



Title	ヒト下垂体腺腫におけるC末端欠失・成長ホルモン放出ホルモン受容体をコードするスプライシング変異転写産物の同定
Author(s)	橋本, 久仁彦
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39007
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	橋本久仁彦
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 11788 号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	ヒト下垂体腺腫におけるC末端欠失・成長ホルモン放出ホルモン受容体をコードするスプライシング変異転写産物の同定
論文審査委員	(主査) 教授 岸本 忠三 (副査) 教授 早川 徹 教授 青笹 克之

論文内容の要旨

【目的】

成長ホルモン放出ホルモン (GHRH) は、下垂体細胞膜に存在する GHRH 受容体 (GHRH-R) に結合し作用を發揮する。最近、ヒト GHRH-R の cDNA 構造が同定され G 蛋白質共役型受容体である事が判明した。*little(lit)* マウスにおいて本受容体のミスセンス変異が発見された事から、GHRH-R が GH 産生細胞の増殖・分化に必須な因子である事が示唆された。本研究では、ヒト GH 産生腺腫における GHRH-R 遺伝子の発現とその構造異常を解析する事を目的とした。特に、G 蛋白質共役受容体である甲状腺刺激ホルモン受容体や黄体化ホルモン受容体において第3細胞内ループ及び第6膜貫通領域の遺伝子変異が受容体の持続的活性化を惹起する事より、この領域を詳細に解析した。また、下垂体腺腫では種々のホルモン刺激に対する奇異性反応が存在する事が知られているため、GH 産生腺腫以外の下垂体腺腫においても GHRH-R 遺伝子の発現について解析した。

【方法ならびに成績】

- 1) 対象：22例の下垂体腺腫 [GH 産生14例、プロラクチン (PRL) 産生1例、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 産生3例、非機能性4例] 及び2例の正常下垂体前葉を対象とした。下垂体腺腫は全て経蝶形骨洞手術の際に収集し、正常下垂体前葉は剖検時に入手した。
- 2) ノーザン・ブロット法による GHRH-R 遺伝子発現の解析：下垂体腺腫及び正常下垂体前葉より全 RNA を抽出し、10 μ g を電気泳動の上、ニトロセルロース・フィルターに移行後、以下のプローブによりノーザン・ブロット解析を施行した。GHRH-R cDNA プローブは後述の RT-PCR 法により得られた250bp 断片を精製し遺伝子配列を確認の上、使用した。また GH 遺伝子プローブ及び β -アクトチン cDNA プローブにより rehybridization を施行した。この結果、GH 産生腺腫全例、ACTH 産生腺腫 1 / 3 例、PRL 産生腺腫 1 / 1 例、非機能性腺腫 2 / 4 例及び正常下垂体前葉全例に GHRH-R mRNA の発現を認めた。2.0kb、2.8kb、4.5kb の転写産物を認めたが、発現した全例において2.0kb が主要な転写産物であった。GH 産生腺腫での GHRH-R mRNA の発現量は多様ではあったが、他の型の腺腫に比し過剰な発現を認めた。特に2.8kb、4.5kb の転写産物については GH 産生腺腫以外ではわずかの発現量を認めるのみであった。なお、発現細胞の特異性を確認するため、GH mRNA に対するノーザン・ブロット解析を実施したところ、正常下垂体前葉及び GH 産生腺腫のみに GH mRNA は発現していた。
- 3) GHRH-R 発現量と GH 産生腺腫の臨床的性質との関連：ノーザン・ブロット解析における GHRH-R mRNA

のバンドについてデンストメトリーにより半定量を施行した。14例のGH産生腺腫において、腺腫径や血清GH値とGHRH-R mRNA発現量との相関関係を検討したが有意な関係は存在せず、またGHRH刺激に対する血清GHの反応との間にも有意な相関を認めなかった。

4) RT-PCR法によるGHRH-R遺伝子構造異常の解析：GHRH-Rにおいて第3細胞内ループと第6膜貫通領域を含む250bpの領域を増幅する様にプライマーを設定しRT-PCR法を実施した。多数の下垂体腺腫において報告された遺伝子配列から予想される250bp断片以外に810bp断片が増幅された。10例のGH産生腺腫において250bp断片の遺伝子配列を決定したが、この領域に遺伝子異常は認めなかった。正常下垂体前葉からゲノムDNAを抽出し、前述のGHRH-Rの領域に対するプライマーによりPCR法を実施し増幅された断片と、前述の810bp断片の遺伝子配列を決定し比較検討した。この結果、810bp断片はスプライシング変異により生じたlarger transcriptに由来する事が判明した。この810bp断片は250bp断片中に561bpの挿入配列が存在し、in frameに終止コドンが存在していた。よってlarger transcriptは第6膜貫通領域直前よりC末端が欠失したGHRH-Rとなる事が予想された。

5) ノーザン・ブロット法によるGHRH-R larger transcript発現の解析：larger transcriptに特異的プローブを作成し、ノーザン・ブロット法を施行し2.8kbおよび4.5kbの転写産物を確認した。解析したGH産生腺腫全例にlarger transcriptの発現を認めたが、ACTH産生腺腫では1/3例にのみ2.8kbにわずかな発現を認め、正常下垂体前葉では両者ともほとんど発現を認めなかった。特に4.5kbのmRNAが著明に発現している2例のGH産生腺腫ではGHRH刺激に対する血清GHの反応が欠如していた。

【総括】

全例のGH産生腺腫及び数例のGH産生以外の腺腫においてGHRH-R mRNAの発現を確認した。その発現量とGH産生腺腫の臨床的性質との間に関連性は存在しなかったが、GHRH-R larger transcriptはGH産生腺腫の病因や増殖制御に関して重要な役割を担う事が推測された。

論文審査の結果の要旨

成長ホルモン放出ホルモン受容体(GHRH-R)は、成長ホルモン(GH)産生細胞の増殖や分化に必須な受容体である。本論文は、ヒト正常下垂体前葉、下垂体腺腫におけるGHRH-R mRNAの発現様式を検討したものである。全例の正常下垂体前葉及びGH産生腺腫と数例の他のタイプの下垂体腺腫にGHRH-R mRNAが発現している事、そしてその発現量は特にGH産生腺腫で著明である事を明らかにした。そこで、次にGH産生腺腫の腫瘍化とGHRH-R mRNA発現との関連を検討し、GH産生腺腫においてその臨床的性質とGHRH-R mRNA発現量との間に有意な相関関係の無い事及びG蛋白との会合に重要なGHRH-Rの第3細胞内ループ・第6膜貫通領域に遺伝子異常が存在しない事を示し、GH産生腺腫の腫瘍化におけるGHRH-Rの寄与は少なくとも主要でない事を明らかにした。また、GH産生腺腫で多量に発現するC末端欠失GHRH-Rをコードするスプライシング変異転写産物の存在を同定した。以上の結果はGH産生腺腫の腫瘍化の解明において有意義な知見であり、学位授与に値するものとする。