

201128164A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大 磯 ユタカ

平成24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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大 磯 ユタカ

平成24年3月

目 次

I. 序 文	1
--------	---

II. 班員名簿	2
----------	---

III. 総括研究報告書	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

IV. 分担研究報告書

1. 中枢性尿崩症発症機序の解明	21
------------------	----

名古屋大学大学院医学系研究科糖尿病・内分泌内科学 有馬 寛

2. 特異な下垂体前葉機能障害、中枢性尿崩症を呈した ラトケ嚢胞の2症例	28
---	----

自治医科大学附属さいたま医療センター内分泌代謝科 石川 三衛

3. 下垂体腺腫に対する内視鏡下経鼻的手術(eTSS)後の 低ナトリウム血症についての検討	35
--	----

日本医科大学大学院医学研究科神経病態解析学分野 寺本 明

4. AtT-20細胞におけるソマトスタチン受容体アゴニストSOM230 によるACTHの分泌/合成及び細胞増殖抑制効果	41
---	----

弘前大学大学院医学研究科内分泌代謝内科学 須田 俊宏

5. 種々のレチノイドX受容体(RXR)アゴニストがAtT20細胞の 増殖・アポトーシスに及ぼす影響の検討	47
--	----

東北大学大学院医学系研究科病態検査学分野 菅原 明

6. ラット ACTH 産生細胞からの開口分泌の可視化解析 53
東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科学 高野 幸路
7. クッシング病の病態解明 (AgRP の役割) と新規薬物療法の開発 59
高知大学保健管理センター 岩崎 泰正
8. Cushing 病における下垂体腺腫増大予測因子について 63
浜松医科大学第二内科 沖 隆
9. 分娩後、視床下部性副腎皮質機能低下症を発症し、
自然寛解した一例 65
福岡大学医学部内分泌・糖尿病内科学 柳瀬 敏彦
10. 先端巨大症術後に 75gOGTT で血中 GH 底値が 1 μ g/L 未満の
症例における IGF-I 値の推移についての検討 73
東京女子医科大学医学部第二内科 肥塚 直美
11. 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と、精神・身体機能への影響についての検討 76
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科脳神経外科学 有田 和徳
12. 思春期における成長ホルモン分泌不全 (GHD) の診断に関する研究 84
国立成育医療研究センター生体防御系内科部 横谷 進
13. 下垂体腫瘍患者における潜在性ホルモン産生と
代謝異常との関連性の検討 89
北海道大学病院検査・輸血部 清水 力
14. 成人 GH 分泌不全症の合併症としての NAFLD/NASH の
病態と治療意義の解明 96
神戸大学大学院医学研究科糖尿病・内分泌内科学 高橋 裕

15. MEN1 の内分泌臓器特異的腫瘍発生と MLL/p27^{Kip1} 経路 101
群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科学 森 昌朋
16. 下垂体で高発現する遺伝子の下垂体細胞内や
下垂体関連培養細胞株での発現解析 106
大阪大学大学院医学系研究科臨床検査診断学 巽 圭太
17. ゴナドトロピン産生腺腫におけるホルモン産生の
DNA メチル化制御機構 110
東海大学医学部基盤診療学系病理診断学 竹腰 進
18. 多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) の病態解明と
ゴナドトロピン療法の個別化 115
群馬大学大学院医学系研究科産科婦人科学 峯岸 敬
19. プロラクチン (PRL) 産生腺腫における
ドパミン作動薬抵抗性の機序 119
国立病院機構京都医療センター臨床研究センター 島津 章
20. 間脳下垂体疾患データベースによる長期予後調査 127
国立保健医療科学院生涯健康研究部 横山 徹爾

V. 重点研究課題報告書

1. リンパ球性漏斗下垂体後葉炎の診断マーカーとしての
抗76kD蛋白抗体の有用性の検証と、ES-AVP細胞培養系を
用いた76kD蛋白のAVP分泌への関与の解析 141
名古屋大学大学院医学系研究科糖尿病・内分泌内科学 大磯ユタカ
2. 機能性下垂体腺腫の腫瘍発生原因と腫瘍増殖に関与する因子の解析 147
東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科学 高野 幸路

3. Cushing病に対する新規薬物療法の開発	155
--------------------------	-----

東北大学大学院医学系研究科病態検査学分野 菅原 明

VI. 間脳下垂体機能異常症の診断と治療の手引き(平成23年度改訂分)

先端巨大症および下垂体性巨人症の診断と治療の手引き	159
---------------------------	-----

VII. 会議記録

平成23年度研究会議プログラム	167
-----------------	-----

間脳下垂体機能障害に関する調査研究班2011年度公開セミナー	172
--------------------------------	-----

VIII. 研究成果の刊行に関する一覧表	175
----------------------	-----

I. 序 文

今年度から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」は私が研究代表者として第2期目の3年間の研究計画に着手することになりました。

当研究班は難治性疾患克服研究事業臨床調査研究分野および特定疾患治療研究事業の対象疾患に包括されるADH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、Cushing病、下垂体機能低下症と下垂体性TSH分泌異常症の合計7病態に関する研究を指定され実施しています。ホルモンの分泌異常症には亢進、低下の両病態があることから実際の研究対象疾患は11以上と一つの班研究としては異例の広範な守備範囲を持っています。このような広範な疾患群を対象にしていることに加え、研究活動としては対象疾患の発症機構の検討、病態解明、診断法の確定とガイドラインの策定・更新、治療法の開発、予後調査の活用による診療水準の向上などこれも広い範囲にわたるため、以下の枠組みを基本とし研究を推進しています。第一には多様な疾患に広く関わる班横断的な問題を重要課題と位置づけ、具体的には三つの「重点研究課題」(横断的研究テーマ)を設定し、新規疾患単位の定義化と疾患概念の再構築、統一された検査法、診断法の設定、より効率的な治療法の開発などを進めています。具体的な課題としては、1)機能性下垂体腺腫の腫瘍発生と腫瘍増殖に関与する因子の研究、2)リンパ球性下垂体炎の病因と分類、3)Cushing病に対する新規薬物療法の開発となっています。一方、個々の研究者が重点課題の重要性を十分に理解した上で各疾患固有の病態解明、診断・治療などに関して実施する「個別研究」を並行して遂行しています。

当研究班は40年近くの研究の蓄積があり、これにより疫学、予後調査、疾患ガイドラインの切れ目のない策定、基礎研究への支援、新薬導入への主体的取り組みなど多くの成果をあげてきており、その活動を通して世界に発信できる多数の知見を発表してきました。また今年度からは間脳下垂体機能障害に関する調査研究班として独自に設置したホームページにも研究成果などを掲載し、従来から実施している一般市民、患者会、実地医家などを対象とした公開セミナーと合わせさらに情報発信の強化を図り、班研究を学問の中でのみで孤立した活動とするのではなく、その成果を社会に還元していくよう積極的に進めています。今年度からはさらに海外の専門研究機関と連携しグローバルな視点からも時代に即した研究を進展させる試みを開始しました。今後も継続的に難治性下垂体疾患の発症予防、増悪抑止、治療ツールの開発など患者の長期予後改善を目的に研究を推進していく所存です。

2012年3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. 班 員 名 簿

	氏 名	所 属	職 名
研究代表者	大磯ユタカ	名古屋大学大学院医学系研究科糖尿病・内分泌内科学	教 授
研究分担者	須田 俊宏	弘前大学大学院医学研究科内分泌代謝内科学	教 授
	森 昌朋	群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科学	教 授
	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	教 授
	肥塚 直美	東京女子医科大学医学部第二内科	教 授
	石川 三衛	自治医科大学附属さいたま医療センター内分泌代謝科	教 授
	横谷 進	独立行政法人国立成育医療研究センター生体防御系内科部	部 長
	峯岸 敬	群馬大学大学院医学系研究科産科婦人科学	教 授
	島津 章	国立病院機構京都医療センター臨床研究センター	臨床研究センター長
	柳瀬 敏彦	福岡大学医学部内分泌・糖尿病内科学	教 授
	沖 隆	浜松医科大学第二内科(内分泌代謝内科)	講 師
	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	教 授
	岩崎 泰正	高知大学教育研究部医療学系臨床医学部門	教 授
	高野 幸路	東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科学	特任講師
	竹腰 進	東海大学医学部基盤診療学系病理診断学	准 教 授
	清水 力	北海道大学病院検査・輸血部	准 教 授
	巽 圭太	大阪大学大学院医学系研究科内科学講座(臨床検査診断学)	講 師
	菅原 明	東北大学大学院医学系研究科病態検査学分野	教 授
	有馬 寛	名古屋大学大学院医学系研究科糖尿病・内分泌内科学	准 教 授
	高橋 裕	神戸大学大学院医学研究科内科学講座糖尿病・内分泌内科学部門	講 師
	横山 徹爾	国立保健医療科学院生涯健康研究部	部 長
研究協力者	千原 和夫	兵庫県立加古川医療センター	院 長
	置村 康彦	神戸女子大学家政学部管理栄養士養成課程病理病態学	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産科婦人科学分野	教 授
	梶村 益久	名古屋大学医学部附属病院糖尿病・内分泌内科	講 師
	山田 正信	群馬大学医学部附属病院内分泌・糖尿病内科	講 師
	泉山 肇	東京医科歯科大学医学部附属病院内分泌・代謝内科	講 師
事 務 局	橋本 育未	名古屋大学大学院医学系研究科糖尿病・内分泌内科学 〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町65 TEL: 052-744-2181 / FAX: 052-744-2212 e-mail hashimoto193@med.nagoya-u.ac.jp	秘 書

Ⅲ. 総括研究報告書

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：当研究班が担当する間脳下垂体疾患には、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疾患がある。これらの疾患群を対象として、班横断的な重要課題と各々の疾患ごとの個別研究を計画し実施した。

【重点研究課題】

（横断的研究テーマ）は、1) 機能性下垂体腺腫の腫瘍発生と腫瘍増殖に関与する因子の研究、2) リンパ球性下垂体炎の病因と分類、3) Cushing病に対する新規薬物療法の開発である。まず1) については、機能性下垂体腺腫の発生原因と腫瘍増殖に関与する因子について、候補遺伝子の異常を検討する手法と、ゲノムワイドに検討する探索的手法の二つで探求した。候補遺伝子としては、成長ホルモン（GH）受容体の体細胞変異を対象とし、100例のGH産生腺腫で体細胞変異を調べたが、Asaらが報告した体細胞変異は一例も認められなかった。ゲノムワイドの解析としてはGH産生腺腫を用いてgenome-wideのエピゲノム解析を行った。GH産生腺腫においては本邦の患者でも体細胞の*gsp*変異が約半数に認められるので、*Gsa*をcodeするGNAS近傍のエピゲノムを解析したが、*gsp*変異の有無で差は認められなかった。一方ゲノムワイドに解析した結果を比較して、*hierarchical clustering analysis*を行ったところ明らかに異なる二つの群に分かれた。二つのクラスターが*gsp*変異と一致すると予想したが予想に反した結果が得られた。*gsp*変異群の中では互いによく似たDNAメチル化状態（非メチル化領域が多い）が見られたが、*wild type*ではメチル化領域が多い群と*gsp*変異群によく似た非メチル化領域が多い群の2群に分かれた。*Wild type*のGH産生腺腫に二つの群があり、片方は*gsp*変異群と近似した出来事が起こっていることが考えられた。次に2) についてはリンパ球性漏斗下垂体後葉炎（LINH）の病因は不明であり、診断マーカーも確立されておらず診断が困難であるため、LINH患者血清を用いて免疫沈降-ショットガンLC-MS/MS法を開発し、プロテオミクス解析の手法を用い、新規自己抗原候補76kD蛋白を同定した。患者血清、健常人、またLINH以外の自己免疫患者血清を収集しウェスタンブロット法によって抗76kD蛋白抗体の有無を合計138例の血清検体を対象に解析した。その結果、抗76kD蛋白抗体はLINHの診断において感度87.5%、特異度89.9%と共に高く、非常に有用な診断マーカーであると考えられた。また、76kD蛋白のバゾプレシン（AVP）分泌に関する分子学的機構を検討するため、ES細胞より分化誘導されたAVP産生細胞（ES-AVP細胞）培養系を用いて解析を行った。76kD蛋白はAVP

と共局在し、KCl刺激によってAVP分泌の亢進が認められ76kD蛋白はAVPの生理的分泌調節機構において、何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。さらに3)についてはCushing病に対する新規薬物療法の開発を目指した研究を進めた。本年度の成果は、a) レチノイドX受容体(RXR)アゴニストであるHX630とPA024が、下垂体ACTH産生AtT-20細胞におけるアポトーシスを誘導する事が明らかとなり、これらのRXRアゴニストが新規Cushing病治療薬たり得る可能性が示された。b) 新規ソマトスタチン受容体アゴニストSOM230が、AtT-20細胞におけるPOMC mRNA発現抑制作用、ACTH分泌抑制作用、細胞増殖抑制作用、ならびにアポトーシス誘導作用を示す事が明らかとなり、SOM230が新規Cushing病治療薬たり得る可能性が示された。c) Cushing病の病態下では、グルココルチコイドにより誘導されたAgRPが、POMC遺伝子由来MSHとMC4受容体レベルで拮抗することにより、過食・肥満が招来される可能性が示されこの成績から新しいCushing病治療開発に有効となる分子病態を明らかにした。

一方、**個別領域研究**の具体的研究課題は**AVP関連**では、中枢性尿崩症発症機序の解明、ラトケ嚢胞症例の下垂体前葉機能障害と中枢性尿崩症の解析、下垂体腺腫に対する内視鏡下経鼻的手術後の低ナトリウム血症の検討、**GH関連**では、先端巨大症術後に75gOGTTで血中GH底値が1 μ g/L未満の症例におけるIGF-I値の推移についての検討、手術後治癒と判定されたGH産生腺腫患者におけるGH分泌能と、精神・身体機能への影響についての検討、思春期におけるGH分泌不全の診断に関する研究、下垂体腫瘍患者における潜在性ホルモン産生と代謝異常との関連性の検討、成人GH分泌不全症の合併症としてのNAFLD/NASHの病態と治療意義の解明、**ACTH関連**では、NF- κ B阻害作用を有する2種類の薬剤(E3330, curcumin)がACTHをコードする遺伝子(POMC)の転写に及ぼす影響の検討、マウスAtT20細胞株を用いて検討ラットACTH産生細胞からの開口分泌の可視化解析、分娩後、視床下部性副腎皮質機能低下症を発症し自然寛解した症例の病態解析、**プロラクチン関連**では、プロラクチン産生腺腫におけるドパミン作動薬抵抗性発生の機序、**ゴナドトロピン関連**では、ゴナドトロピン産生腺腫におけるホルモン産生のDNAメチル化制御機構、多嚢胞性卵巣症候群におけるFSH受容体の遺伝的多型の重要性について、**下垂体腫瘍の発生等に関する研究**では、MEN1の内分泌臓器特異的腫瘍発生とMLL/p27^{Kip1}経路、下垂体で高発現する遺伝子(ARHGAP36/FLJ30058)の発現レベルにから分化・腫瘍化の新たな指標として応用する研究、**長期予後等関連**では、間脳下垂体疾患データベースによる長期予後調査の継続実施と解析研究など、広範な対象疾患について研究を進めた。

以上の研究を通し、間脳下垂体疾患の病態の理解を深め、新規診断法・治療法などの開発を進め、病気で苦しむ患者さん、実地医家の先生などへの研究の社会還元としての貢献が少なからずできたのではないかと考える。

研究分担者氏名

須田 俊宏	弘前大学大学院医学研究科 教授
森 昌朋	群馬大学大学院医学系研究科 教授
寺本 明	日本医科大学大学院医学研究 科 教授
肥塚 直美	東京女子医科大学医学部 教 授
石川 三衛	自治医科大学附属さいたま医 療センター 教授
横谷 進	国立成育医療研究センター 部長
峯岸 敬	群馬大学大学院医学系研究科 教授
島津 章	京都医療センター 臨床研究 センター長
柳瀬 敏彦	福岡大学医学部 教授
沖 隆	浜松医科大学医学部 講師
有田 和徳	鹿児島大学大学院医歯学総合 研究科 教授
岩崎 泰正	高知大学教育研究部 教授
高野 幸路	東京大学医学部附属病院 特 任講師
竹腰 進	東海大学医学部 准教授
清水 力	北海道大学病院 准教授
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 教授
有馬 寛	名古屋大学大学院医学系研究 科 准教授
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

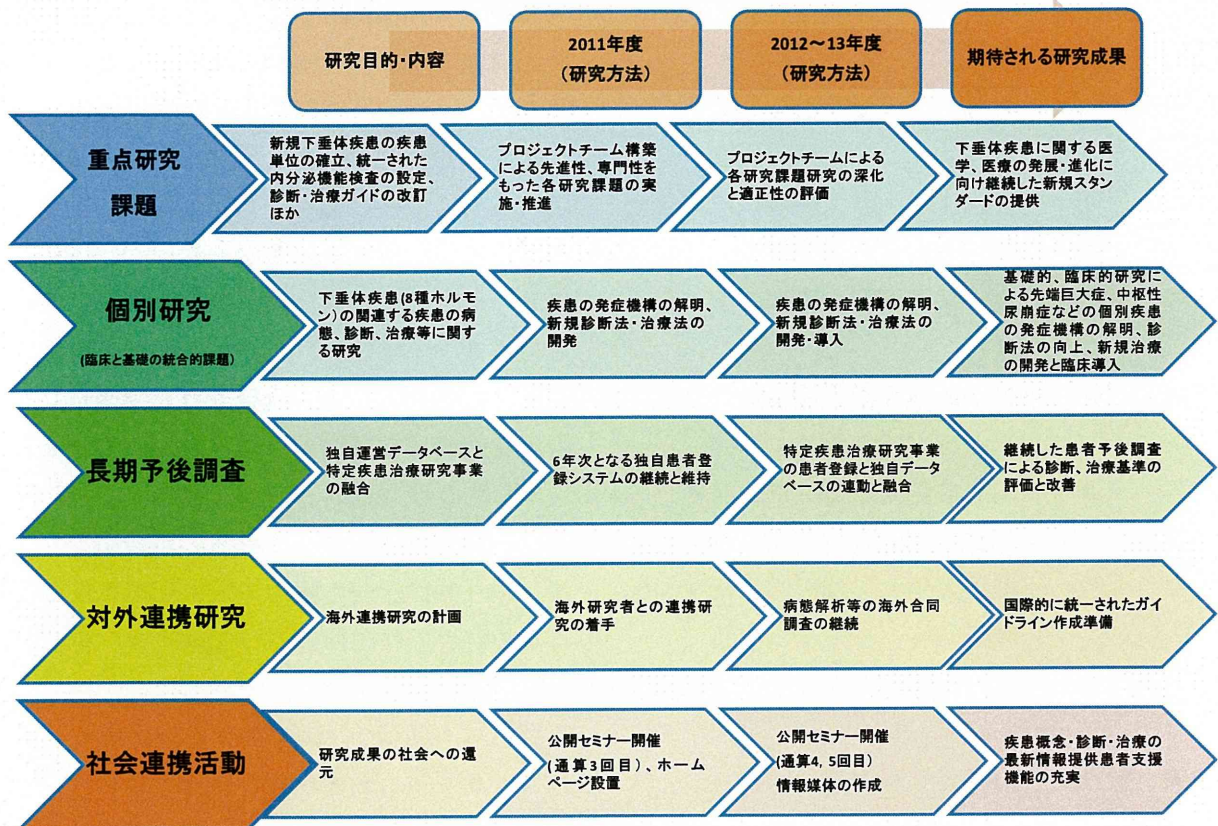
A. 研究目的 (図1)

間脳下垂体機能障害に関する調査研究班の研究対象としては下垂体病変の代表的な7病態11疾患があり、多様な難治性疾患を有効にしかも効率的に統合し研究を進めることが求められている。個々の下垂体疾患に関する専門性を持つ研究者は少なくないが、国際的に見ても全ての下垂体疾患に対し同一の目標を持ち単一の組織で研究を推進しているグループは皆無である。統合された下垂体疾患の研究が必要な理由は下垂体という微小臓器に8種類の重要なホルモンが存在しており、機能的にも物理的にもこれらのホルモンが緊密な相互関係を持ち疾患の病態形成に関与するため個々の疾患研究だけでは十分な成果を上げにくい点にある。

当班は40年近くの研究の蓄積があり、これにより疫学、予後調査、疾患ガイドラインの切れ目のない策定、基礎研究への支援、新薬導入へ主体的取り組みのなど多くの取り組みが可能になっており、活動を通して世界に発信できる多数の知見を発表している(J Clin Invest 2011, Nature 2011)。今年度の研究の詳細は以下に示すが、時代に即した新たな視点を十分に取り入れながら継続的に難治性下垂体疾患の発症予防、増悪抑止、治療ツールの開発など患者の長期予後改善を目的に研究を推進した。

具体的には横断的研究者グループの組織化により新規病態に対応する診断法の確定など重要課題研究を進め、個別研究としては各疾患の病態解析、新規治療開発とその臨床応用への展開を、長期予後調査では当班独自で運営している下垂体疾患患者データベースの維持・更新により長期予後因子の解析を、対外連携研究としては海外連携と相互交流を目的に米国ジョンズ・ホプキンス大学等との共同

図1. 2011～2013年度 間脳下垂体機能障害に関する調査研究班の研究計画



研究の開始、社会連携活動としては得られた研究成果を医療関係者はもちろん、患者会、一般市民等への発信を網羅的に行う目的で公開セミナー、ホームページなどを通し推進した。

B. 研究方法

1) 重点研究課題：

a) リンパ球性下垂体炎の病因と分類(大磯、島津、高橋)：

最近全く新規の下垂体疾患が発見されているが、中でも自己免疫の関与が強く疑われる場合が多く、これらの病態を新規疾患単位として確立するための診断法の開発、治療基準の策定を行う。下垂体炎・自己免疫性下垂体炎の自己抗原の検

索とそれを標的とした診断マーカー開発と全国アンケート調査による病因、病態、治療を含めた臨床経過の解析。

b) Cushing病に対する新規薬物療法の開発を目的とした検討(須田、岩崎、沖、菅原)：

下垂体ACTH産生腺腫によるCushing病は未だに多くの難治症例が存在しており薬物療法の確立が急務である。Cushing病に対する新規薬物療法の開発を目指し各種の候補薬・候補分子の検討とその作用機序の詳細解析を進めた。

c) 機能性下垂体腺腫の腫瘍発生と腫瘍増殖に関与する因子を明らかにする研究(有田、寺本、高野)：

本年度は、候補遺伝子解析としてGH産

生下垂体腺腫におけるGH受容体遺伝子異常の関与を解析し、ゲノムワイドの解析としてGH産生下垂体腺腫のエピゲノム解析を行った。

2) 個別研究：

下垂体疾患の病態、発症機構の解明、新規診断法・治療法の開発に向け集学的アプローチにより研究を進めた。下記にその代表研究を示す。

i) Cushing病 (須田、岩崎、沖、菅原、高野、柳瀬)：

a) 新規ソマトスタチン受容体アゴニストのSOM230を用いて、下垂体ACTH産生腫瘍細胞におけるACTHの分泌／合成及び細胞増殖抑制効果について検討、b) Cushing病患者における下垂体腺腫増大の予測因子の探索のためCushing病患者19例の摘出下垂体腺腫組織を用い、ErbB1、ErbB2、リン酸化Akt、リン酸化Erk、PC2の発現の検討、c) 各種培養系細胞を用い細胞内シグナル伝達阻害剤の効果を検討し、ACTH遺伝子(POMC)の転写活性を強力に抑制する分子の探索、d) RXRアゴニストがAtT20細胞の増殖・アポトーシスに及ぼす影響の検討、e) ACTH細胞を、生きた状態で細胞同定し、ACTH顆粒分泌を蛍光蛋白を用いず解析する方法の確立。

ii) 成長ホルモン (GH) 関連 (有田、高橋、肥塚、清水、横谷)：

a) 術後寛解に至った先端巨大症患者のGH分泌能がQOLや体組成変化に与え因子の検討、b) 成人成長ホルモン分泌不全症 (AGHD) における非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の発症機序の検討、c) 先端巨大症術後寛解基準を設定するためのGH分泌抑制検査の判断時期についての検

討、d) AGHDに対する成長ホルモン投与前後での糖代謝・血圧・脂質代謝の検討)、e) 思春期年齢のGHD診断の適正化を目的として、小児期にGHDと診断された症例の思春期以降のGH分泌能の検討。

iii) 抗利尿ホルモン (AVP) 分泌異常症 (有馬、石川、寺本)：

a) 小胞体ストレスがAVP遺伝子発現に及ぼす影響の検討、b) ラトケ嚢胞の占拠部位による内分泌異常の発症形態の特徴、c) 内視鏡下TSS (endoscopic transsphenoidal surgery：eTSS) による下垂体腺腫術後の低ナトリウム血症発症に関する原因・リスクファクターの検討。

iv) プロラクチン (PRL) 分泌異常症 (島津)：

・ドパミン作動薬抵抗性を示すPRL産生腫瘍のD₂受容体遺伝子発現、蛋白膜発現および遺伝子メチル化の検討。

v) 下垂体腫瘍の発生関連 (森、巽)：

a) MEN1における内分泌臓器特異的腫瘍発生機構の解明のため、Men1、MLLノックアウトマウスを用いたMen1、MLL、p27^{Kip1}、p18^{Ink4c}発現の検討、b) 下垂体で高発現する遺伝子 (ARHGAP36/FLJ30058) の発現レベルを分化・腫瘍化の指標として応用する研究。

vi) ゴナドトロピン分泌異常症 (峯岸、竹腰)：

a) 多嚢胞性卵巣症候群患者におけるFSHレセプターの遺伝子多型解析を用いたゴナドトロピン製剤の反応性についての相関の検討、b) ゴナドトロピン産生腺腫におけるLH特異的発現抑制機構におけるDNAメチル化の検討。

3) 長期予後調査 (横山、大磯)：

2006年度より2012年1月までの5年間余

で、先端巨大症97例、プロラクチノーマ68例、クッシング病16例、下垂体機能低下症149例、バゾプレシン分泌低下症45例、合計375例を対象に分析を行った。

4) 対外連携調査 (大磯) :

海外の関連難病研究期間との連携を進め、国際的な難病の診断基準、治療基準の設定、病態比較、疫学調査などの将来的展開を行うために、今年度は米国ジョーンズ・ホプキンス大学、ジョージタウン大学との間で臨床共同研究に着手した。

5) 社会連携活動 :

得られた成果について医療関係者はもちろん、患者会、一般市民等への公開を積極的に行う目的です。すでに毎年1回開催している公開セミナーを継続し、さらに迅速な情報発信を可能とするため、間脳下垂体機能障害に関する調査研究班独自のホームページを設置する。

C. 研究結果

代表的な研究については以下にその概要を示す。詳細は分担研究報告書を参照。

1) 重点研究課題 :

a) リンパ球性下垂体炎の病因と分類 :

リンパ球性漏斗下垂体後葉炎 (LINH) 患者、健常人、またLINH以外の自己免疫患者血清合計138例のウェスタンブロットによる抗76kD蛋白抗体の診断精度は感度87.5%、特異度89.9%と共に高かった。また、ES細胞より分化誘導されたAVP産生細胞培養系を用いて解析では、76kD蛋白がAVPと共局在し、KCL刺激によってAVP分泌の亢進を認めた。

b) Cushing病に対する新規薬物療法の開発の検討 :

1) レチノイドX受容体アゴニストであるHX630とPA024が、下垂体ACTH産生AtT-20細胞におけるアポトーシスを誘導した。2) 新規ソマトスタチン受容体アゴニストSOM230が、AtT-20細胞におけるPOMC mRNA発現抑制作用、ACTH分泌抑制作用、細胞増殖抑制作用、ならびにアポトーシス誘導作用を示した。

c) 機能性下垂体腺腫の腫瘍発生と腫瘍増殖に関する因子を明らかにする研究 :

機能性下垂体腺腫の発生原因と腫瘍増殖に関する因子について、候補遺伝子の異常を検討する手法と、ゲノムワイドに検討する探索的手法の二つで探求した。GH産生腺腫においては本邦の患者でも体細胞の*gsp*変異が約半数に認められるので、*Gsa*をcodeするGNAS近傍のエピゲノムを解析したが、*gsp*変異の有無で差は認められなかった。一方ゲノムワイドに解析した結果を比較して、hierarchical clustering analysisを行ったところ明らかに異なる二つの群に分かれが、この二群では*gsp*変異との関係で一致を見なかった。

2) 個別研究 :

i) Cushing病 :

a) AtT-20細胞において、SOM230はPOMC mRNA発現を添加後2時間より低下させ、6時間で約75%まで有意に低下させた。添加後24時間では、POMC mRNA発現は有意な低下を認めなかった。SOM230添加後6時間において、POMC mRNA発現の低下は1-100 nMの範囲で濃度依存性の低下を示し、100 nMにおいて有意な低下を示した。b) ErbB1 (EGFR)、

ErbB2 (HER2) いずれもすべての ACTH 産生腺腫に認められた。リン酸化 Erk は 2 例に認められたのみであるが、リン酸化 Akt は 11 例で陽性となった。また、腫瘍径 10 mm 以上のマクロアデノーマ 7 例中 6 例でリン酸化 Akt が陽性であった。また、PC2 陽性 9 例中 8 例でリン酸化 Akt が陽性であった。c) E3330 は AtT20PL 細胞において POMC 遺伝子の基礎転写活性を約 50% 低下させ、一方 curcumin は同様の条件下でさらに強力な効果を示し、基礎転写活性は約 90% 抑制された。d) RXR アゴニストを 24 時間添加した後の POMC mRNA 発現を検討したところ、HX630 は濃度依存的に POMC mRNA 発現を抑制した一方で、PA024 と CD3254 による発現抑制は認められなかった。e) ACTH 分泌を特異的に促進する CRH (10nmol/L) を投与すると、投与後数 10 秒後に、レクチンで同定された ACTH 細胞の一部の辺縁に、蛍光輝点が急激に出現した後ただちに消失した。輝点の出現の時間経過は 2 種類に分かれ、0.3 msec 以内で終了する速い分泌と 3 秒近い経過で輝点の出現と消失が観察される遅い分泌の二つが観察された。

ii) 成長ホルモン (GH) 関連:

a) 術後寛解に至った先端巨大症患者で下垂体前葉機能障害を 1 系統でも認める症例の割合は、GHS (GH-sufficient) 群、GHD 群ともに差はなかったが、個々のホルモン系で評価すると術前のゴナドトロピン分泌能は GHS 群の方が有意に保たれていた。b) AGHD 群では NAFLD、NASH の合併頻度がそれぞれ 77% (対照の 6.4 倍)、21% と著明に上昇していた。そして 6-12 か月の GH 補充療法によって肝機能、線維化マーカーの改善、NAFLD activity

score においても有意な改善を認めた。c) 術後 OGTT と同時に採取した検体で IGF-I 値が +2 SD 以上であった症例は 18/33 例 (54%) であった。術後 1、3、6 ヶ月、1 年では各々 5/16 例 (31%)、2/25 例 (8%)、1/26 例 (4%)、0/19 例 (0%) であった。また、IGF-I 値が -2 SD 以下であった症例は術直後には 0/33 例 (0%) であったが、術後 1 ヶ月で 2 例、3 ヶ月には 3 例であった。d) AGHD に対する GH 投与後、IGF-1、LDL-C は有意に改善したが、血圧、糖代謝には変化を認めなかった。HDL-C は HDL-C < 50mg/dL の群で有意に上昇し、肝機能は投与前 AST、ALT がいずれか基準値異常であった群で有意な改善を認めた。e) 発病時重症 GHD と分類された者は 9 名 (45%)、中等症以下の者は 14 名 (70%)、軽症及び正常例は 6 名 (30%) であったが、思春期以降の現時点では、診断時と同一の者は 14 名 (70%)、30% は重症度が改善した。

iii) 抗利尿ホルモン (AVP) 分泌異常症:

a) mRNA の安定化因子である poly (A) 鎖のサイズは家族性中枢性尿崩症モデルマウスでは有意な短縮を認めた。また小胞体ストレス誘導薬により AVP 及びオキシトシン mRNA の poly (A) 鎖が短縮することがノザンブロット解析にて示された。b) 2 症例の下垂体柄部のラトケ嚢胞で検討した結果、当初は下垂体柄の腫脹、下垂体柄～下垂体部にかけて周囲が造影される嚢胞性腫瘍がみられ、数ヶ月後には下垂体柄の腫脹は消失し、下垂体柄を首座とする嚢胞性腫瘍が明らかとなった。この 2 症例は下垂体柄に首座を置くまねなラトケ嚢胞であり下垂体機能検査で視床下部性の障害パターンを示した。c) 術後 1

週間目に低Na血症を来たした症例は15例(22.1%)であり、PRL産生腺腫の頻度が7例(46.7%)と多く、一方GH産生腺腫で低Na血症を来たした症例は無かった。

iv) プロラクチン(PRL)分泌異常症

PRL産生腺腫におけるD2受容体mRNA発現量は、著効群に比し抵抗群および当初ドパミン作動薬感受性があったが長期使用後に二次無効となった群で明らかに低下していた。またPRL産生腺腫において著効群に比し抵抗群および二次無効群でlongアイソフォームが明らかに低下していたが、shortアイソフォームでは有意な差を認めなかった。D2受容体蛋白の細胞膜における染色性を半定量化し、ドパミン作動薬に対する反応性との関係を検索したが、明確な関連性を認めなかった。

v) 下垂体腫瘍の発生関連：

a) Men1KOにおける各臓器におけるMLL、p27^{Kip1}、p18^{Ink4c}の発現は、野生型マウスと比較していずれも有意差を認めなかった。MLLKOでは下垂体でp27^{Kip1}mRNAの発現が野生型の約70%と有意な低値を呈し、腭島においてもp27^{Kip1}mRNA、p18^{Ink4c}mRNAの発現は、それぞれ野生型の約70%、約60%と有意な低値を認めた。b) ARHGAP36/FLJ30058は、ラット下垂体でのin situ hybridizationの結果、前葉の好酸性細胞に発現が見られた。RT-PCRによる解析では、ラット下垂体では高発現を認めた一方、ラットGH3細胞株、ラットGH3/TR(PRL)細胞株、マウスAtT-20細胞株、ラットPC12細胞株の何れでも発現が低かった。

vi) ゴナドトロピン分泌異常症：

a) 遺伝的多型の割合は、TT/NN 49.5%、AT/SN 41.8%、AA/SS 8.7%であった。基

礎FSH値の中央値は、G1で6.98 mIU/ml、G2で7.73 mIU/ml(p=0.112)、基礎LH値はG1で6.62 mIU/ml、G2で6.37 mIU/ml(p=0.545)で有意差を認めなかった。画像的に多嚢胞性卵巣所見を認め、さらに排卵障害を認めた人のうち、G1ではほぼ全員がPCOSと診断されたが、G2ではPCOSと診断されたのは半数であった。b) LβT2細胞およびAtT20細胞にDNMT阻害剤処理後、いずれの細胞においてもLHβの発現量は阻害剤の濃度依存的に増加した。DNMT等の遺伝子導入を行ったAtT20細胞では、各DNAメチル基転移酵素アイソフォームが誘導された細胞数はいずれのDNMTも約10%程度であった。

3) 長期予後調査：

国民生活基礎調査と同等の質問を用いて調べた生活状況を、性年齢調整を行ったうえで、一般集団(平成16年国民生活基礎調査)と比較した。「健康上の問題で日常生活に影響のある者の割合」は、「日常生活動作」、「外出」、「仕事・家事・学業」、「運動」のいずれも、一般集団よりも高い傾向があった。疾患別にみると、特にバゾプレシン分泌低下症で高かった。

4) 対外連携調査：

米国ジョーンズ・ホプキンス大学との間でリンパ球性下垂体炎の診断等に関する協約を交わし、米国のデータベースで管理している臨床検体の供与を受け測定を開始した。

5) 社会連携活動：

2011年10月7日に当班のホームページを設置した(<http://rhhd.info/>)。間脳下垂体機能障害に関する調査研究班の紹介、各疾患の説

明、研究成果の公表、公開セミナーの内容紹介などを掲載した。また、12月9日に「間脳下垂体疾患の病態と診断・治療に関する最新の研究結果2011」というテーマで4名の班員による講演を行った。

D. 考察

1) 重点研究課題：

a) リンパ球性下垂体炎の病因と分類：

抗76kD蛋白抗体はLINH患者において感度87.5%、またコントロールを含めた全138例において特異度89.9%であった。また、临床上重要な脳腫瘍に伴う中枢性尿崩症を呈する患者の鑑別においては特異度90%で、リンパ球性下垂体炎以外の自己免疫疾患患者においての自己抗体の特異度は89.9%であり、過去に報告されたマーカー候補と比し、格段に優れた有効な診断マーカーであると考えられた。また、ES細胞から分化誘導されたES-AVP細胞において、76kD蛋白がAVPと共局在しながら形質細胞膜へ移動する所見が得られ、76kD蛋白のAVP分泌への関与の検討のみならずLINHの病態への自己免疫機序への関与を解明する上で有効なツールになる可能性が示された。

b) Cushing病に対する新規薬物療法の開発の検討：

今回の研究で得られた成績を基礎に、各種薬剤の標的となる物質(NF- κ B、11 β HSD2、SSTR1-5、RXR、D2R、GABA-A/BR等)の発現(mRNA・タンパク)についてACTH産生腺腫を用い検討し、さらにin vivoでの検討をモデル動物で展開し、有効性、安全性の検討を進める。

c) 機能性下垂体腺腫の腫瘍発生と腫瘍増殖に関与する因子を明らかにする研究：

NASの近傍のエピゲノム解析では*gsp*変異群とwild typeの差は認めなかったが、ゲノムワイドに解析するとDNAのメチル化状態では大きい変化がおきていた。またGH産生下垂体腺腫にGHRHで引き起こされる電気生理現象を調べると*gsp*変異のない腺腫の腺腫細胞ではGHRHによって非選択性陽イオン電流が活性化し、膜透過性cAMPアナログで同様の現象が起こるが、*gsp*変異のある腺腫の腺腫細胞では電流の活性化は起こらず、cAMPでも起こせない。今後はこれらの腫瘍のwhole exome解析の結果が期待される。

2) 個別研究：

i) Cushing病：

a) 今回の検討によって、SOM230による下垂体ACTH産生細胞のACTH分泌抑制と細胞増殖抑制作用が明らかとされた。今後、その統御機構を解明することで、下垂体ACTH細胞の分泌及び細胞増殖機構が明らかにされると考えられる。更に、腫瘍細胞での細胞増殖因子や細胞周期調節機構において、正常細胞との違いを確認し、増殖機構を明らかにすることによって、そのメカニズムに基づいて細胞増殖を抑制させる薬物を明らかにできれば新たなクッシング病治療薬としての開発につながるものと思われた。b) 組織の免疫染色の結果から、EGF受容体以降Akt経路の活性化がCushing病患者の下垂体腺腫増大に関与すると考えられた。一方、Akt活性化とPC2の発現に関連性を認めた。すなわち、Aktの活性化によって腫瘍増殖となり、PC2の発現を促し、血中 α MSHの上昇と関連する可能性が考えられた。また、PC2の発現によって低生物活性ACTHの産生を促し、

血中ACTH/コルチゾール比は上昇すると考えられた。以上から、Cushing病患者において血中ACTH/コルチゾール比の上昇や血中 α MSHの上昇は、下垂体腺腫内PC2発現とAktの活性化を反映し、下垂体腺腫増殖の予測因子となる可能性が示唆された。c)下垂体ACTH産生細胞を対象とした検討では、NF- κ B阻害作用を有する2種類の薬剤(E3330, curcumin)はPOMC遺伝子の転写を強力に抑制した。今回の結果は、NF- κ Bを阻害することによりPOMC遺伝子の転写抑制を介してACTH分泌を低下させる可能性を示唆している。また長期的なNF- κ B阻害が細胞のアポトーシスを誘導し、結果的に抗腫瘍効果を発揮することも考えられる。d)今回の成績から、興味深い事にアポトーシスに関してはHX630とPA024の両者が誘導効果を示したのに対し、POMC mRNA発現・ACTH分泌に関してはHX630のみが抑制効果を示した。以上の結果から、クッシング病の治療薬としては、HX630が最も有効である可能性が考えられた。e)レクチンによるACTH細胞の同定で詳細な観察が容易になり、薬理実験も可能になった。分散培養の場合と異なり、細胞集塊の場合は集塊の接着面に多くのレクチンで陽性細胞を多数確認しこれらは下垂体前葉細胞ではないFS細胞などの間質系細胞と考えられた。ヒトACTH産生腺腫からは、刺激なしに自発分泌が起こることを観察している。この自発分泌においては遅い分泌しか観察されておらず、正常ACTH細胞に生理的的刺激を加えて生じる分泌とは異なっていた。

ii)成長ホルモン(GH)関連：

a)先端巨大症の治療目標は、手術療法や薬物療法、放射線療法によりGHの正常化

を図ることであり、その治癒基準は年々厳格化している。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が、過度なGH低下はGHDを引き起こし、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。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補充療法は検討すべき課題であるが、先端巨大症患者へのGH補充は、心血管障害を引き起こすリスクが報告されており、その適応は慎重に判断する必要がある。b)今回、AGHDには肥満と独立してNAFLD合併が関連していることが明らかになった。特にNASHは予後の悪い病態であるため、AGHDの予後の悪化に関わる可能性があり、NAFLD/NASHの有無を念頭に置いたGH補充療法が重要である。AGHDにおけるNAFLDの増加は、内臓肥満、インスリン抵抗性が深く関わっていると考えられるが、今回の結果はそれに加えて肝臓においてGHが主にIGF-Iを介して肝臓における代謝、線維化抑制に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。c)血中IGF-Iの基準値は2007年に改訂されたが、この基準値を用いて先端巨大症術後にOGTTで血中GH底値が $1\mu\text{g/L}$ 未満の症例について、術後IGF-I値の推移を検討した結果、評価には長期の観察が必要であることが明らかになった。d)成長ホルモン補充療法を開始した患者における代謝異常の有無について検討し、LDL-Cは有意に改善し、HDL-Cでは低値群で改善を認めた。さらに肝機能異常症例では、AST、ALTの有意な改善を認めた。血圧および糖代謝への影響がなく、脂質代謝への一定の効果を認めたが、こうした乖離については今後の検討が必要であ

る。e) 初期診断時のGHD重症度、年齢の要素との関連について検討した結果、思春期以降の重症度が診断時の重症度と同一の者は70%、30%は重症度が改善していた。成人GHDの治療適応基準に該当する者は、初期診断時重症型と診断された9例中8例のみであり、中等度以上のGHDでは該当者はいなかった。治療適応を考える上では、この時期におけるGHD診断基準の問題を考えなければならぬ。

iii) 抗利尿ホルモン(AVP)分泌異常症：

小胞体ストレス下におけるpoly(A)鎖の短縮はmRNAの安定性を低下させるとともに翻訳効率を低下させることで小胞体への負荷を軽減すると推測され、新たな小胞体ストレス応答であると考えられる。一方で、AVP mRNAの発現が低下し、AVPの合成が低下することはFNDIのAVP欠乏による尿崩症の病態形成にも寄与していると考えられる。b) 内分泌機能の異常は今回の検討ではラトケ脳症例としては特異であり、今後症例を重ね、機能異常の発生機序の詳細を明らかにする必要がある。c) 術後低Na血症のリスクファクターは現在までクッシング病、高齢者、女性、microadenomaなどが報告されている。クッシング病については術後の副腎皮質機能不全が原因と思われるが、高齢者においても同様に副腎の予備能の低下が示唆されている。我々の検討ではPRL産生腺腫でNaの低下が多く見られたが、その原因については不明であるが、PRL産生腺腫は女性に多く我々は非浸潤性のmicroadenomaも手術適応としていることから、これらのリスクファクターに一致する可能性も考えられる。

iv) プロラクチン(PRL)分泌異常症：

PRL産生腺腫のドパミン作動薬抵抗性

機序はまだ十分明らかでないが、D2R自身から細胞内情報伝達、PRL遺伝子の転写調節、PRL分泌調節、細胞増殖機構など様々なステップにおける障害が想定されている。今後この経路を詳細に検討することにより、治療効果の予測、より有効な薬剤の開発が期待できる。

v) 下垂体腫瘍の発生関連：

a) Men1 mRNAは野生型マウスの各臓器において有意な発現が認められたが、MLLやp27^{Kip1} mRNAの発現は内分泌臓器において強い発現を呈し、特に標的臓器である下垂体においてはいずれも著明な高値であった。これらの結果は、MLL-p27^{Kip1}経路が下垂体をはじめとする内分泌臓器において重要な因子であることを示している。b) 今回解析した遺伝子ARHGAP36/FLJ30058は、ヒトでは下垂体特異的で、マウスでは視床下部、視索前野、下垂体で高発現する。予測されるタンパク質の構造としては、RhoGAPドメインがあるのが特徴である。また、X染色体上に存在し、隣接遺伝子には下垂体特異的特異的遺伝子IGSF1/PGSF2であるのも興味深い。

vi) ゴナドトロピン分泌異常症：

a) 今回の検討は、本邦のPCOSの患者におけるFSHレセプターの遺伝子多型を調査し、アミノ酸配列とゴナドトロピン製剤に対する反応性の相関を明らかにすることが可能と考えられた。このことにより、排卵誘発における個別化を可能にし、多胎妊娠や卵巣過剰症候群などの合併症を予防することで安全性の高い医療を提供することにつながれると予想される。b) LβT2細胞ではACTHおよびLHの発現は増加し、AtT20細胞においてもDNMT阻害剤の投与によりLHの発現が増加した。この実験