

- 6) Tamura S, Nagasawa A, Masuda Y, Tsunematsu T, Hayasaka K, Matsuno K, Shimizu C, Ozaki Y, Moriyama T. BDNF, produced by a TPO-stimulated megakaryocytic cell line, regulates autocrine proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 427: 542-6.
- 7) Nakabachi M, Mikami T, Okada K, Onozuka H, Kaga S, Inoue M, Yokoyama S, Mishida M, Shimizu C, Matsuno K, Uwano H, Yamada S, Tsutsui M. Overweight causes left ventricular diastolic asynchrony and diastolic dysfunction: a study based on speckle tracking echocardiography in healthy subjects. *J Echocardiogr* 2012; 10: 83-89.
- 8) Sakurai T, Wada N, Takahashi Y, Ichikawa A, Ikuta A, Furumaki H, Hui SP, Jin S, Takeda S, Fuda H, Fujikawa M, Shimizu C, Nagasaka H, Furukawa H, Kobayashi S, Chiba H. Immunological detection of large oxidized lipoproteins in hypertriglyceridemic serum *Annals of Clinical Biochemistry* 2013 in press.
- 9) Miyoshi A, Nagai S, Takeda M, Kondo T, Nomoto H, Kameda H, Hirai A, Cho K, Kimachi K, Shimizu C, Atsumi T, Miyoshi. H Ovarian morphology and prevalence of polycystic ovary syndrome in Japanese women with Type 1 diabetes mellitus *J Diabetes Invest* 2013 in press.
- 10) Nagasawa A, Matsuno K, Tamura S, Hayasaka K, Shimizu C, Moriyama T. The basis examination of leukocyte-platelet aggregates with CD45 gating as a novel platelet activation marker. *Internat J Lab Hemat* 2013 in press

2. 学会発表

- 1) 野本博司, 相川望美, 國崎 哲, 亀田 啓, 平井愛見子, 来海公彦, 曹 圭龍, 永井聡, 近藤琢磨, 清水 力, 三好秀明: 機能性甲状腺結節と高Ca血症を合併した先端巨大症の一例. 第21回臨床内分泌代謝Update, 浜松, 2012年1月27, 28日
- 2) 亀田 啓, 相川望美, 國崎 哲, 野本博司, 平井愛見子, 来海公彦, 曹 圭龍, 永井聡, 近藤琢磨, 三好秀明, 清水 力: ホルモン負荷試験における90分値と120分値の意義の検討. 第21回臨床内分泌代謝Update, 浜松, 2012年1月27, 28日
- 3) 野本博司, 相川望美, 國崎 哲, 亀田啓, 来海公彦, 曹 圭龍, 永井聡, 近藤琢磨, 清水 力, 三好秀明: 治療前後における下垂体機能変化を確認しえたりンパ球性下垂体炎5例の検討. 第85回日本内分泌学会学術総会, 2012年4月19日~21日, 名古屋市
- 4) 三次有奈, 永井 聡, 野本博司, 亀田啓, 曹 圭龍, 来海公彦, 近藤琢磨, 三好秀明, 清水 力: 閉経前1型糖尿病女性の大腿骨頸部低骨密度に関連する因子. 第85回日本内分泌学会学術総会, 2012年4月19日~21日, 名古屋市
- 5) 亀田 啓, 相川望美, 國崎 哲, 野本博司, 来海公彦, 曹 圭龍, 永井聡, 近藤琢磨, 三好秀明, 和田典男, 柳沢克之, 清水 力: 潜在性甲状腺機能低下症と糖尿病合併症の関連についての検討. 第85回日本内分泌学会学術総会, 2012年4月19日~21日, 名古屋市

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1. 下垂体DNAマイクロアレイ法 (WT マウスとの比較)

Gene symbol	Gene description	Fold Change
Nmb	neuromedin B	12.8
Ly6g6c	lymphocyte antigen 6 complex, locus G6C	12.5
St8sia5	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 5	5.5
Slc6a14	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 14	4.9
Igk-V1	immunoglobulin kappa chain variable 1 (V1)	4.4
Grp	gastrin releasing peptide	4.4

図1. 下垂体免疫染色 (抗ACTH抗体)

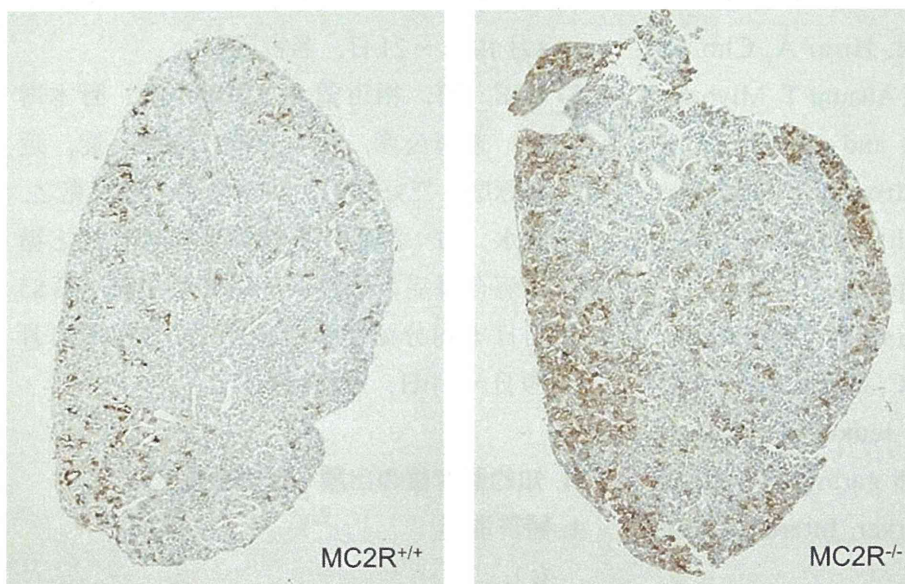


図2. AtT-20/D16v-F2に対するCRH投与後の遺伝子発現変化

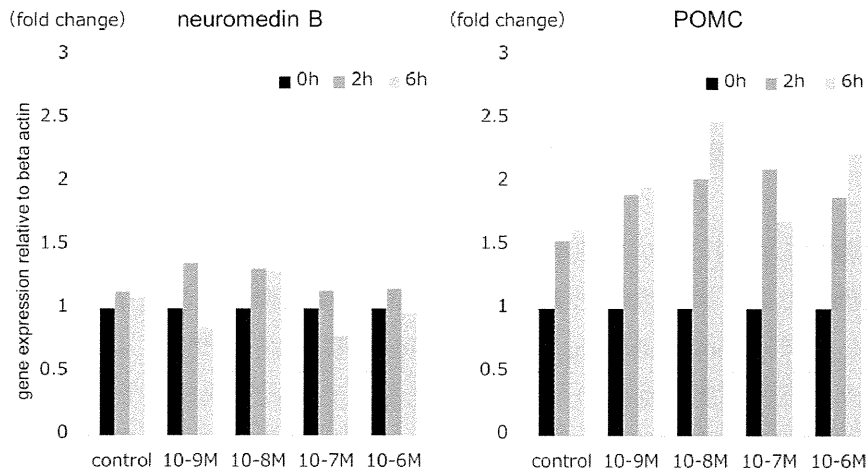
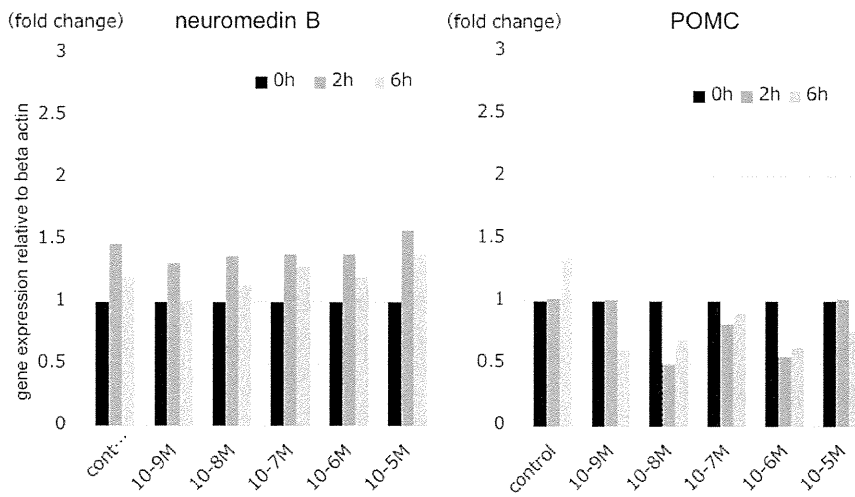


図3. AtT-20/D16v-F2に対するDEX投与後の遺伝子発現変化



TSH分泌異常症例の治療経過

研究分担者 巽 圭太 宝塚大学看護学部／大阪大学
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
鶴田絵里子 大阪大学大学院医学系研究科臨床検査診断学

研究要旨：TSH分泌異常症の症例について自験例を中心に観察・検討し、注意すべき病態を発見した。自験例として、大阪大学医学部附属病院内分泌代謝内科受診中の患者の経過を観察・検討し、米国Food and Drug Administration (FDA) からPTUによる肝性脳症、肝移植のような重症肝障害の症例の副作用報告を取り寄せた。異所性TSH産生腫瘍で腫瘍を摘出後には、甲状腺濾胞内の甲状腺ホルモンが7ヶ月間漏出し続ける新たな型の漏出性の甲状腺中毒症と考えられた症例があり、また、SITSHの甲状腺中毒症が2年以上遷延した後に正常化した症例もあったので、甲状腺中毒症が重くなく自覚症状が無ければ経過観察するのが一つの選択肢であると考えられた。また、バセドウ病でPTU投与後に劇症肝炎で肝移植に至った症例を2例経験したが、PTUは、肝移植例に至る薬剤性肝障害を引き起こす薬剤の中で世界的には4,5番目と高頻度に起こす薬剤で、発症前の経過が比較的長い亜急性型劇症肝炎の方が多く、肝機能検査は少なくとも一部の症例では有効と考えられた。TSH産生腫瘍を摘出後には、甲状腺中毒症が2年以上遷延した後に正常化した症例もあった。また、バセドウ病でPTU投与後の肝機能検査は、6ヵ月以内は月1回程度行うのが望ましい。

A. 研究目的

TSH分泌異常症には、下垂体性のもの、視床下部性のものと、甲状腺中毒症や甲状腺機能低下症に続発する甲状腺性のものである。このようなTSH分泌異常症の症例について自験例を中心に観察・検討し、注意すべき病態を発見した。

B. 研究方法

自験例として、大阪大学医学部附属病院内分泌代謝内科受診中の患者の経過を観察・検討した。

米国Food and Drug Administration (FDA) に対しては、まず、PTUによる副作用報告のline listを取り寄せ、そこから肝性脳症、肝移植のような重症肝障害を疑わせるキ

ワードのあるものを抽出して、FDAよりこれらの症例の副作用報告を取り寄せた。

C. 研究結果

【症例1】 異所性TSH産生腫瘍

《現病歴》 46歳 男性

2000年頃より手指振戦、動悸、多汗を自覚していた。2009年12月に甲状腺腫を指摘され近医受診し、2010年1月FT4、TSHが共に高値で、不適切TSH分泌症候群(SITSH)にて近くの病院に紹介された。SITSHは改善せず、

瀰漫性甲状腺腫を認め、下垂体造影MR1にて下重体には明らかな異常を認めず、咽頭上壁より下垂する腫瘤を認めたため、2010年8月大阪大学医学部附属病院内分泌代謝内

科に紹介受診された。

《当院での経過》

2010年8月当院紹介受診。FT4 4.8 ng/dl、FT3 14.0 pg/ml、TSH 2.59 μ U/mlと、SITSHが持続し、異所性TSH産生腫瘍が疑われ、耳鼻咽喉科にて摘出することとなった。術前に甲状腺機能を正常化するため、プロモクリプチン2.5mg投与し、TSHと甲状腺機能の低下を認めた。プロモクリプチンの治療効果は一ヶ月余りで減弱したため、投与量を5mg、7.5mgと漸増した。

術直前はチアマゾールとヨウ化カリウムの投与で甲状腺機能を正常し、

12/9、鼻腔腫瘍摘出術を施行した。病理所見で異所性TSH産生腫瘍と確定診断された。12/15 FT4 0.9 ng/dl、FT3 1.6 pg/ml、TSH <0.03 μ U/mlと、甲状腺機能低下症となったため、レボチロキシン(LT4)の補充療法を開始した。

2011/2/18 FT4 1.5 ng/dl、FT3 3.8 pg/ml、TSH <0.03 μ U/mlと甲状腺中毒症となったため、LT4の補充療法を中止したが、3月から8月に掛けてFT4 1.1-1.6 ng/dl、FT3 3.8-4.9 pg/ml、TSH <0.03 μ U/mlと甲状腺中毒症が持続した。この間でTRAb <2.0、TSAAb 120%と共に陰性、頸部超音波では甲状腺内部の血流シグナルは乏しく、甲状腺体積は35.4cm³と術前に比べて縮小した。

同年9月に123-I甲状腺摂取率 2.9%、FT4 1.0 ng/dl、FT3 2.8 pg/ml、TSH <0.03 μ U/mlと甲状腺ホルモンが正常化した。同年11月から2012年2月に掛けてFT4 0.5-0.7 ng/dl、FT3 1.6-2.3 pg/ml、TSH 0.83-1.75 μ U/mlとTSHは正常化したもののFT4が低値となった後、2012年4月以降、甲状腺機能が正常化した。

【症例2】 下垂体性のTSH産生腫瘍

《現病歴》 50歳 男性

2005年に健診にて甲状腺腫大を指摘された。自覚症状を認めず、血液検査・穿刺細胞診で甲状腺腫以外の明らかな異常は認めなかった。

2006・2007年の健診の際は甲状腺腫を指摘され、特に自覚症状はなかった。

2007年に血液検査を希望して近医受診し、甲状腺機能亢進と瀰漫性の甲状腺腫大を認め、精査のため、近くの病院を紹介受診した。

2007/9/20 FT4、FT3、TSHが全て高値で、TRAb、TSAAbは共に基準値内であった。頭部MRIにて下垂体柄の右側への偏位を認め、左半中心の腫瘍を疑われ、手術を前提とした精査目的で大阪大学医学部附属病院内分泌代謝内科に紹介受診された。

《当院での経過》

2007年11月当院紹介受診。goiter 4.7cm, pulse 92/min。FT4 2.7 ng/dl、FT3 6.4 pg/ml、TSH 4.03 μ U/mlと、SITSHが持続し、下垂体のTSH産生腫瘍が疑われ、脳神経外科にて摘出することとなった。術直前に、ヨウ化カリウムとオクトレオチドの投与で甲状腺機能を正常し、12/26経蝶形骨洞下垂体腫瘍摘出術を施行した。病理所見でTSH産生腫瘍と確定診断された。2008/1/4 FT4 2.3 ng/dl、FT3 5.0 pg/ml、TSH 2.02 μ U/mlと、術後もSITSHが持続し、頭部MRIで残存腫瘍を認めたため、2008年12月、第2回の経蝶形骨洞下垂体腫瘍摘出術を施行した。再手術後は2年以上経過した2011/4/15まではTSHは基準値内でFT4、FT3軽度高値のことが多かったが自覚症状は無く経過観察した。2011/7月になって甲状腺機能が正常化し、以降、甲状腺機能が正常であった。

【症例3】 バセドウ病による続発性TSH分泌低下症

《現病歴》 48歳 女性

2011年、8ヶ月で8kgの体重減少、発汗過多にて近くの総合病院受診し、甲状腺機能亢進症と診断され、5/28よりプロピルチオウラシル(PTU)200mg/日を投与開始された。同年10月下旬、嘔気、全身倦怠感を自覚した。

同年12月上旬、胃腸症状が1か月続き、褐色尿も出たので、近医(消化器内科)受診、血液検査、腹部エコーの結果、近くの大学附属病院に紹介され、即日入院となった。入院3日後、肝性脳症出現し、亜急性型劇症肝炎と診断され、肝移植のため12月中旬、大阪大学医学部附属病院に搬送され、生体部分肝移植を施行された。2012年1月、液性免疫拒絶を認め、60L以上の血漿交換を行い、2012年5月軽快退院した。

D. 考察

【症例1】は、異所性の上咽頭TSH産生腫瘍が手術で全摘出され、術直後は甲状腺機能低下症となった。通常、TSH産生腫瘍の全摘出術後は、術前の甲状腺機能亢進症から一旦甲状腺機能低下症となり、SITSHの時に抑制されていた正常下垂体組織からのTSHの分泌が再開されるようになって甲状腺機能が正常化する。ところが、本症例では術直後は甲状腺機能低下症となったものの、術後2-8ヶ月に掛けては術前と同様のT3優位の甲状腺中毒症、術後11-14ヶ月にはFT4のみ軽度低値の軽度の甲状腺機能低下症となり、術後16ヶ月後の2012年4月になってようやく甲状腺機能が正常化した。

TSHが抑制される一過性の甲状腺中毒症後に甲状腺機能低下症となった後、甲状腺機能が正常化する既知の病態の中で頻度が多い

ものは橋本病での無痛性甲状腺炎や亜急性甲状腺炎での破壊性甲状腺中毒症である。破壊性甲状腺中毒症では、通常、甲状腺中毒症は1-3ヶ月、その後の甲状腺機能低下症は3ヶ月以下で改善し、本症例とは期間が異なる。本症例では、術後の甲状腺中毒症が自然軽快し、その時のFT3/FT4比が術前と類似した比で、甲状腺中毒症時に甲状腺腫の縮小を認めたことから、通常の破壊性甲状腺中毒症とは異なり、甲状腺濾胞内の甲状腺ホルモンが7ヶ月間漏出し続ける新たな型の漏出性の甲状腺中毒症と考えられた。

【症例2】は、2回目のTSH産生下垂体腫瘍摘出術後にSITSHの甲状腺中毒症が2年以上遷延した後に正常化した。本症例ではTSHの分泌があったため、症例1とは異なり、患者のTSHに対し患者の甲状腺が高感受性であった、患者のTSH産生細胞が甲状腺ホルモンに対し低感受性であった、TSH産生下垂体腫瘍細胞が残存していたが自然軽快した、などの可能性が考えられた。

いずれにせよ、これらの2症例では、TSH産生腫瘍を摘出後、甲状腺中毒症が症例1では7ヶ月、症例2では2年以上遷延した後に正常化したので、甲状腺中毒症が重くなく自覚症状が無ければ経過観察するのが一つの選択肢だといえる。

【症例3】は、バセドウ病による続発性TSH分泌低下症で、PTUを6ヶ月以上投与後、亜急性型劇症肝炎と診断され、生体部分肝移植を施行された。当院では、2006年にもPTUを3ヶ月以上投与後、肝性脳症出現して急性型劇症肝炎と診断され、生体部分肝移植を施行された症例があった。Textbookで調べると、PTUは、肝移植例に至る薬剤性肝障害を引き起こす薬剤の中で、世界的には4,5番目であった。

重篤副作用疾患別対応マニュアル薬物性肝障害(平成20年4月厚生労働省)では、「多くの薬物性肝障害は薬物服用後60日以内に起こることが多いが、90日以降の発症もみられる(約20%)。」と記載されていた。我々が当院で経験したPTU投与後の劇症肝炎症例では、2例とも90日以降の発症であったので、通常の薬物性肝障害とは発症時期が異なる可能性が考えられた。また、定期的な検査に関しては、重篤副作用疾患別対応マニュアル薬物性肝障害(平成20年4月厚生労働省)では、「定期的肝機能検査(服用開始後2ヶ月間は2~3週に1回)がすすめられる。」と記載され、米国甲状腺学会が作成したガイドライン(Hyperthyroidism and Other Causes of Thyrotoxicosis: Management Guidelines of the American Thyroid Association and American Association of Clinical Endocrinologists, 2011)では、「定期的な肝機能検査、白血球検査が薬剤性の副作用の予防に有用だとのコンセンサスはない。定期的な肝機能検査を全患者で行っても重症肝障害を防げた報告は無い。PTUによる肝障害は急性に発症するので肝機能検査でのモニターは有用とは考えられない」と記載されている。我々の経験した症例では、発症直前の検査が消化器症状発症4ヶ月半前と37日前であり、急性型劇症肝炎と予後が悪い亜急性型劇症肝炎が一例ずつだった。

そこで、既報のPTUの劇症肝炎症例について、劇症肝炎を発症した時期、発症予測が困難な急性型劇症肝炎と予後が悪い亜急性型劇症肝炎の割合、消化器症状発症直前の検査の時期を調べるために、国内外の論文を検索すると共に、米国FDAに副作用が報告されたPTUによる副作用症例のline listを請求して取り寄せ、肝性脳症を来した劇症肝炎例な

いし肝移植例について検討した。その結果、肝性脳症発症例ないし肝移植施行の34症例(うち、日本人5症例)を集積した。劇症肝炎を発症した時期は90日以降の発症が74%を占め、180日以降が23%存在した。急性型劇症肝炎と亜急性型劇症肝炎の割合は、日本人では1人:4人、世界的には7人:15人で亜急性型劇症肝炎が多かった。消化器症状発症直前の検査について書かれている論文や副作用報告は5例と少なく、うち4例が日本の症例であった。消化器症状発症直前の検査の時期は短い順から、37日前、46日前、52日前、84日前、4ヶ月半前で、肝性脳症発症はPTU投与開始後、各々、102日目、218日目、66日目、139日目、197日目であった。この内、46日前に検査した症例では、肝機能異常を認めていた。

すなわち、今回の劇症肝炎をPTU投与後に発症した症例の経過からは、PTU投与後に発症した劇症肝炎では、

1. 発症時期がPTU投与後、4ヵ月日以降の発症が74%、7ヵ月日以降の発症が23%と通常の薬剤性肝障害と異なり、かなり遅い、
2. 消化器症状が肝性脳症発症11日以上前に発症し予後が悪い亜急性型劇症肝炎は、日本人では8割、世界的にも68%で、多い、
3. 消化器症状発症直前の検査について書かれている論文、副作用報告は5例と少なかったが日本人症例が8割とよく検査をされ、最も短いもので37日前であった。

したがって、米国甲状腺学会が作成したガイドラインの参照文献と異なり、PTU投与後は発症前の経過が比較的長い亜急性型劇症肝炎の方が多く、現に消化器症状発症直前の検査について書かれている5例のうち1例で

は肝機能異常を認めていたので、肝機能検査は少なくとも一部の症例では有効と考えられた。検査間隔としては、77%が発症する6ヵ月以内は月1回程度(36日以内)の検査が、これまで国内で推奨されている服用開始後2ヶ月間2~3週に1回に加えて望ましい。

E. 結論

TSH産生腫瘍を摘出後には、甲状腺濾胞内の甲状腺ホルモンが7ヶ月間漏出し続ける新たな型の漏出性の甲状腺中毒症と考えられた症例があり、また、SITSHの甲状腺中毒症が2年以上遷延した後に正常化した症例もあったので、甲状腺中毒症が重くなく自覚症状が無ければ経過観察するのが一つの選択肢である。

また、バセドウ病でPTU投与後の肝機能検査は、これまで国内で推奨されている服用開始後2ヶ月間2~3週に1回に加えて6ヵ月以内は月1回程度行うのが望ましい。

F. 研究成果発表

1. 論文発表

- 1) Tsuyoshi Isojima, Akira Shimatsu, Susumu Yokoya, Kazuo Chihara, Toshiaki Tanaka, Naomi Hizuka, Akira Teramoto, Ke-ita Tatsumi, Katsuhiko Tachibana, Noriyuki Katsumata, Reiko Horikawa. Standardized centile curves and reference intervals of serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) levels in a normal Japanese population using the LMS method. *Endocrine Journal* Vol. 59 (2012) No. 9 p.771-780
- 2) 巽 圭太：その他の甲状腺中毒症。(門脇孝, 下村伊一郎 編)代謝・内分泌疾患診療最新ガイドライン.総合医学社, 東京, 2012, p.222-225.
- 3) 巽 圭太：高プロラクチン血症。(平田結喜緒, 山田正三, 成瀬光栄 編)下垂体疾患診療マニュアル, 診断と治療社, 東京, 2012, p141-142.

TRHの下垂体NR4A1 (Nur77)を介する TSH β 遺伝子制御機構

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学
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学
中島 康代 群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科学

研究要旨: 視床下部TRHは下垂体からのTSHの分泌やTSH β 遺伝子の発現を制御しているがその詳細な機構は不明である。そこで、野生型とTRHノックアウトマウス(TRHKO)、さらにTRHKOに甲状腺ホルモンを補充した下垂体のcDNAマイクロアレイ解析を行い、3群間でK-means クラスタ解析を行った。その結果、下垂体で発現している約15,000遺伝子の内、最も強くTRHにより刺激され、さらに甲状腺ホルモンにより抑制される遺伝子は唯一TSH β 遺伝子であり、TRHのTSH β への極めて強い特異性が示された。また、TSH β 遺伝子と同じクラスターに所属する遺伝子としてNR4A1があった。免疫組織化学的検討にてNR4A1はTRHKO下垂体においてTSH産生細胞特異的に発現が低下し、in vitroの系でTRHはERK1/2並びにPKC経路を介し、1時間でNR4A1mRNAを約50倍に増加させた。さらに、TRHはNR4A1遺伝子プロモーター活性を増加させ、NR4A1はTSH β 遺伝子プロモーターを刺激した。以上より、NR4A1は、CRH-ACTH-副腎系やGnRH-ゴナドトロピン系ばかりでなく、視床下部-下垂体-甲状腺系でも重要な役割をしていることが明らかとなった。

A. 研究目的

TRHは最初の視床下部ホルモンとして単離され、下垂体からのTSH分泌刺激やTSH遺伝子発現を調節しているが、その制御機構の詳細は未だ明らかでない。本研究では、TRHノックアウトマウス(TRHKO)を種々の甲状腺状態に暴露しTRHの意義を明らかとし、さらに下垂体におけるcDNAマイクロアレイとクラスタ解析を用い、TRHのTSH遺伝子発現を制御する因子を網羅的に探索した。

B. 研究方法

1) 野生型マウスとTRHKOを甲状腺摘出や種々の濃度の甲状腺ホルモン(T4)を補充し、血清TSH値と下垂体TSH β mRNAレ

ベルをReal-time PCRにて測定した。

- 2) 野生型とTRHKO、そして甲状腺ホルモンを補充したTRHKOの下垂体からmRNAを抽出しマイクロアレイaffymetrix社製(Gene chip 320, 2.0Array)にて約45,000クロンの遺伝子発現の変化を観察した。そしてこの3群間をK-means法によりクラスタ解析することにより、TRH依存性遺伝子群と甲状腺ホルモン依存性遺伝子群を同定し、検索された遺伝子をReal-time PCRにて確認した。
- 3) 野生型およびTRHKOの下垂体におけるNR4A1とTSHやACTHの発現を免疫組織化学染色にて検討した。
- 4) 下垂体細胞株GH4C1を用い、TRHに対する濃度と時間依存性NR4A1mRNA発現量

をReal-time PCRにて検討した。さらに各種シグナル伝達系阻害剤を用い、TRHのNR4A1mRNA発現刺激への効果を検討した。

- 5) サル腎癌細胞CV-1を用い、NR4A1を強制発現させTSH β 遺伝子プロモーター活性への影響を検討した。
- 6) GH4C1細胞並びにCV-1細胞にTRH受容体を強制発現させ、TRHによるNR4A1遺伝子プロモーター活性への影響を検討した。

C. 研究結果

- 1) 野生型マウスとTRHKOで血清FT4値と下垂体TSH β mRNA量は負の相関を認めたが、TRHKOではその応答性が低下していた(図1)。
- 2) 解析した45,101クローンの内、甲状腺ホルモンにより抑制的かつTRH依存性に最も大きく変化する遺伝子は、TSH β 遺伝子で、(TRHKOで野生型の63%、甲状腺ホルモン補充群でさらに9%にmRNA発現が減少)TRHが下垂体に発現している遺伝子の中で、TSH遺伝子に極めて強い特異性があることが判明した。そして、同一のクラスターに所属しTRH依存性の遺伝子にオーファン核内受容体であるNR4A1遺伝子を発見した(図2)。
- 3) NR4A1は下垂体前葉に細胞核に発現を認めたが、野生型と比較しTRHKOではTSH陽性細胞数が減少するが、TSH陽性細胞においてNR4A1の発現が特異的に減少していた(図3)。
- 4) 下垂体細胞株GH4C1細胞において1 nM TRHはNR4A1mRNAを1時間で約50倍にも増加させ、この変化は時間依存性かつ容量依存性であった(図4)。また、この増

加はPKAやCaチャンネル阻害剤では阻害されず、PKCとMAPK阻害剤で有意に阻害された(図5)。

- 5) TSH β 遺伝子プロモーター発現には、Pit1並びにGATA2の発現が必要だが、NR4A1を発現させることによりその活性は容量依存性に増加した(図6)。
- 6) NR4A1遺伝子プロモーターをクローニングしGH4C1細胞でその活性を検討すると、TRHの添加によりその活性は有意に増加した(図7)。また、TRH受容体のないCV-1細胞でその活性化は認められず、TRH受容体を強制発現することによりTRHに対する反応を認めた(図7)。

D. 考察

TRHは下垂体からのTSHの分泌やTSH β 遺伝子の発現も刺激しており、そのシグナル伝達経路としてこれまでMAPK経路やPKC経路の重要性が報告されている。しかし、その下流にある因子についてはこれまでPit1やGATA2を介する系が報告されているが、その詳細は不明であった。

cDNAマイクロアレイ解析とクラスター解析によりTRH依存性遺伝子として明らかになったNR4A1はearly-response geneのひとつでオーファン核内受容体であり、種々の刺激に対してmRNAが急増することが報告されている。NR4A1は、これまでCRH-ACTH-副腎系やGnRH-ゴナドトロピン系でのNR4A1の重要性に関する報告は多いが、視床下部-下垂体-甲状腺系での報告はなかった。

今回TRHKOの免疫組織化学的検討にて、NR4A1はTRHKO下垂体においてTSH産生細胞特異的に発現が低下していることが判明し、さらに*in vitro*の系でTRHはERK1/2並

びにPKC経路を介し1時間でNR4A1mRNAを約50倍に増加させた。また、TRHはNR4A1遺伝子プロモーター活性を刺激し、NR4A1はTSH β 遺伝子プロモーターを刺激した。以上より、NR4A1は、TRHの下流においてTSH β 遺伝子発現に関与し、CRH-ACTH-副腎系やGnRH-ゴナドトロピン系ばかりでなく、視床下部-下垂体-甲状腺系でも重要な役割をしていることが明らかとなった。

E. 結論

TRHはNR4A1を介して下垂体TSH β 遺伝子発現を制御している。NR4A1は、CRH-ACTH-副腎系やGnRH-ゴナドトロピン系ばかりでなく、視床下部-下垂体-甲状腺系でも重要な役割をしている。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nakajima Y, Yamada M, Taguchi R, Shibusawa N, Ozawa A, Tomaru T, Hashimoto K, Saito T, Tsuchiya T, Okada S, Satoh T, and Mori M. NR4A1 (Nur77) mediates thyrotropin-releasing hormone-induced stimulation of transcription of the thyrotropin β gene: analysis of TRH knockout mice. PLoS One 7: e40437, 2012.

2. 学会発表

1) 山田正信, 中島康代, 田口 亮, 森 昌朋. 下垂体の機能調節に関わる新規分子の解明 TRHノックアウトマウスを用いた新たな生理活性経路の探索. 第89回日本生理学会大会, 2012年3月 松本, 2012

(シンポジウム)

- 2) 田口 亮, 山田正信, 橋田 哲, 登丸琢也, 石井角保, 小澤厚志, 渋谷信行, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 三輪秀樹, 柳川右千夫, 森 昌朋. TRHノックアウトマウスは新規環境に対する不安感受性が増強し協調性運動障害を示す. 第39回日本神経内分泌学会, 2012年9月, 北九州市
- 3) 渋谷信行, 田口 亮, 登丸琢也, 石井角保, 小澤厚志, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 山田正信, 森 昌朋. 甲状腺刺激ホルモン放出ホルモンによる膵島FGF21遺伝子発現調節機構. 第55回日本甲状腺学会, 2012年11月, 福岡
- 4) 山田正信, 中島康代, 渋谷信行, 田口 亮, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 森 昌朋. 下垂体NR4A1 (Nur77)を介する視床下部-下垂体-甲状腺系のエネルギー代謝調節機構. 第55回日本甲状腺学会, 2012年11月, 福岡
- 5) 渋谷信行, 田口 亮, 登丸琢也, 石井角保, 小澤厚志, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 山田正信, 森 昌朋. 甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン(TRH)による膵島FGF21遺伝子発現調節. 第33回日本肥満学会, 2012年10月, 京都
- 6) 山田正信, 渋谷信行, 田口 亮, 中島康代, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 森 昌朋. 下垂体NR4A1 (Nur77)を介する視床下部-下垂体-甲状腺系のエネルギー代謝調節機構. 第33回日本肥満学会, 2012年10月, 京都
- 7) 渋谷信行(群馬大学 大学院医学系研究科病態制御内科), 田口 亮, Garay Jennifer, 小澤厚志, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 山田正信, 森 昌朋. 膵臓ランゲルハンス島におけるTRHによるFibroblast Growth

Factor 21 遺伝子発現調節と機能. 第85回日本内分泌学会学術総会, 2012年4月19日, 名古屋

8) 田口 亮(群馬大学 大学院医学系研究科病態制御内科学), 山田正信, 小澤厚志, 渋沢信行, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 三輪秀樹, 柳川右千夫, 森 昌朋. TRHノックアウトマウスは新規環境に対する不安感受性が亢進し協調性運動障害を示す. 第85回日本内分泌学会学術総会, 2012年4月, 名古屋

9) 山田正信, 田口 亮, 堀口和彦, 中島康代, 佐藤哲郎, 橋本貢士, 山崎勇一, 柿

崎 暁, 登坂雅彦, 好本裕平, 山田正三, 森 昌朋. 下垂体前葉疾患の研究の進歩 潜在性内分泌代謝病をリードする甲状腺機能異常の多様性. 第85回日本内分泌学会学術総会, 2012年4月, 名古屋

10) 渋沢信行, Garay Jennifer, 小澤厚志, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 山田正信, 森 昌朋. TRHによる膵臓β細胞FGF21遺伝子発現調節. 第85回日本内分泌学会学術総会, 2012年4月, 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

図1

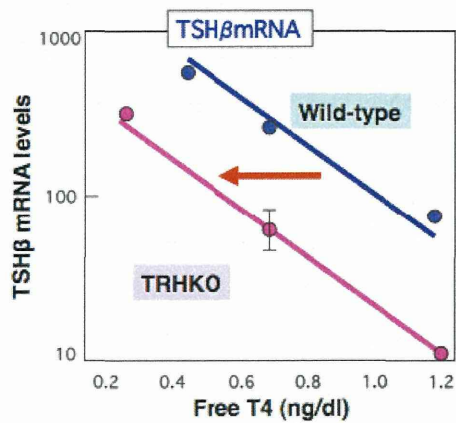


図2

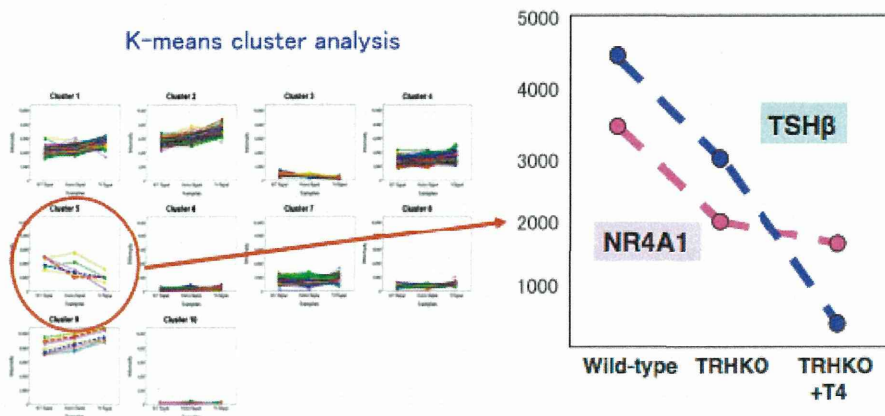


图 3

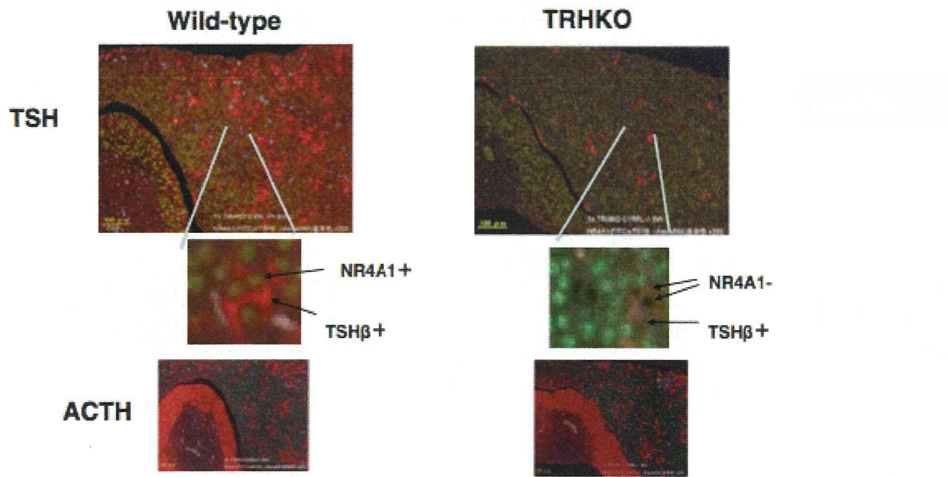


图 4

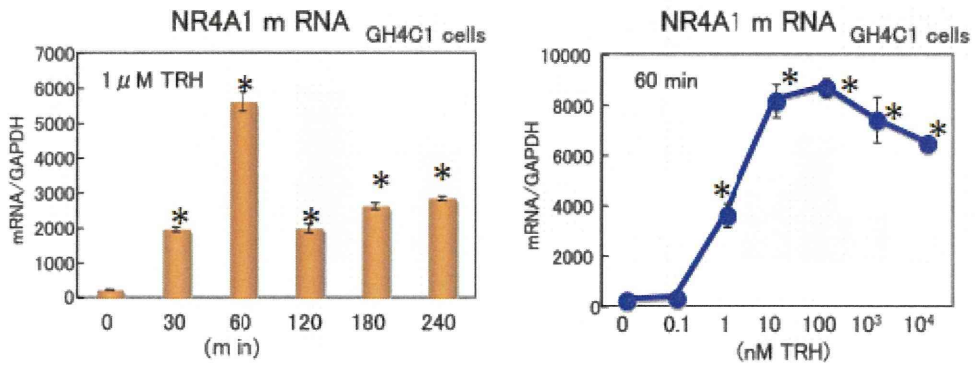


图 5

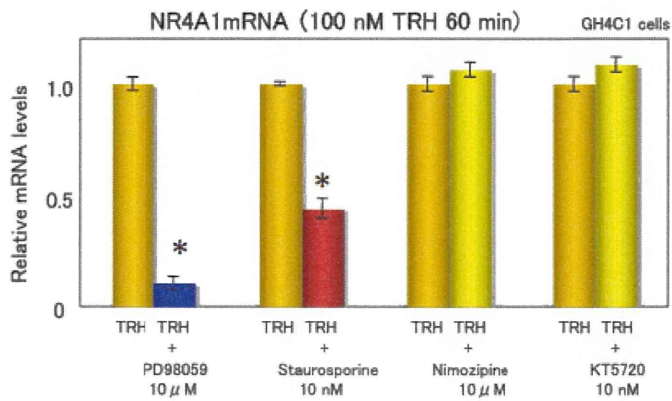


图 6

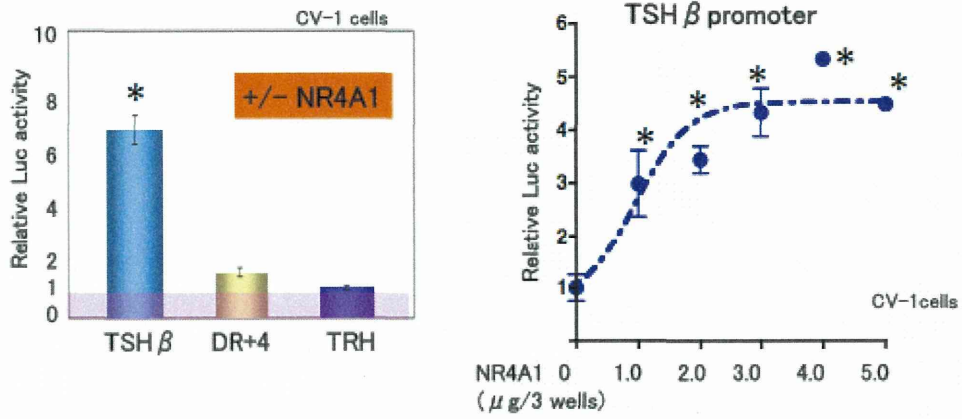
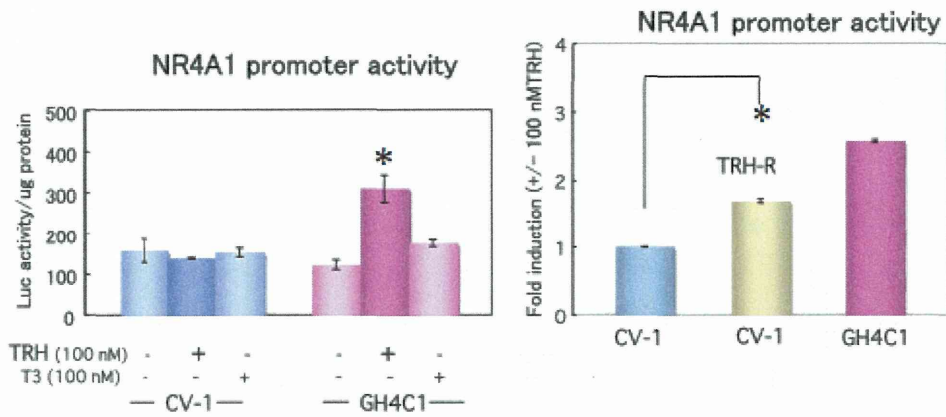


图 7



GH測定の標準化と測定値の補正に関する研究

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
研究協力者	横谷 進	国立成育医療研究センター生体防御系内科部
	田中 敏章	田中成長クリニック
	肥塚 直美	東京女子医科大学医学部第二内科
	巽 圭太	宝塚大学看護部
	立花 克彦	日本ケミカルリサーチ株式会社開発本部先端医療開発部
	堀川 玲子	国立成育医療研究センター生体防御系内科部内分泌・代謝科
	勝又 規行	国立成育医療研究センター研究所分子内分泌研究部基礎内分泌研究室

研究要旨：GHは、歴史的に放射性同位元素(RI)を用いたポリクローナル抗体によるRIAによって測定されたが、モノクローナル抗体による非RI測定が主流となり、測定時間の短縮・検体量の少量化・測定感度にすぐれた全自動測定キットが開発された。しかし、キット間の測定値の乖離が問題化し、2005年からリコンビナントGH較正標品による測定値の標準化が行われた。その後キット間差の問題が再び顕在化したため、臨床検体(n=100)を用い5種類の市販GH測定キット[GHキット「第一」(株式会社ティエフビー：TFB)、Access hGH(ベックマン・コールター株式会社：Beckman、シーメンス・イムライズ GH II(三菱化学メディエンス株式会社：Siemens)、エクルーシス試薬hGH(ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社：Roche)、EテストTOSOH II(HGH)(東ソー株式会社:Tosoh)]間の互換性を検討した。GH値10ng/ml以下で測定値の平均を100%とすると、TFBは約120%、Rocheは約103%、Beckmanは約71%、Siemensは約97%、Tosohは約99%の値を示した。リコンビナントGH(NIBSC code98/574)の希釈系列の測定値はTFB, Roche, Beckmanのキットでほぼ一致していた。今後、ハーモナイゼーションによるキット測定値の補正を行うことが望ましい。

A. 研究目的

GH測定がポリクローナル抗体を用いた競合型ラジオイムノアッセイ(RIA)法であった時代には、測定キットにより測定値がばらつくことは比較的少なかった。しかし、モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ型測定法が登場すると、測定キットによる測定値の乖離が大きな問題となった。同一患者の同一検体であっても、どの測定キットを用いて測定したかによってその測定値が異なり、その結果、診断が異なってしまう可能性がある。こ

のため、成長科学協会ではGH・関連因子検討専門委員会が、使用する測定キットによって診断やGH治療適応判定の結果が異なることを防ぐために、平成3年度以降、各測定キットによる測定値の相関を検討し補正式を作成して用いることで対処してきた¹⁾。平成10年度以降は市販されているすべての測定キットによる測定値の平均を従属変数として線形関係式を求め、それを補正式とした²⁾。その後、測定キットによる測定値の乖離のほとんどが各キットの標準品が異なる較正標品

に準拠していることに起因すること、用いる標準品をリコンビナントGHに統一すれば測定値の乖離を大幅に減少できることが明らかとなった³⁾。このため2005年から、各キットの標準品はリコンビナントGHあるいはリコンビナントGHの校正標品⁴⁾(WHO IS98/574)に準拠したGHを用いるように変更された。これによりわが国においてGH測定値の標準化がなされたが、リコンビナントGHを標準品あるいは校正標品とした場合、測定値は従来の補正值の60%に減じたため、診断の手引きなどにおいてリコンビナントGHを標準品とした場合の判定値が改訂された⁵⁾。

この状況下でGH測定キット間の測定値の乖離は許容範囲内であったが、最近の数年間、キット間差の問題が再び顕在化したため、実臨床の検体を用いて市販のGH測定キットの互換性を検討し、リコンビナントGHの希釈直線の再検討を行った。

B. 研究方法

1. 市販GH測定キットによる臨床検体の測定値の検討

現在、日本ではGH測定キットは5種類(GHキット「第一」：株式会社ティエフビー略TFB, エクルーシス試薬hGH：ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社略Roche, Access hGH：ベックマン・コールター株式会社略Beckman, シーメンス・イムライズGH II：三菱化学メディエンス株式会社略Siemens, EテストTOSOH II (HGH)：東ソー株式会社略Tosoh)が市販されている。それぞれのキットの組み合わせで臨床検体を測定し、相互の互換性を計算した。臨床的に診断や治療適応判定で問題となるGH濃度を0～20ng/mlと仮定し、TFBによる測定値がこの範囲内にあるGH関連負荷試験の血清検体

(n=100)を検討に用いた。各キットの互換性の検討には、キットによる測定値の平均を従属変数としてDeming回帰による線形関係式を求めた。

2. NIBSC code 98/574の希釈系列の検討

WHO IS (NIBSC code 98/574)の希釈系列を作成した。GHキット「第一」、エクルーシス試薬hGH, Access hGHを用いて、各キットに付属した希釈用緩衝液にてさらに希釈し希釈直線を求めた。

C. 研究結果

表1に今回検討した国内市販GH測定キットの一覧を示す。捕捉抗体にはいずれもマウス抗GHモノクローナル抗体を用い、標識抗体にはマウスモノクローナル抗体もしくは他動物種のポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ型イムノアッセイ法である。20kGHとの交差反応性は、キットにより異なった。標準品はいずれもリコンビナントGHである校正標品(WHOIS 98/574)に準拠していたが、キット内の標準品は、リコンビナントGHもしくは下垂体由来GHを使用していた。

臨床検体を用い、TFBによる測定値(横軸)を基準とした場合の各測定キットによる測定値(縦軸)をプロットすると、図1に示すように乖離が認められた。このため各キットの互換性の検討として、キットによる測定値の平均を従属変数とした線形関係式(Deming回帰による)を求めた。図2には各測定キットの測定値(横軸)と平均GH値(縦軸)の線形関係を示した。TFBによる測定値が最も高く、次いでRoche、Tosoh、Siemensの順で、Beckmanによる測定値が最も低値であった。求められた線形関係式は表2に示した。

測定キットによる乖離の原因を探るため、Instruction for use (Version 4.0, Dated

14/01/2008) に従い国際標準品 NIBSC code 98/574 (原液 1.95mg/mL) の希釈系列を作成した。さらに実効測定濃度まで、各キットに添付された検体希釈液を用いて希釈し TFB、Roche および Beckman の各キットにて測定した (図 3)。いずれのキットにおいても希釈率から計算された理論値と実測値はほぼ一致し、キット間の乖離はみられなかった。

D. 考察

わが国では、血中 GH を測定する測定キットについて、2005 年 5 月以降リコンビナント GH に準拠した標準品を用いることにより、キットの種類による測定値の乖離が低く抑えられていた。しかし最近キット間の測定値の乖離が再び明らかとなったため、キット間の互換性について臨床検体を用いて検討した。その結果、通常の免疫学的測定法に内在する測定誤差を凌駕するキット間差が明らかとなった。一方、リコンビナント GH の国際標準品 NIBSC code 98/574 の希釈系列を用いた検討では、臨床検体で測定値の乖離が見られたキットにおいても希釈率から計算された理論値と実測値はほぼ一致していた。従って各キットの標準品は較正標品 (WHO IS 98/574) に準拠していることが再確認された。

キット間差は免疫学的検査法である限り避けられない問題である⁶⁾。測定原理の相違、使用する抗体の違い (ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体)、抗体の認識部位の特異性 (多様な GH 分子形態に対する反応の相違)、抗原抗体反応の条件 (非平衡状態または平衡状態)、いわゆるマトリックス効果 (血清添加の影響)、用いられている標準標品の違い、などが影響していると考えられる。血中の GH には分子多様性が存在する⁷⁾。正常下垂体において 22k の GH と 20kGH

が産生分泌され、さらに血中で糖化や脱アミド化などの修飾を受けている。GH の約半量は単量体で存在するが、2量体や多量体を形成することも知られている。また血中には GH 受容体の細胞外ドメインと一致する GH 結合蛋白 (GHBP) が存在する⁷⁾。通常血中 GH 濃度では約半分が GHBP に結合していると考えられている。このため、非平衡状態のまま短時間で測定する系では、用いる抗体の親和性から GHBP の干渉を受けることも知られている⁸⁾。今回のキット間差は、20kGH への交差反応性の違いのみでは説明できず、測定系に及ぼす GHBP の影響など原因を明らかにする必要がある。

我が国のみならず国際的にも GH 測定の標準化に向けた試みがなされている⁹⁾。理想的には、測定キット毎に基準値や標準値を定めるべきであろう。しかし現実の対応として、測定値の互換や補正、いわゆるハーモナイゼーション試料による解決策を考えている。実運用では、キットの種類による測定値の差をなくすため、測定キットによっては補正式を用いて補正値を算出し、この補正値を用いて診断や GH 治療適応判定を行うことが望ましい。

E. 結論

現在市販されている 5 種類の GH 測定キットの互換性を検討し、測定値の乖離を確認した。今後、ハーモナイゼーションによるキット測定値の補正を行うことが望ましい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 勝又規行, 島津 章, 立花克彦, 肥塚直美, 横谷 進, 巽 圭太, 堀川玲子, 田中敏章, 磯島 豪, 千原和夫, 寺本 明,

成長ホルモン (GH) 及び関連因子の測定に関する研究, 公益財団法人成長科学協会
平成23年度研究年報 35: 45-47, 2012年

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

参考文献

- 1) Tanaka T, Takano K, Hanew K, Nishi Y, Igarashi Y, Hirano T, Saito T, Tachibana K, Yokoya S, Fujieda K, Shimatsu A, Hizuka N, Tsushima T, Irie M. Registration system for growth hormone (GH) treatment with standardized immunoreactive GH values in Japan. *Endocr J.* 1998; 45 (4): 459-465.
- 2) Saito T, Tachibana K, Shimatsu A, Katsumata N, Hizuka N, Fujieda K, Yokoya S, Tanaka T. Standardization of blood growth hormone levels measured by different kits using a linear structural relationship. *ClinPeadiatrEndocrinol.* 2006; 15 (3): 79-84
- 3) Tanaka T, Tachibana K, Shimatsu A, Katsumata N, Tsushima T, Hizuka N, Fujieda K, Yokoya S, Irie M. A nationwide attempt to standardize growth hormone assays. *Horm Res.* 2005; 64 Suppl 2: 6-11
- 4) Bristow AF, Jespersen AM. The Second International Standard for somatropin (recombinant DNA-derived human growth hormone): preparation and calibration in an international collaborative study. *Biologicals.* 2001; 29 (2): 97-106
- 5) 島津 章. GH・IGF-I測定の変遷. *内分泌・糖尿病科*, 2006; 22 (6): 615-620
- 6) Bidlingmaier M, Freda PU. Measurement of human growth hormone by immunoassays: Current status, unsolved problems and clinical consequences. *GH IGF Res.* 2010; 20: 19-25.
- 7) Baumann G. Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants, and binding proteins, *Endocr Rev.* 1991; 12: 424-449
- 8) Jansson C, Boguszewski C, Rosberg S, Carlsson L, Albertsson-Wikland K. Growth hormone (GH) assays: influence of standard preparations, GH isoforms, assay characteristics, and GH-binding protein. *Clin Chem.* 1997; 43 (6 Pt 1): 950-956
- 9) Clemmons DR. Consensus statement on the standardization and evaluation of growth hormone and insulin-like growth factor assays. *Clin Chem.* 2011; 57: 555-559

表1. 国内市販GH測定キット

測定キット製品名	原理	捕捉抗体	標識抗体	(交差反応性		反応容量		キット標準品	承認・認証年月
				20K GH	GH-V	試料	他		
GHキット「第一」	IRMA	マウスmAb	マウスmAb	なし	なし	100μl	100μl	pGH	平成2年3月
Eテスト「TOSOH」II (HGH)	FEIA	マウスmAb	マウスmAb	なし	不明	75μl	75μl	rGH	平成18年10月
シーメンスイムライズ GH II	CLEIA	マウスmAb	ウサギpAb	63%	?	50μl	50μl	?	平成21年1月
アクセス hGH	CLEIA	マウスmAb	ヤギpAb	なし	不明	25μl	225μl	pGH	平成22年12月
エクルーシス試薬 hGH	ECLIA	マウスmAb	ヒツジpAb	75%	あり	40μl	125μl	pGH	平成23年2月

表2. 各社GH測定キットによる測定値の線形関係式

		r
TFB IRMA	$Y = 0.83 X - 0.06$	0.997
Roche ECLIA	$Y = 0.97 X + 0.03$	0.999
Beckman CLEIA	$Y = 1.41 X + 0.07$	0.997
Siemens CLEIA	$Y = 1.03 X - 0.04$	0.999
Tosoh FEIA	$Y = 1.01 X + 0.00$	0.999

図1. (TFBを基準とした)GH測定キットによる測定値

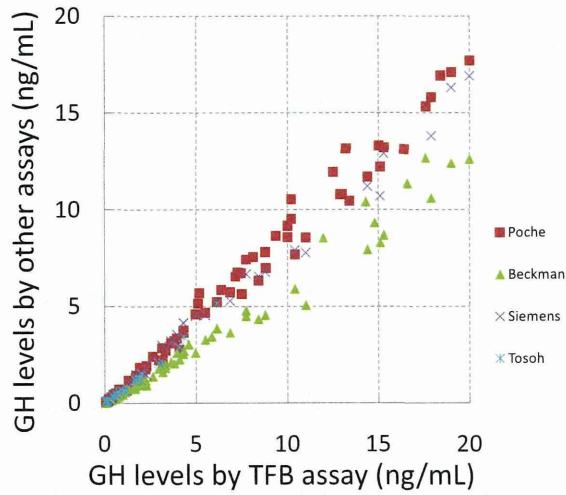


図2. 各社GH測定キットによる測定値と平均GH値との線形関係

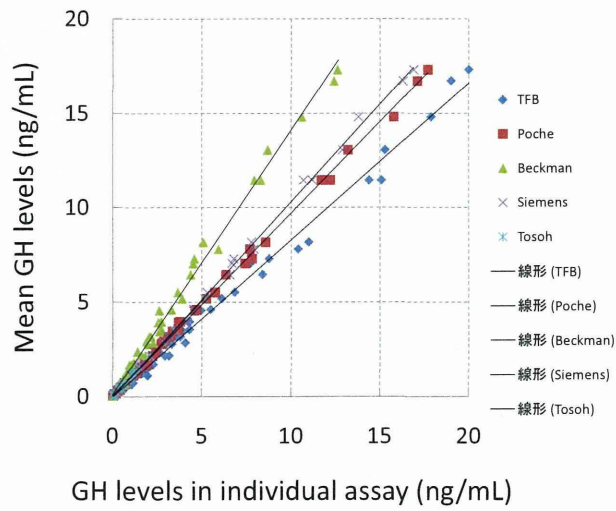


図3. NIBSC code 98/574 (1.95mg/mL)の希釈系列

