Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Human parathyroid hormone related protein fragment-(1-34) had glucose-6-phosphate dehydrogenase activity on distal convoluted tubules in cytochemical bioassay

中井，真通

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1990-04-11
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
乙1422
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001422

※ 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。

〔 175 〕

氏名・(本籍)	中井真道(なかいまさみち) (兵庫県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博ろ第1161号
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位授与の日付	平成2年4月11日
学位論文題目	HUMAN PARATHYROID HORMONE RELATED PROTEIN FRAGMENT-(1-34) HAD GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE ACTIVITY ON DISTAL CONVOLUTED TUBULES IN CYTOCHEMICAL BIOASSAY (ヒト副甲状腺ホルモン関連蛋白(hPTHrP)-(1-34)はサイトケミカルバイオアッセイにおいて遠位尿細管のglucose-6-phosphate dehydrogenase刺激活性を持つ)
審査委員	主査 教授 藤田拓男 教授 守殿貞夫 教授 伊東宏

論文内容の要旨

<要 約>

近年ヒトPTH連蛋白の一次構造がBEN細胞由来のcDNAを用いて決定された。私共はこれをもとにヒトPTH連蛋白(hPTHrP)-(1-34)を合成し，hPTHrP-(1-34)が腎遠位尿細管においてglucose-6-phosphte dehydrogenase(G6PD)活性を示すか否かをサイトケミカルバイオアッセイ(CBA)を用いて検討した。hPTHrP-(1-34)は10^{-16}-10^{-14}Mの濃度でG-6-PD活性を指数直線的に増加させ，その活性はhPTH-(1-84)と同一であった。以上よりhPTHrP-(1-34)はhPTHと同様に遠位尿細管に作用することが明かとなった。

<緒 言>

悪性疾患に屡々高カルシウム血症が合併することが知られている。この原因は大きく二つに分けられ，一つは局所的に作用する物質によるもの，もう一つは腫瘍細胞から分泌され血行を介して骨吸収活性を示す物質によるもので，後者の病態を悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症(Humoral Hypercalcemia of Malignacy, HHM)とよぶ。HHMでは原発性副甲状腺機能亢進症とにた病態(高カルシウム血症，低リン血症，リン利尿，尿中cAMP排泄の亢進，骨吸収促進等)を示すことが知られているが(1-4)，ラジオイムノアッセイを用いた血中のPTH値は正常から低値であり(3)，

腫瘍細胞中にもPTHのmRNAは検出されていない（5）。近年このHHMの原因物質としてPT-HrP（6，7，8），TGFα（9，10），IL-1α（11）等が報告され，更に1987年Suva 等はBEN細胞由来のcDNAを用いてhPTHrPの一次構造を決定した（12）。彼等の報告によるとhPTHrpは141個のアミノ酸から成り，N末端の最初の13個のアミノ酸配列がhPTHと類似していた。更に合成したhPTHrP-（1-34）は骨細胞で骨吸収活性をもち，骨細胞でcAMP産生を刺激し，甲状腺摘出ラットで尿中cAMP排泄を増加さすことが報告されている（13-16)。しかしながらPTHrPが腎臓遠位尿細管細胞に作用するか否かについては未だ報告が無い。

ところでサイトケミカルバイオアッセイ（CBA）は以前よりラジオイムノアッセイに比し100-1000倍高感度なbio-PTH測定法としてしられており（17-19），モルモット腎臓遠位尿細管細胞のG-6-PD活性を指標としている。このアッセイはまた血清中及び腫瘍抽出物のPTH様物質の活性測定にも用いられてきた（6，20)。

そこで私共はこのサイトケミカルバイオアッセイを用いて，合成したhPTHrP-（1-34）がモルモット腎臓遠位尿細管G-6-PD活性を刺激するか否かをhPTH-（1-84）と比較検討した。

<方　法>

試薬：Trowell's T8液体培地はFlow Laboratories Co.（Scotland, UK）より購入した。Glusose-6-P, NADP, phenazine methosulfate はSigma Chemjcals Co.（St. Louis, MO）より購入した。Neotetrazolium chloride はServa（Heidelberg, FRG）より購入した。hPTHrp-（1-84）はペプチド研究所（Osaka, Japan）から購入した。hPTHrP-（1-34）は，Suva 等の報哲（12）に基づき固相法にて合成し（21），薄相クロマトグラフィー及びHPLCにて精製されていることを確認した。

動物：離乳直後のHartley Albino 種雌モルモット（静岡実験動物）をビタミンD欠飼料（オリエンタル酵母GC-4）にて6週間以上飼育したものを用いた。

サイトケミカルバイオアッセイ：サイトケミカルバイオアッセイは，坂口等の方法（17）に従った。簡単に述べると，モルモットを断頭した後腎臓を摘出し被膜を取除き上極と下極を各々4ブロックに切り，次に各ブロックをtrowell's T8液体培地にて37℃ O_2 95%，CO_2 5%の条件下で5時間培養した。更にメディウムで一度洗った後既知濃度の種々の試薬を含んだメディウムと6分間反応させ，-80℃のn-hexane に浸して反応を停止させた。各ブロックをクリオスタットで16μにスライスしサイトケミカルメソッドを用いてG-6-PD活性測定した（17-19)。即ちスライスした切片と5 mM G-6-P, 3 mM NADP, 0.67 mM phenazine methosulfate, 5 mM neoterazo-lium, 20mM KCN, 30% polyvinyl alcohol を含んだ50mM glycylglycine バッファーとを37℃ 10.5分間反応させた。反応により遠位尿細管細胞内に染めだされた formazan をNikon-Vickers M85 マイクロデンシトメーターを用い585nmの波長で測定した。G-6-PD活性は，mean integrated extinction（MIE）x100としてあらわした。統計解枯：結果はmeanS.E.にて示した。有意差検定にはDuncan's new multiple range test をもちいた。

＜結果及び考察＞

図１にhPTH-（１-84）及びhPTHrP-（１-34）によるモルモット腎遠位尿細管細胞G-６-PD刺激活性を示す。hPTHrP-（１-34）は10^{-16}-10^{-14}Mの濃度で指数直線的にG-６-PD活性を刺激した。しかもその活性は等モルトでhPTH-（１-84）と同一であった。同一実験を三回おこない再現性を確認した。この結果はhPTHrPがモルモット腎臓遠位尿細管にhPTHと同様に働くことを初めて示したものである。

hPTHrPの作用に関し現在までラット骨肉腫細胞（UMR106），ウサギ腎皮質ホモジェネート，ウサギ腎近位尿細管でAdenylate cyclase 刺激活性をもつこと（15）や，hPTHrP-（１-34）NH_2 がブタ腎皮質細胞膜でPTH受容体と結合しAdenylate cyclase 刺激活性を示すこと（13）がしられている。これらのことからPTHrPはPTH受容体と結合してcAMP系を活性化していると考えられる。サイトケミカルバイオアッセイではPTHとcAMP系と結合したPTH受容体と結合してG-６-PD活性を刺激しているとかんがえられていることから（６），hPTHrP-（１-34）もPTH受容体を介してG-６-PD活性を刺激していると考えられた。

今回の実験はまた，サイトケミカルバイオアッセイが血清中のhPTHrPの測定にも用いうることを示している。サイトケミカルバイオアッセイは血清中のPTHとPTHrPを区別し得ない為に血清のG-６-PD刺激活性は必ずしも血中PTHrP濃度を反映しないが，PTHのラジオイムノアッセイと組合せることにより，血中のPTH値が低いようなPTHrP産気腫瘍の発見や経過観察に極めて有用であると考えられる。

今回私共はhPTHrP-（１-34）がモルモット腎遠位尿細管においてG-６-PD刺激活性を示し，しかもhPTH-（１-84）と等モルで同一活性であることを報告した。

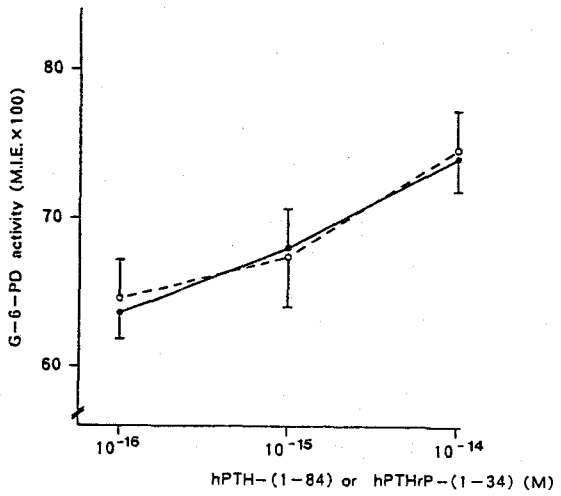

Figure. 1　Compaison of the effects of dilutions of hPTH-（１-84）and hPTHrP-（１-84）on G６PD activity in distal convoluted tubules of guinea pig.

Each points represent the mean ± S.E. of 20 measurements from duplicated secitions. No significant difference exists betweeen hPTH- (1-84) and hPTHrP- (1-34) at the same concentrations.

(•——•) hPTH- (1-84)

(•·····•) hPTHrp- (1-34)

References

1. Sherwood, L.M., O'Riordan J.L. H., Aurbach, G.D., and Potts, J.T., Jr. (1967) J. Clin. Endocrinol. Metab. 27, 140-146
2. Powell, D., Singer, F.R., Murrary, T.M., Minkin, C., and Potts, J.T.,
3. Mundy, G.R., and Martin, T.J., (1982) Metabolism 31, 1274-1277.
4. Mundy, G.R., Ibbotson, K.J., D'Souza, S.M., Simpson, E.L., Jacobs, J.W., and Martin, T.J., (1984) N. Engl.J. Med. 310, 1718-1727.
5. Simpson, E.L., Mundy, G.R., D'Souza, S.M., Ibbotson, K.G., Beckman, R., Kronenberg, H., and Jakobs., W. (1980) N. Engl. J. Med. 309, 325-332.
6. Goltzman, D., Stewart, A.F., and Broadus, A.E. (1981) J. Clin. Endocrinol Metab. 53, 899-904.
7. Rodan, S.B., Insogna, K.L., Vigney, A.M.C., Stewart, A.F., Broadus, A.E., D'Souza, S.M., Bertolini, D.R., Mundy, G.R., and Rodan, G.A. (1983) J. Clin. Invest. 7,, 1511-1515.
8. Strewler, G.J., Williams, R.D., and Nissenson, R.A. (1983) J. Clin. Invest. 71, 769-774.
9. Ibbotson, K.J., Twardzik, D.R., D'Souza, S.M., Hargreaves, W.R., Todaro, G.J., and Mundy, G.R. (1985) Science 228, 1007-1009.
10 Ibbotson, K.J., Harrod, K.J., Gowen, M., D'souza, S., Smith, D.D., Wrinkler, M.E., Derynck, R., and Munday, G.R. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 2228-2232.
11. Sato, K., Fujii, Y., Kasono, K., Saji, M.Tsushima, T., and Shizuma, K. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 138, 618-624.
12. Suva, L.J., Winslow, G.A., Wettenhall, R.E.H., Hammonds, R.J., Moseley, J.M., Diefenbach-Jagger, H., Rodda, C.P., Kemp, B.E., Rodorigues, H., Chen, E.Y., Hudson, P.J., Martin, T.J., and Wood, W.I. (1987) Science 237, 893-896.
13. Horiuchi, N., Caufield, M.P., Fisher, J.E., Goldman, M.E., McKee,

R.L., Reagan, J.E., Levy, J.J., Nutt, RF., Rodan, S.B., Schfield, T.L., Clemens, T.L., and Rosenblatt, M. (1987) Science 238, 1566-1568.

14. Kemp, B.E., Moseley, J.M., Rodda, C.P., Ebeling, P.R., Wettenhall, R. E.H., Stapleton, D., Diefenbach-J.H., Ure, F., Michelangeli, V.P., Simmons, H.A., Raisz, L.G., and Martin, T.J. (1987) Science 238, 1568-1570.
15. Rodan, S.B., Noda, M., Wesolowski, G., Rosenblatt, M., and Rodan, G.A. (1988) J. Clin. Invest. 81, 924-927.
16. Yates, A.J.P., Gutierrez, G.E., Smolens, P. Travis, P.S., Katz, M. S., Aufdemorte, T.B., Boyce, B.F., Hymer, T.K., Poser, J.W., and Mundy, G.R. (1988) J. Clin Invest. 81, 932-938.
17. Sakaguchi, K., Fukase, M., Kobayashi, I., and Fujita, T. (1987) J. Bone Mineral Res. 1, 259-265.
18. Chayen, J. (1980) The cytochemical biossays of parathyroid hormones. Springer, New York.
19. Chayen, J., Bitensky, L., and Butcher, R.G. (1973) Practical histochemistry. Willey, New York.
20. Rabbani, S.A., Mitchell, J., Roy, D.R., Kremer, R., Bennett, H.P., and Goltzman, D. (1986) Endocrinology 118, 1200-1210.
21. Merrifield, R.B., (1969) Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem. 32, 221-296.
22. Duncan, D.B. (1955) Biometrics 11, 1.

論文審査の結果の要旨

血清カルシウムはもっのも精密に維持されている生物学的恒教とされているが，高カルシウム血症が稀におこり，その原因の中で，もっとも多いのが悪性腫瘍であり，次に原発性副甲状腺機能亢進症である。悪性腫瘍の高カルシウム血症の中には骨転移等による局所的原因によるものの他に，腫瘍から体液中にホルモン様の物質が放出され，これによって骨吸収が促進されることによるものがわかった。この悪性腫瘍体液性高カルシウム血症（Humoral Hypercalcemia of Malignancy, HHM）ことに扁平上皮癌に多く局所性高カルシウム血症とことなり，低燐血症を合併し原発性副甲状腺機能亢進症と似た点があることから偽性副甲状腺機能亢進症ともいわれ，腎におけるサイクリックAMPの産生と燐再吸収の抑制という副甲状腺機能亢進症と共通の現象もある反面，腎での活性型ビタミンDの合成はむしろ抑制し，又代謝性アシドーシスをおこさずむしろアルカローシスをおこす等明らかにことなる面がある。

最近人肺癌細胞の培養液から悪性腫瘍体液性高カルシウム血症の原因となると考えられる蛋白がクローニングされ161ケのアミノ酸配列が決定しN末端の十数ケのアミノ酸が副甲状腺ホルモンと相同

を示し，又副甲状腺ホルモンと同じ受容体と結合してサイクリックAMP産生の増加や骨吸収の亢進をおこすことから副甲状腺ホルモン関連蛋白PTHrPと名づけられた。

副甲状腺ホルモンのもっとも鋭敏な生物学的検定法として細胞化学検定がありモルモット腎スライスを用い遠位尿細管のグルコース6燐酸脱水素酵素活性を増加させる性質にもとづくものであるが本研究者はこの手法をPTHrPに応用しPTHと比較した。

ハートレー系雌モルモットにビタミンD欠乏會を与え，腎を摘出，スライスを作製してトロウエルT8培養液で37℃95%酸素5%炭酸ガス存在下で5時間培養し，一旦洗浄の後，検体を含む培養液中に6分間放置，n-ヘキセン中にうつし−80℃に冷却した。16μmの薄片を作製後，5mMのグルコース燐酸，3mMのNADP，0.67mMのフェナジン，メトサルフェート，5mMの塩化ネオテトラゾリウム，10mMのシアンカリウム，及び50mMグリシルグリシン緩衝液中のポリビニールアルコール中に10分間放置し遠位尿細管中に形成されたフォルマザンをニコン，ビッカースM85を走査光電計測顕微鏡で585nmの波長の吸収によって測定し，グルコール6燐酸脱水素酵素の活性を判定した。ヒトPTH1-84とヒトPTH2Pの活性部分であるヒトPTHrP1-34は10^{-10}から10^{-14}Mの範囲で全く区別し難い活性を示した。現在までに骨芽細胞や近位尿細管細胞に加え，遠位尿細管でもPTHrPはPTHと同じ作用をもち恐らく同じ受容体を介してその作用を発現すると考えられた。

以上本研究者は従来殆ど行なわれなかった副甲状腺ホルモン連蛋白の細胞化学生物検定法につきて新しい知見を得たものであり，価値ある集積と考えられる。よって，本研究者は，医学博士の学位を得る資格があると考えられる。