細胞から得た精製産物のみで見られた分子量の大きなバンドを認めた (図3)。

D. 考察

今回、GH3 細胞株で Pit1 を用いて PRL が減少するのを確認し、下垂体細胞株での TR-Dox 系を用いた RNAi による発現抑制が有効であることを確認した。ところで、Pit1 発現抑制株 (GH3/TR/Pit1_siRNA) で Dox (+) により Pit1 量が数分の 1 に減少しながら、細胞内のプロラクチン量の減少が少なかったことに関して、以下のように考えられる。一般論として、RNAi は標的 mRNA を切断することで結果的に標的タンパク質の減少を起こす。この場合に標的タンパク質減少をもたらす現象は細胞増殖による希釈効果と標的タンパク質の分解である。mRNA が切断されると、この減少分が補充されなくなり結果的に標的遺伝子のタンパク質が減少する。このことと Pit1 が PRL の転写因子として働くこ

とを考え合わせると、Pit1 タンパク質やPRL mRNAやPRLタンパク質の安定性しだいではRNAiの効果がPRL産生量や分泌量に効果を及ぼすにはタイムラグが生じる可能性を示唆する。従って、TR-Dox系で任意の遺伝子をRNAiした場合は、標的遺伝子のタンパク質が定常的といえるまで減少してからさらに数日培養してPRLの培地中の量あるいは細胞内の量を検出することではじめて当該遺伝子のPRL産生やPRL分泌への差を検出できる場合がある可能性がある。

KIAA1324/maba1は膜貫通分子であり、子宮内膜疾患で腫瘍が高分化型(Grade 1)に比べ低分化型(Grade 3)では発現が減少すると報告があったことから、KIAA1324/maba1の発現量の低下が接着活性に影響を与えて低分化型になる可能性を考えてL929マウス線維芽細胞での接着能を検討したが、細胞細胞境界にGFPのシグナルは濃縮せず、細胞同士は親株であるL929同様に隙間を空けて存在しており、細胞接着は認めず、homologousな接着活性については否定的となった。この解析の際に、KIAA1324/maba1過剰発現株を得ることは極めて困難であった。

これに関連して、2010年にヒト乳癌細胞MCF7などを用いた解析(Deng L. et al. 2010)があり、KIAA1324/maba1はautophagyに必要な因子で、ストレス環境下での細胞の生存を高め、HEK293細胞やNIH 3T3細胞といった細胞株でKIAA1324/maba1を発現させた場合に細胞増殖が抑制されアポトーシスが起きると報告されている。これは我々がL929細胞で経験したことと以下のように類似している。L929もNIH 3T3も共にマウス由来の線維芽細胞株であり、maba1-EGFPはL929細胞に対しても同様の細胞増殖抑制効果をもたらしたのではないかと考

えられる。一方、昨年度報告したとおり、GH3/TRでは過剰発現してもRNAiにより減少させても細胞増殖に影響が無く、L929細胞と過剰発現時の応答が異なる。こうした差異の原因として、GH3ではKIAA1324/maba1のmRNAは内在性に高レベルに発現が認められることから、内在性KIAA1324/maba1発現レベルの低い細胞にKIAA1324/maba1を発現させた場合は生理的効果として細胞毒性が出る可能性があり、逆に内在性KIAA1324/maba1発現レベルが高い細胞ではKIAA1324/maba1の細胞毒性を打ち消す分子的背景があるのではないかと考えられる。

このようなことから、内在性KIAA1324/maba1に結合する物質が組織内で重要な働きを持つ可能性が示唆された。ところで、GH3/TR/maba1-myc-His株とGH3/TR/maba1_siRNA株で非還元SDS-PAGEで検出されたKIAA1324/maba1の分子量は同等であったが、HEK293で非還元SDS-PAGEで検出されたKIAA1324/maba1の分子量はことなる一方、通常の還元SDS-PAGEではKIAA1324/maba1のバンドの移動度は同じであった。これらの非還元SDS-PAGE間や還元SDS-PAGEとの分子量の差はS-S結合による複合体に原因があると考えられ、GH3細胞あるいはHEK293細胞の少なくとも一方はKIAA1324/maba1と別のタンパク質がS-S結合を介した複合体を形成していることを示唆している。複合体に差があれば、前述の内在性にKIAA1324/maba1を高発現する細胞とそうでない細胞でKIAA1324/maba1強制発現のもたらした効果の差異を説明できる可能性がある。Niビーズを用いてKIAA1324/maba1の複合体を回収し、Imidazole溶出の後還元剤を含まないSDS-PAGE bufferに溶解した。これをSDS-PAGEした後に銀染色し、

maba1-myc-His を過剰発現した細胞から得た精製産物のみで見られる分子量の大きなバンドが分画できたので精製を試みている。S-S結合を介した結合分子が同定されれば機能解析が進む可能性がある。

今回用いた内在性に発現する KIAA1324/maba1 を検出するために用いた2つの抗体についてであるが、抗ヒト KIAA1324抗体は細胞外領域の50アミノ酸を抗原として作られたものである。この領域でのアミノ酸はヒト-ラット間で45残基(90%)一致している。そもそも細胞外領域に対する抗体であるため、種間で保存されたエピトープに対しては抗体ができにくいとも考えられる。しかしながら内在の KIAA1324/maba1 を検出できているため、交叉反応はあるといえる。抗 EIG121抗体についてはWesternで強制発現の KIAA1324/maba1 を検出できないので少なくとも内在性の KIAA1324/maba1 の検出には困難である。

E. 結論

現在までに下垂体における KIAA1324/maba1 の機能はなお未知のままである。

少なくともL929細胞を用いた実験では KIAA1324/maba1 の homologous な接着活性は確認できなかった。GH3細胞では非還元 SDS-PAGEにより KIAA1324/maba1 がS-S結合を介して複合体を形成しているらしいことを見出した。今後、KIAA1324/maba1 の結合因子を同定することにより機能が解析の一助となる可能性が示唆された。

F. 研究成果発表

1. 論文発表

- 1) Characterization of Thr-354 in the human sodium/iodide symporter (NIS) by site-directed mutagenesis. Tatsumi, K, Fujiwara, H, Tanaka, S, Amino, N: *Endocr J*, 57, 11, 997-999, 2010
- 2) Association of functional polymorphisms related to the transcriptional level of FOXP3 with prognosis of autoimmune thyroid diseases. Inoue, N, Watanabe, M, Morita, M, Tomizawa, R, Akamizu, T, Tatsumi, K, Hidaka, Y, Iwatani, Y: *Clin Exp Immunol*, 162, 3, 402-406, 2010