

図1. ミクロ腺腫25例(A)およびマクロ腺腫52例(B)において選択された治療と予後

C: 寛解/コントロール良好, I: コントロール不十分, P: コントロール不良

A: ミクロ腺腫

第一選択	TSS	20	SMS	2	DA	3
第二選択		DA		TSS	TSS	SMS
						TSS
						DA

n	18	2	1	1	2	1
C	18	1		1	2	1
I		1				
P			1			
Total	18	2	1	1	2	1

B: マクロ腺腫

第一選択	TSS	42				SMS	5			DA	5	
第二選択		DA		SMS	γ		TSS	DA		TSS	SMS	
第三選択			γ		SMS			TSS			TSS	

n	34	4	1	2	1	1	1	3	1	3	1
C	30	3	1	1	1	1	1	3		2	1
I	3									1	
P	1	1		1					1		
計	34	4	1	2	1	1	1	3	1	3	1

図2. 腺腫の進展度とTSSを含む集学的治療による寛解率

		側 方 進 展				
		0	1	2	3	4
上 方 進 展	0	100 (12/12)	90 (9/10)	80 (4/5)	-	-
	1	100 (7/7)	94 (16/17)	100 (5/5)	-	50 (1/2)
	2	-	86 (6/7)	100 (2/2)	100 (1/1)	67 (2/3)
	3	-	-	100 (1/1)	-	-
	腫瘍浸潤度不明	2				
	Total	100 (19/19)	91 (31/34)	92 (12/13)		67 (4/6)

成人GH分泌不全症におけるNAFLD/NASHの意義と その発症機序

研究分担者 高橋 裕 神戸大学大学院医学研究科糖尿病・内分泌内科学

研究要旨：成人GH分泌不全症(AGHD)とNAFLD/NASHの関連、発症機序、臨床応用の可能性を明らかにするために以下の研究を行った。66例のAGHD患者を対象に、年齢、性別、BMIをマッチさせた83例の健常コントロールと比較したところ、AGHD群ではNAFLD、NASHの合併頻度がそれぞれ77%(コントロールの6.4倍)、21%と上昇しており、GH補充療法によって改善した。この結果よりNAFLDがAGHDにおいて肥満と独立して合併していることが示唆された。動物実験によってGHはIGF-Iを介して酸化ストレス、ミトコンドリア機能、線維化を調節する星細胞機能を制御すること、さらにIGF-Iが一般のNASHモデル動物の線維化を改善することが明らかになった。これらの結果は、GH/IGF-I系の肝臓における本質的な役割とNAFLD/NASHがAGHDに伴う代謝異常の重要な表現型のひとつであることを示している。

A. 研究目的

近年、特定疾患に指定されている下垂体機能低下症にしばしば伴う成人GH分泌不全症(AGHD)において、非アルコール性脂肪肝(NAFLD)/非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)が高頻度に合併する可能性が示唆されているが、その実態については不明である。本研究においては、臨床および基礎的検討を通じてその病態を明らかにし、AGHDにおけるGH補充療法の新たな意義の解明と予後の改善を目指す。またモデル動物を用いた実験によってGHの作用機序を明らかにし、臨床応用についての基礎的検討を行う。分担研究者らは以前よりAGHDにおける肝障害に注目しAGHDにおけるNASHがGH補充療法によって著明に改善した症例を報告しており(Takahashi et al. Gastroenterology 2007)、本研究ではさらに発展させて疫学的な臨床研究と動物実験による機序の解明と臨床応用をめざす。

B. 研究方法

神戸大学医学部附属病院通院中の成人GH分泌不全を合併した汎下垂体機能低下症例(AGHD)を対象に腹部エコーによるNAFLDの有無、年齢、性別、原因疾患、罹患歴、体重、BMI、内臓脂肪、糖脂質代謝、肝機能、炎症、線維化マーカーなどNAFLD発症に関連した因子について解析した。さらにGH補充群においてはNAFLD関連因子に対する治療効果についても解析を行った。基礎研究として、GH欠損ラット(Spontaneous dwarf rat)、一般のNASHモデルマウス(コリン、メチオニン欠乏食負荷 db/db マウス)に対するGHあるいはIGF-I投与を行い、肝臓における作用およびその機序を解析するとともに、臨床応用を目指した基礎的検討を行った。

(倫理面での配慮)

本研究計画の実施に際して臨床検体を使用する場合には、患者からインフォームドコンセントを得た上で神戸大学医学部倫理委員会

の規約に基づいて研究を実施した。患者の個人情報機関外に漏洩しないよう資料や解析データは厳重に管理している。また成果のとりまとめを行い、内外の学会や学術雑誌に積極的に研究成果の発表を行ったが、発表に際しては個人情報漏洩することがないように、また患者や家族に不利益が生じないように十分配慮した。なお本研究計画に基づき実施する遺伝子組換え実験は、神戸大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得たものであり、カルタヘナ法に則して神戸大学遺伝子組換え実験実施規則に基づき、これを遵守して行った。また、動物実験においては学内の動物実験倫理委員会の承認を得た上で、学内規則に則り動物愛護の精神を持って行った。

C. 研究成果

69例のAGHD患者よりウイルス性あるいは自己免疫性肝炎を除外した66例を対象に、健常コントロール1994例から年齢、性別、BMIをマッチさせた83例と比較したところ、AGHD群ではNAFLD、NASHの合併頻度がそれぞれ77%（コントロール（12%）の6.4倍）、21%（一般人口では1-2%）と著明に上昇していた。そして6-12ヶ月のGH補充療法によって肝機能、線維化マーカーの改善、治療前後で肝生検によって確認出来た5症例においては、NAFLD activity score (NAS)においても有意な組織学的改善を認めた(Nishizawa et al. EJE 2012)。その機序を明らかにするためにGH欠損ラットを用いて解析を行ったところ内臓肥満とともにNASHを認め、肝細胞における酸化ストレス上昇、ミトコンドリア形態異常を伴っていた。そして1ヶ月のGHあるいはIGF-I投与を行ったところいずれにおいても生化学的、組織的改善を認めた(Nishizawa et al BBRC 2012)。

さらに一般のNASHモデル動物であるコリン、メチオニン欠乏食負荷 *db/db* マウスに対して1ヶ月のGHあるいはIGF-I投与の効果解析した結果、IGF-I投与によって脂肪滴の沈着および線維化についての組織学的改善を認め、酸化ストレス、ミトコンドリア機能の改善が関連していた。さらに線維化抑制機序について、*in vitro* および *in vivo* で解析を進め、IGF-Iが線維化の鍵である星細胞の細胞老化を促進することにより活性を抑制し、線維化を改善していることが明らかとなった(Anastasia et al. BBRC 2012, Takahashi EJ (Review) 2012, Nishizawa et al. manuscript in preparation)。

D. 考察

今回AGHDにおいて、肥満と独立してNAFLD合併頻度が増加していることが明らかになった。さらに炎症、線維化を伴ったNASHも高頻度に合併していた。これらの結果はAGHDにおいて認められる肥満を介した二次的な結果だけではなく、GH/IGF-Iが肝臓において重要な役割を果たしていることを示唆している。また臨床的には、AGHDに伴う代謝異常として内臓肥満に関連して脂質、糖代謝異常が増加することが知られているが、NAFLD/NASHも重要な合併症であることを示した。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、今回の結果によって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ことを明らかになった。GH/

IGF-IによるNAFLD/NASH改善機序には以下のものが考えられる。①GHによる内臓脂肪減少作用による間接的な効果、②IGF-Iによるインスリン抵抗性改善、③IGF-Iによる肝細胞における酸化ストレス低下およびミトコンドリア機能改善、④IGF-Iによる星細胞の細胞老化誘導と活性の低下作用など複数の機序によって肝臓において作用していると考えられた(Takahashi et al. EJ (Review) 2012)。

また今回の実験において、GH/IGF-Iが、AGHDに合併したNASHのみならず、一般のNASHモデルにおいても改善効果、特に線維化抑制を示すことを明らかにした。NASHにおいては線維化が予後不良と関連していることから、IGF-Iによる線維化改善を目指した一般のNASHに対する治療応用は、NASHの予後を改善するために貢献できる可能性がある。

E. 結論

今回の結果は、GH/IGF-Iが肝臓において重要な役割を果たしていること、NAFLD/NASHがAGHDに伴う代謝異常の重要な表現型のひとつであること、さらにIGF-Iが一般のNASH治療で有用である可能性が示された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

《著書》

- 1) 高橋 裕：代謝・内分泌疾患診療最新ガイドライン 成人GH分泌不全症. 総合医学社 183-186, 2012
- 2) 高橋 裕：下垂体診療マニュアル 成長ホルモン. 診断と治療社 39-41, 2012
- 3) 高橋 裕：下垂体診療マニュアル 先端巨大症. 診断と治療社 120-123, 2012
- 4) 高橋 裕：下垂体診療マニュアル 成人GH分泌不全症. 診断と治療社 128-130, 2012
- 5) 高橋 裕：下垂体診療マニュアル ドーパミンアゴニストと心臓弁膜症. 診断と治療社 258-259, 2012
- 6) 井口元三, 高橋 裕：下垂体診療マニュアル 抗PIT-1抗体症候群 診断と治療社 185, 2012
- 7) 井口元三, 高橋 裕：下垂体診療マニュアル 下垂体の転写因子. 診断と治療社 20-21, 2012
- 8) 井口元三, 高橋 裕：下垂体診療マニュアル 下垂体茎断裂症候群. 診断と治療社 195-196, 2012
- 9) 高橋 裕：下垂体診療マニュアル 特定疾患治療研究事業の対象7疾患の概略. 診断と治療社 41, 2012
- 10) 高橋 裕：症例に学ぶNASH/NAFLDの診断と治療：成人成長ホルモン分泌不全症にNASHが合併し成長ホルモンが著効した症例. 診断と治療社 172-174, 2012
- 11) 高橋 裕：アクロメガリーハンドブック、アクロメガリーの病態とGH, IGF-I過剰. メディカルレビュー社 2012, in press
- 12) 高橋 裕：糖尿病代謝疾患の分子標的と治療薬事典 D2 ドーパミン受容体作動薬. 羊土社 2012, in press
- 13) 高橋 裕：内分泌代謝専門医ガイドブック 成長ホルモン分泌不全性低身長症. 診断と治療社 96-99, 2012
- 14) 高橋 裕：内分泌代謝専門医ガイドブック 特定疾患の現状. 診断と治療社 395-396, 2012

- 15) 高橋 裕：医学大事典 成人成長ホルモン分泌不全症. 南江堂 2012, in press
- 16) 高橋 裕：医学大事典 成長ホルモン単独欠損症. 南江堂 2012, in press
- 17) 医学大事典 下垂体前葉ホルモン単独欠損症. 南江堂 2012, in press
- 18) 高橋 裕：医学大事典 ラローン型低身長症. 南江堂 2012, in press
- 《英文論文》
- 1) Nishizawa S, Handayaningsih AE, Iguchi G, Cho Y, Takahashi M, Yamamoto M, Suda K, Kasahara K, Fumihiko H, Yamanouchi K, Nishihara M, Seino S, Takahashi SI, Takahashi Y. Enhanced oxidative stress in GH-transgenic rat and acromegaly in humans. *Growth Hormone and IGF-I Research* 22: 64-68, 2012
- 2) Yamamoto M, Iguchi G, Fukuoka H, Miyako K, Takahashi Y. Growth hormone deficiency in two siblings associated with combined GH1 gene polymorphisms. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 120: 1-3, 2012
- 3) Nishizawa H, Iguchi G, Murawaki A, Fukuoka H, Hayashi H, Kaji H, Yamamoto M, Suda K, Takahashi M, Seo Y, Yano Y, Kitazawa R, Kitazawa S, Koga M, Okimura Y, Chihara K, Takahashi Y. Nonalcoholic fatty liver disease in adult hypopituitary patient with growth hormone deficiency and the impact of growth hormone replacement therapy. *Eur J Endocrinol* 167: 67-74, 2012
- 4) Nishizawa H, Takahashi M, Fukuoka H, Iguchi G, Kitazawa R, Takahashi Y. GH-independent IGF-I action is essential to prevent the development of nonalcoholic steatohepatitis in a GH-deficient rat model. *Biochem Biophys Res Commun* 423: 295-300, 2012
- 5) Hashimoto N, Yokoi N, Komada H, Matsuda T, Hirota Y, Sakaguchi K, Takahashi Y, Ogawa W, Seino S. A case of type A insulin resistance associated with heterozygous Asn462Ser mutation of the insulin receptor gene. *Diabetology Internastional* 3: 239-243, 2012
- 6) Takahashi M, Inomata S, Okimura Y, Iguchi G, Fukuoka H, Miyake K, Koga D, Akamatsu S, Kasuga M, Takahashi Y. Decreased serum chemerin levels in male Japanese patients with type 2 diabetes: sex dimorphism. *Endocrine J* 60: 37-44, 2012
- 7) Handayaningshi AE, Takahashi M, Fukuoka H, Iguchi G, Nishizawa H, Yamamoto M, Suda K, Takahashi Y. IGF-I enhances cellular senescence via the reactive oxygen species-p53 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 425: 478-84, 2012
- 8) Maki T, Yamamoto D, Nakanishi S, Iida K, Iguchi G, Takahashi Y, Kaji H, Chihara K, Okimura Y. Branched-chain amino acids reduce hindlimb suspension-induced muscle atrophy and protein levels of atrogen-1 and MuRF1 in rats. *Nutr Res* 32: 676-83, 2012
- 9) Taniguchi M, Nishihara M, Sasayama T, Takahashi Y, Kohmura E. A rapidly expanding immature teratoma originating from a neurohypophyseal germinoma. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2012 Oct 29. doi: 10.1111/nan.12000. [Epub ahead of print]
- 10) Nishizawa H, Fukuoka H, Iguchi G, Inoshita N, Yamada S, Takahashi Y. AIP mutation identified in a patient

with acromegaly caused by pituitary somatotroph adenoma with neuronal choristoma. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 2012, z in press.

- 11) Suda K, Inoshita N, Iguchi G, Fukuoka H, Takahashi M, Nishizawa H, Yamamoto M, Yamada S, Takahashi Y. Efficacy of combined octreotide and cabergoline treatment in patients with acromegaly: a retrospective clinical study and review of the literature. *Endocrine J* 2013 Jan 5. [Epub ahead of print].
- 12) Sumida Y, Naito Y, Hashimoto E, Aoi W, Takahashi Y, Yonei Y, Yoshikawa T. Science of nonalcoholic fatty liver disease in Anti-Aging Medicine. *Anti-Aging Medicine* 9: 24-33, 2012 (Review).
- 13) Takahashi Y. Essential roles of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) in the liver. *Endocrine J* 59: 955-962, 2012 (Review).
- 14) Takahashi Y. The regulation of aging and cellular senescence by IGF-I. *Anti-Aging Medicine* 9: 174-179, 2012 (Review).

《和文論文》

- 1) 高橋 裕：先端巨大症（総説）。今日の臨床サポート 2012, in press
- 2) 高橋 裕：小児内分泌疾患のトランジション（総説）。小児科診療 75: 477-482, 2012
- 3) 高橋 裕：症例に学ぶNASH/NAFLDの診断と治療：成人成長ホルモン分泌不全症にNASHが合併し成長ホルモンが著効した症例 診断と治療, 別冊 171-174, 2012
- 4) 高橋 裕：自己抗体研究の新展開：内分泌領域の自己抗体研究の進歩（総説）。臨床化学 41: 5-8, 2012
- 5) 高橋 裕：内分泌疾患－疑うヒントと専門医へ紹介するポイント－先端巨大症（総説）。診断と治療 100: 1103-1107, 2012
- 6) 高橋 裕, 井口元三：知っておきたい内科症候群, 抗PIT-1抗体症候群（総説）。内科 6: 1333-1334, 2012
- 7) 高橋 裕, 山本雅昭, 井口元三：新たな疾患概念「抗PIT-1抗体症候群」。バイオクリニカ 27: 87-90, 2012
- 8) 島津 章, 香川二郎, 都 研一, 高橋裕, 堀川玲子, 高野幸路, 中村明枝, 沼倉周彦, 北中幸子, 長崎啓祐, 河野 斉, 西 美和：小児期から成人期へ：GH分泌不全症の移行期診療を考える。内分泌・糖尿病・代謝内科 2012, in press
- 9) 高橋 裕：成人GH分泌不全症 からの科学 275: 27-30, 2012

2. 学会発表

《国際学会》

- 1) Fukuoka H, Iguchi G, Suda K, Yamamoto M, Nishizawa H, Takahashi M, Seino S, Yamada S, Takahashi Y. A novel missense mutation of AIP gene in a patient with octreotide-resistant non-familial gigantism. The 94th Annual Meeting of the Endocrine Society 2012
- 2) Suda K, Iguchi G, Fukuoka H, Yamamoto M, Nishizawa H, Takahashi M, Seino S, Takahashi Y. SOCS2 missense mutation identified in a patient with gigantism without GH producing pituitary tumor. The 6th international congress of the GRS and the IGF society 2012
- 3) Nishizawa H, Iguchi G, Fukuoka H, Suda K, Yamamoto M, Takahashi M, Seino S, Takahashi Y. IGF-I prevents the development of hepatic fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis via regulating oxidative stress

and inactivating the hepatic stellate cells.
The 6th international congress of the GRS
and the IGF society 2012

- 4) Yamamoto M, Iguchi G, Fukuoka H, Takahashi M, Nishizawa H, Suda K, Seino S, Takahashi Y. Sirt1 negatively regulates IGF-I production by growth hormone via deacetylation of Stat5 in liver. The 6th international congress of the GRS and the IGF society 2012

《国内学会》

- 1) 高橋 裕：成長ホルモン、IGF-Iの肝臓における新たな作用と治療応用(シンポジウム)。第85回日本内分泌学会学術総会, 2012
- 2) 高橋 裕：生命を育む下垂体ホルモン(市民公開講座)。第85回日本内分泌学会学術総会, 2012
- 3) 高橋 裕：新規アディポカイン、ケマリンの発見と病態生理学的意義の解明(基調講演)。第9回GPCR研究会, 2012
- 4) 高橋 裕：インスリン様増殖因子(IGF-I)による寿命制御機構の解明－IGF-Iは酸化ストレスを介して細胞老化を促進する－(研究奨励賞受賞講演)。第12回日本抗加齢医学会総会, 2012
- 5) 高橋 裕：非アルコール性脂肪性肝炎の新たなメカニズム－GH,IGF-Iの役割－(特別講演)。糖尿病治療 UP TO DATE, 2012
- 6) 高橋 裕：先端巨大症の最新のトピックス(特別講演)。第8回間脳下垂体疾患症例検討会, 2012
- 7) 高橋 裕, 坂東弘教, 山本雅昭, 井口元三：抗PIT-1抗体症候群-その後の展開(シンポジウム)。第39回日本神経内分泌学会学術集会, 2012
- 8) 高橋 裕, 肥塚直美, 島津 章：特別企画：薬物療法の現況と展望(パネルディスカッション)。第8回アクロメガリーフォーラム, 2012
- 9) 高橋 裕：下垂体機能低下症をきたす新たな疾患概念 抗PIT-1抗体症候群(特別講演)。第10回北関東間脳下垂体疾患研究会, 2012
- 10) 高橋 裕：ホルモンは何のためにあるのか、内分泌の病気とは何か(特別講義)。宮崎大学医学部, 2012
- 11) 高橋 裕：成人GH分泌不全症の新たな合併症－NAFLD/NASH－(特別講演)。インターネット動画講演会 Lilly Streaming TV, 2012
- 12) 高橋 裕：成長ホルモン、IGF-Iの肝臓における新たな作用と治療応用(特別講演)。成人GH分泌不全症&代謝調節研究会, 2012
- 13) 高橋 裕, 西沢 衡, 福岡秀規, 井口元三：成人GH分泌不全症におけるNAFLD/NASHの意義とその発症機序(厚労省班会議)。間脳下垂体機能障害に関する調査研究(難治性疾患克服研究事業班会議), 2012
- 14) 高橋 裕：診断治療に難渋した症例、下垂体(コメンテーター)。第22回臨床内分泌代謝 Update, 2013
- 15) 高橋 裕：NAFLD/NASH発症の新たな機序：成長ホルモン/IGF-Iの役割(特別講演)。臨床肝臓病研究会, 2013
- 16) 高橋 裕：健やかに生きるために大切な下垂体の役割とその病気(特別講演)。平成24年度堺市難病患者支援センター間脳下垂体機能障害学習会, 2013
- 17) 高橋 裕：サブクリニカル機能性下垂体腺腫の病態(教育講演)。第23回日本間

脳下垂体腫瘍学会，2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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 中枢性思春期早発症及び成長ホルモン分泌不全性低身長症 診断と治療の手引H24年度改訂に向けて適正化に関する研究

研究分担者 横谷 進 国立成育医療研究センター生体防御系内科部
研究協力者 堀川 玲子 国立成育医療研究センター内分泌代謝科

研究要旨:中枢性思春期早発症(CPP)、および成長ホルモン分泌不全性低身長症(GHD)の診断と治療の手引きは、広く診療に使用されている。一般的に「診療の手引き」は、医学的にエビデンスレベルの高いデータを基として、診断の確定と治療方針の策定の基準となるものである。しかし、日常診療では、医療の社会的側面を加味する必要があり、また高いエビデンスレベルを求めることが困難な疾患・状況がある。そこで、今年度の研究では、本研究班で策定されたCPPとGHDの診断と治療の手引きについて、問題点を検討した。また、GHDでは思春期における基準値の問題を検討した。

- 1) CPPについて: CPPは、生理的範囲の思春期早発傾向と連続したスペクトラム上に存在する。思春期発来年齢の明確な生活年齢では診断の手引きには合わないが、低身長にて二次性徴が発来し、成人身長著しい低下を来す症例への対処が問題となる。
- 2) GHDについて: 身長が標準範囲にあるような器質性疾患によるGHDにおいては、成長率が-1.5SD以下に低下している状態が2年以上にわたり持続することが条件となっているため、2年間はGH欠乏状態に置かれることになる。腫瘍性疾患の再発の問題もあるが、GHの成長促進及び代謝に対する作用を考慮すると、2年間の規定は必ずしも妥当とは言えない。
- 3) トランジション期のGH分泌負荷試験基準値: 小児期にGHDと診断された12例について、二次性徴発来(ホルモン補充療法も含む)以降にGH分泌能を再検した。重症GHD7例中7例で重症GHDを、中等度GHD5例中4例で正常反応を認めた。GHRP2負荷試験の頂値について、症例を増やして検討していく。

A. 研究目的

中枢性思春期早発症(CPP)、および成長ホルモン分泌不全性低身長症(GHD)の診断と治療の手引きは、広く診療に使用されている。一般的に「診療の手引き」は、医学的にエビデンスレベルの高いデータを基として、診断の確定と治療方針の策定の基準となるものである。しかし、日常診療では、医療の社会的側面を加味する必要があり、また高いエビデンスレベルを

求めることが困難な疾患・状況がある。

今年度の本研究では、以上の状況を踏まえ、本研究班で策定されたCPPとGHDの診断と治療の手引きの適正化を図ることを目的とし、これらについて、問題点を検討した。

内因性GH分泌は、乳児期に高値で小児期に一定したのち思春期に再上昇、成人期には徐々に低下する。GH分泌の指標でもあるIGF-Iは、思春期に最も高値となる。思春期年齢にお

けるGH分泌刺激試験の標準値は、内因性GHの上昇を考慮すると、小児期より上昇する可能性が考えられる。重症GHDと診断された小児においても、思春期に刺激試験に対する反応が改善することが報告されており、一過性のGHD以外にGH分泌不全の永続的に改善が見込まれない症例が、非GHDと判断されてしまう可能性が指摘されている。そこで昨年度に引き続き、小児期にGHDと診断され思春期・成人期に達した症例において、思春期以降のGH分泌能評価の問題点を明らかにすることを目的とし、小児期診断時の重症度と思春期・成人期におけるGH反応性の関連を検討した。

B. 研究方法

1. CPPとGHD診断と治療の手引きの検討

日本小児内分泌学会成長ホルモン委員会等において、小児内分泌専門医ら実際の臨床現場で診断と治療の手引きを使用している医師の指摘を集約し、実際の症例に基づいて検討した。

2. 思春期におけるGHDの診断に関する研究

【対象】昨年度の検討例から軽症例と20歳以上の症例を除き、新たに負荷試験を行った症例を加え、全17例(13～19歳)で検討した。二次性徴発来は臨床的および生化学的に確認されており、二次性徴不全例は性ホルモンにて治療を開始後に検査を行った。甲状腺ホルモン分泌不全を伴っている症例にも補充療法開始後にGH分泌能を検討した。

【方法】小児期のGHDの診断は間脳下垂体障害研究班の診断の手引きに従って行った。GHDの重症度は、診断の手引きに従い、すべての負荷試験の頂値が3ng/ml以下の場合「重症」、すべての負荷試験の頂値が6ng/ml以下で重症以外のものを「中等症」、2つ以

上の負荷試験の頂値が6ng/ml以下の場合を「軽症」とした。GHRP2については、18歳以上の症例では6ng/mlを、18歳未満では11ng/mlを基準値とした。思春期におけるGHDの診断は、GHRP2テストを行い、初期の診断が中等症だった例はアルギニン負荷、クロニジン負荷試験を追加した。

C. 研究結果

1. CPPとGHD診断と治療の手引きの検討

1) CPPの手引き：問題点と実際の症例

問題点は、大きく3点あげられた。

①日本人二次性徴進行の標準的目安について、新規検討を要する可能性があることである。現在使用されている目安は、広範な疫学調査に基づいたものではなく、保健教諭が行った特定の1校における調査で、調査から15年以上経過している。複数の学校等における最近の疫学調査が必要である。

②標準的年齢からのカットオフ値の設定、LH/FSH値のカットオフの設定。長く-3SDを目安に設定されていたカットオフ値が、前回の改訂で-2SDに変更になった。これが適正であるか、広範な議論が必要である。LH,FSHについては、LH基礎値が0.3mIU/mlを超えていれば、二次性徴が生化学的に開始したと考えられ、このカットオフ値の感度は高い(綾部、堀川ら2008)。しかし、LH基礎値が0.1mIU/mlであっても二次性徴開始ではない、とは言えず、0.3mIU/mlは特異度は低い。

③低身長思春期発来の問題 生活年齢はCPPの基準には合致しないが、身長が低いまま二次性徴が進行すると、成人身長 of 極端な低下を招くことがあり、QOL

や身体能力に影響が出る可能性がある。
実際の症例を図に示す。

2) GHDの手引き：器質性疾患によるGHDの問題点として、「2年以上にわたる成長率低下」の扱いが問題である。理由は以下の通りである。

- 身長が標準範囲にあるような器質性疾患 2年間はGH欠乏状態。
- 腫瘍性疾患の再発の問題もあるが、GHの成長促進及び代謝に対する作用を考慮すると、2年間の規定は必ずしも妥当とは言えない。
- 「2年間」の根拠はない？

実際の症例を以下に示す。

2. 思春期におけるGHDの診断に関する研究

小児期にGHDと診断された12例について、二次性徴発来(ホルモン補充療法も含む)以降にGH分泌能を再検した結果、重症GHD7例中7例で重症GHDを、中等度GHD5例中4例で正常反応を認めた。GHRP2負荷試験の頂値について、症例を増やして検討していく。

D. 考察

中枢性思春期早発症(CPP)、および成長ホルモン分泌不全性低身長症(GHD)の診断と治療の手引きは、広く診療に使用されている。一般的に「診療の手引き」は、医学的にエビデンスレベルの高いデータを基として、診断の確定と治療方針の策定の基準となるものである。しかし、日常診療では、医療の社会的側面を加味する必要があり、また高いエビデンスレベルを求めることが困難な疾患・状況がある。

今回の検討では、CPPの診断と治療の手引きでは、思春期発来の、生物学的・生化学的カットオフ設定の問題、QOLを低下させる

可能性が大きい低身長思春期発来の問題があげられた。一方GHDでは、器質性障害、特に脳腫瘍治療後の症例に対するGHDの診断と治療適応の問題があげられた。いずれの問題も、診断と治療の手引き改訂に際しては、幅広く意見を求めるPeer reviewを行った方がよいとかがえられ、また疫学調査にも着手する必要性が示された。

思春期におけるGHDの診断については、昨年度と同様、GH分泌能の回復が、重症例でもとくに特発性の診断例では認められた。

思春期年齢での一過性のGH分泌反応頂値上昇である可能性もあり、今後の経過観察が必要である。

E. 結論

本研究において、CPPの診断と治療の手引きでは、思春期発来の、生物学的・生化学的カットオフ設定の問題、QOLを低下させる可能性が大きい低身長思春期発来の問題があげられた。一方GHDでは、器質性障害、特に脳腫瘍治療後の症例に対するGHDの診断と治療適応の問題があげられた。

思春期におけるGHDの診断については、GH分泌能の回復が、重症例でもとくに特発性の診断例では認められた。

思春期年齢での一過性のGH分泌反応頂値上昇である可能性もあり、今後の経過観察が必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1) 小児がん経験者(CCS)のための内分泌フォローアップガイド ver1.1 小児内分泌学会CCS委員会 <http://jspe.umin.jp/>

2) Isojima T, Shimatsu A, Yokoya S, Chihara K, Tanaka T, Hizuka N, Teramoto A, Tatsumi KI, Tachibana K, Katsumata N, Horikawa R. 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. *Endocr J.* 59 (9) : 771-80, 2012

3) 堀川玲子：思春期早発症 内分泌代謝専門医ガイドブック（成瀬光栄・平田結喜緒・島津章編集）診断と治療社（2012. 11; pp.271-273）

4) 堀川玲子：成長ホルモン分泌不全性低身長症 からだの科学 ホルモン(内分泌)の病気(石橋みゆき編)日本評論社（2012. 11 pp.21-26）

図1

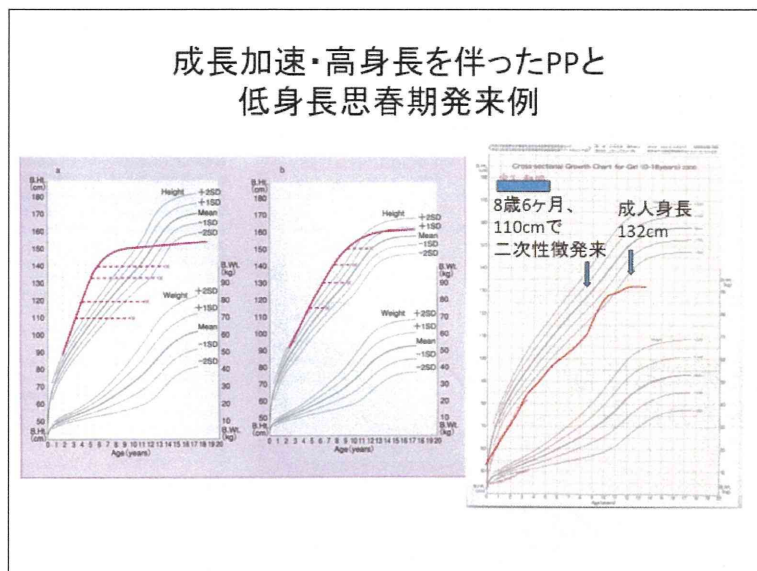


図2

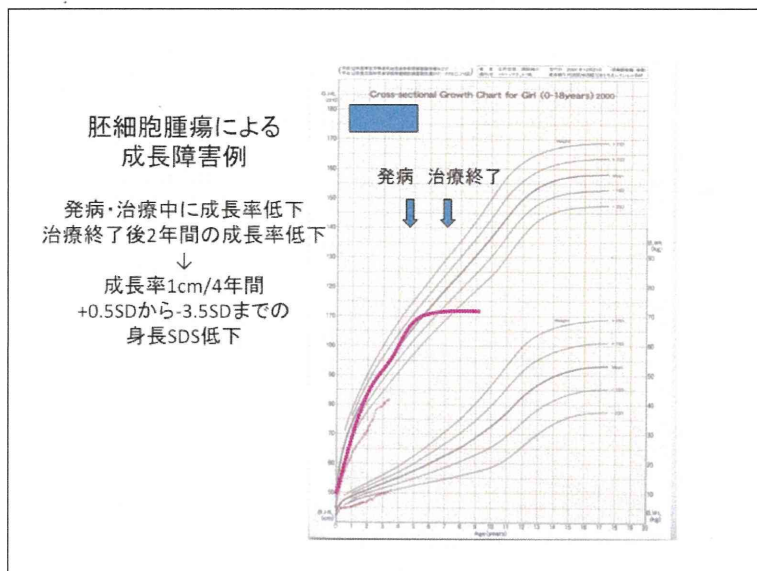


図3

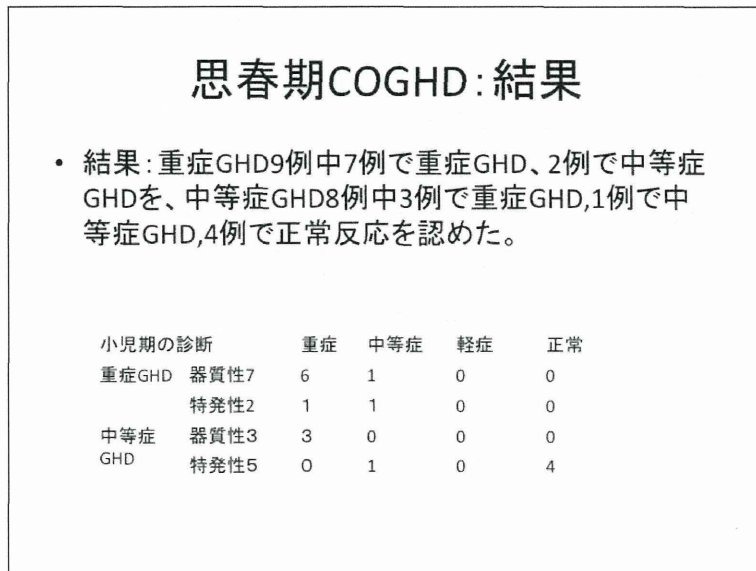
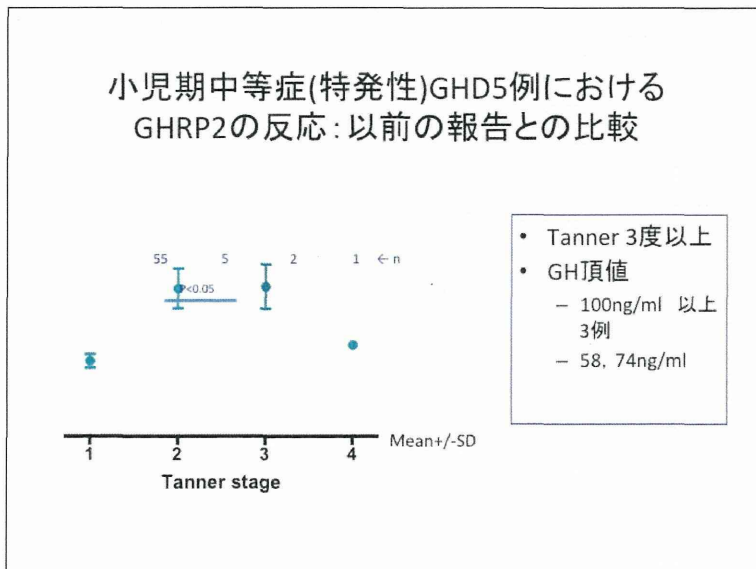


図4



エストロゲン誘発ラットプロラクチノーマに認められた 多ホルモン産生増殖性病変の病理組織学的検討

研究分担者 竹腰 進 東海大学医学部基盤診療学系病理診断学

研究要旨：エストロゲン誘発ラットプロラクチノーマ(E2-PRLoma)は、PRL産生腫瘍のモデルとして良く知られている。今回、E2-PRLomaに認められた多ホルモン産生増殖性病変の症例に遭遇したので、その病理組織学的検討結果を報告する。雌SDラットにエストラジオールデポ剤を10 mg/kg/2weekの用量で22週間以上投与しPRLomaモデルを作成した。誘発されたPRLoma全5例中4例において、PRLoma内部にゴナドトロフ細胞に類似する大型の好酸性細胞から成る限局性増殖性病変が認められた。この病変部位では、PRL、TSH β 及び α サブユニットが陽性であり、GH、LH β 、ACTH及びS-100は陰性であった。二重染色の結果、この大型好酸性細胞ではPRLとTSH β 、PRLと α サブユニット及びTSH β と α サブユニットの共発現が認められた。以上の結果から、長期エストロゲン投与により雌SDラット下垂体にPRL、TSH及び α サブユニットを発現する多ホルモン産生性の腫瘍性結節が生じることが明らかとなった。これはヒトの多ホルモン産生性下垂体腺腫の病態の解析、治療薬開発のためのモデルとして有用であると考えられた。

A. 研究目的

ヒト下垂体腺腫は、機能分化の観点から①GH-PRL-TSH産生系、②ACTH産生系、③ゴナドトロピン産生系に分類することができる。①の系譜に分類されるプロラクチン産生腺腫(PRLoma)は、下垂体腺腫の中で11%~28%占める比較的頻度の高い腺腫であり基本的にはPRLのみを産生する腺腫である。一方、同じ①の系譜であるGH産生腺腫(GHoma)はGHのみを産生する腺腫に加え、GH産生細胞とPRL産生細胞が混在するMixed somatotroph-lactotroph adenoma、GHとPRLの両ホルモンを産生する細胞から構成されるMammosomatotroph adenomaからなる。また、McCune-Albright症候群(原因遺伝子:Gs α)、Carney complex(原因遺伝子:Prkar1 α)ではGHoma、PRLomaなどの下垂体腺腫が発生し、また、Meninを原因

遺伝子とするMEN1ではすべてのタイプの下垂体腺腫が生じる。またPRO1トランスジェニックマウスおよびPrkar1 α のノックアウトマウスではGHoma、PRLoma、TSHomaが生じることが判明している。一方、本研究で用いた下垂体腺腫の実験モデルであるエストロゲン誘発PRLomaはこれまでPRLのみを産生する腺腫として考えられてきた。今回我々は雌SDラットにエストロゲンを長期間(22~36週間)投与することでエストロゲン誘発PRLomaの病変とともに、通常のPRLoma細胞とは形態的に異なる大型好酸性細胞からなる腫瘍性結節が生じることを見出した。パイロット試験の結果から、この腫瘍性結節では他種類のホルモンを産生する多ホルモン産生性の腫瘍であることが強く示唆された。そこで本研究では、各種下垂体ホルモンの二重染色およびレーザーマイクロダイセ

クシオン法を用い腫瘍結節部における下垂体ホルモンmRNAの発現解析を施行し本病変のホルモン産生の特徴を詳細に観察した。また、下垂体ホルモンの発現に重要な役割を果たすPit-1、ER α 、SF-1等の転写因子の発現解析を施行し、多ホルモン産生の機序の検討を行った。以上の検討結果から、この現象が「ヒトの多ホルモン産生性下垂体病変の亜型として考えられるのか」あるいは「SDラット特有の現象なのか」を考察した。

B. 研究方法

(1) エストロゲン誘発ラットプロラクチノーマの作成

雌SDラット(Crj:CD(SD)Rat)5例にジプロピオン酸エストラジオール(E2)(オバホルモンデポー筋注5mg(あすか製薬))を10mg/kgの用量で2週間に1回筋肉内注射し、22週間～36週間投与しプロラクチノーマ(PRLoma)モデルを作成した。対照動物として、5例の雌SDラットに安息香酸ベンジルとゴマ油の混合液を上記と同様の用量及び頻度で筋肉内注射した。

(2) 病理組織学的検索

ラットの一般症状を観察して全身状態が悪化(自発運動の低下、体温低下等)した動物については適宜切迫屠殺し、誘発されたPRLomaの下垂体サンプルを採取して常法に従ってH&E染色標本作製し病理組織学検査を実施した。また下垂体の各種ホルモンの免疫組織化学的染色として、抗PRL抗体、抗GH抗体、抗TSH β 抗体、抗 α サブユニット(α SU)抗体、抗LH β 抗体(全てNIDDK)、抗ACTH抗体(Santa Cruz)、抗S-100抗体(Dako)を用いて免疫組織化学的染色を実施した。さらに抗TSH β -PRL抗体、抗 α SU-PRL抗体、抗

TSH β - α SU抗体、抗GH-PRL抗体、抗TSH β -GH抗体、抗 α SU-GH抗体の組み合わせ(6組)で酵素抗体法による免疫二重染色を実施した。また、抗Pit-1抗体(Santa Cruz)、抗ER α 抗体(Leica Biosystems)、抗GATA-2抗体(Atlas Antibodies)、抗SF-1抗体(Perseus Proteomics)を用いた転写因子の免疫組織化学的染色も行った。

(3) 多ホルモン産生増殖性病変における下垂体ホルモンのmRNA発現解析

ラットPRLomaの内部に認められた大型好酸性細胞の増殖性病変の代表例1例について、レーザーキャプチャーマイクロダイセクションを用いて、病変部を採取した後、RNAを抽出し、この抽出RNAを鋳型としてcDNAの作成を行った。リアルタイムPCRは、TaqMan Gene Expression Assay kit(Applied Biosystems社)のラットPRL、GH、TSH及び α SUをプローブとし、DNA Engine Opticon 2 Real-Time Cycler(BIO-RAD社)を用いて解析を行った。

C. 研究結果

(1) モデルの作成及び下垂体の病理組織学的検索

雌SDラット5例にE2を10mg/kg/2weekの用量で22～36週間投与した後、剖検し5例全例にラットPRLomaが誘発されたことを確認した。病理組織学的検討を行ったところ、PRLoma 4/5例で腫瘍内部に大型好酸性細胞から成る増殖性病変が限局性及び多巣状性に認められた(図1a)。下垂体ホルモンの発現を検索するため、抗PRL抗体、抗GH抗体、抗TSH β 抗体、抗 α SU抗体、抗LH β 抗体、抗ACTH抗体、抗S-100抗体を用いて免疫組織化学的染色を行ったところ、大型好酸性細胞はPRL、TSH β 及び α SUに陽性を示

し(図1b, 図1c, 図1d)、GH、ACTH及びS-100には陰性であった。大型好酸性細胞におけるPRL、TSH β 及び α SUの免疫組織化学陽性像より、大型好酸性細胞がPRL、TSH β 及び α SUを共発現していることが示唆された為、各種抗体の組み合わせで酵素抗体法による免疫二重染色を実施した。その結果、大型好酸性細胞はPRLとTSH β 、PRLと α SU及びTSH β と α SUを共発現していることが確認された(図2a, 図2b, 図2c)。さらに転写因子の発現を確認するため、抗Pit-1抗体、抗ER α 抗体、抗GATA-2抗体及び抗SF-1抗体を用いた免疫組織化学的染色を行ったところ、大型好酸性細胞の核がPit-1、ER α 及びGATA-2に陽性を示した(図4)。

(2) レーザーキャプチャーマイクロダイセクションによる遺伝子発現解析

ラットPRLomaの内部に認められた大型好酸性細胞からなる増殖性病変をレーザーキャプチャーマイクロダイセクション法により採取した後、PRL、GH、TSH及び α SUのmRNA発現解析を行ったところ、大型好酸性細胞の増殖性病変(多ホルモン産生部位)は周囲の腫瘍組織と比較して、PRL、GH、TSH及び α SUのmRNAの発現が増加していた。特にTSH及び α SUについては、周囲の腫瘍組織においては殆ど発現しておらず、多ホルモン産生部位でのみ顕著な発現が認められた(図3)。

D. 考察

これまでに報告されている多ホルモン産生性の下垂体腫瘍を生じる実験モデルは、MEN、Prkarlaなどの特定の遺伝子の変異を導入したノックアウトマウスあるいはPROPI、PTTGなどの転写因子を過剰発現す

るトランスジェニックマウスなど遺伝子改変動物が主であった。今回、ホルモン製剤を投与することにより多ホルモン産生性腫瘍性結節が下垂体に生じることが初めて明らかとなった。免疫二重染色の結果から、このエストロゲン誘発多ホルモン産生性結節部位では、「PRLとTSH」あるいは「PRLと α SU」のように2種類のホルモンを同時に産生する多ホルモン産生細胞が多数存在することが判明した。レーザーマイクロダイセクションによりこの多ホルモン産生性結節部位を選択的にマイクロダイセクションした後、他の部位と各ホルモンのmRNA発現を比較したところ、この多ホルモン産生性結節部位では免疫染色の結果と同様にPRL、TSH、 α SUのmRNAの発現が顕著に高いことが確認され、多ホルモン産生誘導は転写レベルであることが判明した。興味深いことに免疫染色では殆ど発現の認められなかったGHのmRNAが結節部位では増加していた。GHの発現誘導に重要な働きをしている転写因子であるPit-1が結節部位の殆どの細胞の核内に強い発現が認められており、結節部におけるGH mRNA増加の原因の一つとして考えられた。上記に述べたようにPrkarla ノックアウトマウス、PROPIトランスジェニックマウスなどの遺伝子改変動物では多ホルモン産生下垂体腺腫が生じるが、その腺腫で産生されるのは、GH、PRL、TSHといった機能分化の観点からは同一の細胞系譜(GH-PRL-TSH産生系)に由来すると考えられるホルモンであるのに対し、今回のエストロゲン誘発性腺腫ではPRLと α SUのように異なる系譜の細胞で産生されるホルモンが、しかも同一の細胞で発現しているという特徴を有していた。ヒトの下垂体腺腫の中にも細胞系譜を超えたホルモン発現を示す症例が報告されており、これは転写因子発現

の異常に基づく trans-lineage differentiation と考えられている。しかし、エストロゲン誘発多ホルモン産生性結節部位では Pit-1、ER α 、SF-1 の発現に大きな変化は認められずヒトの下垂体腺腫で起こっている転写因子発現に基づく trans-lineage differentiation とは異なる分子機構が推察される。エストロゲンにより MAPキナーゼカスケード依存性に p27 の degradation が誘導されること、また、p27 により SOX2 の発現が抑制されていることが判っており、本腫瘍性病変ではこれらの増殖調節因子、転写因子が重要な役割を果たしていることが示唆された。通常、エストロゲン誘発ラットプロラクチノーマの作出にはエストロゲン感受性の高い Fisher 系ラットが用いられることが多い。今回、SD 系ラットを用いることで多ホルモン産生性腫瘍性結節が生じることが明らかとなった。今後、Fisher 系ラット、Wistar 系ラットを用いて同様の実験を行い、多ホルモン産生性腫瘍性結節が発症するのは SD ラットに特有の現象であるのか明らかにする予定である。

E. 結論

雌 SD ラットにエストロゲンを長期間投与することにより大型好酸性細胞からなる腫瘍性結節が生じることが判明した。この腫瘍性結節では、PRL、TSH β 及び α サブユニットの各ホルモンが発現しており、ヒトの多ホルモン産生性下垂体腺腫に類似する病変であった。また、腫瘍性結節を構成する大型好酸性細胞では複数のホルモンが同一細胞内で同時に発現するというユニークな特徴を有することが明らかとなった。本モデルは、ヒトの多ホルモン産生下垂体腺腫の病態解析、治療薬開発のためのモデルとして有用であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Toriumi K, Horikoshi Y, Yoshiyuki Osamura R, Yamamoto Y, Nakamura N, Takekoshi S. Carbon tetrachloride-induced hepatic injury through formation of oxidized diacylglycerol and activation of the PKC/NF- κ B pathway. *Lab Invest.* 93: 218-29, 2013
- 2) Masuda S, Kadowaki T, Kumaki N, Tang X, Tokuda Y, Yoshimura S, Takekoshi S, Osamura RY. Analysis of gene alterations of mitochondrial DNA D-loop regions to determine breast cancer clonality. *Br J Cancer.* Dec 4;107(12): 2016-23, 2012
- 3) Sugiyama T, Miyazawa M, Mikami M, Goto Y, Nishijima Y, Ikeda M, Hirasawa T, Muramatsu T, Takekoshi S, Iwamori M. Enhanced expression of sulfatide, a sulfated glycolipid, in well-differentiated endometrial adenocarcinoma. *Int J Gynecol Cancer.* 22: 1192-7, 2012
- 4) Deepak Chhabra, Koji Oda, Palepu Jagannath1, Hirotohi Utsunomiya, Susumu Takekoshi, Yuji Nimura. Chronic Heavy Metal Exposure and Gallbladder Cancer Risk in India, a Comparative Study with Japan. *Asian Pac J Cancer Prev.* 13:187-90, 2012
- 5) Tsuyoshi Fukui, Akira T. Kawaguchi, Susumu Takekoshi, Muneo Miyasaka, Rica Tanaka. Liposome-Encapsulated Hemoglobin Accelerates Skin Wound Healing in Mice. *Artificial Organs* 36: 161-169, 2012

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

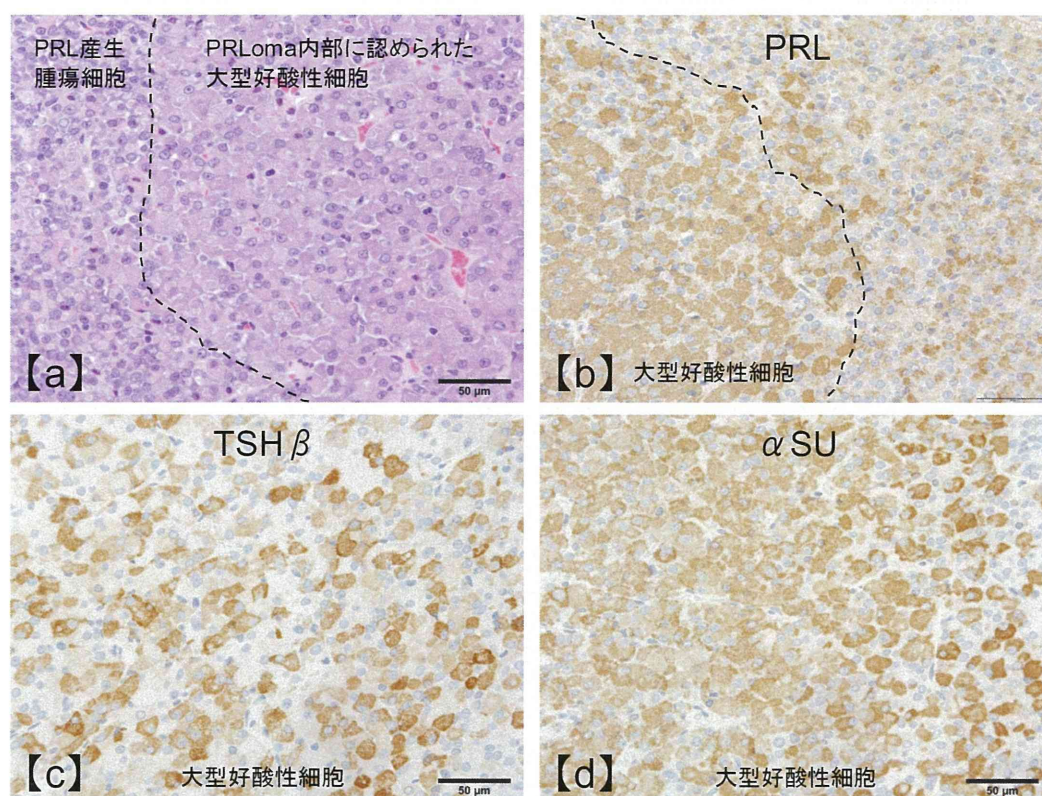
2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

図1. エストロゲン誘発ラットPRLoma内部に認められた多ホルモン産生増殖性病変



- 【a】H & E染色，ラットPRLoma内部に認められた大型好酸性細胞の増殖性病変部位
- 【b】抗PRL抗体を用いた免疫組織化学的染色，大型好酸性細胞の増殖性病変部位
- 【c】抗TSH β抗体を用いた免疫組織化学的染色，大型好酸性細胞の増殖性病変部位
- 【d】抗α SU抗体を用いた免疫組織化学的染色，大型好酸性細胞の増殖性病変部位

図2. 抗TSH β - PRL抗体、抗 α SU-PRL抗体、抗TSH β - α SU抗体を用いた免疫二重染色

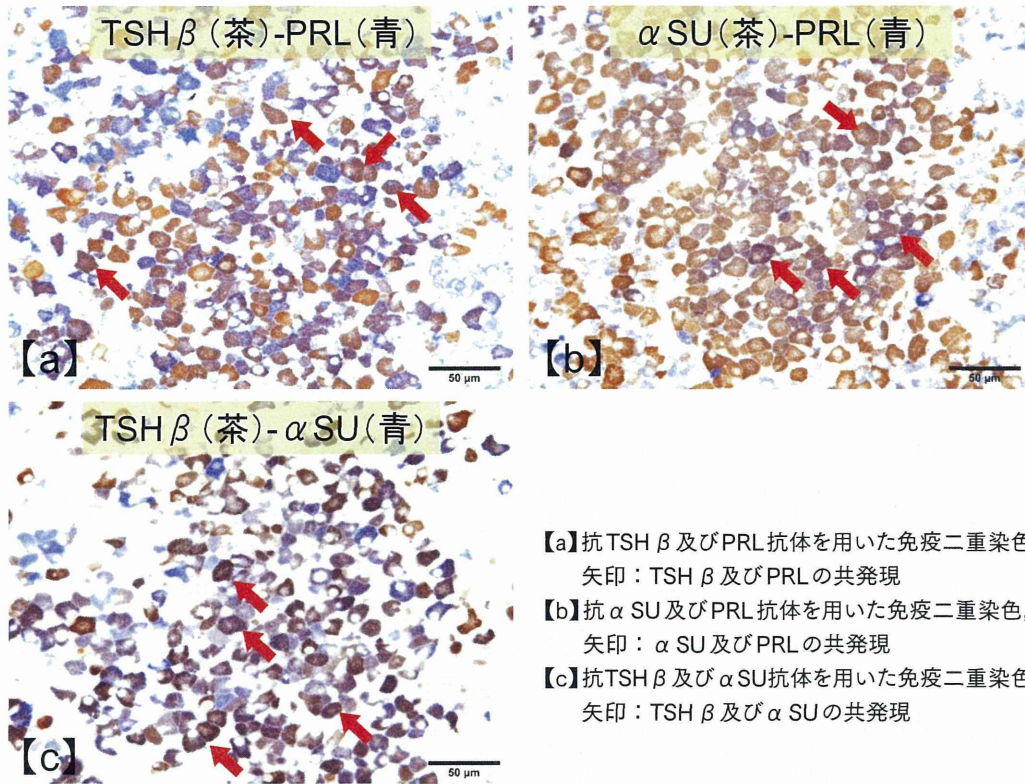


図3. レーザーマイクロダイセクションによるリアルタイムPCR 発現解析

