

big ACTH (POMC と proACTH) に対する高感度 immune complex transfer EIA (ICT-EIA) の開発と臨床応用 2 : 巨大 ACTH 産生腺腫 (macroACTHoma, macA) あるいは異所性 ACTH 症候群 (EAS) での検討

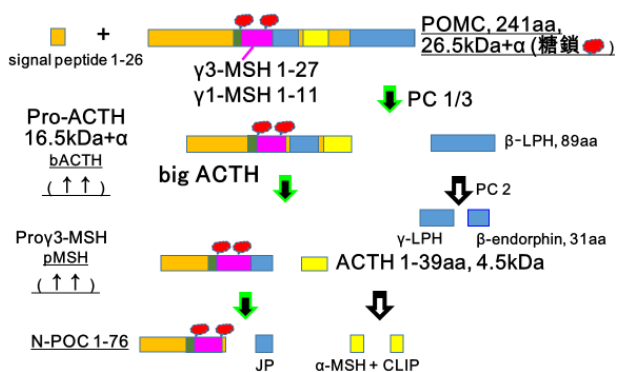
1) 今里胃腸病院・内科, 2) バイオマーカー測定センター, 3) 虎の門病院・病理, 4) 虎の門病院・間脳下垂体外科, 5) 東京脳神経外科病院・外科

片上秀喜^{1) 2)}・井下尚子³⁾・福原紀章⁴⁾・西岡 宏⁴⁾・山田正三^{4) 5)}

1. 緒 言

異所性 ACTH 症候群 (EAS) では micro ACTHoma (micA) に基づく Cushing 病 (CD) とは異なり, ACTH 前駆体タンパク (pro-opiomelanocortin, POMC) が特有の翻訳後修飾をうけ, ACTH 前駆タンパク, big ACTH : POMC と pro ACTH, が増加する (図 1. big ACTH:POMC+pro-ACTH)¹⁾.

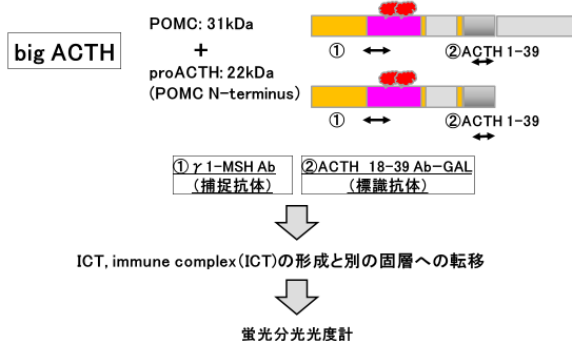
図 1



われわれは big ACTH にたいする新規の超高感度測定系 (ICT-EIA) を開発し, 本法が EAS 簡易診断に有用であることを報告してきた²⁾.

図 2

新規の big ACTH 測定法の開発: (immune complex transfer-EIA, ICT-EIA) 免疫複合体転移法



一方, macA は診断時にはすでに巨大腺腫 (腫瘍径 $\geq 1.0\text{cm}$) で発見され, 海綿静脈洞への伸展などの浸潤度が大きく, 難治性である. 同症においては免疫

活性と生物活性の低い ACTH が産生・分泌され, 顕性のクッシング徴候を示さない症例がある³⁾. そのため, 非機能性下垂体腺腫 (NF) と診断されることも少なくない.

さらに, 従来の γ 3-MSH RIA は不安定で, 凍結融解を 2 回以上, 繰り返すと, 高値を示すことがあきらかとなった. 一方, 新規の big ACTH 測定法は凍結融解操作や室温での安定性があることが明らかとなっている (データ示さず).

2. 目 的

macA において, EAS と同様の特有の POMC 翻訳後修飾の特異性, big ACTH タンパクの増加, の有無を新規の高感度 big ACTH 測定法 (ICT-EIA) を用いて検討した.

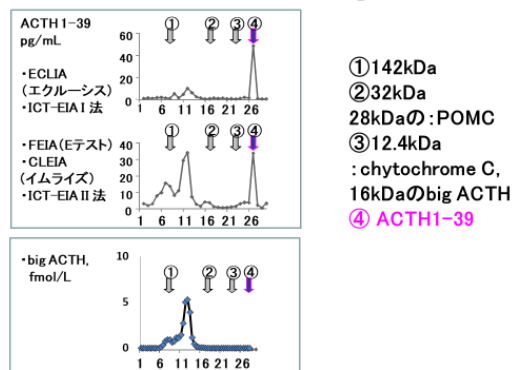
3. 対象と方法

【対象】

既報の big ACTH (LDV: 2fmol/L) と ACTH1-39 (LDV: 0.2pg/mL) の ICT-EIA を用いて, 血中の big ACTH と ACTH をそれぞれ測定した (図 3).

図 3

異所性 ACTH 症候群を呈した甲状腺髄様癌の末梢血: ACTH 1-39 の各測定法と新規 big ACTH 測定法の比較



- ・対照: 正常下垂体機能を示した耐糖能異常者, 2 型糖尿病あるいは甲状腺偶発腫 (CNT : N=42 例).
- ・EAS : 内分泌学的に EAS と確定診断された症例 (N=19 例).
- ・micA による CD: 蝶形骨洞の下垂体腺腫摘出術 (TSS)

により病理的に確定診断された症例 (N=25 例)。

- ・非機能性下垂体腺腫 (NF) : TSS により, 病理形態学 に診断された症例 (N=7 例)。

- ・macA : Cushing 徴候に乏しく, 術前のコルチゾールは 正常からやや高値, 画像診断では海綿静脈洞浸潤度 Knosp G3~G4 を示し, かつ, 術後の病理学的検査で ACTH 産生を証明された症例 (N=8 例)。

【方法】

micA による CD : 一部の症例で局在診断のため, 術前に CRH 負荷試験下 (ヒト CRH 100 μ g, iv) での海綿静脈洞サンプリング (CS) を行い, 左右の CS と末梢血中の ACTH と big ACTH を測定した (0, 5, 10 分)。

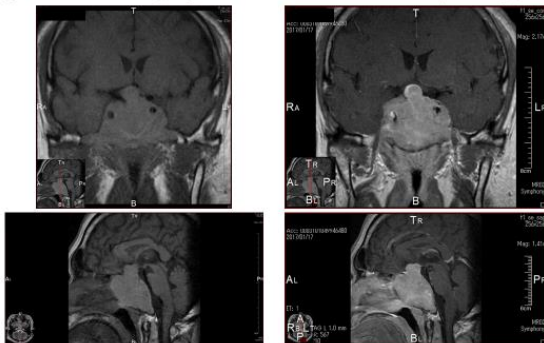
非機能性副腎腫瘍 : 一部の副腎偶発腫の機能診断のため, デキサメタゾン一晩抑制試験, 1mg と 8mg, をおこない, 血中コルチゾールと ACTH 測定時の残血漿中の big ACTH を測定した。

さらに, 海綿静脈洞浸潤度 Knosp G4 を示し, 術前に非機能性下垂体腺腫を疑われた macA において (図 4. ACTH1-39, ECLIA 法: 329.5pg/mL, F 7.8ug/dL), 術前の新鮮血漿をサイズ排除型 HPLC を用いて解析した (移動相 50mM KCL + 0.05%TFA, HPLC: 東ソーTSK G2000SW, 7.5x600mm)。

症例 画像MRI

図4

【画像所見】鞍内~蝶形骨洞・後部篩骨洞に充満する giant adenoma陰影. 45x70x52mm Knosp 4/4度



採取分画中の ACTH1-39 と big ACTH をそれぞれ超 高感度測定法で測定した。

4. 結 果

big ACTH 値 : CNT 5~30 fmol/L, micA : 8~32 fmol/L, EAS : 45.3~927.9 fmol/L, macA : 56.0~998.2fmol/L. うち浸潤度 Knosp G3~G4 の macA (N=4) : >200 fmol/L. silent ACTHoma (血中 ACTH<45pg/mL で, 病理組織のみ ACTH 免染陽性, N=3) : <39 fmol/L (図 5) .

次に, Cushing 徴候を欠き, 術前 ACTH のみが異常 高値をしめした macA (図 4) の末梢血中 ACTH 分子 型を検索したところ, ACTH 活性の 80%が big ACTH を示した (図 6)。

図5

big ACTH (proACTH + POMC) levels in microACTHoma, macroACTHoma, NF vs. EAS

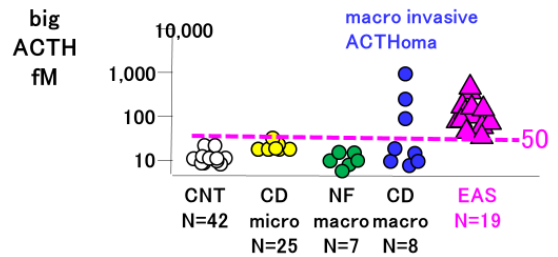
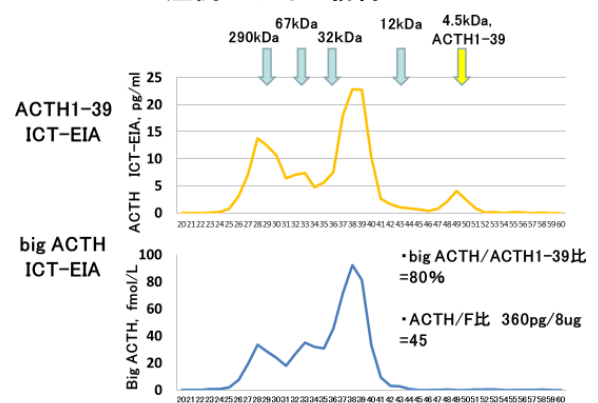


図6

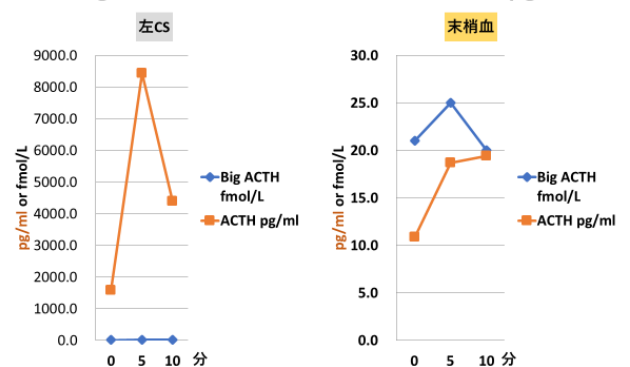
症例のサイズ排除HPLC



さらに, CD (micA)の局在診断のため施行した海綿静脈洞 (CS) サンプリング血中の, ACTH と big ACTH を測定したところ, micA が下垂体右側に存在する検査所見を得たが, CRH 刺激試験により, 右 CS 血中の ACTH は前値の 4 倍以上に増加したが, big ACTH は微増にとどまった. 同様の増加反応は増加率は低いものの, 末梢血でも観察された (図 7)。

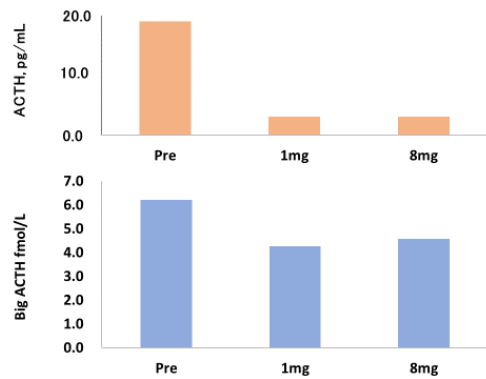
図7

CRH負荷試験:海綿静脈洞血中 (CS) vs. 末梢血中のbig ACTH (fmol/L) ACTH 1-39濃度 (pg/mL)



そして, 血中 big ACTH の抑制反応も一晩デキサメタゾン抑制試験 1mg と 8mg において観察された. CRH 刺激試験と同様に, big ACTH 抑制反応は ACTH 抑制反応に比較して減弱していた (図 8)。

図8
デキサメタゾン一晩抑制試験(1mg, 8mg)前後の
血中ACTHとbig ACTH濃度



5. 考 察

以上の成績より, macA の一部では micA にもとづく CD とはことなり, EAS と同様に PC1/3 酵素活性が低下し, POMC 分子の翻訳後の偏倚をもたらし, big ACTH が増加していることが明らかとなった. とくに, 末梢血中の ACTH1-39 (pg/mL) / コルチゾール ($\mu\text{g/dL}$) 比が 10 以上を示す症例では big ACTH が著増する. 一方, micA による CD や巨大腺腫を示す NF では血中 big ACTH は基準値内 (5~50 fmol/L) を示した.

さらに, 新規の高感度 big ACTH ICT-EIA により, CRH 刺激試験時の前値のみならず, デキサメタゾン抑制試験後の低値も正確に測定できた.

そして, 各刺激試験ならびに抑制試験における big ACTH 変化率は ACTH1-39 の変化率に比較して鈍化を示した. Big ACTH のデキサメタゾン抑制率は前値の 50% で, ACTH1-39 タンパクは 10% を示した. その説明として, ACTH 産生細胞において前駆体タンパクと ACTH1-39 タンパクが異なる細胞内ソーティングを受ける結果, 他のホルモン, 例えば, proinsulin と insulin の関係に相当する分泌経路をたどるためと考えられる⁴⁾.

興味深いことに, サイズ排除型 HPLC 解析では EAS における分子型 (ACTH1-39) (図 3 上段, vs. 下段 big ACTH) と 巨大・浸潤型の macA による分子型 (ACTH1-39, 図 6 上段, vs. 下段 big ACTH) には差異がある. すなわち, ACTH ECLIA 法での分子認識には EAS と macA における分子認識, epitope, が異なる可能性を示唆する. つまり, ACTH の測定法によって, EAS と macA の big ACTH 比率が異なるため, ACTH/コルチゾール比が異なるときは 特異的な big ACTH 測定を追加する必要がある.

つぎに, われわれの big ACTH の従来測定値は big ACTH の標準品が入手できないため, サイズ排除型 HPLC 分画において, POMC 分画中の γ 1-MSH 活性と big ACTH 活性を等モルと仮定して算出している. 一方, Manchester グループは ACTH 産生腫瘍の抽出液を精製

し標準品としている. そのため 2 つの, big ACTH 測定法の間で結果が異なる. 測定値の解釈には留意すべきである.

そこで ACTH1-39 活性中の big ACTH 免疫活性をするため, 本研究では macA 末梢血中の ACTH1-39 と big ACTH ICT-EIA による活性をサイズ排除型 HPLC を用いて検討した. 図 6 の解析から ACTH1-39 分画の 80% が big ACTH とすると, われわれの big ACTH ICT-EIA 基準値 (<50 fmol/L) は <2.7 pmol/L, 測定感度 (2 fmol/L) は 0.1 pmol/L と変更可能である (従来 big ACTH ICT-EIA の報告値の 53.4 倍). 本変換により, ACTH1-39 との直接的なモル比での対比が容易になるものと期待される. 留意すべき点は図 1, 図 2 で示すように, big ACTH 分子は糖鎖の附加を受けるため, 病態や試料により, 標準物質の分子量がことなる. さらに, 免疫測定法では用いる抗体により, 認識部位が異なる. その結果, big ACTH 測定法間での質的・量的な差異を生ずることになる.

6. 結 語

1. 高感度の新規 big ACTH 測定系により, 従前の測定法では不可能であった全ての低濃度の big ACTH を測定できるようになった.

2. 巨大・浸潤型の macA の中には EAS と同様に生物学的に不活性な big ACTH を産生している腫瘍がある. その診断に新規の高感度 big ACTH ICA-EIA は有用である.

3. ACTH1-39 と big ACTH の同時測定により, ACTH1-39 と big ACTH の間には insulin と proinsulin 測定と同様に細胞内 ACTH1-39 と POMC トラフィッキングの違いを知る手がかりになる.

文 献

- 1) Oliver RT, et al: Characterisation of ACTH related peptides in ectopic Cushing's syndrome. Pituitary 6:119-126, 2003
- 2) 片上 秀喜: corticotropin-releasing hormone (CRH) と proopiomelanocortin (POMC) 関連ペプチドに対する超高感度・高感度ホルモン測定法からみえてくるもの ACTH 単独欠損症と異所性 ACTH 症候群 ACTH RELATED PEPTIDES 27 : 40-49, 2016
- 3) Gibson S, et al: Impaired processing of proopiomelanocortin in corticotroph macroadenomas. J Clin Endocrinol Metab 81: 497-502, 1996
- 4) Niamh X, et al: Biosynthesis, trafficking and secretion of proopiomelanocortin-derived peptides. J Mol Endocrinol 56: T77-T97, 2016