

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591213

研究課題名（和文）先天性下垂体形成不全の分子病態の解明

研究課題名（英文）Molecular basis of congenital pituitary defect

研究代表者

田島 敏広 (TAJIMA TOSHIHIRO)

北海道大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：50333597

研究成果の概要（和文）：

今回40例の先天性下垂体形成不全を伴う、複合型下垂体ホルモン欠損症(Combined pituitary hormone deficiency, CPHD)の成因を解析した。その中で、2例においてOTX2遺伝子の変異、1例でLHX4遺伝子の変異を同定した。OTX2遺伝子の異常は眼球欠損、精神運動発達の遅れを伴う2例で同定し、新たなCPHDの病態を確立した。またLHX4の新たな変異（V101A）を同定し、その機能喪失を証明した。臨床的にLHX4異常では下垂体低形成、トルコ鞍の形成不全が特徴とされてきたが、今回の症例ではトルコ鞍の形成不全を認めず、その表現型が一様ではないことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed 35 patients of congenital pituitary anomalies accompanying with combined pituitary hormone deficiency. As results, we identified novel mutations of the OTX2 gene (p.S136sX178, p.K75fsX103) and one novel mutation (V101A) of the LHX4 gene.

OTX2 is a transcription factor necessary for ocular and forebrain development. This study indicates that the OTX2 gene mutation is a cause of CPHD and the clinical phenotypes of OTX2 mutations involved ophthalmological and central nervous anomalies.

LHX4, a LIM-homeodomain transcription factor, is required for development of the pituitary and nervous system. A novel missense mutation (V101A) was identified. In vitro transfection studies demonstrated that this mutant was loss-of-function. An early report suggested that a poorly developed sella turcica was a characteristic feature caused by a LHX4 mutation. However, our patient had a normally developed sella turcica. Therefore, a poorly developed sella turcica is not a universal feature of patients with LHX4 mutations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児内分泌学、下垂体、発生

## 1. 研究開始当初の背景

下垂体前葉細胞はそれぞれ、副腎皮質刺激ホルモン(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、性腺刺激ホルモン [follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH)], 甲状腺刺激ホルモン(thyroid-stimulating hormone, TSH)、成長ホルモン (growth hormone, GH)、乳汁分泌ホルモン(prolactin PRL)を分泌する細胞に分化、増殖する。

視床下部-下垂体の発生に関わる転写因子の異常はヒトにおいて様々な複合型下垂体前葉ホルモン欠損 (CPHD) を起こすことが示されてきた。また各種転写因子の異常は下垂体の形成異常に加え、これらが発生に関わる下垂体以外の組織の異常を起こすこともある。小児科領域においては先天的な下垂体の形成不全は呼吸不全、低血糖を発症し、早期に適切なホルモン補充療法がおこなわれなければ、生命の危険を伴う。

したがって早期の CPHD の診断、治療介入は重要である。CPHD の早期診断の方法のひとつとして、新生児期におこなわれる甲状腺マスキングによって TSH と同時に、甲状腺ホルモンを測定する方法がある。このシステムにより TSH 分泌不全を早期に発見することが可能であり、それを契機に CPHD の診断にいたる。我々は現在までに札幌市衛生研究所とともに新生児マスキングで TSH と甲状腺ホルモンの同時測定を行い、CPHD の早期診断、早期治療をおこなってきた。

## 2. 研究の目的

今回の3年間の研究期間において我々は下垂体形成不全や透明中隔欠損や視神経、眼球、中枢神経系の異常をともなう CPHD の原因を明らかにし、まずそのメカニズムを *in vitro* で解析することを目的とした。

### (1) LHX4

LIM ホメオドメイン蛋白質である LHX3/4 を中心にまず解析を開始する。本邦ではこれらの異常を多数例で検討した報告はない。とくに LHX4 はその発現時期が下垂体前葉の発生早期であり、さらにその発現は下垂体に分化しうる体性幹細胞でみとめられ、前葉細胞の分化とともに消失してゆくことが報告されている。このことは体性幹細胞の未分化状態維持に必要な因子とのなんらかの相互作用が推定される。そこで LHX4 と相互作用をおこなうさまざまな因子のなかで下垂体前葉に存在する蛋白を同定し、そのクロストークを解明してゆく。

(2) OTX2 遺伝子はペアードタイプのホメオドメインを持つ転写調節タンパク質をコードしている。ヒトにおいては OTX2 の異常は眼球の欠損を引き起こすことが報告されているが、その下垂体、視床下部形成の役割については検討がなされていない。そこで OTX2 のヒトでの役割を理解するため、眼球欠損、下垂体・視床下部の形成不全の症例において解析をすすめ、CPHD との関連を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) LHX4 変異の同定と機能解析

① LHX4 の *in vitro* での機能を解析するために同定した LHX4 の変異発現ベクターを構築。さらに・FSH $\beta$  ブユニット、POU1F1 のプロモーターを用いたプロモーターアッセイ、DNA 結合能をゲルシフトアッセイにてその機能を野生型と比較検討する。

② LIM ホメオドメインは細胞質、核内に存在することが報告されている。またさまざまな蛋白と相互作用をおこない、その局在が変化することが知られている。そこで GFP 発現ベクターに LHX4 の野生体、変異体をクローニングし、COS 細胞にトランスフェクションし、共焦点蛍光顕微鏡にて観察し、野生体、変異体での細胞内局在について検討する。

### (2) OTX-2 異常による病態の解明

① CPHD での対象患者のヒト OTX2 遺伝子の解析し、同定した変異をヒト OTX2 cDNA に導入し、発現ベクターを構築する。OTX2 のプロモーター活性は Interstitial retinoid-binding protein (IRBP) 遺伝子のプロモーター、マウス Hesx1 プロモーター遺伝子を標的として測定する。

② それぞれの変異については野生型とともにトランスフェクションを行い、優性阻害効果、半量不全について検討する。

(3) 中枢性性腺機能低下症 (Hypogonadotropic hypogonadism, HH) を起こす成因の検討

① 中枢性性腺機能低下症、虹彩欠損、難聴を伴う患者の CHD7 遺伝子の解析

② 中枢性性腺機能低下症、副腎不全を伴う患者の DAX-1 遺伝子、SF-1 遺伝子の解析

## 4. 研究成果

### (1) LHX4 異常症

下垂体発生に重要な転写因子 LHX4 の新たな変異も同定した。今回の変異 (V101A) は LIM ドメインに存在した。臨床的には LHX4 異常では下垂体低形成、トルコ鞍の形成不全が特徴とされてきたが、今回のわれわれの症例ではトルコ鞍の形成不全を認めず、その表現型が一

様ではないことを示した。同定したLHX4の二つの変異(P366TとV101A)について*in vitro*での機能解析を行い、核内に移行することが可能であること、しかしV101AはPOUF1のプロモーターの活性化能を失っていることを確認した(図1)。

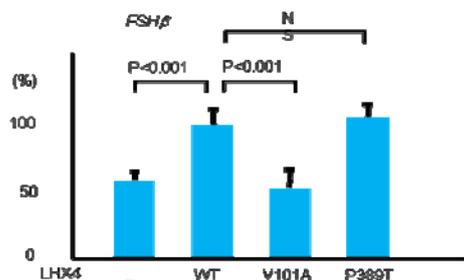


図1 変異LHX4機能解析

### (2) OTX2異常症

中枢神経系の発生に重要な転写因子OTX2異常により下垂体—視床下部の形成障害、中枢神経系の発生異常がヒトでおこることを解明した。今回同定した変異はp. S136sX178, p. K75fsX103である。この2例では小眼球症、精神運動発達の遅れを伴っていた。欠損ホルモンはp. S136sX178症例ではGH, TSH, LH/FSH, ACTHの欠損、p. K75fsX103症例では単独GH欠損であった。変異蛋白は*in vitro*の解析の結果、HESX1プロモーター、POU1F1プロモーターの活性化能が野生型に比較し低下していた。これらの所見は下垂体前葉ホルモン欠損を引き起こすひとつの要因と考えられた。これらの研究により、OTX2異常がCPHDの成因であること、OTX2異常によるCPHDの表現型、視床下部—下垂体の所見(図2)については多様性があることを確立した。今後無眼球症の患者において下垂体機能不全が存在し、患者の健康・生活の質の低下をきたしている可能性があり、内分泌検査、治療の重要性を示唆するものである。

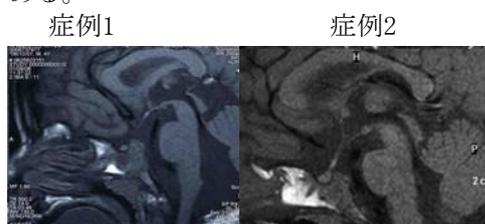


図2 MRI所見

### (3) HHの検討

HHを示す疾患のなかで、CARGE症候群は虹彩欠損、後鼻腔閉鎖、聴覚異常を伴い、視床下部障害を起こす疾患である。原因遺伝子はCHD7であるが、クロマチンリモデリング蛋白の1種である。今回典型的2例、さらにHHと虹彩欠損、聴覚障害のみの非典型的の1例でCHD7

遺伝子の変異を同定した。さらに副腎不全を合併した1成人例においてはX連鎖性副腎低形成症の責任遺伝子であるDAX-1遺伝子にミスセンス変異(L466R)を同定した。野生型DAX-1は*in vitro*でラットLHβサブユニット遺伝子のEgr-1による転写促進作用を抑制する。しかし、この変異DAX-1はその抑制作用を喪失していた。従ってDAX-1異常によるHHのメカニズムを明らかにした。

### (4) CPHDの成因の検討

新たにさらに15例CPHD患者を対象にPROP1, OTX2, LHX3, LHX4, HESX1, SOX2, GLI2を解析した。片側の視神経の形成不全を持つ患者でGLI2遺伝子のイントロンの1塩基置換を同定した。この患者では透明中隔欠損も伴っておりSepto-Optic-Dys-plasia(SOD)と診断した。GLI2はSonig Hedgehogシグナルの下流に存在する転写因子で、中枢神経の発達に重要な役割を果たす。現在この変異による機能変化を*in vitro*で検討し、CPHDの関連について明らかにしようとしている。SODの原因はいまだ完全には解明されていないが、GLI2の異常がその一つである可能性を示唆している。

今回の研究を通じて、CPHDの成因、臨床症状との関連を明らかにすることができた。今後このような検討を行うことは1)視床下部—下垂体の発生のメカニズム、2)中枢神経系の発達の異常の解明の手掛かりになりえる。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計44件)

- ①. Dateki S, Kosaka K, Hasegawa K, Tanaka H, Azuma N, Yokoya S, Muroya K, Adachi M, Tajima T, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, Sato N, Fukami M, Ogata T. Heterozygous orthodontic homeobox 2 mutations are associated with variable pituitary phenotype. J Clin Endocrinol Metab 95, 756-764, 2010 査読有
- ②. Tajima T, Ishizu K, Yorifuji T. Loss of function mutation (V101A) in a LIM domain of the LHX4 gene causes combined pituitary hormone deficiency. Exp Clin Endocrinol Diabetes 118, 405-409, 2010 査読有
- ③. Nakamura A, Shimizu C, Nagai S, Yoshida M, Aoki K, Kondo T, Miyoshi H, Wada N, Tajima T, Terauchi Y, Yoshioka N, Koike T Problems in diagnosing atypical

Gitelman's syndrome presenting with normomagnesaemia. Clin Endocrinol 72, 272-276, 2010 査読有

④. Adachi M, Asakura Y, Muroya K, Tajima T, Fujieda K, Kuribayashi E, Uchida S. Increased Na reabsorption via the Na-Cl cotransporter in autosomal recessive pseudohypoaldosteronism. Clin Exp Nephrol 14, 228-232, 2010 査読有

⑤. Nakamura A, Fujiwara F, Hasegawa Y, Ishizu K, Mabe A, Nakagawa H, Nagasaki K, Jo W, Tajima T. Molecular analysis of the GATA3 gene in five Japanese patients with HDR syndrome. Endocr J. 2010 Dec 10. [Epub ahead of print] 査読有

⑥. 田島敏広、中村明枝、城和歌子、石津桂、奥原宏治、藤枝憲二 先天性副腎過形成の成因と治療の最近の話題 日本小児科学会雑誌 114; 1373-1380, 2010 査読有

⑦. 田島敏広 成長ホルモン分泌不全性低身長 小児の薬の使い方 小児内科増刊号 42 565-666, 2010 査読無

⑧. 田島敏広 先天性複合型下垂体機能低下症 ゲノム医学 9 55-59 2009 査読無

⑨. Tajima T, Ohtake A, Hoshino M, Amemiya S, Sasaki N, Ishizu K, Fujieda K. OTX2 loss of function mutation causes anophthalmia and combined pituitary hormone deficiency with a small anterior and ectopic posterior pituitary. J Clin Endocrinol Metab. 94:314-319 2009 査読有

⑩. Tajima T, Jo W, Fujikura K, Fukushi M, Fujieda K. Results of neonates with elevated free thyroxine levels detected by a neonatal screening system. Pediatr Res 66 312-316, 2009 査読有

⑪. 田島敏広 複合型下垂体機能不全 小児疾患診療のための病態生理 小児内科 40 661-666 2008 査読無

⑫. Tajima T, Fujieda K. Prenatal diagnosis and treatment of steroid 21-hydroxylase deficiency. Clin Pediatr Endocrinol. 17:95-102, 2008 査読有

⑬. Tajima T, Tsubaki J, Ishizu K, Jo W, Ishi N, Fujieda K. Case study of a 15-year-old boy with McCune-Albright syndrome combined with pituitary gigantism: effect of octreotide-long acting release (LAR) and cabergoline therapy. Endocr J. 55:595-599, 2008. 査読有

⑭. Okuhara K, Abe S, Kondo T, Fujita K, Koda N, Mochizuki H, Fujieda K, Tajima T.

Four Japanese patients with adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism caused by DAX-1 gene mutations: mutant DAX-1 failed to repress steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and luteinizing hormone beta-subunit gene promoter activity. Endocr J. 55:97-103 2008 査読有.

[学会発表] (計 25 件)

①. 田島敏広 思春期発来異常へのアプローチ 第20回臨床内分泌 up date 2011年1月29日 札幌

②. Tajima T Dr Kenji Fujieda Memorial Lecture 49<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society for Pediatric Endocrinology 2010年9月24日 プラハ

③. Nakamura A, Jo W, Ishizu K, Tajima T, Fujieda K Longitudinal growth of patients with 21-hydroxylase deficiency.

International Symposium on Pediatric Endocrinology. 2010年3月31日 東京

④. Tajima T, Nakamura A, Ishizu K, Jo W. Molecular basis and clinical phenotypes

caused by OTX2 gene defects in combined pituitary hormone deficiency. 14th

International Congress of Endocrinology. 2010年3月29日 京都

⑤. Tajima T, Fujieda K Cytochrome P450scc as a cause of congenital adrenal hyperplasia (lipoid CAH) 2010年3月28日 京都

⑥. 田島敏広 思春期発来異常をめぐる諸問題、第43回日本小児内分泌学会学術集会、2009年10月3日 宇都宮

⑦. Tajima T, Fujieda K. Clinical and molecular genetic spectrum of lipoid CAH

and noncalssic lipoid CAH. LWPES/ESPE 8<sup>th</sup> Joint Meeting Global Care in Pediatric

Endocrinology 2009年9月13日ニューヨーク

⑧. 田島敏広 新生児スクリーニングで見つかる先天性副腎過形成症—健やかな成長を

目指して—第36回日本マススクリーニング学会 2009年8月21日、札幌

⑨. 田島敏広、藤枝憲二 先天性副腎過形成症のトランジションについて 第19回

臨床内分泌代謝 up date 2009年3月14日 東京

⑩. Tajima T, Ishizu K, Otake A, Amamiya S, Kosaka K, Hoshino M. Two novel mutations of the oTX2 causes anophthalmia, pituitary ectopic posterior lobe and combined

pituitary hormone deficiency. 90<sup>th</sup> annual meeting of Endocrine Society. 2008年6月17日サンフランシスコ

⑩. 田島敏広、石津桂、星野正也、大竹明、雨宮伸、佐々木望、藤枝憲二 下垂体形成異常におけるOTX2の役割 第81回日本内分泌学会学術総会 2008年5月17日 青森

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田島 敏広 (TAJIMA TOSHIHIRO)

北海道大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：50333597