

## ① 思春期早発症の分類

中枢性思春期早発症(眞性思春期早発症)：ゴナドトロピン依存性

### I 特発性

体質性

機能性：先天性副腎皮質過形成症、甲状腺機能低下症などに伴うもの<sup>注1)</sup>

### II 器質性

脳腫瘍：視床下部過誤腫、視床下部星細胞腫、視神経腫など

頭蓋内病変(腫瘍以外)：水頭症、頭部外傷、くも膜嚢胞、頭部放射線照射<sup>注2)</sup>、髄膜炎など

仮性思春期早発症：ゴナドトロピン非依存性

### I 女児

同性性

FSH 産生腫瘍

hCG 産生胚細胞腫瘍<sup>注3)</sup>

エストロゲン産生卵巣腫瘍：顆粒膜細胞腫、奇形腫、絨毛上皮腫など

McCune-Albright 症候群

自律性機能性卵巣嚢胞

副腎腫瘍

外因性：女性ホルモン含有食品、薬品、化粧品など

異性化(男性化)

先天性副腎過形成症

副腎男性化腫瘍

アンドロゲン産生卵巣腫瘍：arrhenoblastoma、奇形腫

外因性：アンドロゲン含有食品、薬品、化粧品など

### II 男児

同性性

hCG 産生腫瘍(胚細胞腫瘍、奇形腫、絨毛癌など)

副腎アンドロゲン過剰(副腎腫瘍、先天性副腎過形成症)

アンドロゲン産生精巣腫瘍：Leydig 細胞腫瘍

家族性テストキシコーシス

外因性：アンドロゲン含有食品、薬品、化粧品など

異性化(女性化)

副腎腫瘍

エストロゲン産生精巣腫瘍：Sertoli 細胞腫瘍

外因性：女性ホルモン含有食品、薬品、化粧品など

部分的性早熟

乳房早期発育

陰毛早期発育

月経早期発来

注1) 視床下部・下垂体ホルモン過剰分泌を伴う内分泌疾患において、ゴナドトロピンの分泌促進も伴うことがある。

注2) 頭部放射線照射が18 Gyを超えると思春期早発症のリスクが高くなり、35 Gyを超えるとゴナドトロピン分泌不全が起こりやすい。

注3) hCGによる思春期早発症は女児ではまれである。

波検査、視床下部下垂体 MRIにて器質性疾患を鑑別する。思春期の下垂体は正常でも腫大し、下垂体高は1 cmを超えるので注意する。仮性思春期早発症を疑う場合、腹部CT、MRIなども必要になる。

## ② 診断

厚生労働省間脳下垂体機能障害調査研究班が作成した中枢性思春期早発症の「診断の手引き」を表2に示す。注意しなくてはならないのは、これはあくまでも中枢性思春期早発症の診断の手引きであり、治療基準ではない、ということである(治療基準については後述)。仮性思春期早発症では二次性徴の進行が急速なことが多い。

## ③ 治療

思春期早発症の治療目的は、①原疾患があればその治療、②精神年齢・暦年齢に不相応な身体の成熟の抑制、③最終身長低下の防止、である。中枢性思春期早発症では、診断の手引きに当てはまっても最終身長が良好なものは治療対象にはならない場合もあるし、手引きに当てはまらなくても低身長で思春期が発来してしまった場合は治療が必要なこともある。中枢性思春期早発症に対してはGnRHアナログによる治療を行う。リュープロレリン酢酸塩(リュープリン<sup>®</sup>)注射薬とブセレリン酢酸塩(スプレキュア<sup>®</sup>)点鼻薬があり、ゴナドトロピン抑制効果に応じて量を増減する。スプレキュア<sup>®</sup>は点鼻回数が多く、確実な治療になりやすい。リュープリン<sup>®</sup>は、女児で初回投与後に一過性に消退出血をみることがあるが、それ以外は副反応もほとんどなく、治療終了後の下垂体-性腺系回復も良好である。仮性思春期早発症に対しては、アロマトラーゼ阻害薬(アリミデックス<sup>®</sup>〈アナストロゾール〉、フェマラ<sup>®</sup>〈レトロゾール〉、いずれも保険適用外使用)、メドロキシプロゲステロン酢酸エステル(プロベラ<sup>®</sup>)が用いられるが、確立した治療法はない。

治療終了時期の明確な規定はない。暦年齢、身長予後予測の改善などを目安に終了するが、身長のみ注目すると治療が長期化しやすい。思春期年齢に骨塩量が獲得されることを考慮し、総合的に判断する。

## ② 中枢性思春期早発症の診断の手引き

### I 主症候

#### a) 男児の主症候

- 1) 9歳未満で精巣、陰茎、陰嚢などの明らかな発育が起こる
- 2) 10歳未満で陰毛発生をみる
- 3) 11歳未満で腋毛・ひげの発生や声変わりをみる

#### b) 女児の主症候

- 1) 7歳6か月未満で乳房発育が起こる
- 2) 8歳未満で陰毛発生、または小陰唇色素沈着などの外陰部早熟、あるいは腋毛発生が起こる
- 3) 10歳6か月未満で初経をみる

### II 副症候 発育途上で次の所見をみる<sup>注1)</sup>

- 1) 身長促進現象：身長が標準身長の2.0SD以上、または年間成長速度が2年以上にわたって標準値の1.5SD以上
- 2) 骨成熟促進現象：骨年齢-暦年齢 $\geq$ 2歳6か月を満たす場合  
または暦年齢5歳未満は骨年齢/暦年齢 $\geq$ 1.6を満たす場合
- 3) 骨年齢/身長年齢 $\geq$ 1.5を満たす場合

### III 検査所見

下垂体性ゴナドトロピン分泌亢進と性ステロイドホルモン分泌亢進の両者が明らかに認められる<sup>注2)</sup>

### IV 除外規定<sup>注3)</sup>

副腎性アンドロゲン過剰分泌状態(未治療の先天性副腎皮質過形成<sup>注4)</sup>、副腎腫瘍など)、性ステロイドホルモン分泌性の性腺腫瘍、McCune-Albright症候群、testotoxicosis、hCG産生腫瘍、性ステロイドホルモン(蛋白同化ステロイドを含む)や性腺刺激ホルモン(LHRH、hCG、hMGを含む)の長期投与中(注射、内服、外用<sup>注5)</sup>)、性ステロイドホルモン含有量の多い食品の大量長期摂取中などのすべてを否定する

#### 【診断基準】

##### 確実例

- 1) Iの2項目以上とIII、IVを満たすもの
- 2) Iの1項目およびIIの1項目以上とIII、IVを満たすもの

##### 疑い例

Iの年齢基準を1歳高くした条件で、その確実例の基準に該当するもの。なお、疑い例のうちで、主症状発現以前の身長が-1SD以下のものは、治療上は確実例と同等に扱うことができる

#### 病型分類

中枢性思春期早発症が診断されたら、脳の器質的疾患の有無を画像診断などで検査し、器質性・特発性の病型分類をする

注1) 発病初期には必ずしもこのような所見を認めるとは限らない。

注2) 各施設における思春期の正常値を基準として判定する。なお、基準値のない施設においては、血清ゴナドトロピン基準値を参考にする。

注3) 除外規定に示すような状態や疾患が、現在は存在しないが過去に存在した場合には中枢性思春期早発症をきたしやすいので注意する。

注4) 先天性副腎皮質過形成の未治療症例でも、年齢によっては中枢性思春期早発症をすでに併発している場合もある。

注5) 湿疹用軟膏や養毛剤などの化粧品にも性ステロイドホルモン含有のものがあるので注意する。

〔千原和夫、他：中枢性思春期早発症の診断の手引き。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15年度総括・分担研究報告書。2004；119-120より〕

#### 文献

- 1) Bourginon JP : Chapter 19 Control of the onset of puberty. In : Pescovitz OH, et al. (eds), *Pediatric Endocrinology : Mechanisms, Manifestations, and Management*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2004 ; 285-298.
- 2) Tanner JM : Sequence and tempo in the somatic changes in puberty. In : Grumbach MM, et al. (eds), *Control of the onset of puberty*. John Wiley & Sons, New York, 1974 ; 446-470.
- 3) Conte F, et al. : Variations in plasma LH and FSH with age in 35 patients with XO gonadal dysgenesis. *Pediatr Res* 1972 ; 6 : 353.
- 4) Parent AS, et al. : The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity : variations around the world, secular trends and changes after migration. *Endocr Rev* 2003 ; 24 : 668-698.
- 5) 千原和夫、他：中枢性思春期早発症の診断の手引き。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15年度総括・分担研究報告書。2004；119-120。



## Ⅲ やせに関連する疾患

# Q14 鑑別すべき疾患

回答： 国立成育医療研究センター 堀川玲子  
内分泌代謝科

### point

- やせは、成長と代謝に必要なエネルギーと食事摂取エネルギーのマイナスバランスによって生じる。
- やせの病因は、年齢によって異なる。
- 病的やせは成長障害を伴う。
- 全身性の疾患は、やせを伴いやすい。

Ⅲ やせに関連する疾患

## 乳児期のやせ・体重増加不良

Q

症例1 9ヵ月、男児。保健所の健診で低体重を指摘され、精査目的にて来院。

⇒ 鑑別すべき疾患と診断へのアプローチについて教えてください

A

1. 成長の評価を適切にすること  
乳児の成長障害は、FTT (failure to thrive)という言葉で表現されますが、これには二つの状態があります。一つは体重増加不良はあるが身長は伸びている状態。もう一つは、身長も体重も両方増加不良がある場合です。また、はじめからやせているのか、ある時点からやせ始めたのかについて、注意深く評価することも重要です(図1)。

身長体重の測定は、乳幼児では変動が大きく、ミルク前後でも変わりますので、一点のみの計測で判断するのではなく、それまでの成長の流れとして捉えることがポイントとなります。このために、できるだけ身長体重計

測データを集めること、それを成長曲線上にプロットすることが診断のアプローチになります。また、身長と体重からBMI(カウプ指数)を計算し、肥満度曲線(BMI曲線)を利用することも、診断の足掛かりになります。

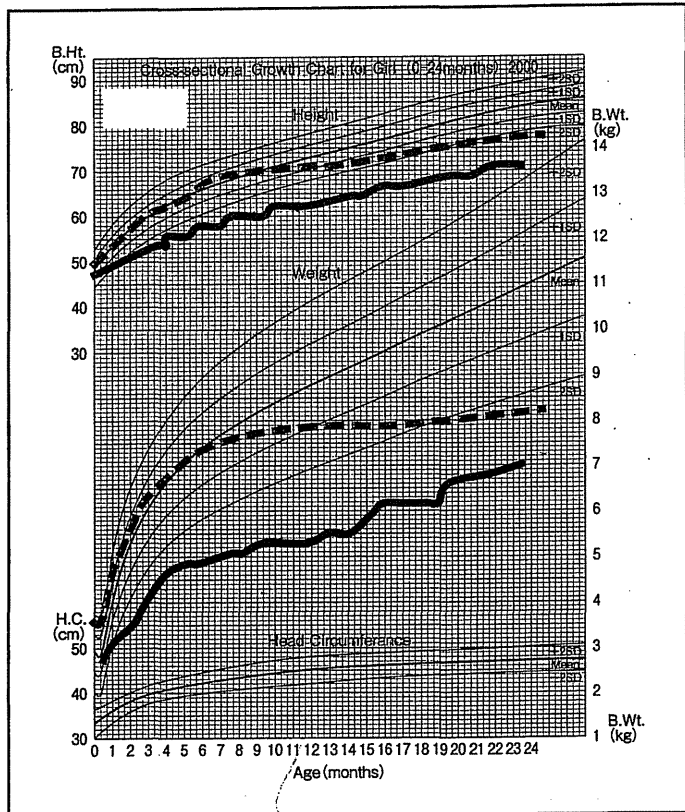
早産児の場合、身長・体重の評価は修正月齢を考慮して行います。体重は12ヵ月まで、身長は2~3歳までは在胎週数で修正して評価します。また、頭囲の測定も大切です。

乳児のやせでは、栄養障害が最も多い原因ですが、栄養障害ではまず体重増加不良があり、その後、身長増加不良が起こってきます。さらに栄養障害が長期に及ぶと、頭囲も増加しなくなってきます。一方、身長・体重

図1 乳児期やせ・体重増加不良例の成長曲線

実線（症例1）：在胎週数比低出生体重にて出生，重度のGERにて体重増加不良を呈している。

点線（症例2）：周産期は異常なく，5ヵ月までは良好に成長していたが，離乳期に体重増加不良となり身長増加も不良となった。



が共に増加不良である，または体重は比較的増加するが身長が伸びない場合は，内分泌疾患や先天異常などが疑われます。

## 2. 病歴の聴取（表1，2）

以下の病歴は，乳児の体重増加不良の病因を知るうえで重要です。

- 早産・低出生体重，子宮内発育遅延の有無：低出生体重児は，体重増加不良を伴いやすいです。
- 慢性全身性疾患の鑑別：心疾患，消化管疾患，慢性炎症性疾患，悪性疾患，アレルギー性疾患など，疾患に特異的な症状の有無の聴取，排便・排尿回数，便性など，また，家族性の疾患がないか，家族歴の聴取も大切です。
- 発達：特に離乳期以降，発達障害により

栄養障害をきたすことがあります。特異的な嗜好など，食事に関することの他，全体的な発達の状態の把握も必要です。

- 虐待：病歴に不自然な点はないか，次に述べる栄養状態も含め，詳しい病歴をとります。近年，ネグレクトなどが増加しているので，乳児期の体重増加不良の一因として，常に鑑別が必要となります。

## 3. 栄養状態

新生児・乳児期のミルク量，離乳食への移行の状況，母乳の場合，母親が不足していることを認識していないこともあります。

アレルギーなどを心配して自己流に食事制限をしていたり，乳児の体型に対する理解が不足しているため，肥満と考えてミルクの制限をしたりしている場合もあります。

表1 やせ・体重増加不良の病因

栄養摂取不良	
授乳の問題	母乳不足, 技術の不良, ミルク濃度の間違い, 母子関係不良
栄養摂取量・摂取成分の問題	アレルギー除去食, 偏ったこだわり食 (ベジタリアン, ヴィーガンなど), 果物摂取過多による果糖過剰, 年齢不相応な食事, 経済的事由・心理社会的問題
機械的異常	口唇口蓋裂, アデノイド肥大, 神経筋疾患による吸綴・嚥下障害
消化器疾患	胃食道逆流, 慢性便秘症, 胃腸疾患に伴う腹痛・嘔気
食欲不振による摂食不良	
社会心理的問題	愛情遮断症候群, 神経性食欲不振症など
全身性・器質性疾患	心疾患, 呼吸器疾患
	慢性感染症, 免疫不全
	脳性麻痺, 脳内疾患 (脳腫瘍, 水頭症など)
	遺伝症候群
	貧血
栄養吸収不良, 栄養喪失	
肝・胆道系疾患	胆道閉鎖症, 肝硬変
吸収不全症候群	乳糖不耐症, 腸管アレルギー, 炎症性腸炎, 腸回転異常症, 短腸症候群, 感染性下痢症
エネルギー消費の亢進	
甲状腺機能亢進症	
悪性腫瘍	
慢性炎症性腸疾患	
慢性全身性疾患	若年性関節リウマチなど, 慢性呼吸不全 (気管支肺異形成), 慢性反復性感染症
慢性代謝異常症	先天性代謝異常症, 糖尿病, 副腎不全など

(文献1, 2を参照して作成)

表2 病歴からのやせの鑑別診断

病歴	鑑別診断
下痢・軟便	吸収不全症候群, 慢性腸管感染症, 甲状腺機能亢進症
慢性便秘	短腸症候群, 食欲不振の原因
慢性中耳炎, 反復感染	免疫不全
いびき, 口呼吸	アデノイド肥大
喘鳴	気管・気管支の機械的閉塞 (血管輪), 慢性肺疾患
嘔気・嘔吐	胃食道逆流, 消化管蠕動低下, 腸管閉鎖など
反芻, 嚥下遅滞, など	吸綴・咀嚼運動不全, 口腔内過敏
多飲多尿, 過食	糖尿病, 尿崩症, 習慣性多飲多尿, 高Ca血症

(文献1, 2を参照して作成)

表3 身体所見からのやせの鑑別

身体所見	可能性のある疾患
バイタルサイン	
低血圧	副腎不全, 下垂体機能低下症
高血圧	腎疾患, 甲状腺機能亢進症, 副腎腫瘍など
頻脈	甲状腺機能亢進症
全身所見	
顔色不良	貧血, 副腎疾患, 甲状腺疾患
drooling	oral motor dysfunction
脱毛を伴ったやせ	高度栄養障害, 消耗性疾患
顔貌異常	先天奇形症候群, 染色体異常症など
頭頸部所見	
小頭症	神経疾患, 胎児アルコール症候群
大泉門閉鎖不全	ビタミンD 欠乏症, 甲状腺機能低下症
乳頭浮腫	頭蓋内圧亢進
アフタ性口内炎	クローン病
口腔・舌異常	奇形による摂食低下
甲状腺腫	甲状腺疾患
胸部所見	
喘鳴等	気管支喘息, 慢性肺疾患, 心疾患
心雑音	先天性心疾患
腹部所見	
腹部膨満, 腸蠕動亢進	吸収不全
肝脾腫	肝疾患, 代謝異常症, 悪性疾患
泌尿生殖器系所見	
尿路・外性器異常	内分泌疾患
直腸瘻孔	クローン病
筋・骨格系所見	
ばち状指	心疾患 / 肺疾患による慢性低酸素血症
浮腫	蛋白欠乏
神経学的所見	
深部腱反射異常	脳性麻痺
神経症	ビタミン B12, B3, B6, E 欠乏症
皮膚・粘膜所見	
皮膚剥脱	亜鉛欠乏, ビオチン欠乏
candidiasis	immune deficiency
さじ状爪	鉄欠乏
口角炎・肛門周囲発赤	ビタミン B2, B3, B6 欠乏症
多数の痣, 高度のおむつ皮膚炎	虐待, ネグレクト

(文献 1, 2 を参照して作成. やせをきたさない成長障害は除外した.)

広汎性発達障害や、自閉症スペクトラムにあたる子どもの場合、食品の舌で触れた時の感触で嫌がったり、白米しか食べないなど、離乳食での偏食が目立つこともあります。乳児期からの極端なミルク嫌いも、その後の食事の嗜好などを十分に聴取する必要があります。

#### 4. 現 症 (表 3)

成長曲線を描くこと、病歴聴取、一般的な診察で、体重増加不良ややせの原因にかなり迫ることができます。栄養摂取の問題が主である場合は、様々なビタミン不足などの症状も出る可能性があります。例えばビタミンD欠乏症の場合、つかまり立ち開始後には、下肢の彎曲が出現し、くる病所見が明らかになってきます(図2)。また、アレルギーミルクのみを飲んでいる子どもの場合、ビオチンやカルニチン欠乏により皮膚所見が出てくることがあります。

母乳育児に伴う鉄欠乏性貧血も、成長障害や体重増加不良の主な原因となります。

#### 5. 検査所見

●血液・尿検査：末梢血、一般検尿所見、一般血液・尿生化学所見に加え、以下の点も栄養評価には必要となります。

- ・プレアルブミンの他、Zn、セレンなど微量元素の測定
- ・血中IGF-I：IGF-Iは、成長ホルモン分泌量の指標となりますが、栄養にも大きく左右されます。IGF-Iが低値で、やせが目立つ場合は、成長ホルモン分泌不全症よりも栄養障害が疑われます。
- ・一般に、成長ホルモン分泌不全症では、成長障害にやせを伴うよりも、顔面や体幹は脂肪沈着があるためにむしろふっくらと見えます。ただし、低栄養状態が



図2 ビタミンD欠乏性くる病の下肢X線所見  
アレルギー除去食による栄養不足のため、やせをきたしていた。

長期にわたると、二次性に成長ホルモン分泌も低下するので、注意が必要です。

- ・低血糖気味、尿ケトン陽性、血中アルブミンが4g/dL未満、トリグリセリドが低値、といった所見のいずれかがあれば、低栄養の可能性あります。また、鉄欠乏性貧血もよく認めます。
- ・必要に応じ、染色体検査などを行い、原疾患の診断をまず行います。
- 画像検査：頭部MRI、腹部MRI、CT、腹部超音波検査など。
  - ・急激に著明なるいそをきたす場合、器質性疾患が疑われます。症状、血液・尿検査から、脳内あるいは腹部臓器の器質性疾患を疑う所見がないか、注意します。

## 症例1 解説

この症例は、病歴から子宮内発育遅延に伴う低出生体重があり、哺乳後の嘔吐が頻回にあることが明らかとなりました。また、成長曲線では体重増加不良と共に身長増加不良も認めました（図1実線、症例1）。現症では、小顎があり、逆三角形の顔、体の左右非対称が認められました（図3）。検査所見では、血中IGF-Iは7 ng/mLと低値を認めました。

診断は、シルバーラッセル症候群です。7番染色体の母性片親性ダイソミーが確認され、病因が特定されました。頻回の嘔吐は、胃食道逆流によるものでした。胃食道逆流が高度であったため、外科的な治療を必要としましたが、その後改善し、SGA性低身長症に対する成長ホルモン治療も行い、成長捕捉を認めました。

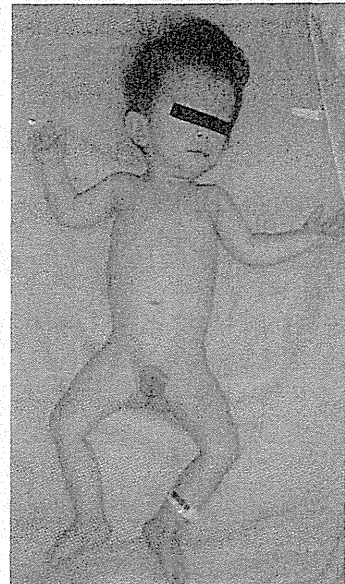


図3 シルバーラッセル症候群  
広い額、耳介従立、筋緊張低下、逆三角形の顔、上下肢に左右差を認める。

## 小児思春期のやせ

Q

**症例2** 3歳、女児。身長体重増加不良を主訴に来院。家族は両親と弟。弟とは12ヵ月しか年が離れていない。食事摂取は良好、食べさせると際限なく食べる、という。便性も悪くない。発達はほぼ正常。診察室では、3歳としては大変行儀が良い。現症では、やせが目立つ他、皮膚に痣などはない。⇒ 診断は？

**症例3** 12歳、女児。中学に入り、夏休みから4ヵ月間に6kgの急激な体重減少を認めた。肥満度は-30%。本人はダンス部に所属し熱心に運動をしており、特に体調不良は訴えない。やせているとも思わない。月経は、初経11歳、ほぼ順調であったが、3ヵ月前から止まっている。まじめで妥協できない性格、学校の成績は中くらい。嘔気・嘔吐、頭痛はないが、視力低下がみられている。⇒ 診断は？

A

### 1. 成長の評価

以下の診断の手順は、基本的に乳児期と同じです。0～17歳の成長曲線を使用し、そこに身長体重データをプロットしていきます

すが、症例2のように年少児で、体重増加不良の始まりが乳児期の場合、2歳までの成長曲線にもプロットしてみると、いつ頃が発病なのかがよくわかると思います。



思春期年齢は、成長が大きく変化する時期なので、評価には注意が必要です。日本人女子の二次性徴開始（乳房発育開始）時期は、平均9歳3～6ヵ月で、男子の二次性徴開始は精巣が大きくなり始める時と一致しますが、平均11歳6ヵ月です。この頃から、特に女子では標準BMIが上昇していきます。すなわち、思春期には身長のスパートと一致、あるいはやや先んじて急激に体重も増加するのが正常の成長です。したがって、思春期にBMIが上昇しないのは、やせが進行しているということになります。

## 2. 病歴の聴取

小児期のやせは、遅発型の先天性疾患も一部病因となりますが、多くは後天性の疾患による体重増加不良が病因です。

- **悪性腫瘍など消耗性疾患**：消耗性疾患が原因のやせは、はじめは身長増加不良を伴わないこともあります。脳腫瘍では、視床下部・下垂体障害があると成長ホルモン分泌不全を含む下垂体ホルモン分泌不全症が起り、成長障害を認めますが、やせのみの進行は起きにくいのが特徴です。一方、間脳症候群を起こしている場合は、著明なるいそが進行します。また、自己免疫疾患や慢性感染症など炎症性疾患でも体重増加不良が起ります。
- **甲状腺疾患**：バセドウ病は、思春期女兒に発病の一つのピークがあります。成人発症のバセドウ病の場合、代謝が亢進してやせが著明になってきますが、小児思春期では食欲が亢進するため、見かけ上やせの進行が認められないことも少なくありません。頻脈、落ち着きがなく学力が低下する、夜尿の出現、暑がり、イライラして怒りやすい、などがみられたら、体重減少がなくてもバセドウ病を疑って検査します。
- **糖尿病**：口渇多飲多尿を伴い、体重減少を

認めます。易疲労感は、子どもでは気付かれないこともあります。

- **発達障害に伴うやせ**：広汎性発達障害等では、摂食障害を起こしてやせが進行することがあります。いわゆる神経性食欲不振症との鑑別が必要になります。
- **中枢性摂食異常症、社会心理的原因のやせ**：小児期のやせは、社会環境や心理面の問題で起こることも少なくありません。幼児期には愛情遮断症候群という、ネグレクトなどによる成長障害が起ります。また、過度の習い事など心理的負担が多い場合や、家族の疾病（アルコール依存症や精神疾患）、家庭内の不和、学校生活の適応障害などがあると、容易に中枢性摂食異常症（神経性食欲不振症、過食症など）を発症します。最近の傾向として「やせ」「やせ傾向」の子どもの割合は年々増加しています（図4）。メディアの影響が関与していると思われませんが、このような傾向は、中枢性摂食異常症予備軍を多く作っていることとなります。摂食行動の異常や変化（極端に摂取量が少ない、揚げ物を嫌がり、揚げ物の衣を除いて食べる、など）がないか、病歴の聴取とともに、摂取量評価を行うことが必要になります。

## 3. 栄養状態

血液検査所見での評価は、上記に準じます。血中IGF-I値は、年齢、特に思春期年齢で大きく変化し、標準値もかなり幅があるので、単独での評価は難しいところがあります。摂食量の低下が疑われる時は、摂取量評価を行い、栄養指導していく必要があります。

## 4. 現症

通常の見症に加え、二次性徴の評価、摂食異常が疑われる場合は、唾液腺の腫脹や手の吐きだこがないか見ます。

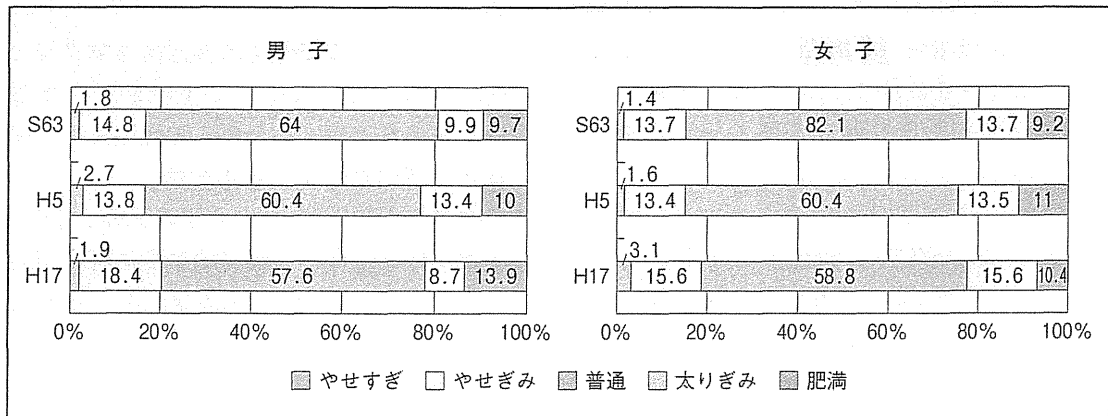


図4 小児の肥満度年次推移 (6~14歳) 平成17年度厚生労働省国民健康・栄養調査

### 5. 検査所見

乳児と同様ですが、年齢別標準値が設定してあるものはそれによって判断します。

#### 症例2 解説

病歴をとっていく時に、母子手帳からデータを収集しました。この時、「赤ちゃんに一言」という欄に白い紙が貼ってあり、よく見るとその下に「優しい女の子になって欲しい」と書いてあるのに気がきました。成長は、新生児乳児期は標準の成長曲線の範囲内、その後身長も体重も全く増加しなくなっています。血液検査、画像検査にて、器質性の疾患は認めませんが、成長ホルモン分泌、甲状腺ホルモンは軽度の低下を認めました。しかし入院を続けていると、特に治療をしなくても身長も体重も増加していき、甲状腺ホルモン、IGF-I値は改善しました。ところが退院すると、身長も体重も全く増えず、再入院にて急激に増加することを繰り返しました。診断は、心理社会的成長障害、愛情遮断症候群でした。弟の妊娠・出産以後、母子の意思疎通がうまくいかなくなってしまった例です。この成長曲線(図5)は、典型的な愛情遮断症候群の「階段状成長」を示しています。

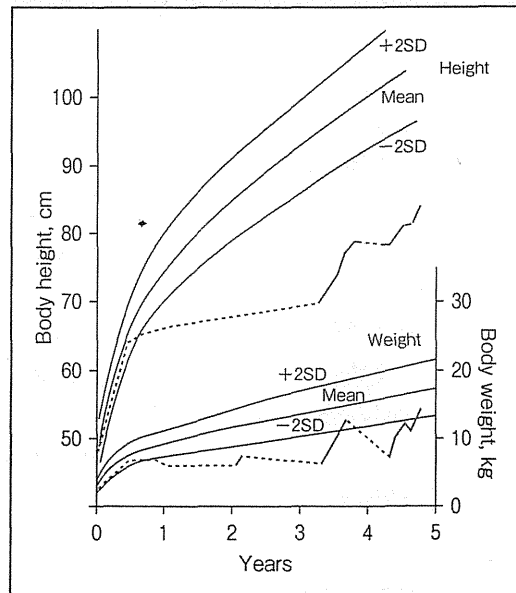


図5 愛情遮断症候群の成長障害

### 症例3 解説

病歴、ボディイメージの歪み、過活動、病識がない、続発性無月経は、典型的な神経性食欲不振症ですが、頭部MRIを撮影したところ、大きな嚢胞状の占拠性病変がありました。手術によりこの病変は全摘出され、悪性所見はなく経過は良好です。しかし、ボディイメージの歪みは残り、食事量を調節しようとする傾向は持続しています。脳内病変に摂食障害の心性を伴った状態、と考えられます。

\* \* \*

やせの鑑別を、乳児期と幼児期・小児思春期に分けて述べました。

まず、器質性疾患、消耗性疾患など、治療が必要な疾患を鑑別すること、その際には、

年齢により主な病因が異なること、さらに心理社会的な問題によるやせを常に鑑別におく必要があることがポイントとなります。

### [文 献]

- 1) Frank D, Silva M, Needlman R : Failure to thrive : Mystery, myth and method. *Contemp Pediatr* 10 : 114, 1993
- 2) Committee on Nutrition American Academy of Pediatrics : Failure to thrive. "Pediatric Nutrition Handbook, 6th ed" Kleinman RE ed. American Academy of Pediatrics, Elk Grove Village, p601, IL 2009

---

IV-3. 研究成果の刊行物・別刷

(平成 25 年度)

---



Official Research Journal of  
the American Society of  
Exercise Physiologists

ISSN 1097-9751

## FoxO1 Inhibits Skeletal Muscle Hypertrophy Through mTOR-independent Mechanisms

Rachael A. Potter<sup>1</sup>, Alissa D. DeLong<sup>1</sup>, Sierra M. Smith<sup>1</sup>, Benjamin M. Erb<sup>1</sup>, Bryon Renwand<sup>1</sup>, Yasutomi Kamei<sup>2</sup>, Yoshihiro Ogawa<sup>2</sup>, and Thomas J. McLoughlin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Kinesiology, The University of Toledo, Toledo, Ohio, <sup>2</sup>Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo

### ABSTRACT

**Potter RA, DeLong AD, Smith SM, Erb BM, Renwand B, Kamei Y, Ogawa Y, McLoughlin TJ.** FoxO1 Inhibits Skeletal Muscle Hypertrophy Through mTOR-independent Mechanisms. *JEPonline* 2013;16(4):32-50. The canonical Akt/mTOR signaling pathway plays a strong role in promoting skeletal muscle hypertrophy through regulating anabolic and catabolic signaling cascades. The transcription factor, FoxO1, a downstream molecular target of Akt signaling, may play a negative role in skeletal muscle hypertrophy through suppression of growth signaling and/or upregulation of atrophy gene expression. Using a transgenic mouse model in which FoxO1 is specifically expressed within skeletal muscle, we tested the hypotheses: (a) that FoxO1 inhibits skeletal muscle hypertrophy *in vivo*; and (b) that inhibition of skeletal muscle hypertrophy conferred through FoxO1 expression is associated with suppression of Akt/mTOR signaling and upregulation of muscle atrophy F-box (MAFbx/atrogen-1) gene expression. The findings confirm that FoxO1 inhibits skeletal muscle hypertrophy associated with 2 wks of mechanical overload (synergist ablation), evidenced through dampened increases in muscle mass, protein content, and muscle cross sectional area. We conclude that FoxO1 overexpression hampers the ability of skeletal muscle to hypertrophy, and that this suppression involves mechanisms independent of mTOR signaling.

**Key Words:** Synergist Ablation, Ubiquitin, Anabolism, Atrophy, p70<sup>S6k</sup>

## INTRODUCTION

The regulation of skeletal muscle hypertrophy is contingent upon the fine balance between protein synthesis and degradation. Although this fine balance is maintained by a myriad of molecular signaling mechanisms, a wealth of data has implicated the canonical Akt/mTOR signal transduction pathway and associated downstream molecules (e.g., p70<sup>s6k</sup>, 4EBP-1) as potent regulators of skeletal muscle size (5,18,24). Activation of Akt and subsequent activation of downstream molecules (e.g., mTOR) appears to play a role in promoting skeletal muscle hypertrophy through not only induction of protein synthesis machinery, but also the downregulation of protein degradation cascades. Specifically, activation of molecules within the canonical Akt/mTOR pathway appears to suppress gene expression of key muscle degradatory genes, namely the muscle atrophy F-box protein (MAFbx/atrogen-1), an E3 ubiquitin ligase that plays a critical role in regulating protein ubiquitination and breakdown in skeletal muscle (4,11,30).

The ability of the Akt-mediated signaling to dictate changes in muscle size appears to be due, in part, through its influence on the transcription factor FoxO1. Specifically, FoxO1, a known target of Akt kinase activity (28), is phosphorylated and subsequently sequestered in the cytoplasm and kept removed from its nuclear target genes upon Akt activation (6,28,35). When Akt signaling is markedly suppressed, as in cases of muscle atrophy (5,8), FoxO1 accumulates in the nucleus and can promote the expression of MAFbx/atrogen-1 (16). Conversely, in cases of muscle hypertrophy, when Akt signaling is activated, FoxO1 has been shown to be hyperphosphorylated and sequestered in the cytoplasm (19).

Using an in vivo muscle specific overexpression model, Kamei et al. (16) reported that mice that overexpress FoxO1 had decreased muscle size, which was accompanied by increased gene expression of known muscle atrophy-associated genes (e.g., MAFbx/atrogen-1, lysosomal proteinase, capthesin-L). Given that activation of FoxO1 has been shown to promote the specific degradation of key anabolic signaling molecules, specifically mTOR and p70<sup>s6k</sup> (34), it is reasonable to speculate that amplification of FoxO1 activity has a negative impact on muscle size, in part through hampering growth signaling. Although yet to be explored, given its potent role in the regulation of muscle hypertrophy (3,5), FoxO1 may act to hinder skeletal muscle hypertrophy upon exposure to growth stimulus (e.g., mechanical overload) through disruption of Akt and mTOR mediated growth signaling.

The purpose of this investigation was to test the hypotheses: (a) that FoxO1 overexpression in skeletal muscle suppresses hypertrophy; and (b) that the suppression is associated with compromised Akt, mTOR, p70<sup>s6k</sup>, and 4EBP-1 signaling (i.e., phosphorylation status) and increased MAFbx/atrogen-1 gene and protein expression. These hypotheses were tested using a transgenic mouse model in which the FoxO1 protein is specifically overexpressed within skeletal muscle (16). Muscle hypertrophy was induced via a synergist ablation surgical model, in which the plantaris muscle was chronically overloaded for a period of 2 wks (12).

## METHODS

### Subjects

**Animals:** Three-month-old male wildtype C57BL/6 (WT) and skeletal muscle specific FoxO1 overexpressing mice (FoxO1<sup>+/-</sup>, C57BL/6 background) used in the experiments were obtained from an established breeding colony at The University of Toledo. FoxO1 overexpression was driven within skeletal muscle of transgenic mice via a skeletal muscle actin promoter, as previously described (16). All procedures were performed in accordance with University of Toledo Institutional Animal Care and

Use Committee guidelines. All animals were housed in clear polycarbonate cages, exposed to a 12:12 hr light-dark cycle (lights on at 0800 hrs), and provided a standard rodent diet and water ad libitum. For all experiments, Line A2 FoxO1<sup>+/-</sup> mice were used, as these mice possess the highest FoxO1 transgene copy number incorporation and, therefore, express the highest amount of the FoxO1 protein (16).

**Animal Surgeries:** Following genotypic determination, FoxO1<sup>+/-</sup> and WT mice were divided into two groups (n = 10-12 per group): (a) 14-day sham surgery (control); and (b) 14-day synergist ablation (overload). All mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of 2.5% Avertin. Following anesthetization, a small incision over the posterolateral aspect of the lower hindlimb was made, exposing the plantaris, soleus, and gastrocnemius muscles, as previously described (12). The synergist soleus and gastrocnemius muscles were excised, leaving the plantaris muscle intact (synergist ablation overload model). This was performed bilaterally on all animals. Animals exposed to a sham surgery (animals anesthetized, muscle exposed and the incision sutured without removing the muscles) served as controls. The incisions were then closed and animals returned to their cages and allowed to resume normal cage activity. Non-surgery control mice initially included in the study were found to be not statistically different from sham-control mice on any of the dependent variables measured. As such, non-surgery controls were subsequently pooled with sham-controls for all analyses (data not shown).

## Procedures

**Muscle Collection and Protein Quantification:** Following 14-days of normal cage activity, control mice and mice exposed to synergist ablation (mechanical overload) were anesthetized and plantaris muscles excised, cleaned of any residual connective tissue, weighed, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for subsequent analysis. Plantaris muscles were homogenized in PKB buffer supplemented with HALT™ protease inhibitor single-use cocktail (Thermo Scientific, Rockford, IL) and 10 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> using a TissueLyser (2 x 3.0 min at 30 Hz; Qiagen, Valencia, CA). Homogenates were spun at 14,000 x g for 15 min at 4°C and the supernatants were removed and rapidly frozen at -80°C. Protein concentrations of the supernatants were subsequently determined using detergent-compatible protein assay kit (DC Protein Assay, Bio-Rad, Hercules, CA) and quantified by spectrophotometry using a microtiter plate reader (SpectraMax 190; Molecular Devices, Sunnyvale, CA). For determination of FoxO1 protein content and cellular localization, cytoplasmic and nuclear fractions were obtained via use of a commercially available extraction kit (ProteoJET; Fermentas Life Sciences, Glen Burnie, MD).

**Histology:** Control and overloaded plantaris muscles from a separate cohort of mice were excised, mounted in tissue freezing medium, and frozen in liquid nitrogen pre-cooled isopentane. Serial muscle sections (10 μm) were stained with hematoxylin and eosin and sections visualized using an Olympus IX70 fluorescence microscope (Melville, NY) equipped with a digital camera and image processing software (Spot-RT, Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, MI). Muscle fiber CSA of all muscle fibers in each of the collected control and mechanically overloaded sections were digitized and quantified using Image-PRO Plus software (Media Cybernetics, Bethesda, MD) by a blinded experimenter. When the automated approach failed and there was not 100% fidelity, the experimenter manually verified that all muscle fiber borders had been traced.

**Western Blotting:** Muscle homogenates (50 μg) were solubilized in Laemmli sample buffer and boiled for 5 min, resolved by SDS-PAGE on 6% (mTOR), 7.5% (FoxO1, p70<sup>S6k</sup>, and Akt), 10% (MAFbx/atrogen-1) or 16% (4EBP-1) tricine or polyacrylamide gels, transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF-FL; Millipore; Billerica, MA) via either wet-transfer (mTOR; Hoefer TE-22; 400mA constant for 2 hrs; 4EBP-1; Hoefer TE-22; 200mA constant for 1 hr) or semi-dry blotting (FoxO1, Akt,

p70<sup>S6k</sup>, and MAFbx/atrogin-1; TransBlot Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA; 20v constant for 1 hr), blocked in 5% non-fat dry milk in TBS for 1 hr at room temperature, and immunoblotted overnight at 4°C with total-mTOR, phospho-mTOR (Ser<sup>2448</sup>), total FoxO1, total-p70<sup>S6k</sup>, phospho-p70<sup>S6k</sup> (Thr<sup>389</sup>), total Akt, and phospho-Akt (Ser<sup>473</sup>), total 4EBP-1, phospho-4EBP-1 (Thr<sup>37/46</sup>) and MAFbx/atrogin-1 antibodies (1:1000; Cell Signaling, Beverley, MA). Equal protein loading was verified using GAPDH expression (1:5000; Cell Signaling, Beverley, MA). After a 1 hr incubation with an infrared-conjugated Alexa Fluor 680 secondary antibody (1:5000; Molecular Probes, Carlsbad, CA) at room temperature, the immunoreactive proteins were observed via infrared detection (Odyssey Imaging System, LI-COR BioSciences, Lincoln, NE) and quantified by densitometry.

**Immunoprecipitation:** Muscles samples were homogenized in NP-40 buffer (50mM Tris base, 150 mM NaCl, 1% NP-40, pH 8.0) containing HALT™ protease inhibitor single-use cocktail supplemented with 10 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and spun at 14,000 x g for 15 min at 4°C; supernatants were collected and used for immunoprecipitation reactions. Supernatants were pre-cleared using a slurry of protein A/G magnetic beads (Invitrogen, Carlsbad, CA) for 1 hr at 4°C and then incubated overnight at 4°C with a total mTOR antibody (1:100; Cell Signaling). Following the overnight incubation, muscle/antibody complexes were incubated for 1 hr with a slurry of protein A/G magnetic beads at 4°C. The magnetic beads were then isolated using a DynaMag magnet (Invitrogen), washed with NP-40 buffer, solubilized in Laemmli sample buffer, and heated to 95°C in preparation for SDS-PAGE. Following SDS-PAGE, western blotting was performed using antibodies against phosphorylated and total mTOR (1:1000). Following 1 hr incubation with an infrared-conjugated Alexa Fluor 680 secondary antibody (1:5000) at room temperature, the immunoreactive proteins were observed via infrared detection (Odyssey Imaging System, LI-COR BioSciences, Lincoln, NE) and quantified by densitometry.

**Real-time Quantitative PCR (qRT-PCR):** Total RNA was isolated from control and overloaded WT and FoxO1<sup>+/-</sup> plantaris muscles using an RNeasy Mini column (Qiagen, Valencia, CA), purified by DNase digestion (Turbo DNase; Ambion, Foster City, CA), and stored at -80°C until further processing. cDNA synthesis using 10 ng of total RNA and subsequent PCR amplification was performed using a one-step qRT-PCR kit (Superscript III, Invitrogen) and gene specific Taqman® primers and probes (Applied Biosystems, Foster City, CA) designed against MAFbx (Mm00499518\_m1) and GAPDH (Mm99999915\_g1). The qRT-PCR reactions were carried out in triplicate using a Applied Biosystems 7500 Real-Time Detection System. Analyses were performed to verify the dynamic range and confirm consistency among the amplification efficiencies of the various target genes analyzed. Data were expressed via the comparative C<sub>t</sub> method, in which ΔC<sub>t</sub> values were calculated for all samples as follows: C<sub>t</sub>target gene - C<sub>t</sub>housekeeping gene, where the target gene was MAFbx and the housekeeping gene was GAPDH. Relative changes in gene expression were then calculated for each target gene via the 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> method, in which ΔC<sub>t</sub> values determined for each of the experimental samples (WT ablation, FoxO1<sup>+/-</sup> control and FoxO1<sup>+/-</sup> ablation) were subtracted from the ΔC<sub>t</sub> value from the calibrator sample (WT control).

**Ubiquitination Assays:** Muscle homogenates from control and overloaded WT and FoxO1<sup>+/-</sup> mice were subjected to immunoprecipitation via magnetic bead separation, as described previously. Briefly, pre-cleared homogenates were incubated overnight with ubiquitin antibody (1:100; SC-8017, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA). Immunoprecipitated proteins were resolved by SDS-PAGE on 4-15% polyacrylamide gradient gels (Jule Inc., Milford, CT). After which, gels were incubated overnight in Krypton Protein Stain (21)(Thermo Scientific, Rockford, IL) and then observed via infrared detection (Odyssey Imaging System, LI-COR BioSciences, Lincoln, NE), as previously described (21).



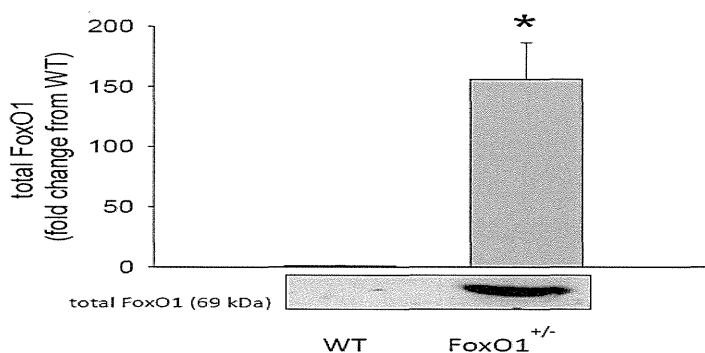
## Statistical Analyses

Differences in FoxO1 protein expression between wildtype and FoxO1<sup>+/-</sup> mice were analyzed via independent student *t*-test. Cytoplasmic and nuclear localization of total FoxO1 protein were analyzed using a three-way factorial ANOVA (strain [wildtype vs. FoxO1<sup>+/-</sup>] x treatment [control vs. ablation] x fraction [cytoplasmic vs. nuclear]. Where a significant effect was found, multiple comparison analysis was performed with the Sidak post hoc test to identify differences. All subsequent data obtained were analyzed with a two-way factorial ANOVA (strain [wildtype vs. FoxO1<sup>+/-</sup>] x treatment [control vs. ablation]) with a Student-Newman-Keuls post hoc analysis used to locate difference when a significant interaction effect was found. The alpha level was set at P<0.05 a priori and was used for determination of statistical significance in all statistical procedures.

## RESULTS

**FoxO1 expression inhibits skeletal muscle hypertrophy.** As shown in Figure 1, plantaris muscles of FoxO1<sup>+/-</sup> mice displayed significant elevations in FoxO1 total protein expression compared to WT counterparts.

Figure 1



**Figure 1. Total FoxO1 Protein Expression is Elevated in Plantaris Muscles of FoxO1<sup>+/-</sup> Mice Compared to Wildtype (WT) Mice.** Panel A: Total FoxO1 protein in WT and FoxO1<sup>+/-</sup> mice. \*, significant difference between FoxO1<sup>+/-</sup> and WT mice. P<0.05 for all significant differences. n = 6 for each group. Data represented as means ± standard error.

Body masses of FoxO1<sup>+/-</sup> mice were significantly smaller than that of age-matched WT mice, as previously reported by Kamei et al. (16). No significant difference in body mass was observed between control and overload conditions for WT and FoxO1<sup>+/-</sup> mice. When the data were normalized to body mass, no differences in control plantaris muscle mass or protein content were observed between WT and FoxO1<sup>+/-</sup> mice. The plantaris muscles of WT mice and FoxO1<sup>+/-</sup> mice exhibited a significant increase in both relative (60% and 27%, respectively) and absolute (58% and 25%, respectively, data not shown) mass following overload (Table 1). This finding was corroborated by

significant increases in relative (61% and 12%, respectively) and absolute (51% and 19%, data not shown) protein contents.

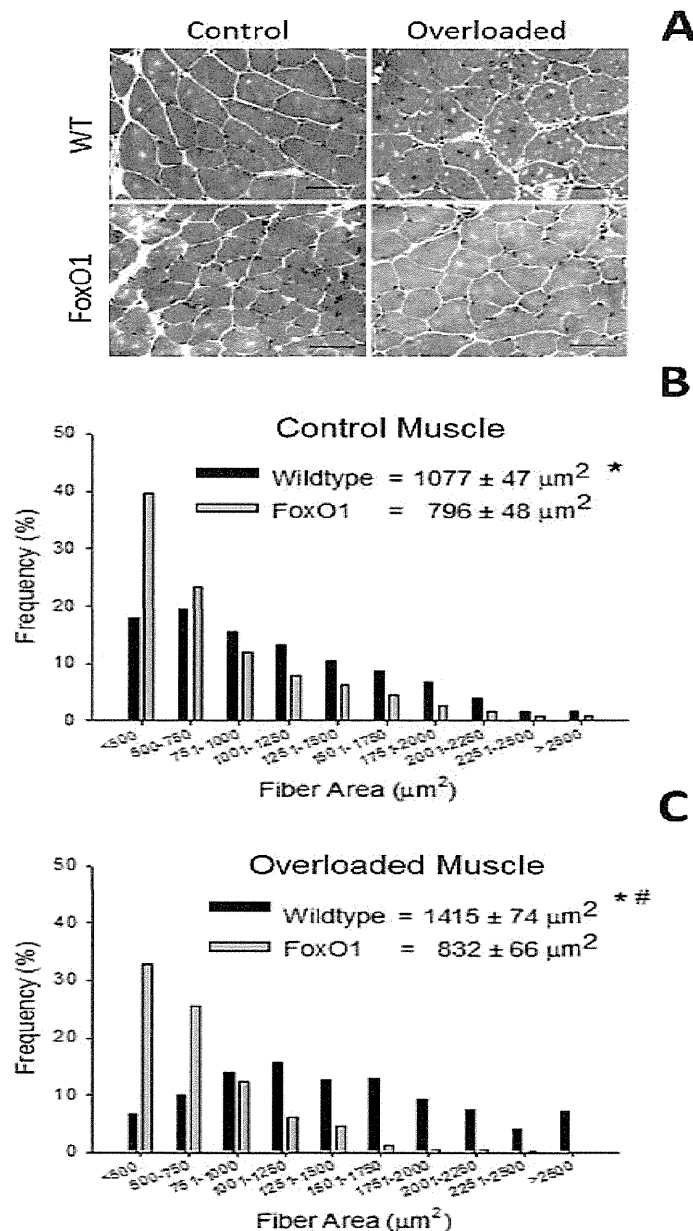
Table 1. Body mass, normalized muscle mass and normalized protein content for wildtype and FoxO1 transgenic control or mechanically overloaded mice.

<i>Condition</i>	<i>Treatment</i>	<i>Body Mass (g)</i>	<i>mg muscle/ g body mass</i>	<i>% Change from Control (relative mass)</i>	<i>mg protein/ g body mass</i>	<i>% Change from Control (relative protein)</i>
<i>Wildtype</i>	Control	25.2 ± 0.45 <sup>&amp;</sup>	0.68 ± 0.02	–	0.054 ± 0.006	–
	Overloaded	26.2 ± 0.47	1.09 ± 0.02 <sup>*#</sup>	↑ 60%	0.087 ± 0.006 <sup>*#</sup>	↑ 61%
<i>FoxO1</i>	Control	20.7 ± 0.47	0.66 ± 0.02	–	0.055 ± 0.006	–
	Overloaded	20.2 ± 0.45	0.84 ± 0.02 <sup>*</sup>	↑ 27%	0.062 ± 0.005 <sup>*</sup>	↑ 12%

&= sig. main effect for condition (wildtype sig. greater than FoxO1), \*= sig diff. from control, #= sig diff. from control and ablation for both WT and FoxO1.  $p < 0.05$  for all comparisons.  $n=8-10$  muscles per group.

Although both mouse strains exhibited increases in muscle mass and soluble protein content following the mechanical overload compared to their respective controls, the changes observed in the FoxO1<sup>+/-</sup> mice were significantly muted compared to WT counterparts. In control muscle, fiber cross-sectional area of WT mice was significantly greater than that of FoxO1<sup>+/-</sup> mice (Figure 2A), with the majority of the muscle fibers in FoxO1<sup>+/-</sup> plantaris muscles being  $<500 \mu\text{m}^2$  (Figure 2B). Muscle cross-sectional area of WT mice increased upon exposure to mechanical overload compared to control and was significantly greater than that of FoxO1<sup>+/-</sup> mice. The hypertrophic response was significantly blunted in FoxO1<sup>+/-</sup> mice compared to WT mice 4.5% vs. 32% hypertrophy, respectively; Figure 2C) and was not statistically significant from control. No significant differences were observed in the number of muscle fibers between WT and FoxO1<sup>+/-</sup> (control muscle;  $582 \pm 31.8$  vs.  $525 \pm 50$ , respectively; data not shown).

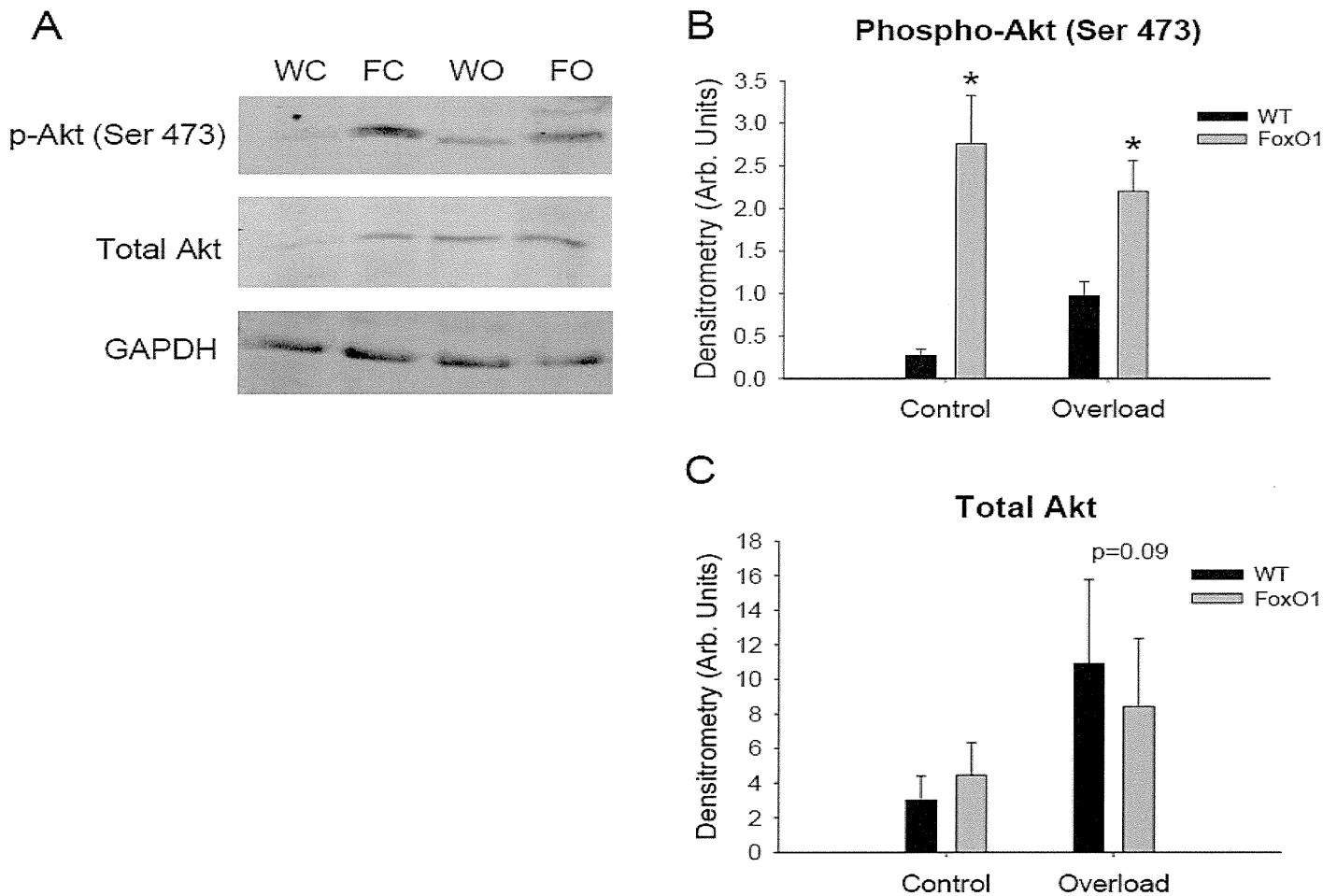
Figure 2



**Figure 2. Plantaris Muscle Cross-Sectional Area is Smaller and Does Not Significantly Increase Following Overload in FoxO1<sup>+/-</sup> Mice.** Panel A: Hematoxylin and eosin staining of control and overloaded (ablation) plantaris muscles of wildtype (WT) and FoxO1<sup>+/-</sup> mice. Panel B: Frequency histogram of muscle cross-sectional areas of control plantaris muscles of WT and FoxO1<sup>+/-</sup> mice. \*, significant main effect for strain; #, significant difference between WT and FoxO1<sup>+/-</sup> mice in control plantaris muscle. Panel C: Frequency histogram of muscle fiber cross-sectional areas of overloaded plantaris muscles of WT and FoxO1<sup>+/-</sup> mice. %, significant main effect for treatment; \*, significant difference from respective control. #, significant difference between WT and FoxO1<sup>+/-</sup> mice in overloaded plantaris muscle.  $P < 0.05$  for all significant differences.  $n = 8-10$  for all groups. Data represented as means  $\pm$  standard error.

**FoxO1-mediated inhibition of muscle hypertrophy is not associated with suppression of mTOR and p70<sup>s6k</sup> signaling.** Akt phosphorylation (Ser<sup>473</sup>) was significantly elevated in the muscles of FoxO1<sup>+/-</sup> mice compared to WT counterparts; however, mechanical overload did not differ from control as a whole (Figures 3A and 3B). Although mechanical overload resulted in elevations in total Akt in plantaris muscles of WT and FoxO1<sup>+/-</sup> mice compared to control (Figures 3A and 3C), the response in total Akt was similar in WT and FoxO1<sup>+/-</sup> mice (Figure 3C). Further, there was no significant strain by treatment interaction on protein levels of phosphorylated or total Akt.

## Figure 3



**Figure 3. Phosphorylated and Total Akt Protein in Control and Overloaded Plantaris Muscles of Wildtype and FoxO1<sup>+/-</sup> Mice.** Panel A: Representative western blot analyses from wildtype control (WC), FoxO1<sup>+/-</sup> control (FC), wildtype ablation (WO) and FoxO1<sup>+/-</sup> ablation (FO) conditions. Panels B and C: Quantification of western blot data for phosphorylated and total Akt, respectively. &, significant main effect for strain; \*, trend for significant main effect treatment (P=0.09). P<0.05 for all significant differences. n=6 for all groups. Data represented as means  $\pm$  standard error.