



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、平均値か平均値±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。

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 (D112G) 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・レポーター遺伝子に移入した新しい 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。