

非放射性プローブを用いた *in situ* hybridization 法による
下垂体腺重のホルモン産生能と細胞起源に関する研究

松 野 彰

非放射性プローブを用いたin situ hybridization法による
下垂体腺腫のホルモン産生能と細胞起源に関する研究

松 野 彰

1、緒言

従来より下垂体腺腫はヘマトキシリンエオジン染色の結果より、好酸性腺腫、好塩基性腺腫、嫌色素性腺腫に分類されてきた。近年免疫組織化学(immunohistochemistry)や細胞培養法、電子顕微鏡などの技術の発達によりその内分泌機能が明らかにされるようになってきた(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10)。さらに最近ではNorthern blot hybridizationやin situ hybridization法(ISH)などの分子生物学的手法が下垂体腺腫の内分泌機能をより一層明らかにするために用いられるようになってきている(13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26)。その結果下垂体腺腫はそれぞれにさまざまな内分泌学的特徴を有するheterogeneousな集団であることが明らかになってきた(27)。一方allelic X-chromosome inactivation patternのrestriction fragment length polymorphismの検討により、下垂体腺腫が monoclonal origin であることが示されている(28,29,30)。このように monoclonal originである下垂体腺腫がそれぞれにさまざまな内分泌活性を有するということは、個々の下垂体腺腫の細胞起源がそれぞれ異なる可能性を意味する。下垂体前葉細胞は、primordial stem cellよりsomatotroph, lactotroph, thyrotroph, gonadotroph, corticotrophの5種類の成熟細胞へ分化すると考えられており(27)、monoclonal originである下垂体腺腫はこの分化の種々の段階で障害を生じ異常増殖をきたすものと考えられる。ISHを用いて遺伝子転写産物であるmessenger ribonucleic acid(mRNA)の発現を個々の細胞について検討することにより、下垂体腺腫の内分泌機能を細胞レベルで明らかにし、下垂体腺腫が分化のどの段階から発生したか、その細胞起源の解明に迫ることができると考えられる。従来の研究では主として放射性プローブが用いられてきたが(18,19,20)、近年非放射性プローブを用いたISHが放射性プローブを用いる方法に比し、組織学的解像力に優れている点、ラベルされたプローブが長期間保存できる点、短時間で結果がえられる点、プローブの扱いが容易である点などのさまざまな利点を有することが報告されている(15,21,22)。しかしながら非放射性プローブを用いたISHにより糖蛋白ホルモンを含むすべての下垂体前葉ホルモンのmRNAの発現について検討した報告は渉猟しえた限りでは過去に認められない。そこで本研究では下記の点を主な研究目的とした。

1) 非放射性プローブを用いたISHにより各種の下垂体腺腫における下垂体前葉ホルモンのmRNAの発現を調べ、遺伝子発現の観点からその内分泌機能をより一層明らかにすること

2) ISHを用いた研究にてより明確となった内分泌機能を念頭に、monoclonal originである下垂体腺腫がprimordial stem cellからsomatotroph、lactotroph、thyrotroph、gonadotroph、corticotrophの5種類の成熟細胞への分化のどの段階で腫瘍化したか、その細胞起源を明らかにすること

3) 技術的な問題として

代表的な非放射性プローブであるビオチン化プローブを用いたISHは、どの程度まで下垂体前葉ホルモンのmRNAの検出が可能であるか、また光顕レベルでのISHのみならずNorthern blot hybridizationや電子顕微鏡下でのISHにも応用できるのか。

以上の点を明らかにすることを目的として、本研究を行った。

2、対象と方法

種々のヒト下垂体腺腫における糖蛋白ホルモンを含むすべての下垂体前葉ホルモンmRNAの発現についてビオチン化オリゴヌクレオチドプローブを用いたISHにより検討した。またラット正常下垂体について同一のビオチン化オリゴヌクレオチドプローブを用いて、光顕レベルのISHのみならずNorthern blot hybridization、電子顕微鏡下でのISHを行い、その有用性について検討した。

対象組織：

本研究で用いた組織材料は、ラット正常下垂体組織、ヒト下垂体腺腫の各々の固定後凍結切片、ホルマリン固定パラフィン包埋切片である。ヒト下垂体腺腫の診断はヘマトキシリンエオジン染色で行った。ヒト下垂体腺腫の内訳は、次の通りである。すべて東京大学脳神経外科(45例)およびその関連病院である東京警察病院脳神経外科(15例)にて過去に手術を行った例である。

成長ホルモン産生腺腫 29例 (好酸性腺腫21例、好酸性嫌色素性混合性腺腫8例)

プロラクチン産生腺腫 9例 (全例嫌色素性腺腫)

臨床的非機能性腺腫 22例 (全例嫌色素性腺腫)

凍結切片は、4%パラホルムアルデヒドで一晩固定し sucrose in 0.01M phosphate buffered saline pH7.4 (PBS)で段階的に(10%で1時間、15%で2時間、20%で4時間)置換したのち、OCT compound (Tissue-Tek ; Miles Laboratories Inc.)に包埋した。パラフィン切片は10%ホルマリンで固定したものを用いた。4 μ mの切片を作成し、組織の剥脱を

防ぐ目的で3-aminopropylmethoxysilaneでコートしたスライドガラスにのせ、60℃で一晩加温した。0.02% diethylpyrocarbonate(DEPC)で処理したribonuclease-freeの溶液を用い、すべての組織切片やスライドガラスを扱う際には、手袋を使用した。

プローブ：

ラットおよびヒト下垂体前葉ホルモン、並びに陽性対照試験として用いていた β -actinのmRNAに対するオリゴヌクレオチドプローブの塩基配列は表1のごとくである。成長ホルモン(GH)、プロラクチン(PRL)、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)またはその前駆体であるpro-opiomelanocortin(POMC)、卵胞刺激ホルモン β サブユニット(FSH β)、黄体形成ホルモン β サブユニット(LH β)、 β -actinは、Lloydら(22,23) が用いている塩基配列であり、糖蛋白ホルモン α サブユニット(α SU)、甲状腺刺激ホルモン β サブユニット(TSH β)はKilárらが用いている塩基配列である(16)。各プローブはDNA合成機(Applied Biosystems model 392)を用いて合成した。

表1：本研究で用いたmRNAに対するオリゴヌクレオチドプローブの塩基配列

プローブ	部位	塩基配列
1 hPRL	AA66-72	5' dGGC TTG CTC CTT GTC TTC GGG
2 rPRL	AA64-70	5' dGGC TTG CTC CTT GTC TTC AGG
3 hGH	AA11-17	5' dGGC GCG GAG CAT AGC GTT GTC
4 rGH	AA145-151	5' dATC GCT GCG CAT GTT GGC GTC
5 ACTH(POMC)	AA5-11	5' dGCC GAC CGG CTT GCC CCA GCG
	AA8-14	5' dCTT GCC CCA GCG GAA GTG CTC
6 FSH β	Nd90-120	5' dTAT GCA GAA ACG ACA TTC TTC TTT CTC TAT
7 LH β	Nd323-340	5' dAGG GTC CAC AGG GAC AG
8 α SU	Nd244-273	5' dACT TGC TGT GTA GCT AAA TCA TAT AAC AGG
9 TSH β	Nd331-363	5' dGAC TAT AGT GAC TGC ATA CAT GAA GCC ATC AAG
10 β -actin	AA125-131	5' dGGC TGG GGT GTT GAA GGT CTC

AA：アミノ酸配列

Nd：核酸配列

h：ヒト

r：ラット

1-7,10 from Lloyd (22,23)

8,9 from Kilár (16)

プローブの標識:

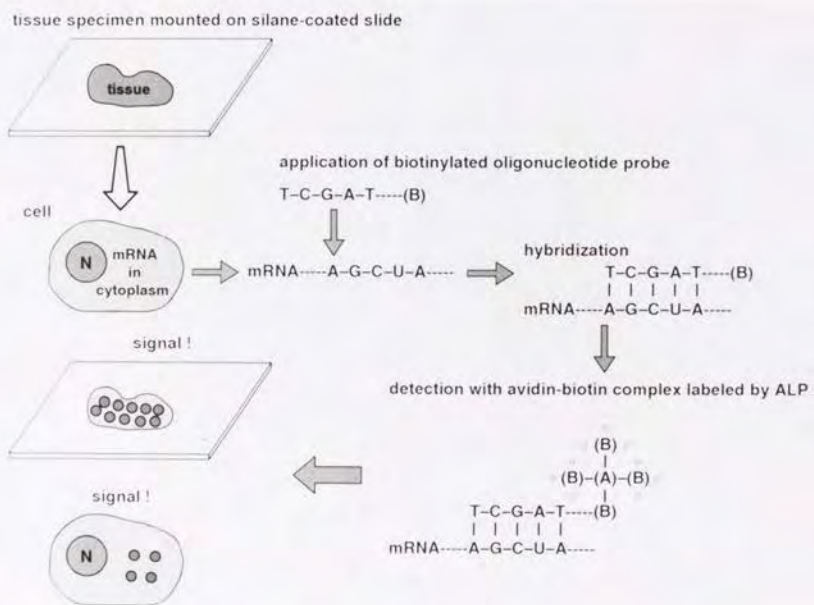
オリゴヌクレオチドプローブは、ENZO's terminal labeling kitを用いて3'末端標識法(31)によりビオチン化した。1 μ g/ μ lのオリゴヌクレオチドプローブを 15 μ l terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT) reaction buffer(666mM K-cacodylate pH7.0, 3mM 2-mercaptoethanol), 2 μ l biotin 11-deoxyuridin-triphosphate(2.5mM in 50mM Tris HCl pH7.5), 1 μ l TdT(<80 units/ μ l in 100mM K-cacodylate pH7.0, 300mM KCl, 5mM 2-mercaptoethanol, 50% glycerol, 1mg/ml bovine serum albumin(BSA), 1mM ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)), 4 μ l TdT dilution buffer(50mM K-cacodylate pH7.0, 5mM 2-mercaptoethanol, 1mg/ml BSA, 1mM EDTA), 22 μ l distilled DEPC water(DEPC-DW), 5 μ l 100mM CoCl₂と37℃で2時間反応させた。

in situ hybridization (図1):

脱パラフィン、100%および95%エタノールによる脱水ののち、パラフィン切片を0.2N塩酸で20分間処理した。すべてのパラフィン切片と一部の凍結切片はproteinase Kと37℃で30分間反応させ、除蛋白を行った。proteinase Kの濃度は凍結切片では0.1から1 μ g/mlであり、パラフィン切片では10から100 μ g/mlである。非特異的なプローブの結合を防止するために10分間acetylation(0.25% acetic anhydride in 0.1M triethanolamineによる処理)を行った。スライドガラスを2x sodium chloride sodium citrate(SSC)中で30分間70℃に加温し、さらに2xSSC中に室温で3分間浸した。prehybridizationは、30分間37℃で行った。Prehybridization solutionは、10% dextran sulfate, 3xSSC, 1xDenhardt's solution(0.02% Ficoll/0.02% BSA/0.02% polyvinylpyrrolidone), 100 μ g/ml salmon sperm DNA, 125 μ g/ml yeast tRNA, 10 μ g/ml polyadenyliccytidylic acid, 1mg/ml sodium pyrophosphate pH7.4, 50% formamideから成る溶液である。ビオチン化プローブはこの溶液に溶解し、その濃度は、凍結切片では0.1または0.2ng/ μ lであり、パラフィン切片では1または2ng/ μ lである。hybridizationは、37℃で一晩行なった。翌日、スライドガラスを室温下に2xSSC, 1xSSC, 0.5xSSC中でそれぞれ15分間洗浄した。hybridization signalは、DAKO's in situ hybridization detection kit を用いてstreptavidin-biotin-alkaline phosphataseで検出した。陰性対照試験として1) senseプローブを用いたISH、2) プローブを用いないISH、3) ribonuclease A (100 μ g/ml, 45分間37℃)により前処理したISHを行い、陽性対照試験として4) Northern blot hybridization、5) mRNAの保存性を検討す

るために β -actin mRNAに対するプローブを用いたISHを行った。

図1：ビオチン化オリゴヌクレオチドプローブを用いたin situ hybridization法



電子顕微鏡下でのmRNAの観察(preembedding法)：

前記の如く4%パラホルムアルデヒドで固定後の4 μ mの凍結切片を3-aminopropylmethoxysilaneでコートしたスライドグラスにのせ、1時間風乾したのちPBSで15分間洗浄した。0.1から0.3 μ g/mlの濃度でのproteinase K処理を37℃で30分間行ったのち、非特異的なプローブの結合を防止するためにacetylationを10分間行った。スライドグラスを2xSSC中で30分間70℃に加温し、さらに2xSSC中に室温で3分間浸した。prehybridizationは、30分間37℃で行った。Prehybridization solutionは、光顕レベルのISHで用いたものと同一である。プローブの濃度は、0.1または0.2ng/ μ lである。hybridizationは、37℃で一晩行った。翌日スライドグラスを室温で2xSSC、1xSSC、0.5xSSC中でそれぞれ15分間洗浄した。hybridization signalはVectastain's ABC kitを用いてstreptavidin-biotin-horseradish peroxidase(ABC-HRP)と反応させ、diaminobenzidine(DAB)とH₂O₂(DAB20mg/100mlTris-HCl+0.005% H₂O₂)で検出した。osmification(2%オスミウム酸と1時間反応)とエタノール脱水を行い、倒立法でQuetol-812に包埋した。60℃で2日間重合させたのち超薄切片を作成し電子顕微鏡(JEOL 1200VT)下に観察した。対照試験として1)senseプローブを用いたISH、2)プローブを用いないISHを行った。

Northern hybridization：

Total RNAをChirgwinら(32)の方法によりラット正常下垂体組織およびヒト下垂体腺腫(成長ホルモン産生腺腫5例、プロラクチン産生腺腫2例)より抽出した。1レーンにつき15 μ gの total RNAを流し、ホルムアミドアガロースゲルにて電気泳動を行い、capillary elution法にてナイロンメンブレンに転写した。Hybridization signalはビオチン化または³²Pで標識したオリゴヌクレオチドプローブで検出した。以下にビオチン化オリゴヌクレオチドプローブを用いる方法を示す。ナイロンメンブレンをメタノールに浸したのち、蒸留水と3xSSCで洗った。0.05M phosphate buffer pH6.5、10xDenhardt's solution、50%formamide、5xSSCから成るprehybridization solutionにより、prehybridizationを30分間42℃で行ったのち、Hybridizationを42℃で一晩行った。Hybridization solutionは、0.38M phosphate buffer pH6.5、7.7xDenhardt solution、38%formamide、3.8xSSCから成り、ビオチン化オリゴヌクレオチドプローブの濃度は0.15 μ g/mlである。翌日、ナイロンメンブレンを2xSSC、0.1%sodium dodecyl sulfate(SDS)で20分間室温で洗浄した。hybridization bandは、DAKO's in situ hybridization detection kitを用いてstreptavidin-

biotin-alkaline phosphataseで検出した。

免疫組織化学：

ISHで用いたものと同一の組織切片を用いた。GH、PRL、ACTH、FSH β 、LH β 、TSH β 、 α SUの7種類の下垂体前葉ホルモンないしそのサブユニットに対し、酵素抗体間接法により免疫組織化学染色を行った。0.5% H_2O_2 加メタノールにて30分間処理し内因性peroxidaseを阻止したのち、PBSで洗浄後一次抗体(抗ヒト下垂体前葉ホルモノウサギ血清)と20分間反応させた。一次抗体は、原血清をPBSにて抗GH1:400、抗PRL1:600、抗ACTH1:400 (以上DAKO, USA)、抗FSH β 1:200、抗LH β 1:100、抗TSH β 1:3200(以上National Institute of Arthritis Metabolism & Digestive Diseases)、抗 α SU1:2000(UCB-Bioproducts, S.A.)に希釈し用いた。PBSで洗浄後、二次抗体(peroxidase標識抗ウサギIgGヤギ血清をPBSにて1:40に希釈して使用)と15分間反応させた。PBSで洗浄後DABと H_2O_2 (DAB20mg/100mlTris-HCl+0.005% H_2O_2)で4分間発色させ、Methyl Greenで核染色を行い、脱水封入した。陽性対照試験として正常下垂体組織を用い、陰性対照試験として肝臓組織を用いて免疫組織化学染色を行った。

ISHと免疫組織化学における陽性細胞の判定：

両者共に対照試験の結果を十分に考慮したうえで陽性陰性の判定を行った。全視野から倍率400倍で任意に選んだ5視野において500個以上の細胞を観察し、その陽性細胞の比率により結果を0から4までの5段階(0:陰性、1: \leq 25%で陽性、2:26-50%で陽性、3:51-75%で陽性、4:76-100%で陽性)で表記した。

3、結果

図2はラットの正常下垂体組織より抽出したRNAのNorthern blot hybridizationであるが、ピオチンで標識したオリゴヌクレオチドプローブにより、ラットGHおよびPRLのmRNAに対するhybridization bandが検出された。サイズは共に1.0Kbであった。 ^{32}P で標識した同一のオリゴヌクレオチドプローブを用いたNorthern blot hybridizationでも、GH、PRLmRNAに対するhybridization bandが認められている。図3は、このピオチン化オリゴヌクレオチドプローブを用いて行った、ラット正常下垂体組織におけるGH(3-

a)およびPRL(3-b)mRNAのISHである。共に細胞質にhybridization signalが認められた。図4は、ラット正常下垂体組織の新鮮凍結切片で、ビオチン化オリゴヌクレオチドプローブを用いて、中葉に選択的にPOMCのmRNAが検出された。前葉にも小数ながらPOMCmRNA陽性細胞の存在を認めている。またラット正常下垂体組織のパラフィン切片を用いたISHでも同様にPOMCmRNAの陽性細胞を認めている。

ラット正常下垂体組織の凍結切片においてstreptavidin-biotin-horseradish peroxidaseおよびDAB、 H_2O_2 を用いた発色を行ってもGHmRNAを検出することができた(図5)。この切片にosmificationを行い倒立法でQuetol-812に包埋後超薄切片を作成し電子顕微鏡下に観察すると、GHmRNAが粗面小胞体上のribosomeに局在することが示された(図6)。senseプローブを用いた陰性対照試験では光学顕微鏡下でもhybridization signalは認められず(図5)、電子顕微鏡下でも粗面小胞体上にsignalを認めなかった(図7)。

ヒト成長ホルモン産生腺腫(症例11)のNorthern blot hybridizationでは、 ^{32}P で標識したオリゴヌクレオチドプローブを用いてGH、PRLmRNAに対する1.0Kbのhybridization bandが認められた(図8)。本例のISHでもGH、PRLmRNAが陽性であった(図9)。免疫組織化学でもGH、PRLが陽性であった。他の成長ホルモン産生腺腫(症例3)のパラフィン切片でのISHを示す(図10)。GHmRNAが瀰漫性に強陽性であった。PRLmRNAも瀰漫性に陽性であり、ACTH、FSH β 、LH β 、 α SUおよびTSH β のmRNAも散在性に陽性であった。陰性対照試験として行ったsenseプローブを用いたISHはすべて陰性であった。本例の免疫組織化学では、GH、PRL、 α SUおよびTSH β が陽性であった。

プロラクチン産生腺腫(症例20)のNorthern blot hybridizationでは、 ^{32}P で標識したオリゴヌクレオチドプローブを用いてPRLmRNAに対する1.0Kbのhybridization bandが認められた(図11)。本例のISHではPRLmRNAのみが瀰漫性に陽性であった(図12)。免疫組織化学でもPRLのみが陽性反応を呈した。

次に臨床的非機能性下垂体腺腫(症例24)のISHを示す(図13)。GH、PRL、ACTH、FSH β 、LH β のmRNAが陽性であった。陰性対照試験として行ったsenseプローブによるISHはすべて陰性であった。本例の免疫組織化学では、FSH β 、 α SUが陽性であった。

今回検討したヒト下垂体腺腫のISHの結果を免疫組織化学の結果と共に表2に示した。対照試験の結果を十分に考慮し、当該ホルモンのmRNAを検出していないと考え

られる例、mRNAの保存性に問題があると思われる例は全て除外した。このため最終的に評価の対象となった症例数は減少した。免疫組織化学とISHのそれぞれの陽性例数を表3に併記した。

17例の成長ホルモン産生腺腫の免疫組織化学では、GHは全例で、PRLは11例、ACTHは1例、 α SUは9例、TSH β は1例で陽性であり、FSH β 、LH β が陽性の例はなかった。ISHではGHは全例で、PRLは13例、ACTHは8例、FSH β は5例、LH β は3例、 α SUは4例、TSH β は3例でそれぞれのmRNAが検出された。免疫組織化学で陰性であってもISHが陽性の例がみられ、特にACTH、FSH β 、LH β でその傾向が顕著であった。4例のプロラクチン産生腺腫では、全例で免疫組織化学、ISH共にPRLのみが陽性であった。臨床的非機能性腺腫14例は、免疫組織化学の結果より10例のゴナドトロピン産生腺腫と4例のナルセル腺腫の2群に分けられる。10例のゴナドトロピン産生腺腫の免疫組織化学ではFSH β 、LH β 、 α SUがそれぞれ10例、1例、9例で陽性であった。ISHでは、FSH β 、LH β 、 α SUのmRNAがそれぞれ5例、4例、1例で陽性であり、GH、PRL、ACTHのmRNAが4例、5例、3例で陽性であった。GH、PRL、ACTHでは、免疫組織化学で陰性であってもISHが陽性の例がみられた。TSH β のmRNAが陽性の例はなかった。4例のナルセル腺腫のISHでは1例でACTHのmRNAが陽性であったのみで、他の下垂体前葉ホルモンの遺伝子発現はみられなかった。

表2：成長ホルモン産生腺腫17例、プロラクチン産生腺腫4例、ゴナドトロピン陽性腺腫10例、ナルセル腺腫4例の免疫組織化学とin situ hybridizationの結果一覧

成長ホルモン産生腺腫17例 (AC:acromegaly、GI:gigantism)

CaseNo.	AGE&SEX		GH	PRL	ACTH	FSH β	LH β	α SU	TS β
1	AC	38 F	4/4	4/4	1/1	0/1	0/1	2/4	0/4
2	AC	54 M	4/2	0/3	0/0	0/0	0/0	2/0	0/0
3	AC	36 M	4/3	1/3	0/3	0/3	0/4	2/2	1/3
4	AC	32 M	4/2	0/1	0/1	0/0	0/0	2/0	0/0
5	AC	62 F	2/4	2/3	0/4	0/3	0/0	0/4	0/4
6	AC	53 F	2/3	0/3	0/2	0/2	0/2	2/0	0/0
7	AC	41 F	1/3	0/3	0/2	0/0	0/0	0/0	0/0
8	AC	61 F	3/2	0/4	0/1	0/4	0/0	2/0	0/0
9	AC	50 F	4/2	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
10	AC	24 M	3/2	3/1	0/0	0/0	0/0	1/0	0/0
11	AC	34 M	3/2	2/1	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0
12	AC	60 F	2/1	2/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
13	AC	34 M	3/1	3/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
14	AC	45 F	3/1	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
15	AC	32 F	2/1	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
16	AC	50 F	3/2	3/1	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0
17	GI	14 F	3/3	3/3	0/0	0/0	0/0	2/0	0/0

IHC/ISH

0 : negative

1 : $\leq 25\%$ positive

2 : 26-50% positive

3 : 51-75% positive

4 : 76-100% positive

プロラクチン産生腺腫4例

CaseNo.	AGE&SEX	GH	PRL	ACTH	FSH β	LH β	α SU	TSH β
18	29 M	0/0	3/3	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
19	21 M	0/0	4/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
20	34 M	0/0	3/3	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
21	17 F	0/0	3/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0

ゴナドトロピン産生腺腫10例

CaseNo.	AGE&SEX	GH	PRL	ACTH	FSH β	LH β	α SU	TSH β
22	55 M	0/0	0/0	0/0	2/0	0/0	2/0	0/0
23	35 M	0/0	0/0	0/0	1/0	0/0	1/0	0/0
24	59 M	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	1/0	0/0
25	54 M	0/2	0/2	0/0	1/2	0/2	1/0	0/0
26	68 M	0/3	0/3	0/2	2/2	0/3	0/0	0/0
27	74 M	0/3	0/3	0/3	2/2	0/2	2/0	0/0
28	25 F	0/0	0/0	0/0	1/0	1/0	1/0	0/0
29	61 F	0/0	0/0	0/0	1/0	0/0	1/0	0/0
30	49 F	0/0	0/0	0/0	2/0	0/0	1/0	0/0
31	54 F	1/0	1/1	1/0	3/1	0/0	1/1	0/0

IHC/ISH

0 : negative

1 : $\leq 25\%$ positive

2 : 26-50% positive

3 : 51-75% positive

4 : 76-100% positive

ナルセル腺腫4例

CaseNo.	AGE&SEX	GH	PRL	ACTH	FSH β	LH β	α SU	TS β
32	38 F	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
33	42 M	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
34	74 F	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
35	54 F	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0

IHC/ISH

0 : negative

1 : $\leq 25\%$ positive

2 : 26-50% positive

3 : 51-75% positive

4 : 76-100% positive

表3：免疫組織化学とISHの陽性例数

	GH	PRL	ACTH	FSH β	LH β	α SU	TS β
成長ホルモン産生腺腫	17/17	11/13	1/8	0/5	0/3	9/4	1/3
プロラクチン産生腺腫	0/0	4/4	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
ゴナドトロピン産生腺腫	1/4	1/5	1/3	10/5	1/4	9/1	0/0
ナルセル腺腫	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0

IHC/ISH

図2：ラットの正常下垂体組織より抽出したRNAのNorthern blot hybridizationである。1レーンあたり15 μ gのtotal RNAを電気泳動し、capillary elution法によりナイロンメンブレンに転写した。ビオチンで標識したオリゴヌクレオチドプローブにより、ラットGHおよびPRLのmRNAに対するhybridization bandが認められた。サイズは共に1.0Kbであった。

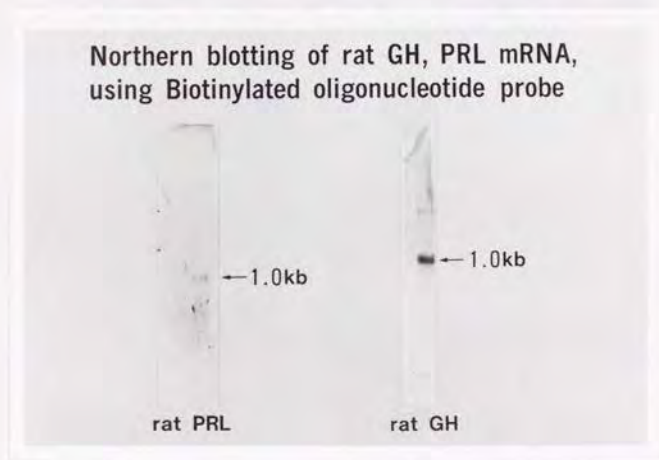


図3：ビオチン化オリゴヌクレオチドプローブを用いて行った、ラット正常下垂体組織におけるGH(3-a)およびPRL(3-b)mRNAのISHである。共に細胞質にhybridization signalが認められた。(パラフィン切片 x600)

3-a



3-b

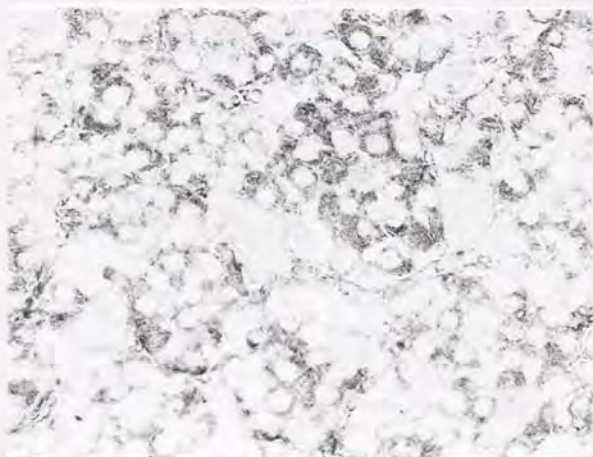


図4：ラット正常下垂体組織の新鮮凍結切片において、ビオチン化オリゴヌクレオチドプローブを用いて、中葉にPOMCのmRNAが検出された。(x15)

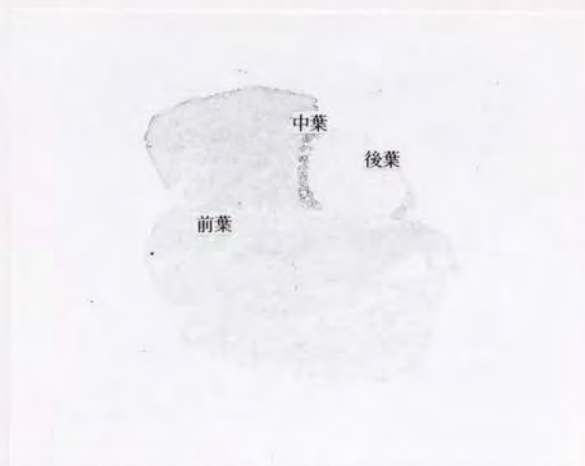


図5 : a:ラット正常下垂体組織の凍結切片におけるGHmRNAのISHである。streptavidin-biotin-horseradish peroxidase、DABおよび H_2O_2 による発色でもGHmRNAのhybridization signalを検出することができた。(x600)

b:senseプローブを用いた陰性対照試験ではhybridization signalは認められなかった。(x600)

5-a



5-b



図6：preembedding法による電子顕微鏡下でのmRNAの観察である。ラットGHmRNAが粗面小胞体上のribosomeに局在することが示された。(x50,000)



図7：ラットGHmRNAに対するsenseプローブを用いた陰性対照試験では電子顕微鏡下でも粗面小胞体上にhybridization signalは認められなかった。(x55,000)



図8：成長ホルモン産生腺腫(症例11)のNorthern blot hybridizationである。 ^{32}P で標識したオリゴヌクレオチドプローブを用いてGH、PRL mRNAに対する1.0Kbのhybridization bandが認められた。

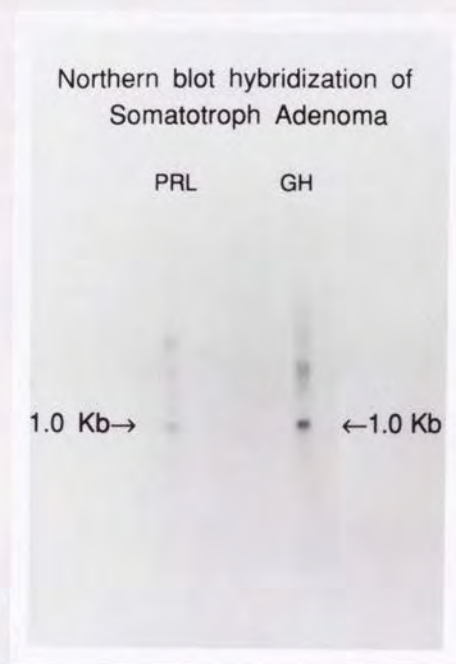


図9：成長ホルモン産生腺腫(症例11)のパラフィン切片を用いて行ったISHである。
GH(a)およびPRL(b)のmRNAに対するhybridization signalを認めた。(x600)

9-a

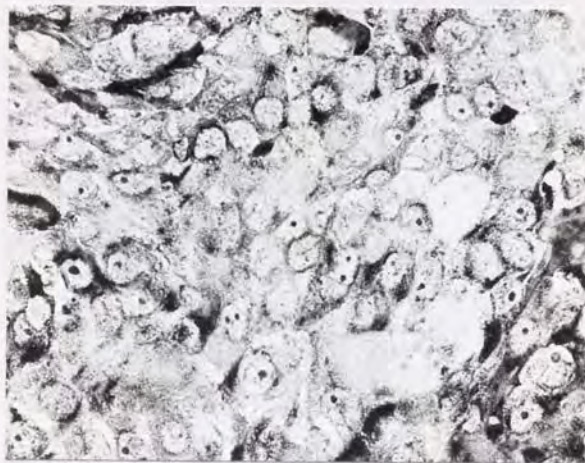


9-b

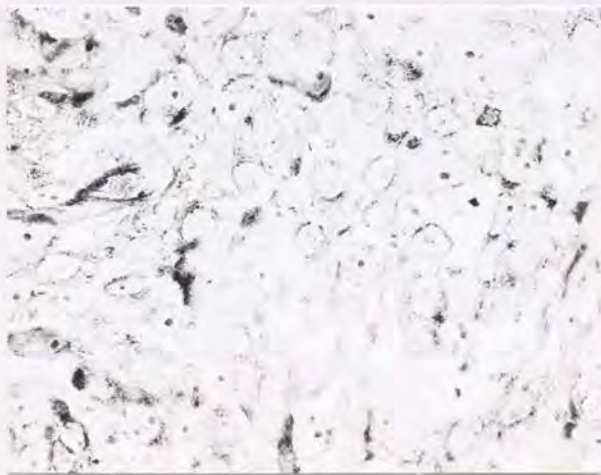


図10：成長ホルモン産生腺腫(症例3)のISHである。GHmRNA(a)が瀰漫性に強陽性であり、PRLmRNA(b)も瀰漫性に陽性である。ACTH(c)、FSH β (d)、LH β (e)、TSH β (f)および α SU(g)のmRNAも散在性に陽性である。(パラフィン切片 x600(a-c,e-g), x300(d))

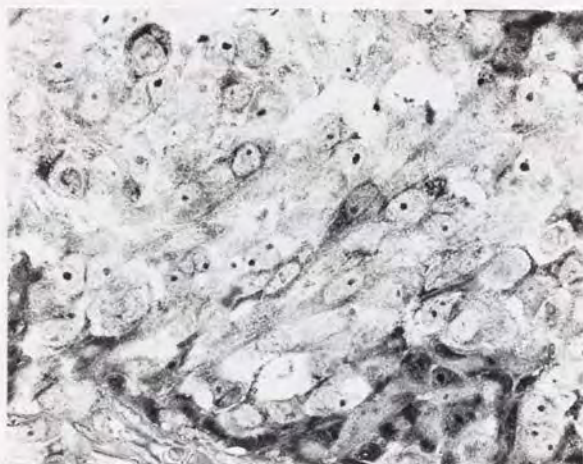
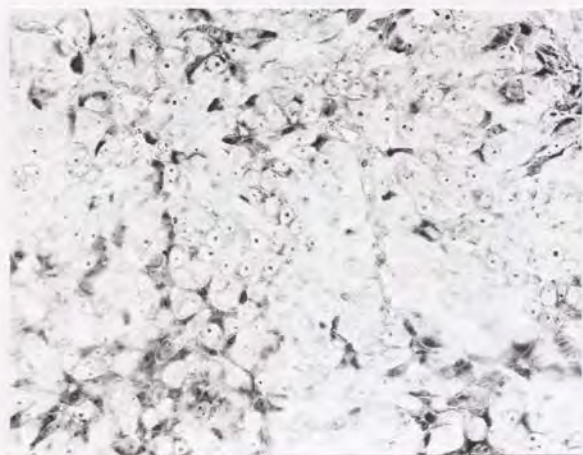
10-a(GHmRNA)

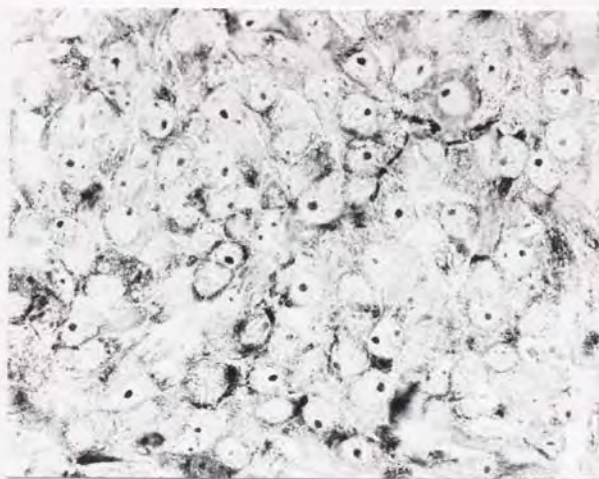
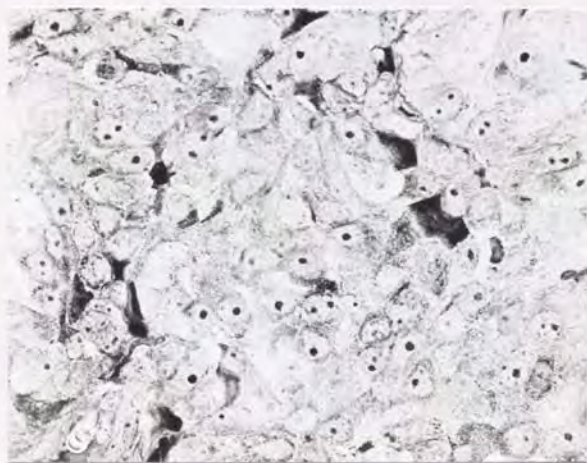


10-b(PRLmRNA)



10-c(ACTHmRNA)

10-d(FSH β mRNA)

10-e(LH β mRNA)10-f(TSH β mRNA)

10-g(α SUmRNA)

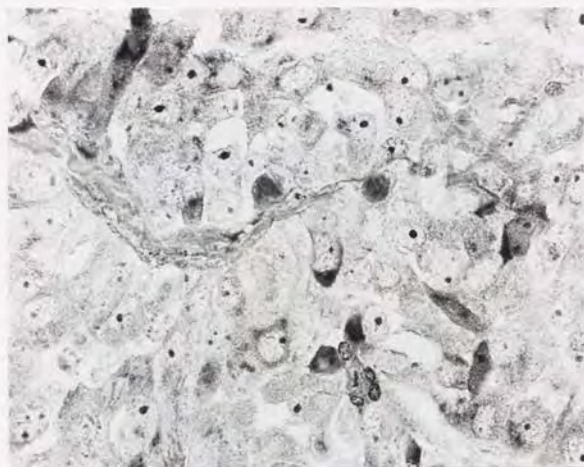


図11：プロラクチン産生腺腫(症例20)のNorthern blot hybridizationである。 ^{32}P で標識したオリゴヌクレオチドプローブを用いてPRLmRNAに対する1.0Kbのhybridization bandが認められた。

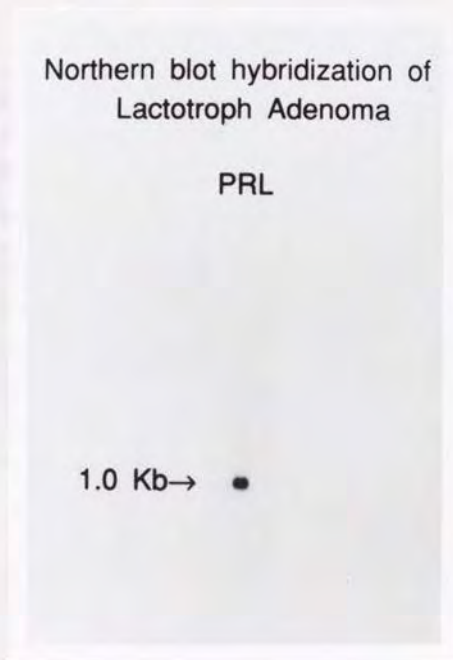
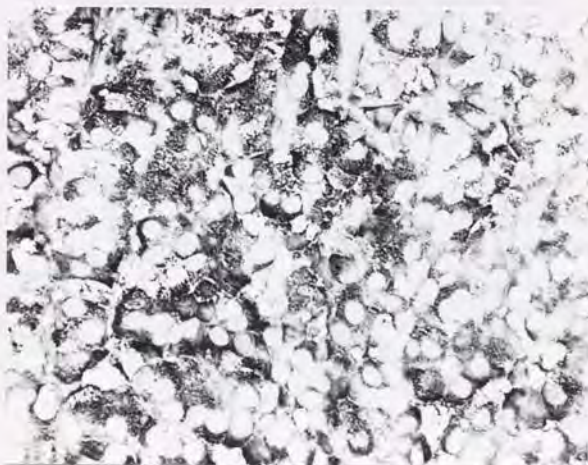


図12 : プロラクチン産生腺腫(症例20)のパラフィン切片を用いたISHである。PRL mRNAに対するhybridization signalが瀰漫性に認められた。(x600)



図13: 臨床的非機能性腺腫(症例24)のISHである。GH(a)、PRL(b)、ACTH(c)、FSH β (d)、LH β (e)のmRNAが陽性である。(パラフィン切片 x600)

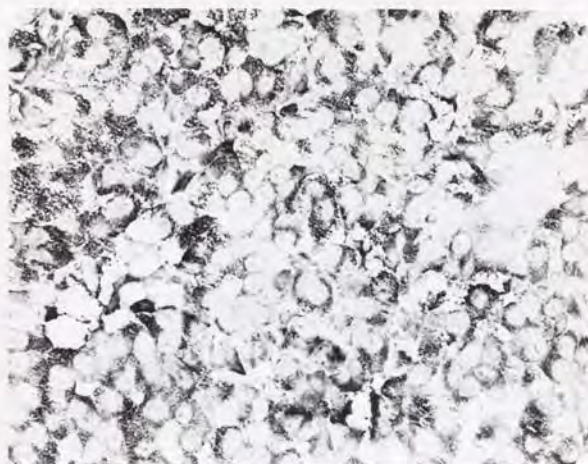
13-a(GHmRNA)

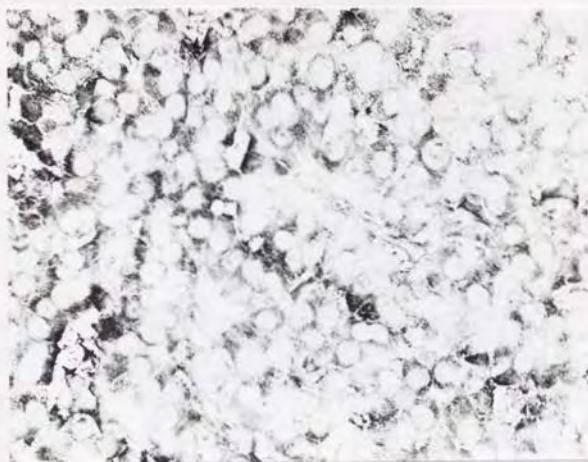


13-b(PRLmRNA)



13-c(ACTHmRNA)

13-d(FSH β mRNA)

13-e(LH β mRNA)

4、考 察

下垂体腺腫の内分泌機能は従来主として免疫組織化学により、産生される下垂体前葉ホルモンによって評価されてきた。近年、ISHによる下垂体前葉ホルモンmRNAの発現の検討など下垂体腺腫の病態生理に関する研究がすすめられてきている(13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26)。免疫組織化学とISHを併用することにより、下垂体腺腫の内分泌機能を形態学的により一層明確にすることができると考えられる。従来の報告では主として放射性プローブによるISHが用いられてきたが(18,19,20)、近年非放射性プローブによるISHは、若干感度の点で劣るところがあるが、組織学的解像力に優れている点、ラベルされたプローブが長期間保存できる点、短時間で結果がえられる点、プローブの扱いが容易である点、免疫組織化学との対比も容易である点などのさまざまな利点を有することが報告されている(15,21,22)。しかしながら非放射性プローブを用いたISHにて糖蛋白ホルモンを含むすべての下垂体前葉ホルモンのmRNAの発現を検討した報告は過去にない。本研究ではデオキシオリゴヌクレオチドプローブを用いて糖蛋白ホルモンを含むすべての下垂体前葉ホルモンmRNAの発現について検討を行い、その有用性と問題点についても検討した。

ISHにおけるhybridization signalの強度には、hybridizationの温度、hybridization後の洗浄の際の塩濃度、組織中に固定されているmRNAを露出させるためのproteinase Kの濃度などが関与するが(33)、本研究においてはこれらの条件を可能な限り一定とした。各プローブの長さ、その塩基組成などからTm(melting temperature)を計算しその値がほぼ60℃前後であったので、hybridizationの際の温度として一般に推奨されているように(33)、Tm-25℃すなわち37℃にhybridizationの温度を統一し洗浄の際の塩濃度も一定にした。また組織の固定状態に応じてproteinase Kの濃度は適宜調節した。

ISHにはさまざまな対照試験が必要であり、その主なものを以下に示す。陰性対照試験として、1) senseプローブによるISHを行って陰性であること、2) プローブを用いないISHを行って陰性であること、3) ribonuclease A (100µg/ml, 37℃, 45分間)で処理した後ISHを行い陰性であること、陽性対照試験として、4) Northern blot hybridizationでhybridization bandがえられること、5) β -actinに対するプローブを用いたISHを行ってmRNAの組織中での保存性を確認すること、などである。本研究でもこれらの対照試験に基づきISHの結果を検討し各ホルモンの特異的なmRNAの検出が行われていることを確認した。非特異的反応と考えられるもの、mRNAの保存性に問題があると思われる

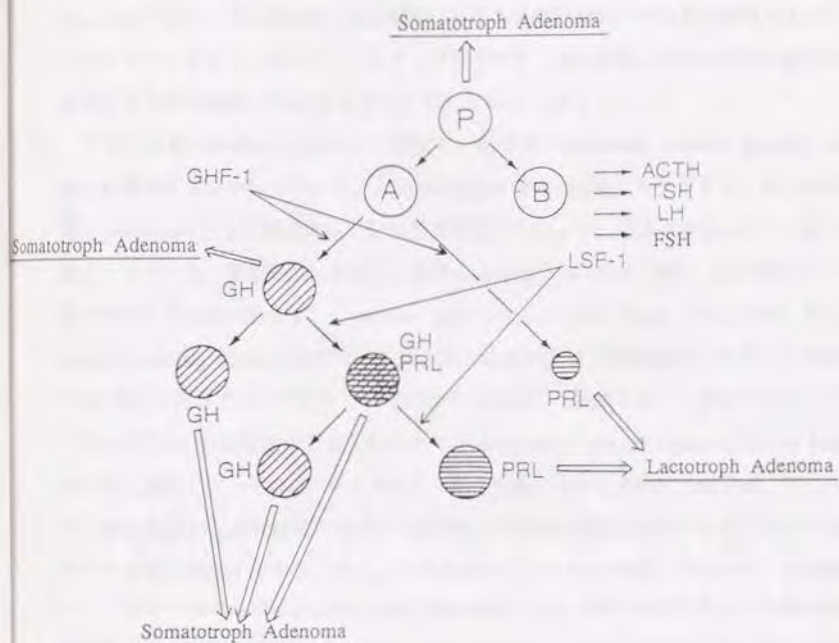
るものについては評価の対象外とした。

本研究の結果より下垂体腺腫における蛋白(ホルモン)とそのmRNAの発現に開離が存在する場合があるということが示された。すなわち、1) 蛋白が免疫組織化学で陽性であるのにそのmRNAがISHにて陰性である場合、2) mRNAがISHにて認められるが当該の蛋白が免疫組織化学で陰性である場合がある。1)の理由としては、ISHで用いた組織におけるmRNAの保存性に問題がある、mRNAも蛋白も少量しか産生されないが蛋白の分泌も少なく結果として貯蔵された蛋白のみが検出されている、などが考えられる。2)の理由としては、mRNAから蛋白への翻訳に何らかの障害がある、翻訳された蛋白が極めて速く代謝されたり分泌されたりしている、などが考えられる。

成長ホルモン産生腺腫は、好酸性細胞、つまりsomatotroph cell, acidophil stem cell, mammosomatotroph cellから発生すると考えられてきた(12,34)。成長ホルモン産生腺腫におけるGHとPRLのmRNAの発現と免疫組織化学については、既に確立されている(17, 20,35)。しかしながら、成長ホルモン産生腺腫における他の下垂体ホルモンmRNAの発現に関する報告は、ほとんどなくUhligらの報告(36)のみである。Uhligらは、放射性プローブを用いたISHにより39例のacromegalyの症例を検討しその25%においてLH β mRNAの発現を認めたという(36)。本研究ではすべての下垂体前葉ホルモンのmRNAの発現について非放射性プローブを用いたISHにより検討し、一部の成長ホルモン産生腺腫では、GH以外にPRL、ACTH、FSH β 、LH β 、TSH β 、 α SUの多種類のmRNAが発現していることを見いだした。中には、免疫組織化学で陰性であってもそのmRNA、特にACTH、FSH β 、LH β のmRNAがISHにより認められる例が存在した。下垂体腺腫はmonoclonal originとされているが(28,29,30)、成長ホルモン産生腺腫の中に好酸性細胞に由来するGH、PRL以外に好塩基性細胞に由来すると考えられるACTH、FSH β 、LH β のmRNAを発現するものが存在するということは、これらの腺腫の細胞起源が両者のprecursorであるplurihormonal primordial stem cellであることを強く示唆するものである。即ち本研究のISHの結果より一部の成長ホルモン産生腺腫が潜在的な多ホルモン産生能を有すること、さらにその細胞起源がplurihormonal primordial stem cellに求められる可能性が示唆された(図14)。

プロラクチン産生腺腫に関するISHとNorthern blot hybridizationによる検討では、その下垂体前葉ホルモンmRNAの発現がPRLのみに限定されていた。本研究の結果は他の研究者のものと一致する。Lloydらは、10例のプロラクチン産生腺腫のGHとPRLの発現

図14：成長ホルモン産生細胞とプロラクチン産生細胞の分化の図式である。下垂体前葉原始細胞(primordial stem cell(P))は全てのホルモン産生細胞のprecursorである好酸性細胞(A)と好塩基性細胞(B)に分化する。GHF-1やLSF-1が成長ホルモン産生細胞やプロラクチン産生細胞の分化に関与すると考えられる段階、および本研究の結果より推測される成長ホルモン産生腺腫とプロラクチン産生腺腫の発生母地を図中に示す。



P : Primordial Stem Cell

A : Acidophilic Cell

B : Basophilic Cell

GHF-1 : Growth Hormone Factor-1

LSF-1 : Lactotroph Specific Factor-1

-----modified after Karin M et al. (34)

について免疫組織化学と放射性プローブを用いたISHにより検討し、GHmRNAの発現がみられないことを明らかにした(20)。Liらも9例のプロラクチン産生腺腫について同様の検討を行い、その下垂体前葉ホルモンの発現がPRLに限られていると述べている(35)。本研究では非放射性プローブを用いたISHによっても同様の結果をえた。

transgenic mice を用いた研究でも、胎児におけるGH細胞は大多数のPRL細胞のprecursorであり、PRL細胞は下垂体前葉における好酸性細胞の最終分化段階にあることが示されている(37)。以上のことより、プロラクチン産生腺腫は好酸性細胞の最終分化段階にあるPRL細胞に由来するものと考えられる(図14)。

下垂体前葉はRathke's pouchより発生し、胎生期にprimordial anterior pituitary stem cellsが増殖するといわれている。このprimordial stem cellは、さまざまホルモン産生細胞のprecursorである好酸性細胞と好塩基性細胞に分化する。前者は成長ホルモン産生細胞とプロラクチン産生細胞に分化し、後者からはACTH、TSH、FSH、LHを産生する細胞が派生する(38)(図14)。pituitary specific transcription factor-1(Pit-1)(39)、またはgrowth hormone factor-1(GHF-1)(40)は、既に成長ホルモン産生細胞に分化した細胞のGHの発現に関与するだけでなく、その分化の過程にも関係することが明らかになっている(34)。PRLの転写因子として知られているlactotroph specific factor-1(LSF-1)も細胞の分化に関与している(34)。プロラクチン産生腺腫に関する本研究の結果は、プロラクチン産生腺腫が好酸性細胞の最終分化段階にあるPRL細胞に由来するものという従来からの学説に合致するものである。一方成長ホルモン産生腺腫については、本研究により、その一部のものはplurihormonal primordial stem cellに由来するという興味深い仮説をえることができた。plurihormonal primordial stem cellに由来すると考えられる一部の成長ホルモン産生腺腫が何故acromegalyやgigantismなどのGH過剰症状のみを呈するのかは明らかではない。その臨床症状の発現にはmRNAから蛋白への翻訳や翻訳された蛋白の分泌と代謝に関するなんらかの因子がさらに関与しているものと思われる。

臨床的非機能性腺腫のホルモン産生能に関して、これまでも免疫組織化学や細胞培養法などにより数多くの研究がなされている(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10)。その結果臨床的非機能性腺腫は、ゴナドトロピン産生腺腫の亜型であることが明らかとなってきた。山王らは免疫組織化学により83例の臨床的非機能性腺腫について検討し、38例(45.8%)で1つまたはそれ以上のゴナドトロピンsubunitが陽性であり、37例の腺腫はすべての下

垂体前葉ホルモンについて陰性のナルセル腺腫であり、ゴナドトロピン産生腺腫とナルセル腺腫は免疫組織化学的にも内分泌学的にも連続性をもっていると述べている(7)。またJamesonらはNorthern blot hybridization法により臨床的非機能性腺腫においてゴナドトロピンの遺伝子発現を明らかにした(14)。Lloydらは放射性プローブを用いたISHにより11例のナルセル腺腫、11例のoncocytoma、10例のゴナドトロピン産生腺腫について検討した結果、ゴナドトロピンの遺伝子発現の点で共通の性格を有していると述べている(24)。Büzらも放射性プローブを用いたISHにより40例中14例の臨床的非機能性腺腫においてHCGβ/LHβの遺伝子発現をみとめている(13)。本研究でもデオキシ化オリゴヌクレオチドプローブを用いたISHにより、FSHβ、LHβ、αSUのmRNAをそれぞれ5例、4例、1例で検出した。この結果はLloydら(24)、Büzら(13)の結果と一致し、臨床的非機能性腺腫がゴナドトロピンのmRNAを発現していることを示すものである。

Lloydらはその他の下垂体ホルモンのmRNAの発現を、すなわちGHmRNAを1例のナルセル腺腫で、PRLmRNAを2例のナルセル腺腫と1例のゴナドトロピン産生腺腫で、ACTHmRNAを1例のナルセル腺腫で認めた(24)。Büzらも40例の臨床的非機能性腺腫でGH、PRLのmRNAの発現をそれぞれ3例と8例に認めている(13)。Kontogeorgosらは300例の臨床的非機能性腺腫を免疫組織化学的に検索し、そのうち18%の腺腫が糖蛋白ホルモン以外にGH、PRL、ACTHが陽性の細胞を有することを報告し、下垂体腺腫のなかには、precursor cellを起源としゴナドトロピン細胞のみならず他の腺腫細胞に分化しうるものがあるのではないかと述べている(41)。本研究でもGH、PRL、ACTHのmRNAがゴナドトロピン産生腺腫のそれぞれ4例、5例、3例で発現していることが示された。この結果はGH、PRL、ACTHの遺伝子発現または免疫組織化学の点でLloydら(24)、Büzら(13)、Kontogeorgosら(37)のものと合致し、臨床的非機能性腺腫がplurihormonal primordial stem cellに由来する可能性を示唆するものである。本研究の非放射性プローブを用いたISHでは下垂体ホルモン遺伝子発現のほとんどみられなかったナルセル腺腫は内分泌活性がゴナドトロピン産生腺腫に比しより乏しい腺腫であると考えられる。このような遺伝子発現の極めて乏しい例については、非放射性プローブを用いたISHには限界があり今後放射性プローブを用いたISHなどによりさらに検討が必要と思われる。

3例の臨床的非機能性腺腫で無症候性のGH産生がみられたという報告も(42)、本研究の結果を示唆するものである。臨床的非機能性腺腫においてドーパミン受容体が存在

する例があること(43,44)、in vitroにおいてcorticotroph releasing factorやgonadotropin releasing factorに反応する例があること(45)も、これらがplurihormonal primordial stem cellに由来するという仮説を支持するものである。

さまざまな下垂体ホルモンのmRNAを発現している臨床的非機能性腺腫が何故臨床症状を呈さないかということは明らかではない。粗面小胞体やゴルジ器官などの微細構造が未熟である点を考えると、蛋白への翻訳の段階などに問題があるのではないかとと思われる。

ビオチン化オリゴヌクレオチドプローブを用いたISHは、ナルセル腺腫のような遺伝子発現の極めて乏しい例を除けば種々の下垂体腺腫において、さまざまな下垂体ホルモンのmRNAの発現を検討する際に用いることができると考えられる。臨床症状、免疫組織化学、電子顕微鏡所見に基づくHorvathとKovacsの分類(11,12)はとても有用であるが、臨床的非機能性腺腫(13,16,24)や無症候性成長ホルモン産生腺腫(17,41,46)、無症候性ACTH産生腺腫(47,48,49)に関する最近の研究により、下垂体腺腫の病態を明らかにするうえで免疫組織化学の限界が指摘されている。このような例では特定の遺伝子発現を検討するうえでISHが必須である(17,22,24,26)。免疫組織化学のみならずISHとNorthern blot hybridizationは下垂体腺腫の内分泌機能とその細胞起源を明らかにするうえで重要であると考えられる。

一般に非放射性プローブを用いたISHでは主としてstreptavidin-biotin-alkaline phosphataseでhybridization signalの検出が行われているが、本研究ではstreptavidin-biotin-horseradish peroxidaseを用いてもラットGHmRNAを検出することが可能であった。streptavidin-biotin-horseradish peroxidaseを用いてhybridization signalの検出が可能となれば、preembedding法により電子顕微鏡下に観察することにより、mRNAの粗面小胞体上のribosomeへの局在を証明することは比較的容易であり、細胞内でのmRNAの動態と蛋白合成における役割に関してさらなる情報をえることができると考えられる。

本研究で示されたようにビオチン化オリゴヌクレオチドプローブは、光顕レベルのISHのみならずNorthern blot hybridizationや電顕レベルのISHにも応用でき、下垂体腺腫の内分泌機能への形態学的アプローチに大変有用である。尚、このように同一のビオチン化オリゴヌクレオチドプローブを用いて、光顕レベルのISHのみならずNorthern blot hybridization、電子顕微鏡下でのISHを行えた例は過去に報告がなく、本研究が最初であると思われる。

本研究のISHの結果より、プロラクチン産生腺腫がPRLmRNAのみを発現する分化度の高い腫瘍であると考えられるのに対し、成長ホルモン産生腺腫のなかにはACTH、FSH β 、LH β などの多種類の下垂体前葉ホルモンのmRNAを発現しplurihormonal primordial stem cellに由来するものがあると思われ、またゴナドトロピン産生腺腫の1型と考えられていた臨床的非機能性腺腫の一部にもGH、PRL、ACTHmRNAを発現しplurihormonal primordial stem cellに由来するものが存在すると考えられた。また、本研究によりこれらの腺腫における下垂体ホルモンの産生とそのmRNAの発現に開離があることが明らかとなり、今後mRNAより蛋白への翻訳や翻訳された蛋白の分泌と代謝の問題などについて検討が必要になるとと思われる。

5、結語

種々の下垂体腺腫について、非放射性プローブを用いたISHにより下垂体前葉ホルモンのmRNAの発現について検討を行い、その内分泌活性、細胞起源につき考察を行った。

本研究の結果より以下のことが示された。

- 1、成長ホルモン産生腺腫の一部で免疫組織化学で陰性であってもISHによりそのmRNAの発現が示された例が、特にACTH、FSH β 、LH β で認められた。このことは、これらの下垂体腺腫が、従来より成長ホルモン産生腺腫の発生源とされてきた好酸性細胞ではなく、plurihormonal primordial stem cellに由来する可能性を示唆するものと思われる。
- 2、プロラクチン産生腺腫はその下垂体前葉ホルモnmRNAの発現がPRLに限られ、また免疫組織化学の結果も同様であり、好酸性細胞の最終分化段階にあるPRL細胞に由来するものと考えられる。
- 3、臨床的非機能性腺腫の一部でGH、PRL、ACTHについて免疫組織化学で陰性であってもISHによりそのmRNAの発現が示された例がある。本腫瘍は、ゴナドトロピン産生腺腫の1型として位置づけられているが、そのみならず、GH、PRL、ACTHのmRNAを発現しているものも存在するということは、plurihormonal primordial stem cellに由来する可能性を意味するものとして興味深い。
- 4、下垂体腺腫における下垂体前葉ホルモンの産生分泌とそのmRNAの発現に関して

は、非放射性プローブを用いたISHに加え、mRNAから蛋白への翻訳や翻訳された蛋白の分泌と代謝の問題などを同時に検討し、さらに詳しく調べる必要があると思われる。

5、ビオチン化オリゴヌクレオチドプローブを用いたISHは、ナルセル腺腫のような内分泌活性が低く遺伝子発現の乏しい腺腫では下垂体前葉ホルモンmRNAの検出には限界があり、放射性プローブを用いたISHでさらに検討する必要があると考えられるが、成長ホルモン産生腺腫のように内分泌活性の高い腺腫ではさまざまな下垂体前葉ホルモンmRNAを検出することができ、その内分泌活性を明らかにするうえで有用な方法であると思われる。

6、ビオチン化オリゴヌクレオチドプローブは、光顕レベルのISHのみならず、Northern blot hybridizationにも用いることができ、さらには電子顕微鏡下でのmRNAの細胞内局在の検討を行う際にも有用であり、細胞内mRNAの動態を知る手がかりとなりうると考えられた。

6、文献

- 1) Asa SL, Gerrie BM, Singer W, Horvath E, Kovacs K : Gonadotropin secretion in vitro by human pituitary null cell adenomas and oncocytomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;62:1011-1019
- 2) Beckers A, Stevenaert A, Mashiter k, Hennen G : Follicle-stimulating hormone-secreting pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;61:525-528
- 3) Black PM, Hsu DW, Klibanski A, Kliman B, Jameson JL, Ridgway EC, Hedley-Whyte ET, Zervas NT : Hormone producing in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *J Neurosurg* 1987;66:244-250
- 4) Mashiter K, Adams E, Van Noorden S : Secretion of LH, FSH and PRL shown by cell culture and immunocytochemistry of human functionless pituitary adenomas. *Clin Endocrinol(Oxf)* 1981;15:103-112
- 5) Osamura RY, Watanabe K : Immunohistochemical studies of human FSH producing pituitary adenomas. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1988;413:61-68
- 6) Ridgway EC : Glycoprotein hormone production by pituitary tumors. edited by Black PM, Zervas NT, Ridgway EC, Martin JB : *Pituitary Gland*. Raven Press, New York, 1984:343-363
- 7) Sanno N, Teramoto A, Inada K, Osamura Y : Immunohistochemical and clinicoendocrinological studies of gonadotropin producing pituitary adenomas. *Brain and Nerve* 1992;44:745-753 (in Japanese)
- 8) Snyder PJ : Gonadotroph cell adenomas of the pituitary. *Endocrine Reviews* 1985;6:552-563
- 9) Surmont DW, Winslow CL, Loizou M, White MC, Adams EF, Mashiter K : Gonadotrophin and alpha subunit secretion by human functionless pituitary adenomas in cell culture ; long term effects of luteinizing hormone releasing hormone and thyrotrophin releasing hormone. *Clin Endocrinol(Oxf)* 1983;19:325-336
- 10) Takeuchi J, Handa H, Suda K, Aso T : In vitro secretion of follicle-stimulating hormone by pituitary chromophobe adenomas. *Surg Neurol* 1980;14:303-309
- 11) Horvath E, Kovacs K : Pituitary gland. *Pathol Res Pract* 1988;183:129-142
- 12) Kovacs K, Horvath E : Tumors of the pituitary gland. *Atlas of Tumor Pathology*,

Second Series, Fascicle 21. Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC, 1986

13) Báz E, Saeger W, Uhlig H, Fehr S, Lüddecke DK : HGH, PRL and β HCG/ β LH gene expression in clinically inactive pituitary adenomas detected by in situ hybridization. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1991;418:405-410

14) Jameson JL, Klibanski A, Black PM, Zervas NT, Lindell CM, Hsu DW, Ridgway EC, Habener JF : Glycoprotein hormone genes are expressed in clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *J Clin Invest* 1987;80:1472-1478

15) Hankin RC, Lloyd RV : Detection of messenger RNA in routinely processed tissue sections with biotinylated oligonucleotide probes. *Am J Clin Pathol* 1989;92:166-170

16) Kilár F, Muhr C, Funa K : In situ hybridization histochemistry of mRNAs for hormones and chromogranins in normal pituitary tissue and pituitary adenoma. *Acta Endocrinologica(Cppenh)* 1991;125:628-636

17) Kovacs K, Lloyd RV, Horvath E, Asa SL, Stefaneanu L, Killinger DW, Smyth HS : Silent somatotroph adenomas of the human pituitary. *Am J Pathol* 1989;134:345-353

18) Lloyd RV : Analysis of human pituitary tumors by in situ hybridization. *Path Res Pract* 1988;183:558-560

19) Lloyd RV, Iacangelo A, Eiden LE, Cano M, Jin L, Grimes M : Chromogranin A and B messenger ribonucleic acids in pituitary and other normal and neoplastic human endocrine tissues. *Lab Invest* 1989;60:548-556

20) Lloyd RV, Cano M, Chandler WF, Barkan AL, Horvath E, Kovacs K : Human growth hormone and prolactin secreting pituitary adenomas analyzed by in situ hybridization. *Am J Pathol* 1989;134:605-613

21) Lloyd RV, Jin L, Fields K : Detection of chromogranins A and B in endocrine tissues with radioactive and biotinylated oligonucleotide probes. *Am J Surg Pathol* 1990;14:35-43

22) Lloyd RV, Fields K, Jin L, Horvath E, Kovacs K : Analysis of endocrine active and clinically silent corticotroph adenomas by in situ hybridization. *Am J Pathol* 1990; 137:479-488

23) Lloyd RV, Jin L, Chandler WF : In situ hybridization in the study of pituitary

tissues. *Path Res Pract* 1991;187:552-555

24) Lloyd RV, Jin L, Fields K, Chandler WF, Horvath E, Stefaneanu L, Kovacs K : Analysis of pituitary hormones and chromogranin A mRNAs in null cell adenomas, oncocytomas, and gonadotroph adenomas by in situ hybridization. *Am J Pathol* 1991;139:553-564

25) Singer RH, Lawrence JB, Villave C : Optimization of in situ hybridization using isotopic and non-isotopic detection methods. *Biotechniques* 1986;4:230-259

26) Stefaneanu L, Kovacs K, Horvath E, Lloyd RV : In situ hybridization of pro-opiomelanocortin(POMC) gene expression in human pituitary corticotrophs and their adenomas. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1991;419:107-113

27) Saito S : Pathophysiology and gene abnormalities of endocrine tumors. *Folia Endocrinol.* 1992;68:1225-1239

28) Alexander JM, Biller BMK, Bikkal H, Zervas NT, Arnold A, Klibanski A : Clinically nonfunctioning pituitary tumors are monoclonal in origin. *J Clin Invest* 1990;86:336-340

29) Herman V, Fagin J, Gonsky R, Kovacs K, Melmed S : Clonal origin of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:1427-1433

30) Schulte HM, oldfield EH, Allolio B, Katz DA, Berkman RA, Ali IU : Clonal composition of pituitary adenomas in patients with Cushing's disease: Determination by X-chromosome inactivation analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:1302-1308

31) Guitteny AF, Fouque B, Mougin C, Teoule R, Bloch B : Histological detection of messenger RNAs with biotinylated synthetic oligonucleotide probes. *J Histochem Cytochem* 36:563-571,1988

32) Chirgwin JM, Przyhyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ : Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979;18:5294-5299

33) 中根一穂編 : 改訂版In situ ハイブリダイゼーション手法 学際企画、1992

34) Karin M, Castrillo JL, Theill LE : Growth hormone gene regulation: a paradigm for cell-type-specific gene activation. *Trends Genet* 1990;6:92-96

- 35) Li J, Stefaneanu L, Kovacs K, Horvath E, Smyth HS : Growth hormone (GH) and prolactin (PRL) gene expression and immunoreactivity in GH- and PRL-producing human pituitary adenomas. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1993;422:193-201
- 36) Uhlig H, Saeger W, Fehr S, Lüdecke DK : Detection of growth hormone, prolactin and human beta-chorionic gonadotropin messenger RNA in growth-hormone-secreting pituitary adenomas by in situ hybridization. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1991;418:539-546
- 37) Borrelli E, Heyman RA, Arias C, Sawchenko PE, Evans RM : Transgenic mice with inducible dwarfism. *Nature* 1989;339:538-541
- 38) Chatelain A, Dupouy JP, Dubois MP : Ontogenesis of cells producing polypeptide hormones (ACTH,MSH,LPH,GH,prolactin) in the fetal hypophysis of the rat: influence of the hypothalamus. *Cell Tissue Res* 1979;196:409-427
- 39) Ingraham HA, Chen RP, Mangalam HJ, Elsholtz HP, Flynn SE, Lin CR, Simmons DM, Swanson L, Rosenfeld MG : A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* 1988;55:519-529
- 40) Bodner M, Castrillo JL, Theill LE, Deerinck T, Ellisman M, Karin M : Pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. *Cell* 1988;55:505-518
- 41) Kontogeorgos G, Kovacs K, Horvath E, Scheithauer BW : Null cell adenomas, oncocytomas, and gonadotroph adenomas of the human pituitary: An immunocytochemical and ultrastructural analysis of 300 cases. *Endocr Pathol* 1993;4:20-27
- 42) Klibanski A, Zervas NT, Kovacs K, Ridgway EC : Clinically silent hypersecretion of growth hormone in patients with pituitary tumors. *J Neurosurg* 1987;66:806-811
- 43) Lloyd RV, Anagnostou D, Chandler WF : Dopamine receptors in immunohistochemically characterized null cell adenomas and human pituitaries. *Modern Pathol* 1988;1:51-56
- 44) Grossman A, Ross R, Charlesworth M, Adams CB, Wass JA, Doniach I, Besser GM : The effect of dopamine agonist therapy on large functionless pituitary tumors. *Clin Endocrinol(Oxf)* 1985;22:679-686

- 45) Song J, Jin L, Chandler WF, England BG, Smart JB, Landefeld TD, Lloyd RV : Gonadotropin-releasing hormone regulates gonadotropin β -subunit and chromogranin-B messenger ribonucleic acids in cultured chromogranin-A-positive pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1990,71:622-630
- 46) Valenta LJ, Elias AN : Clinical Acromegaly with undetectable growth hormone and hyperprolactinemia. *J Natl Med Assoc* 1987,79:555,559-560
- 47) Horvath E, Kovacs K, Killinger DW, Smyth HS, Platts ME, Singer W : Silent corticotropic adenomas of the human pituitary gland. *Am J Pathol* 1980,98:617-638
- 48) Lloyd RV, Chandler F, McKeever PE, Schteingart DE : the spectrum of ACTH-producing pituitary lesions. *Am J Surg Pathol* 1986,10:618-626
- 49) Reincke M, Allolio B, Saeger W, Kaulen D, Winkelmann W : A pituitary adenoma secreting high molecular weight adrenocorticotropin without evidence of Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1987,65:1296-1300



