

図4. 健康上の問題で日常生活に影響のある者の割合

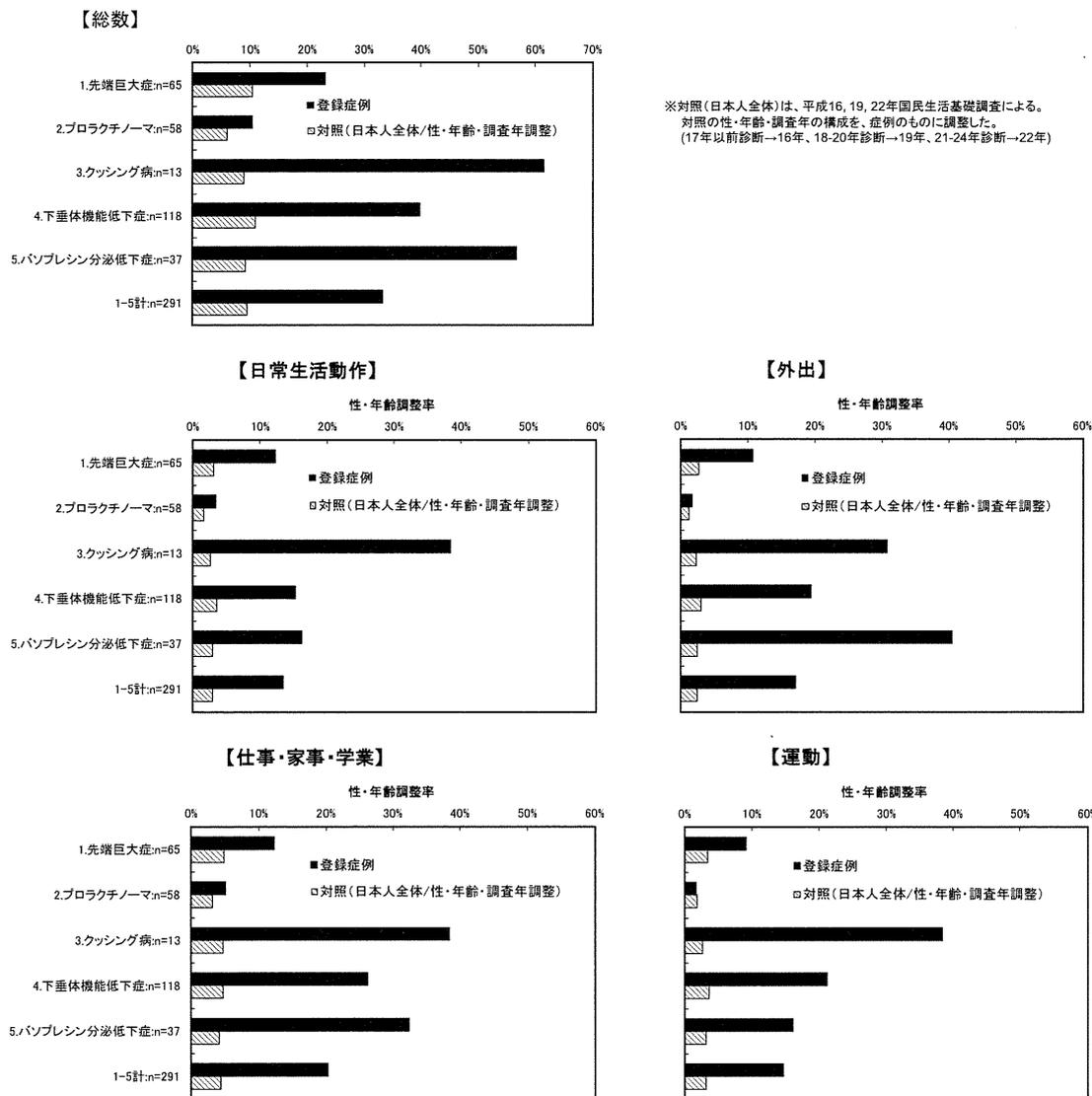


図5. 主観的健康観の経年的変化(5疾患計)

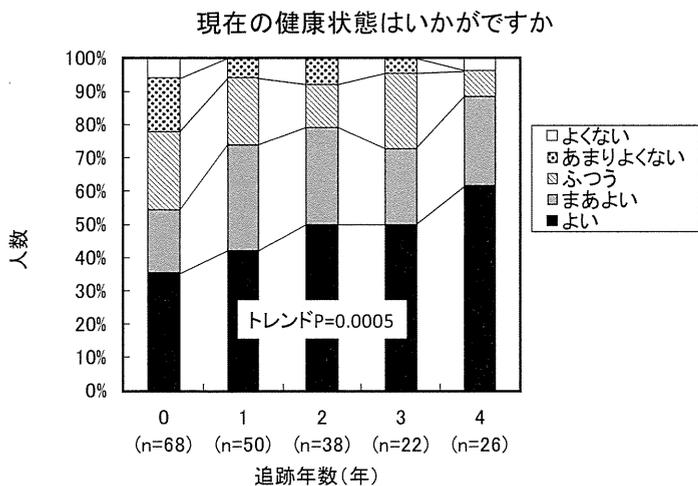
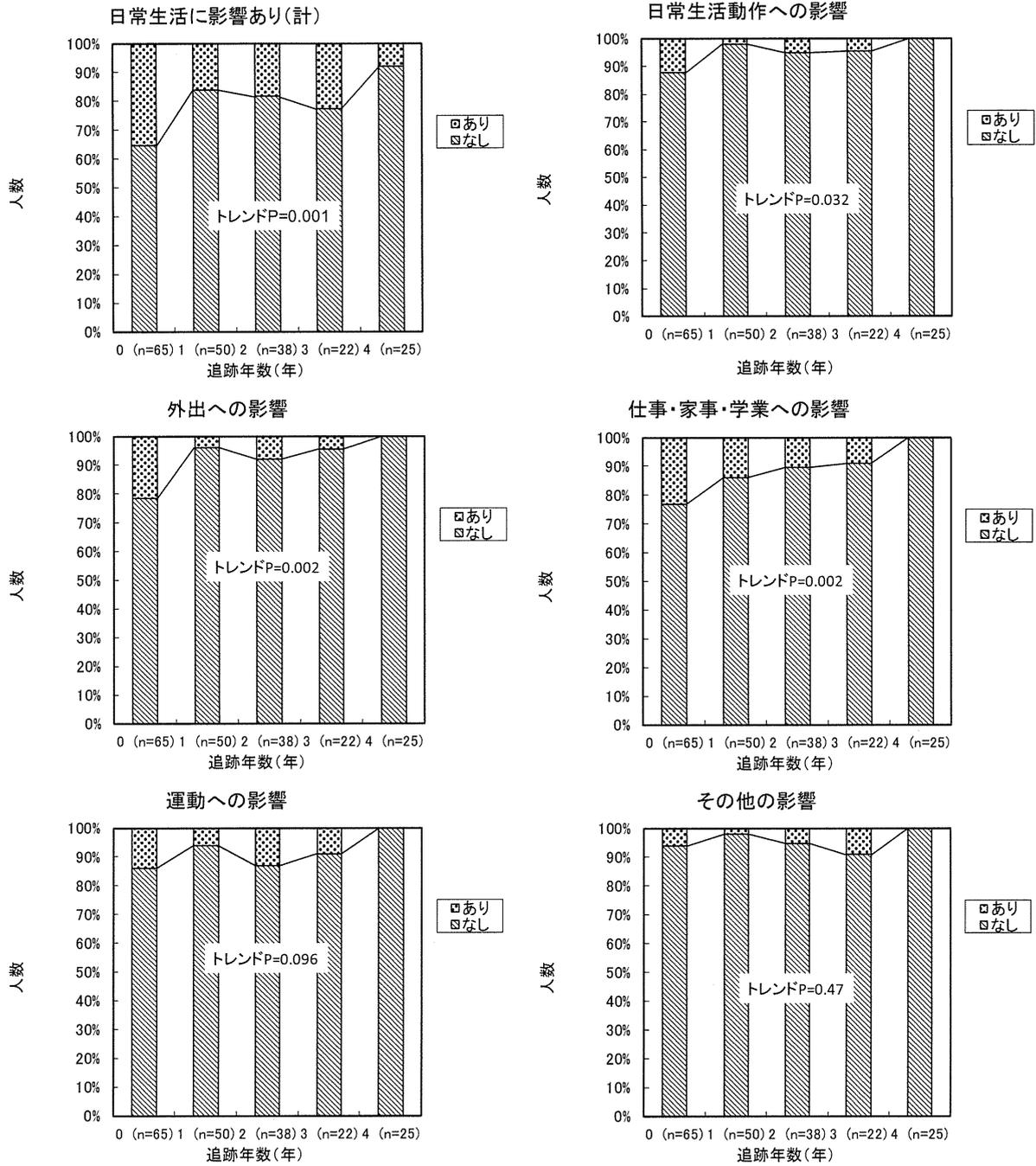


図5. 健康上の理由で日常生活に影響のある者の割合の経年的変化(5疾患計)



ヒトACTH産生腺腫細胞からの開口分泌の可視化解析

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

研究要旨: 2光子励起法によりヒトACTH産生細胞のACTH顆粒分泌を可視化し、分泌動態を解析した。

ヒトACTH産生腺腫のACTH過剰分泌の原因を明らかにするため、刺激を加えない状態で観察したところ、微小腺腫において自発開口分泌が認められた。これは、昨年報告した正常下垂体ACTH細胞では認められない現象であり、クッシング病の過剰なACTH分泌を説明するものである。CRHやAVPなどの生理的アゴニストによるACTH顆粒分泌の動態も調べた。CRHの投与を行うと、いったん自発分泌が減少したあと、30-60秒後に自発分泌を凌駕する活発な顆粒分泌が起こりはじめた。開口分泌は数秒で終了するfull fusionの分泌動態を示した。亢進した分泌は、投与後20分以上比較的長時間続いた。一方AVP投与では投与10秒以内に分泌が見られた。分泌は20分以上続き、分泌を形成する個々の顆粒分泌はCRH刺激と同様のfull fusionであった。これらの結果は、昨年解析した正常ACTH細胞と異なるものであり、機能性腺腫の分泌動態が正常細胞と異なることを示すものであった。また、一部の腺腫で、カベルゴリンとソマトスタチンによる自発開口分泌の抑制が観察され、これらの薬剤がクッシング病の治療に有効であることの基盤を明らかにできた。

A. 研究目的

クッシング病ではACTH産生腺腫からの過剰なACTH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。クッシング病の治療は手術的切除が第一選択であるが、手術のみで治癒に至らない場合や手術不能の場合は内科的治療が必要である。しかしながら下垂体腺腫をターゲットとした保険適応のある治療法はない。D2アゴニストやソマトスタチンアナログが下垂体をターゲットとした治療の候補となるがその作用機構の解明は不十分である。この作用機構を明らかにするためにも、ホルモン過剰分泌のしくみを解明すること必要であり、新しい治療法を模索するためにも必要である。このためにACTH顆粒分泌を解析する方法を確立する必要がある。

蛍光蛋白を用いた顆粒分泌現象の解析は、蛍光分子の設計に結果が左右されることが知られており、蛍光蛋白を用いない方法が求められる。またACTH細胞は細胞集塊中でまばらにしか存在しないため、薬理実験を行うためには、生きた状態で細胞同定しておく必要がある。

本研究の目的はACTH細胞を、生きた状態で細胞同定する方法を確立し、ACTH顆粒分泌を蛍光蛋白を用いないで解析する方法を確立することである。

Two-photon extracellular polar tracer法(TEP法)1,2は、水溶性の蛍光物質を細胞外液に分布させ、開口分泌によって細胞膜と分泌顆粒膜が融合して生じる Ω 型の分泌顆粒内に細胞外液の蛍光物質が流入したものを2光子励起蛍光顕微鏡によって輝点として検出す

るものである(図1)。TEP法は観察対象の細胞に事前処置(蛍光物質との融合蛋白のトランスフェクションなど)を必要としないため、インタクトな細胞における開口分泌現象の観察も可能である。この方法を用いてACTH顆粒分泌の可視化を試みた。

B. 研究方法

手術によって得られたヒトACTH産生腺腫細胞を30-50個の細胞からなる細胞集塊とし、可視化解析を行った。2光子励起法のTEP法を用いてACTH分泌を可視化し、観察を行った。実験は、一部を除いて30°Cの環境で行い、自発分泌の有無を観察し、CRHやAVPによる分泌を観察した

開口分泌の観察には蛍光物質としてsulforhodamine Bを用い、分泌顆粒の計測と分泌現象の解析を行った。実験には、OlympusのFluoview 1000を用いた。

C. 研究結果

ヒトACTH腺腫細胞からの開口分泌の可視化解析

細胞集塊にしたヒトACTH腺腫細胞塊を用いて2光子励起法のTEP法による観察を行った。細胞外液をSRBを含む細胞外液に置換すると、ただちに細胞間隙が蛍光で染まり、少なくとも分子量2000程度の分子は細胞間隙を自由に動きうる事が明らかになった(図2)。

C1. 自発分泌の証明

刺激をしない状態でACTH細胞を観察した。すると微小腺腫(n=5)においてはACTH腺腫細胞の辺縁に、蛍光輝点が急激に出現した後ただちに消失した。輝点の大きさは、 $320 \pm 110 \text{ nm}$ (n=20)であった。輝点の出現

は細胞間隙に接して生じ、ACTH顆粒分泌であると考えられた。full fusionの自発性開口分泌であると判断された。25°Cから35°Cまで、5°Cおきにmicroincubatorの環境温度を上昇させたところ、自発開口分泌は段階的に増加し35°Cでは25°Cの数倍に増加した。この分泌は、観察時間(40分)の間ずっと継続した。腺腫採取後、培養3日目まで、自発開口分泌は認められたが、その開口頻度や自発開口分泌を示す細胞の割合は、時間がたつにつれて減少していった。

C2. 生理的刺激因子の作用

ACTH分泌を特異的に促進するCRH(10nmol/L)を投与すると、いったん自発分泌が減少したあと、30-60秒後に自発分泌を凌駕する活発な顆粒分泌が起こりはじめた。ACTH細胞の辺縁に、蛍光輝点が急激に出現した後ただちに消失した(図3)。輝点の出現の時間経過は3秒近い経過で輝点の出現と消失が観察される分泌が観察された。一方、kiss-and-stay exocytosisやsequential exocytosisは認められなかった。この分泌は、細胞によって異なるものの、次第に頻度を減少させたが観察時間(40分)の間ずっと継続した。

AVP(10 nmol/L)刺激では、CRH刺激と異なる分泌経過で顆粒分泌が認められた。

刺激後いったん自発分泌が減少した後、10秒前後してから、自発分泌より頻度の多い開口分泌が認められた。このAVPによる分泌は比較的長く続き、分泌を形成する個々の顆粒分泌はCRH刺激と同様のfull fusionであった。

C3. クッシング病の治療薬の作用

クッシング病の治療についてACTH分泌

抑制を引き起こす薬剤の開発が期待されているが、これまでD2アゴニストとソマトスタチンアナログが一部の症例でACTH値の低下を起こしうることが知られている。そこで、これらの薬剤を用いて、クッシング病のACTH過剰分泌の原因と考えられる自発開口分泌が抑制可能であるかを検討した。自発分泌を証明できた5例のうち、2例でD2アゴニストのカベルゴリンによりACTHの自発分泌が有意に減少した。一方、祖的スタチンにより5例中3例でACTHの自発分泌が有意に減少した。

D. 考察

D1. 自発分泌

ヒトACTH産生腺腫において、何ら刺激なく腺腫細胞からの自発開口分泌が認められた。この現象は昨年研究した正常ACTH細胞では認められない現象であり、これがクッシング病でのACTH過剰の原因のひとつであることが明らかになった。先端巨大症の原因であるヒトGH産生腺腫でも同様の自発開口分泌がみられたが、クッシング病の原因であるACTH産生腺腫でもみとめられたことから、自発性開口分泌が機能性下垂体腺腫の共通する重要な病態生理であることが示唆されたと考える。今後、他の機能性下垂体腺腫についても解明を進めることが重要である。

また、開口分泌の動態も正常ACTH細胞で生理的刺激で起こる開口分泌とは異なっていることが判明した。正常細胞では生理的刺激により開口時間が1秒未満の速い開口分泌が生じるのが主体であるのに対し、腺腫細胞では3秒程度の比較的ゆっくりした開口分泌が認められた。

D2. 刺激因子の作用

CRH刺激とAVP刺激では、分泌の時間経過のことなる分泌現象が観察された。

昨年解析した正常ACTH細胞では、CRH分泌の方が開口分泌の頻度は多く、長く刺激された。しかしながら、ヒトACTH産生腺腫ではCRH、AVPともに同程度の開口分泌が観察された。クッシング病の診断にAVP2受容体作動薬のデスマプレシン刺激試験が用いられるが、クッシング病の原因のヒトACTH産生腺腫が正常ACTH細胞よりAVPによりよく反応することは、この刺激試験の有用性の基礎を与える結果である。

D3. 治療薬の作用

クッシング病の治療についてACTH分泌抑制を引き起こす薬剤の開発が期待されているが、これまでD2アゴニストとソマトスタチンアナログが一部の症例でACTH値の低下を起こしうることが知られている。今回、自発分泌を検討できた腺腫5例のうち一部であるが、D2アゴニストのカベルゴリンとソマトスタチンにより自発性ACTH分泌の抑制が認められたことから、これらの薬剤の作用機序が明らかにできると考えられる。

E. 結論

ヒトACTH産生腺腫細胞は、刺激のない状態でも自発性の開口分泌を示した。これは、正常ACTH細胞では見られない現象で、このことは、ACTH産生下垂体腺腫によるACTH過剰分泌が、自発開口分泌によって示している。CRH刺激やAVP刺激による顆粒分泌を可視化し解析した。ヒトACTH産生腺腫細胞は正常ACTH細胞に比してAVPに対する反応性が強いことが示された。また、ACTH分泌を抑制する作用をもつ

クッシング病の治療薬の候補が、実際に一部の腺腫からの自発開口分泌を抑制し、治療に有用であることを示すことができた。

参考文献

- 1) Nemoto T, et al: Nat Cell Biol, 3: 253, 2001.
- 2) Takahashi N & Kasai H: Endocr J, 54: 337, 2007.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究成果発表文献

1. 論文発表

- 1) Hideomi Yamada, Koji Takano, Nobuhira Ayuzawa, George Seki and Toshiro Fujita Re-lowering of serum Na for osmotic demyelinating syndrome. Case Reports in Neurological Medicine, 2012
- 2) Toshio Hirohata, Kenichiro Asano; Shingo Takano, Kazunori Arita, Shigeyuki Tahara,

Koji Takano, et al. DNA mismatch repair protein MSH6 correlated with the responses of atypical pituitary adenomas and pituitary carcinomas to temozolomide: The national cooperative study by the Japan Society for Hypothalamic and Pituitary Tumors. J. Clin. Endocrinol. & Metab..in press, 2013

- 3) Hirohata T, Saito N, Takano K, Yamada S, Son JH, Yamada SM, Nakaguchi H, Hoya K, Murakami M, Mizutani A, Okinaga H, Matsuno A. Urinary growth hormone level and insulin-like growth factor-1 standard deviation score (IGF-SDS) can discriminate adult patients with severe growth hormone deficiency. Endocr J. 2012 Nov 29. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

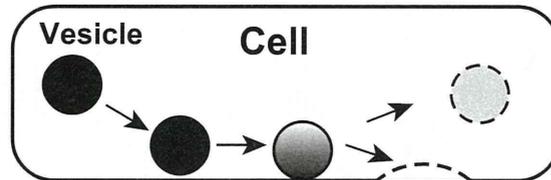
該当なし

図1. Two-photon extracellular polar tracer 法 (TEP 法)

- (A) 分泌顆粒を可視化する通常の方法は、分泌顆粒の内容物や顆粒膜を蛍光物質で標識し、開口分泌を蛍光物質で染色された分泌顆粒の消失として観察するものである。この方法では通常の蛍光顕微鏡で観察できるが、分泌顆粒を蛍光させるために人為的な融合蛍光蛋白をトランスフェクションするなどの操作が必要であり、臨床検体の観察には適さない。
- (B) TEP法では細胞外に水溶性蛍光性物質を分布させ、分泌顆粒膜が細胞膜に融合した以降に分泌顆粒が蛍光する (post-fusion labeling)。このため臨床検体でも観察可能である。ただし開口分泌の検出には2光子励起顕微鏡が必要である。(文献2より改変引用。)

A. 通常の画像

Intracellular
Fluorescence
tracer



B. TEP画像 Extracellular

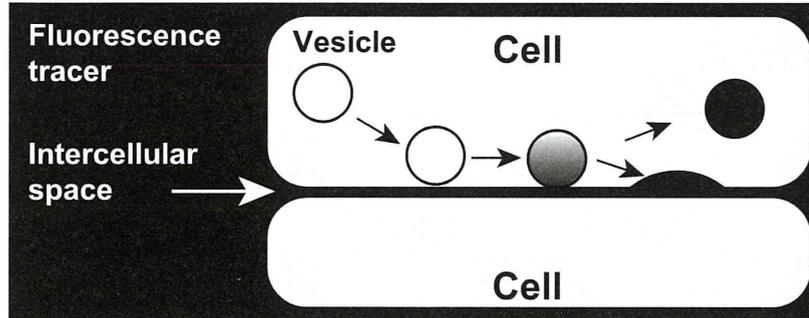


図2. 2光子励起法のTEP法を用いたヒトACTH腺腫細胞集塊の構造

細胞外にSRBを流すと、直ちに細胞間隙に蛍光物質が分布する

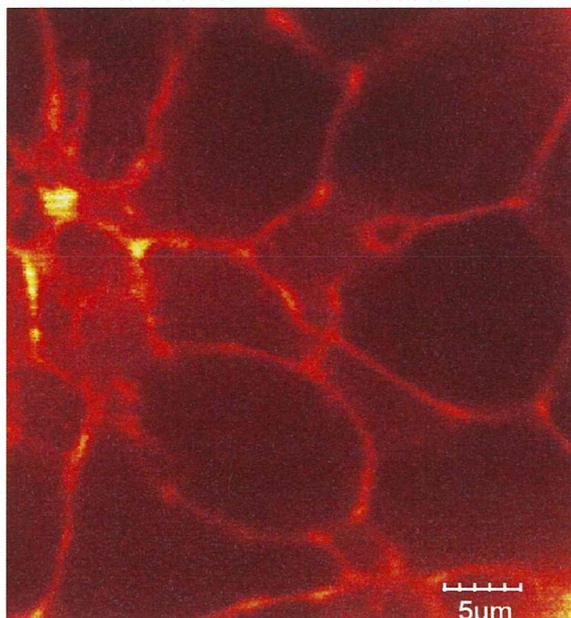
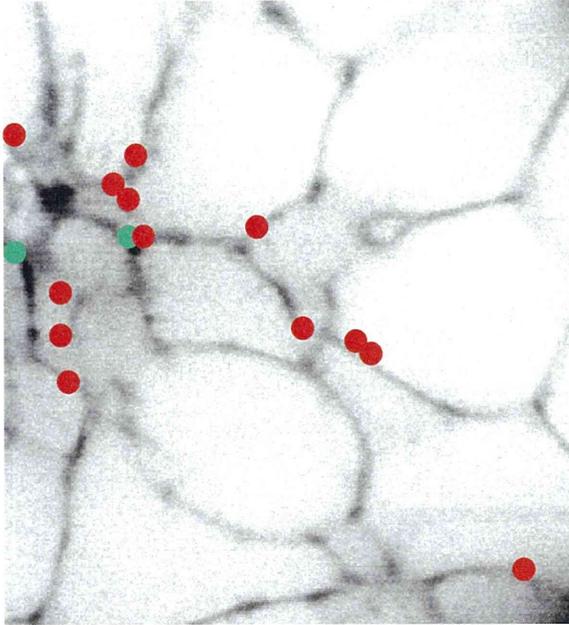


図3. CRH 刺激による ACTH 分泌の可視化像

CRH 刺激により生じた ACTH 分泌は、図の赤い点で示されるように、細胞間隙に接した細胞縁に生じ、毛細血管に接する場所以外の細胞間隙にもよく開口していた。自発分泌でも、同様の結果が得られている。



V. 重点研究課題報告書

自己免疫性視床下部下垂体炎の診断法の 確立に関する研究

— 臨床診断法と再分類の試み —

研究代表者	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
研究分担者	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
	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
	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	難波 多挙	国立病院機構京都医療センター内分泌・代謝内科
	沖 隆	浜松医科大学第二内科
	桑原(島津)智子	京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科
	白井 健	国立病院機構京都医療センター臨床研究センター
	田上 哲也	国立病院機構京都医療センター内分泌・代謝内科
	成瀬 光荣	国立病院機構京都医療センター臨床研究センター内分泌代謝高血圧研究部

研究要旨：視床下部下垂体炎は、病変により前葉炎、漏斗後葉炎、汎下垂体炎に大別され、原因が不明の原発性と他疾患に併発する二次性(続発性)に分けられる。臨床診断法を明らかにし再分類のため、視床下部下垂体炎が疑われる症例を集積した。自験例は12例(男/女:7/5)、年齢26歳~78歳。中枢性尿崩症のみ2例、下垂体機能低下症のみ5例、両者合併5例。下垂体茎腫大11例、下垂体腫大11例。治療前IgG4高値は3/7例。IgG4関連疾患では後腹膜、顎下腺、脾、硬膜。サルコイドーシス1例とトローサ・ハント症候群1例以外は基礎疾患不詳。ステロイドの補充量で4例に腫大軽減。薬理量で4例に腫大軽減したが2例で再燃あり。下垂体病理組織は5例に得られ、3例でIgG4陽性細胞の著明な浸潤を認めた。原因が不明の下垂体炎に半数近くIgG4関連漏斗下垂体炎が疑われること、IgG4関連漏斗下垂体炎単独やIgG4濃度が高値を示さない場合があり、下垂体病理組織による診断にも困難があることが明らかにされた。

A. 研究目的

下垂体の炎症性疾患はまれであるが、MR検査機器が普及しているわが国ではいわゆる下垂体炎の報告例が諸外国と比較して多い。自己免疫性視床下部下垂体炎¹⁾は、病変の主座により前葉または下垂体茎~後葉および両者を侵す疾患群に大別され、典型的な前葉炎は妊娠後期~産褥期の女性に多く、下垂体腫瘍および下垂体機能低下の形をとり、漏斗下

垂体後葉炎は中枢性尿崩症の形をとる。一方、発生学的に異なる前葉と後葉を同時に侵す汎下垂体炎の原因は多様であり、下垂体後葉から前葉へ炎症が波及したと考えられる例、ラトケ嚢胞や頭蓋咽頭腫、下垂体腺腫などに伴う二次性下垂体炎、特殊な感染症や全身性肉芽腫性疾患に伴う下垂体炎のほか、肥厚性硬膜炎やTolosa-Hunt症候群などの傍鞍部非特異的炎症や多巣性繊維硬化症に伴うも

のなども報告されている。近年、日本発の新規疾病概念であるIgG4関連疾患²⁾が知られるようになり、それに伴う漏斗下垂体病変の報告が相次いでいる。臨床的診断法はまだ確立しておらず、自己免疫性視床下部下垂体炎の再分類のために、いわゆる視床下部下垂体炎の自験例からその臨床像について検討を加えた³⁾。

B. 研究方法

最近の8年間で視床下部下垂体病変が疑われた12例を対象とした。診療録から、臨床症状と症候、臨床検査、下垂体前葉および後葉機能、下垂体MRI画像、他臓器への関連病変、病理組織所見、治療法とその臨床経過の各項目について後ろ向き調査を行った。

倫理面への配慮では、「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、個人情報保護を図るとともに、所属施設の倫理規程を遵守した。

C. 研究結果

症例は12例(男/女:7/5)、年齢は26歳から78歳にわたり、平均60歳であった。

表1にIgG4関連漏斗下垂体病変の5例(cases 1~5)とそれ以外の漏斗下垂体病変の7例(cases 6~12)を示した。臨床所見として、中枢性尿崩症のみ2例、下垂体機能低下症のみ4例、両者合併6例であった。下垂体のMRI検査では、下垂体茎腫大を11例、下垂体腫大を11例に認めた。臨床検査所見では、治療前IgG4値が高値を示した症例は7例中3例であった。

IgG4関連疾患として、後腹膜線維症2例、硬化性顎下腺炎2例、自己免疫性膵炎1例、再発性肥厚性硬膜炎1例を認めた。他の併発疾患では、サルコイドーシスが1例、トローサ・ハント症候群1例、脳梗塞1例、橋本病

6例であった。

臨床経過として、副腎皮質機能低下症に対するグルココルチコイド補充量により4例で下垂体および茎の腫大は軽減した。ステロイド薬理量では4例に下垂体茎の腫大は軽減したが、内2例でステロイドの減量に伴い再燃を繰り返した。尿崩症や下垂体機能低下症の発症が、IgG4関連疾患の発見に先行する例が2例(23年後、10年後)に認められた。下垂体単独病変も1例に認められ、5年の経過中他臓器にIgG4関連疾患を認めていない。

下垂体の生検組織は、表1の症例*に示した5例で得られ、内3例でIgG4陽性細胞の著明な浸潤が認められ、IgG4関連疾患に伴う漏斗下垂体炎と診断された。

D. 考察

下垂体の炎症性疾患、いわゆる下垂体炎はその成因に自己免疫学的機序が想定され、漏斗部にも炎症がみられ、自己免疫性視床下部下垂体炎¹⁾と捉えられている。厚生労働省の間脳下垂体機能障害に関する調査研究班による全国調査⁴⁾では、1997年1年間に107例の下垂体炎の患者が報告され、1年間の受療患者の推定数は170例(95%信頼区間:120-220例)であった。二次調査では、前葉障害、後葉障害、前葉+後葉障害はほぼ同数であった。2000年の疫学調査では成人下垂体機能低下症に占める下垂体炎の頻度は2.4%(501例中12例)に過ぎない。

IgG4関連疾患に合併した下垂体機能障害の報告が相次ぎ、2000年以降の論文や学会発表に基づいて2009年にIgG4関連漏斗下垂体病変を新たな疾患概念として提唱するに至った⁵⁾。その後の報告を追加し、論文発表および自験例の中でIgG4関連疾患と組織学的に確認された例に限定して、その臨床的

特徴をまとめて報告した⁶⁾。

視床下部・下垂体近傍の臨床症状では、下垂体周囲組織の障害により、視力視野障害、下垂体前葉機能低下、尿崩症のほか、脳硬膜髄膜炎、海綿静脈洞炎、副鼻腔炎が引き起こされる。下垂体周囲組織を巻き込んだ慢性炎症として肥厚性硬膜炎や海綿静脈洞炎症候群を伴った傍トルコ鞍部非特異的炎症の病態が知られており、IgG4関連漏斗下垂体炎でもトルコ鞍近傍の硬膜炎や副鼻腔病、眼窩病変を伴う例やTolosa-Hunt症候群が認められ、局所病変に伴う二次性(続発性)下垂体炎(表2⁷⁾)に含まれる。

多巣性線維硬化症に伴う下垂体病変の報告例は、IgG4関連漏斗下垂体炎と同様に下垂体前葉機能低下または尿崩症+下垂体前葉機能低下の症状で発見され、ステロイド治療により比較的早期に下垂体腫瘍、下垂体茎腫大の縮小と下垂体機能の一部回復がみられるという特徴を有し、全身性IgG4関連疾患に伴う二次性(続発性)下垂体炎(表2)と位置づけられる。一方、今回の症例でみられた尿崩症を初発とする例や下垂体機能低下症の単独例においては、長期経過観察でIgG4関連疾患が発見されるまでは原発性下垂体病変(表2)として扱うことになる。

Leporatiら⁸⁾は、IgG4関連下垂体炎の診断基準として、1)単核球浸潤(リンパ球および形質細胞、IgG4陽性細胞>10個以上/HPF)を示す下垂体の病理組織所見、2)トルコ鞍腫瘍および/または下垂体茎腫大を示すMRI所見、3)組織学的に証明された下垂体以外の臓器病変、4)血清IgG4高値(>140mg/dl)の血清学的所見、5)腫瘍や症状のステロイド反応性、をとりあげ、1)単独、2)+3)、2)+4)+5)を満たす場合、IgG4関連下垂体炎と確定診断することを提唱している。一方、

わが国の包括的診断基準²⁾では、ステロイドに関して、①安易なステロイドトライアルは厳に慎むべきである、②診断はできる限り病理組織を採取する努力をすべきである、ただし、膣、後腹膜、脳下垂体病変など組織診の難しい臓器に限っては、ステロイド効果のある場合、本疾患の可能性もある、③初期使用量はプレドニゾロン0.5~0.6mg/kg/dayが推奨される、初回治療でのステロイド無効例は診断を見直すべきである、と解説を加えている。今回検討した漏斗下垂体炎では、補充量のステロイドで寛解する例もあるが、ステロイド減量時に再燃し治療に難渋する例が認められた。ステロイド反応性良好とする基準のとり扱いには議論の余地があろう。

自己免疫性視床下部下垂体炎の確定診断は生検や手術による下垂体または下垂体茎の組織所見により行なわれる。実際には生検が困難なことも多い。原則的に除外診断によるため、類似病変を示す疾患の鑑別が重要であり、可能であればステロイド治療前に病変部の組織学的検索が望まれる⁶⁾。ラトケ嚢胞や頭蓋咽頭腫などの病変周囲にIgG4陽性細胞が集簇して浸潤している組織像が得られることがある。しかし、これらはIgG4関連漏斗下垂体炎とは考えがたい。

リンパ球性下垂体炎では自己免疫性甲状腺疾患(橋本病)の合併頻度が高いが、IgG4関連漏斗下垂体炎でも合併がみられる。GHおよびACTHに対する自己抗体がIgG4関連下垂体炎で報告されている。最近、名古屋大学の梶村、大磯ら⁹⁾は、漏斗下垂体後葉炎の患者血清と下垂体後葉抽出蛋白による免疫沈降物を高精度質量分析装置により分析し自己抗原の網羅的同定を行なった。その中で感度、特異度ともに高い76kDa蛋白

(Rabphilin-3A)に対する自己抗体を報告し、漏斗下垂体後葉炎の疾患マーカーとして提唱している。IgG4関連漏斗下垂体炎でも陽性例がみられ、今後幅広い臨床応用が期待される。

E. 結語

原因がはっきりしない下垂体炎の症例のなかで、半数近くIgG4関連漏斗下垂体炎が疑われる例があること、IgG4関連漏斗下垂体炎単独やIgG4濃度が高値を示さない場合があり、下垂体病理組織による診断にも困難な例があること、が明らかにされた。今後、自己免疫性視床下部下垂体炎の再分類を行い、臨床診断法を確立する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 島津 章, 島津智子, 難波多挙, 沖 隆. III. 内分泌 B. 臨床分野での進歩 1. IgG4関連漏斗下垂体炎: 自己免疫性視床下部下垂体炎との関連について. 「Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌 2012」, 寺内康夫, 石橋 俊, 伊藤 裕 編集, 中外医学社, 東京, pp.199-206, 2012年
- 2) 島津 章. V. 消化管以外の重要なIgG4関連全身疾患. 1. 中枢神経系病変—漏斗下垂体炎を中心に. 特集「明らかにされた自己免疫性膵炎および周辺疾患」. 肝胆膵 64(1): 113-121, 2012年
- 3) 厚生労働省難治性疾患対策事業 奨励研究分野IgG4関連全身硬化性疾患の診断法の確立と治療方法の開発に関する研究班, 新規疾患, IgG4関連多臓器リンパ増殖性疾患(IgG4+MOLPS)の確立のための研究班. IgG4関連疾患包括診断基準2011, 日本内科学会雑誌 101(3): 795-804, 2012年

- 4) 島津 章. 20 IgG4関連漏斗下垂体炎. 「下垂体疾患診療マニュアル」, 平田結喜諸, 山田正三, 成瀬光栄 編集, 診断と治療社, 東京, pp.182-184, 2012
- 5) 島津 章, 難波多挙, 沖 隆, 桑原(島津)智子, 金本巨哲, 白井 健, 田上哲也, 成瀬光栄. 下垂体炎の臨床例からみた“リンパ球性”漏斗下垂体炎の診断について. 第22回日本間脳下垂体腫瘍学会Proceeding, 日本内分泌学会雑誌 88(Suppl.): 68-71, 2012年
- 6) 島津 章. Topics 自己免疫性視床下部下垂体炎: 最近の進歩. 医学のあゆみ 242(6): 542-543, 2012

2. 学会発表

- 1) 島津 章, 難波多挙, 沖 隆, 金本巨哲, 白井 健, 田上哲也, 成瀬光栄. シンポジウム2「下垂体炎の診断と治療」 下垂体炎の臨床例からみたリンパ球性下垂体炎の鑑別診断について. 第22回日本間脳下垂体腫瘍学会, 東京, 2012年2月24日
- 2) 島津 章. 特別講演「トルコ鞍・下垂体の炎症性疾患: 再分類に向けて」. 第12回特定営利活動法人東北内分泌研究会/第24回日本内分泌学会東北地方会, 仙台市, 平成24年4月7日
- 3) 島津 章. 教育講演12. 下垂体機能低下症の診療: 最近の進歩から. 第85回日本内分泌学会学術総会, 名古屋市, 2012年4月20日(EL12)
- 4) 服部尚樹, 石原 隆, 島津 章. シンポジウム②「下垂体と自己免疫」, 下垂体ホルモンに対する自己抗体. 北九州市, 第39回日本神経内分泌学会学術集会, 北九州市, 2012年9月28-29日
- 5) 湯野暁子, 辰口治樹, 仲谷 了, 伊古田明美, 澤村 豊, 小泉茂樹, 島津 章.

尿崩症で発症し、胚腫との鑑別を要したリンパ球性下垂体炎の1例. 第92回北海道医学大会内分泌分科会・第12回日本内分泌学会北海道地方会, 札幌市, 2012年10月6日

6) 島津 章. 特別講演2「いわゆる下垂体炎をどう整理するか」. 第3回兵庫間脳下垂体疾患フォーラム, 神戸市, 平成24年12月14日

7) 島津 章. 教育講演「下垂体疾患の診療: 最近の進歩」. 第12回日本内分泌学会東海支部会, 静岡市, 2013年2月23日

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

参考文献

- 1) 島津 章. 自己免疫性視床下部下垂体炎. 日本臨牀 内分泌症候群(第2版), 日本臨牀社, 大阪, 2006, pp. 37-40
- 2) Umehara H, Okazaki K, Masaki Y, et al. Comprehensive diagnostic criteria for IgG4-related disease (IgG4-RD), 2011. *Mod Rheumatol* 2012; 22: 21-30
- 3) 島津 章, 難波多挙, 沖 隆, 桑原(島津)智子, 金本巨哲, 白井 健, 田上哲也, 成瀬光栄. 下垂体炎の臨床例からみた“リンパ球性”漏斗下垂体炎の診断について. 第22回日本間脳下垂体腫瘍学会 Proceeding, 日本内分泌学会雑誌 2012; 88 (Suppl.): 68-71
- 4) 島津 章. 中枢神経系病変—漏斗下垂体炎を中心に. 特集「明らかにされた自己免疫性膵炎および周辺疾患」. *肝胆膵* 2012; 64 (1): 113-121
- 5) Shimatsu A, Oki Y, Fujisawa I, et al. Pituitary and stalk lesions (infundibulohypophysitis) associated with immunoglobulin G4-related systemic disease: an emerging clinical entity. *Endocr J* 2009; 56 (9): 1033-1041
- 6) 島津 章, 島津智子, 難波多挙, 他. IgG4関連漏斗下垂体炎: 自己免疫性視床下部下垂体炎との関連について. 「Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌 2012」, 寺内康夫, 石橋 俊, 伊藤 裕 編集, 中外医学社, 東京, 2012, pp.199-206
- 7) 島津 章. Topics 自己免疫性視床下部下垂体炎: 最近の進歩. *医学のあゆみ* 2012; 242 (6): 542-543
- 8) Leporati P, Landek-Salgado MA, Lupi I, et al. IgG4-related hypophysitis: a new addition to the hypophysitis spectrum. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96 (7): 1971-1980
- 9) 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班 平成23年度総括・分担研究報告書(研究代表者 大磯ユタカ), 2012, pp.141-146

表1. 漏斗下垂体病変を示した自験例 (n=12)

Case	初発年齢・性	下垂体病変	全身病変(異時性)	IgG4 濃度 (mg/dl)	治療 投与量/日
1	50 F*	尿崩症+下垂体機能低下症	肥厚性硬膜炎(同時) 本病	—	Pred 40mg
2	52 F	尿崩症	自己免疫性睪炎**(23年後) 橋本病	47, 87	外科手術
3	70 M	尿崩症+下垂体機能低下症	顎下腺炎**(10年後) RPF(10年後) 橋本病	132→203	HC 5mg →Pred 20mg
4	72 M*	下垂体機能低下症	—	181	Pred 60mg
5	78 F*	下垂体機能低下症 (尿崩症)	顎下腺炎**(9年前) RPF(同時)	143	HC 15mg
6	26 M*	尿崩症	—	36	—
7	51 M	下垂体機能低下症	Sarcoidosis** 橋本病	92	Pred 10mg
8	54 F*	尿崩症+下垂体機能低下症	Tolosa-Hunt 症候群(同時)	—	HC 15mg
9	60 M	下垂体機能低下症	脳梗塞	—	Pred 7.5mg
10	63 M	下垂体機能低下症	橋本病	—	HC 20mg
11	71 F	下垂体機能低下症 (尿崩症)	橋本病	23	HC 15mg
12	72 F	尿崩症+下垂体機能低下症	—	—	HC 15mg

*: 下垂体生検, **: 病変部生検, (尿崩症): 仮面尿崩症, PRF: 後腹膜線維症
Pred: プレドニゾロン, HC: ヒドロコルチゾン

表2. 視床下部下垂体炎の分類 案

<ul style="list-style-type: none"> • 原発性下垂体炎 - リンパ球性 - 肉芽腫性 - 黄色腫性 - (黄色肉芽腫性) - (壊死性) - IgG4形質細胞性 	<ul style="list-style-type: none"> • 二次性(続発性)下垂体炎 局所病変 - 胚細胞腫 - ラトケ嚢胞 - 頭蓋咽頭腫 - 下垂体腺腫 - 傍鞍部非特異的炎症など 全身性疾患 - サルコイドーシス - ウェゲナー肉芽腫症 - ランゲルハンス細胞組織球症 - 梅毒 結核 - IgG4関連疾患
--	--

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
	田原 重志	日本医科大学大学院医学研究科神経病態解析学
	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、ゲノムワイドに検討する探索的手法で探求した。ゲノムワイドの解析として、24例のGH産生腺腫を用いてゲノムワイド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性の *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* 変異の有無でこの領域のDNAメチル化状態に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について hierarchical clustering analysis を行ったところ、明らかに異なる2つの群に分かれた。これら2つのクラスターは *gsp* 変異の有無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、*gsp* 変異陰性症例(以後、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。このことから wild type のGH産生腺腫には2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、いくつか明らかにされている。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⁾ものの、これ以外の体細胞変異の関与は機能性下垂体腺腫の発生原因遺伝子として

十分に明らかにされていない。最近分かった家族性下垂体腺腫の原因遺伝子の体細胞変異は若年例の一部に認められることがわかってきたが、*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、孤発性下垂体腺腫に認められることは極めて少ない。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。本年度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、ゲノムワイドの探索解析により明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

本年度は、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。具体的には、①正常下垂体組織のメチロームとの比較②*gsp*変異の有無とゲノムワイドのメチロームの解析の二つの解析を行った。

B-1. 網羅的メチローム解析

【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24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。これら全例でゲノムワイドのメチローム解析を行い、正常ヒト下垂体組織のメチロームと比較した。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ゲノムDNAを作成し、イルミナ社のInfinium Human Methylation 450 Bead Chipを用いて網羅的なメチローム解析を行った。ヒト下垂体組織、腺腫細胞を用いた研究については、倫理委員会に申請し、承諾を得た。手術材料を用いる場合、患者さんに事前に書面によるインフォームドコンセントを得て行い、また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。

ヒトGH産生腺腫においては本邦の患者でも体細胞性の*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。

B-2. *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をとともに解析した。

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

B-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)。

C. 研究結果

C-1. 正常下垂体組織と腺腫組織の網羅的メチローム比較

正常下垂体組織と腺腫組織の網羅的メチローム比較を行ったところ、複数の腫瘍で共通してメチル化状態が正常組織と異なる遺伝子が多数見出された。これらの中には、メチル化の亢進している遺伝子も、メチル化の低下している遺伝子も見られた。Duong CVらの報告(Endocr Relat Cancer. 19: 805-16, 2012).では、3例のGH腺腫と正常下垂体でメチル化の亢進が認められた21遺伝子が紹介されているが(図1)、探索群の症例を増やすと多くの遺伝子の変動が見出され、メチル化の低下を示す遺伝子も複数検出された。図2に示す報告のある下記5遺伝子のうち*RASSF1A*以外はDuong CVらの腺腫3例を用いた報告では見出されなかったが、研究班の24例を用いた報告では検出でき、*gsp*変異の有無でメチル化状態に差がないことも判明した。

C-2. *GNAS*近傍のエピゲノム解析と *gsp* 変異の有無によるメチロームの相違

*GNAS*近傍のエピゲノム解析

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⁾、*Gsα*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(図3)。GH産生腺腫では *GNAS* の imprinting の relaxation が報告されているが、これを強く支持する結果とはならなかった。

gsp 変異の有無によるメチロームの相違

ゲノムワイドに解析した結果について hierarchical clustering analysis を行ったところ、明らかに異なる2つの群に分かれた。2つのクラスターが *gsp* 変異の有無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2つの群があり、片方は *gsp* 変異群と近似した出来事(例えば *Gsα*-cAMP-PKA経路の体細胞変異)が起こっていることが考えられた。

GH産生腺腫でこれまでに発現異常が報告されている遺伝子を詳細に調べてみると、そのメチル化異常が *gsp* 変異と無関係に起こっているもの、*gsp* 変異がある腫瘍でメチル化が亢進しているもの、*gsp* 変異がある腫瘍でメチル化が抑制されているものなどがあり、GH産生腫瘍のメチローム解析には *gsp* 変異の有無の情報が不可欠であり、メチル化異常の意義も腫瘍の *gsp* 変異の有無によって異なってくるのが明らかになった。

D. 考察

D-1. 正常下垂体組織と腺腫組織の網羅的メチローム比較

これまで、標的遺伝子の発現を正常下垂体組織と下垂体腺腫組織で比較した研究や、腺腫RNAアレイを用いて、正常下垂体組織と腺腫組織で遺伝子発現の違いを網羅的に解析する試みはいくつかなされてきたが、RNAアレイは、検体採取条件とその後の保存条件に大きく影響を受けるという限界がある。我々は、RNAアレイに比してこれらの条件の影響を受けにくいメチローム解析を用いて、24例の多数例で解析を行った。これまで報告のあった遺伝子について詳細な解析を行ったところ、遺伝子ごとにメチル化の亢進する場合、低下する場合があることもわかった。

D-2. *GNAS*近傍のエピゲノム解析と *gsp* 変異の有無によるメチロームの相違

*GNAS*の近傍のエピゲノム解析では腫瘍間の差は見られず、*gsp* 変異群と wild type の比較でも差は認めなかった。GH産生腺腫では wild type (*gsp* 変異陰性症例)で *GNAS* の imprinting の relaxation が報告されており、これが wild type の機能異常や腫瘍発生に関与すると考えられてきたが、この考えを強く支持する結果とはならなかった。

ゲノムワイドにメチローム解析すると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。*Gsα*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* 変異例と似たメチル化パターン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った⁶⁾。昨年報告にも引用したが、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* 変異群と同様のパターン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。

メチロームの変化が*gsp* 変異陽性群、wild type群のうち*gsp* 変異陽性群に近いメチロームを示す群、wild type群で前記2つと大きく異なる群の3群に大きく分かれ、それぞれの群内で比較的均一であることは、これらの3

群がそれぞれ異なる原因によって起こっていることを示唆する。第一群はそれが*gsp* 変異であるわけであるが、第2群と第3群もそれぞれに原因となる体細胞変異が一つ(もしくは表現型を一致させる複数)見つかる可能性が高い。したがって、これら第2と第3の腺腫群は網羅的変異解析(Exome analysis)を行うのに最適の群である。現在、これらの群の網羅的変異解析の準備を行っている。

E. 結論

以上より、

1. 本邦のGH産生下垂体腺腫を正常下垂体組織と比較すると、多くの遺伝子にメチル化の異常が起こっていた。24例という多数例のメチロームを解析することで、これまでの解析では明らかにしきれなかった腫瘍による相違と類似の状態が明らかになった。
2. GH産生腺腫の網羅的メチローム解析には、*gsp* 変異有無の情報が必須であり、これらの有無により、遺伝子によっては腫瘍でのメチル化の変化の意義が異なってくるものが考えられた。
3. 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, 2007.
- 5) Kola B et al, Clin Endocrinol (Oxf). 59:

328, 2003.

6) Yasufuku-Takano J, et al: Endocrinology, 140: 2018, 1999.

7) Duong CV, et al: Endocr Relat Cancer. 19: 805, 2012.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究成果発表文献

論文発表

1) Hideomi Yamada, Koji Takano, Nobuhira Ayuzawa, George Seki and Toshiro Fujita
Re-lowering of serum Na for osmotic demyelinating syndrome. Case Reports in Neurological Medicine、2012

2) Toshio Hirohata, Kenichiro Asano; Shingo Takano, Kazunori Arita, Shigeyuki Tahara, Koji Takano, et al. DNA mismatch repair

protein MSH6 correlated with the responses of atypical pituitary adenomas and pituitary carcinomas to temozolomide: The national cooperative study by the Japan Society for Hypothalamic and Pituitary Tumors. J. Clin. Endocrinol. & Metab..in press, 2013

3) Hirohata T, Saito N, Takano K, Yamada S, Son JH, Yamada SM, Nakaguchi H, Hoya K, Murakami M, Mizutani A, Okinaga H, Matsuno A. Urinary growth hormone level and insulin-like growth factor-1 standard deviation score (IGF-SDS) can discriminate adult patients with severe growth hormone deficiency. Endocr J. 2012 Nov 29. [Epub ahead of print]

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

図 1

Cuong V. Duong, Richard N. Clayton William E. Farrellらの報告で示された3例のGH腺腫と正常下垂体でメチル化に相違が認められた遺伝子

- | | |
|------------|------------|
| • ACTA1 | • HAAO |
| • ALX4 | • KIAA0676 |
| • C6orf150 | • KIAA1822 |
| • CHST8 | • PGLYRP1 |
| • COL1A2 | • RAC2 |
| • DLX5 | • RASSF1 |
| • EFEMP1 | • Rhod |
| • ERBB2 | • SECTM1 |
| • FLJ32569 | • SIPA1 |
| • FLJ46380 | • VILL |
| • FLJ90166 | |