Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

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（いいだ けいじ）　（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3.0μgのGHR-flあるいはGHR－277発現ベクターと2.0μgのpSVβ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中に加え，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 tranaducer 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（3.0μg）と，様々な量のGHR－277発現ベクター（0.3，1.5，3.0μg）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Ka＝0.4x10^{9}M^{-1}，GHR－277でKa＝0.61x10^{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い出した。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れず，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は似ているが，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box２近旁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，JAK２（janus kinase ２）と呼ばれるチロシンキナーゼがGHRのbox１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box１領域も含め細胞内の大部分を欠くためにJAK２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同士のホモダイマー，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）が産生されると考えられる。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シクナル伝達に重要な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pT７BlueT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，^{125}I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Ka＝$0.4X10^{9}M^{-10}$，GHR－277でKa＝$0.6X10^{9}M^{-10}$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／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。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^{125}I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–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。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らず多く膜面に浮遊し，GHR–flよりもより多くのリガンド（GH）を結合する。すなわちGHR–fl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。