Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Lactogenic hormone responsive element reporter gene activation assay for human growth hormone

坂谷，知泰

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2003-07-09

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
乙2702

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002702

※ 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。

【１７６】

氏　名　・（本　籍）　坂谷　知泰　　（　兵庫県　）

博士の専攻分野の名称　博士（医学）

学　位　記　番　号　　博ろ第1884号

学位授与の　要　件　　学位規則第４条第２項該当

学位授与の　日　付　　平成１５年７月９日

【 学位論文題目 】

Lactogenic hormone responsive element reporter gene activation assay for human growth hormone
(ヒト成長ホルモンの LHRE・レポーター遺伝子転写活性化アッセイ)

審　査　委　員

主　査　教　授　千原　和夫

教　授　松尾　雅文

教　授　馬場　久光

緒言

成長障害の原因の一部に、GH分子の構造異常である生物学的不活性型GHが認められている。我々は、Kowarski's syndromeとして報告された不活性型GHについて、GH-1遺伝子変異による不活性型(D112G)、あるいはドミナント・ネガティブ型(R77C)GH分子症例を既に明らかにした。不活性型変異GH症例では、血清GHの免疫活性と生物活性に乖離が見られており、正確な生物活性の検定が重要である。従来のNb2、Ba/F3-hGHRといった細胞増殖バイオアッセイ系が有用であるが、今回さらに、GHターゲット遺伝子の内、Stat 5結合配列を有するGH反応性プロモーターであるLHRE並びにGH受容体をCHO細胞にトランスフェクションし、GHターゲット遺伝子による転写活性を利用したバイオアッセイを構築した。血清GHの生物活性は、そのGH情報伝達能をGH受容体、LHREを介するStat 5依存性の転写活性化能として、ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子を用いてデュアル・ルシフェラーゼアッセイで測定した。

目的

ヒトGH受容体cDNA,Lactogenic hormone responsive element(LHRE)/ルシフェラーゼフュージョン遺伝子を培養CHO細胞に共発現させ、ルシフェラーゼ活性を指標に、高感度で特異的な新しいGHバイオアッセイ系を確立する事が本研究の目的である。又、対照血清GH並びに既報のドミナント・ネガティブ型GH分子(R77C)症例の血清GHの生物活性を、本バイオアッセイ系で測定し、その免疫活性と比較・検討した。

対象

血清サンプルは説明と同意の後に、GHRH負荷試験後の先端巨大症あるいはGH-1遺伝子のコドン77でのミスセンス変異(Arg→Cys)を有する低身長男児から得た。

野生型ヒトGH発現プラスミドは、GH産生下垂体腺腫細胞cDNAライブラリーのPCR断片を、変異型ヒトGH(R77C)発現プラスミドは、患児のGH-1遺伝子エクソン4のPCR断片を同じく、pGEX-KGプラスミドベクターのBamH1-EcoR1サイトへサブクローニングし、GSTフュージョン蛋白として用いた。

方法

リポフェクション法を用いたトランスフェクションにより、pcDNA3.1-hGH受容体、LHRE/ルシフェラーゼレポーター遺伝子を培養CHO細胞に共発現させ、内因性コントロールとしてpRL-SV40を用いてトランスフェクション効率を補正した。
血清GH及び野性型、変異型GH発現・GST蛋白の生物活性は、デュアル・ルシフェラーゼアッセイで測定し、pRL-SV40のレニラ・ルシフェラーゼ活性を用いて補正後、コントロールにより標準化された相対的ルシフェラーゼ活性から求められ、更にリコンビナントGHによる標準曲線上で、相対的ルシフェラーゼ活性と同等なGH濃度(ng/dl)として算出した。
結果は、平均値±平均値±標準誤差で表示し、ノンパラメトリック・ウィルコクソン・ランク検定により有意差($P<0.05$)を算出した。

結果

1)ヒトGH受容体をトランスフェクトさせたCHO細胞におけるLHRE活性化能
Stat 5結合配列(LHRE)を上流に組み込んだルシフェラーゼ・レポーター遺伝子を用いた、Stat 5依存性の転写活性化能は、リコンビナントGH、血清GHのいずれも、各濃度(1～100ng/ml)で、ほぼ同等に、コントロールと比較して有意に発現が上昇していた。
GH受容体を介するStat 5依存性の転写活性化能は、血清中でGH以外のサイトカインやプロラクチンetcにより影響を受ける可能性が有り、抗GH抗体を用いて、血清によるLHRE転写活性への影響を検討した。血清各濃度(5,20,100ng/ml)におけるLHRE転写活性は、$1/10^3$濃度の抗GH抗体により完全

に抑制された。更に、300ng/ml のヒトプロラクチン、インスリン、T3、デキサメサゾンの LHRE 転写活性化能への影響を検討したが、いずれも影響は見られなかった。
一方、血清中 GH 結合蛋白(GHBP)は、GH 受容体を介する GH 作用を修飾するとされているが、GH による LHRE 活性化への GHBP 効果を検討すると、20ng/ml では影響は見られず、100ng/ml では、GH 刺激 LHRE 活性を減弱させた。

2)変異型 GH(R77C)の生物活性
我々の LHRE 転写系システムが、血清 GH 生物活性を評価可能か否か、確定する上で、変異型 GH 患者血清の生物活性を、正常患者血清と比較した。
リコンビナント GH による標準曲線上で、GH は LHRE 転写活性を用量依存性に増加させた(GH:1ng/ml;1.23,5ng/ml;1.39,10ng/ml;1.43)が、変異型 GH 患者血清では、むしろ低値を示した(GH:4.2ng/ml;0.59,8.2ng/ml;0.72)。一方、末端肥大症患者血清では、その免疫活性とほぼ同等の生物活性であった(GH:4.4ng/ml;1.36,8.9ng/ml;1.46)。
野性型・変異型ヒト GH cDNA　発現 GST フュージョン蛋白の LHRE 転写活性化能を各々単独刺激と、共刺激で検討した。
野性型ヒト GH による LHRE 活性は、50ng/ml で 2.1±0.1,100ng/ml で 2.6±0.1 であったが、変異型では、50ng/ml で 1.2±0.1,100ng/ml で 1.5±0.1 と、野性型の各々、59%,57%活性を示した。変異型ヒト GH が野性型ヒト GH を LHRE 転写活性において、ドミナント-ネガティブに抑制し得るか否か、共刺激により検討すると、野性型単独に比し、50ng/ml で 71%,100ng/ml で 68%を示した。
変異型 GH は、それ自身、LHRE 転写活性化能を十分発現し得ないのみならず、野性型 GH の LHRE 活性をドミナント-ネガティブに阻害し得た。

考察

各種 GH 刺激による Stat5 依存性 LHRE 転写活性により、GH 生物活性の検定を行った。血清 GH は、リコンビナント GH とほぼ同等に、各濃度で、コントロールと比較し、LHRE 活性を有意に増加させており、この系において GH 生物活性は、1ng/ml の低値まで検定可と示唆された。抗 GH 抗体を用いた血清による LHRE 転写活性への影響や、ヒトプロラクチン、インスリン、T3,デキサメサゾンの LHRE 活性への影響から、このアッセイ系は、GH 特異的であると考えられた。
LHRE 転写系の再現性を、各アッセイ間とアッセイ内の CV(coefficient variation)でみると、各々、8.3%,8.2%であり、良好な再現性で検定可であると考えられた。
我々は、既に、GH-1 遺伝子のヘテロ接合体ミスセンス変異症例(R77C)を報告したが、GH シグナル伝達系におけるチロシンリン酸化能と同様、本転写アッセイ系においても、ドミナント-ネガティブ型の転写活性を示した。
血清ヒト GH に対し、高感度で特異的な、新しい、GH ターゲット遺伝子である LHRE を組み込んだルシフェラーゼ・レポーター転写系バイオアッセイを構築した。LHRE レポーターアッセイは、通常の細胞増殖を指標とする GH バイオアッセイ法に加えて、細胞機能選択的な新たな GH バイオアッセイ法として有用と考えられる。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第1886号	氏　名	坂谷知泰
論文題目	Lactogenic hormone responsive element reporter gene activation assay for human growth hormone （ヒト成長ホルモンの LHRE・レポーター遺伝子転写活性化アッセイ）		
審査委員	主　査　千原和夫 副　査　松尾雅文 副　査　馬場久光		
審査終了日	平成 15年 6月 30日		

（要旨は1，０００字～２，０００字程度）

小児の成長障害をきたす原因として様々な基礎疾患が知られているが、内分泌疾患の中で頻度が高いものは成長ホルモン(GH)欠乏によるものである。GH 分泌不全性低身長症は治療が可能であるため、その診断を正確に行い、患児を見つけだすことは内分泌専門医の責務である。GH 分泌不全性低身長症の診断は、低身長や骨年齢の遅れなど身体所見に加えて、血中 IGF-I 低値、２種類以上の GH 分泌刺激試験に対する血中ＧＨの低反応によってなされる。多くの GH 分泌不全性低身長症の患児はこの診断基準で正確に診断されるが、少数例の患児で、臨床症候、血中 IGF-I 低値は GH 分泌不全性低身長症の基準を満たすにもかかわらず血中ＧＨ値はむしろ高く、ＧＨ分泌刺激試験では過剰反応を示す例が有ることが知られていた。このような症例ではＧＨ分子に異常がありＧＨの生物活性が低い可能性が Kowarski ら(1978 年)によって指摘されていた。1996 年と 1997 年に申請者達は Kowarski らが指摘した特徴を満たす日本人の患児において GH-1 遺伝子変異による生物学的不活性型ＧＨ（Dl12G）およびドミナント・ネガティブ型ＧＨ（R77C）による症例を世界に先駆けて報告した。この研究の過程で気付いたことは,このような症例を見出すためには GH 測定に一般的に用いられているラジオイムノアッセイ(RIA)やイムノラジオメトリックアッセイ(IRMA)はこのような異常ＧＨ分子を見つけることは難しいという点である。生物活性に問題がある異常ＧＨ分子を見つけるには簡便で且つ精度の高いＧＨの生物活性測定系がひつようである。申請者は、培養 CHO 細胞を用いて、その細胞にヒト GH 受容体 cDNA, Lactogenic hormone responsive element (LHRE) ／luciferase 結合遺伝子を移入することによって共発現させ、luciferase 活性を指標に、高感度で特異的な新しい GH バイオアッセイ系を確立することを試みた。LHRE は β-casein 遺伝子のプロモーター領域から得られた配列で Stat5 の結合部位を持つ。CHO 細胞には内因性 Jak, Stat5 が存在するので、ＧＨが受容体に結合して活性化されれば Jak-Stat5 系の賦活化の結果 luciferase 活性で GH シグナルの強さを定量出来る。培養ＣHO 細胞にリポフェクション法を用いて pcDNA 3. 1- hGH 受容体、LHRE ／luciferase 結合遺伝子を移入し共発現させた。内因性コントロールとして pRL-

SV40を用いて移入効率を補正した。変異型ヒトGH（R77C）発現プラスミドは、患児のGH-1遺伝子エクソン4のPCR断片を同じく、PGEX-KGプラスミドベクターのBam-EcoRIサイトへサブクローニングし、GST結合蛋白として作製した。リコンビナントGH，血清GHをこのGHバイオアッセイ系にかけたところ，GH濃度（1～100ng／ml）で用量反応性にluciferase活性の上昇が見られた。一方、血清GH（5，20，100ng／ml）添加によるluciferase活性上昇は抗GH抗体(1:1000)の同時投与によって完全に消失した。更に、ヒトプロラクチン、インスリン、T3、デキサメサゾン投与はこのGHバイオアッセイ系には影響は与えずGHに特異的であった。一方、GH結合蛋白（GHBP）を添加すると20ng／mlでは影響は見られなかったが、100ng／mlでは、GH刺激活性を減弱させた．末端肥大症患者血清GHを、IRMAとこのGHバイオアッセイ系で比較するとほぼ同等測定値が得られた。変異型GH患者血清ではIRMAとGHバイオアッセイ系の測定値に乖離が見られ、GHバイオアッセイ系では低値を示した。野性型・変異型GHを各々単独刺激と共刺激で検討したところ、野性型GH刺激では用量反応性にLHRE活性は増加したが、変異型では反応は見られず、また共刺激では野性型単独に比し有意に抑制した。申請者達が確立したGHバイオアッセイ系において、血清GH添加はリコンビナントGHとほぼ同等に様々な濃度でLHRE活性を有意に増加させておりGH生物活性は1ng／mlの低値まで検定可能であった。各アッセイ間とアッセイ内のCV (coefficient variation)は、各々8．3%，8．2%であり良好な再現性を示した。

以上、本研究は、生物学的不活性型GHによる低身長症の診断法について、実用的なGHバイオアッセイ系を作製することを研究したものであるが、CHO細胞にGH受容体遺伝子とStat5結合配列LHREを連結させたルシフェラーゼ・レポーター遺伝子を移入した新しいGHバイオアッセイを初めて確立し、その有用性について詳細に検討した価値ある知見の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。