

201024008B

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に関する調査研究

# 平成20年度～22年度 総合研究報告書

研究代表者 大 磯 ユタカ

平成23年3月

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に関する調査研究

# 平成20年度～22年度 総合研究報告書

研究代表者 大 磯 ユタカ

平成23年3月

# 目 次

I. 序 文	1
--------	---

II. 総合研究報告書	5
-------------	---

名古屋大学大学院医学系研究科病態内科学講座  
糖尿病・内分泌内科学 研究代表者 大磯ユタカ

## III. 会議記録

平成20年度研究班会議プログラム	25
平成21年度研究班会議プログラム	30
平成22年度研究班会議プログラム	35
間脳下垂体機能障害に関する調査研究班2009年度公開セミナー	40
間脳下垂体機能障害に関する調査研究班2010年度公開セミナー	41

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	45
--------------------	----

# I. 序 文

「間脳下垂体機能障害に関する調査研究」は厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業であり、1973年度にその研究が開始されて以来、継続した積極的な研究活動が進められてきました。2008年度から2010年度の3年間で私が研究代表者として新たな研究班を組織し多くの優れた研究分担者の協力を得ることができ間脳下垂体疾患に対する網羅的な研究を全力で進めてきました。

間脳下垂体機能障害とは視床下部と下垂体に発生する内分泌異常、自律神経異常など種々の病態を包含しますが、その中で最も主要な病態はこの場所で産生される各種ホルモンの分泌異常に基づく内分泌疾患が代表的なものであることは言うまでもありません。今回の研究班が発足した当初、2008年春の段階では難治性疾患克服研究事業の対象疾患としては、プロラクチン分泌異常症、ゴナドトロピン分泌異常症、ADH分泌異常症の3病態が当班の研究対象疾患に該当していました。しかし、2008年6月の特定疾患対策懇談会において難治性疾患克服研究事業の対象疾患として「先端巨大症」、「Cushing病」、「下垂体機能低下症」の3疾患が2009年度から追加されることが決定されました。さらに、2009年度半ばには当班の関与する間脳下垂体疾患の7病態（前記6病態に下垂体性TSH分泌異常症が追加された）が特定疾患治療研究事業（難病医療費支援制度）の対象疾患に指定され、診療費が軽減・免除されることになりました。この治療研究事業への指定に向けては、歴代の当研究班班長が班活動の一環として取り組んで来た長い経緯があり、また関連する患者会をはじめとする広い範囲からの社会的要請も強く、ようやく実現できたことは大きな活動成果の一つでもあるとともに、一方で今後の認定作業などにおいて当研究班の果たす役割の重要性を改めて認識することにもなりました。

このように、現在当研究班が担当する研究領域はきわめて広範囲の疾患群におよび、それだけに他の研究班とは研究の進め方や具体的な到達目標の設定などについてある意味異なった運営方法を取らざるを得ない立場となり、班員全体が共有すべき課題の選択と実施、および個々の領域・疾患に関する専門性を持った課題研究の深化を同時進行させることが非常に重要であると考えました。そこで、班研究の進め方として横糸となる横断的重要課題を設定するとともに、領域別の個別研究を併せ推進する方法により効率的で意義のある難病疾患研究を進めることとしました。重要課題研究には、新規間脳下垂体疾患の探索、自己免疫の関与する可能性がある各種間脳下垂体疾患の病態解析と診断マーカーの開発、それに基づく疾患概念の再構築といった具体的な課題を設定した他、横断的班研究活動の一環として間脳下垂体機能障害に関した社会連携活動である未承認薬の臨床導入、研究成果公表のための公開セミナーの開催などについ

でも推進・実践してきました。その結果、間脳下垂体の新規病態の発見や、新規治療法の臨床導入、さらには未承認薬の承認に向けた治験の開始などの成果を得ることができました。また、個別領域の研究もそれぞれ間脳下垂体疾患の病態形成、診断、治療、長期予後などに関する多くの良質な研究成果をあげることができ、この領域の医学と医療に貢献できたのではないかと考えております。

今後もこの領域の研究・診療の発展に向けて広く各方面との連携を深めながら継続し努力していく所存であります。

平成23年2月

間脳下垂体機能障害に関する調査研究班

研究代表者 大磯ユタカ

## Ⅱ. 総合研究報告書

## 間脳下垂体機能障害に関する調査研究

研究代表者 大磯ユタカ 名古屋大学大学院医学系研究科  
病態内科学講座糖尿病・内分泌内科学 教授

**研究要旨：**平成20年度から23年度の3年間にわたり、新組織として発足した間脳下垂体機能障害に関する調査研究班は、抗利尿ホルモン(バゾプレシン)分泌異常症、プロラクチン分泌異常症、ゴナドトロピン分泌異常症、先端巨大症、クッシング病、下垂体機能低下症、下垂体性TSH分泌異常症を指定研究課題とし、さらに関連する病態を含め1研究班としては非常に広範囲にわたる病態群を対象にそれらの発症機構、診断、治療、長期予後などについて研究を進めてきた。多数の間脳下垂体疾患に関し個々の疾患の研究を深化させることが重要であることは言うまでもないが、この領域の網羅的研究を進めることの重要性についてもあらためて認識し、班研究として横系となる横断的重要課題を設定し、領域別個別研究と併せ推進することにより効率的で意義のある難病疾患研究を遂行することを基本目的とした。重要課題研究には、1)新規間脳下垂体疾患の探索、2)自己免疫が関与する可能性のある各種間脳下垂体疾患の病態解析と診断マーカーの開発、それに基づく疾患概念の再構築、3)下垂体疾患の新規診断・治療法の開発などを中心とし、さらに疾患の早期発見、高水準で良質な治療を有効かつ安全に遂行できるよう当該疾患の診断・治療にかかわる指針を3年度にわたり経年的に大幅改訂した。また各種疾患の治療法別長期予後評価のための独自疾患データベースの維持と解析、診断・治療の手引きの更新、社会連携活動として未承認薬の臨床導入、研究成果公表のための公開セミナーの開催などを企画・実施した。これらの研究成果の概要としては、1)新規間脳下垂体疾患の発見、疾患概念の構築に至ったものとして、抗PIT-1抗体症候群を世界で初めて報告し、成人期以後に発症した中枢性TSH、GH、PRL分泌低下症が下垂体特異的蛋白転写活性因子であるPIT-1に対する抗PIT-1自己抗体に原因することを明らかにし、2)自己免疫が関与する可能性のある各種間脳下垂体疾患の病態解析と診断マーカーの開発として、臨床診断に必須であるためこれまで古くから世界的にその探索が行われてきたものの発見に至っていないリンパ球性漏斗下垂体後葉炎(LINH)の自己抗原探索と診断マーカーの確立に向けた研究をプロテオミクスの手法を駆使し網羅的に実施し、76kDの蛋白をその候補に特定し、マーカーとしての臨床応用への展開に至っている。3)下垂体疾患の新規治療法の開発については、SIADHの標準治療法の設定に向けた検討を行い、ナトリウム補正に随伴し発症する危険性のある橋中心髄鞘崩壊に代表される浸透圧性脱髄症候群の回避を目的としたミノサイクリン併用療法の有効性の証明と臨床応用を行った。さらに研究成果の社会還元を目的とした公開研究セミナーの定期開催し、また15年ほど前からわが国への導入を働きかけてきた中枢性尿崩症治療の世界的標準薬となっているデスマプレシン錠剤(溶解錠)の日本における開発を目的とし患者会とも連携の上、「医療上の必要

性が高い未承認の医薬品又は適応の開発」制度にあらためて申請し開発認可を得ることができ現在治験が進行するなど、研究班の研究活動が着実に社会へと還元されつつある。

一方、領域別の個別研究としては各対象疾患の病態解析、発症予防、早期発見による重症化・遷延化の防止、低負担の治療法開発によるQOL改善などを目的に研究を実施した。具体的研究課題としては、バゾプレシン関連では家族性中枢性尿崩症モデル動物でバゾプレシン遺伝子発現調節の検討を進め、またナトリウム負荷による多尿の進行を認め、小胞体ストレスの関与を明らかにした上で中枢性尿崩症進展予防に食塩コントロールが有用であることを示した。またSIADHの治療随伴性脱髄の発症・進展予防の基礎研究を行った上で標準治療法の設定目的で臨床治験に着手し症例を集積中である。さらに視床下部障害に基づく高ナトリウム血症の発症機構の解析を行い、安全な治療開発に向け基礎データを蓄積した。

成長ホルモン(GH)関連では、GH産生腺腫の自発開口分泌と病理像の関連、gsp変異とMLL/p27<sup>Kip1</sup>経路の意義、GH産生腺腫におけるプロレニン受容体の意義などの基礎的検討の他、GH産生下垂体腺腫のサイトケラチン染色性によりオクトレオチドに対する反応性の予測、オクトレオチドLARの治療成績、GH測定の標準化が適正診断に与える影響の検討、手術後治癒と判定されたGH産生腺腫患者におけるGH分泌能の推移、先端巨大症における内頸動脈IMTなどを用いた動脈硬化進展の把握とその因子解析、成人GH分泌不全症(GHD)患者におけるGH治療前後のQOL調査の施行、GHD患者における肝機能障害とGHの治療効果に関する検討、GH欠乏がメタボリック症候群を発症させる機序の詳細などの研究を進め、診断・治療指針の大幅改訂につながる成果ともなった。

ACTH関連では、レプチン・CRHダブルノックアウトマウスの表現型解析、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、Cushing病と臨床上鑑別がきわめて困難である異所性ACTH産生腫瘍の病態の相違を明らかにする目的でIKZF1発現を解析しその亢進を認め、転写因子の発現の違いが病態形成に重要な意味を持つ可能性を明らかにし、またCrooke cell adenomaの臨床病理学的検討によりMIB-1index、p53、ソマトスタチン受容体サブタイプなどの指標を組み合わせることにより治療抵抗性の腺腫に対する新しい治療導入への展開につながる成果を得、Cushing病モデル動物におけるインスリン抵抗性発症機構の解明など基礎的研究を進める一方、コルチゾール測定値標準化と測定誤差を考慮したデキサメサゾン抑制試験によるCushing病診断の検討、Pre/sub-clinical Cushing病の唾液中コルチゾール測定を用いた診断基準の策定し、さらにCorticotroph hyperplasiaによるCushing症候群の解析、小児におけるGHRP2負荷試験のHPA axisの評価などCushing病患者あるいはACTH分泌異常症患者の診断・治療法選択上の指針を提示した。

プロラクチンの領域では、プロラクチン産生腺腫からのプロラクチン過剰分泌機構について解析する目的で二光子励起法を用いた下垂体プロラクチン細胞からの顆粒分泌

を可視化し解析し種々の病態解析に今後広く応用できることを明らかにした。また、高プロラクチン血症の新たな病因であるマクロプロラクチン血症について、日本人におけるマクロプロラクチン血症の頻度とその病態について検討し、マクロプロラクチン血症が健常成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、今後臨床診断を進める上で重要な留意点となる成績を得た。また高プロラクチン血症を惹起する各種薬剤の比較検討を行い、その結果問題となる薬剤の添付文書改訂などの作業を行った。さらに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を検討し、今後の治療の選択肢を広げた。

ゴナドトロピン関連では、ヒト下垂体ゴナドトロピン産生腺腫におけるホルモン産生のエピジェネティクス制御機構の検討を行い、LHβプロモーター領域のメチル化がLH発現抑制に重要であることが明らかとなり、また、多嚢胞性卵巣症候群診断におけるLH、LH/FSH比の基準値設定を行い診断の精度向上を高めることが出来た。

長期予後の等関連研究では、間脳下垂体特定疾患患者の臨床像について、一つは班会議関連研究として独自に運営している間脳下垂体疾患データベースによる長期予後調査を継続実施し、先端巨大症89例、プロラクチノーマ58例、下垂体機能低下症123例、バゾプレシン分泌低下症38例など計300例以上の登録症例を解析し、主観的健康観ではバゾプレシン分泌低下症では低い傾向が強いことなど疾患特異性があることが示され今後の治療方針の決定の上で参考となる成績を得た。

以上はこの3年間にわたる当研究班の研究の中の一部に過ぎないが、世界初となる新規病態の発見、安全で有効な下垂体疾患の治療法の臨床展開などを含め医学、医療および社会に還元できる数多くの成果を得たものとする。

<b>研究分担者：</b>		横谷 進	国立成育医療研究センター 部長
平田結喜緒	東京医科歯科大学大学院医歯 学総合研究科 教授	島津 章	京都医療センター 臨床研究 センター長
大関 武彦	浜松医科大学医学部 教授	苛原 稔	徳島大学大学院ヘルスバイオ サイエンス研究部 教授
須田 俊宏	弘前大学大学院医学研究科 教授	柳瀬 敏彦	福岡大学医学部 教授
森 昌朋	群馬大学大学院医学系研究科 教授	有田 和徳	鹿児島大学大学院医歯学総合 研究科 教授
寺本 明	日本医科大学大学院医学研究 科 教授	岩崎 泰正	高知大学教育研究部 教授
肥塚 直美	東京女子医科大学医学部 教授	高野 幸路	東京大学大学院医学系研究科 特任講師
石川 三衛	自治医科大学附属さいたま医 療センター 教授	竹腰 進	東海大学医学部 准教授
		清水 力	北海道大学病院 講師

巽 圭太	大阪大学大学院医学系研究科 講師
菅原 明	東北大学大学院医学系研究科 客員教授
有馬 寛	名古屋大学医学部附属病院 講師
高橋 裕	神戸大学大学院医学研究科 講師
横山 徹爾	国立保健医療科学院 部長
置村 康彦	* 神戸大学大学院保健学研究 科病態解析学・医学研究科糖 尿病代謝内分泌学 准教授
長村 義之	* 東海大学医学部基盤診療学 系病理診断学 教授

( \* 研究班参加当時の所属・役職名)

## A. 研究目的

間脳下垂体系に発生する病態はきわめて多く、当研究班の指定研究対象は、抗利尿ホルモン(バゾプレシン)分泌異常症、プロラクチン分泌異常症、ゴナドトロピン分泌異常症、先端巨大症、クッシング病、下垂体機能低下症、下垂体性TSH分泌異常症の7疾患と広範である。そのため、間脳下垂体疾患の網羅的研究の重要性をあらためて認識し、班研究として横系となる横断的重要課題を設定し、領域別個別研究と併せ推進することにより、さらに効率的な難病疾患研究を遂行することを基本目的とした。

重要課題研究には、1) 新規の間脳下垂体疾患の探索、2) 自己免疫が関与する可能性のある各種間脳下垂体疾患の分子病態解析と診断マーカーの解析、それに基づく疾患概念の再構築、3) 下垂体疾患の新規診断・治療法の開発を主要な柱とし、これに加え当該疾患の診断・治療にかかわる手引き(指針)について毎年見直しと改訂を行った。その他の

横断的研究として各種疾患の治療法別長期予後を客観的に評価する目的で独自疾患データベースの維持と解析を行い、さらに診断・治療の手引きの継続的更新、社会連携活動として未承認薬の臨床導入、研究成果公表のための公開セミナーの開催などを企画・実施した。さらに当研究班の担当疾患が特定疾患治療研究事業の対象として指定されたため、厚生労働省と協議を重ねながら認定基準の策定、申請用個人票の書式作成などの作業を行った。

一方、個別領域研究としては各々の疾患病態解析、発症予防、早期発見による重症化・遷延化の防止、低負担の治療法開発によるQOL改善などを目的に研究を進めた。

## B. 研究方法

3年度にわたる研究計画は間脳下垂体系疾患の重要課題を含む横断的重要研究と、各病態の個別研究を並行して進めた。主たる重要課題については、新規下垂体病変の発見に基づく疾患単位としての診断・治療法の確定のために班内でプロジェクトチームを組織し研究を進めた。また新規治療法については班員の関連施設で開発治験を実施する体制を整備し、臨床評価のための活動を開始した。社会連携については未承認薬の導入のため、「医療上の必要性が高い未承認の医薬品又は適応の開発」制度に対応して行政、製薬メーカー、患者会などの中で本研究班が推進調整機能を発揮し、デスマプレシン経口薬(口腔内溶解錠)の開発治験を2011年1月から開始した。以下に代表的な横断的重要課題を示す。

### ・新規間脳下垂体疾患の発見、疾患概念の構築：

GH,PRL,TSH分泌が特異的、後天性に障害され発症した自己免疫機序が疑われる間脳

下垂体機能障害3症例において、その病態を明らかにすることを目的として各種自己抗体のスクリーニングによる解析研究を行った。

#### ・自己免疫が関与する間脳下垂体疾患の病態解析と診断マーカーの開発：

リンパ球性下垂体炎の特異的自己抗原蛋白をプロテオーム解析により検索し、IgG4関連疾患などとの鑑別診断を行い、治療法の開発を行う目的で自己抗原をプロテオミクスにより網羅的に解析する方法を構築し、診断マーカーなどへの臨床応用を行う。

#### ・下垂体疾患の新規治療法の開発：

SIADHの標準治療法の設定に向けた検討を行い、ナトリウム補正に随伴し発症する危険性のある橋中心髄鞘崩壊に代表される浸透圧性脱髄症候群の回避を目的としたミノサイクリン併用法の有効性の証明と臨床応用を行った。従来の研究で脱髄病変部に集積する活性化ミクログリア(MG)が脱髄の発症、進展に関与している可能性を見出したため、MGの活性化を阻害するミノサイクリン(MINO)の効果を検討し、その上で臨床治験を進めた。

一方、主要な個別研究については以下にその方法を示す。

#### ・下垂体疾患の診断標準化に向けたホルモン基準値の設定：

クッシング病(CD)/サブクリニカルクッシング病(subCD)の診断において、デキサメサゾン(Dex) 0.5mg抑制試験(DST-0.5)はスクリーニングの検査として必須であるが、近年、血清コルチゾール測定がnonRI法に切り替わり低濃度域における測定キット間での値のばらつきが問題になっている。そこで今回はコルチゾール標準物質を用いた標準血清を作成し、これによる較正と測定法の検定を行った。

#### ・バゾプレシン(AVP)：

家族性中枢性尿崩症(FNDI)は生後数か月から数年で緩徐進行性に尿崩症が発症する常染色体優性遺伝性疾患であるが、今回の研究ではバゾプレシンのキャリアプロテインであるニューロフィジンの点突然変異の一つであるCys98stopを導入したノックインマウス(FNDIマウス)を用い、バゾプレシン遺伝子発現調節の検討を行った。

さらにラトケ嚢胞の占拠部位特異的に下垂体前葉障害、尿崩症を呈する可能性についての症例解析と視床下部障害にもとづく高ナトリウム血症の病態の詳細分析を行った。

#### ・成長ホルモン(GH)：

成人GH分泌不全症(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、この肝機能障害は非アルコール性脂肪肝障害(NAFLD)と考えられ、GH治療により改善することが示唆されている。今回、GHDに対してGH治療を行った症例での肝機能障害の推移について、GH治療を1年以上受けている成人GHD49例(18~66歳；男/女 23/26)を対象とし、GH治療前後の肝機能障害、脂質異常について検討した。

さらに成長ホルモン分泌不全と代謝異常の関連を明らかにする目的で、肝細胞において糖質コルチコイド代謝に対する成長ホルモンの作用を検討した。

一方、先端巨大症治療後のGH分泌不全症が注目されている。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垂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。

また、GH産生下垂体腺腫には電顕像で densely granulated (DG) adenoma と sparsely granulated (SG) adenoma の2つの組織型があり、これはサイトケラチンの免疫組織染色で perinuclear pattern と dot pattern の二つに相当する。SG adenoma は DG adenoma に比べ大きめで、治癒しにくいことが示唆されている。これまで DG adenoma は盛んに顆粒分泌を行っており、SG adenoma は顆粒分泌も乏しいと推測されてきたが証明されておらず、この問題は治療成績とも強く関連するため重要である。今回は51例のGH産生腺腫を術後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。また 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した。

加えて、GH産生腫瘍において MLL と p27<sup>Kip1</sup> mRNA 発現が低下し、オクトレオチド (oct) 治療により回復することを本研究で明らかにしてきたが、多数例の解析から、この oct 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 GH 産生腫瘍で報告されている。そこで、oct の MLL/p27<sup>Kip1</sup> 経路への作用と gsp 変異の関係について、1) GH 産生腫瘍41例の gsp 変異を検索し、2) MLL、p27<sup>Kip1</sup> mRNA 発現量と gsp 変異の関係について検討した。

またプロレニン受容体 (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ち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、またその下垂体ホルモン分泌に対する意

義は全く不明であるためその解明を行った。

さらに成長ホルモン産生腺腫におけるサイトケラチン染色パターンと臨床・病理像との相関を検討した。

#### ・ACTH:

糖質コルチコイド (GC) の過剰で肥満や過食を伴う Cushing 病を呈するが、病態は未解明の点が多い。一方レプチン欠損により肥満をきたす ob/ob マウスでは GC の上昇が認められる。そこで GC 過剰に伴う肥満・過食の分子機序を解明するため、ob/ob マウスと CRH の欠損により GC 低下をきたす CRH-KO マウスを交配したレプチン・CRH ダブルノックアウト (DKO) マウスを作出し、ob/ob マウスとの間で体重・摂食量の比較および PCR アレイを用いた視床下部摂食関連遺伝子発現の解析を行った。一方、Cushing 病モデルマウスにおいてインスリン抵抗性の発症機序の解析についても同時に進めた。

また、レチノイン酸が Cushing 病に対する治療上有効であることが報告されている。これまでの研究でレチノイン酸受容体 (RAR) は POMC 遺伝子発現をむしろ増加させることを見いだしたが、その機序は不明であったことから今回検討を行った。

さらに 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、極めて稀に corticotroph hyperplasia の報告があり、異所性 CRH 産生腫瘍を病因とする症例が多いが、CRH 過剰産生を介さない病態の可能性もあり、今回は72歳の女性で ACTH 依存性の Cushing 症候群と診断した症例の解析を行った。

#### ・プロラクチン:

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について、

英国ではPRL測定を実施している全施設の82%がルーチンにスクリーニング検査を行っていることが報告されている。今回の研究では日本人におけるマクロプロラクチン血症の頻度とその病態について検討した。

また、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検討した。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日目および退院後行った。

さらに下垂体で高発現する新規遺伝子の単離と同定を行い、それらの機能について検討するため、下垂体で高発現する膜タンパクKIAA1324/mab1の細胞接着能について過剰発現系を用いて検討するとともにドキシサイクリン存在下でのみ発現して転写を抑制するRNAi用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。

また薬剤の副作用による高プロラクチン血症について、副作用の頻度・レベルに応じて注意喚起を可能にするために、医療用医薬品の添付文書情報の記述をより適切にし、高プロラクチン血症による短期・長期の副作用の発生と患者のQOLの悪化を少しでも予防できるか否かについての検討を行った。

#### ・ゴナドトロピン：

ヒト下垂体ゴナドトロピン産生腺腫は大部分が臨床的に非機能性腺腫であるが、黄体形成ホルモン(LH)に比較して卵胞刺激ホルモ

ン(FSH)の産生が優位となることが知られている。この現象は転写因子によるホルモン産生制御だけでは説明ができない。今回の研究ではゴナドトロピン産生腺腫におけるLH産生低下に遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化が関与していると考え検討した。経蝶形骨洞下垂体腺腫摘出術によって採取されたFSH陽性LH陰性の下垂体腺腫28症例を用いて、LHβ遺伝子プロモーター領域に存在するCpGサイトを標的としたMethylation-specific PCR (MSP)法を行った。

一方、近年、第1度無月経、希発月経、無排卵周期症の患者に遺伝子組換えヒトFSH製剤(rFSH)の自己注射が認可された。中枢性第2度無月経患者にはLHを含有するhMG製剤を用い、連日の通院注射で治療が行われる。今回はrFSHの効果を評価するため国内臨床試験成績を解析した。

さらにゴナドトロピン分泌異常を来す多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)の診断に重要である高LH判定の基準は、スパック-SでLH $\geq$ 7mIU/mlかつLH/FSH比 $\geq$ 1と規定されているが、他の測定系を用いた場合の判定基準は明確でない。そこで現在国内で汎用されている測定系のひとつであるエクルーシス試薬を用いた場合の基準値を検討した。

#### ・下垂体機能低下症：

下垂体機能低下症患者において、成長ホルモン欠乏(GHD)の有無、およびGH補充療法の有無によりQOLに違いがあるかを明らかにするため、成人下垂体機能低下症QOL尺度(Japan Adult Hypopituitarism Questionnaire, JAHQ)を使用して、91名の成人GHD患者のQOLを調査した。

また甲状腺を含む領域に放射線照射を受けた患者の甲状腺機能は詳細に検討されていない。今回は甲状腺を含む領域に放射線治療う

けた小児患者の甲状腺機能評価を目的として放射線治療群のTSH基礎値高値の患者に対しTRH負荷試験を施行した。

・長期予後関連調査：

間脳下垂体疾患の治療を施行する際、患者の生活状況や生活の質を把握することは、治療の妥当性や今後の治療方針決定に重要な意味を持つと考えられる。本報告では、北海道独自に施行されていた間脳下垂体疾患医療補助制度認定患者510名に対して臨床個人調査票をもとにその臨床像を解析した。

(倫理面への配慮)

人を対象とする全ての研究は、研究に参加する各施設の倫理審査委員会またはそれに該当する委員会の許可を受けた上で実施した。プライバシー保護のため、守秘義務の徹底と

すべての資料は施設下で管理するなど管理体制を整備した。担当医師は研究の実施に際し承認された説明文書に従って患者に説明し、文書を用い自由意志による同意を得た。また本研究を行うにあたっては、ヘルシンキ宣言の趣旨を尊重し、医の倫理的配慮をとるものとした。研究試料は住所、氏名を使用せず、個人を特定できない符号により管理した。参加、不参加あるいは参加後の中止により患者が不利益をうけることが一切ないことを明示した。動物実験は、研究に参加する各施設の動物実験・遺伝子組み換え実験許可を受けた上で、その実施要綱に沿って実施した。

C. 研究結果 (表1)

班研究の横断的重要課題の研究結果を中心

表1. 平成20～22年度間脳下垂体機能障害に関する調査研究研究成果

横断的重要課題

1)視床下部・下垂体疾患

i)新規疾患単位の検索とその診断基準・治療ガイドの確立

例:自己免疫性下垂体機能障害:抗PIT-1抗体、リンパ球性下垂体炎

ii)新規治療法の開発:基礎的班研究に基づく臨床展開

例:SIADH治療に伴う浸透圧性脱髄症候群臨床治験の進行

2)間脳下垂体疾患の診断・治療ガイドラインの逐年的改訂

領域別研究課題

7病態10疾患をコアにした臨床的・基礎的研究(本文参照)

疾患データベース

1)独自運用のデータベースの運用

症例の経年的蓄積と解析研究

2)特定疾患治療研究事業のデータ収集作業の構築準備

社会連携・行政への反映

1)間脳下垂体疾患に関する未承認薬導入への活動

中枢性尿崩症治療薬であるDDAVP錠剤の認可と治験の開始

2)特定疾患治療研究事業対象7病態の認定基準・個人票改訂

3)班研究成果の公表

間脳下垂体機能障害に関する調査研究班主催公開セミナー開催

として表1. にまとめた。そのうち代表的な研究結果を以下に示す。

・新規間脳下垂体疾患の発見、疾患概念の構築：

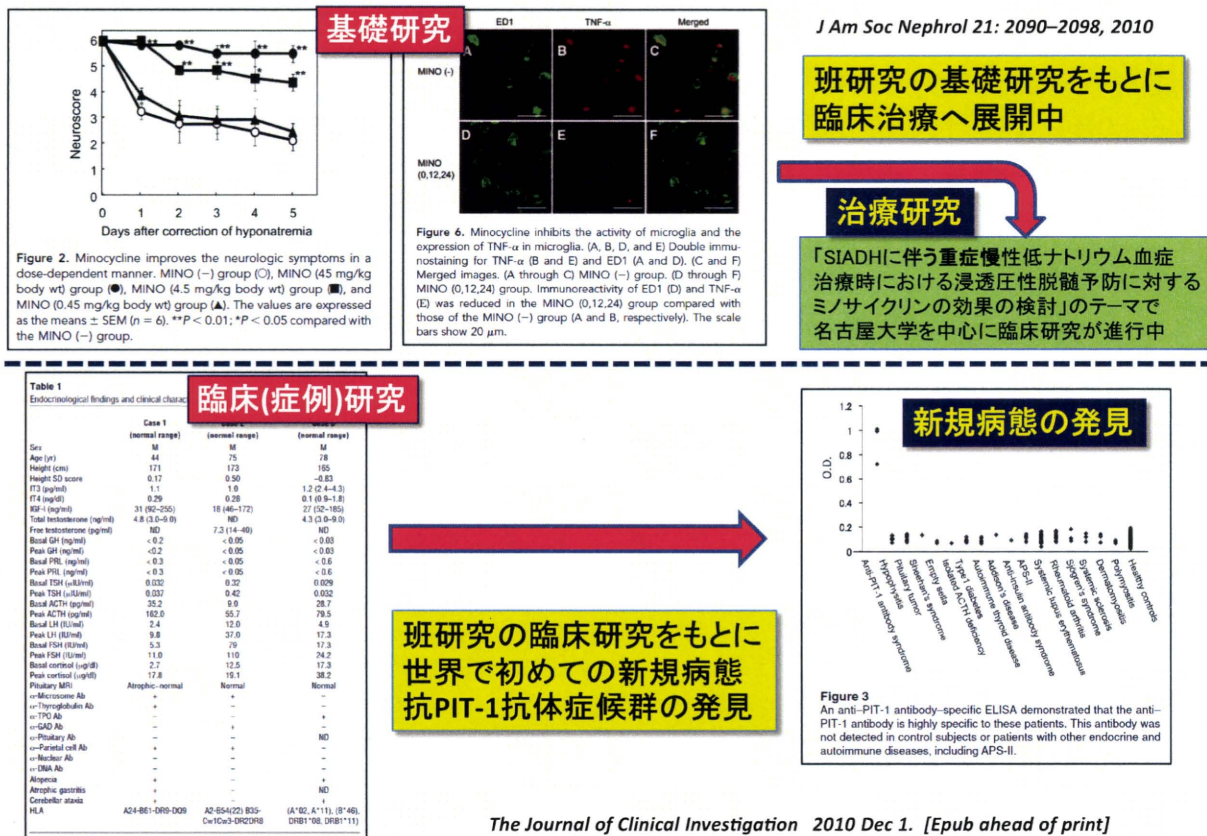
症例はいずれも成人期以後に中枢性甲状腺機能低下症を契機に発見され、GH,PRL測定感度以下TSH低値で、前葉ホルモンのプロファイルは先天性PIT-1遺伝子異常症と酷似していた。各種の自己抗体を検討し、今回の症例で検出された抗PIT-1抗体はコントロール、その他の内分泌、自己免疫疾患では認めず極めて特異的だった。下垂体におけるPIT-1陽性細胞、GH陽性細胞、PRL陽性細胞、TSH陽性細胞が特異的に消失しており、自己免疫性甲状腺炎、1型糖尿病、副腎炎、胃炎、肝炎を合併していたことから自己免疫

性内分泌腺症候群 (APS) 類縁疾患と考えられた (図1)。

・自己免疫が関与する間脳下垂体疾患の病態解析と診断マーカーの開発：

3例のLINH患者血清と健常人の血清を用いて解析を進め、LINH患者特異的な自己抗原候補が複数見出された。その中に自己抗原候補として6種類の分泌顆粒関連蛋白が認められたため、それらの6種類の自己抗原候補蛋白をサブクローニングし、リコンビナント蛋白を作成した。これらのリコンビナント蛋白と患者血清との反応をウェスタンブロットで再検証した結果、76kDの蛋白において患者血清との反応が確認された。LINH患者7例中6例で本76kD蛋白に対する自己抗体が認められた。一方、対照者で本自己抗体が認

図1. 平成20~22年度間脳下垂体機能障害に関する調査研究研究成果例



められたのは健常人で1例/9例、リンパ球性下垂体前葉炎0例/3例、腫瘍などに伴う尿崩症では1例/10例であった。

#### ・下垂体疾患(SIADH)の新規治療法の開発:

ミノサイクリン(MINO)を急速補正時、補正12時間後、補正24時間後の3回投与するMINO(0,12,24h)群を作成し神経症状への効果を確認した。急速補正のみの対照群のラットは補正後重篤な神経症状を呈するのに対し、MINO群では著明な神経症状の改善が認められた。MINOは組織学的にも脱髄発症・進展を防止した。またMINOは脱髄部に集積するMGのIB4、TNF- $\alpha$ の免疫活性を低下させ、MG活性を抑制した。定量的RT-PCRを用いた検討で、MINOは炎症性サイトカインiNOS、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ の遺伝子発現を有意に低下させ、免疫組織化学法で検討した結果、炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ 、iNOS、IL-1 $\beta$ は脱髄病変に集積するMGに発現することが明らかとなり、またMINOはMGの発現するこれらの炎症性サイトカインを抑制した。また、SIADHによる慢性低Na血症が認められ、かつ、血清Na濃度が120mEq/L以下で低Na血症のため神経学的症状を呈する患者に対し名古屋大学生命倫理委員会承認の上、高張食塩水による補正時にMINOの併用投与を行い臨床効果の検討を継続実施している(図1)。

代表的な領域別個別研究については以下にその研究概要を示す。

#### ・下垂体疾患の診断標準化に向けたホルモン基準値の設定:

コルチゾールの高純度標準品を利用して作成した検量線で低濃度のコルチゾール検体を測定し、血清標準物質とした。これを用いて従来使用されていた7つのコルチゾール測定キットの校正を行ったところ、各キット間の

ばらつきがCV $\leq$ 10%に改善した(校正前は約15%)。

この測定精度だと、Dex抑制試験のカットオフ値である1.8、3および5 $\mu$ g/d付近のばらつき( $\pm$ 2SD)は、それぞれ $\pm$ 0.36、 $\pm$ 0.6、 $\pm$ 1.0 $\mu$ g/dlとなった。

#### ・バゾプレシン(AVP):

電子顕微鏡を用いた検討により3か月齢のFNDIマウスにおいて視床下部視索上核のニューロンの小胞体内腔に凝集体の蓄積が確認された。FNDIマウスでは野生型マウスと比較してバゾプレシンmRNA発現が基礎状態、刺激下のいずれにおいても有意に低下していたが、転写活性を示すバゾプレシンheteronuclear(hn)RNAの発現は野生型マウスと比較して有意な差を認めなかった。

またラトケ嚢胞4例に関する詳細を解析した結果では、症例1-3はいずれの症例も多飲・多尿が出現し中枢性尿崩症と診断された。MRI画像上でトルコ鞍内、トルコ鞍内から鞍上部にかけて径10-16mmの嚢胞性腫瘤が見られラトケ嚢胞と診断された。画像上T1強調像では後葉高信号は消失しており、また下垂体前葉機能は正常であった。症例4は特異な下垂体機能障害を呈した、中枢性尿崩症と診断された後、全身状態不良、頭痛のため精査を施行し画像上下垂体柄から後葉にかけて腫大し同部位に辺縁明瞭に周囲が造影される腫瘤が見られた。T1強調像で後葉高信号は消失していた。下垂体機能では、視床下部障害パターンの下垂体機能低下症を呈した。3か月後のMRIでは下垂体柄と後葉の腫脹が軽減した。

また、高Na血症を呈する視床下部障害8例について水代謝異常の特徴を著しい脱水例5例と非脱水例3例の2群に分けて対比検討した。血清ナトリウムは156.4

vs 150.3mmol/l、尿浸透圧は246.8 vs 738.7 mmol/Kgと非脱水群で尿濃縮力が保持されていた。脱水群ではバゾプレシン(AVP)分泌が無反応で中枢性尿崩症に加え著しい渴障害を認めたが、非脱水群ではAVP分泌、渴中枢機能が部分的に残存し、sporadicなAVP分泌を示した。

#### ・成長ホルモン(GH)：

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。

さらに、肝細胞(HepG2 cell)において成長ホルモン、IGF-IおよびH6PDHを添加し11 $\beta$ 水酸化ステロイド脱水素酵素1型(11HSD1)のプロモーター活性を測定した。成長ホルモンないしIGF-I添加により11HSD1プロモーター活性は有意に減少した。生理的と考えられる濃度でもその反応は見られ、用量依存性も確認された。H6PDHによっても11HSD1プロモーター活性は低下したが濃度依存性は認められなかった。以上から成長ホルモンはIGF-Iを介したまたは直接的に肝での11HSD1プロモーター活性を低下させることが示された。

また術後症例の検討では、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。

さらに自発開口分泌の検討では、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high K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。

一方、GH産生腫瘍において、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<sup>Kip1</sup> 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。

また、PRRに関する研究では、PRPが下垂体で発現し、主に切断された可溶型受容体であり、成長ホルモン産生腺腫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の反応性が高い結果を得た。

さらに、GHoma 141例で検討した結果、CAM5.2抗体を用いたサイトケラチン染色パターンは、sparsely granulated adenomaに相当するdot pattern (DP) 30例(21.3%)、densely granulated adenomaに相当するperinuclear pattern (PP) 83例(58.9%)、両者が混在するmixed pattern (MP) 28例(19.9%)であった。腫瘍径はD型が有意に大きかった。TRHやLHRHテストに対する奇異反応はD型で有意に少なかった。E-cadherinに対する細胞膜の染色性はD型で有意に弱かった。その他、P型に比較してD型ではOctreotideに対する反応性が低い傾向、プロラクチン陽性率が低い傾向などが認められ

た。Gs蛋白の遺伝子変異については43例で検討した。GS蛋白の遺伝子変異(Arg201 or Gln227)は25例(58.1%)で認められた。GS蛋白の遺伝子変異はD型で少ない傾向であった(P=0.083)。

#### ・ACTH：

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。一方、今回はクッシング病モデルであるCRH過剰発現マウス(CRH-Tg)を用いた検討では、体脂肪量増加、血中グルココルチコイド(GC)濃度の著明高値を呈し、ipGTTにて耐糖能障害、ITTにてインスリン抵抗性を示した。また野生型マウス(WT)と比較して脂肪組織におけるアディポネクチン(AdN)発現量は減少したが、逆に血中AdN濃度は有意に増加した。この増加は副腎摘除により消失した。

また、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。

一方、corticotroph hyperplasia疑いの症例における解析では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、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。

また、Crooke cell adenomaと診断された7症例の臨床病理学的検討を行った。免疫染色の結果では、すべての症例でACTHはびまん性に陽性であり、1症例でGHも陽性であった。MIB-1indexは0.1～2.0%であり、p53が陽性症例は認めず。SSTR2Aと5の検討を行った結果、subtype2Aでは5症例陽性であったがsubtype5は1症例のみで陽性。また、DNA修復酵素：0-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)の免疫染色による検討を行った結果2症例で陽性であった。

#### ・プロラクチン：

ポリエチレングリコール(PEG：終濃度12.5%)による血中PRLの沈降率60%以上をマクロプロラクチン血症と定義した上で、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。

また、内視鏡単独経鼻的手術(eTSS)による治療成績の検討では、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、治癒基準を5ng/ml未満とすると80.6%、10ng/ml未満で90.3%、15ng/ml未満では100%の治癒が得られた。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。

さらに下垂体に発現する新規遺伝子の機能解析では、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。

また日本の添付文書情報の副作用欄に「高プロラクチン血症」の記載がある医薬品はこれまでの当班の「プロラクチン分泌過剰症の診断の手引き」に高プロラクチン血症を来す薬剤と記載されていた医療用医薬品よりかなり少なく、諸外国の添付文書の副作用欄でのこれらの記載状況を確認する為に、英国の医療用医薬品の添付文書情報の「副作用」の項目内に「プロラクチン」を含む医薬品を主にリストアップして、日米と比較調査した。日本の添付文書の「副作用」「薬理作用」欄は、米英に比べ記載項目、内容が少ない傾向であることが明らかとなった。

#### ・ゴナドトロピン：

LHβプロモーター領域には多数のCpG配列が存在し、そのメチル化が亢進していた。特に転写開始点近傍のメチル化がLH発現抑制に重要であると考えられた。また、ゴナドトロピン産生腺腫におけるDNMT3aの発現

が亢進していた。

また、過去の2つの治験結果に基づき集計すると、開始量100IU/日のrFSH治療では中枢性第2度無月経の全患者の48.9% (23/46)に、体重60kg未満の症例に限ると54.2% (19/35)に排卵が起きていた。

さらに正常月経周期女性72例、PCOS症例128例、相関検討用172検体の計372検体のLH、FSHをエクルーシスとスパックSで測定し、正常月経周期女性のLH、LH/FSH比の平均値+1SDを基準値候補とした。次に2測定系間の相関式を求め、スパック-Sでの基準値に相当するエクルーシスのLH値、LH/FSH比を算出し、基準値候補と比較して基準値を設定した。またこの基準を用いてPCOS症例における高LH率を検討した。その結果、正常女性の測定値からLH 8.548 mIU/ml、LH/FSH比 1.253 を基準値候補とした。相関式から、スパック-SのLH=7、LH/FSH比=1に相当するデータをLH=8.94、LH/FSH比=1.40と算出した。基準値候補は相関式算出データともほぼ一致し、LH値 $\geq$  8.55mIU/mLかつLH/FSH比 $\geq$  1.25を基準値とした。この基準でのPCOS患者の高LH陽性率は一般的なLH高値再現率と一致していた。

#### ・下垂体機能低下症：

GH分泌不全者のうち、GH補充療法を受けている者のJAHQスコアは、GH補充療法を受けていないGH分泌不全患者に比べ全体的に高値(良好)である傾向を示し、性的関心に関わる領域では有意にJAHQスコアは高値であった。一方、全被験者を、GH分泌不全群と、非GH分泌不全群+GH分泌不全ではあるもののGH補充されている群(GH存在群)に分け検討したところ、気力に関連する領域において、GH存在群で有意にJAHQ

スコアが高値であった。

一方、がん治療のため甲状腺領域を含む放射線照射を受けた群：放射線治療群と化学療法のみ群：化学療法群に分けて評価した結果、両群のFT3、FT4の基礎値に差がないものの、放射線治療群のTSH基礎値は有意に高値であった。このTSH高値の患者に対しTRH負荷試験を施行したところTSHの過剰遅延反応を認めた。

#### ・長期予後関連調査：

解析の結果、1)発症から数十年を経過している患者や80歳を超える高齢者患者が存在すること、2)性腺ホルモン補充が50%以下にとどまっているのに対し比較的新しい治療法である成人におけるGH補充療法が3割に達していたこと、3)先端巨大症に対する治療について多様性を認めたこと、4)糖尿病を含む耐糖能異常、高血圧症、脂質異常症といったいわゆる生活習慣病の合併が多いことが再確認されたこと、5)今回対象とした4疾患では下垂体機能低下症とクッシング病でQOLがより障害されていたこと、が明らかとなった。

## D. 考察

はじめに横断的重要課題の代表例について以下に示す。

#### ・新規間脳下垂体疾患の発見、疾患概念の構築：

今回新たに発見された病態においてはPIT-1発現細胞に対する特異的免疫反応が原因となった可能性が考えられた。その原因について解析を進めたところ、B細胞機能を調節し免疫寛容に重要な分子に同一の遺伝子変異を全例に認めた。この変異の頻度、意義についてはさらに詳細な解析が必要である。

#### ・自己免疫が関与する間脳下垂体疾患の病態解析と診断マーカーの開発：

病因となる下垂体自己抗原の探索の方法として自己抗体を用いた免疫沈降-ショットガンLC-MS/MS法を開発した。本法を用いた解析は過去報告されておらず最も広範囲で網羅的なLINHの下垂体自己抗原のプロテオーム解析であると考えられ、LINHで既に報告されている蛋白質の他に新規自己抗原候補をいくつか同定することが出来た。この方法はLINHの自己抗原解析に非常に有用な方法だと考えられた。また、今後、自己抗原候補の中から有効な診断マーカー、また病態を反映するようなバイオマーカーを開発するためには、臨床検体を収集し大規模な検証が必要であると考えられた。

#### ・下垂体疾患(SIADH)の新規治療法の開発：

MINOのCPM予防・進展防止作用については、基礎的研究により神経症状の著明な改善効果が認められ、主な作用点は髄鞘の障害に直接関与するMGであることが示された。また、臨床応用についても現在実施中であり今後のSIADH治療の標準化として設定していくことが可能と考えられた。

主要な領域別個別研究について以下に示す。

#### ・下垂体疾患の診断標準化に向けたホルモン基準値の設定：

今回の検討から、各種測定法の変動域を考慮する必要性が明らかとなり、この幅を考慮しこれまでに施行したDex抑制試験の結果を再検討したところ、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。

#### ・バゾプレシン(AVP)：

家族性中枢性尿崩症モデルにおけるバゾプレシンmRNAの発現低下が遺伝子転写活性の低下ではなくmRNAの安定性に起因することが示唆された。同じく視床下部視索上核