

図6. 健康上の理由で日常生活に影響のある者の割合の経年的変化(5疾患計)

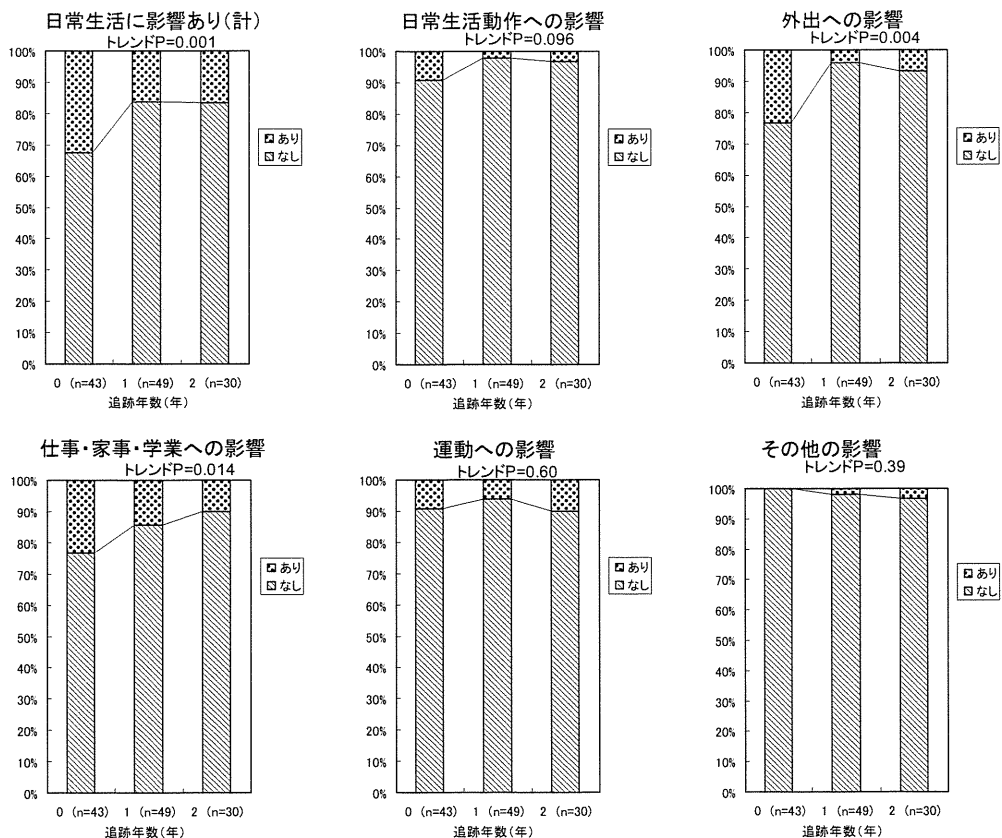
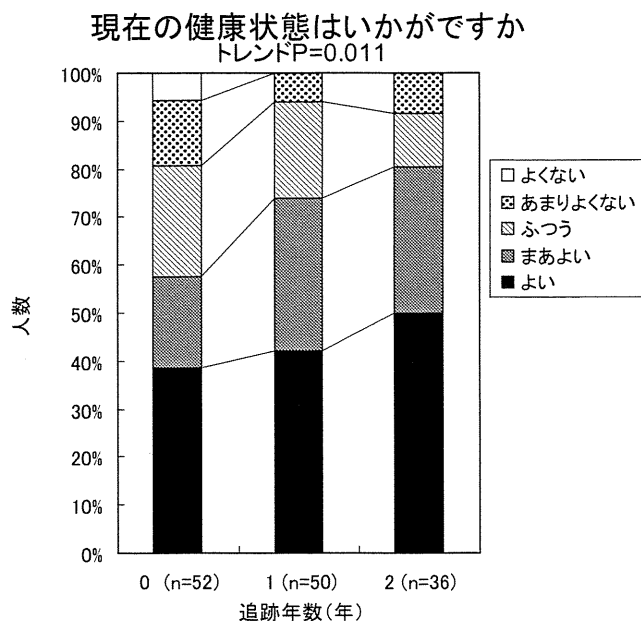


図7. 主観的健康観の経年的変化(5疾患計)



V. 重点研究課題報告書

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

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
研究分担者	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
	高橋 裕	神戸大学大学院医学研究科糖尿病・内分泌内科学
研究協力者	清田 篤志	名古屋大学大学院医学系研究科糖尿病・内分泌内科学
	梶村 益久	名古屋大学大学院医学系研究科糖尿病・内分泌内科学
	岩間信太郎	名古屋大学大学院医学系研究科糖尿病・内分泌内科学
	福岡 一貴	名古屋大学大学院医学系研究科糖尿病・内分泌内科学
	高木 博史	名古屋大学大学院医学系研究科糖尿病・内分泌内科学
	長崎 弘	藤田保健衛生大学医学部生理学講座 I
	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

研究要旨: 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。我々は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。昨年の報告後さらに患者血清、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。

A. 研究目的

リンパ球性漏斗下垂体後葉炎(LINH)は病因が不明な疾患であり、また胚細胞腫瘍などの腫瘍や肉芽腫疾患などの腫瘍性病変との鑑別が困難な場合がある。LINHの確定診断には侵襲的な下垂体の生検が必要であるが侵襲性により施行されない事も多く、LINHの有用な非侵襲的診断マーカーもないため誤診され不必要な手術が施行される事も少なくな

い。これまで我々は、病因の解明、非侵襲的診断マーカーの開発に向けて、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LINHの新規病因自己抗原候補76kD蛋白を同定した。また患者血清を用いたウェスタンブロットの解析により抗76kD蛋白抗体は疾患特異度・感度がともに優れLINHの有用な診断マーカーである可能性を報告し

た。また76kD蛋白は視床下部AVP細胞と下垂体後葉に発現し、LINHの病因及びAVP分泌に関与する可能性があることを報告した。今回の研究の目的は新たに収集した血清を用い76kD蛋白に対する自己抗体の有無について解析し、診断マーカーとしての有効性について検証することと、76kD蛋白のAVP分泌調節機構に関する分子学的機序を検討することである。

B. 研究方法

- 1) 検討に用いた血清検体について図1に示す。
- 2) 76kD蛋白をコードするfull length cDNAを発現ベクター(pcDNA3.1D/V5-His-TOPO)にsubcloningしLipofectamine 2000を用いて発現ベクターを哺乳類細胞株(HEK293FT)にtransfectionし発現させた。
- 3) 合成したリコンビナント蛋白と一次抗体として患者血清(1:100)を用いてウェスタンブロット(WB)を行い、76kD蛋白に対する血清中の自己抗体の有無を検討した。
- 4) ES (Embryonic stem) 細胞から分化誘導されるES-AVP細胞培養系を使用し、KCl刺激によるAVP分泌を培地中のAVP濃度をRIA法で測定することによって評価した。
- 5) ES-AVP細胞培養系において、76kD蛋白とCopeptinの二重免疫組織化学を施行し、共焦点蛍光顕微鏡で細胞内での発現を観察した。またKCl刺激による76kD蛋白とCopeptinの細胞内分布に対する影響を検討した。

C. 研究結果

- 1) LINH患者8例中7例(7/8)で76kD蛋白に対する自己抗体が認められ、リンパ球性下垂体前葉炎患者(LAH)で3例中0例

(0/3)、腫瘍などに伴う尿崩症患者で10例中1例(1/10)、また自己免疫疾患においては69例中7例(7/69)、健常人では39例中5例(5/39)で抗76kD蛋白抗体が認められた。LINHの診断において抗76kD蛋白抗体は全症例138例において、感度87.5%、特異度89.9%で、他の腫瘍性病変に伴う中枢性尿崩症の鑑別では特異度は90%であった(図2、図3)。

- 2) ES-AVP細胞でKCl刺激によってAVP分泌の亢進が認められた(図4)。また免疫組織化学の結果、KCl刺激前では76kD蛋白はCopeptinと主に細胞質において共局在することが示され(図5)、またKCl刺激後にはCopeptinと76kD蛋白が共局在しながら形質細胞膜へ移動したことを示唆する所見が認められた(図6)。

D. 考察

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、臨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ける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較し、格段に優れた有効な診断マーカーであると考えられた。今後は抗体価を定量的に評価するために抗76kD抗体のELISAを構築して初のLINH診断キット開発を行ってみたい。

ES細胞から分化誘導されたES-AVP細胞において、高濃度のK刺激によってAVPが分泌されると共に、76kD蛋白がAVPと共局在しながら形質細胞膜へ移動することを示唆する所見が得られた。従って、76kD蛋白は

AVP分泌調節機構に関与する可能性が示唆され、またES-AVP細胞は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ある。

今後も本研究班を中心に症例の集積を進め、本自己抗原・自己抗体の臨床的な有用性とLINHの病態における意義をさらに解明していきたいと考えている。

E. 結語

免疫沈降-ショットガンLC-MS/MS法により同定された76kD蛋白に対する自己抗体は、LINHにおいて疾患特異度・感度がともに優れ、自己免疫疾患患者、健常人でも偽陽性が10%程度であり、非常に有用な診断マーカーと考えられた。またES細胞から分化誘導されたES-AVP細胞において76kD蛋白はAVPと共局在しAVP分泌調節機構に関与する可能性が示唆された。

文献

- 1) 岩間信太郎, 梶村益久, 加藤琢哉, 鈴木陽之, 榎本篤, 有馬寛, 大磯ユタカ: 日本内分泌学会雑誌85巻2号: 569, 2009.
- 2) Iwama S, Sugimura Y, Kato T, Suzuki H, Enomoto A, Arima H, and Oiso Y. *Endocr J*. 57 (Suppl.2):S507, 2010.
- 3) 梶村益久, 岩間信太郎, 鈴木陽之, 有馬寛, 大磯ユタカ: 厚生労働省科学研究費補助金 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21年度総括・分担研究報告書 主任研究者: 大磯ユタカ, 22-26, 2010.
- 4) 大磯ユタカ: ADH分泌異常症(尿崩症)を呈するリンパ球性漏斗下垂体後葉炎の診断マーカーの開発に向けた患者検体の収

集, 厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 平成21年度総括・分担研究報告書 研究代表者: 大磯ユタカ, 1-15, 2010.

- 5) 岩間信太郎, 梶村益久, 清田篤志, 鈴木陽之, 有馬寛, 大磯ユタカ: プロテオミクスによるリンパ球性下垂体後葉炎新規自己抗原の同定とその疾患特異性に関する検討, 日本内分泌学会雑誌87巻1号: 295, 2011.
- 6) 梶村益久, 岩間信太郎, 鈴木陽之, 有馬寛, 大磯ユタカ: 厚生労働省科学研究費補助金 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22年度総括・分担研究報告書 研代表者: 大磯ユタカ, 21-25, 2011.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

- 1) 岩間信太郎, 梶村益久, 清田篤志, 鈴木陽之, 有馬寛, 大磯ユタカ: プロテオミクスによるリンパ球性下垂体後葉炎新規自己抗原の同定とその疾患特異性に関する検討, 日本内分泌学会雑誌87巻1号: 295, 2011.
- 2) 梶村益久, 岩間信太郎, 鈴木陽之, 有馬寛, 大磯ユタカ: 厚生労働省科学研究費補助金 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22年度総括・分担研究報告書 研代表者: 大磯ユタカ, 21-25, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

平成23年11月28日、名古屋大学知的財産部より「リンパ球性漏斗下垂体後葉炎の診断マーカー」の特許出願申請。

2. 実用新案登録

該当なし

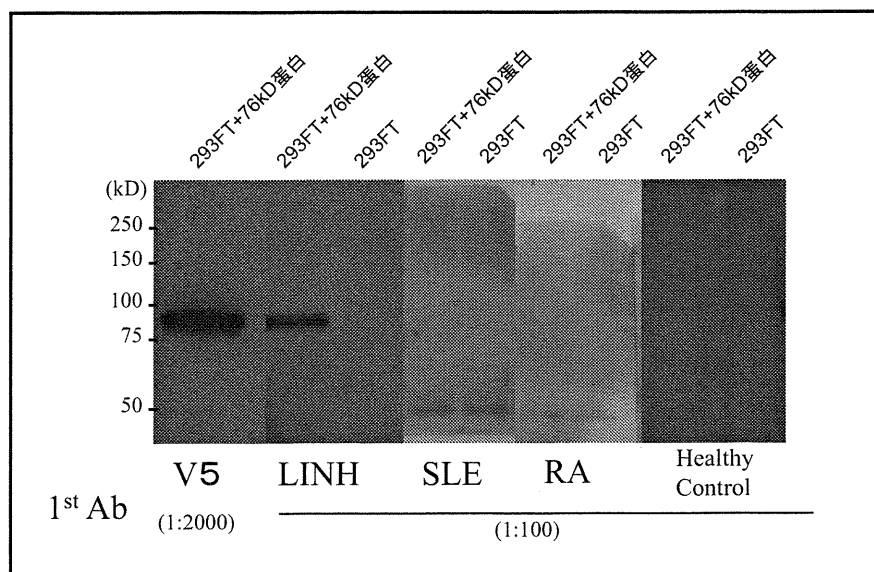
3. その他

該当なし

図1. 血清サンプル一覧

リンパ球性後葉炎…………… 8例	MBLより提供された検体 自己免疫疾患…………… 69例 ・混合組織結合病…………… 2例 ・多発筋炎/皮膚筋炎…………… 8例 ・強皮症…………… 14例 ・慢性関節リウマチ…………… 20例 ・Sjogren症候群…………… 10例 ・SLE…………… 15例 健常者(外国人)…………… 30例
リンパ球性前葉炎…………… 3例	
IgG4関連下垂体炎…………… 3例	
Disease control (DI) …… 10例	
胚細胞性腫瘍…………… 3例	
鞍上部松果体腫瘍術後…………… 1例	
視床下部腫瘍術後…………… 1例	
ラトケ嚢胞…………… 1例	
頭蓋咽頭腫…………… 2例	
Glioma術後…………… 1例	
サルコイドーシスDI…………… 1例	
健常者…………… 9例	

図2. 患者血清と76kDリコンビナント蛋白を用いたWB



LINH患者において76kD蛋白に対する自己抗体が認められ、SLEやRAなどの自己免疫疾患、健常人では抗76kD蛋白抗体が認められなかった。

図3. 76kD 蛋白抗体の陽性率

診断マーカーとしての有用性		
リンパ球性後葉炎 …… 8例	7/8	全例 感度 87.5% (7/8) 特異度 89.9%(124/138)
リンパ球性前葉炎 …… 3例	0/3	
IgG4関連下垂体炎 …… 3例	1/3	
腫瘍性病変+DI …… 10例	1/10	腫瘍性病変+DIとの鑑別 特異度 90% (9/10)
自己免疫疾患 …… 69例	7/69	他の自己免疫疾患と LINHとの鑑別 特異度 89.9% (62/69)
混合組織結合病	2例 0/2	
多発筋炎/皮膚筋炎	8例 0/8	
強皮症	14例 1/14	
慢性関節リウマチ	20例 4/20	
Sjogren症候群	10例 1/10	
SLE	15例 1/15	
健常者 …… 39例	5/39	

図4. ES-AVP細胞におけるKCl刺激によるAVP分泌

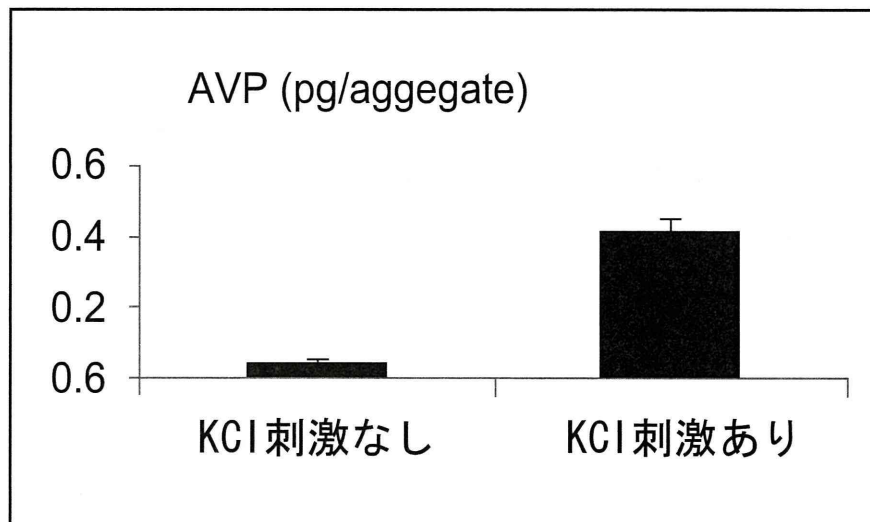
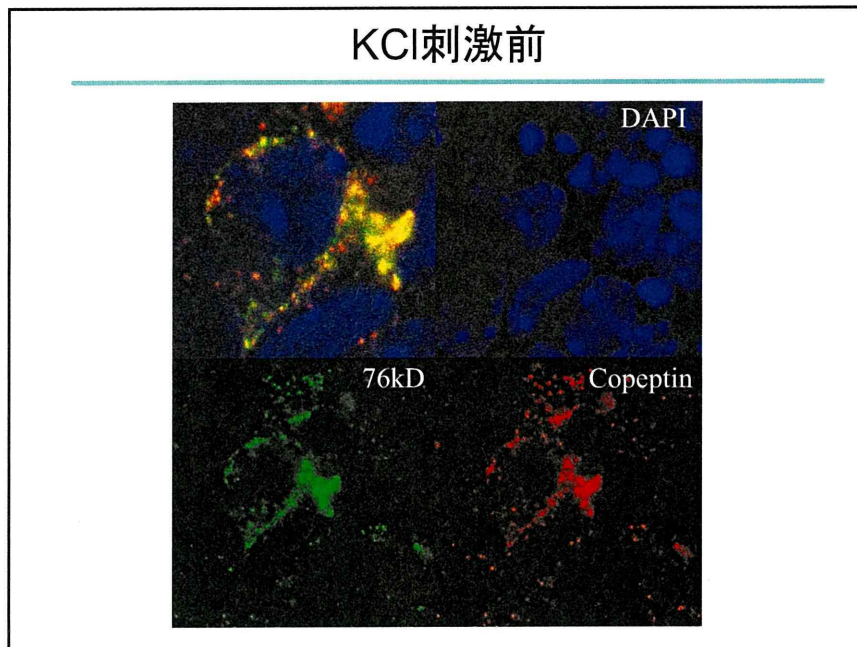
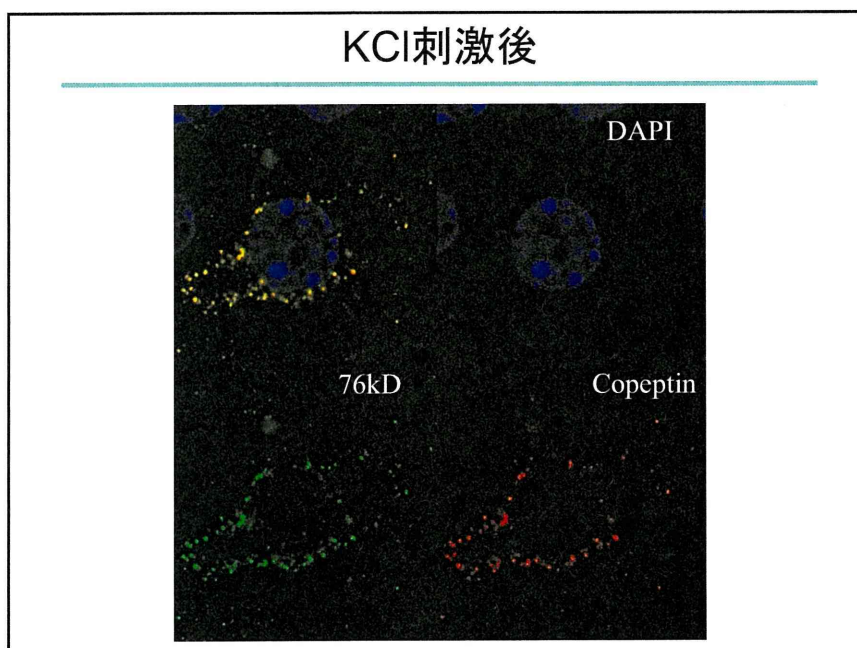


図5. ES-AVP細胞における76kD蛋白抗体とCopeptinの免疫染色(KCl刺激前)



KCl刺激前では76kD蛋白はCopeptinと主に細胞質においてAVPと共局在した。

図6. ES-AVP細胞における76kD蛋白抗体とCopeptinの免疫染色(KCl刺激後)



KCl刺激後ではCopeptinと76kD蛋白が共局在しながら細胞膜へ移動することが示唆された。

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

研究分担者	高野 幸路	東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科学
	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
	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	永江 玄太	東京大学先端研究所ゲノムサイエンス
	油谷 弘幸	東京大学先端研究所ゲノムサイエンス

研究要旨: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、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、2007年に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、24例の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。

A. 研究目的

先端巨大症やクッシング病では機能性下垂体腺腫からの過剰なホルモン分泌が生じ、代謝障害、臓器障害により生命予後、QOLの低下がもたらされる。ホルモン過剰分泌の原因を解明し、腫瘍増殖に関与する因子を解明することは新しい治療法を開発するために必須である。これまでに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は、いくつか明らかになってきた。しかしながら、発生原因としてはGH産生腺腫の約半数で*gsp*変異が認められる¹⁻³⁾が、機能性下垂体腺腫の発生原因

遺伝子としてこれ以外の体細胞変異の関与は十分に明らかにされていない。MEN1やCarney complexなどの下垂体腺腫をおこす遺伝性内分泌腺腫症候群の原因遺伝子の体細胞変異が、孤発性の下垂体腺腫に認められることも極めて少ない。また、いくつか知られている腫瘍増殖に関与する因子についても、腫瘍増殖を一部しか説明できていない。本研究は機能性下垂体腺腫の原因と腫瘍増殖に関与する因子を、候補遺伝子解析法とゲノムワイドの探索解析により明らかにしようとするものである。

B. 研究方法

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。

B-1. GH受容体遺伝子異常について

【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100症例。これらは3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。これら全例でGH受容体変異を解析し、その一部について*gsp*変異、病理所見、*ptd-FGFR4*の発現を解析した。症例の臨床情報はカルテから抽出し、手術で得られた検体からRT-PCRによりcDNAを作成し、遺伝子変異の有無を直接塩基配列決定で解析した。また臨床データとの関連を統計解析した。ヒト腺腫細胞を用いた研究については、各大学倫理委員会に申請し、承諾を得てこれを行った。手術材料を用いる場合、患者さんにあらかじめインフォームドコンセントを書面により得て行い、個人情報の保持のために、手術材料はコード化し管理し、個人情報は厳重に管理し、コード化のための対応表も厳重に管理した。

1) 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pure GH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。

2) GH受容体変異、*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。*Gsa*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。

GH受容体については、2007年にAsaら⁴⁾が報告した変異⁴⁾について直接塩基配列決定で解析した。

3) 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)。

B-2. エピゲノム解析

24例の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またGH産生腺腫ではGNASのimprintingのrelaxationが報告され

ているので、GsaをcodeするGNAS近傍のエピゲノムの詳細解析を行った。次に、ゲノムワイドの解析結果をhierarchical clustering analysisを用いて分析した。

C. 研究結果

C-1. GH受容体変異、病理所見の結果

GH受容体変異については、100例のGH産生腺腫(約半数が鹿児島県の症例、残りが東京の症例)で行ったが、2007年にAsaらが、GH産生腺腫の原因遺伝子異常と報告した変異⁴⁾(図1)は一例も認められなかった(図2)。

100例のうち、一部についてはPRL染色、サイトケラチン染色、gsp変異の検索、ptd-FGFR4発現の解析も行った。

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、densely granulated (DG)タイプは32例、sparsely granulated (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 ± 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 ± 25.8 ng/ml、IGF-Iの値は698 ± 300 ng/mlであった(平均 ± 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。

Asaらは、GH受容体変異は14例のSpGタイプの6例に認められたとしているが、われわれのSpGタイプの中には一例も認められなかった。このことから、selection biasによってGH受容体変異が見出せなかったとは考えにくい。

図3にこれらの結果をまとめた。

C-2. エピゲノム解析

GH産生腺腫においては体細胞のgsp変異が本邦の患者でも約半数に認められるので³⁾、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変異と対応すると予想したが予想に反し、以下の結果が得られた。gsp変異群の中では互いに類似したgenome-wideの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gsp変異群に類似した群とメチル化領域が多い群に分かれた。Wild typeのGH産生腺腫に見られた2つのメチル化パターンの2群のうち、gsp変異と類似のパターンを示す群では、gsp変異例と同様の表現型を引き起こすような出来事(例えばGsa-cAMP-PKA経路の体細胞変異)が起きていることが推測された。

D. 考察

D-1. GH受容体変異について

Asaらがsparsely granulated (SpG) GH secreting adenomaに特異的にみとめられる体細胞変異として報告したHis49の体細胞変異は、我々の100例の解析では一例も認められなかった。この100例の中にSpG adenomaが含まれていることから、少なくとも本邦の

GH産生腺腫においてはHis49Leuの体細胞変異は原因として殆ど見られないのではないかと考えられる。一方、欧米でもKolaらはGH産生腺腫18例においてGH受容体を解析し変異を認めなかったと報告している⁵⁾。

D-2. エピゲノム解析結果から

GNAS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。まずWild typeの多くの症例においてメチル化されている場所が優位であったのに対し、*gsp*変異群では多くの部位が非メチル化されており多くの遺伝子群が活性化状態にあると推測された。G α の活性化変異ひとつの変化だけで、ゲノム全体に著しい活性化をもたらしていることが明らかになった。

また、wild typeには2群があり、片方は*gsp*変異例と似た表現型を起こしていることがわかった。

この現象は、過去に調べたGH産生腺腫の電気生理学的特徴と合致する結果である⁶⁾。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(図6の上図)、*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(A)、膜透過性cAMPアナログで同様の現象が起こる(B)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(C)、cAMPでも起こせない。一方、PKA阻害薬で処理すると(図6の下図)、*gsp*変異のない腺腫では基底状態の電流の変化はないが(A)、*gsp*変異のある腺腫では基底状態の電流量が減少し、I-V関係から非選択性陽イオン電流が減少したことがわかる(B)。このような現象を多くのGH産生腺腫で検討すると、上記

の関係に合致しない例があることがわかった(図7)。*Gsp*変異がないにもかかわらず、非選択性陽イオン電流の活性化がGHRHや8Br-cAMPで起こらず、PKA阻害薬で基礎の電流が減少する症例が8例も見つかった。これらにおいては、*gsp*変異以外の原因でPKAの活性化が基礎状態で生じていることが示唆される。ゲノムワイドのエピゲノム解析で見られたwild typeでありながら非メチル化領域の多い*gsp*変異群と同様の表現型を示した一群は電気生理現象でみたこのような群を示すものではないかと考えられる。

今後、これらの腫瘍のwhole exome解析に期待が持てる。

E. 結論

以上より、

1. 本邦のGH産生下垂体腺腫においては、GH受容体の変異が原因であるものはあっても極めて少ないと考えられる。
2. ゲノムワイドのエピゲノム解析から、新たな体細胞変異が想定され、今後の解析の筋道が明らかになった。

参考文献

- 1) Landis CA, et al: J Clin Endocrinol Metab, 71:1416, 1990.
- 2) Spada A, et al: J Clin Endocrinol Metab, 71:1421, 1990.
- 3) Yasufuku-Takano J, et al: Clin Endocrinol (Oxf), 64:91, 2006.
- 4) Asa SL et al, Cancer Res. 67:7505-7511. 2007.
- 5) Kola B et al, Clin Endocrinol (Oxf). 59:328-338. 2003.
- 6) Yasufuku-Takano J, et al: Endocrinology, 140:2018, 1999.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Akira Matsuno*, Akiko Mizutani, Hiroko Okinaga, Koji Takano, So Yamada, Shoko M. Yamada, Hiroshi Nakaguchi, Katsumi Hoya, Mineko Murakami, Masato Takeuchi, Mutsumi Sugaya, Johbu Itoh, Susumu Takekoshi and R. Yoshiyuki Osamura
Molecular Morphology of Pituitary Cells, from Conventional Immunohistochemistry to Fluorescein Imaging. *Molecules*, 16, 3618-3635, 2011
- 2) 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* 68:E1761-7, 2011

- 3) Matsuno A, Mizutani A, Okinaga H, Takano K, Yamada S, Yamada SM, Nakaguchi H, Hoya K, Murakami M, Takeuchi M, Sugaya M, Itoh J, Takekoshi S, Osamura RY. Functional molecular morphology of anterior pituitary cells, from hormone production to intracellular transport and secretion. *Med Mol Morphol.* 44 (2) :63-70. 2011
- 4) Fujio S, Tokimura H, Hanaya R, Hirano H, Arita K, Yunoue S, Bohara M, Arimura H, Kinoshita Y, Tominaga A. Gradual declination of IGF-1 over a year after transsphenoidal adenomectomy of GH producing pituitary adenomas. *Endocrine Journal* 58:1087-1091, 2011.
- 5) 石井雄道, 田原重志, 大山健一, 寺本明. TSH産生下垂体腺腫に対する手術と治療成績 日本内分泌学会雑誌 87:333, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

図1. Asaらが報告したGH受容体の変異

同じHis49の場所の2種類のアミノ酸置換に相当する変異を報告している。

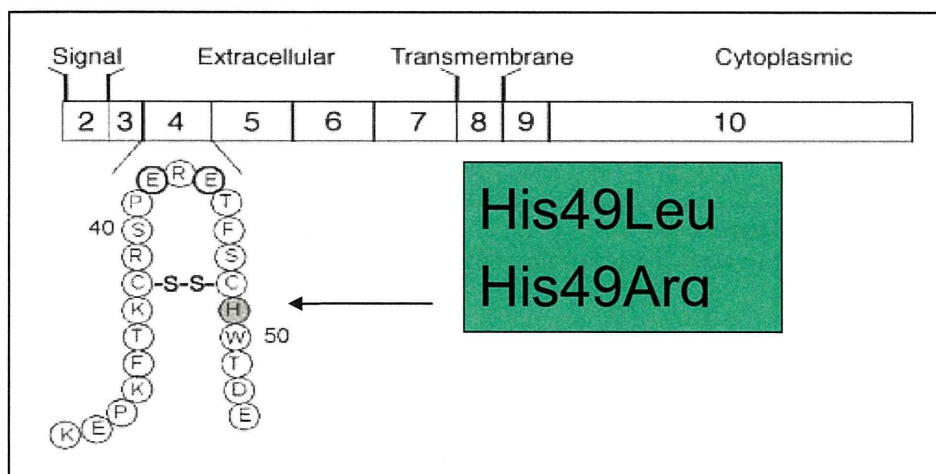


図2. GH受容体のHis49領域の塩基配列解析

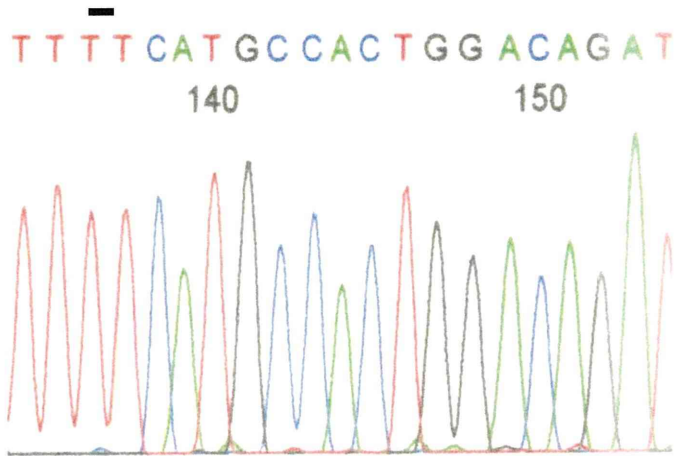


図3. cytokeratin pattern とその他の指標との関係

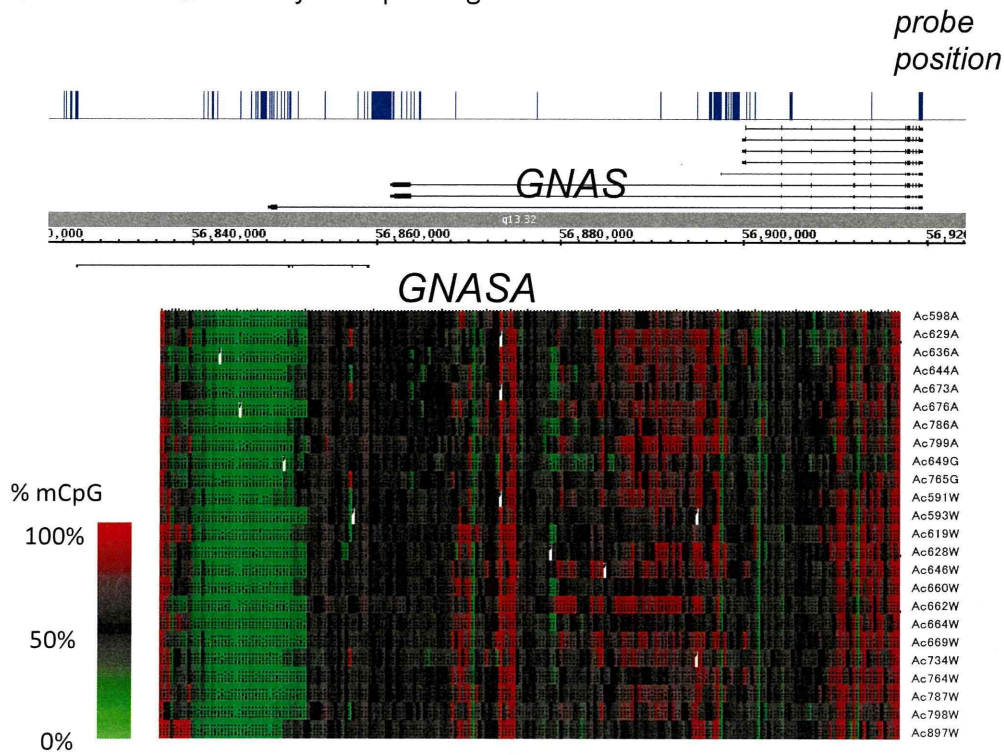
Cytokeratin pattern (n=)	GHR His49 (n=)	Gsp mutation (n=)	Ptd-FGFR4 (n=)	GH suppression by octreotide*
SpG (9)	WT (9)	WT (3) 201Cys (5) 201His (1)	Positive (2) Negative (5) No data (2)	Positive (4) Negative (4) No data (1)
SpG with DG (1)	WT (1)	WT (1)	Positive (1)	Positive (1)
DG (25)	WT (25)	WT (9) 201Cys (13)	Positive (6) Negative (14) No data (5)	Positive (21) Negative (2) No data (2)
DG with SpG (2)	WT (2)	201Cys (2)	Positive (1) Negative (1)	Positive (2)
No data (8)	WT (8)	WT (2) 201Cys (5) No data (1)	Negative (6) No data (2)	Positive (8)
overall	No mutation	29/44= 66%	9/34=26%	P=0.0258 Between pure SpG & pure DG**

SpG: sparsely granulated, DG: densely granulated.

* GH suppression was considered positive when it was less than 50% of baseline value.

** By Fisher's exact test.

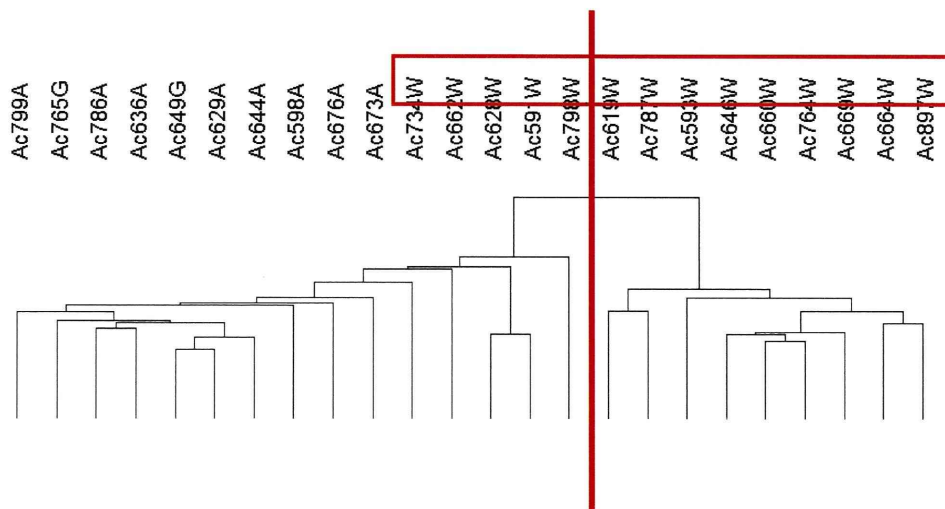
図4. GNAS近傍の methylation profiling



Takano K, Nagae G, Yasufuku-Takano J, Aburatani H, Teramoto A, Arita K, 2011

図5. genome-wide 解析を行ったときの epigenomic profiles の hierarchical clustering 解析結果
 腺腫番号の最後に W とついたものが wild type で、ついてないものは *gsp* 変異例。

Hierarchical clustering analysis



Takano K, Nagae G, Yasufuku-Takano J, Aburatani H, Teramoto A, Arita K, 2011

図6. GH産生下垂体腺腫に引き起こされる電気生理現象

(上図) *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(A)、膜透過性cAMPアナログで同様の現象が起こる(B)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(C)、cAMPでも起こせない。(下図)一方、PKA阻害薬で処理すると、*gsp* 変異のない腺腫では基底状態の電流の変化はないが(A)、*gsp* 変異のある腺腫では基底状態の電流量が減少し、I-V関係から非選択性陽イオン電流が減少したことがわかる(B)。(文献6から引用)

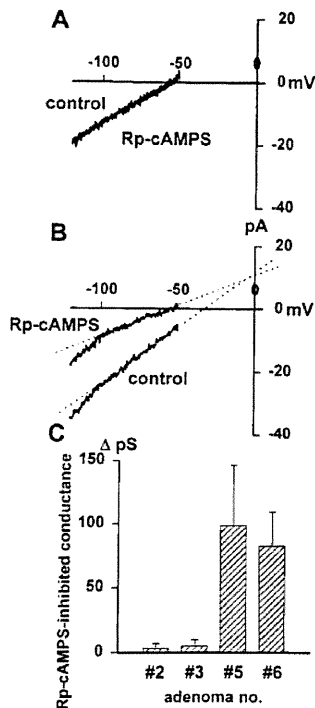
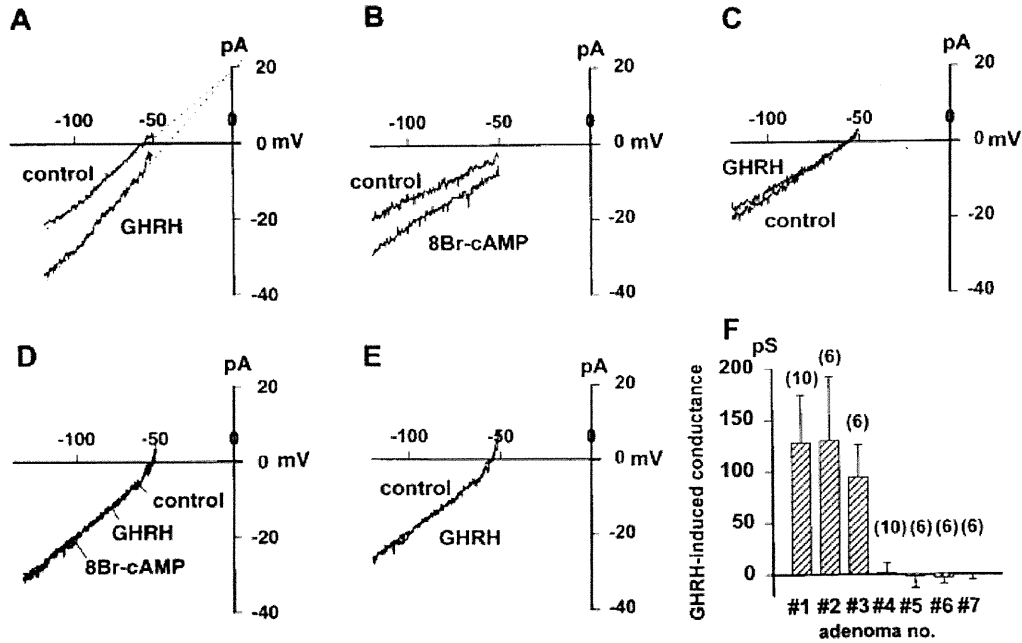


図7. *gsp* 変異の有無とGHRHで起こる電気現象の有無の相関
gsp 変異のないGH産生腺腫の中にGHRHで非選択性陽イオン電流の活性化がみられない(NSCC(-)と表現)例が8例認められた。これらは、非選択性陽イオン電流が基底状態ですでに活性化していることが示唆され、*gsp* 変異以外の原因でPKAが活性化状態にあることを示唆している。(文献6から引用)

	NSCC (+)	NSCC (-)	未検	合計
<i>gsp</i> (+)	1	16	3	20
<i>gsp</i> (-)	4	⑧	0	12
合計	5	24		32

Cushing病に対する新規薬物療法の開発

研究分担者	菅原 明	東北大学大学院医学系研究科病態検査学分野
	岩崎 泰正	高知大学教育研究部医療学系臨床医学部門
	沖 隆	浜松医科大学第二内科
	須田 俊宏	弘前大学大学院医学研究科内分泌代謝内科学

研究要旨:我々のグループでは、相互に連携を取りながら、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ている。本年度の成果を以下に示す。

- 1) 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。
- 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。
- 3) 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た。
- 4) 巨大下垂体腺腫によるCushing病において血中 α MSHが上昇している事が明らかとなり、血中 α MSHの測定がCushing病の下垂体腺腫増大の予測因子として重要である可能性が示された。

来年度は、これらの研究成果を基に、Cushing病に対する新規薬物療法の開発を更に進めて行く。

A. はじめに

下垂体ACTH産生腺腫によるクッシング病は、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。我々のグループでは、相互に連携を取りながら、Cushing病に対する新規薬物療法・新規診断法の開発を目指した研究を進めている。

B. 本年度の成果

I) 薬物療法

- 1) RXRアゴニストHX630がAtT20細胞に対して、POMC mRNA発現抑制作用・

ACTH分泌抑制作用・アポトーシス誘導作用を有する事を明らかにした(菅原)。

- 2) ソマトスタチン受容体アゴニストSOM230がAtT20細胞に対して、POMC mRNA発現抑制作用・ACTH分泌抑制作用・細胞増殖抑制作用・アポトーシス誘導作用を有する事を明らかにした(蔭山・須田)。

- 3) NF κ B阻害剤E3330・阻害物質クルクミンやMAPK阻害剤PD98059・SB203580が、AtT20細胞においてPOMC遺伝子の転写活性を抑制する事を明らかにした(岩崎)。

II) 診断等

- 1) POMC発現下垂体腫瘍の一部でPC1/3 processingの異常により silent corticotroph adenomaが発生する可能性を明らかにした(沖)。
- 2) PC2発現を伴うACTH産生腫瘍はサイズが大きく侵襲性が高くなる傾向がある事を明らかにした。また血漿中の α -MSHを測定することで、術前に腫瘍内PC2の発現を予測することを可能とした(沖)。
- 3) Cushing病の病態下ではグルココルチコイドによりAgRPの発現が促進され、過食・肥満が招来される可能性を明らかにした(岩崎)。

C. 今後の研究計画

I) 現在検討中・今後検討予定の薬剤

今後は、以下の薬剤のCushing病治療薬としての効果の検討を予定している。

- 1) ソマトスタチンアナログ(SOM230/pasireotide、オクトレオチド)
- 2) NF κ B阻害剤(E3330・パルテノライド)
- 3) NF κ B阻害物質(クルクミン)
- 4) MAPK阻害剤(PD98059・SB203580)
- 5) ドパミンアゴニスト(カベルゴリン・ブロモクリプチン)
- 6) 11 β HSD2抑制剤
- 7) RXRアゴニスト(HX630、PA024、CD3254)
- 8) GABAアンタゴニスト(ムシモール)
- 9) 他の抑制性生理活性物質(cannabinoid、opioid、cGMP/PKGなど)
- 10) 他のシグナル伝達阻害剤(EGF/EGFR、

Annexin A1など)

- 11) イオンチャネル阻害剤(Cl channel inhibitor)

II) 現在進行中・今後施行予定のプロジェクト

- 1) 上記薬剤の標的の検討：上記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)を、Cushing病患者の手術時に得られるACTH産生腺腫を用いて、定量PCR・免疫染色にて検討する(2012～2013)。
- 2) 上記薬剤の効果のin vitroでの検討：マウスACTH産生AtT20細胞を用いて、これら薬剤の細胞増殖抑制効果、アポトーシス促進効果ならびにPOMC発現・ACTH分泌抑制効果を解析する(2012)。
- 3) 上記薬剤の効果のin vivoでの検討：AtT20細胞を移植したヌードマウスを用いて、これら薬剤の腫瘍細胞に対する増殖抑制効果、POMC発現・ACTH分泌抑制効果を解析する(2012～2013)。

D. 結論

Cushing病の新規薬物療法・診断法に関して、本年度は前記の成果が得られた。今後、グループとしてさらに研究を進める事により、Cushing病の新規薬物療法の早期の確立を目指していく。

E. 研究発表

各研究分担者の報告書に記載。

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

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 (平成23年度改訂)

先端巨大症の診断の手引き

I. 主症候(注1)

- 1) 手足の容積の増大
- 2) 先端巨大症様顔貌(眉弓部の膨隆、鼻・口唇の肥大、下顎の突出など)
- 3) 巨大舌

II. 検査所見

- 1) 成長ホルモン(GH)分泌の過剰
血中GH値がブドウ糖75g経口投与で正常域まで抑制されない(注2)
- 2) 血中IGF-1(ソマトメジンC)の高値(注3)
- 3) MRIまたはCTで下垂体腺腫の所見を認める(注4)

III. 副症候および参考所見

- 1) 発汗過多
- 2) 頭痛
- 3) 視野障害
- 4) 女性における月経異常
- 5) 睡眠時無呼吸症候群
- 6) 耐糖能異常
- 7) 高血圧
- 8) 咬合不全
- 9) 頭蓋骨および手足の単純X線の異常(注5)

(注1) 発病初期例や非典型例では症候が顕著でない場合がある。

(注2) 正常域とは血中GH底値1 µg/L(リコンビナントGHを標準品とするGH測定法)未満である。糖尿病、肝疾患、腎疾患、青年では血中GH値が正常域まで抑制されないことがある。また、本症では血中GH値がTRHやLH-RH刺激で増加(奇異性上昇)することや、プロモクリプチンなどのドパミン作動薬で血中GH値が増加しないことがある。さらに、腎機能が正常の場合に採取した尿中GH濃度が正常値に比べ高値である。

(注3) 健常者の年齢・性別基準値を参照する(附表)。栄養障害、肝疾患、腎疾患、甲状腺機能低下症、コントロール不良の糖尿病などが合併すると血中IGF-Iが高値を示さないことがある。

(注4) 明らかな下垂体腺腫所見を認めない時や、ごく稀にGHRH産生腫瘍の場合がある。