

氏 名	きむ なお てつ かなもと なおてつ 金 巨 哲 (金 本 巨 哲)
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2854 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	The analysis of the regulation of human ghrelin gene expression (ヒトのグレリン遺伝子発現調節の解析)

論文調査委員	(主 査) 教 授 藤 田 潤 教 授 北 徹 教 授 清 水 章
--------	--------------------------------------

論 文 内 容 の 要 旨

成長ホルモン (GH) secretagogue 受容体の内因性リガンドであるグレリンは主に胃の X/A-like 細胞で産生され、消化管をはじめ視床下部、下垂体、膵臓、腎臓などに発現が認められている。グレリンは GH 分泌促進、摂食亢進等多様な生理作用を有するが、その遺伝子発現・分泌調節機構は不明な点が多い。そこで、本研究ではグレリンを発現、分泌する培養細胞株を同定し、その細胞株を用いてグレリン遺伝子発現・分泌調節に関する解析を行った。

甲状腺傍濾胞細胞及びそれを発生母地とする髄様癌は多種多様な消化管ホルモンや神経ペプチドを分泌することが知られている。そこで、まず甲状腺傍濾胞細胞におけるグレリンの発現に関する検討を行った。RT-PCR を用いてヒト正常甲状腺、ヒト甲状腺髄様癌細胞株 (TT 細胞) 及びラット甲状腺髄様癌細胞株でグレリン遺伝子の発現を認めたが、ラット甲状腺濾胞細胞株では発現を認めなかった。次に、TT 細胞抽出物を RP-HPLC で分画した後アシル化及び脱アシル化グレリンを各々特異的に認識する抗体を用いて測定したところ、各々の分画に一致するピークを認めた。更に、免疫染色では TT 細胞は各々の抗体で染色された。同細胞の培養上清のグレリン濃度測定では脱アシル化グレリン濃度は経時的に上昇したがアシル化グレリン濃度は上昇しなかったこと、培養上清にグレリンを添加するとアシル化グレリン濃度が急速に低下したことより、グレリンは分泌された後にすぐに脱アシル化されることが示唆された。また、甲状腺髄様癌組織のグレリン含量は正常甲状腺組織や乳頭癌組織より約 5 倍増加していた。以上より、TT 細胞や甲状腺髄様癌組織でのグレリン産生が証明された。

次に、TT 細胞を用いてヒトのグレリン遺伝子発現調節の解析を行った。まず、同細胞 mRNA を用いて 5'-RACE を行ったところ、ヒトのグレリン遺伝子の転写開始点は翻訳開始点から -80、-555bp の二ヶ所に存在すると考えられ、後者では非翻訳領域に長さ 20bp のエクソンの存在が明らかになった。各々の転写産物はヒト胃では等量に発現していたが、TT 細胞では前者が後者の約 40 倍発現が多く、ヒトのグレリン遺伝子の発現に組織特異性のあることが示唆された。次に、ヒトのグレリン遺伝子 5' 上流域を組み込んで作製したレポータープラスミドを TT 細胞に導入しプロモーター活性の検討を行ったところ、翻訳開始点より -193~-349bp 及び -1010~-1409bp の間でプロモーター活性の上昇を認めた。これらの領域にはいくつかのコンセンサス配列が存在し、その中には消化管内分泌細胞の発生・分化に重要な因子である basic/helix-loop-helix (bHLH) 型転写因子が結合する E-box が含まれていたことから、E-box について検討を行った。上述の領域には E-box が各々一ヶ所及び二ヶ所存在し、各々の部位に変異を導入したレポータープラスミドではプロモーター活性は低下した。また、TT 細胞の核タンパク抽出物を用いたゲルシフトアッセイでは bHLH-leucine zipper 型転写因子である upstream stimulatory factor (USF) の特異的結合が認められた。以上より、ヒト正常甲状腺傍濾胞細胞に極めて近い性質を持つ TT 細胞において USF がグレリン遺伝子発現に関与していることが明らかになり、ヒトのグレリン遺伝子発現調節における USF の意義が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究はグレリンの遺伝子発現調節の解明を目的とし、グレリンを発現、分泌する培養細胞株を同定し、ヒトのグレリン遺伝子発現調節の解析を行ったものである。

ヒト甲状腺髄様癌細胞株（TT 細胞）にグレリン遺伝子発現を認めること、細胞抽出物の逆相 HPLC でグレリンに一致するピークを認め、細胞培養上清中のグレリン濃度が経時的に上昇すること、グレリン抗血清を用いた免疫染色で特異的に染色されることから TT 細胞でのグレリン産生が証明された。

次に、TT 細胞を用いてヒトのグレリン遺伝子プロモーター領域の解析を行った。ヒトのグレリン遺伝子の転写開始点は 2 ヶ所存在し、各々の転写産物の発現に組織特異性の存在が示唆された。翻訳開始点より -193bp から -349bp の間および -1110bp から -1509bp の間でプロモーター活性の上昇を認め、これらの領域には bHLH 型転写因子が結合する E-box が計 3 カ所存在した。それぞれの E-box に変異を導入するとプロモーター活性が低下した。ゲルシフトアッセイでは bHLH 型転写因子の一つである upstream stimulatory factor (USF) との特異的結合が認められた。これらの結果よりヒトのグレリン遺伝子発現調節における USF の意義が示唆された。

以上の研究はグレリンの遺伝子発現調節機構の解明に貢献し、グレリンの臨床的意義の解明に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値のあるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成17年2月15日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。