



SHORT STATURE CAUSED BY A MUTANT GROWTH HORMONE

高橋, 裕

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1477

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001477>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	たか はし ゆたか 高 橋 裕	(東京都)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)	
学位記番号	博い第1003号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成8年3月31日	
学位論文題目	SHORT STATURE CAUSED BY A MUTANT GROWTH HORMONE (変異成長ホルモンによって引き起こされた低身長)	
審査委員	主査 教授 千原 和 夫 教授 中 村 肇 教授 松 尾 雅 文	

論 文 内 容 の 要 旨

〈緒言〉

これまでインスリンをはじめ、いくつかのペプチドホルモンにおいてその構造異常のためにホルモンの生物活性が低下し、結果としてそのホルモンの欠損症と類似した病像を示すことが知られている。

生物学的不活性型成長ホルモンは1978年にコワルスキラが、報告して以来十数例が確認されている。しかし、分子レベルでその構造異常を証明した成績はない。我々は、臨床的に生物学的不活性型成長ホルモンが疑われる症例において、分子生物学的手法を用いてその成長ホルモン(GH)の構造異常の解析を試みた。

〈症例〉

4歳11か月男児、身長-6.1SD、骨年齢2歳、IGF-1 34ng/ml、GHは基礎値は8.9ng/ml、GH刺激試験のITTに対し38ng/ml、L-dopaに対し35ng/ml、と過剰反応を示した。夜間の尿中GH分泌は67.8ng/gCrと高値。外因性GHに対するIGF-1 generation testは3日間のGH投与に対しては、IGF-1はほとんど反応を見せなかったが、半年間のGH投与に対しては200ng/mlと増加し、身長の伸びも、3.9cm/年から6.0cm/年(3.0cm/6ヶ月)と改善した。GHBPは69.6pmol/l、IGFBP-3は0.86ng/lだった。

〈方法〉

まず、GH濃度依存性に増殖を示すNb2細胞および、ヒトGH受容体を持つIM-9細胞を用いて、その血清中GHの生物活性を測定した。生物活性の低下を確認した後、ゲノムDNAを抽出し、成長ホルモンをコードしているGH-N遺伝子に特異的なプライマーを用いてPCRにて増幅後、PCR-SSCP法にてスクリーニングし、遺伝子異常が疑われるフラグメントについてはベクターにサブクローニング、サンガー法にてシーケンスを決定し、変異を認めた場合には直接シーケンス法で確認した。また末梢血よりリンパ球を分離、RNAを抽出しRT-PCRにてGHcDNAを増幅後同様に解析した。

見いだした変異はクローニングしたGH遺伝子に部位特異的変異導入法にて変異体を作成し、GSTとの融合蛋白として大腸菌にて発現、GSTカラムにて精製した後、機能実験を行った。機能実験として、Nb2細胞における生物活性の測定、IM-9細胞に対する結合実験、遺伝子組換えヒトGH結合蛋白（rhGHBP）に対する親和性の測定、およびIM-9細胞における成長ホルモン依存性のチロシンリン酸化能のウェスタンブロッティング法による同定を行った。

〈結果〉

1) 生物活性の測定

本症例において血清中のGHの生物活性をNb2細胞により測定したところコントロール血清 1.04 ± 0.22 に対し 0.57 ± 0.20 と有意の低下を認めた。

2) 遺伝子の解析

GH-1遺伝子をPCR-SSCP法でスクリーニングした結果、患者および父親でバンドのシフトが見られ遺伝子異常が強く疑われたので、ベクターにサブクローニング、サンガー法にてシーケンスを決定し、変異を認めたため直接シーケンス法で確認した。変異はコドン77のアルギニンがシステインに変化するもので患者および父親でヘテロの変異であった。

3) 変異GHの同定

変異GHが存在しているかどうかを確認する目的で、患者、父親およびコントロール血清において等電点電気泳動による分離をおこなったところ患者血清において、正常GHとともに変異GHのピークを認めたが、父親およびコントロール血清では正常GHのピークのみを認めた。

4) 変異GHの機能解析

変異GHを大腸菌にて発現させ精製した後、機能解析を行った。まずNb2細胞で生物活性を測定したところ正常GHと変異GHの間に差を認めなかった。しかしアッセイメディウムに血清を加えると変異GHにおいて有意の低下を認めたため、血清中に存在するGH受容体の細胞外領域であるGHBPの影響が考えられた。そこでrhGHBPを加えて生物活性を測定するとrhGHBPの濃度依存性に変異GHにおいて有意の低下を認めた。次にrhGHBPとの結合親和性を抗GHBP抗体を用いた免疫沈降法で調べると、変異GHは正常GHに比べ約6倍結合親和性が高いことが判明した。またGH受容体を発現しているIM-9細胞においてGH依存性のチロシンリン酸化能をウェスタンブロッティングにより解析すると、変異GHはGH依存性のチロシンリン酸化能を失っているのみならず、アンタゴニストとして作用し正常GHの効果を抑制することが明らかになった。

〈考察〉

本症例においては臨床的データ上、生物学的不活性型GHが疑われた。また血清中のGHの生物活性の有意の低下を認めたため、生物学的不活性型GHとして外因性にリコンビナントGHの投与を行った。しかし短期投与によるIGF-1 generation testに対してはほとんど反応を示さず、長期投与に対しても期待していたほどの効果は認めなかった。GH-1遺伝子を解析したところコドン77をコードするアルギニンがシステインに変化するヘテロのミスセンス変異を認めた。この部位はGH分子の2番目の α ヘリックスに存在し、GH受容体との結合に重要なサイト1の裏側にあたり、あらたに生じたシステインは、GH分子に本来存在し2組のS-S結合を形成している4つのシステインのいずれかと異常なS-S結合を形成し、立体構造の変化をきたす可能性が考えられた。

患者においては変異はヘテロで発症しており、同じ遺伝子型を持つ父親がなぜ発症しないのかは不

明であった。まず等電点電気泳動の結果から患者血清中には変異GHは存在するが父親血清中には存在しないことが判明し、父親において変異GHが発現していないことが発症していない原因であった。父親において発現していない理由は不明で、今後の検討が必要と考えられた。

rhGHBPとの結合親和性は変異GHにおいて数倍高く、これは立体構造の変化にともないサイト1あるいはサイト2における親和性が影響を受けた結果と考えられた。ウェスタンブロットングの結果から、変異GHはGH依存症のチロシンリン酸化能がほとんどなくおそらくシグナル伝達に必要なGH受容体の重合化が起こらないことが原因と考えられた。以上のことから、本症例では、正常GHと変異GHがともに産生、分泌されているが、GHのシグナルを正常に伝達できない変異GHのGH受容体(およびGH結合蛋白)への結合親和性が正常GHよりも高いために、変異GHのドミナントネガティブ効果が発揮され、GH欠乏症と同様の病態を示すと考えられた。

本症例では治療としてリコンビナントGHを0.5U/kg/w用いたが十分な効果をあげることができなかった。今後、変異GHの分泌抑制とドミナントネガティブ効果を凌駕することを期待して倍量による治療そしてそれが無効の場合にはIGF-1を用いた治療も検討中である。

論文審査の結果の要旨

生物学的不活性型成長ホルモンによって小人症が起こる可能性を1978年にコワルスキラが報告して以来その病態を解明する努力が続けられているが、現在まで分子レベルでその構造異常を証明した成績はない。申請者達は、臨床的に生物学的不活性型成長ホルモンが疑われる症例を見出し、分子生物学的手法を用いてその患者の成長ホルモン(GH)の構造異常の解析を試みた。

患児は著しい低身長を示した4歳11か月の男児で、血中GHは常に高値、血中IGF-1は低値を示した。外因性GHに対するIGF-1 generation testは3日間のGH投与に対しては、IGF-1はほとんど反応を見せなかったが、半年間のGH投与に対して明確に増加し、身長伸びも、有意に改善した。まず、GH濃度依存性に増殖を示すNb2細胞および、ヒトGH受容体を持つIM-9細胞を用いて、患児の血清中GHの生物活性を測定したところ対照血清 1.04 ± 0.22 に対し 0.57 ± 0.20 と有意に低下していた。次にゲノムDNAを抽出し、成長ホルモンをコードしているGH-N遺伝子に特異的なプライマーを用いてPCRにて増幅後、PCR-SSCP法にてスクリーニングしたところ、患者および父親でバンドのシフトが見られ遺伝子異常が強く疑われたので、ベクターにサブクローニング、サンガー法にてシーケンスを決定し、変異を認めたため直接シーケンス法で確認した。変異はコドン77のアルギニンがシステインに変化するもので患者および父親でヘテロの変異であった。変異GHが存在しているかどうかを確認する目的で、患者、父親、およびコントロール血清において等電点電気泳動による分離をおこなったところ患者血清において、正常GHとともに変異GHのピークを認めたが、父親およびコントロール血清では正常GHのピークのみを認めた。見出した変異はクローニングしたGH遺伝子に部位特異的変異導入法にて変異体を作成し、GSTとの融合蛋白として大腸菌にて発現、GSTカラムにて精製した後、機能実験を行なった。まずNb2細胞で生物活性を測定したところ正常GHと変異GHの間に差を認めなかった。しかしアッセイメディウムに血清を加えると変異GHにおいて有意の低下を認めたため、血清中に存在するGH受容体の細胞外領域であるGHBPの影響が考えられた。そこでrhGHBPを加えて生物活性を測定するとrhGHBPの濃度依存性に変異GHにおいて有意の低下を認めた。次にrhGHBPとの結合親和性を抗GHBP抗体を用いた免疫沈降法で調べると、変異GHは正常GHに比べ約6倍結合親和性が高いことが判明した。またGH受容体を発現しているIM-9細胞にお

いてGH依存性のチロシンリン酸化能をウエスタンブロッティングにより解析すると、変異GHはGH依存性のチロシンリン酸化能を失っているのみならず、アンタゴニストとして作用し正常GHの効果を抑制することが明らかになった。申請者達の変異を見出したコドン77の部位はGH分子の2番目の α ヘリックスに存在し、GH受容体との結合に重要なサイト1の裏側にあたり、あらたに生じたシステインは、GH分子に本来存在し2組のS-S結合を形成している4つのシステインのいずれかと異常なS-S結合を形成し、立体構造の変化をきたす可能性が考えられた。さらに、rhGHBPとの結合親和性は変異GHにおいて数倍高く、これは立体構造の変化にともないサイト1あるいはサイト2における親和性が影響を受けた結果と考えられた。ウエスタンブロッティングの結果から、変異GHはGH依存性のチロシンリン酸化能がほとんどなくおそらくシグナル伝達に必要なGH受容体の重合化が起こらないことが原因と考えられた。すなわち本症例では、正常GHと変異GHがともに産生、分泌されているが、GHのシグナルを正常に伝達できない変異GHのGH受容体（およびGH結合蛋白）への結合親和性が正常GHよりも高いために、変異GHのドミナントネガティブ効果が発揮され、GH欠乏症と同様の病態を示すと考えられた。

以上、本研究は、生物学的不活性型成長ホルモンによってもたらされた小人症の症例についてその成長ホルモンの構造を解析し、従来まったく知られていなかった変異成長ホルモンをはじめて見出しその機能について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。