

図4. PRLoma内部の多ホルモン産生増殖性病変における免疫組織化学的染色結果

【免疫染色結果のまとめ】

| 群 | 動物番号 | 解剖時 週齢(W) | 投与期間 | Focal Proliferative Lesion of the Eosinophilic Cells in Prolactinoma | | | | | | |
|------|------|--------------|------|--|------|-------------|-------------|------------|------|-------|
| | | | | PRL | GH | TSH β | α SU | LH β | ACTH | S-100 |
| E2投与 | 1 | 29 | 22 | + | - | + | + | - | - | - |
| | 2 | 36 | 29 | + | - | + | + | - | - | - |
| | 3 | 43 | 36 | + | - | + | + | - | - | - |
| | 4 | 32 | 25 | + | - | + | + | - | - | - |
| | 5 | 32 | 25 | 病変なし | 病変なし | 病変なし | 病変なし | 病変なし | 病変なし | 病変なし |

| 群 | 動物番号 | Focal Proliferative Lesion of the Eosinophilic Cells in Prolactinoma | | | | | |
|------|------|--|-----------------|---------------------------|--------|-----------------|----------------|
| | | TSH β -PRL | α SU-PRL | TSH β - α SU | GH-PRL | TSH β -GH | α SU-GH |
| 対照群 | | - | - | + | - | - | - |
| E2投与 | 1 | + | + | + | - | - | - |
| | 2 | + | + | + | - | - | - |
| | 3 | + | + | + | - | - | - |
| | 4 | + | + | + | - | - | - |
| | 5 | 病変なし | 病変なし | 病変なし | 病変なし | 病変なし | 病変なし |

| 群 | 動物番号 | Focal Proliferative Lesion of the Eosinophilic Cells in Prolactinoma | | | | | | |
|------|------|--|-------------------|--------------------|------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------|
| | | Pit-1-PRL | Pit-1-TSH β | Pit-1- α SU | ER α -PRL | ER α -TSH β | ER α - α SU | SF-1-LH β |
| 対照群 | | + | ± | -~± | + | - | ± | + |
| E2投与 | 1 | + | + | + | - | - | - | + |
| | 2 | + | + | + | - | - | - | NE |
| | 3 | + | + | + | - | - | - | NE |
| | 4 | + | + | + | - | - | - | NE |
| | 5 | 病変なし | 病変なし | 病変なし | 病変なし | 病変なし | 病変なし | 病変なし |

* :大型好酸性細胞の増殖巣ではLH β 陽性細胞は認められず
 NE:Not Examined

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

研究分担者 峯岸 敬 群馬大学大学院医学系研究科産科婦人科学

A. 研究目的

PCOSにおいては、ホルモン分泌の異常としてのLH高値と多嚢胞性の形態を示す卵巣が特徴的であり、視床下部-下垂体-卵巣系の調節の不全が関与していると推定されている。欧米におけるPCOSは、肥満やアンドロゲン高値が特徴となり、診断基準においてもNIH診断基準を拡大したロツテルダム診断基準が用いられている。すなわち、PCOSの表現型やホルモン状況が人種間で異なっているため、本邦では2007年に日本産婦人科学会が示した独自の診断基準が用いられている。

LHレセプターの機能亢進型変異は男子思春期早発症患者やLeydig cell腫瘍の患者にみられ、TSHレセプターの機能亢進型遺伝子変異は甲状腺機能亢進を示す甲状腺腫や甲状腺癌患者に多数見いだされている。FSHレセプターにおいては、1996年GromollらはFSHレセプターの点突然変異に関する症例を報告した。症例は下垂体腫瘍のため下垂体切除後、ゴナドトロピン欠損症を示した男性患者、テストステロンの補充後、受精が成立したという症例である。FSHレセプターの遺伝子解析では、1700番目のコドンがアデニンからグアニンに点突然変異したもので、この結果、細胞内第3ループを形成するAsp567がGlyに置換されたものであった。発現実験では、このmutant FSHレセプターのcAMPの基礎値はwild type FSHレセプターより上昇していたが、2倍以下程度の小さな上昇であった。その後、別々のグループにより追試されたが、mutant FSHレセプターと

wild type FSHレセプターとの間にcAMPの基礎値の違いは認めることはなかった。このため患者の表現型と遺伝子変異との関連を否定する意見も多い。

一方、FSHレセプターの多型に関しては、人種差がありこの卵巣機能に関わる機能とPCOSとの関連を検討することは、PCOSの病態を理解する上で重要な意味を持つため、検討を行った。卵胞発育過程には、FSHによる作用が主体となり、そのFSHレセプターには、遺伝子多型(SNPs)(Ala307Thr-Asn680Ser)があることが報告され、女性不妊症患者では680Ser/SerはFSH製剤に対する反応性が不良と報告されている(JCEM 90:4866-4872,2005)。さらに、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で、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を目的とする。PCOSはゴナドトロピンに対する有効閾値の範囲が狭く、不妊治療に際して、過剰刺激等の合併症を生じやすい病態であり、個別化して治療することにより、これを予防することは生殖医療と周産期医療の向上に貢献するものである。

一方、PCOSの病態に関しては不明な点が多く検討がされ、最近PCOSにおいては、肥満に関連して耐糖能が低下していること、また、脂肪細胞からのサイトカイン分泌がこの肥満と耐糖能低下に関連することが報告

されている。我々は、サイトカインの内でIL-6に注目し、卵巣におけるIL-6の作用がゴナドトロピン作用に与える影響を検討し、PCOSの病態との関連を明らかとすることを病態解明のため検討した。

B. 研究方法

症例の解析

当院の産婦人科では、生殖医療班で一般不妊症と体外受精に対する治療を行っており、この中に含まれるPCOSの患者の表現型、卵巣形態、ホルモン測定により診断を行う。

当院倫理委員会の承認のもと、当科不妊外来患者にインフォームドコンセント施行し、研究参加への同意を得られた症例を対象にFSHレセプターの遺伝的多型(Thr307Ala、Asn680Ser)をDNAシーケンサを用いて調べ、グループ1(G1) Thr/Thr-Asn/Asn(TT/NN)、グループ2(G2) Ala/Thr-Ser/Asn(AT/SN)またはAla/Ala-Ser/Ser(AA/SS)に分類した。

これらの症例から、FSHレセプターのタイプにより、以下の点で検討した。

- ①FSH製剤に対する反応性が異なり、FSH製剤の総投与量に相違があるか。
- ②治療期間中の卵胞サイズの変化に特徴があるか。
- ③測定されたホルモン値の中で卵胞数、サイズと相関するものがあるか。
- ④ホルモン値と多型に相関するものがあるか。

レセプターの機能の解析

細胞レベルでの機能解析として、293細胞を用いての発現実験として、ヒトFSHレセプターのそれぞれの多型をPCRで組成した。それぞれを発現ベクターに導入して、プラスミドを増幅して、cDNAトランスフィクション

ンに使用した。FSHを作用させた時の細胞中cAMPを測定することにより、変異型の機能の相違を検討した。

生体内では、同一細胞に正常のものと変異のあるレセプターが同時に発現している可能性がある。そこで、同一細胞に正常/変異レセプターのcDNA量を割合を変えて導入して、FSHに対する反応性を観察する。

以上の解析より、多型によるFSHに対する反応性を評価し、FSHレセプターの型と反応性に相関があるかを検討する。新規の多型、変異等があれば上記と同様の検討を行う。

ラット顆粒膜細胞培養

この卵胞発育・排卵過程での顆粒膜細胞におけるゴナドトロピン受容体発現について注目し、まずFSH受容体が次いでLH受容体がFSH依存性に発現し、LHの作用を受けた顆粒膜細胞は排卵後に黄体化顆粒膜細胞へと変化する。特に排卵過程に関しては、LHサーージに反応する顆粒膜細胞が重要な役割を果たすことが現在までに明らかにされている。

一方で排卵障害を特徴とするPCOSの卵胞液中にIL-6が増加するという報告があるため、IL-6がLH受容体発現に影響を与えているのではないかという観点から、IL-6と顆粒膜細胞LH受容体発現との関連を検索した。

- ・3週齢メスラットにDES 2mg/body/dayを4日間投与し、未熟な顆粒膜細胞を採取し培養を行った。
- ・FSH vs FSH,IL-6 同時添加群とでLH・IL-6受容体mRNAの発現量をNorthern blot及びreal time RT-PCRを用い評価し、有意差を持ってIL-6添加による増強効果を確認したので、転写活性やmRNAの安定性に関して検討した。

C. 研究結果

症例の解析

2012年末までの患者さん総数は106名であり、遺伝的多型の割合は、TT/NN 56人 48.3 %、AT/SN 51人 44.0 %、AA/SS 名 7.76 %であった。基礎FSH値の中央値は、G1で6.59 mIU/ml、G2で7.4mIU/ml(p=0.045)有意差を認め、基礎LH値はG1で5.45 mIU/ml、G2で5.79 mIU/ml(p=0.0621)で有意差を認めなかった。また、BMIはG1で21.3、G2で19.9(p=0.008)で有意差を認めた。経膈エコーで多嚢胞性卵巣所見を認め月経異常もある患者のうち、PCOSと診断された割合は、G1で9/10人(90.0%)、G2で6/9人(66.7%)であった。

現在までの一般不妊100症例程におけるFSHレセプターのアミノ酸680番の多型の頻度はAsn/Asn:Asn/Ser:Ser/Serは56:51:9でありSer/Serの症例が欧米の報告に比較して明らかに少ない傾向にある。又Ser/Serの症例では基礎FSHが高く、FSH製剤に対する反応性が低いと考えられる。

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。これはFSHレセプターの遺伝的多型により、G2では有意差は認めなかったが基礎FSH値が高値になりやすい傾向にあるため、日本におけるPCOSの診断基準を満たさない症例が含まれる可能性が示唆された。

レセプターの機能の解析

細胞レベルでの機能解析として、293細胞を用いての発現実験として、ヒトFSHレセプターのそれぞれの多型をPCRで組成した。それぞれを発現ベクターに導入して、プラス

ミドを増幅して、cDNAトランスフィクションに使用した細胞を用いて実験を行った。いずれの多型のレセプターにおいてもFSHに対する用量反応においては同様であり、他の研究室からの報告と同様にcAMP産生能におけるFSHに対するレセプターの機能に相違は見られなかった。

このため、FSHレセプターが二量体を形成して機能する可能性を重視して、ワイルドタイプのレセプターを恒常的に導入した細胞を用いて、それぞれのレセプターをcDNAを追加で細胞に導入することでFSHに対する反応性をcAMP産生能に関して観察したが、有意差を認めることができなかった。

同一細胞にFSHを作用させた後にERK1/2のリン酸化を検討したが、結果としてcAMP産生と同時にMAPKの経路が刺激されERK1/2のリン酸化をウェスタンブロットで検出することができた。ヒトのFSHレセプターの活性化とMAPKの経路の刺激を確認できる系が確立できたので、この系を用いてSNPsの機能解析を行っていく予定である。

ラット顆粒膜細胞培養

- FSH単独添加群に比して、IL-6同時添加群でLH受容体mRNA発現が時間と用量依存的に増強した。
- IL-6刺激は主にMAPKとSTAT3経路を介してシグナル伝達するといわれており、顆粒膜細胞においてもこのようにErk及びSTAT3のリン酸化が確認できた。一方FSHはErkのリン酸化のみ起こし、STAT3のリン酸化は認めなかった。また、FSH・IL-6同時添加によりリン酸化シグナルの増強を認めており、FSHとIL-6刺激がMAPK系で協調的に働いていることが分かり、またErk阻害薬U0126併用により

Erkのリン酸化は消失した。

- IL-6のLH受容体mRNA転写活性を調べるため、LH受容体遺伝子プロモーター領域を含むベクター(LH receptor-Luc)を顆粒膜細胞にトランスフェクションし、FSHまたはFSH及びIL-6同時添加におけるルシフェラーゼ活性を検討した。非添加群に比して、FSH添加によりルシフェラーゼ活性が上昇したが、IL-6同時添加により相乗的に有意な差をもって活性上昇していることが分かり、IL-6はLH受容体mRNA転写活性を上昇させた。
- IL-6受容体の構造のうちIL-6受容体 α 鎖はIL-6に特異的に結合するが、このmRNAをFSH及びFSH、IL-6同時添加群で経時的に比較したところ、IL-6同時添加によりIL-6R α mRNA発現が増強していた。

D. 考察

FSH受容体(FSHR)の一塩基多型(SNP: Single Nucleotide Polymorphisms)は頻発するものであり、対立遺伝子変異体は卵巣反応の違いに関連することが示されている。最近のメタアナリシスで、FSHR N680S多型の女性はFSHに対する反応が低い傾向があることが示された。同様に、プロモーター領域(29)に頻発するFSHR多型は、調節卵巣刺激(COS)の最中の卵巣反応に関係があり、hCG投与前にはエストラジオールレベルが低いためにより多くの外因性FSHを必要とすることが報告されている。男性における試験から、FSHR β 鎖の多型がどのようにFSHレベルに影響するかも明らかになった。現時点では、女性におけるデータが不足している。FSHレベルが正常範囲内で低い場合、この多型を持つ可能性が高い。Simoni博士は、FSHR β とFSHRの相互作用を評価する

研究が重要であるが、現時点では、妊娠率に対するこれらの多型の影響について、評価に利用できるデータは存在しないと考察した。

女性不妊症患者では680Ser/SerはFSH製剤に対する反応性が不良と報告されている(JCEM 90:4866-4872,2005)が、男性の成績では680Serの存在する方が、FSH製剤に反応して精子数が増加する(Int J Androl.2010Jun 20)とされ、FSHレセプター多型の機能についての成績に不一致がある。又、多型の分布についても地域差があり、たとえば680Ser/Serの分布は欧米では24%と報告されているが、我々の日本人100例ほどの検討では10%に満たない。これらレセプターの機能解析については、アミノ酸配列の異なったFSHレセプターに相応するcDNAの発現系で検討されているが、ホルモン結合能とcAMP産生を指標にする検討では、FSHに対する反応性に相違はみられていない(JCEM 92:2321-2317、2007)、このためin vivoにおけるFSH製剤に対する反応性の相違を説明できるin vitroの実験結果が存在しないのが現状である。

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。さらに、FSHレセプターの機能解析には我々が確立している恒常的FSHレセプター発現細胞を用いて、アミノ酸の変異がレセプターの二量体化またはDown regulationに影響する可能性について検討する必要がある。

FSHレセプターからのシグナルはレセプターのリン酸化やInternalizationによりFSHレセプターからのシグナルがオフとなり(termination)、さらなるシグナルに対しレセプターが不応となりいわゆる脱感作(desensitization)の状態になる。

リガンドであるFSHがラットFSHレセプター結合するとラットFSHが活性化し、第1、第3細胞内ループのセリン/スレオリン残基がリン酸化される。このリン酸化はGRK(G-protein coupled receptor kinase)により行われ、レセプターが活性化されると β -arrestinと呼ばれるタンパクと結合しレセプター/ β -arrestin complexを形成する。これによって、レセプターとGタンパクとの連絡が阻害(uncoupling)されレセプターの脱感作(desensitization)が起きる。さらにこのレセプター/ β -arrestin complexはclathrin-coated pitに作用しレセプターのinternalizationを促進する。膜表面のレセプターはendocytosisにより膜表面より排除され、さらなるホルモンの刺激に対してレセプターは不応となるため、internalizationはGPCRの脱感作(desensitization)のための一つの様式といえる。FSHレセプターのSNPs680アミノ酸部位は細胞内にあるため、これらのレセプターの修飾に参与する可能性があり、脱感作の関連についても検討する予定である。

ラット顆粒膜細胞培養の実験結果よりIL-6はLH受容体発現を増強することが示唆された。

顆粒膜細胞へのFSH添加により内因性のIL-6分泌が上昇するという報告が過去にされており、これを併せて考えると、FSH、IL-6同時添加によりIL-6受容体発現およびIL-6分泌が上昇し、auto-regulationのようなかたちでIL-6刺激を増強している可能性が示唆

された。

E. 結論

FSHレセプターのSNPsの発現には人種間で相違があり、608Ser/Serは欧米に比較してアジア人では少ない傾向にある。このことは、日本人の場合はFSHに反応性の低いFSHレセプターの分布が少ないことになり、FSHには反応性の良いレセプターがより多数を占めていることになる。この傾向と欧米でのPCOSにおいてアンドロゲンが高値であり、アジア人でこの傾向が少ないことを考え併せると、FSHが有効に作用する環境下ではアンドロゲンは容易にE2に芳香化を受けるので、アジア人のアンドロゲンが低いのはFSHレセプターの機能の相違に関連性があるかもしれない。しかし、これらSNPsのもつFSHレセプターの機能に対するin vitroの機能解析は不十分であり、今後の研究の進展が必要である。一方、今回の結果は日本のPCOSの評価基準のLHとFSHのそれぞれの絶対値を用いて比較することを含んでいるため、欧米の基準より厳しいものとなり症例の範囲が狭められている可能性を示すものである。同一疾患を世界的レベルで検討する際には、この診断基準の不一致は是正されるべきものであると考える。

一方で、疾患の世界的分布の相違と何らかの有意な因果関係をもつ遺伝子的相違が明らかになれば、有益な病態解明のためのヒントを与える可能性があり検討の必要性があると考えた。

PCOSではLH基礎値が高値であることも知られており、PCOSではLHがIL-6の影響で増加したLH受容体を介して、高アンドロゲン血症を引き起こす可能性が考えられた。

また、高濃度のIL-6存在下では顆粒膜細

胞でのLH受容体が適切なタイミングより早く発現してし、FSHのシグナルを抑制し、十分な卵胞発育が阻害され、排卵障害をきたすという機構が考えられた。これらの結果からIL-6などのシグナル伝達系を修飾するこ

とで排卵の制御が可能になれば、現在最も多胎発生の危険性の高いPCOSの排卵誘発に画期的な方法を提供する可能性があり生殖・周産期医療に貢献することが考えられる。

下垂体腺腫におけるSOX2陽性細胞に関する研究

| | | |
|-------|-------|------------------------|
| 研究分担者 | 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 | 湯之上俊二 | 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科脳神経外科学 |
| | 藤尾 信吾 | 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科脳神経外科学 |
| | 羽生 未佳 | 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科脳神経外科学 |
| | 富永 篤 | 広島大学大学院医歯薬総合研究科脳神経外科学 |

研究要旨：SOX2陽性細胞は下垂体の発生初期において重要な細胞集団であるが、我々は下垂体腺腫にもSOX2陽性細胞が存在することを見出している。今回、下垂体腺腫におけるSOX2陽性細胞の特性について解析したので報告する。方法は下垂体腺腫105例を対象とし主に免疫組織学的解析にて検討した。SOX2陽性細胞は非機能腺腫と比較して機能性腺腫により認められやすかった。また、Ki67LIの平均はSOX2陽性群と陰性群間に有意な差はなかった。一方、悪性下垂体腺腫3例においてSOX2陽性細胞は観察されなかった。一方、SOX2陽性細胞は下垂体ホルモン陰性、SOX9陽性であった。これらの結果より下垂体腺腫におけるSOX2陽性細胞はSOX2/SOX9共陽性細胞として存在し、腫瘍の増殖に関与している細胞集団ではなく、内分泌細胞への分化能を有した前駆細胞なのではないかと推測された。

A. 研究目的

下垂体腺腫は内分泌学的表現形の多様性を持っているが、その発生にかかわるメカニズムについては不明な点が多い。下垂体原基が個体において発生し、その後、各種のホルモンを分泌するための転写因子が下垂体腺腫においても同様に機能することで下垂体腺腫における内分泌学的表現形の違いが生じるとする説が現在のところ主流であるといえる。下垂体の発生には今日、SOX2陽性細胞として存在する幹細胞が深く関与していることが知られるようになってきた。下垂体ではSOX2陽性細胞を起源とし、SOX2陽性細胞に各種転写因子が発現していくことで下垂体における内分泌細胞への分化が起こることが示されている(図1)。本研究では下垂体腺腫においてもSOX2陽性細胞が存在することを証明すると同時にその存在意義を解明しつつ、下

垂体腺腫における内分泌学的発現形の違いにSOX2陽性細胞が関与しているのかどうかを明らかにしたい。

そもそもSox2はSox(SRY-related HMG box)遺伝子ファミリーに属し、DNA結合能を持つHMGドメインと転写活性化ドメインから成る転写因子である。マウスにおけるその発現は生殖細胞をはじめ、初期胚で神経系の幹細胞や前駆細胞にみられ、その機能の未分化性への関与を強く示唆することが知られていた。以前からSOX2遺伝子の欠失変

異ではbilateral anophthalmia/microphthalmiaなどが発生することが知られ特に中枢神経系器官の発生にも大きく関与することが示されていた。その様な背景の中で2006年にはSOX2遺伝子の変異により下垂体の低形成が誘導されるという研究成果が発表され下垂体の発生にも大きく関与している遺伝子であ

ることが知られるようになってきた¹⁾。2008年には胎生期マウスの下垂体発生におけるSOX2陽性細胞の存在とその機能報告がなされたが、この報告の中で、胎生期のSOX2陽性細胞は増殖活性が高く器官形成に関与しているが、生後は、SOX2同様(SRY-related HMG box) 遺伝子ファミリーに属する転写因子であるSOX9を発現するようになるという。このSOX2+/SOX9+細胞は多分化能を有し、その他の転写因子の制御の下、各種の下垂体ホルモンを産生するために存在するという報告がなされた²⁾。このような背景の中で本研究では、下垂体腺腫におけるSOX2陽性細胞の存在を証明すると同時に主に免疫学的組織染色の手法を用いて下垂体腺腫におけるSOX2陽性細胞の存在意義を明らかにすることを目的とし研究を行った。

B. 研究方法

1. 対象は鹿児島大学病院脳神経外科にて摘出された下垂体腺腫の標本105例。これら全例にまず、SOX2 monoclonal 抗体にて免疫組織染色を行い通常の光学顕微鏡にて観察し、その後にSOX2陽性症例と陰性症例を分け二群間で年齢、Ki67 label index、subtype (GHoma, PRLoma, ACTHoma, TSHoma, NFoma)を比較した。
2. 悪性下垂体腺腫(異型性下垂体腺腫あるいは下垂体癌)と診断された3症例(8歳女児 GHoma, 47歳女性 GHoma, 67歳男性 PRLoma)についてSOX2の発現があるかどうかを免疫組織学的に検討した。
3. 下垂体腺腫におけるSOX2陽性細胞はホルモン産生能を有しているかどうかの実験を免疫学的蛍光多重染色で検討した。
4. 下垂体腺腫におけるSOX2陽性細胞はSOX9を発現しているかどうかについて

免疫学的蛍光二重染色を行った。

C. 研究結果

1. 下垂体腺腫105例におけるSOX2抗体での免疫染色にて39例(37.1%)にSOX2陽性細胞の存在を確認した。陰性例は66例であったが、陽性群と陰性群とを比較したときに年齢は平均で50.8歳 vs 51.2歳(P>0.05)、Ki67 label indexについては1.26 vs 1.81(P>0.05)であり、両群間に有意な差はなかった。一方、subtypeごとにSOX2陽性例がどの程度あるかを検討した結果、NFomaでは19.0% (8/42), GHomaでは52.6% (20/38), PRLomaでは43.7% (7/16), ACTHomaでは40.0% (2/5), TSHomaでは50.0% (2/4)であった。SOX2陽性細胞は機能性下垂体腺腫に認められやすい傾向があった(表1)。
2. 悪性下垂体腺腫にSOX2陽性細胞が発現しているかどうかを免疫組織学的に検討した。標本は病理学的に悪性下垂体腺腫と診断された8歳女児 GHoma, 47歳女性 GHoma, 67歳男性 PRLomaの3症例。これらのいずれの症例においてSOX2陽性細胞は観察されなかった(図2)。
3. 下垂体腺腫におけるSOX2陽性細胞がホルモン産生能を有しているかどうかを免疫学的蛍光多重染色にて解析した。SOX2と各ホルモン(GH, PRL, ACTH, TSH, LH, FSH)に対する1次抗体を反応させた後に抗IgG-Alexa fluor488 (green)にてSOX2を標識し、各ホルモンは抗IgG-Alexa fluor555 (red)にて標識し検討した。下垂体腺腫におけるSOX2陽性細胞は各ホルモン抗体にて陽性とならず、ホルモン産生能を有していないことが確認された(図3)。

4. 下垂体腺腫におけるSOX2陽性細胞についてSOX9の発現がどうかを解析した。SOX2とSOX9に対する1次抗体を反応させた後に抗IgG-Alexa fluor488 (green)にてSOX2を標識しSOX9は抗IgG-Alexa fluor555 (red)にて標識し検討した。下垂体腺腫におけるSOX2陽性細胞はSOX9も共発現しSOX2+/SOX9+細胞として存在していることが確認された(図4)。

D. 考察

これまでの研究で下垂体腺腫にSOX2陽性細胞が存在していることが確認できた。下垂体の発生に重要な幹細胞の1つであるSOX2陽性細胞が下垂体腺腫にも存在するということが示され、さらに陽性群と陰性群の比較でKi67 label indexにおいて両群間で有意な差がなかったことから下垂体腺腫におけるSOX2陽性細胞は増殖能は高くないことが推測された。また、さらに今回の実験で下垂体腺腫におけるSOX2陽性細胞はSOX9も陽性であった。Fauquierらは下垂体におけるSOX2+/SOX9+は増殖能は高くなく組織の維持に関わっているという説を報告している(2)が、我々の実験結果もこの説を支持するものと考えられた。

さらにグリオーマにおいては悪性度とSOX2陽性率が相関するという報告がなされている(3)が、下垂体腺腫においてはSOX2陽性細胞の悪性度への関与は否定的であることが示されたと考えている。

最後に、本研究ではSOX2陽性細胞は機能性下垂体腺腫に発現が認められやすい傾向があったにもかかわらず、ホルモン産生能を有していないという興味深い事実が見出された。

以上の結果より下垂体腺腫に発現しているSOX2陽性細胞はSOX9共陽性として存在し、増殖や悪性化に関わっているのではなく組織の維持、或いは下垂体腺腫におけるホルモン産生細胞の前駆細胞として存在している可能性が示唆された。

E. 結論

下垂体腺腫におけるSOX2陽性細胞は機能性腺腫に認められやすいが、ホルモン産生能は有しておらず、増殖能も低いと考えられる。このことから下垂体腺腫において、SOX2陽性細胞は器官の維持、もしくはホルモン産生細胞の前駆細胞として存在している可能性がある。

参考文献

- 1) M Kelberman D, Rizzoti K, Avilion A, Bitner-Glindzicz M, Cianfarani S, Collins J, Chong WK, Kirk JM, Achermann JC, Ross R, Carmignac D, Lovell-Badge R, Robinson IC, Dattani MT. Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans. *J Clin Invest.* Sep; 116 (9): 2442-55, 2006
- 2) Fauquier T, Rizzoti K, Dattani M, Lovell-Badge R, Robinson IC. SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland., *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 26; 105 (8): 2907-12, 2008
- 3) Guo Y, Liu S, Wang P, Zhao S, Wang F, Bing L, Zhang Y, Ling EA, Gao J, Hao A. Expression profile of embryonic stem cell-associated genes Oct4, Sox2 and Nanog in human gliomas. *Histopathology.* Oct; 59(4):

763-75, 2011

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文

《著書》

- 1) 藤尾信吾, 有田和徳. 顕微鏡・内視鏡併用経蝶形骨洞手術. NS Now 下垂体外科 Update. 寺本 明, 新井 一, 塩川芳昭, 大畑建治 編. メジカルビュー. P130-141, 2012
- 2) 藤尾信吾, 有田和徳. 転移性下垂体腫瘍. 内分泌シリーズ, 下垂体疾患診療マニュアル. 平田結喜緒, 山田正三, 成瀬光栄 編. 診断と治療社. P219-220, 2012
- 3) 藤尾信吾, 有田和徳. 非機能性下垂体腺腫(ゴナドトロピン産生下垂体腺腫). 内分泌シリーズ, 下垂体疾患診療マニュアル. 平田結喜緒, 山田正三, 成瀬光栄 編. 診断と治療社. P160-162, 2012

《論文》

- 1) 藤尾信吾, 羽生未佳, 湯之上俊二, 平野宏文, 有田和徳, 時村 洋, 有田和徳, 有村 洋, 西尾善彦. 機能性下垂体腺腫摘出術における腫瘍被膜外摘出の有効性と安全性. 日本内分泌学会雑誌. vol88 (Suppl. August 2012), 5-7, 2012
- 2) Fujio S, Tokimura H, Hirano H, Hanaya R, Kubo F, Yunoue S, Bohara M, Kinoshita Y, Tominaga A, Arimura H, Arita K. Severe growth hormone deficiency is rare in surgically-cured acromegalics. Pituitary. 2012 Aug 24 (in press).

2. 学会発表

- 1) 第22回日本間脳下垂体腫瘍学会(東京, 2012年2月24日). 下垂体腺腫におけるSOX2陽性細胞の免疫組織学的検討. 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 脳神経外科. 湯之上俊二, 藤尾信吾, 羽生未佳, ユーリズ バクティアル, 時村 洋, 有田和徳.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

図1

下垂体ではSOX2陽性細胞を起源とし、SOX2陽性細胞に各転写因子が発現していくことで下垂体における内分泌細胞への分化が起こることが示されている。(The pituitary, third editionより抜粋)

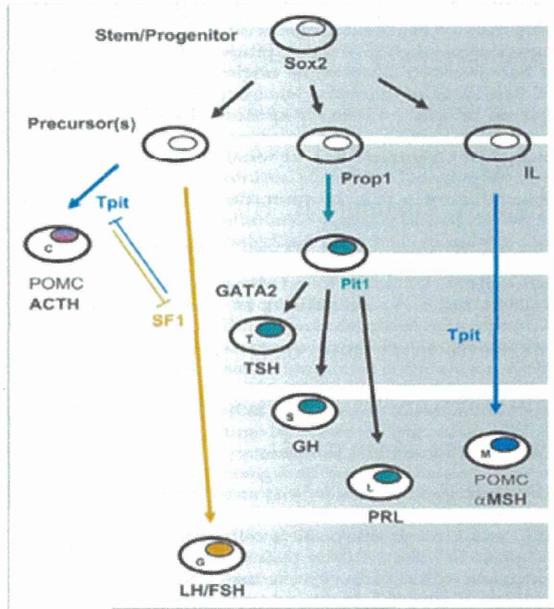


図2

免疫組織学的にSOX2陽性細胞が観察された。GHoma: growth hormone producing adenoma, PRLoma: prolactine producing adenoma, ACTHoma: adrenocorticotrop hormone producing adenoma, TSHoma: thyroid stimulating horumone producing adenoma

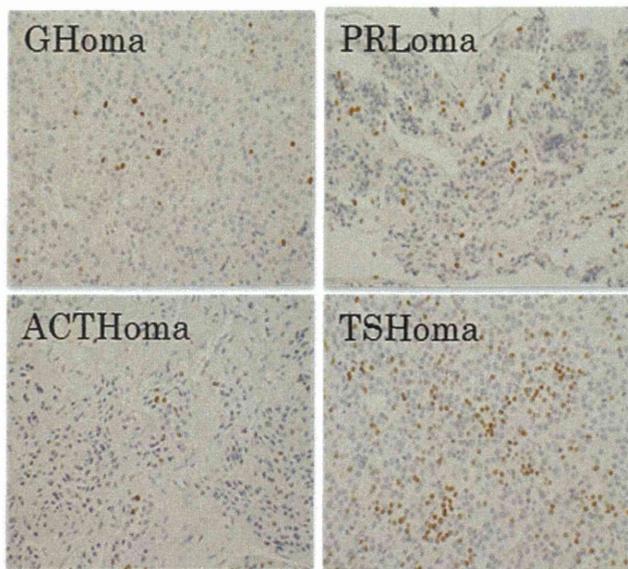


図3

(代表症例)47歳 男性のGHomaの免疫学的蛍光多重染色にて青;核染色,緑;SOX2陽性細胞,赤;成長ホルモンを示す。SOX2陽性細胞(矢印)は赤で示されるホルモンを欠いている。

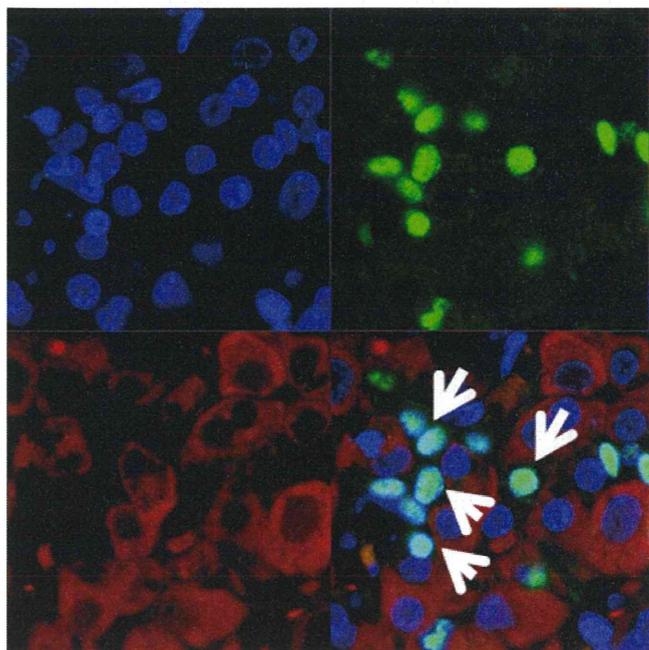


図4

(代表症例)19歳 女性のPRLomaの免疫学的蛍光多重染色にて青;核染色,緑;SOX2陽性細胞,赤;SOX9陽性細胞を示す。下垂体腺腫におけるSOX2陽性細胞はほとんどがSOX9共陽性である。

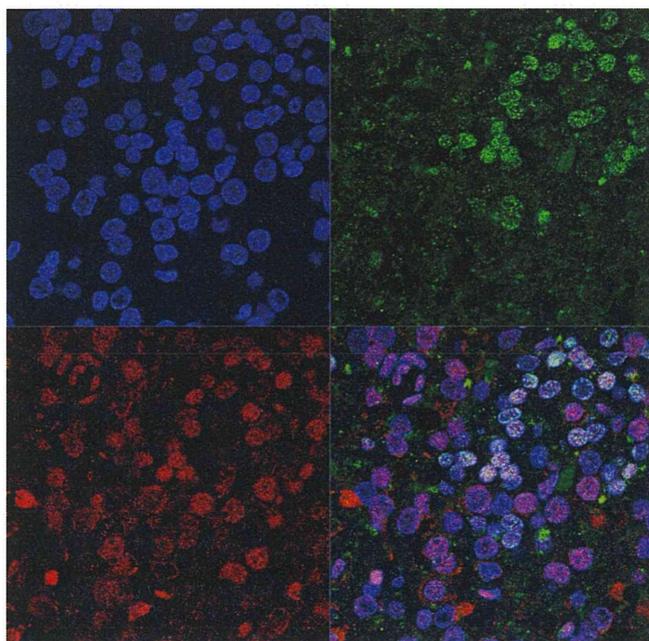


表 1

| | Positive | Negative |
|----------------|-----------|-----------|
| No (%) (n=105) | 39 (37.1) | 66 (62.8) |
| Age(mean) | 50.8 | 51.2 |
| Ki-67 LI | 1.26 | 1.81 |
| Subtype | | |
| NFoma | 8 (19.0) | 34 |
| GHoma | 20 (52.6) | 18 |
| PRLoma | 7 (43.7) | 9 |
| ACTHoma | 2 (40.0) | 3 |
| TSHoma | 2 (50.0) | 2 |

Ki67LI: Ki67 label index, NFoma: clinically nonfunctioning adenoma, GHoma: growth hormone producing adenoma, PRLoma: prolactine producing adenoma, ACTHoma: adrenocorticotropic hormone producing adenoma, TSHoma: thyroid stimulating horumone producing adenoma

間脳下垂体疾患データベースによる長期予後調査

研究分担者 横山 徹爾 国立保健医療科学院生涯健康研究部
研究協力者 置村 康彦 神戸女子大学家政学部
千原 和夫 兵庫県立加古川医療センター

研究要旨：間脳下垂体機能障害は、経過が長期に渡るものが多いため、経過を単に生命予後のみで把握するだけでなく、症候、合併症、日常生活状況、主観的健康観等を指標とした健康余命に関しても評価することが望まれる。その結果は臨床医療および公衆衛生行政にとって重要な基礎資料となる。2006年度より登録が開始された間脳下垂体疾患データベースには、2012年12月末までの約6年間で、先端巨大症101例、プロラクチノーマ81例、クッシング病19例、下垂体機能低下症165例、バソプレシン分泌低下症50例、計416例が登録され、診断時からの経過年数は 5.4 ± 2.9 年（平均 \pm SD）となった。登録時データの入力完了した症例についての基本集計と、一部の症例に対する短期的な縦断分析を試みた。

A. 研究目的

間脳下垂体機能障害は、適切な管理が行われれば経過が長期に渡るものが多く、患者の生命予後のみならず健康余命、QOLや主観的健康観等に影響する治療法・生活習慣・周囲の支援体制等の要因を明らかにすることは、臨床医療および公衆衛生行政にとって重要な基礎資料となる。

予後調査は長期間の追跡と多大な労力が必要であり、間脳下垂体疾患の長期予後については国内、国外ともにまだデータが乏しい。わが国では、間脳下垂体機能障害研究班において、末端肥大症および下垂体性巨人症、クッシング病、下垂体前葉機能低下症および前葉ホルモン単独欠損症、甲状腺ホルモン刺激ホルモン分泌異常症、プロラクチン分泌異常症、クッシング症候群、中枢性尿崩症等について後ろ向きの実態調査を行い¹⁾、予後に関連する要因についての検討を行った。しかし、多数の登録症例を、長期間に渡って定期的・継続的に高い追跡率で調査し、病態の変

化や生命予後に及ぼす治療等の要因の影響を明らかにした研究はない。前向きに追跡調査を行うことで、後ろ向き調査では得にくい病態等の経時的な変化を正確に把握することが可能になり、治療法や周囲の支援体制等に関する貴重な情報が得られることが期待される。

間脳下垂体機能障害研究班では、諸外国での追跡研究や過去にわが国で実施された難病に関する予後調査を参考にして、間脳下垂体機能障害の予後調査実施方法について検討を重ね²⁾⁻⁶⁾、2006年度より間脳下垂体疾患データベースの登録を行ってきている。本年度は、2012年12月までの登録データについての基本集計と、一部の症例に対する短期的な縦断分析を試みた。

B. 研究方法

(1) 患者の登録方法

本調査は多施設共同の予後調査である。これまでの参加施設は、間脳下垂体機能障害研

究班の分担研究者・研究協力者の所属施設および関連施設が中心となっている。対象疾患は、①先端巨大症、②プロラクチノーマ、③クッシング病、④下垂体前葉機能低下症、⑤バソプレシン分泌低下症の5疾患で、登録する症例は、診断基準に該当する登録期間中の新規診断例と、過去5年間の診断例の全てである。

(2) 診断時調査

診断時点における調査内容は、疾患によって少しずつ異なるが、おおよそ以下の通りである。①患者背景：識別番号、年齢、性別、住所(市区町村)、診断年月、発症推定年月、②症候(有無と程度)、合併症(有無と発症日)、③検査：内分泌検査、画像検査所見など、④治療：外科療法、薬物療法(薬剤名、期間、量)、その他、(6)生活状況(国民生活基礎調査から選んだ5項目)。患者からインフォームド・コンセントを受けた後、識別番号で連結可能匿名化を図り、担当医がオンライン(平成21年度まで)またはFAX(平成22年度以降)で調査票を事務局に送付し、データベースに登録する。連結のためのIDの対応表は各医療機関に置いて厳重に管理する。

(3) 追跡調査

毎年の追跡調査の項目は、生存状況以外は診断時調査とほぼ同じで、①症候(有無と程度)、合併症(有無と発症日)、②検査：内分泌検査、画像検査所見など、③治療：外科療法、薬物療法(薬剤名、期間、量)、その他、④生活状況(厚生労働省の国民生活基礎調査から選んだ5項目)、⑤生存状況(最終生存確認日または死亡日と死因)である。登録後は、担当医に対して定期的に追跡調査の依頼を行う。また、毎月1度、症例の登録状況を

「マンスリーレポート」として事務局より送付する。

(4) 解析計画

詳細は解析計画として整理した通りであり⁶⁾、以下の内容を予定している。①登録時の基本集計、②登録症例と一般集団との死亡率の比較、③登録症例と一般集団との生活状況の比較、④登録時の状態と予後との関連分析(生命予後、合併症、生活状況)、⑤治療法と症候等の変化との縦断解析。

追跡期間がまだ短いことと追跡データの登録が未完了な症例が多いため十分な縦断的な解析はできないが、追跡状況について確認するとともに、登録時データの入力完了した症例について①と③の解析を行い、また、短期的な縦断分析を試みた。

(5) 倫理面での配慮

本研究は、「疫学研究に関する倫理指針(文部科学省・厚生労働省)」⁷⁾に従って研究計画をたて、研究責任者の所属する機関での倫理審査委員会の承認をうけた。その後、各協力医療機関における倫理審査を経てデータベースへの登録が開始されている。研究結果に関しては統計解析の結果のみを示し、個々の研究対象者を特定できる情報が公表されることはない。

C. 研究結果

(1) 登録症例数

2012年12月28日現在で、先端巨大症101例、プロラクチノーマ81例、クッシング病19例、下垂体機能低下症165例、バソプレシン分泌低下症50例、計416例が登録された(図1)。性年齢階級別人数は表1および図2の通りである。症例の診断年は2008年前後

が多いが、推定発症年は明確には分からないものも多い(図3)。

(2) 追跡状況

診断時からの経過年数は 5.4 ± 2.9 年(平均 \pm SD)である。診断年別にみた最大追跡年数の分布は表2の通りであり、平均(\pm SD)で 1.4 ± 2.5 年であり、今後も定期的な確認が必要である。

(3) 診断時の生活状況

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・調査年調整を行ったうえで、一般集団(平成16年、19年、22年国民生活基礎調査)と比較した(図4)。「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い。

(4) 登録後4年間の変化

登録後1~4年目の追跡データが登録された一部の症例について、「主観的健康観」と「健康上の理由で日常生活に影響のある者の割合」の経年的変化を縦断的に分析した結果を図5~6に示す。いずれの割合も、経時的に有意に改善していることが確認できる。

D. 考察

間脳下垂体疾患の予後を前向きに長期間追跡する研究は、わが国では初めてである。登録開始から6年間で416例が登録されたが、今後も疾患別の分析のための追加登録と、縦断的な追跡の継続が必要である。本研究では、患者の生活状況を一般集団と比較するために、厚生労働省の国民生活基礎調査と

同等の5つの項目を調べている。これらを用いて、今後生命予後のみならず、健康余命やQOL等に関する評価が可能となることが期待される。登録後1~4年目の追跡データが登録された一部の症例で縦断的な分析を試みたところ、「健康上の理由で日常生活に影響のある者の割合」(日常生活動作への影響、外出への影響、仕事・家事・学業への影響)と「主観的健康観」の改善傾向が確認された。今後、このような分析を治療法別に行うことにより、治療法とADLや症候等の改善との関係が明らかになることが期待される。そのためには、登録時情報を漏れなく収集することと、毎年の追跡調査を確実に行うことが重要である。追跡率を高めるための担当医への定期的な依頼法について、症例ごとに具体的に未記入箇所を明示するなどの工夫を試みていく予定である。

E. 結論

間脳下垂体疾患データベースへの症例登録と追跡を継続している。今後、追跡調査を確実にを行い、追跡データがある程度蓄積した段階で、逐次、縦断的・横断的集計結果を報告する予定である。長期間の追跡により、治療法や周囲の支援体制等に関する貴重な情報が得られることが期待される。

文 献

- 1) 間脳下垂体機能障害調査研究班. 間脳下垂体機能障害疫学調査報告. 厚生省特定疾患間脳下垂体機能障害調査研究班平成5年度総括研究事業報告書, 1994
- 2) 横山徹爾. 間脳下垂体機能障害の予後調査法に関する検討. 厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業間脳下垂体機能障害に関する調査研究平成14年度総括・

分担研究報告書. pp.91-95.

- 3) 横山徹爾, 間脳下垂体機能障害の予後調査法に関する検討. 厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業間脳下垂体機能障害に関する調査研究平成16年度総括・分担研究報告書. pp.85-89.
- 4) 横山徹爾, 間脳下垂体機能障害の長期予後追跡調査法に関する研究. 厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業間脳下垂体機能障害に関する調査研究平成17年度総括・分担研究報告書. pp.72-74.
- 5) 置村康彦, 他. 間脳下垂体データベースの構築. 厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業間脳下垂体機能障害に関する調査研究平成17年度総括・分担研究報告書. pp.107-109.
- 6) 横山徹爾, 他. 間脳下垂体機能障害の長

期予後追跡調査の解析計画. 厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業間脳下垂体機能障害に関する調査研究平成18年度総括・分担研究報告書. pp.80-83.

- 7) 文部科学省／厚生労働省. 疫学研究に関する倫理指針. 2002年6月17日(2004年12月28日全部改正).

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1. 間脳下垂体疾患データベース登録状況

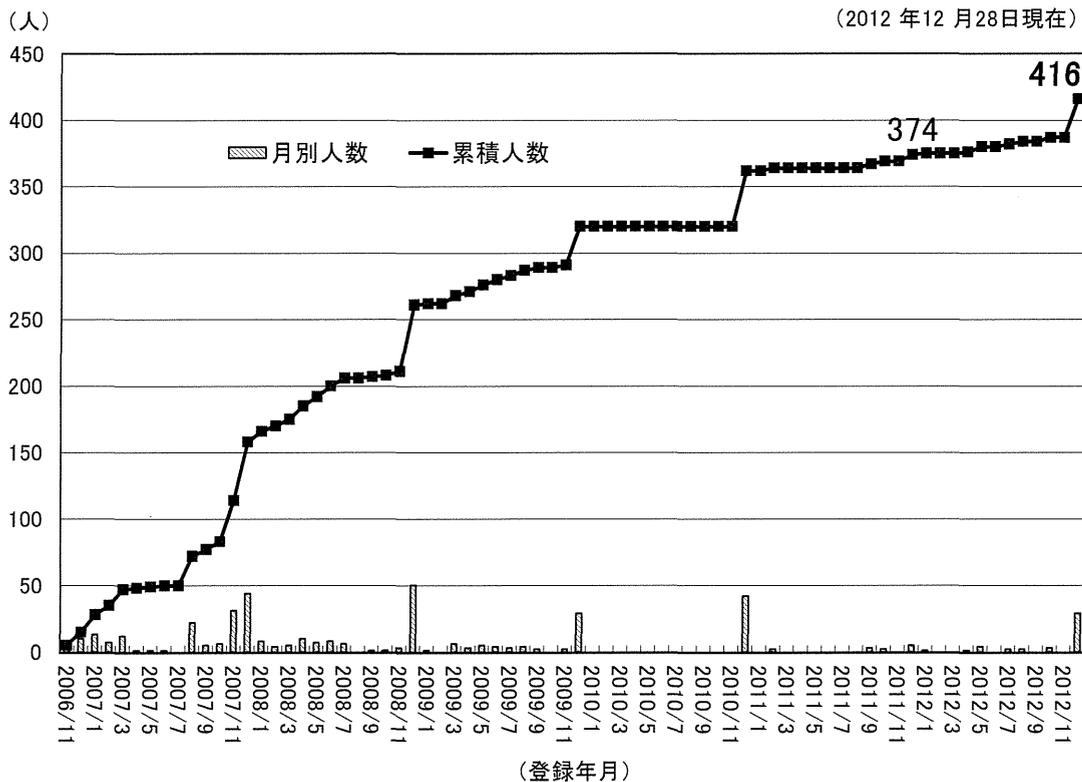


表1. 間脳下垂体疾患データベース疾患別登録数

2012年12月28日現在

| | | 年齢階級 | | | | | | | | | |
|---------------|---|------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 計 | 0- | 10- | 20- | 30- | 40- | 50- | 60- | 70- | 80+ |
| 1.先端巨大症 | 男 | 31 | 0 | 5 | 2 | 3 | 6 | 6 | 7 | 2 | 0 |
| | 女 | 70 | 0 | 1 | 0 | 6 | 14 | 26 | 15 | 8 | 0 |
| | 計 | 101 | 0 | 6 | 2 | 9 | 20 | 32 | 22 | 10 | 0 |
| 2.プロラクチノーマ | 男 | 24 | 0 | 2 | 8 | 4 | 4 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| | 女 | 57 | 0 | 8 | 27 | 12 | 7 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| | 計 | 81 | 0 | 10 | 35 | 16 | 11 | 8 | 1 | 0 | 0 |
| 3.クッシング病 | 男 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 女 | 17 | 0 | 1 | 2 | 5 | 4 | 1 | 3 | 1 | 0 |
| | 計 | 19 | 0 | 1 | 3 | 5 | 5 | 1 | 3 | 1 | 0 |
| 4.下垂体機能低下症 | 男 | 84 | 1 | 6 | 6 | 12 | 8 | 13 | 24 | 12 | 2 |
| | 女 | 81 | 1 | 5 | 6 | 10 | 10 | 19 | 21 | 9 | 0 |
| | 計 | 165 | 2 | 11 | 12 | 22 | 18 | 32 | 45 | 21 | 2 |
| 5.バソプレシン分泌低下症 | 男 | 19 | 0 | 2 | 2 | 4 | 2 | 1 | 3 | 3 | 2 |
| | 女 | 31 | 0 | 2 | 5 | 6 | 7 | 4 | 4 | 2 | 1 |
| | 計 | 50 | 0 | 4 | 7 | 10 | 9 | 5 | 7 | 5 | 3 |
| 1～5計 | 男 | 160 | 1 | 15 | 19 | 23 | 21 | 26 | 34 | 17 | 4 |
| | 女 | 256 | 1 | 17 | 40 | 39 | 42 | 52 | 44 | 20 | 1 |
| | 計 | 416 | 2 | 32 | 59 | 62 | 63 | 78 | 78 | 37 | 5 |

表2. 間脳下垂体データベース追跡状況

| 診断年 | 人数 | 最長追跡年数 | | | | | | | | | | | |
|--------|-----|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|
| | | 0年 | 1年 | 2年 | 3年 | 4年 | 5年 | 6年 | 7年 | 8年 | 9年 | 10年 | 11年 |
| 2001以前 | 32 | 63% | 0% | 0% | 0% | 0% | 3% | 0% | 9% | 0% | 0% | 22% | 3% |
| 2002 | 19 | 53% | 0% | 0% | 0% | 5% | 0% | 21% | 0% | 11% | 5% | 5% | - |
| 2003 | 16 | 44% | 0% | 0% | 19% | 0% | 13% | 6% | 13% | 0% | 6% | - | - |
| 2004 | 28 | 54% | 0% | 14% | 7% | 7% | 0% | 14% | 0% | 4% | - | - | - |
| 2005 | 40 | 48% | 13% | 3% | 20% | 10% | 5% | 3% | 0% | - | - | - | - |
| 2006 | 41 | 63% | 7% | 12% | 7% | 5% | 2% | 2% | - | - | - | - | - |
| 2007 | 57 | 81% | 4% | 11% | 5% | 0% | 0% | - | - | - | - | - | - |
| 2008 | 94 | 76% | 0% | 7% | 4% | 13% | - | - | - | - | - | - | - |
| 2009 | 31 | 77% | 3% | 3% | 16% | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2010 | 24 | 100% | 0% | 0% | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2011 | 16 | 100% | 0% | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2012 | 18 | 100% | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 合計 | 416 | 71% | 3% | 6% | 6% | 5% | 3% | 3% | 1% | 1% | 0% | 2% | 0% |

図2. 登録症例の性・年齢分布

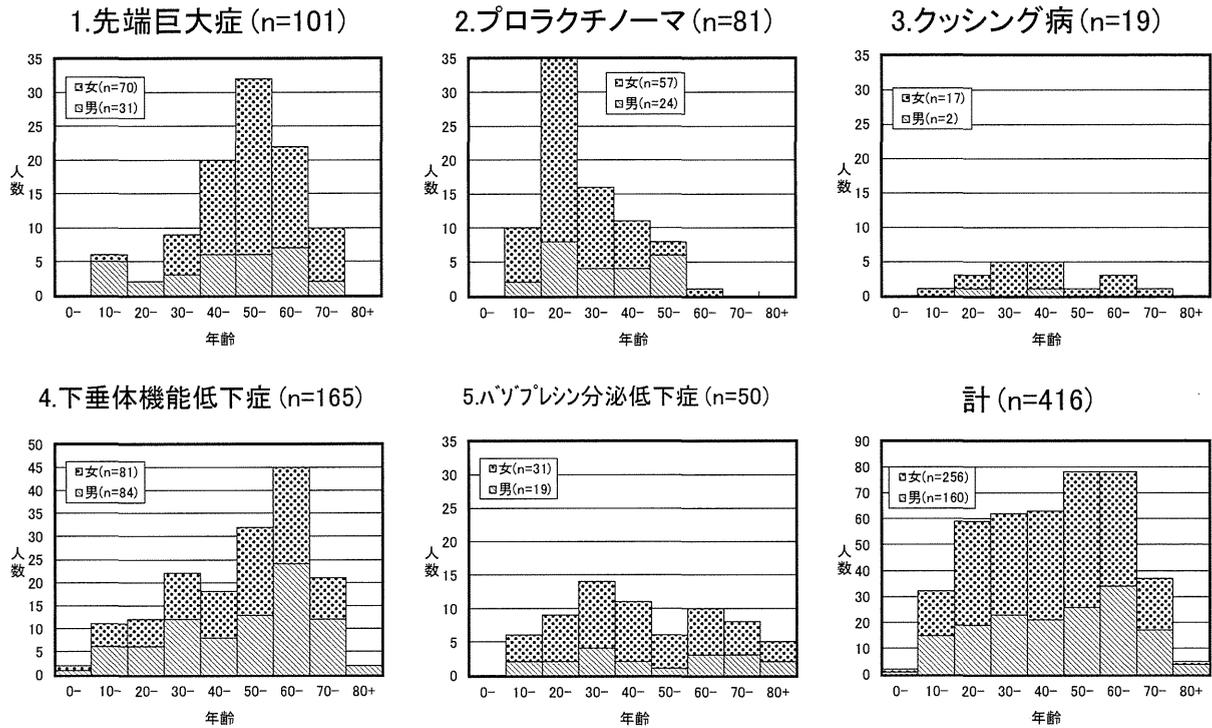


図3. 登録症例の診断年／推定発症年

