

論文の内容の要旨

論文題目 成長ホルモンの分泌及び転写の調節機構

指導教官 藤田 敏郎 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成14年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 冲永 寛子

要旨

[背景および目的]

先端巨大症はGHの過剰分泌によっておこる症候群であり、約95%でGH産生下垂体腺腫が原因となっている。GH産生下垂体腺腫の主なGH分泌刺激であるGHRHについては電位依存性Ca²⁺チャンネルからのCa²⁺流入による[Ca²⁺]_iの上昇がGH分泌に重要であることが知られている。一方で先端巨大症患者の約50~80%でTRH刺激試験によるGHの奇異性分泌を認め、GH産生下垂体腺腫の術後の残存病変の有無の確認や摘出術後の腺腫の再発の検出にも用いられる。TRHの奇異性反応を示すGH産生腺腫はTRH受容体を発現することが知られているが、TRHの作用機序は十分に解明されていない。そこで本研究において、ヒトのGH産生下垂体腺腫におけるTRHの作用機序を[Ca²⁺]_iとstatic incubation assayによるGH濃度測定を用いて解析を行った。次に機能的なTRH受容体を有するGH₃細胞に、蛍光物質であるEYFPとラットGHの融合蛋白を発現させ、分泌機構の可視化を行い解析した。更にGH分泌を刺激する因子は同時に他方でGHの転写合成をどのように誘導するか検討するために、同じGH₃細胞にラットGh1遺伝子のプロモーターをluciferase遺伝子に融合したプラスミドを一過性に導入し、luciferase assayによりGh1遺伝子がどのように活性化されるかを検討した。

[ヒト GH 産生下垂体腺腫細胞における TRH の奇異性反応の解析]

TRH 奇異性反応を認めた 3 例のヒト GH 下垂体腺腫を初代培養し、fura2 を用いて $[Ca^{2+}]_i$ を行った。TRH 投与によって腺腫 1,2 では $[Ca^{2+}]_i$ の反応は 2 相性となり、ピークを持つ一過性の上昇(第 1 相)と、それに引き続く持続性の上昇(第 2 相)であった。この第 2 相の持続性の反応は L 型 Ca^{2+} チャンネルブロッカーである nitrendipine により消失したため、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが関与していると思われた。また腺腫 3 では第 1 相の上昇はなく、持続性の第 2 相の上昇のみであり、これも nitrendipine により消失した。腺腫 1,2 で認められた第 1 相の Ca^{2+} 上昇の反応は IP_3 を介する細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出の阻害剤である xestospongine C による前処理で消失した。さらに xestospongine C 前処理後に nitrendipine 存在下に TRH を投与すると第 1 相も第 2 相共に消失した。PKC 阻害薬の処理によっても第 2 相の反応が消失するので、PKC を介することが推測された。腺腫 3 の持続性の反応も PKC 阻害薬と同様に消失した。

次にこの $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が TRH による GH 分泌の奇異性反応に実際に関与しているかを調べるために、初代培養細胞を用いて static incubation assay による GH 濃度測定を行った。TRH 濃度依存性に GH の分泌を増加し、この増加は nitrendipine と PKC 阻害薬によって著しく減弱した。このことから TRH による GH 分泌反応には電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介する Ca^{2+} 流入が大きく関与していることが分かった。

[EYFP-GH 融合蛋白を発現させた GH₃ 細胞を用いた分泌機構の可視化]

TRH 受容体を有するラット下垂体前葉細胞の cell line である GH₃ 細胞に EYFP-GH fusion protein を導入し、GH を含む分泌顆粒を可視化することを試みた。EYFP-GH fusion protein を transfect し G418 を用いて選択し、stable cell line を樹立した。抗ラット GH 抗体を用いた western blot analysis で fusion protein の導入が確認された。この細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、顆粒上の蛍光が核を除く細胞質内に分布しており、特に細胞膜直下に大きめの顆粒が分布しており、分泌顆粒を可視化していると考えられた。

TRH 投与によってこの分泌顆粒の動態がどのように変化するかを観察した。対照の細胞では細胞質内の顆粒がほとんど変化なく 10 分後同様に確認されることと、レーザー光による褪色が撮影条件下ではあまり影響しないことが分かった。60mmol/L の K 濃度を有する細胞外液 (High K) で細胞膜を脱分極し、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介する Ca^{2+} 流入を起こすと、全体的に蛍光が減弱し、顆粒が分泌されたことが分かった。この反応は nitrendipine で抑制された。TRH 投与にて顆粒が分泌され、nitrendipine にて抑制された。

このような細胞質内の顆粒の変化が、実際に GH 分泌量の変化と相関しているかを培養液中の GH 濃度を測定することで検証した。High K では細胞外に GH が分泌され、対照との有意差が見られた。この分泌は nitrendipine によりほとんど抑制された。また、TRH 投与でも GH が細胞外に分泌され、対照と比較して有意であり、nitrendipine により部分的に抑制されることが示された。

EYFP と Rhod-2 を用いてこの細胞において、顆粒の変化と $[Ca^{2+}]_i$ の変化を生きている状態で同時に観察することが可能となった。High K 投与により細胞膜を脱分極させると、Rhod-2 での蛍光強度が増加し、 $[Ca^{2+}]_i$ が上昇し、EYFP-GH 顆粒は減少した。TRH 投与により $[Ca^{2+}]_i$ は上昇し、顆粒は徐々に分泌された。

[GH 遺伝子の発現調節機構]

ラット GH₃ 細胞にラット Gh1 遺伝子のプロモーター1.7kb を luciferase レポーター遺伝子に結合したプラスミドを一過性に transfection し、ラット Gh1 遺伝子プロモーターの活性化を検討した。上述の実験にて High K による脱分極で分泌は起こることが示されたが、転写を活性化するかを検討した。ところで神経細胞ではこの Ca^{2+} 流入が神経伝達物質の放出のみならず神経伝達物質の転写制御にも重要であるが、同じ興奮性細胞である下垂体細胞でも同様であるかを GH₃ 細胞で解析した。transfection から 6 時間で試薬を投与し、試薬投与後 4 時間で luciferase assay を行った。

細胞を KCl 30 mmol/L で細胞膜を脱分極させ、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルによる Ca^{2+} 流入を起こしたところ、luciferase 活性は有意に上昇しなかった。このことから、脱分極による $[Ca^{2+}]_i$ 濃度の上昇のみでは GH₃ 細胞においては GH 遺伝子の転写を誘導しないと考えられた、脱分極による Ca^{2+} 流入刺激のみで促進される GH 分泌とは異なる機構で GH 転写は調節されていることが示された。

GHRH の刺激と同様に adenylyl cyclase を活性化する forskolin を投与すると、Gh1 プロモーター活性が約 8.6 倍に促進し、これは PKA 阻害薬の H89 処理で約 45%、L 型 Ca^{2+} チャンネル阻害薬の nitrendipine 処理で約 34% 阻害された。H-89 と nitrendipine の両方では約 56% 減少した。forskolin については cAMP 非依存性の作用も報告されているため、cAMP アナログである 8-CPT-cAMP を投与するにした。8-CPT-cAMP を投与すると Gh1 プロモーター活性が約 13 倍に促進し、これは H-89 処理で約 54%、nitrendipine では有意差を認めず、また MAPK の特異的阻害剤の U0126 処理で約 43% 阻害された。これらのことから、ラット Gh1 遺伝子の cAMP で誘導される転写調節には PKA のシグナル伝達経路と MAPK を介するシグナル伝達経路が主に関与しており、L 型電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介する Ca^{2+} 流入はあまり関与していないのではないかと推測された。

次に TRH を GH₃ 細胞に投与した場合の Gh1 プロモーターの転写活性を測定した。TRH 投与で Gh1 プロモーター活性が約 7.8 倍に促進し、これは nitrendipine 処理で約 44%、H-89 処理で約 30%、U0126 処理で約 56% 阻害された。CaMKII 阻害剤である KN93 処理では TRH 投与と比較して有意差を認めなかった。これらのことから、ラット Gh1 遺伝子は TRH でも転写が誘導され、PKA と MAPK を介するシグナル伝達経路と L 型電位依存性 Ca^{2+} チャンネルによる Ca^{2+} 流入が関与しており、CaMKII はあまり関与していないと考えられた。

[考察]

ヒト GH 産生下垂体腺腫細胞において TRH による GH の奇異性反応の機構を解析し、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介する Ca^{2+} 流入が重要であることが示された。TRH 受容体を有するラット GH₃細胞を用いて EYFP-ラット GH fusion protein を導入した stable cell line を樹立し、それを用いて TRH による GH 顆粒分泌を可視化し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化と GH 分泌の関係を生きた細胞で同時観察した。一方、ラット Gh1 遺伝子のプロモーターと luciferase レポーター遺伝子を一過性に導入した GH₃細胞にて Gh1 プロモーター活性が分泌刺激と同調して促進されるかを検討した。転写には主に PKA や MAPK を介するリン酸化シグナル伝達経路が重要であり、L 型電位依存性 Ca^{2+} チャンネルからの Ca^{2+} 流入だけでは転写は促進されないことがわかった。また、TRH によって Gh1 遺伝子の転写は促進され、PKA、MAPK と L 型電位依存性 Ca^{2+} チャンネルからの Ca^{2+} 流入が関与していることが分かった。今後、これらの手法を用いて GH の顆粒分泌と転写の調節の機構について更に検討したいと考えている。