



Functional Characterization of Truncated Growth Hormone (GH) Receptor- (1-277) Causing Partial GH Insensitivity Syndrome with High GH-Binding Protein

飯田, 啓二

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2000-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2139

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002139>

※ 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）	飯 田 啓 二 (兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博い第1282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12年3月31日
学位論文題目	Functional Characterization of Truncated Growth Hormone (GH) Receptor—(1—277) Causing Partial GH Insensitivity Syndrome with High GH-Binding Protein (成長ホルモン(GH)結合蛋白高値を示した部分的GH不応症例で見い出された truncate 型 GH 受容体の機能解析)
審査委員	主査 教授 千 原 和 夫 教授 久 野 高 義 教授 春 日 雅 人

論文内容の要旨

はじめに

成長ホルモン (GH) 不応症は、1966年にラロンらによって初めて提唱された常染色体劣性遺伝疾患である。その病因として GH 受容体 (GHR) 遺伝子異常が報告されているが、異常の大部分は細胞外領域をコードする領域に見い出されており、ほとんどがホモ接合体あるいは複合型ヘテロ接合体変異である。

GH 結合蛋白 (GHBP) は、GHR の細胞外領域が蛋白限定分解により切断されることにより産生されるが、GH 不応症の大多数の症例で血中の GHBP は、GHR の機能異常を反映して検出できないか極めて低値となる。最近我々は部分的 GH 不応症および血中 GHBP 高値を示す日本人の兄妹例で、GHR 遺伝子のイントロン 9 のドナースプライスサイトに新奇なヘテロ接合体変異を同定し報告した。この変異により、一方のアリルにおいてエクソン 9 が完全にスキップし、わずか277アミノ酸からなる truncate 型 GHR (GHR-277) が産生されると考えられる。本研究では、血中 GHBP 高値およびヘテロ接合体変異にもかかわらず低身長を来した患児の臨床的特徴を説明する目的で GHR-277 の機能解析を行った。

対象および方法

症例

症例は日本人の同胞例で13歳の兄と9歳の妹である。それぞれ-3.0SD および-3.5SD の低身長を呈していた。母親は147cm と-2.0SD の低身長であった。兄妹とも血清 GH は高値を示し、GH 刺激試験においても過剰反応を認めた。血中 insulin like growth factor-I (IGF-I) 値は低下していた。外因性の GH に対する反応を調べるために IGF-I 産生試験を行ったところ軽度の反応を認めるにとどまった。また血中 GHBP が正常の約2倍に上昇しているのが特徴的であった。

野生型 GHR (GHR-fl) および GHR-277発現ベクターの作成

GHR-fl cDNA を含んだ pUC119ベクター (pUC119/GHR-fl) から, BamH 1 – Sph 1 制限酵素サイトを利用して GHR-fl cDNA を切り出し, 発現ベクター pcDNA 1 に組み込んだ。GHR-277発現ベクターの作成には, まず患児のリンパ球から抽出した RNA を鋳型に RT-PCR 法で増幅したエクソン 7 からエクソン10を含む断片を pT 7 BlueT ベクターに導入し, Nco 1 – EcoR 1 制限酵素サイトを利用して, pUC119/GHR-fl のエクソン 7 – エクソン10断片と入れ替えた。次に BamH 1 – Sph 1 制限酵素サイトを利用して GHR-277cDNA を切り出し, 発現ベクター pcDNA 1 に組み込んだ。

トランスフェクション

トランスフェクションは3.0 μ g の GHR-fl あるいは GHR-277発現ベクターと2.0 μ g の pSV β コントロールベクターを, リポフェクション法で行った。細胞は COS-7 および CHO 細胞を用いた。トランスフェクション効率は β ガラクトシダーゼ活性で補正した。

Scatchard 解析

GHR-fl あるいは GHR-277発現 COS-7 細胞に対し, 125 I でラベルした一定量のヒト GH (hGH) とさまざまな濃度のラベルなしの hGH の混合液を培養上清に加え, 90分後に細胞を0.1N の NaOH で溶解し, 放射活性を測定, 値を β ガラクトシダーゼ活性で補正した。

培養上清中の GHBP の測定

GHR-fl あるいは GHR-277発現 COS-7 細胞の培養上清を回収し, 125 I でラベルした hGH とマウスの抗 GHR 抗体を含んだ溶液を加え, ポリエチレングリコールで沈降させペレットの放射活性を測定, 値を β ガラクトシダーゼ活性で補正した。

GH 誘導性の GHR インターナリゼーション

GHR-fl あるいは GHR-277発現 COS-7 細胞の培養上清に 125 I –hGH を加え, 0, 15, 30および60分後に0.2M 酢酸 –0.5M NaCl を加え, 回収し膜表面上の受容体に結合した 125 I –hGH の放射活性を測定した。さらに残りの細胞に0.1N NaOH を加え溶解し, 細胞内に取り込まれた 125 I –hGH の放射活性を測定し, 細胞内に取り込まれた 125 I –hGH の割合を求めた。

GH 依存性の STAT 5 b (signal transducer and activator of transcription – 5 b) のチロシンリン酸化

GH シグナル伝達の程度を STAT 5 b のチロシンリン酸化で評価した。CHO 細胞に, 一定量の GHR-fl 発現ベクター (3.0 μ g) と, 様々な量の GHR-277発現ベクター (0.3, 1.5, 3.0 μ g) を同時にトランスフェクションし, GHR-fl と GHR-277を共発現させ, 100ng/ml の hGH で15分間刺激後細胞を溶解し STAT 5 b 抗体で免疫沈降, リン酸化チロシン抗体で Western blotting を行った。

結果

hGH との結合能の解析

Scatchard 解析により, 結合親和性においては GHR-fl で $K_a=0.4 \times 10^9 M^{-1}$, GHR-277で $K_a=0.61 \times 10^9 M^{-1}$ と約1.5倍, GHR-277の方が高親和性を示した。一方, 結合サイトに関しては GHR-fl で約70fmol

／ 10^6 細胞数，GHR-277で約147fmol／ 10^6 細胞数と，GHR-277の方が約2倍多かった。

培養上清中の GHBP 濃度

GHBP 値を反映する放射活性の値は GHR-fl 発現細胞で約1079cpm,GHR-277発現細胞で約3299cpm と GHR-277発現細胞の方が約3倍高値であった。

インターナリゼーションの時間経過

GHR-fl 発現細胞においては，時間依存性にリガンドは細胞内に取り込まれ，60分後の%インターナリゼーションが約75.6%であるのに対して，GHR-277発現細胞においては60分後の%インターナリゼーションは約16.6%と有意に少なかった。

GH シグナル伝達におよぼす GHR-277の影響

STAT5b のチロシンリン酸化は，トランスフェクトした GHR-277発現ベクター量に対し容量依存性に抑制された。すなわち GHR-277は GH シグナル伝達に対し，ドミナントネガティブ効果をおよぼすことが示唆された。

考察

我々は，GHBP 高値および部分的 GH 不応症を呈する症例において，GHR 遺伝子イントロン9にヘテロ接合体変異を見出した。この変異が患児の臨床像を説明しうるかどうかを明らかにする目的で変異受容体 GHR-277の機能解析を行った。患者の臨床像の特徴の一つは，これまでの大多数の GHR 異常症と異なり，血中 GHBP が高値を示していた点である。過去に GHR の膜貫通領域の異常のために産生された受容体が膜上にとどまらず，血中に流出して GHBP として測定されるために GHBP 高値を示すと考えられる症例が報告されている。我々の症例はこの例と臨床上是似ているが，GH との結合実験からも分かるように本例では明らかに変異受容体は膜上に発現しており，GHBP 高値となる機序は過去の報告例とは異なると考えられた。GHBP 高値となる機序の説明として，GHR-277がインターナリゼーションされにくいことが原因の一つであると考えた。GHR のインターナリゼーションには細胞内領域の box 2 近傍の領域が重要であることが知られている。本症例はこの領域を欠いているためインターナリゼーションされにくいことが予想された。インターナリゼーションされにくいために膜上に多く存在する GHR-277から蛋白限定分解により多くの GHBP が産生されると考えられた。実際 GHR-277発現細胞の方が GHR-fl 発現細胞よりも培養上清中の GHBP 濃度は高く，インターナリゼーションも明らかに障害されていることが本実験で証明された。その他の機序としては，GHR-277は細胞内領域を欠くために立体構造が変化し，GHBP を産生するプロテアーゼに対する感受性が上昇した可能性も考えられるが，現在のところ証拠はない。

本症例のもう一つの興味深い特徴は，ヘテロ接合体変異にもかかわらず GH 不応症および低身長をきたした点である。実際に GHR-277がドミナントネガティブ効果を発揮することを証明した。GH のシグナル伝達においては一つの GH 分子が二つの GHR を重合化させ，JAK 2 (janus kinase 2) と呼ばれるチロシンキナーゼが GHR の box 1 領域に結合し活性化されることが最初のステップであるが，GHR-277は box 1 領域も含め細胞内の大部分を欠くために JAK 2 が結合できず，シグナルを伝えられないことが予想された。さらにヘテロ接合体変異のために GHR のダイマー形成において，GHR-fl 同士ホモダイマー，GHR-277同士のホモダイマーおよび GHR-fl と GHR-277のヘテロダイマー

という3種類のダイマーが形成されることが予想される。GHR-277はGHR-flとヘテロダイマーを形成することにより、さらに膜上に多くとどまるという性質から、リガンドであるGHとの結合においてGHR-flと競合することにより、GHシグナル伝達においてドミナントネガティブ効果を発揮すると考察した。

以上、我々は新しい発症機序によるGH不応症例の存在を明らかにした。

論文審査の結果の要旨

成長ホルモン受容体（GHR）異常による低身長症は、1966年にLaronらがはじめて記載したことによりラロン症候群としてよく知られている。その診断基準に常染色体劣性遺伝疾患であることが盛り込まれているが、GHR遺伝子がクローニングされて以来その遺伝子異常について解析が進み、GHR異常症には古典的なラロン症候群の規準を満たさない種々のタイプが存在することが分かり、それらを包括してGH insensitivity syndrome (GHIS) と呼ぶようになってきた。申請者らは、低身長と部分的GH不応症を示し血中GH結合蛋白（GHBP）高値を示す日本人の兄妹例を解析し、GHR遺伝子のイントロン9のドナースプライスサイトに新奇なヘテロ接合体変異を見出し報告した。この変異により、一方のアリルでエクソン9が完全にスキップされたエクソン8とエクソン10が結合するmRNAが作られることになり、結果としてエクソン10の読み取りの早い時期にstop codonが出現し、わずか277アミノ酸から成るtruncate型GHR（GHR-277）が産生されることが考えられる。GHR-277は正常GHR（アミノ酸数620）とくらべて、細胞外ドメインおよび膜貫通領域は同じであるが、細胞内ドメインに7個のアミノ酸しかなくGHシグナル伝達に重要なbox1やbox2も欠落する。しかし、ヘテロ接合体変異にもかかわらず低身長を来した機序、およびGHRの細胞外ドメインと構造が同一であるGHBPが血中高値を示す機序を明らかにするため、申請者はGHR-277を人工的に強制発現させた細胞を用いて機能実験を行った。野生型GHR（GHR-fl）発現ベクターの作成には、GHR-fl cDNAを含んだpUC119ベクター（pUC119/GHR-fl）から、BamH1-Sph1制限酵素サイトを利用してGHR-fl cDNAを切り出し、発現ベクターpcDNA1に組み込んだ。GHR-277発現ベクターの作成には、まず患児のリンパ球から抽出したRNAを鋳型にRT-PCR法で増幅したエクソン7からエクソン10を含む断片をpT7 BlueTベクターに導入し、NcoI-EcoR1制限酵素サイトを利用して、pUC119/GHR-flのエクソン7-エクソン10断片と入れ替えた。次にBamH1-Sph1制限酵素サイトを利用してGHR-277 cDNAを切り出し、発現ベクターpcDNA1に組み込んだ。それぞれの発現ベクターをリポフェクション法でCOS-7およびCHO細胞へトランスフェクトした。COS-7細胞に強制発現後、¹²⁵I標識ヒトGHと種々の濃度の非標識ヒトGHを培養液中に加えヒトGH結合能を調べたところSactchard解析により、結合親和性においてGHR-flで $K_a=0.4 \times 10^9 M^{-10}$ 、GHR-277で $K_a=0.6 \times 10^9 M^{-10}$ と約1.5倍、GHR-277の方が高親和性を示した。一方、結合サイトに関してはGHR-flで約70fmol/10⁶細胞数、GHR-277で約147fmol/10⁶細胞数と、GHR-277の方が約2倍多かった。また、培養上清中のGHBP濃度を測定したところGHR-277発現細胞の培養上清中濃度はGHR-fl発現細胞のそれより約3倍高値を示した。さらに培養液中へ加えた¹²⁵I標識ヒトGHの細胞へのインターナリゼーションを調べるとGHR-fl発現細胞に比べてGHR-277発現細胞では明らかに減弱していた。次にGHシグナル伝達の程度をSTAT5bのチロシンリン酸化で評価した。CHO細胞に、一定量のGHR-fl発現ベクターと、様々な量のGHR-277発現ベクターを同時にトランスフェクションしGHR-flとGHR-277を共発現させ、100ng/mlのhGHで15分間刺激後細胞を溶解しSTAT5b抗体で免疫沈降、リン酸化チロシン抗

体で Western blotting を行ったところ STAT5b のチロシンリン酸化は、トランスフェクションした GHR-277 発現ベクター量に対し容量依存性に抑制された。すなわち GHR-277 は GH シグナル伝達に対し、ドミナントネガティブ効果をおよぼすことが示唆された。以上の成績より、本症例の特徴の 1 つである血中 GHBP 高値になる機序として GHR-277 がインターナリゼーションされにくいことが原因の一つであると考えた。GHR のインターナリゼーションには細胞内領域の box 2 近傍の領域が重要であることが知られている。本症例はこの領域を欠いているためインターナリゼーションされにくいことが予想された。インターナリゼーションされにくいために膜上に多く存在する GHR-277 から蛋白限定分解により多くの GHBP が産生されると考えられた。実際 GHR-277 発現細胞の方が GHR- β 1 発現細胞よりも培養上清中の GHBP 濃度は高く、インターナリゼーションも明らかに障害されていることが本実験で証明された。本症例のもう一つの興味深い特徴は、ヘテロ接合体変異にもかかわらず GH 不応症および低身長をきたした点である。GH のシグナル伝達においては一つの GH 分子が二つの GHR を重合させ、JAK 2 (janus kinase 2) と呼ばれるチロシンキナーゼが GHR の box 1 領域に結合されることが活性化されることが最初のステップであるが、GHR-277 は box 1 領域も含め細胞内の大部分を欠くために JAK 2 が結合できず、シグナルを伝えられないことが予想された。さらに、GHR-277 は前述のようにインターナリゼーションが起これば多く膜面に浮遊し、GHR- β 1 よりもより多くのリガンド (GH) を結合する。すなわち GHR- β 1 に結合する GH 数を相対的に減少する可能性が推測され、これらの現象の結果として GH シグナル伝達においてドミナントネガティブ効果を発揮すると考えられた。

以上、本研究は、低身長児から新しく同定された truncate 型 GH 受容体について、その作用機作を研究したものであるが、従来知られなかった GH シグナル伝達調節機構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。