

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	ミレグリ マイマイティ
<p>学位論文題目</p> <p>New Bioassay System of Human Growth Hormone Determination (ヒト成長ホルモンに対する新しい生物学的活性測定法の開発)</p> <p>共著者名 棚橋祐典、毛利善一、藤枝憲二</p> <p>未公表</p> <p>研究目的</p> <p>成長ホルモン (GH) は成長発達および代謝に関わる重要な下垂体ホルモンである。ヒト成長ホルモンの測定法は現在のところ臨床においては抗 GH 抗体による免疫抗体法が広く用いられているが、いくつかのヒト GH isoform の存在や生物学的活性がない変異 GH の同定などにより、GH による細胞増殖の程度を定量化する生物学的活性の必要性が高まっている。小児期の成長障害における診断と治療において、GH 活性の正確な評価は非常に重要なことである。</p> <p>本研究では、従来の GH に対する生物学的活性測定法に改良を加えた新しい測定法を開発し、正常小児および内分泌学的疾患患者の検体から免疫学的活性の測定と同時に生物学的活性を測定し、その有用性を検討することを目的とした。</p> <p>材料・方法</p> <p>【患者】</p> <p>日本および中国ウイグル自治区の小児を対象とした。日本人正常小児 23 名、特発性低身長症 36 名、高身長 9 名、思春期早発症 10 名、低出生体重児(SGA)11 名、肥満症 10 名、および中国ウイグル自治区の特発性低身長症 32 名の血清検体から測定した。</p> <p>【GH の生物学的活性測定】</p> <p>従来の生物学的活性測定法を改良し、高感度かつ簡便な BaF/GM 細胞の細胞増殖を測定する方法をおこなった。BaF/GM 細胞は Ba/F3 細胞にヒト GH 受容体を強制発現させた細胞で、</p>			

GHに対して強い感受性をもって細胞増殖する系である。

96 ウェルプレートに BaF/GM 細胞を一定の細胞密度で培養し、血清サンプルを 10 μ l 添加した。22 時間 CO₂ インキュベータにて 5%CO₂37C°で培養し、細胞増殖の程度を One Solution Cell Proliferation Assay Kit (Promega)によって比色定量した。比色定量にはマイクロプレートリーダー(THERMO max)により吸光度測定した。濃度既知の標準 GH 溶液を希釈し、標準曲線を作成し、サンプルの吸光度値から GH 濃度を換算し、これを GH 生物学的活性とした。

【GH の免疫学的測定】

血清サンプルのヒト GH 濃度は IRMA 法(SRL)キットにより測定した。

成績

【GH の生物学的活性測定法】

BaF/GM 細胞は GH 添加により濃度依存的に細胞増殖がみられた。GH 濃度の感度は 0.02ng/mL 以上であった。血清添加でも同様に細胞増殖がみられ、血清中の GH による細胞増殖と考えられた。

測定の GH 特異性を調べるために、BaF/GM 細胞にインスリン、プロラクチン、ハイドロコルチゾン、FSH、TSH、サイロキシン、EGF、FGF の成長サイトカインなどを投与したが、いずれも細胞増殖を認めなかった。Free IGF-1 を投与したところ、IGF-1 濃度 30ng/mL 以上にて細胞増殖がみられた。

GH 投与に細胞増殖は、ヒト GH 抗体により阻害され、また GHR アンタゴニスト投与により細胞増殖はみられなくなった。

アッセイ内変動、およびアッセイ間変動は 3 回測定し、それぞれ 9.1, 5.6, 11.9%、8.5, 7.9, 3.8%で、いずれも平均 10%であった。

【ヒト GH の生物学的活性測定】

小児の血清検体 (n=163) 中の GH を生物学活性および免疫学的測定法の両方で測定した。両者の測定値は非常に近い値で一致しており、生物学的/免疫学的活性比(B/I 比)は 1.04 \pm 0.33(Mean \pm SD)であった。

GH 分泌刺激試験を施行した特発性低身長症の分泌刺激試験における前値および頂値の検体において生物学活性および免疫学的活性を測定したところ、前値および頂値のいずれも生物学活性および免疫学的活性間に有意差は認められなかった。

日本およびウイグル自治区の特発性低身長症の小児 (36 名および 32 名) の血清検体について、GH 測定をおこなったが、両者に有意差はみられなかった。B/I 比も両地域間に差は見られなかった。

特発性低身長症以外の小児疾患（高身長、思春期早発症、低出生体重児(SGA)、肥満症）の血清検体について GH の生物学活性および免疫学的活性を測定したところ、免疫学的活性は疾患群いずれにも有意差はなかった。しかしながら、生物学的活性においては、高身長と肥満症間に有意差 ($p<0.05$) が認められた。高身長では 2.41 ± 0.60 、肥満症 0.56 ± 0.20 (ng/mL: mean \pm SE)であった。

考案

GH の生物学的活性測定法はその操作の煩雑さから敬遠され、従来から GH 抗体による免疫学的測定法が広く用いられてきた。しかし、近年の GH のアイソフォームおよび生物学的不活性の GH が発見され、生物学的活性の測定は重要性を増している。本研究での BaF/GM 細胞を用いる系は、生物学的活性測定法として最も汎用されている ESTA アッセイ法に比較して、感度が約 10 倍優れている。また、アッセイに必要な時間も短時間で簡便な方法である。これは、BaF/GM 細胞が細胞増殖、GH 反応性に富んでいることと比色定量法の試薬の改良によるものと考えられる。さらに他のホルモンおよび成長因子では増殖がみられなかったことから、この生物学的活性測定法は GH 特異性が非常に高いと思われる。

小児の血清検体における GH の生物学的活性と免疫学的活性の測定値の比較では、両者はよく一致していた。ESTA アッセイ法でみられた GH 分泌刺激試験頂値での生物学的活性と免疫学的活性の乖離が今回の生物学的活性測定法ではみられなかったことから、測定法としての正確性と信頼性を示唆するものであった。

各疾患間での GH の比較において、高身長と肥満症との間に生物学的活性では有意差が見られた。これは免疫学的活性ではみられなかったことから、未知の GH 以外の因子が BaF/GM 細胞の細胞増殖に関わっている可能性が示唆される。しかしこれはさらに多数例での解析が必要になるとと思われる。

結語

ヒト GH における、高感度で簡便で迅速な生物学的活性測定法を確立した。この生物学的活性は非常によく免疫学的活性とよく相関していた。成長に関する小児の疾患において、生物学的活性を評価することは非常に重要なことであり、本研究の測定法は有用であると考えられた。





引用文献

1. Ishikawa, M., Nimura, A., Horikawa, R., Katsumata, N., Ariska, O., Wada, M., Honjo, M. & Tanaka, T. (2000) A novel-specific bioassay for serum hGH. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85, 4274–4279.
2. Nimura A, Katsumata N and Tanaka T. (2004) Serum Levels of Free Insulin-Like Growth Factor (IGF)-I in Normal Children. *Clin Pediatr Endocrinol*: 13(1), 71-78.
3. Jennifer E. Rowland, Nicholas J. Marshall, Kin-chuen Leung, et al (2002) A novel bioassay for human somatogenic activity in samples supports the clinical reliability of immunoassays. *Clinical Endocrinology* 56, 475–485.

参考文献

1. Maimaiti M, Takahashi S, Okajima K, Suzuki N, Ohinata J, Araki A, Tanaka H, Mukai T, Fujieda K. (2009) Silent exonic mutation in the acid-alpha-glycosidase gene that causes glycogen storage disease type II by affecting mRNA splicing. *J Hum Genet.* : 54(8):493-6.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	ミレグリ マイマイティ
審査委員長 鈴木 裕 			
審査委員 伊藤 喜久 			
審査委員 清水 恵子 			
審査委員 藤枝 憲二 			
学 位 論 文 題 目 New Bioassay System for Human Growth Hormone Determination (ヒト成長ホルモンに対する新しい生物学的活性測定法の開発)			
<p>本論文は、従来の成長ホルモン (GH) に対する生物学的活性測定法に改良を加えた新しい測定法を開発し、正常小児および内分泌学的疾患患者の検体から免疫学的活性の測定と同時に生物学的活性を測定し、その有用性を検討することを目的とした。このため学位論文提出者らは、ヒト GH 受容体とトロンボポイエチンのキメラを Ba/F3 細胞に安定発現させた GH 依存性細胞株 BaF/GM を作製し、この増殖に対する GH や他のホルモン・成長因子の影響を MTS 発色系により評価した。</p> <p>その結果、新しい方法により評価した生物学的活性はきわめて高く免疫学的活性と相関し、さらに、現在汎用されている生物学的活性測定法 ESTA アッセイに比較して感度が約 10 倍優れていただけでなく one-step の簡便な方法であった。また BaF/GM 細胞では、他のホルモンおよび成長因子による増殖がみられず、GH 特異</p>			

抗体およびアンタゴニストにより GH 感受性増殖がブロックされた。このように新生物学的活性測定法は、正確性と信頼性そして GH 特異性が極めて高く、また簡便で優れた方法であった。

論文提出者らは、さらに、特発性低身長症、高身長、思春期早発症、低出生体重児、肥満症、の患者血清検体の GH レベルを新生物学的活性法と免疫学的活性法により測定比較し、生物学的活性と免疫学的活性の比は、高身長では有意に高く、肥満症では有意に低いこと、他の疾患では有意差がないことを観察した。

現在、いくつかのヒト GH isoform の存在が明らかとなり、また生物学的不活性な変異体 GH が同定されたことなどにより、GH による細胞増殖の程度を定量化する生物学的活性の必要性が高まっている。本研究により開発された生物学的活性法は、小児期の成長障害の診断と治療において必須となっている GH 活性の正確な評価にきわめて有用であるだけでなく、今後、各症例、病態について詳細な検討とともに評価対象症例数を増やすことにより、新たな疾患・病態の発見や病態解明の推進に貢献することを期待させるものである。

論文内容と関連領域についての各審査委員による試問に対しても論文提出者から適切な回答が得られた。

以上の審査結果から、本審査委員会は、本論文が博士（医学）の学位に値するものであると判定した。