成長ホルモンの生物活性に関する研究
Ⅱ．末稍血リンパ球およびIM-9細胞に及ぼす成長ホルモンの影響

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 清水, 眞
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8200

金沢大学十全医学会雑誌　第99巻　第3号　517－528　(1990)

成長ホルモンの生物活性に関する研究

II．末梢血リンパ球および IM-9 細胞に及ぼす成長ホルモンの影響

金沢大学医学部小児科学講座（主任：谷口　昂教授）
清　水　　眞

（平成2年5月17日受付）

近年成長ホルモン (growth hormone, GH) 投与と白血病発症との因果関係が注目されているが，GH の血液細胞，リンパ系組織に対する作用については未だ一定の見解が得られていない．今回ヒト下垂体抽出 GH (p-hGH) および遺伝子組換合成ヒト GH (recombinant-human growth hormone, r-hGH) を用いてリンパ球の増殖におよぼす影響ならびに GH の細胞内情報伝達機序につき試験管内および生体内で検討し以下の成績を得た．(1)末梢リンパ球 (peripheral blood lymphocytes, PBL) の [^{3}H]-Thymidine ([^{3}H]-TdR) 摂取に対し p-hGH, r-hGH は共に影響をおよぼさなかった．しかし phytohemagglutinin (PHA) 刺激下における増殖過程に r-hGH は影響しなかったが p-hGH は抑制効果を示した．(2)細胞株 IM-9 の増殖に対し，10ng/ml 以上の r-hGH は DNA 合成を促進したが，T細胞株 MOLT-4 の増殖には影響しなかった．(3)[^{125}H]-GH 結合能の解析から，IM-9 には GH 特異的結合能が認められ，IC_{50}は 5ng/ml であった．しかし MOLT-4, PBL には特異的結合は認められなかった．(4)r-hGH は IM-9 細胞の cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 産生および細胞内 Ca^{++} 濃度に影響をおよぼさなかった．(5)GH 長期治療中の下垂体性小人症およびターナー症候群の患者における末梢血液，リンパ球サブセットは正常対照との差が認められなかった．以上の成績から生理的濃度ないし治療量の GH が生体内でリンパ球増殖，文化に著明な影響をおよぼす可能性は少ないものと考えられる．しかし GH 受容体を有するB細胞系の増殖文化に影響をおよぼす可能性は残される．

Key words pituitary human growth hormone, recombinant human growth hormone, lectin-activated lymphocytes, cyclic AMP, calcium ion channel

近年内分泌系統と免疫系統の相互関係が注目をあび各種ホルモンがヒトリンパ球の表面構造と機能両面で作用をおよぼしたと報告されている[1)~4)]．成長ホルモン (growth hormone, GH) とリンパ系，免疫系との関連性は，GH 欠乏マウスである Snell-Bagg マウスにおける免疫不全として報告された[5)]．ヒトにおいては主に試験管内で検討がなされており，Astaldi らは，培養中のヒトリンパ球に GH が，芽球化現象をもたらしたと報告したが[6)]，これに対し，Mercola らは無刺激のリンパ球には GH は何ら刺激作用をもたらさないが phytohemagglutinin (PHA) 刺激下のT細胞にコロニー形成を促進すると報告した[7)]．また，Thieriot-Prevost らは GH は PHA で誘導されるリンパ球増殖に何ら影響を及ぼさないと結論付けている[8)]．また，Kiess ら[9)]，Schimpff ら[10)] は GH は末梢リンパ球 (peripheral blood lymphocytes, PBL) に著明な刺激作用を及ぼし，[^{3}H]-Thymidin ([^{3}H]-TdR) 摂取を亢進させるが，PHA 刺激下の PBL に対しては GH は

Abbreviations: cAMP, cyclic adenosine monophosphate; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FCS, fetal calf serum; GH, growth hormone; IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine; IL-2, interleukin 2; LAL, lectin-activated lymphocytes; NHS, normal human

[^{3}H]-TdR 摂取を抑制すると報告している．以上のように，GH がおよぼすリンパ球の文化，増殖への影響に関しての見解は未だ統一されていない．これまでの報告は下垂体抽出ヒト成長ホルモン (pituitary human growth hormone, p-hGH) を用いており，過去の成績が一貫性を欠く理由として GH 以外の抽出物の混在が考えられる．また，最近になり，GH 補充療法中の患者から，白血病の発生が，高率に見られるとの報告がなされ[11]臨床面で，改めて GH のリンパ系組織へ文化，増殖に及ぼす作用が問われるようになった．

今回遺伝子組換ヒト成長ホルモン (recombinant human growth hormone, r-hGH)，を中心に試験管内および生体内において末梢リンパ球や株化された培養リンパ球に対する GH の生物学的作用を検討した．

対象および方法

I．使用薬剤

遺伝子組換ヒト成長ホルモン (r-hGH) は LY-1379-98 (Ely Lilly，米国)，下垂体抽出ヒト成長ホルモン (p-hGH) は Corpormon (日研化学，東京) を用い，それぞれ添付の日局注射用蒸留水で 1mg/ml の濃度に溶解し，小チューブに10μg づつ分注し－20℃で凍結保存した．必要に応じて，培地，もしくは緩衝液で，所定の濃度に希釈して用いた．

II．使用細胞

培養細胞は JCRB 細胞バンク由来の，ヒト慢性骨髄性白血病より株化されたB細胞系の IM-9 と，急性リンパ性白血病より株化されたT細胞系の MOLT-4 を用い，それぞれ，10%の加温不活化処理した胎児牛血清 (fetal calf serum, FCS) を含む RPMI 1640 培地 (Gibco，米国) を培養液とし，5％ CO_2気相下，37℃で培養したものを用いた．末梢リンパ球 (PBL) は，健

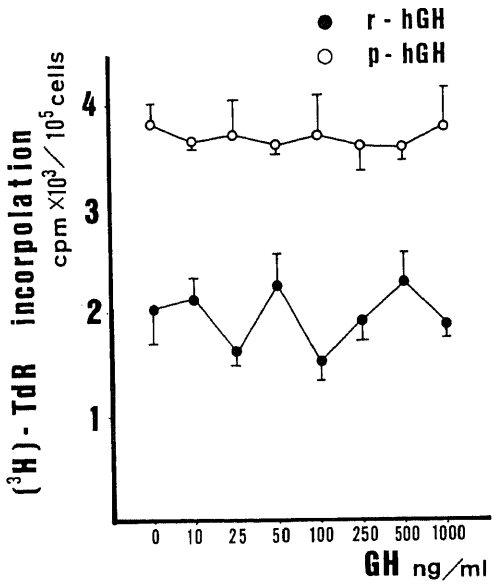

Fig. 1. Effect of various doses of p-hGH (○) and r-hGH (●) on [^{3}H]-thymidine (TdR) uptake in peripheral lymphocytes (PBL). PBL (10^5cells) were cultured in RPMI-1640 medium containing 10% FCS with 0-1000 ng/ml hGH for 96 hrs. Twelve hours after addition of 2×10^{-4}Ci of [^{3}H]-TdR, cells were harvested on glass fiber filter and radioactivity was counted. [^{3}H]-TdR uptake was expressed as cpm/10^5cells. Vertical bar, mean±SEM of quintupled samples.

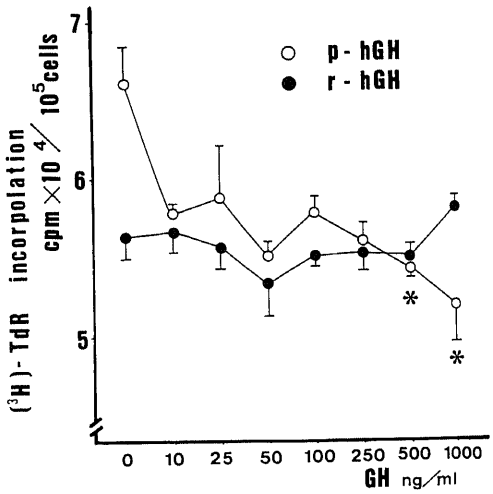

Fig. 2. Effect of various dose of p-hGH (○) and r-hGH (●) on [^{3}H]-TdR uptake in PHA-stimulated PBL. PHA was added to incubation medium at a concentration of 4.8 μg/ml and cells were processed in the same way as described in the legend of Fig. 1. *, $p<0.05$ VS. control by ANOVA followed by Scheffe's multiple comparison procedure.

serum ; PBL, peripheral blood lymphocytes ; PHA, phytohemagglutinin ; p-hGH, pituitary human growth hormone ; PRL, prolactin ; r-hGH, recombinant human growth hormone ; RIA, radioimmunoassay ; SAC, staphylococcus aureus cowan ; TdR, thymidine

康な成人の静脈よりヘパリン加採血し，Ficoll-Hypaque 法を用いて得た．細胞の生存率評価は，trypan blue 染色により97%以上であった．また，May-Grunwald-Giemsa 染色では，5～8%の単球の混入を認めたが，多核球は2%以下であった．

1．末梢リンパ球及びレクチン活性化リンパ球 (lectin-activated lymphocytes, LAL) に及ぼす r-hGH, p-hGH の影響

Kiess らの方法[9]に従って実験を行った．即ち，PBL は加温不活化処理を行った正常ヒト血清 (normal human serum, NHS) 10%を含む RPMI-1640 に 5×10^5cells/ml の濃度で再浮遊させ，96wells の Flat bottom plate (Corning, 米国) に200 μづつ分注した．r-hGH, p-hGH をそれぞれ0～1000 ng/ml の最終濃度で加えた．また，LAL への影響を検討した群については，PHA (Gibco) を4.8μg/ml を同時に添加した．5% CO_2気相下37°Cで96時間培養したのち [Methyl-^{3}H] -Thymidine ([^{3}H]-TdR) (Specific activity: 6.7Ci/ml) (New England Nuclear, 米国) を 2×10^{-4}Ci に加え，12時間孵置したのち，Glass Fiber Filter Strips PHD (Cambridge Technology, Inc 米国) 上に集め，液体シンチレーションカウンター LSC-700 (アロカ，東京) で放射能活性を測定した．結果は1分間あたりのカウント数 (counts per minute, cpm) の平均値±標準誤差 (mean±S. E. M) で表示した．

2．T細胞株，B細胞株の DNA 合成に及ぼす r-hGH の影響

T細胞として MOLT-4，B細胞株として IM-9 を用いた．細胞はそれぞれ，4% FCS を含む RPMI-1640 培地にて洗浄後，5×10^4cells/ml に再浮遊させ，0～1000ng/ml の r-hGH を加え 96wells flat bottom の培養プレートに200μづつ分注し，37°C，5% CO_2気相下で48時間培養後，[^{3}H]-TdR 2×10^{-4}

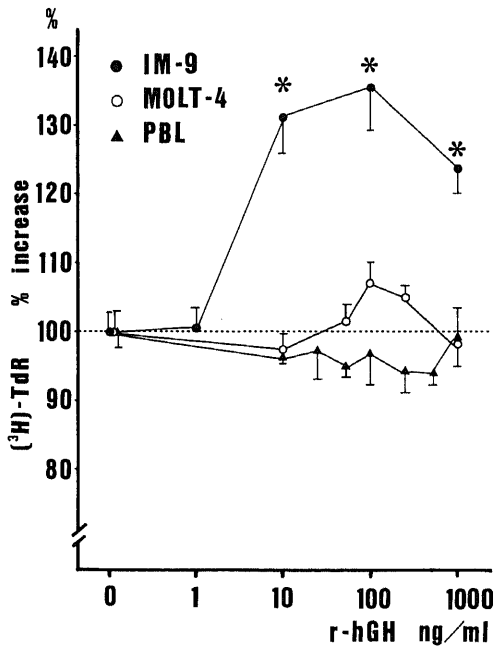

Fig. 3. Effect of various doses of r-hGH on [^{3}H] -TdR incorpolation into IM-9 (●), MOLT-4 (○) and PBL (▲). 1×10^4cells were cultured in RPMI-1640 medium containing 4% FCS with or without r-hGH (0-1000 ng/ml) for 48 hours. Three hours after addition of 2×10^{-4}Ci of [^{3}H]-TdR, cells were harvested on glass filter and radioactivity was counted. Values are expressed as per cent increase from the sample without hGH. Vertical bar, mean±SEM of quintupled samples. *, $p<0.05$ VS. control by ANOVA followed by Scheffe's multiple comparison procedure.

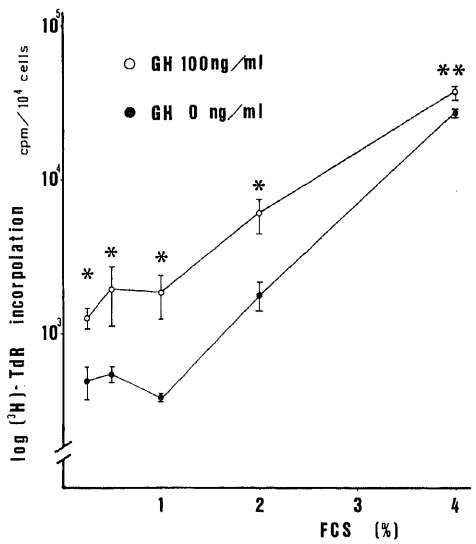

Fig. 4. Effect of 100 ng/ml of r-hGH on [^{3}H] -TdR uptake in IM-9 cells under various FCS concentrations. 1×10^4cells were cultured in RPMI-1640 medium containing 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0% of FCS with 100ng/ml of r-hGH or without r-hGH in the same way as described in the legend of Fig. 3. *, $p<0.01$, **, $p<0.05$ compared with the group cultured in RPMI-1640 medium without GH by ANOVA followed by Scheffe's multiple comparison.

Ci を加えて3時間孵置したのち Glass fiber filter 上に集め，液体シンチエーションカウンターで放射能活性の測定を行った．結果は r-hGH 0ng/ml 時の [^{3}H]-TdR 摂取量を100%とし，r-hGH 添加時の [^{3}H]-TdR 摂取量を百分率で表示した．PBL の [^{3}H]-TdR 摂取も百分率で併記した．また，IM-9 細胞では FCS 濃度を0.25～4%の間で変化させたときの [^{3}H]-TdR 摂取量の変化を GH 0ng/ml, 100ng/ml の時について検討した．

3．GH 受容体の解析

末梢リンパ球，MOLT-4, IM-9 を用いて，GH 受容体解析のため，GH の^{125}I 標識化合物である [^{125}I]-GH と非標識 GH を用いて，結合解離曲線を作成した．IM-9, MOLT-4, PBL を，Hepes-Lymphocyte buffer (50mM Hepes, 120mm NaCl, 1.2mM $MgSO_4$, 2.5mM KCl, 15mM Sodium acetate, 10mM glucose, 1mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1mg/ml human serum albumin, pH7.0)[12]で洗浄した後，同緩衝液に 5×10^7 cells/ml で再浮遊させ，各々0.5ml を，radioimmunoassay (RIA) 用 assay tube 13×75mm (シオノギ，大阪)，に分注し非標識の r-hGH を0～1000ng/ml の最終濃度で加えた．30°Cで加温，震盪しながら4.5時間孵置した後 [^{125}I]-GH (100μCi/μg) (New England Nucleaer) 250pg/50μl buffer を加え，更に30°Cにて1.5時間孵置した．反応停止は氷冷した Hepes-lymphocyte buffer を 1ml 加え攪拌することによった．マイクロチューブ (1.5ml) (Eppendorf，米国) 0.7ml づつ分注し TOMY micro centrifuge MC-150 (トミー精工，東京) にて 2000rpm，1分間遠心した．上清は吸引除去し，管壁に付着した [^{125}I]-GH の影響を最小とするために細胞塊を残してチューブの上部は切断した．放射能活性はオートウェルガンマカウンター ARC-500 (アロカ) で測定した．結果は，r-hGH 0ng/ml の時細胞に結合した [^{125}I]-GH の総カウント数に対する百分率で表示した．

4．IM-9 の cAMP 産生量定量

洗浄した細胞を 1×10^7cells/ml を RPMI-1640 培地に再浮遊させ最終濃度1～1000ng/ml の r-hGH と同時にフォスフォディエステラーゼの酵素活性阻害剤として 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (Sigma，米国) 0.5mM を加え，30°Cで孵置し，経時的に2時間まで100μl づつ (細胞数として 1×10^6ケ) を別に用意した RIA 用チューブ (13×75mm) (シオノギ) に分注し，直ちに900μl の蒸留水を加え細胞を溶解し上清中の cAMP 濃度を YAMASA Cyclic AMP Kit (ヤマサ醤油，千葉) を用いて測定した．予備実験として cAMP 濃度の経時的な変化を検討したが，cAMP 産生量は IBMX 添加後30分で最高となり，以後，漸減したため，r-hGH 添加時の cAMP 産生量の検討は孵置開始後30分で行った．結果は細胞 1×10^6ケ当たりの cAMP 産生量を p mol 数で表示した．

5．細胞内 Ca 濃度の測定

PBL，又は IM-9 細胞の RPMI-1640 浮遊液 3ml (5×10^5 ケ/ml) に10μl の Fura 2-AM (1mM) と Mg^{++} (1mM) を含むリン酸緩衝生食 (phosphate buffered saline, PBS) 2ml に懸濁し測定に用いた．刺激には r-hGH 10ng/ml, 100ng/ml, Staphylococcus aureus cowan (SAC, 0.01%) を添加し，細胞内 Ca^{++} 濃度の変化を検討した．測定は分光光度計 RF-5000 (島津製作所，京都) を用い，励起波長 335nm (Ca^{++} 結合) と 362nm (Ca^{++} 解離) の強度比の変化を 500nm の蛍光で観測した．

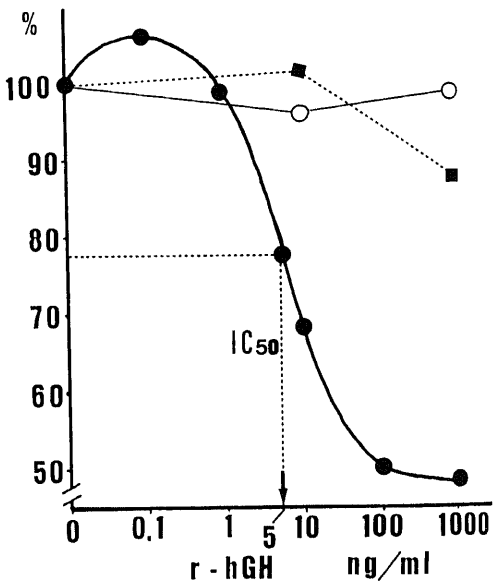

Fig. 5. Displacement curve of [^{125}I]-GH by unlabelled r-hGH in IM-9 (●), MOLT-4 (■), and PBL (○). 2.5×10^7 cells were in cubated in Hepes-lymphocyte buffer with or without r-hGH (0-1000 ng/ml) for 4.5 hrs. One and half after addition of 250 pg of [^{125}I]-GH, duplicate 700 μl aliquots were taken into a microfuge tube and contrifuged for 1 min. The radioactivity in the pellet was counted, and values are expressed as per cent decrease from the sample without r-hGH. The concentration of 50% inhibitation (IC_{50}) is indicated by arrow.

Ⅲ．GH 投与患者における検討

1．GH 治療中の末梢血変化

対　象

厚生省診断基準に基づき，身長は同性，同年令の［標準値－2標準偏差］以下，年間成長率4.5cm 以下，骨年令/暦年令比80％以下で二種類以上の GH 分泌刺激試験を施行し，GH の最大血中濃度 5ng/ml 以下に該当し，かつ継続的に調査可能であった GH 治療中の下垂体性小人症17名を対象とした．

方　法

末梢血中の赤血球数，ヘモグロビン，ヘマトクリット，白血球数，血小板数，Giemsa 染色による抹消血液像上の，好中球，リンパ球の百分率を検討した．

2．細胞表面マーカーの検索

対　象

GH による治療中の下垂体性小人症19例，ターナー症候群5例，および正常対照小児11例を対象とした．GH 投与量は0.4～0.5U/kg/週で投与期間は下垂体性小人症は3年以上，ターナー症候群は1年間である．

方　法

単クローン抗体直接蛍光標識法 (Ortho diagnostic system Inc，米国) によって標識した表面マーカー CD2，3，4，8，16，57，Ia を Spectrum III (Ortho) を用いフローサイトメトリーで検討した．

Ⅳ．統計学的処理

得られた数値はすべて平均値±標準誤差 (mean±S. E. M) で示した．二群間の平均値の差の検定には Student の t 検定を用い，多群間の平均値の差の検定には一元配置分散分析後 Scheffe 検定によって有意差の検定を行った．なお，危険率5％以下を統計学的に有意差ありとした．

成　　績

Ⅰ．r-hGH および p-hGH の末梢リンパ球に及ぼす影響

p-hGH 存在下での PBL の [H^3]-TdR とりこみは3823±87cpm～3584±57cpm で p-hGH 添加量との関係は見られず，有意差もなかった (図1)．r-hGH 存在下での PBL の [H^3]-TdR 摂取への影響も2272±299～1520±181 cpm で r-hGH 濃度との間には一定の傾向や有意差は認められなかった．PHA 存在下における LAL に対する GH の影響は，p-hGH では用量依存性に抑制を受け66030±2382cpm から51900±2440 cpm へ21％の減少が見られたのに対し，r-hGH では53219±2023cpm～58100±631cpm の間に分布し，用量依存性も有意差も見られなかった (図2)．

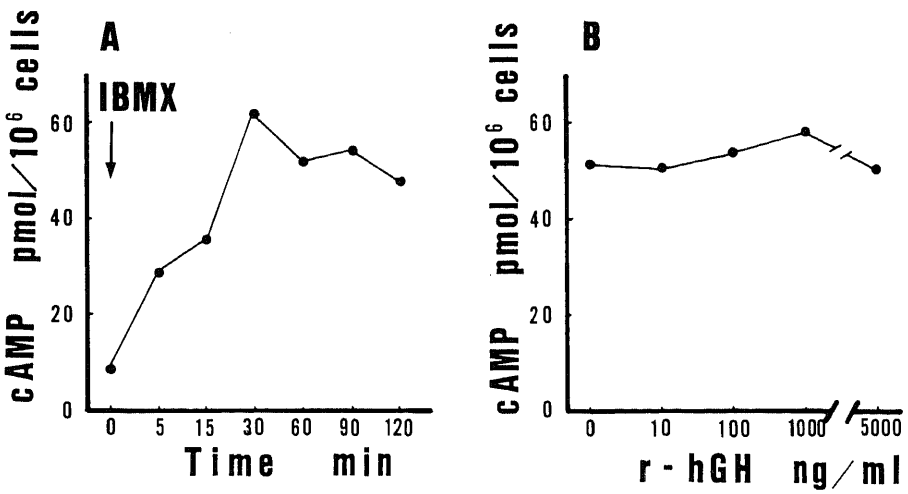

Fig. 6.　Effect of GH on cAMP production in IM-9 cells.
(A)Time course of cAMP production in IM-9 cells. 1×10^7cells were cultured in 1 ml of RPMI 1640 medium with 0.5 mM of IBMX. At 0, 5, 15, 30, 60, 90 and 120 min., 100μl of aliquot was removed to other tube, and cells were lysed by addition of 900μl distilled water. Concentration of cAMP was measured by RIA, and values are expressed as p mol/1×10^6cells.
(B) Effect of various doses of r-hGH on cAMP production in IM-9 cells during 30 min of incubation period.

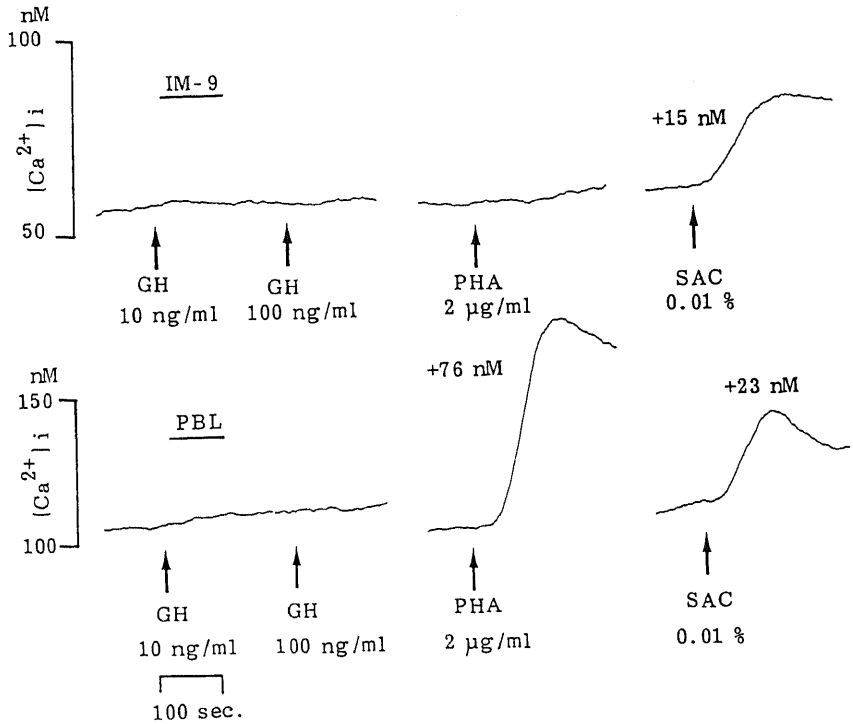

Fig. 7. Effect of r-hGH, PHA and Staphylococcus aureus Cowan (SAC) on intracellular Ca concentrations in IM-9 (upper panel) and PBL (lower panel). 1.5×10^6 cells were cultured in 3 ml of RPMI 1640 medium, and 2ml of PBS containing 1mM of Fura-2-AM and 1mM of Mg was added. Excitation wave lengths were 335 nm (bound Ca^{++}) and 362 nm (dissociated Ca^{++}), and changes of fluorecent strength were measured by fluorophotospectrometer at 500 nm.
[Ca^{2+} i], intracellular calcium ion concentration.

Table 1. Changes in blood cell counts in patients with pituitary dwarfism and Turner's syndrome during 3 years of hGH therapy.

	Before (n=17)	6M (n=12)	1Y (n=14)	2Y (n=12)	3Y (n=10)
RBC × 10^4/mm^3	478±11	437±10	444±6	455±9	464±11
WBC /mm^3	8847±603	6508±646	8079±887	7250±739	6160±553
Hb g/dl	13.3±0.4	12.8±0.3	13.3±0.2	12.9±0.3	13.2±0.3
Ht %	41.2±0.9	37.9±0.8	38.2±0.6	39.1±0.8	40.1±1.0
Plats × 10^4/mm^3	31.7±2.4	27.8±1.6	31.9±2.8	31.7±2.5	30.3±1.8
Neutro %	49.2±3.2	54.8±4.4	44.8±4.5	54.9±2.7	45.6±3.6
Lympho %	42.9±2.9	37.9±3.4	42.8±3.4	34.3±2.2	44.8±3.8

Values are means±S.E.M. RBC, red blood cell count; WBC, white blood cell count; Hb, hemoglobin concentration; Ht, hematocrit; Plts, platelet count; Neutro, percentage of neutrophiles; Lympho, percentage of lymphocytes

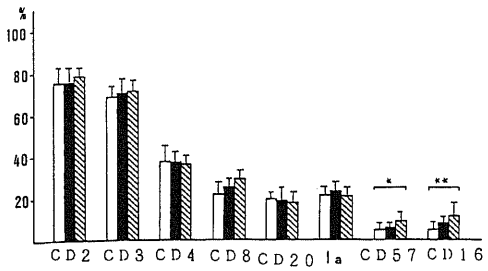

Fig. 8. Lymphocyte subsets in 19 patients with pituitary dwarfism (■), 5 with Turner's syndrome (▧) receiving long-term hGH therapy, and 11 normal age-matched children (□). *, $p<0.05$, **, $p<0.02$ VS. controls by ANOVA followed by Scheffe's multiple comparison.

II．T細胞株，B細胞株の増殖に対する影響

T細胞系の MOLT-4 では [^{3}H]-TdR のとりこみは r-hGH 0～1000ng/ml の添加では全く影響を受けなかったが，IM-9 では10～1000ng/ml の r-hGH 添加で [^{3}H]-TdR 摂取は23～30％の増加を示した (図３). IM-9 の細胞増殖過程における r-hGH の刺激効果を FCS の濃度による変化と比較した (図４). FCS は１％以上の添加で著明な増殖促進効果を示した．一方 r-hGH 100ng/ml の添加は全手の FCS 濃度で [^{3}H]-TdR 取り込みを増強したが，その増強効果はほぼ２％ FCS の効果に匹敵した．

III．hGH 受容体と DNA 合成の関係

GH 受容体の有無と [^{3}H]-TdR 摂取率の関係をみるために，IM-9, MOLT-4, PBL を用いて GH の^{125}I 標識化合物である [^{125}I]-GH の細胞結合能を検討した．IM-9 は GH 0.1ng/ml 存在下で，106.7％の最大結合を示し，以後濃度依存性に結合能は低下した (図５). GH 1000ng/ml 存在下における非特異的結合能は対照の53.2％であった．[^{125}I]-GH と IM-9 の結合を50％阻害する GH 濃度である IC_{50} は 5ng/ml であった．一方，PBL, MOLT4 は加えた [^{125}I]-GH の総カウント数の2.7％，2.6％の非特異的結合が認められたのみであり，GH 受容体は存在しない事が判明した．

IV．IM-9 における cAMP 産生によぼす r-hGH の影響

フォスフォディエステラーゼの活性阻害剤として0.5mM の IBMX を添加し細胞 1×10^6 当たりの cAMP 産生量を検討した．まず，予備実験として，cAMP 産生量の経時的な変化を調べた．cAMP は IBMX 添加30分後に最高値となり，以後漸減した．この成績より，IBMX 添加30分後の，cAMP 産生量で r-hGH の影響を比較することにした (図６－A). 0～5000ng/ml の r-hGH と0.5mM の IBMX 添加し30分後の cAMP 産生量は，50～58pmol/1×10^6cells で測定誤差範囲内と考えられる変動が見られたのみであり，r-hGH は IM-9 の cAMP 産生には影響をおよぼさないことが判明した (図６－B).

V．細胞内 Ca 濃度への影響

T細胞増殖因子である PHA 添加に対して PBL は＋76nM の Ca 濃度上昇が見られたが，B細胞である IM-9 の細胞内 Ca 濃度には影響をもたらさなかった．一方，B細胞増殖因子である SAC 添加では IM-9 の細胞内 Ca も 15nM 上昇した．しかし，PBL, IM-9 共に10～100ng/ml の r-hGH 添加に対して細胞内 Ca 濃度は変化を示さなかった (図７).

VI．GH 投与患者の末梢血液像の変動

GH 補充療法中の下垂体性小人症，ターナー症候群を対象として，GH 治療開始前，開始半年，１年，２年，３年後の赤血球数，ヘモグロビン，ヘマトクリット，白血球数，血小板数，血液像上の好中球，リンパ球の百分率を検討した．いずれについても有意な変動は見られなかった (表１).

VII．GH 投与患者の PBL サブセットへの影響

GH 治療中の下垂体性小人症19例，ターナー症候群５例，正常対照小児11例について，B細胞系の増殖に及ぼす GH の作用を検討するために，末梢リンパ球の表面マーカーを対比した (図８). 下垂体性小人症では対照群と有意の差はなく，ターナー症候群では CD16, CD57 のわずかな上昇傾向が見られた．しかしマーカーの性質上 GH 依存性変化とは考えられなかった．

考　　察

免疫系統組織の正常な発育，維持には GH が必要であることについては動物をモデルとして古くからの報告がある．すなわち①幼若マウスの胸腺の発育におよぼす GH の影響[13]，②免疫不全が出現した下垂体切除マウスに GH 投与を行ったところ免疫能の回復が見られた[14]，③抗 GH 抗体投与によって胸腺無形成を伴った瘠痩症候群が出現した[15]，④幼若マウスに GH 投与を行ったところ循環血液中のB細胞増加を伴った肝脾腫が出現した[16]，⑤成熟動物循環血液中のT細胞，B細胞の比率に GH が影響をもたらした[17]，⑥GH, prolactin (PRL) 分泌不全に対して bromocriptine 治療を行った成熟マウスに dinitro chlorobenzene 接触反応の低下が見られ，かつ，GH 治療により反応性が回復した，⑦胸腺の機能不全を伴った犬で GH 依存性の発育障害が見られた，⑧マウスやラットで下垂体切

除により NK 細胞活性の低下をもたらした[18)~20)]などの報告がある．

しかしヒトにおいては，低ガンマグロブリン血症を伴った家族性の GH 欠損症の兄弟例[21)]，GH 欠損に ataxia telangiectasia, X-linked hypogammaglobulinemia[22)]や慢性肉芽腫[23)]が合併したという症例報告が散見されるが，GH と免疫機構との間に直接的因果関係が示された例はなく，臨床的には現在なお結論がでていない．

一方，試験管内では，GH それ自体，および somatomedin を介する経路の両面から検討がなされている．(1)ヒト繊維芽細胞，ニワトリ胎繊維芽細胞が somatomedin 存在下で受ける影響，(2)ヒト動脈内皮細胞が GH 自体により増殖を示した，(3)Snell マウスでは GH 投与により脾での DNA，蛋白合成が促進した[24)]，などの報告がある．血球系の細胞では，GH がリンパ球に形態学的な変化をもたらしたとする Astaldi らの報告[6)]を始めとして，正常ヒトリンパ球[7)9)10)25)~27)]，T細胞性白血病細胞[7)]，胸腺組織[26)]，赤芽球細胞[29)]，等を用いて検討がなされている．また，IM-9 細胞[30)]やヒト末梢単核球[31)]に GH レセプターの存在することが報告されており，EB ウィルス感染細胞株にも GH の結合が認められた，あるいはT・B細胞白血病株に GH 結合能は認めないが，Insulinlike growth factor I 結合能のある細胞が高頻度に認めた[32)]，との報告もある．これらのことは，リンパ球の増殖過程に GH が何らかの形で関与していることを示唆するものであるが，実験条件の相違から相反する結論がもたらされているのが実情である．また，これらの報告はいずれも p-hGH によるものであり，r-hGH のリンパ球増殖に対する影響はまだほとんど検討されてはいない．また，GH の作用発現にかかわる細胞内の二次伝達物質の正体はいまだ謎とされている．

今回我々は以上の経緯を踏まえて，r-hGH の作用発現にかかわる因子について検討を試みた．p-hGH を用いた報告では GH が芽球化現象をもたらした[6)9)10)]，あるいはもたらさない[7)]という対立した意見があり，また，PHA 刺激によるリンパ球増殖を刺激[7)]または抑制する[9)10)]という意見がある．末梢血単核細胞の GH 受容体の存在そのものも論争中であるが，Kiess らの報告[31)]ではトリス緩衝液中に20°C 8～16時間の孵置を行うことにより末梢単核細胞（リンパ球と単球を含む）にも GH に特異的な結合を示す受容体を発現させるとしている．対立する意見の存在は，細胞の種類，増殖時期，測定条件の相違，あるいは GH 精製過程における何らか影響因子の混入の影響が考えられる．しかし r-hGH を用いた報告は，わずかに，組み換え型インターロイキン 2 (recombinant interleukin-2, rIL-2) 刺激によるリンパ球増殖に対して methyonyl-GH (m-GH) が 4 日間培養では何ら作用を及ぼさなかったという藤枝らの報告[33)]にとどまる．今回，著者らは，methyonyl 基をもたない r-hGH と下垂体抽出製剤を用いて，PBL に及ぼす GH の作用を検討したが，過去の報告とは異なり，図 1 に示したように r-hGH, p-hGH 共にリンパ球増殖に対する影響はなかった．PHA 刺激によるリンパ球増殖に対しては，r-hGH は作用を及ぼさなかったが，p-hGH は有意にこれを抑制した（図 2）．過去の，p-hGH によって [^{3}H]-TdR 摂取が促進した，あるいは LAL に対して p-hGH が [^{3}H]-TdR 摂取を抑制したという報告[9)10)]はいずれも Roos 法で精製された p-hGH を用いており，一方，今回我々が用いた Corpormon は Raben 法で精製された後，Roos 法で再精製を行ったもので精製過程の相違が結果に影響をおよぼした可能性がある．また，r-hGH が PHA 刺激下の PBL 抑制効果をもたらさなかったことは，インターロイキン 2 (interleukin-2, IL-2) が PHA の刺激作用を媒介する点から藤枝らの結果[33)]とは矛盾しない．r-hGH については1982年の Kabi 社（スウェーデン）の Somatonorm 以来年々高純度化されて来ており大腸菌菌体蛋白を含め現在，他の因子の影響はほとんど無視し得るものであろう．さらにT細胞，B細胞に対する GH 刺激作用を培養細胞モデルとして検討した．B細胞としてはかねてから GH 受容体の存在が証明されている IM-9 を用いた[30)]．T細胞系の MOLT-4 に対しては刺激作用を発揮しなかったが，B細胞系の IM-9 に対しては 100ng/ml の濃度をピークとして DNA 合成が促進された（図 3）．この差異は GH 受容体の有無によるものと考えられる．細胞増殖に必要な全ての成長因子を含有する FCS が濃度依存性に顕著な増殖促進作用を示すのに対し GH の刺激効果は軽度で約30％の増強に止まった．この点は GH がリンパ球増殖に必要な因子ではなく修飾因子であることを示すものと考えられる．次に GH 刺激機序について検討した．細胞における情報伝達系は情報伝達物質と対応する細胞膜受容体との結合から開始される．これらの情報伝達物質は細胞膜の脂質二重層を通過できないため細胞膜内で変換，増幅されて細胞内二次メッセンジャーに伝えられる．現在二次メッセンジャーとしては①アデニレートシクラーゼ活性化系②アデニレートシクラーゼ抑制系③イノシトールリン脂質代謝回転へ Ca 動員系④イオノフォア直結系⑤チロシンキナーゼ系が知られてい

る．しかしながら GH に関しては GH の GH 受容体結合以後の作用発現機構は全く不明である．そこで情報伝達系としての細胞内 Ca 濃度と cAMP 産生系についての影響を，GH 受容体を細胞膜上に有する IM-9 をモデルとして検討した．一般に cAMP を介するホルモンではその変動幅は数百培以上であるが IM-9 の cAMP 産生には r-hGH は何ら影響もおよぼさなかった (図6)．従って GH の二次メッセンジャーがアデニレートシクラーゼを介しているとは考え難い．

細胞内 Ca^{++} はすべての細胞において0.1μM 内外の非常に低いレベルに保たれており細胞内 Ca^{++} 濃度の上昇は多くの細胞で生理機能の活性化を引き起こす要因となる[34]．そこで細胞内 Ca^{++} 濃度の検討を行った．PBL は PHA に対し，IM-9 は SAC に対し明らかな Ca^{++} の上昇を示したが r-hGH は細胞内 Ca^{++} 濃度には直接的な影響をもたらさなかった (図7)．したがって，この系と直結するイノシトールリン酸系の関与も否定的である．今回その他の伝達機構について検討出来なかったが GH は今までに検討されて来た系とは全く異なった未知の経路を有するか，あるいはリンパ系細胞を用いることが GH の情報伝達機序を調べるうえで実験モデルとして不適当であるのかもしれない．

最後に生体内における長期的な作用について検討を加えたが，3年間に渡る GH 投与は，赤血球数，白血球数，ヘモグロビン，ヘマトクリット，血小板数，血液像上の好中球百分率，リンパ球百分率には影響を与えなかった．また，リンパ球表面マーカーにも GH 投与は大きな影響を示さなかった．GH 欠損患者の免疫系統の機序については①細胞性，液性免疫が正常もしくは異常であった[35)36)]，②GH 治療中一過性の変化を生じた[37)]，③GH 欠損患者でナチュラルキラー活性低下を認めた[38)]，④GH の直接的な免疫機能への影響は認めなかった[39)]，などの報告が見られる．我々の成績から，現時点では，正常末梢リンパ球に対する生理的量の GH 投与は，血液細胞に病的変化を誘導する可能性は少なく，特に r-hGH の影響は，p-hGH より更に少ないものと考えられる．しかし，GH 受容体を有する IM-9 細胞に対しては一定の生物学的活性をもつことから，長期間または過剰量の GH 投与が何らかの形で，幼若幹細胞の増殖過程を修飾する可能性は否定出来ない．

結　　論

1．r-hGH は PBL，T細胞系 MOLT-4 の DNA 合成に影響をおよぼさなかった．

2．r-hGH はリンパ球増殖に抑制的作用をもつ hGH 以外の因子を含有していると推定される．

3．特異的 GH 受容体を有するB細胞系 IM-9 では 10ng/ml 以上の r-hGH で DNA 合成促進効果が認められた．

4．r-hGH の DNA 合成促進効果は cAMP，Ca^{++} 伝達系を介さない．

5．GH 長期投与患者での検討から，生理的量の GH 投与が血液細胞の増殖文化に影響を与える可能性は少ない．

謝　　辞

稿を終えるに臨み，御指導と御校閲を賜りました恩師谷口昂教授に深甚なる謝意を表します．また終始直接御指導頂きました佐藤　保助教授に心から感謝致します．併せて本研究遂行に多大な御協力を頂きました小児科内分泌グループ，並びに教室員の皆様に深く感謝致します．最後に本研究のために貴重な細胞株を提供して頂きました JCRB 細胞バンクに心から御礼申し上げます．

なお，本論文の要旨は第22回日本小児科内分泌学会 (於名古屋，1988) にて発表した．

文　　献

1) **Maraz, A. & Petri, Ildiko:** Inhibition of lymphocyte DNA synthesis. Lancet, I, 212 (1973).

2) **Snow, E. C., Feldbush, T. L. & Oaks, J. A.:** The role of insulin in the response of murine T-lymphocytes to mitogenic stimulation in vitro. J. Immunol, **124,** 739-744 (1980).

3) **Snow, E. C., Feldbush, T. L. & Oaks, J. A.:** The effect of hGH and insulin upon MLC response and the generation of cytotoxic lymphocytes. J. Immunol., **126,** 161 (1981).

4) **Souweine, G., Danel, L., Costa, O., Tubiana, N., Martin, P., Monier, J. C. & Saez, S.:** Effect of physiological concentrations of sex hormones on the formation of «early» sheep red blood cell rosettes by human lymphocytes. Possible relations with the presence of sex-hormone-cytosol-receptors in lymphocytes. Biomedicine, **33,** 150-152 (1980).

5) **Van-Buul-Offers, S. & Den Brande, J. L.:** Effect of growth hormone and peptide fractions containing somatomedin activity on growth and cartilage metabolism of Snell dwarfmice. Acta Endocrinol., **92,** 242-257 (1979).

6) **Astaldi, A. Jr., Yalcin, B., Meardi, G.,**

Burgio, G. R., Nerolla, R. & Astaldi, G.: Effect of growth hormone on lymphocyte transformation in cell culture. Blut, **26,** 74-81 (1973).

7) **Mercola, K. E., Cline, M. J. & Golde, D. W.:** Growth hormone stimulation of normal and leukemic human T-lymphocyte proliferation in vitro. Blood, **58,** 337-340 (1981).

8) **Thieriot-Prevost, G. & Schimpff, R. M.:** Mesur de l'incorporation de thymidine tritiee dans le lymphocyte active et activite somatomedine du serum. C. R. Acad. Sc. Paris, **290,** 527-530 (1980).

9) **Kiess, W., Holtmann, H., Butenandt, O. Eife, R.:** Modulation of lymphoproliferation by human growth hormone. Eur. J. Pediatr., **140,** 47-50 (1983).

10) **Schimpff, R. M. & Repellin, A. M.:** In vitro effect of human growth hormone on lymphocyte transformation and lymphocyte growth factors secretion. Acta Endocrinol., **120,** 745-752 (1989).

11) **Watanabe, S., Tsunematsu, Y., Fujimoto, J. & Komiyama, A.:** Leukemia in patients treated with growth hormone. Lancet, I, 1159 (1988).

12) **Eastman, R. C., Lesniak, M. A., Roth, J., De Meyts, P. & Gorden, P.:** Regulation of receptor by homologous hormone enhances sensitivity and broadens scope of radioreceptor assay for human growth hormone. J. Clin. Endocrinol. Metab., **49,** 262-268 (1979).

13) **Pierpaoli, W., Fabris, N. & Sorkin, E.:** Hormones and the immune response. In Wolstenholme, G. E. W. & Knight, J. (eds.), Chiba Foundation Publication, No. 36, 1st ed., p126-153, Churchill, London, 1970.

14) **Pierpaoli, W., Baroni, C., Fabris, N. & Sorkin, E.:** Hormones and immunological capacity: II. Reconstitution of antibody production in hormonally deficient mice by somatotrophic hormone, thyrotrophic hormone and thyroxin. Immunology, **16,** 217-230 (1969).

15) **Pierpaoli, W. & Solkin, E.:** Hormones and immunologic capacity.: I. Effect of heterologous anti-growth hormone (ASTH) antiserum on thymus and peripheral lymphatic tissue in mice. Induction of a wasting syndrome. J. Immunol., **101,** 1036-1043 (1963).

16) **Van-Bull-Offers, S., Van den Brande, J. L., Dumoleijn, L., Feijlbrief, M., Hoogerbrugge, C. M. & Van de Klundert, P. L. M.:** Cellular growth in organs of dwarf mice during treatment with growth hormone, thyroxine and plasma fractions containing somatomedin activity. Acta Endocrinol., **99,** 150-160 (1982).

17) **Dumont, F., Robert, F. & Bischoff, P.:** T and B lymphocytes in pituitary dwarf Snell-Bagg mice. Immunology, **38,** 23-31 (1979).

18) **Saxena, Q. B., Saxena, R. K. & Adler, W. H.:** Regulation of natural killer activity in vitro: III. Effect of hypophysectomy and growth hormone treatment on the natulal killer activity of the mouse spleen cell population. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., **67,** 169-174 (1982).

19) **Forni, G., Bindoni, M., Santoni, A., Bellnardo, N., Marchese, A. F. & Giovarelli, M:** Radiofrequency destruction of the tuberoinfundibular region of hypothalamus permanently abrogates NK cell activity in mice. Nature, **306,** 181-184 (1983).

20) **Cross, R. J., Markesbery, W. R., Brooks, W. H. & Rostman, T. L.:** Hypothalamic-immune interactions: Neuromodulation of natural killer activity by lesioning of the anterior hypothalamus. Immunology, **51,** 399-405 (1984).

21) **Fleisher, T. A., White, R. M., Broder, S., Nissley, S. P., Blaese, R. M., Mulvihill, J. J., Olive, G. & Waldman, T. A.:** X-linked hypogammaglobulinemia and isolated growth hormone deficiency. N. Engl. J. Med., **302,** 1429-1434 (1980).

22) **Ammann, A. J., Duquesoy, R. J. & Good, R. A.:** Endocrinological studies in ataxiatelangiectasia and other immunological deficiency diseases. Clin. Exp. Immunol., **6,** 587-595 (1970).

23) **Buescher, E. S. & Gallin, J. I.:** Stature and weight in chronic granulomatous disease. J. Pediatr., **104,** 911-913 (1984).

24) **Van-Buul-Offers, S. C., Dumoleijn, L., Feylbrief, M., Hoogerbrugge, C., Vandeclundert, P. & Van den Brande, J. L.:** Effect of growth hormone and peptide fractions containing somatomedin activity on growth and cartilage metabolism of Snell dwarfmice. Acta Endocrinol., **92,** 242-257 (1979).

25) **Thieriot-Prevost, G. & Schimpff, R. M.** A

hormonally controlled serum factor stimulating the thymidine uptake into lectin-activated lymphocytes. Acta Endocrinol., **98**, 358-363 (1981).

26) **Schimpff, R. M., Repellin, A. M., Salvatoni, A., Thieriot-Prevost, G. & Chatelain, P.:** Effect of purified somatomedins on thymidine incorporation into lectin activated human lymphocytes. Acta Endocrinol., **102**, 21-26 (1983).

27) **Schimpff, R. M., Bozzola, M. & Zapf, J.:** Serum thymidine activity and insulin-like growth factors in neonatal period. Acta Endocrinol., **110**, 140-144 (1985).

28) **Arrenbrecht, S.:** Specific binding of growth hormone to thymocytes. Nature, **252**, 255-257 (1974).

29) **Golde, D. W. & Bersch, N.:** Growth hormone: Species-specific stimulation of erythropoiesis in vitro. Science, **196**, 1112-1113 (1977).

30) **Lesniak, M. A., Roth, G. P. & Gavin III J. R.:** Binding of ^{125}I-human growth hormone to specific receptors in human cultured lymphocytes. Characterization of the interaction and a sensitive radioreceptor assay. J. Biol. Chem., **249**, 1661-1667 (1974).

31) **Kiess, W. & Butenandt, O.:** Specific growth hormone receptors on human peripheral mononuclear cells: Reexpression, identification, and characterization. J. Clin. Endocrinol. Metab., **60**, **740-745 (1985).**

32) **Lee, P. D. K., Rosenfeld, R. O., Hintz, R. L. & Smith, S. D.:** Characterization of insulin, insulin-like growth factors I and II, and growth hormone receptors on human leukemic lymphoblasts. J. Clin. Endocrinol. Metab., **62, 28-35 (1986).**

33) **藤枝幹也，荒木久美子，脇口　宏，倉繁隆信：**成長ホルモンのリンパ球増殖に及ぼす影響について．研究年報，**12**, 255-267頁，成長科学協会，東京，1988.

34) **河西春郎：**細胞膜の Ca チャンネルと GTP 結合蛋白質．実験医学，**6**, 1145-1150 (1988).

35) **Gupta, S., Fikrig, S. M. & Noval, M. S.:** Immunological studies in patients with isolated growth hormone deficiency. Clin. Exp. Immunol., **54**, 87-90 (1983).

36) **Abbassi, V. & Bellanti, J. A.** Humoral and cell-mediated immunity in growth hormone-deficient children: Effect of therapy with human growth hormone. Pediatr. Res., **19**, 299-301 (1985).

37) **Rapaport, R., Oleske, J, Ahdieh, H., Solomon, S., Delfaus, C. & Denny, T.:** Suppression of immune function in growth hormone-deficient chirdren during treatment with human growth hormone. J. Pediatr., **109**, 434-439 (1986).

38) **Kiess, W., Doerr, H., Eisl, E., Butenandt, O. & Belohradsky, B. H.:** Lymphocyte subsets and natural-killer activity in growth hormone deficiency. N. Engl. J. Med., **314**, 321 (1986).

39) **Kiess, W., Malozowski, S., Gelato, M., Butenand, O., Doerr, H., Crisp, B., Eisl, E., Maluish, A. & Belohradsky, B. H.:** Lymphocyte subset distribution and natural killer activity in growth hormone deficiency befor and during short-turm treatment with growth hormone releasing hormone. Clin. Immunol. Immunopath., **48**, 85-94 (1988).

Studies on Biological Activities of Growth Hormone. II. Effect of Growth Hormone on Peripheral Lymphocytes and IM-9 Cells

Makoto Shimizu, Depertment of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920
—J. Juzen Med. Soc., 99, 517—528 (1990)

Key words pituitary human growth hormone, recombinant human growth hormone, lectine-activated lymphocytes, cyclic AMP, calcium ion channel

Abstract

Recently clinical attention has been focused on the relatively high incidence of leukemia in children treated with human growth hormone (hGH), but controversial findings have been reported on the biological action of hGH on blood cells and lymphoid tissues. The present study was undertaken to elucidate the effects of pituitary hGH (p-hGH) and recombinant hGH (r-hGH) on lymphocyte proliferation in vitro and in vivo, as well as changes in cAMP content and intracellular Ca^{++} concentration, after hGH stimulation. The results were as follows: (1) [^{3}H]-thymidine ([^{3}H]-TdR) incorporation into the peripheral blood lymphocytes (PBL) was not affected by varying doses of p-hGH nor r-hGH, but under phytohemaggulutinin stimulation, the [^{3}H]-TdR uptake was significantly suppressed by p-hGH but not by r-hGH; (2) the DNA synthesis of B cell-derived IM-9 cells was stimulated by 30% over 10 ng/ml of r-hGH, while that of T cell-derived MOLT-4 cells was not affected; (3)IM-9 cells had specific binding sites for [^{125}I]-hGH with IC_{50} 5 ng/ml, whereas MOLT-4 and PBL had no appreciable GH-binding sites; (4) neither cAMP production or intracellular Ca^{++} concentration in IM-9 cells was influenced by r-hGH stimulation, and (5) peripheral lymphocyte subsets including CD2, CD3, CD4, CD8, CD20, Ia, CD16 and CD57 in 19 patients with pituitary dwarfism and 5 with Turner's syndrome receiving long- term hGH treatment were not significantly different from those in normal children. The red blood cell and leukocyte count, hemoglobin concentration, hematocrit, platelet conut and percentage of neutrophiles and lymphocytes did not change during the 3 years of hGH therapy. These results indicate that (1) remarkable changes in proliferation and differentiation of lymphocytes does not occur by the physiological and therapeutic dose of r-hGH administration in vivo, and (2) hGH may modify the proliferation of B lymphoblast expressing hGH receptor, at an excessively high dosage.