

# ACTH 産生腫瘍および脳脊髄液中の ACTH, $\beta$ -lipotropin, $\beta$ -endorphin

東京女子医科大学内科学教室 2 (主任: 鎮目和夫教授)

須 田 俊 宏  
ス タ ト シ ヒロ

(受付 昭和55年 9月29日)

## ACTH, $\beta$ -Lipotropin and $\beta$ -Endorphin in ACTH Producing Tumors and Cerebrospinal Fluid

Toshihiro SUDA, M.D.

Department of Internal Medicine (Director: Prof. Kazuo SHIZUME)

Tokyo Women's Medical College

In vitro biosynthesis of ACTH,  $\beta$ -lipotropin ( $\beta$ -LPH) and  $\beta$ -endorphin, and the effects of several drugs on these peptides release were examined by incorporation study and superfusion of the pituitary adenomas obtained from patients with Cushing's disease. These peptides were also determined in human cerebrospinal fluid (CSF) in various endocrine disorders and in ectopic ACTH producing tumors. After the incubation of the pituitary adenoma with  $^3\text{H}$ -phenylalanine, labeled ACTH,  $\beta$ -LPH and  $\beta$ -endorphin were isolated. In the superfusion study, ACTH and  $\beta$ -endorphin release from the pituitary adenoma and non-adenomatous tissues were markedly increased by lysine-8-vasopressin (LVP) and slightly increased by serotonin. These peptides release was suppressed by dexamethasone and cyproheptadine, an anti-serotonergic agent. ACTH,  $\beta$ -LPH and  $\beta$ -endorphin concentrations in CSF were not reflected those in plasma of patients with endocrine disorders. Large amount of  $\beta$ -endorphin was present in the ectopic ACTH producing tumors.

These results are summarized as follows:

- 1  $\beta$ -LPH conversion to  $\beta$ -endorphin was activated in the pituitary of patients with Cushing's disease and the ectopic ACTH producing tumor.
- 2 ACTH and  $\beta$ -endorphin release from the pituitary of patients with Cushing's disease might partly be mediated by serotonergic mechanism, and both dexamethasone and LVP directly effected on such peptides release from the pituitary.
- 3 ACTH,  $\beta$ -LPH and  $\beta$ -endorphin in CSF was suggested to be extrapituitary origin.

### I. 緒 言

Adrenocorticotropin (以下 ACTH と略),  $\beta$ -lipotropin (以下  $\beta$ -LPH と略) および  $\beta$ -LPH のアミノ酸構造の61位から91位までのフラグメントで

ある  $\beta$ -endorphin (以下  $\beta$ -EP と略) が, これらペプチドを, アミノ酸構造の中に含んでいる共通前駆物質より, アミノ酸結合が切れてできてくることは良く知られている<sup>1)2)</sup>.

われわれは、(i) 血中  $\beta$ -EP は、正常人にくらべ、クッシング病、アジソン病、ネルソン症候群の患者において多量に存在する<sup>3)4)</sup>。(ii) クッシング病下垂体腺腫中に、ACTH、 $\beta$ -LPH が高濃度に存在するが、非腫瘍組織での濃度は、著明に低下している<sup>5)6)</sup>。(iii) これら下垂体腺腫および非腫瘍組織中には、多量の  $\beta$ -EP が存在し、 $\beta$ -LPH から  $\beta$ -EP への転換の亢進を示唆する<sup>5)6)</sup>。ことを報告した。そこで今回は、クッシング病下垂体腺腫および非腫瘍組織での ACTH、 $\beta$ -LPH、 $\beta$ -EP の合成、分泌機序を *in vitro* で検討し、さらに脳脊髄液 (cerebrospinal fluid, 以下 CSF と略) および異所性 ACTH 産生腫瘍中の ACTH、 $\beta$ -LPH、 $\beta$ -EP についても検討した。

## II. 方法

### 1. ACTH 産生腫瘍

クッシング病下垂体腺腫および非腫瘍組織は、2例のクッシング病症例より、Hardy の手術によつて得られた。異所性 ACTH 産生腫瘍は、小細胞性肺癌2例と甲状腺様癌1例より、手術又は剖検にて得られた。これら組織は、摘出後直ちにドライアイスにて凍結し、その後 0.2N 塩酸にて抽出した。手術で得られた下垂体腺腫および非腫瘍組織の一部を、10%の牛胎児血清を含む Minimum Essential Medium (以下 MEM と略) に入れ、水中で保存し、superfusion 又は incorporation study に用いた。

### 2. Incorporation study

クッシング病下垂体腺腫の一部 (約 4mg) を、10% 牛胎児血清を含む MEM から取り出し、0.5% 牛血清アルブミンと 0.2% glucose を含む Krebs-Ringer bicarbonate buffer (以下 KRB と略) 1ml に入れ、0.5mCi の <sup>3</sup>H-Phenylalanine を加え、3時間、37°C の水槽中で静かに振とうさせながら incubation を行なつた。Incubation 後、0.5% 牛血清アルブミンを含む MEM で数回洗つた後、1ml の 0.2N 塩酸で homogenize し、15,000rpm で40分間遠心して、上清を 0.1N 塩酸で飽和させた sephadex G-50fine カラム (0.9×60cm) にかけて、1ml ずつ各分画を集めた。各分画を蒸発乾固後、0.8% 人血清アルブミンを含む pH 7.8、0.05M の phosphate buffer で再溶解した。各分画の一部を ACTH、 $\beta$ -EP の測定に用い、残りの各分画を2つに分け、ACTH 又は  $\beta$ -EP 抗体を加え、2日間 incubation した後、第2抗

体を加えてさらに一晚 incubation した。Incubation 後、各チューブを遠心し上清を除去した後、沈渣に 0.1N 塩酸を加えて再溶解し、シンチレーションカウンターにて各チューブの <sup>3</sup>H の放射活性をカウントした。

### 3. Superfusion

図1に示した装置を用い、クッシング病下垂体腺腫および非腫瘍組織の superfusion を、既に報告した方法で行なつた<sup>7)</sup>。図1の chamber 内に組織片を入れ、0.5% 牛血清アルブミン、0.2% glucose を含む KRB を、0.5 ml/分の速度で流し、種々の試薬を加えて組織からの

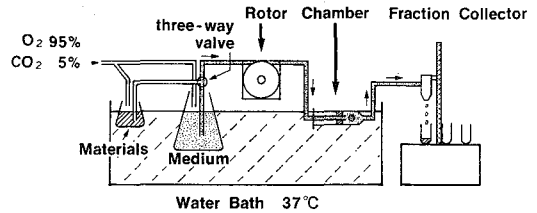


図1 Superfusion 装置

ACTH および  $\beta$ -EP 分泌に及ぼす効果をみた。試薬としては、lysine-8-Vasopressin (以下 LVP と略)、dexamethasone (以下 Dex と略)、抗セロトニン作用を持つ cyproheptadine およびセロトニンを用いた。

### 4. CSF

CSF は、朝9時から11時の間に、健康人23例、ACTH 単独欠損症2例、クッシング病2例、ネルソン症候群1例、シーハン症候群1例、末端肥大症3例から腰椎穿刺により得られた。CSF からの ACTH と  $\beta$ -EP の抽出は、すでに報告した silicic acid 法にて行なつた<sup>9)</sup>。

### 5. Radioimmunoassay (以下 RIA と略)

ACTH、 $\beta$ -LPH および  $\beta$ -EP の RIA は、さきに報告した方法で行なつた<sup>9)10)</sup>。 $\beta$ -EP の抗体は、 $\beta$ -EP および  $\beta$ -LPH と等モルに交叉する。ACTH および  $\beta$ -EP の抗体は、共通前駆物質にも交叉する。

## III. 結果

### 1. Incorporation study

図2に示したように、Sephadex G-50 によるカラム分画中の ACTH の免疫活性は、void volume および <sup>131</sup>I-ACTH の部位に peak がみられた。さらに、これら peak に一致して <sup>3</sup>H-phenylalanine の取り込みがみられた。一方、 $\beta$ -EP の免疫活性は、void volume、<sup>125</sup>I- $\beta$ -LPH および <sup>125</sup>I- $\beta$ -EP の部位に peak がみられ、さらに、これらの peak

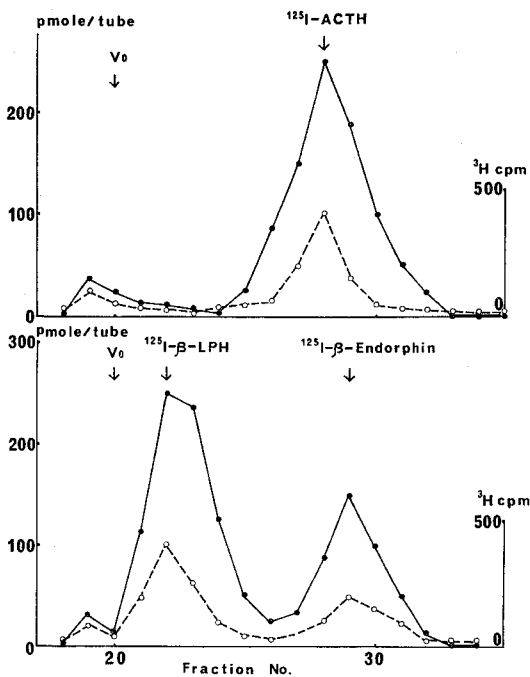


図2 クッシング病下垂体腺腫を、<sup>3</sup>H-phenylalanine と incubation した後、Sephadex G-50 カラムにかけた時の溶出パターン。上段実線はACTH の PIA の結果を、破線は<sup>3</sup>H-phenylalanine の取り込みを示す。下段実線は、 $\beta$ -LPH と等モルに交叉する抗体を用いた $\beta$ -EP の RIA の結果を、破線は<sup>3</sup>H-phenylalanine の取り込みを示す。

に一致して <sup>3</sup>H-phenylalanine の取り込みがみられた。このことから、void volume にみられた peak は、ACTH および  $\beta$ -EP の両活性を持つ共通前駆物質であることが示唆された。

2. Superfusion

症例 1 の腫瘍組織では、図 3 の如く、immuno-reactive ACTH (以下 I-ACTH と略) と I- $\beta$ -EP (この場合は、測定法の関係で  $\beta$ -EP +  $\beta$ -LPH) 分泌は、LVP で刺激され、DEX および Cyproheptadine で抑制された。一方非腫瘍組織では図 4 の如く、やはり LVP により I-ACTH と I- $\beta$ -EP 分泌は刺激され、Dex および cyproheptadine で抑制された。症例 2 の腫瘍組織では、セロトニンにより I-ACTH および I- $\beta$ -EP 分泌の軽度の増加に、Cyproheptadine による抑制や LVP による増加がみられた (図 5)。非腫瘍組織からの I-ACTH の分泌も、セロトニンにより軽度に増加し、cyproheptadine により抑制され、LVP により明らかに増加した (図 6)。

3. CSF

CSF 中の I-ACTH および I- $\beta$ -EP 活性の希釈曲線をかいてみると、標準曲線に平行な曲線が得られた (図 7)。この CSF の抽出物を、Sephadex

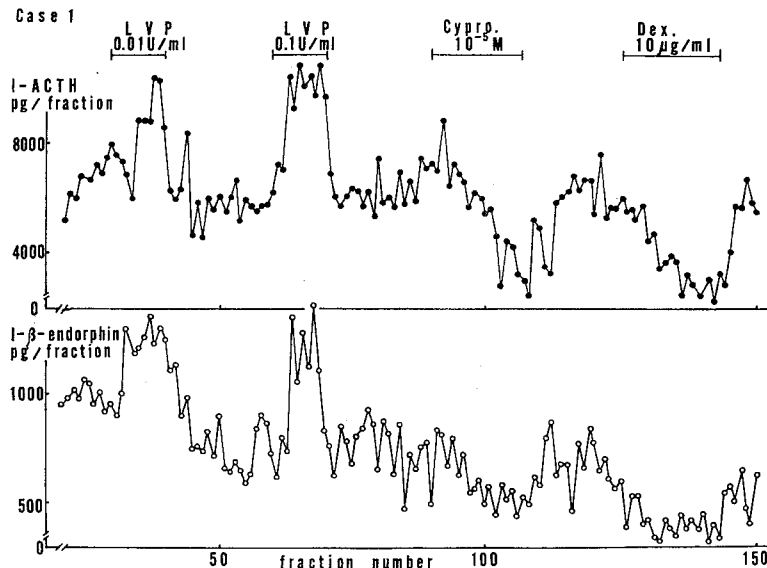


図3 Superfusion における、クッシング病下垂体腺腫からの、I-ACTH および I- $\beta$ -EP 分泌に及ぼす LVP, cyproheptadine, Dex の影響。

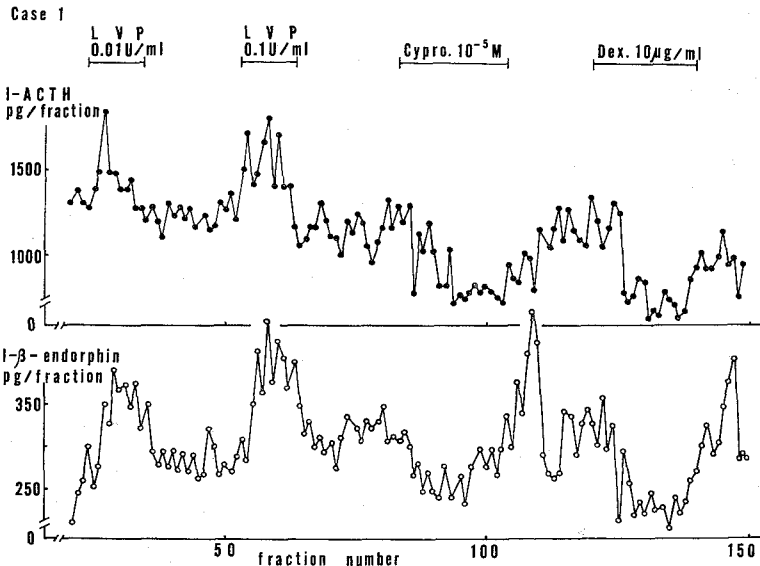


図4 Superfusion における, クッシング病下垂体非腺腫組織からの, I-ACTH, I-β-EP 分泌に及ぼす LVP, cyp.oheptadine, Dex の影響.

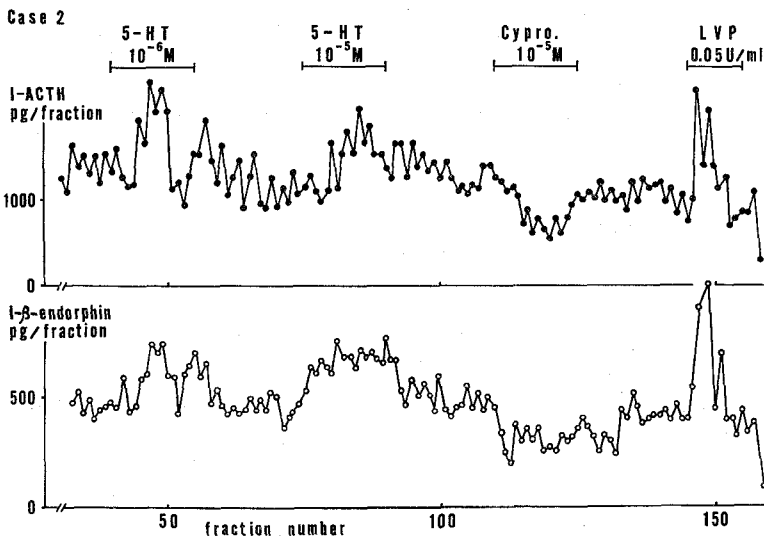


図5 Superfusion 法におけるクッシング病下垂体腺腫からの I-ACTH, β-EP 分泌に及ぼすセロトニン (5-HT), cyproheptadine, LVP の影響.

G-50 カラムにかけて β-EP 活性を調べてみると, 図8のように, void volume に小さな peak が, β-LPHとβ-EP の部位に peak がみられた. β-EP の peak が, total I-β-EP 中に占める割合は約20%であつた. 次に各疾患の, カラムにかけ

る前の CSF 中の I-ACTH および I-β-EP (β-EP+β-LPH) 活性をみると, 図9のごとく正常人では, それぞれ  $79\pm 8$ ,  $61\pm 6\text{pg}/\text{ml}$  ( $M\pm SE$ ) であつた. ACTH 単独欠損症, ネルソン症候群, 末端肥大症の場合でも, I-ACTH および I-β-EP

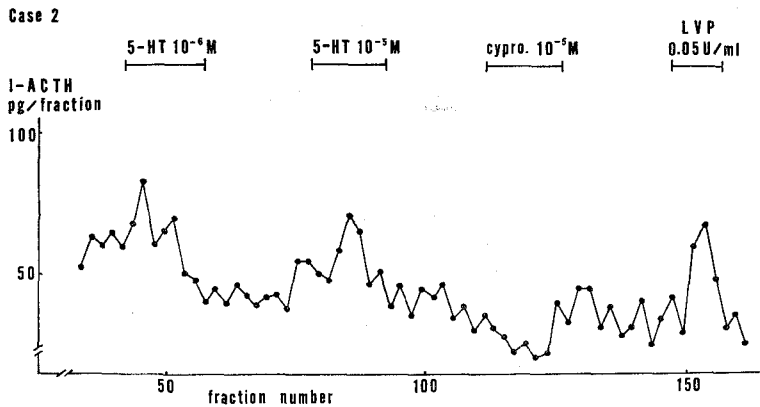


図6 Superfusion 法におけるクッシング病下垂体非腺腫組織からの I-ACTH 分泌に及ぼすセロトニン (5-HT), cyproheptadine, LVP の影響。

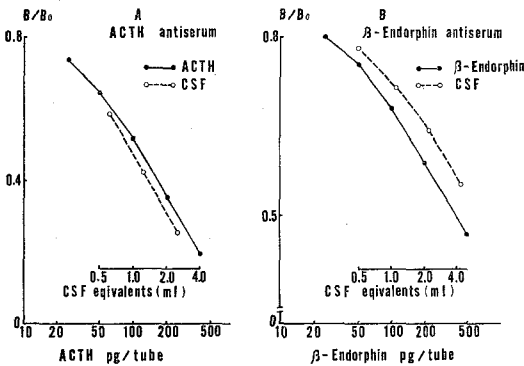


図7 CSF 中の, ACTH および  $\beta$ -EP 活性の稀釈曲線。

濃度は正常人レベルだった。一方, クッシング病やシーハン症候群の例では, 正常人のレベルよりも低下していた。

4. 男所性 ACTH 産生腫瘍

表1に示したように ACTH と  $\beta$ -LPH+ $\beta$ -EP は, 腫瘍中にはほぼ等モルに存在し,  $\beta$ -LPH+ $\beta$ -EP 中に占める  $\beta$ -EP の割合も, 正常人下垂体にくらべ著明に増加していた<sup>5)6)</sup>。症例1の腫瘍抽出

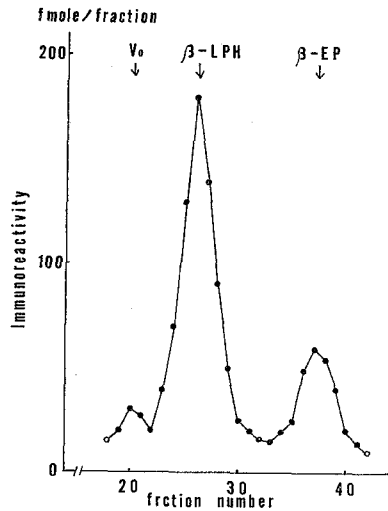


図8 CSF 抽出物を Sephadex G-50 カラムにかけた時の,  $\beta$ -EP 活性の溶出パターン。

物を, Sephadex G-50 カラムにかけた時の溶出パターンを図10に示した。I- $\beta$ -EP 活性は, void volume,  $\beta$ -LPH,  $\beta$ -EP の各部位にみられた。

表1 異所性 ACTH 産生腫瘍中の ACTH,  $\beta$ -LPH,  $\beta$ -EP 濃度

Case	Diagnosis	ACTH pmole/g w. wt.	$\beta$ -LPH + $\beta$ -EP pmole/g w. wt.	$\beta$ -EP $\beta$ -LPH + $\beta$ -EP
1	Lung Cancer	0.89	0.76	0.30
2	Lung Cancer	0.60	0.46	0.55
3	Thyroid Cancer	1.00	1.00	0.90

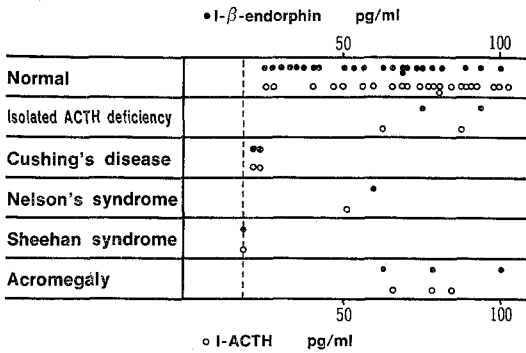


図9 各種内分泌疾患例の、CSF 中の I-ACTH および I-β-EP 濃度。

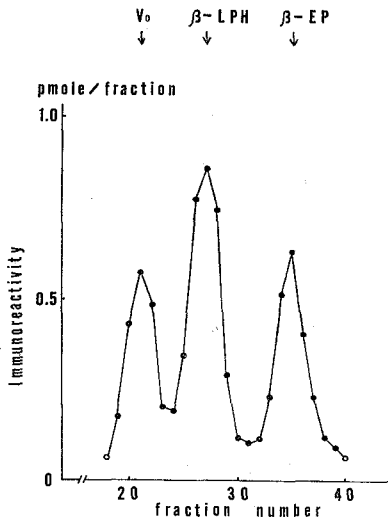


図10 異所性 ACTH 産生肺瘍抽出物を、Sephadex G-50 カラムにかけた時の、β-EP 活性の溶出パターン。

IV. 考 按

われわれは、さきに正常人下垂体および血液中においては、β-EP の前駆物質である β-LPH が主に存在し、β-EP はあつてもごくわずかであり (<10%)、一方クッシング病、ネルソン症候群、アジソン病患者の血中およびクッシング病下垂体においては、多量の β-EP が存在することを明らかにした<sup>3)4)5)6)</sup>。今回は、ラベルしたアミノ酸を用いた incorporation study で、共通前駆物質と思われる部分、β-LPH、β-EP の各分画にアミノ酸の取り込みがみられ、クッシング病下垂体では、

β-LPH から β-EP への転換が亢進していることを証明した。Krieger ら<sup>10)</sup> は、クッシング病症例に cyproheptadine を投与して、血中 ACTH 濃度の低下をみており、この cyproheptadine の効果は、中枢を介することを示唆した。しかし、今回の superfusion による実験で、cyproheptadine や Dex により、腺腫からの ACTH と β-EP 分泌が抑制され、一方、セロトニンにより軽度な、さらに LVP により著明な ACTH と β-EP 分泌の亢進を認め、著者は、これら薬剤の下垂体腺腫に対する直接作用を証明した。この (i) superfusion の結果と、(ii) 今までに報告された正常人下垂体やラット下垂体前葉では、β-EP 濃度は低いが、ラット下垂体中葉やクッシング病下垂体腺腫では、β-EP 濃度が著明に増加していること<sup>5)6)11)</sup>、さらに (iii) ラット下垂体中葉を用いた in vitro の実験で、セロトニンによる ACTH 分泌の増加をみた Kraicer<sup>12)</sup> の報告等を考えてみると、クッシング病下垂体腺腫は、前葉と中葉の双方の性格を持つ可能性が示唆された。さらに、一般的に腫瘍の“先祖帰り”の傾向がいられていることと、人の胎児には中葉が存在することからも、下垂体腺腫の中葉化の可能性が強くと示唆された。腫瘍および非腫瘍組織からの ACTH および β-EP の concomitant な分泌は、Mains ら<sup>1)</sup> のいう共通前駆物質の存在や、Guillemin ら<sup>14)</sup> のラットでの ACTH および β-EP の報告、およびわれわれの人血中 ACTH と β-LPH についての報告<sup>4)</sup> とよく一致している。近年、CSF<sup>15)16)</sup> および脳<sup>16)17)18)19)</sup> の中に ACTH と β-EP の存在が報告されている。今回 RIA にて、CSF 中の I-ACTH と I-β-EP の存在を証明したが、興味あることには ACTH 単独欠損症例での CSF 中の I-ACTH と I-β-EP 濃度は正常人と同じレベルであり、一方、血中 ACTH や β-EP 濃度の高いクッシング病やネルソン症候群では、正常範囲もしくは、むしろ低下していた。このことは、CSF 中の ACTH や β-EP の origin が、下垂体以外にある可能性を示唆している。さらに視床下部での ACTH や β-EP の合成を証明した報告もあり<sup>20)</sup>、CSF 中

の ACTH や  $\beta$ -EP が、脳特に視床下部由来である可能性が強い。シーハン症候群で CSF 中の濃度が低いのは、本症候群が下垂体のみならず視床下部にも病変が及んでいることが最近知られており<sup>21)</sup>、今回の結果とよく一致している。

稿を終るにあたり、ご指導とご校閲を賜りました鎮目 和夫教授、出村博教授、出村黎子助教授に深謝いたしますとともに、本研究にご協力頂いた本教室医局および研究室各位に感謝いたします。本研究の一部は、文部省科学研究費補助金 および 厚生省特定疾患調査研究費補助金によつた。

#### 文 献

- 1) **Mains, R.E., B.A. Epper and N. Ling:** Proc Natl Acad Sci USA **74** 3014~3018 (1977)
- 2) **Nakanishi, S., A. Inoue, T. Kita, M. Nakamura, A.C. Chang, S.N. Cohen and S. Numa:** Nature **278** 423~427 (1978)
- 3) **Suda, T., A.S. Liotta and D.T. Krieger:** Science **202** 221~223 (1978)
- 4) **Krieger, D.T., A.S. Liotta, T. Suda, A. Goodgold and E. Condon:** J Clin Endocrinol Metab **48** 566~571 (1979)
- 5) **Suda, T., Y. Abe, H. Demura, R. Demura, K. Shizume, N. Tamahashi and N. Sasano:** J Clin Endocrinol Metab **49** 475~477 (1979)
- 6) **Suda, T., H. Demura, R. Demura, F. Tozawa, K. Jibiki and K. Shizume:** J Clin Endocrinol Metab **51** 1048~1053 (1980)
- 7) 須田俊宏: Superfusion 法 井村裕夫ら編: 内分泌実験叢書 2 内分泌動物実験法 初版講談社サイエンティフィック 東京 (印刷中)
- 8) **Suda, T., H. Demura, R. Demura, K. Shizume, A.S. Liotta and D.T. Krieger:**  $\beta$ -endorphin in human plasma, cerebrospinal fluid, pituitary and ACTH producing tumor in Shah, N.S. and A.G. Donald (Editors): Endorphins and opiate antagonists in psychiatric research: Clinical implications vol. 1, First edition. Plenum Publishing Co. New York in press
- 9) **Suda, T., H. Demura, R. Demura, I. Wakabayashi, K. Nomura, E. Odagiri and K. Shizume:** J Clin Endocrinol Metab **44** 440~446 (1977)
- 10) **Krieger, D.T., L. Amorosa and F. Linick:** N Engl J Med **293** 893~896 (1975)
- 11) **Liotta, A.S., T. Suda and D.T. Krieger:** Proc Natl Acad Sci USA **75** 2950~2954 (1978)
- 12) **Kraicer, J.:** 58th Meeting Endocrine Society Abst **146** p. 129 (1976) San Francisco
- 13) **Tuchmann-Duplessis, H., M. Auroux and P. Haegel:** Illustrated human pathology 3 Springer-Verlag New York p. 123 (1974)
- 14) **Guillemin, R., T. Vargo, J. Rossier, S. Minick, N. Ling, C. Rivier and F. Bloom:** Science **197** 1367~1369 (1977)
- 15) **Akil, H., D.E. Richardson, J. Barchas and C.H. Li:** Proc Natl Acad Sci USA **75** 5170~5172 (1978)
- 16) **Terenius, L. and Wahlstrom:** Life Sci **16** 1759~1764 (1975)
- 17) **Krieger, D.T., A.S. Liotta, T. Suda, M. Palkovits and M. Brownstein:** Biochem Biophys Res Commun **76** 930~936 (1977)
- 18) **Krieger, D.T., A.S. Liotta and M. Brownstein:** Proc Natl Acad Sci USA **74** 468~652 (1977)
- 19) **Rossier, J., T.M. Vargo, S. Minick, N. Ling, F.E. Bloom and R. Guillemin:** Proc Natl Acad Sci USA **74** 5162~5165 (1977)
- 20) **Liotta, A.S., D. Gildersleeve, M. Brownstein and D.T. Krieger:** Proc Natl Acad Sci USA **76** 1448~1452 (1979)
- 21) **Reichlin, S.:** Neuroendocrinology [in Williams, R.H. (editor): Textbook of Endocrinology, Fifth Edition. Saunders Co. Philadelphia (1974) p 782]