

ACTH産生下垂体腺腫に対する内視鏡下経鼻的 下垂体腫瘍摘出術(eTSS)の治療成績

研究分担者 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分野

研究要旨：ACTH産生下垂体腺腫(ACTHoma)は検査技術が進歩した現在でも、診断治療が難しい疾患である。またmacroadenoma(M)は通常の腺腫と異なる病態を呈することが知られており注意を要する。近年術式としてeTSSが主流になりつつあるが、今回ACTHomaに対するeTSSの治療成績をmicroadenoma(m), M群に分けて検討した。手術適応は各種検査にてクッシング病の診断基準を満たし、かつMRIで腺腫を検出できた症例を対象とした。m群に関しては原則として海綿静脈洞直接サンプリングをあわせて行った。eTSSを施行した症例はm群44例(男:女=12:32, 年齢18-72歳)、M群8例(男:女=3:5, 年齢28-71歳)であり、当科初回手術の治療成績を評価した。M群は1例を除き、すべて浸潤性の腺腫であった。寛解基準は術後1週間以内の早朝ACTH測定感度以下(<5.0pg/ml)またはコルチゾール2.0μg/dl未満とした。m群において37/44例(84.1%)で寛解が得られた。寛解しなかった症例中2例は腺腫が発見されず、1例はincidentalomaであった。また術中腺腫が認められなかったにも関わらず、寛解した症例が2例存在した。一方M群で寛解が得られた症例は1例(12.5%)のみであり、この症例も33か月後に再発した。病理学的には全例、大部分の腫瘍細胞がCrooke変性を伴っており、2例で下垂体癌に移行した。M群は増殖能が高く、治療が困難であることが再認識された。一方m群においても腺腫が発見できない症例が依然として存在し、さらなる診断技術の向上が期待される。

A. 研究目的

下垂体腺腫は、臨床の場において時に遭遇する腫瘍であり、頭蓋内腫瘍の約18%を占める。そのほとんどは良性腫瘍であるが、腫瘍の発生部位が脳深部の主要血管、神経に近いことから、その進展様式によっては視神経障害による失明、視力視野障害、外眼筋麻痺による複視、内頸動脈の狭窄、閉塞による脳梗塞などの重度の障害を来す恐れがあり、早期の診断、病態把握、適切な治療が必要不可欠である。その中でもクッシング病(ACTH産生下垂体腺腫:ACTHoma)はmicroadenoma(m)が多く、画像上描出されない症例も多く、その診断には苦慮する。一

方macroadenoma(M)は増殖能が高いケースが含まれており、治療が困難であることが多い。クッシング病治療の第一選択は経蝶形骨手術(transsphenoidal surgery; TSS)を中心とする外科治療である。この術式は歴史的に手術機器として顕微鏡が使用されてきたが、近年の内視鏡手術の進歩、手術機器の発達に伴い、この方法に内視鏡が広く使われるようになりつつある。内視鏡下TSS(endoscopic TSS; eTSS)は視野が広く、従来死角となる部分も観察できるのが特徴であり、手術の摘出率の向上に寄与しているが、ACTHomaに対する手術成績の報告は少ない。今回我々はACTHomaに対する当科初回手術(eTSS)の

治療成績をm群とM群に分けて検討した。

B. 研究方法

1. 対象

当施設でのACTH依存性Cushing症候群の診断・治療方針を図1に示す。まず、厚生労働省間脳下垂体機能障害に関する調査研究班によるクッシング病の診断の手引きから、主症候・内分泌検査所見を満たす症例については3テスラの下垂体MRI (dynamic studyを含む)を施行する。その結果、視神経に接するようなMが見られる場合は、たとえincidentalomaとしても手術適応があるためeTSSまたは開頭術を施行する。一方mが認められた場合は、それがincidentalomaである可能性もあるため、原則として海綿静脈洞サンプリング (cavernous sinus sampling: CSS)を施行する。そこでstep upが見られた場合(陽性)はeTSSを施行し、一方陰性の場合には内分泌内科に紹介するとともにMRI追跡を行う。またMRIで腺腫の所見がない場合も、同様にCSSを行い、陽性の場合には副腎酵素阻害剤投与を行い、MRIで所見が認められ次第eTSSを施行する。当然陰性の場合には異所性と考え内分泌内科に紹介する。

このような方法で診断し、eTSSを施行したACTHomaの患者のうち、当院での初回手術症例は52例であった。内訳はm群が44例(84.6%)、M群が8例(15.4%)であった。平均年齢はm群が46.0歳、M群が49.5歳であり、女性の比率はそれぞれ72.7%、62.5%であった(表1)。

2. 方法

1) CSS

CSSの方法は海綿静脈洞の前方、中央、後方、および下錐体静脈洞にそれぞれマイク

ロカテーテルを留置しACTH採血を行う、multi-spot samplingを施行した(図2)。CRH負荷は行わず、またPRL補正も行わなかった。判定基準は中枢/末梢比(C/P ratio)>2.0とした。

2) mの手術戦略

術中腺腫が発見できた場合、MRIとCSSの腫瘍局在が一致した場合は、そのまま腺腫の被膜外摘出を行った。またMRIとCSSで局在が異なる場合は、腺腫の被膜外摘出および反対側の検索を追加した。一方、術中腺腫を発見できない場合は、CSSの結果をもとに正中を含む下垂体半切除を行った(図3)。

3) 治療基準

以上のような治療を行い、術後1週間以内の早朝空腹時のACTHが5.0pg/ml未満、またはcortisolが2.0μg/dl未満を内分泌学的寛解とした。

C. 研究結果

1. m群の治療成績

44例中37例(84.1%)が今回の寛解基準を満たした。この中で術中明確な腺腫が認めなかったにも関わらず、寛解が得られた症例が2例含まれていた。一方寛解しなかった症例は7例(15.9%)であり、内訳は画像上摘出されているように見えるが未治療のものが3例、術中腫瘍が発見できない症例が2例、摘出不十分が1例、またincidentalomaが1例であった(図4)。

代表例を示す。患者は35歳の女性である。術前のACTH 125pg/ml, cortisol 44.4μg/dlと高値であり、デキサメサゾン0.5mg抑制試験で抑制されず、8mgで抑制された。CRH負荷試験でも反応を認め、下垂体病変が疑われたため3テスラMRIを施行したところ下垂体右側に5mmのless enhanced massを認めた(図

5)。CSSで腫瘍が局在していると思われる右海綿静脈洞にカテーテルを挿入することができなかったが、左海綿静脈洞でC/P比が21.6とstep upを認めた(図6)。実際の手術ではMRI所見に一致し、右側に白色調の腺腫を認め、これを被膜外に全摘出した。ただCSSの結果をもとに左側に2mm間隔で割を入れ、他の病変がないことを確認した。術後7日目のACTH 1.4pg/m、cortisol 0.9μg/dlと著明に低下し、内分泌学的寛解が得られた(図7)。

2. M群の治療成績

M群の治療成績を表2に示す。一例を除き、すべてKnosp grade 4の浸潤性の腺腫であり、1例(症例No.2)のみ非浸潤性で、術後早期での内分泌学的寛解が得られた。しかし、この症例も術後33か月で再発し、2回目のeTSS後cortisolは2.0μg/dlまで低下したが、さらに12か月後に斜台部、右海綿静脈洞および蝶形骨洞方向に浸潤性に再発した(図8)。

病理学的にはMIB-1 indexが0.2~4.0%と極端に高くはなく、p53は一例のみ陽性であったが、すべてがCrooke's cell adenomaの所見であった。そして、2例が頭蓋内播種を来し、1例に剖検で肝転移が認められた(表3)。

D. 考察

Cushing症候群は大きくACTH依存性、非依存性の2群に分類される。後者は当然副腎疾患であり、ACTHは測定感度以下となることから、これらを除外することは容易である。一方ACTH依存性には下垂体腺腫(Cushing病)と異所性ACTH産生腫瘍が含まれる。頻度の上では、下垂体腺腫が大部分を占めるが、両者を鑑別することは極めて困難である。通常、ACTH依存性Cushing症

候群の患者には、デキサメサゾン抑制試験、CRH負荷試験、DDAVP負荷試験などが試みられ、これらの反応性の違いから両者をおおよそ区別できるとも言われている。しかし、どちらの病態にも非典型的な反応を示す症例は存在し、内分泌検査のみで確定診断を得ることは困難である。

一方、下垂体疾患を疑った場合、当然下垂体部を中心とした画像検査が行われるが、これについてもいくつかの問題がある。現在の画像診断の進歩は著しく、下垂体中心の詳細な造影MRIを施行すると直径2mm程度の小病変までは診断可能である。また、最近では空間解像能の高い高磁場の3テスラのMRIも普及しつつある。しかし、これだけ画像診断が進歩しても腺腫のサイズが2mm未満のケースも10%程度認められる。また逆に画像の精度が高いということは、同時に下垂体偶発腫(pituitary incidentaloma)が描出されている可能性も念頭におかなければならない。著者らは剖検下垂体1000例に含まれる直径2mm以上の偶発腫瘍を検索したところ61例(6.1%)がこれに該当した。また100例のボランティアに下垂体中心のMRIを施行したところ10%に腺腫に相当する所見が見られたとの報告もある。すなわち、ACTH依存性患者において下垂体部に異常所見が見られた場合でも、これが責任病変である確証は無いということになる。事実、今回のシリーズにおいてもdouble adenomaを1例、またラトケ嚢胞合併症例を1例経験している。以上の理由からCushing病においては下垂体部MRIのみでは検査が不十分であり、それ以外に下垂体からのACTH分泌亢進を証明するために静脈サンプリングが必要となる。

静脈サンプリングは種々の方法がある。すなわちカテーテルの位置、CRH負荷の有無

などである。当科では以前より海綿静脈洞内の多部位でサンプリングを行い、同部位の中央から後方でサンプリングが望ましいことを報告した。この方法では、CRH負荷を施行しなくてもよく、患者にとっての負担も少ない方法であり、ACTHomaの診断に極めて有用であった。

クッシング病の治癒基準は、今だ明確なものはないが、術後1週間以内の早朝コルチゾール値が2.0 μ g/dl未満、あるいはACTHの測定感度以下が一般的である。このような基準でACTHomaの手術寛解率は一般的に70-90%といわれているが、再発率も5年で5-10%、10年で10-20%と高い。最近はeTSSが広く行われているが、Wagenmakers MAらの報告ではMRI上陰性症例の60%、m群の83%、非浸潤性M群の94%、さらに海綿静脈洞浸潤をきたしたM群の40%で寛解が得られたとし、再発率は平均71ヶ月のフォローで16%であったとしている。このことから、eTSSは顕微鏡手術と同様に安全かつ有用な治療法であり、再発率も従来の方法と変わらないと報告している。我々のシリーズでもm群では早期寛解率が84.1%と高かったが、再発率も少なくないため嚴重なフォローが必要と考えている。

一方、M群の治療成績は極めて劣るといわざるを得ない。今回のシリーズは病理学的にすべてCrooke's cell adenomaであったことは注目に値する。そもそもCrooke変性は正常ACTH産生細胞に見られる退行性変化であり、Crooke's cell adenomaは腺腫細胞においても著明なCrooke変性をきたすものである。HE染色では好酸性で、ヒアリン変性した細胞質が認められる。Crooke's cell adenomaは臨床的にaggressiveであり、浸潤性のMであることが多く、今回の所見に合

致する。近年、悪性あるいは増殖能の高い下垂体腺腫に対し、テモゾロミドが有効であるとの報告が散見される。今回も下垂体癌の症例(M群case 5)にテモゾロミドを使用し、一時的に腫瘍縮小効果が得られたが、最終的に肝転移を来し死亡した。現時点では、放射線治療や薬物療法を組み合わせ対応していくしかないと思われるが、今後新たな分子標的薬の開発が期待される。

E. 結論

ACTHomaにおいて、M群は増殖能が高く、治癒が困難であることが再認識された。一方m群においても腺腫が発見できない症例が依然として存在し、さらなる診断技術の向上が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究成果発表

1. 論文発表

- 1) Matsuno A, Murakami M, Hoya K, Yamada SM, Miyamoto S, Yamada S, Son JH, Nishido H, Ide F, Nagashima H, Sugaya M, Hirohata T, Mizutani A, Okinaga H, Ishii Y, Tahara S, Teramoto A, Osamura RY, Yamazaki K, Ishida Y.: Clinicopathological and Molecular Histochemical Review of Skull Base Metastasis from Differentiated Thyroid Carcinoma. *Acta Histochem Cytochem.* 46 (5) : 129-36, 2013.
- 2) Hattori Y, Tahara S, Ishii Y, Kitamura T, Inomoto C, Osamura RY, Teramoto A, Morita A.: A case of prolactinoma with chordoma. *Clin Neurol Neurosurg.* 115(12): 2537-9, 2013.

- 3) Matsuno A, Murakami M, Hoya K, Yamada SM, Miyamoto S, Yamada S, Son JH, Nishido H, Ide F, Nagashima H, Sugaya M, Hirohata T, Mizutani A, Okinaga H, Ishii Y, Tahara S, Teramoto A, Osamura RY.: Molecular status of pituitary carcinoma and atypical adenoma that contributes the effectiveness of temozolomide. *Med Mol Morphol.* 2013 Aug 17. [Epub ahead of print]
- 4) Hattori Y, Tahara S, Ishii Y, Kitamura T, Inomoto C, Osamura RY, Teramoto A, Morita A.: A case of IgG4-related hypophysitis without pituitary insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 98 (5) : 1808-11, 2013.
- 5) Hirohata T, Asano K, Ogawa Y, Takano S, Amano K, Isozaki O, Iwai Y, Sakata K, Fukuhara N, Nishioka H, Yamada S, Fujio S, Arita K, Takano K, Tominaga A, Hizuka N, Ikeda H, Osamura RY, Tahara S, Ishii Y, Kawamata T, Shimatsu A, Teramoto A, Matsuno A.: 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.* 98 (3) :1130-6, 2013.
- 6) Oyama N, Tahara S, Oyama K, Ishii Y, Teramoto A.: Assessment of pre- and postoperative endocrine function in 94 patients with Rathke's cleft cyst. *Endocr J.* 60 (2) :207-13, 2013.

2. 学会発表

- 1) Shigeyuki Tahara, Yudo Ishii, Yujiro Hattori, Takayuki Kitamura, Akira Teramoto, and Akio Morita: Surgical and Long-term Outcome of Endoscopic Transsphenoidal

Pituitary Surgery for Acromegaly: Differences between New and Conventional Criteria for Biochemical Cure. XV WFNS World Congress of Neurosurgery, Seoul, Korea, 2013.09.

- 2) 田原重志, 石井雄道, 服部裕次郎, 杉山誠, 竹井麻生, 喜多村孝幸, 井野元智恵, 長村義之, 寺本 明, 森田明夫: 先端巨大症に対する内視鏡下経鼻的下垂体腫瘍摘出術の治療成績と長期経過—本邦と欧米における新たな治癒基準との比較—, 第23回日本間脳下垂体腫瘍学会(鹿児島), 2013.03.
- 3) 田原重志, 石井雄道, 服部裕次郎, 杉山誠, 竹井麻生, 喜多村孝幸, 寺本 明, 森田明夫: 先端巨大症に対する内視鏡下経鼻的下垂体腫瘍摘出術の治療成績と長期経過—本邦と欧米における新たな治癒基準との比較—, 第72回日本脳神経外科学会学術総会(横浜), 2013.10.
- 4) 田原重志, 村井保夫, 石井雄道, 服部裕次郎, 喜多村孝幸, 寺本 明, 森田明夫: 脳腫瘍および脳動脈瘤手術に対するハイビジョンエンドアームの使用経験, 第13回日本術中画像情報学会(山形), 2013.07.
- 5) 田原重志: 内視鏡下下垂体腫瘍摘出術の基本手術手技, 内視鏡下経蝶形骨手術の基本と応用, 第33回日本脳神経外科コンgres総会(大阪), 2013.05.
- 6) 田原重志, 服部裕次郎, 石井雄道, 喜多村孝幸, 寺本 明, 森田明夫: 下垂体腺腫に対する内視鏡下経鼻的下垂体腫瘍摘出術の基本手技, 第16回日本病院脳神経外科学会(広島), 2013.07.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表1. 対象

	Microadenoma (m)=44 (84.6%)	Macroadenoma (M)=8 (15.4%)
Age (y/o)	18-72 (Ave.46.0)	28-71 (Ave.49.5)
Sex M/F	12 / 32	3 / 5
Ratio of Female	72.7%	62.5%

表2. M群の治療成績

No.	Age	Sex	当院手術	腫瘍最大径(mm)	Knosp	ACTH (pg/ml)	Cortisol (ug/dl)	CR
1	28	F	初回	30	4	122.5	20.7	-
2	52	F	初回	21	2	268.7	25.3	+
3	71	M	初回	20	4	114.6	16.4	-
4	56	F	2回目	27	4	145	24	-
5	41	F	3回目	40	4	168	40.6	-
6	43	M	初回	30	4	322	15.1	-
7	62	F	初回	38	4	112	17.7	-
8	43	M	2回目	50	4	257	35.2	-

表3. M群の病理所見および経過

No.	Age	Sex	ACTH (pg/ml)	Cortisol (ug/dl)	CR	MIB-1 index (%)	p53	後療法	経過
1	28	F	122.5	20.7	-	2.0	-	☒-knife(2回),内服	
2	52	F	268.7	25.3	+	4.0	-	内服	
3	71	M	114.6	16.4	-	3.0	-	内服	
4	56	F	145	24	-	1.0	-	なし	頭蓋内播種
5	41	F	168	40.6	-	3.4	+	☒-knife(2回) 通常照射,内服	頭蓋内播種 肝転移
6	43	M	322	15.1	-	0.5	-	☒-knife, 補充療法	
7	62	F	112	17.7	-	0.2	-	内服	
8	43	M	257	35.2	-	1.0	-	内服	

すべてCrooke's cell adenomaの所見

図1. ACTH依存性Cushing症候群の診断・治療

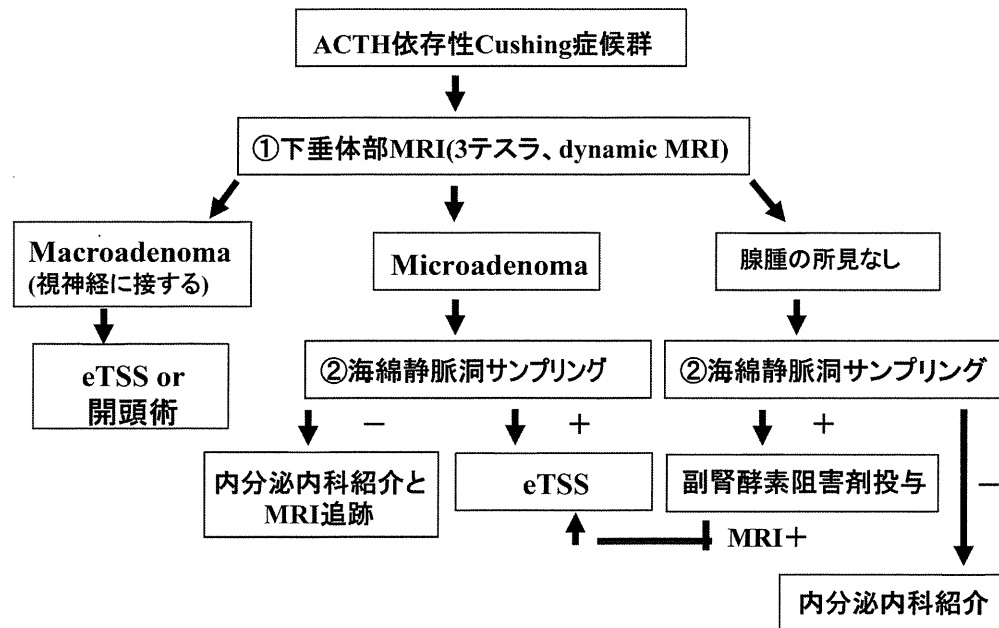
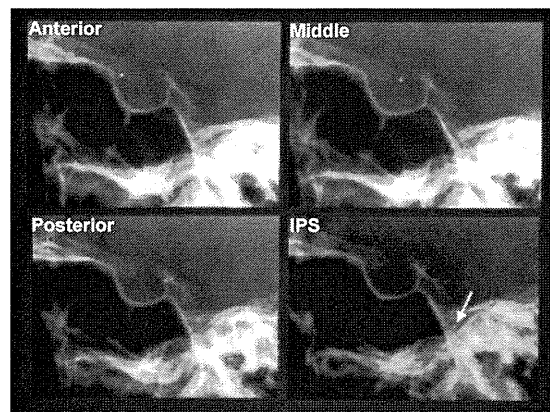


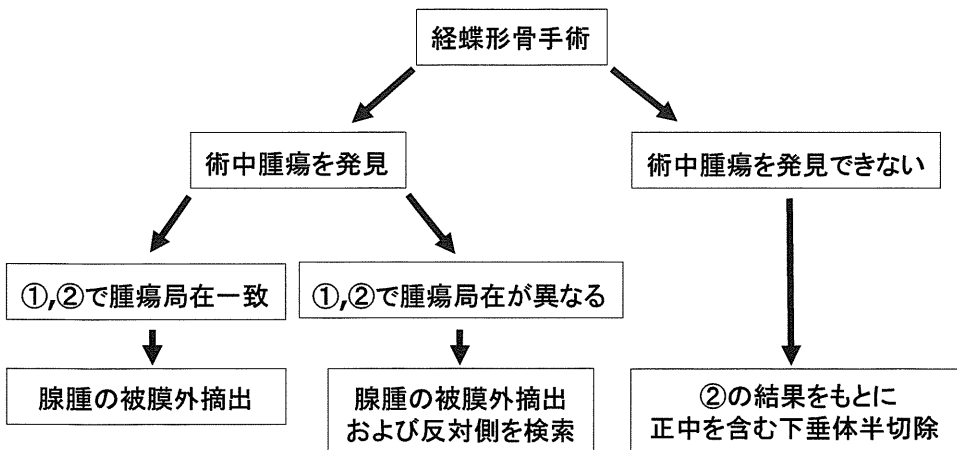
図2. 海綿静脈洞サンプリング (CSS) の方法

- ✓ **Multi-spot sampling**
- ✓ **CRH負荷(-)**
- ✓ **PRL補正(-)**
- ✓ **C/P ratio > 2.0**



Teramoto A, et al. J Neurosurg. 1998

図3. ACTH microadenomaの手術戦略



①下垂体部MRI(3テスラ、dynamic MRI)

②海綿静脈洞サンプリング

図4. m群の内分泌学的寛解率

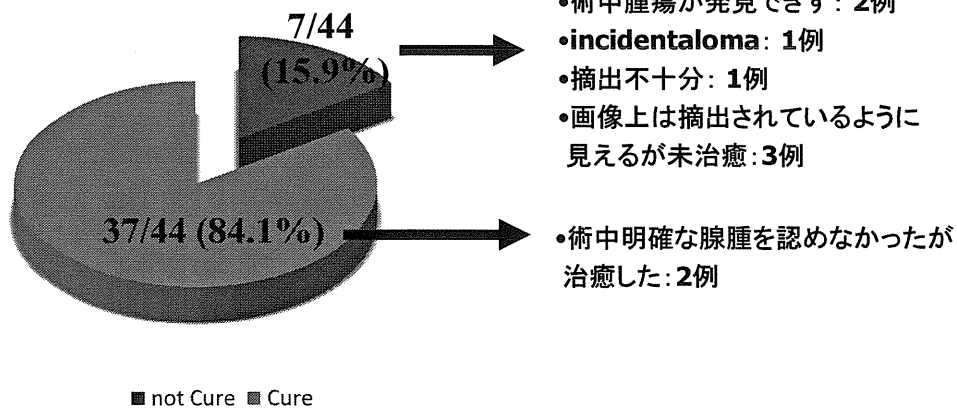
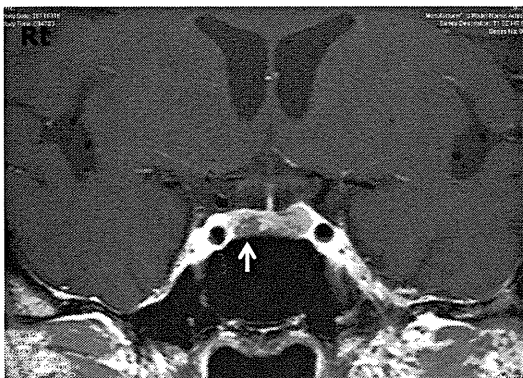


図5. 35F Cushing's disease



ACTH: 125pg/ml

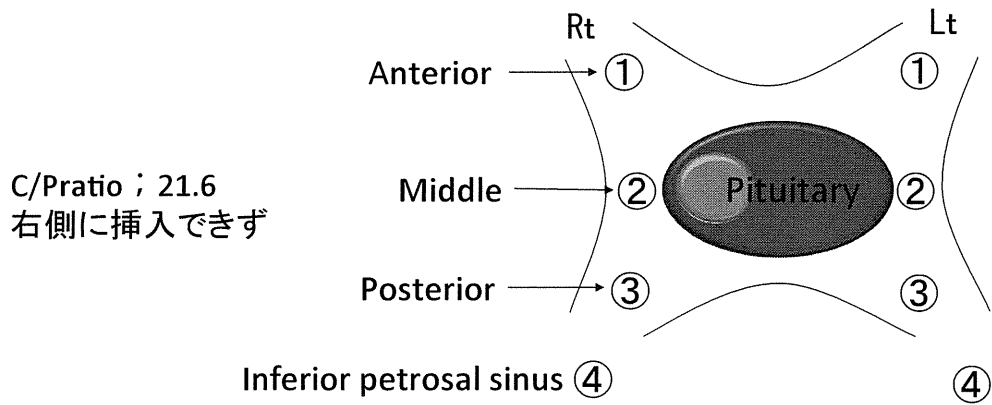
Cortisol: 44.4mg/dl

Dex0.5mg suppression(-)

Dex8mg suppression(+)

CRH response(+)

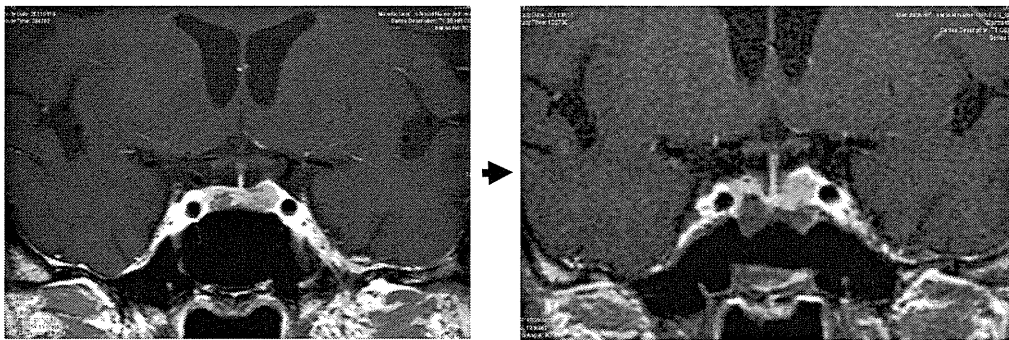
図6. CSSの結果



ACTH level (pg/ml); central/peripheral

	①	②	③	④
Rt	-	-	-	-
Lt	121.5/33.8	528.8/38.5	506.3/33.8	803.0/37.1

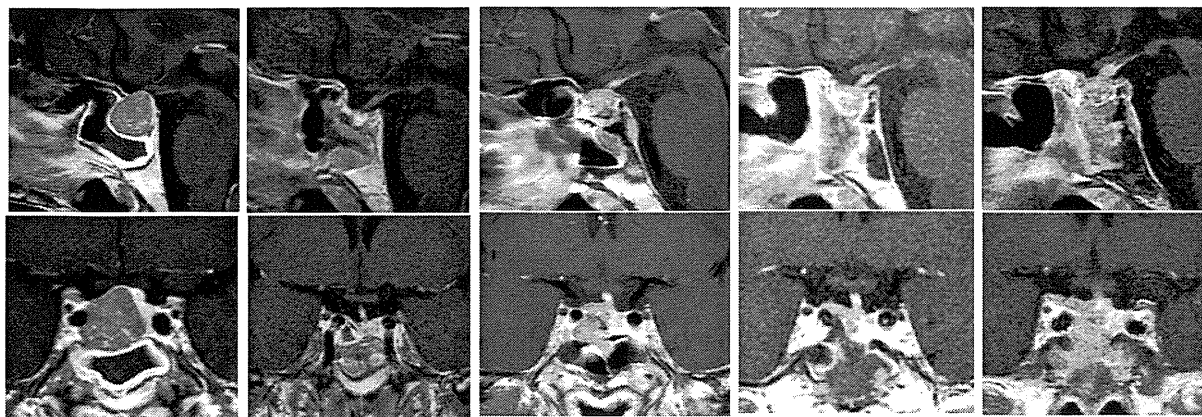
図7. 35F 術前後MRIの比較



術後7日目: ACTH; 1.4pg/ml, Cortisol; 0.9 μ g/dl

図8. 52F macro ACTHoma

初診時 初回術後 ⇒33month 2回目術後 ⇒12month



ACTH (pg/ml)

268.7

5.9

155.7

39.1

213.1

Cortisol (μg/dl)

25.3

1.9

20.8

2.0

25.8

メラノコルチン2受容体欠損マウスにおける 下垂体遺伝子発現の検討 — 第2報 —

研究分担者 清水 力 北海道大学病院検査・輸血部
研究協力者 亀田 啓 北海道大学大学院医学研究科内科学講座免疫・代謝内科学

研究要旨：副腎不全状態における下垂体の遺伝子発現の変化について検討することを目的として、メラノコルチン2受容体欠損(MC2R^{-/-})マウス下垂体を用いて実験を行った。MC2R^{-/-}マウス下垂体における遺伝子発現をDNAマイクロアレイ法で検討したところ、野生型(WT)マウスと比較してニューロメジンB(NMB)の発現が上昇していた。リアルタイムPCR法を用いた検討では下垂体以外の臓器ではNMB遺伝子発現の上昇は認めなかった。MC2R^{-/-}マウス下垂体前葉の免疫組織染色では副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)陽性細胞にNMBが発現していた。コルチコステロン徐放性ペレットを皮下投与して3週間後に下垂体における遺伝子発現をリアルタイムPCR法で検討したところ、NMBの発現はコルチコステロンペレット投与後に低下し、免疫組織染色でもACTH陽性細胞数とNMB陽性細胞数は低下した。NMB下垂体における調節因子を検討するためにCL57B/6Jマウス下垂体前葉細胞を単離し、コルチコトロピン放出ホルモン(CRH)とデキサメサゾン(DEX)を投与したところCRHの投与によってNMBの遺伝子発現は上昇し、免疫組織染色でACTHとNMBの共陽性細胞の出現を認めた。DEXの投与ではNMBの遺伝子発現は低下した。以上の研究からACTH陽性細胞においてNMBの発現がCRHによって促進的に、DEXによって抑制的に調節されていることがわかった。今後NMBのACTH陽性細胞における意義を検討していく方針である。

A. 研究目的

副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)は副腎におけるステロイド合成を刺激するが、その受容体であるメラノコルチン2受容体(MC2R)は副腎以外の臓器にも発現が報告されている。MC2Rの変異はACTH不応症の原因となり、生下時からの副腎皮質機能不全を呈する。副腎から分泌されるグルココルチコイドの諸臓器における作用については未解明な点が多く、副腎不全の状態における副腎以外の臓器における変化についても同様に不明な点が多く残されている。当科ではマウスMC2Rのクローニングおよび構造の解析を行い、

ノックアウトマウスを共同で作成してACTHの機能について検討をこれまで行っているが、今回は副腎不全状態における全身臓器の変化、特に下垂体の遺伝子発現の変化について検討した。

B. 研究方法

《動物》

下垂体単離細胞実験以外の全ての実験においてC57BL/6JとBalb/cの混合バックグラウンドを有するMC2R^{-/-}ならびにそのlittermateであるWTマウスを用いた。MC2R^{-/-}マウスは副腎皮質束状層の著明な萎

縮を示し、生下時より慢性的な副腎不全状態にあるマウスである。血漿のコルチコステロンは感度以下であり、血漿ACTHは野生型の littermate と比較して著明に高値を示す。また絶食負荷により容易に低血糖を呈するという表現型を示す (Chida D, Shimizu C, et al. PNAS. 2007 104:18205-18210)。

下垂体単離細胞では8週齢のC57BL/6Jマウスを用い、それ以外の実験では20週齢以上のマウスを用いた。

全ての実験において雄のマウスを用いた。全てのマウスは明期12時間、暗期12時間の条件下で飼育され、飼料ならびに水は自由に摂取できるものとした。

《実験1》

18週齢のMC2R^{-/-}マウスとWTマウスを午前中に麻酔下にと殺して下垂体ならびに各臓器(視床下部、下垂体、心臓、肺、肝臓、腎臓、膵臓、脾臓、大腸、筋肉、精巣)を採取しRNAを抽出した。RNAはキットを用いて抽出し(RNeasy Mini Kit, Invitrogen)、下垂体由来のRNAを用い、DNAマイクロアレイ法(GeneChip Mouse Gene 1.0 ST Array, Affimetrix)で遺伝子発現を解析した。

得られたRNAはSuperScript VILO Master Mix (Life Technologies社)を用い逆転写PCRを行いcDNAを得た。cDNAとニューロメジンB(NMB)、プロオピオメラノコルチン(POMC)、コルチコトロピン放出ホルモン(CRH)、 β -アクチンの各遺伝子特異的プライマーをfast SYBR Green PCR Master Mixと混合し、ABI 7500 fast real-time PCR system (Applied Biosystems社)を用いて遺伝子発現を調べた。各遺伝子発現は β -アクチンの発現量を用いて標準化し、 $\Delta\Delta$ Ct法を用いてコントロールとした遺伝子発現との相対的発

現量を求めた。

MC2R^{-/-}マウスとWTマウスを麻酔下に4%パラホルムアルデヒドで灌流し全身臓器を固定し採取した。臓器は浸漬固定後パラフィンに包埋して5 μ mの厚さで薄切しプレパラート上に固定した。一次抗体としてウサギポリクローナル抗NMB抗体(Sigma-Aldrich社)を100倍、マウスモノクローナル抗ACTH抗体(Santa Cruz Biotechnology社)を50倍の濃度でそれぞれ用いた。二次抗体としてAlexa Fluor 594-conjugated 抗マウスIgG抗体(Molecular Probes社)とAlexa Fluor 488-conjugated 抗ウサギIgG抗体(Molecular Probes社)を200倍の濃度で用いた。核染色として4',6-diamino-2-phenylindole(DAPI)を使用し、スライドグラスを載せて観察した。観察には蛍光顕微鏡BZ-900(キーエンス社)を用いた。

《実験2》

18週齢のMC2R^{-/-}マウスとWTマウスを用い、コルチコステロン徐放性ペレット(10mg、21日間、Innovative Research of America)ならびにプラセボペレットを皮下投与し、3週間後に午前中に麻酔下にと殺して血漿ならびに下垂体と視床下部からRNAを採取した。血漿のACTH測定(Roche Diagnostics)を行い、また下垂体と視床下部の遺伝子発現をリアルタイムPCR法で解析した。リアルタイムPCR法での遺伝子発現は β アクチンを内在性コントロールとして $\Delta\Delta$ Ct法を用いて相対的に定量評価した。実験1と同様に免疫組織染色を行いACTH陽性細胞、NMB陽性細胞、ACTH・NMB共陽性細胞の数を計測し、DAPI陽性細胞数を全細胞数として除してそれぞれの割合を求めた。

《実験3》

8週齢のC57BL/6Jマウスから下垂体前葉細胞を採取、単離しCRHならびにDEXの投与による遺伝子・蛋白発現の変化を検討した。方法は大水・高橋らの方法に若干の修飾を加えたものである(Oomizu, S., Takahashi, et al. J. Endocrinol. 1998:157, 53-62)。麻酔下にマウスを断頭し、下垂体を採取した。採取した下垂体はHank's Solutionに20mMのHepes緩衝液と0.3%のBSAを加えたもの(HSH-BSA)内で前葉以外を除去し、さらにメスを用いて細かい切片に細切した。マウス20匹分の下垂体から前葉細胞を採取し、HSH-BSAで3回洗浄した後Hank's Solutionに0.5%トリプシンを加えた溶液内で37°C15分間培養し、続いてHSH-BSAにDNaseを加えた液で37°C1分間培養し、次に1% soy bean trypsin inhibitorを加えた溶液内で37°C10分間培養した。続いて下垂体細胞をCa²⁺とMg²⁺を除いたHSH-BSAで3回洗浄した後2mMのEDTAを加えたHank's Solutionで37°C5分、1mMのEDTAを加えたHank's Solutionで37°C15分培養した。Ca²⁺とMg²⁺を除いたHSH-BSAで3回洗浄した後慎重にピペッティングを行い細胞を分離したのち室温、5分、1500gで遠心を行い細胞を回収し、cytometerを用いて細胞数を計測した。細胞の生存率は90%以上であった。単離された下垂体細胞はpoly-D-lysineでコートされた24ウェルの細胞培養プレート(Becton Dickinson社)5.0×10⁵個の濃度で各ウェルに播種した。細胞はDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)とHam's F12 mediumを1:1で混合し(DMEM/F12)、10%のfetal calf serumを加えた培養液中で37°C、5%のCO₂を含む培養器内で培養した。2日間培養後、培養液はDMEM/F12にトリヨードサイロニン400ng/L、トランス

フェリン10mg/L、グルカゴン10ng/mL、副甲状腺ホルモン200ng/L、セレン5μg/Lを含む液に変更し、それぞれ溶媒ならびにCRHとDEXを10⁻⁹M~10⁻⁷Mの濃度で加え、2日後にRNAを回収しリアルタイムPCR法で遺伝子発現の解析を行った。また単離下垂体細胞はpoly-D-lysineでコートされた35mmのglass bottom dish(Becton Dickinson社)にも同様の濃度で播種し、免疫染色を行い蛋白発現を評価した。

統計解析について

図表のデータは全て平均値±標準誤差で表記した。二群間の平均の検定には対応のないStudentのt検定を用いた。他群間の平均の検定にはone-way analysis of variance (ANOVA)を用い、有意差を認めた場合はpost hoc試験としてTukey-Kramer法を用いて各群間を比較した。p値が0.05未満の場合に有意差のある差を認めると定義した。それぞれの実験においては3回の独立した実験を行いデータを得て統計的に解析した。統計解析においてはソフトウェアとしてIBM SPSS statisticsバージョン21(IBM社)を用いた。

(倫理面への配慮)

実験動物を用いた実験は全て当施設における動物実験ならびに遺伝子組み換え実験に関する倫理基準に基づき許可を得た上で、動物への苦痛を最小限にとどめるよう配慮し施行した。

C. 研究結果

《実験1》

DNAマイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現解析の結果、MC2R^{-/-}マウスならびにWTマウスの下垂体から28,853の遺伝子につ

いて結果が得られた。発現を比較したところMC2R^{-/-}マウスにおいてWTマウスと比べて3倍以上の発現を示す遺伝子は13個あった(表1)。NMBが最も発現比が高かった。NMBと同じくボンベシン様ペプチドファミリーに属する遺伝子発現も増加していた。その他に発現が増加していた遺伝子は機能別に内分泌機能(tyrosine hydroxylase, myotilin, chemokine C-C motif ligand 3)、陽イオン輸送(solute carrier family 6, member 14)、抗原結合(immunoglobulin kappa chain variable 1, immunoglobulin joining chain)、ガングリオシド合成(ST8 alpha-N-acetyl-neuraminidase alpha-2,8-sialyltransferase 5)、アラキドン酸合成経路(arachidonate 12-lipoxygenase, 12R type)、筋肉におけるオルタナティブスプライシング(muscleblind-like 3)、機能不明(leucine zipper protein 2)であった。

全身臓器のリアルタイムPCR法による解析ではNMBの発現はMC2R^{-/-}マウスの下垂体においてWTマウスの下垂体と比較して20倍以上の増加を認めた。視床下部、心臓、肺、肝臓、腎臓、膵臓、脾臓、大腸、筋肉、精巣ではMC2R^{-/-}マウスとWTマウスで有意な発現の差を認めなかった(図1)。

MC2R^{-/-}マウスの下垂体前葉の免疫染色においてACTH陽性細胞とNMB陽性細胞がそれぞれ認められた。両者の染色像を合成した画像でACTHとNMBが両者とも陽性となる細胞が存在していることが認められた(図2)。WTマウスの下垂体前葉の免疫染色ではNMBの発現は弱く、ACTHと共に陽性となる細胞は認められなかった。

《実験2》

ペレット投与3週後の血漿ACTHはプラセボペレットを投与されたMC2R^{-/-}マウスで著

明に高値を示した。コルチコステロンペレットを投与されたMC2R^{-/-}マウスでは抑制されWTマウスと同程度まで低下した。WTマウスではプラセボペレットとコルチコステロンペレットを投与された群で有意な変化を認めなかった(図3)。下垂体NMBの遺伝子発現はプラセボペレットを投与されたMC2R^{-/-}マウスで著明に高値を示し、コルチコステロンペレットを投与されたMC2R^{-/-}マウスでは抑制されWTマウスと同程度まで低下した(図3)。下垂体NMBの遺伝子発現はWTマウスではプラセボペレットとコルチコステロンペレットを投与された群で有意な変化を認めなかった。下垂体POMCと視床下部CRHの遺伝子発現も同様にプラセボペレットを投与されたMC2R^{-/-}マウスで著明に高値を示し、コルチコステロンペレットを投与されたMC2R^{-/-}マウスでは抑制されWTマウスと同程度まで低下した。下垂体POMCならびに視床下部CRHの遺伝子発現はWTマウスではプラセボペレットとコルチコステロンペレットを投与された群で有意な変化を認めなかった(図3-B)。下垂体の免疫染色ではMC2R^{-/-}マウス下垂体細胞においてACTH陽性細胞、NMB陽性細胞、ACTH・NMB共陽性細胞の占める割合はプラセボペレット投与と比較してコルチコステロンペレット投与で有意に減少した(図4)。

《実験3》

単離された下垂体前葉細胞において、NMBの遺伝子発現はCRHの投与(10⁻⁷M)で溶媒の投与と比較して有意に増加し、DEXの投与(10⁻⁸~10⁻⁷M)で有意に低下した(図5)。POMCの遺伝子発現はCRHの投与で有意に増加したが、DEXの投与では有意な変化を認めなかった(図5)。下垂体単離細胞の

免疫染色ではCRHを投与した時のみACTHとNMBが共陽性となる細胞が出現した(図6)。

D. 考察

NMBはボンベシン様ペプチドの一つとしてブタの脊髄から同定された物質である。視床下部、下垂体を含む中枢神経系に広く分布し、最近では情動行動との関連が報告されている。NMBとHPA軸の関連についてはいくつかの報告がなされている。下垂体では甲状腺刺激ホルモン産生細胞に発現しており、NMB受容体欠損マウスではTRHに対するTSHの反応性が変化すると報告がある。

また興味深い報告として、自己分泌(autocrine)あるいは傍分泌(paracrine)の機序によって腫瘍細胞の増殖や活性化を促す作用が肺非小細胞癌、前立腺癌、大腸癌などの細胞株あるいはヒト腫瘍細胞で報告されている。

今回我々の検討ではMC2R^{-/-}マウスの下垂体においてマイクロアレイ解析でNMBの発現増加を認めたが、同様の報告は副腎摘除マウス下垂体のマイクロアレイ解析でも報告されている。前者が慢性副腎不全モデル、後者が急性副腎不全モデルであるという異なる病態であるが、NMBの下垂体での発現増加はそれらを問わず副腎不全の病態では共通して起きる事象であると考えられる。

組織学的な解析において我々はMC2R^{-/-}マウスの下垂体においてNMBがACTH産生細胞に発現していることを証明した。我々の知る限り、これまでに同様の報告は認めない。NMBのACTH産生細胞での発現は正常の状況下では弱い、MC2R^{-/-}のような副腎不全の状態でも強く発現すると言える。

グルココルチコイドの皮下投与による補

充を行う事で、増加していた下垂体のNMBは下垂体のPOMC、視床下部のCRHと同様に抑制された。このことからNMBの調節はACTHと類似した機序であると推測され、NMBの調節機序を解明するためにCRHとグルココルチコイドを下垂体細胞に投与する実験を行った。

単離された下垂体前葉細胞において、CRHの投与はNMBの遺伝子発現を増加させた。CRHはグルココルチコイドによってネガティブフィードバックを受けていることから、血漿コルチコステロンが著明に低値となり、視床下部でのCRH発現が亢進していることが推測されるMC2R^{-/-}マウスの下垂体においてNMBの発現が増加していることを説明する結果と考えられる。また同様にDEXの投与によってNMBの遺伝子発現が低下することはMC2R^{-/-}マウスへのコルチコステロンペレットの投与の結果と一致するものと言える。また、下垂体細胞へのDEXの直接投与によってNMB発現が低下することはグルココルチコイドによるフィードバック調節をNMBも受けていることを示唆する。これらの結果から下垂体におけるNMBの遺伝子発現は下垂体POMCと同様にCRHとグルココルチコイドによって調節されていることを示すと考えられる。

我々の知る限り下垂体のNMBとHPA軸の関連を示す報告はなく、我々の研究は下垂体におけるNMBの発現がHPA軸の因子によっても調節されていることを示す最初の報告と考えられる。本研究ではNMBのACTH陽性細胞における発現の意義は明らかではないが、今後NMBがホルモン分泌に与える影響や、ACTH産生腫瘍における発現についても検討を進める予定である。

E. 結論

MC2R-/-マウスを用いた検討により、副腎不全の状態下における下垂体においてACTH陽性細胞にNMBが発現していることが証明された。また、ACTH陽性細胞においてCRHがNMBの発現を促進し、GCが発現を抑制するという機序を持つことが明らかになった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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* 4: 326-329, 2013
- 2) 野本博司, 小梁川直秀, 三次有奈, 山本浩平, 山本知穂, 相川望美, 亀田 啓, 田島一樹, 野田 学, 曹 圭龍, 中垣 整, 近藤琢磨, 三好秀明, 清水 力, 渥美達也: 血清IgG4高値を示した甲状腺原発MALT

リンパ腫の1例, 日本内分泌学会雑誌: 89 Suppl 43-45, 2013

- 3) 亀田 啓, 永井 聡, 中垣 整, 近藤琢磨, 三好秀明, 渥美達也, 千田 大, 岩倉洋一郎, 清水 力: メラノコルチン2受容体欠損マウスにおける下垂体遺伝子発現の検討 *ACTH related peptides vol.24*: 12-14, 2013
- 4) 清水 力: 内分泌疾患の診断におけるホルモン測定, *medicina* 50(10): 1728-1732, 2013

2. 学会発表

- 1) 亀田 啓, 野本博司, 中垣 整, 永井 聡, 近藤琢磨, 三好秀明, 渥美達也, 千田 大, 岩倉洋一郎, 清水 力: メラノコルチン2受容体欠損マウスにおける下垂体遺伝子発現の検討, 第86回日本内分泌学会学術総会, 仙台, 平成25年4月25日~27日

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. MC2R^{-/-}マウスの下垂体のDNAマイクロアレイ法による遺伝子発現の検討(WTマウスとの比較)

Gene symbol	Gene description	Accession number (GenBank)	WT (raw)	MC2R ^{-/-} (raw)	Absolute Fold Change
Nmb	neuromedin B	BC028490	170.1894	2171.0056	12.8
Ly6g6c	lymphocyte antigen 6 complex, locus G6C	BC116365	80.49387	1009.762	12.5
St8sia5	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 5	BC034855	95.20573	522.44055	5.5
Slc6a14	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 14	AF320226	45.52998	221.0048	4.9
Igk-V1	immunoglobulin kappa chain variable 1 (V1)	U65535	32.6247	143.90976	4.4
Grp	gastrin releasing peptide	BC024515	256.1458	1115.6742	4.4
Th	tyrosine hydroxylase	M69200	139.3865	560.6882	4.0
Alox12b	arachidonate 12-lipoxygenase, 12R type	BC113149	84.83019	335.1788	4.0
Mbnl3	muscleblind-like 3 (Drosophila)	BC057157	203.4678	773.4397	3.8
Igj	immunoglobulin joining chain	BC006026	45.87752	165.25262	3.6
Ccl3	chemokine (C-C motif) ligand 3	M23447	126.5833	450.45227	3.6
Luzp2	leucine zipper protein 2	BC075646	128.7431	443.98346	3.4
Myot	myotilin	AF230979	63.95737	206.29175	3.2

図1. リアルタイム PCR 法による全身臓器のニューロメジン B の発現の検討

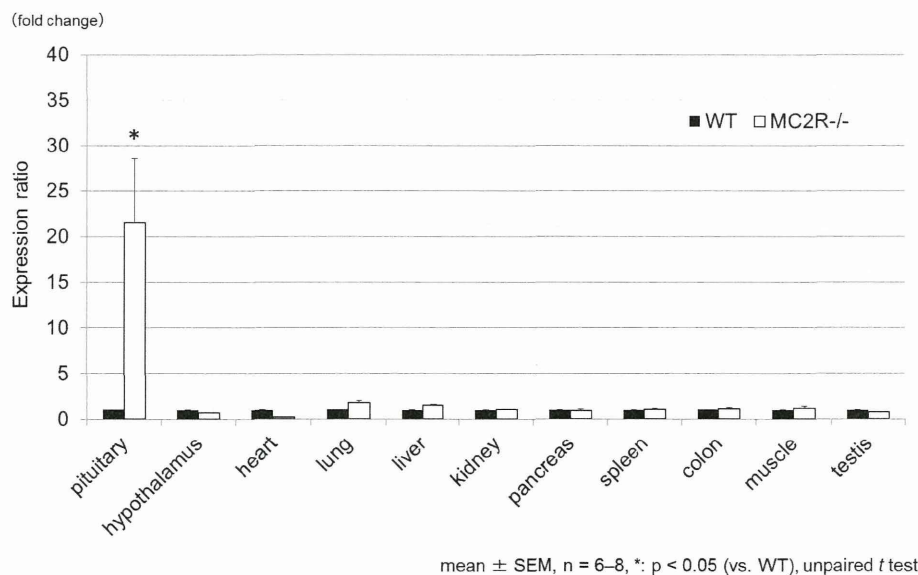


図2. MC2R^{-/-} の下垂体の免疫組織染色

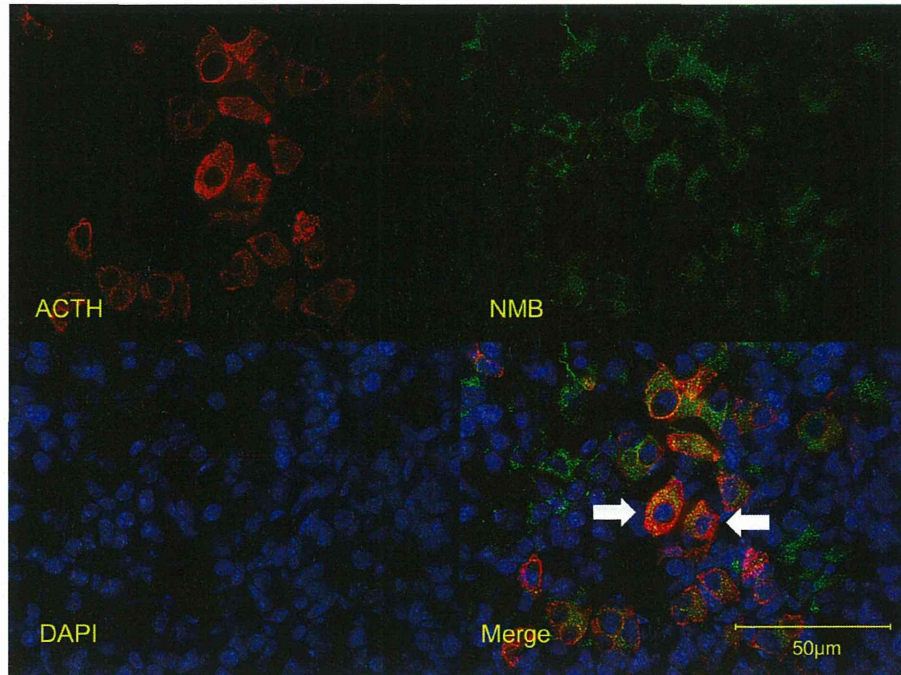
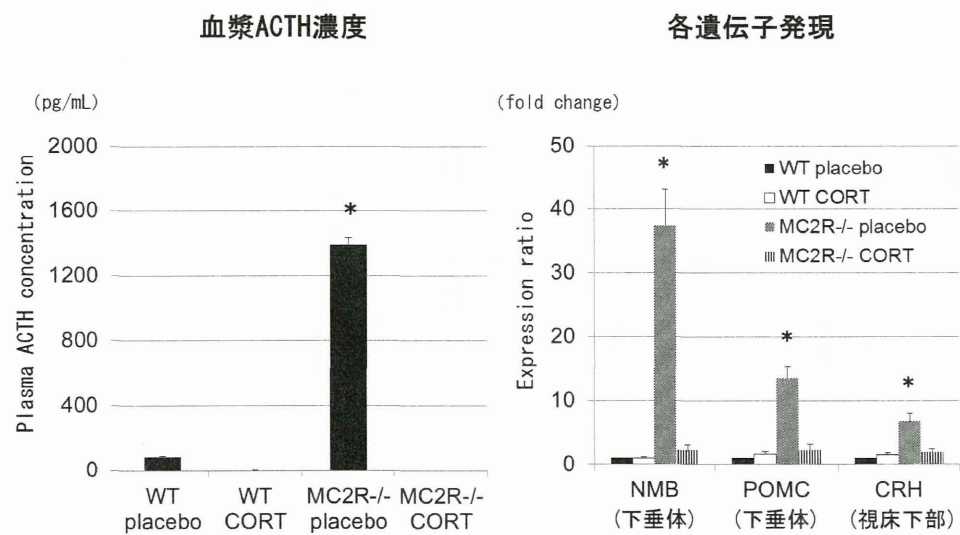


図3. コルチコステロンペレット投与後の血漿 ACTH と各遺伝子発現の検討



mean ± SEM, n = 5-6, *: p < 0.05 (vs. other groups), ANOVA

図4. コルチコステロンペレット投与後のMC2R-/- マウスの下垂体免疫染色の検討

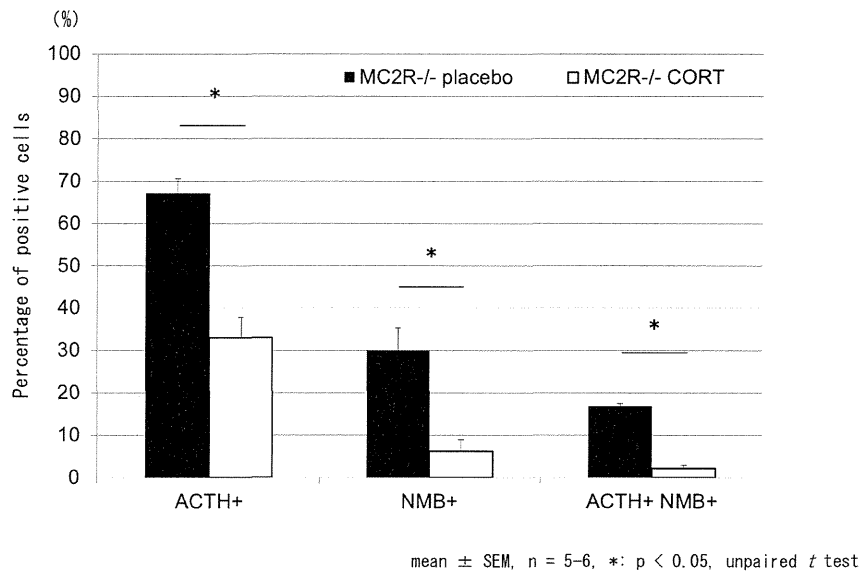


図5. 下垂体前葉単離細胞へのCRH、デキサメサゾン投与による遺伝子発現の変化

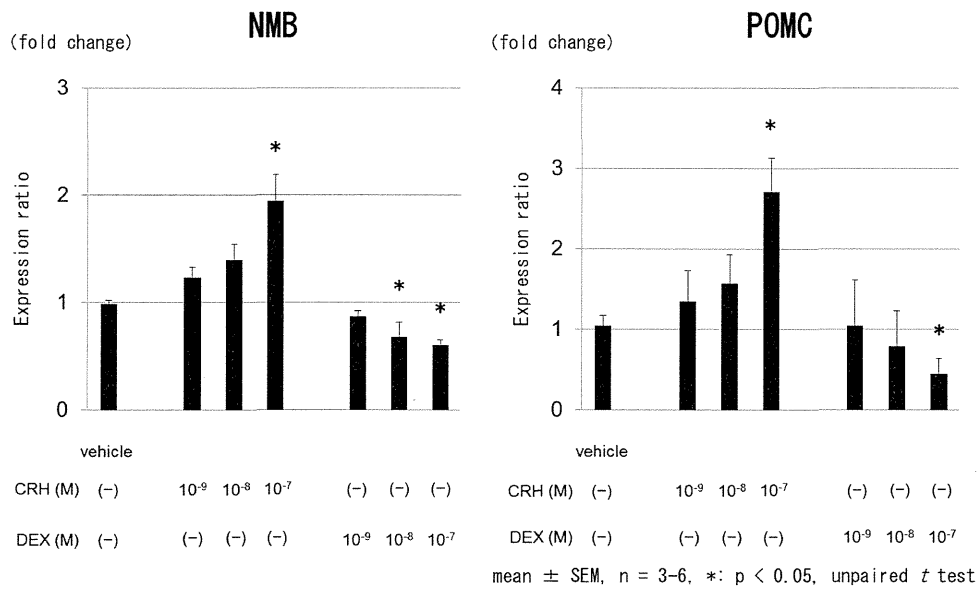


図6. 下垂体前葉単離細胞へのCRH 10-7M投与時の免疫染色の所見

