LH-RH刺激に対する糖タンパクホルモンの 遊離型 α サブユニットの分泌動態

—性腺機能不全ならびに異所性 α -サブユニット産生腫瘍を中心として—

神戸大学医学部産科婦人科学教室

浜 本 保, 西 村 隆一郎
足 高 善 彦, 東 條 伸 平

The Response of Free α -subunit of Glycoprotein
Hormones to LH-RH Administration

**Tamotsu HAMAMOTO, Ryuichiro NISHIMURA,
Yoshihiko ASHITAKA and Shimpei TOJO**

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kobe University, School of Medicine,
Kobe, Japan

The responses of immunoreactive free α -subunit of glycoprotein hormones to LH-RH administration were studied in normal men and women, and in patients with hypergonadotropic hypogonadism, hypogonadotropic hypogonadism, trophoblastic disease and isolated ectopic α -subunit producing tumor.

In patients with hypergonadotropic hypogonadism, basal levels of serum α -subunit were elevated and the responses to LH-RH were also excessive compared to those of normal men and women. Conversely, in hypogonadotropic hypogonadism, basal levels of α -subunit were significantly low and its response to LH-RH was barely detectable.

The response of α -subunit to constant intravenous infusion of LH-RH ($1\mu\text{g/kg/h}$) was studied in 4 normal men. Both LH and α -subunit revealed biphasic patterns of elevation. Its releasing pattern suggests the possibility that two pools of gonadotropin are involved in the production and secretion of α -subunit.

In patients with trophoblastic disease secreting low levels of hCG (18mIU/ml), the responses of α -subunit as well as pituitary gonadotropin to LH-RH were normal. However, in cases of high concentrations of hCG (1000mIU/ml), the responses of α -subunit and gonadotropin were suppressed.

After the administration of LH-RH to a patient with an isolated ectopic α -subunit producing tumor, the serum concentration of pituitary gonadotropin increased within the normal range, although that of α -subunit did not show a significant change.

These results suggest that the production of α -subunit by tumors may be autonomous in contrast with a regulatory production in the pituitary.

緒 言

下垂体性糖蛋白ホルモンである黄体化ホルモン (LH), 卵胞刺激ホルモン (FSH), 甲状腺刺激ホルモン (TSH) ならびにヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) は, α , β 2つのサブユニットの非共有結合により構成されている^{1) 18) 22) 24)}。従来より指摘されていたこれら糖蛋白ホルモン間の共通抗原性は, それぞれの α サブユニットのアミノ酸組成が, 相互に極めて類似していることで理解されている¹⁹⁾。

近年, 正常あるいは種々の病時状況において, 完全型糖蛋白ホルモンとは別に, 遊離型 (フリー) サブユニットが, 組織中, 血中, 尿中に存在していることが明らかになってきている^{1) 2) 9) 13) 14) 20)}。

胎盤では hCG- α , β それぞれを合成する mRNA が別個に同定され, hCG の生合成が両サブユニットの生成を介して行なわれるものと推定されている⁴⁾。また, 下垂体でも, 組織ホモゲネート中にフリーサブユニットが存在しており, また, LH-RH 刺激により, LH, FSH などとともに, フリー α サブユニットも放出されることが明らかにされ, 下垂体においては, この糖蛋白ホルモンの生合成におけるサブユニットの関与が考えられている⁸⁾。

われわれは, 正常人ならびに各種内分泌疾患をもつ患者において, LH-RH 刺激下でのフリー α サブユニットの動態を, 完全型ホルモンと同時に測定し, 糖蛋白ホルモン生合成におけるサブユニットの関与, また, その分泌動態について検討してみた。

実 験 方 法

正常月経周期婦人 (卵胞期), 成人健康男子, 多嚢胞卵巣症候群 (Polycystic ovary syndrome: PCO), Sheehan 症候群, 絨毛癌, 異所性 α サブユニット産生腫瘍を対象とした。成人男子例には, LH-RH (LH-RH 田辺) を輸液ポンプを用いて $1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ の速度で 4 時間の持続静注を行ない, 10 分間隔で採血した。他の症例には, LH-RH $100\mu\text{g}$ の一回静注を行ない, 静注前, 静注後 15 分, 30 分, 60 分, 120 分に採血した。採取した血液から血清を分離したのち, これを測定まで -20°C で保存した。

hCG 及びフリー α サブユニットの測定は, 既報の二抗体法ラジオイムノアッセイによった¹⁷⁾。最も問題となる LH との交叉率は, hCG- α RIA 系で, 蛋白量表示により, LER960 で 10%, LER907 では 1% 以下であった。多量の LH が存在する場合には, 干渉量を交叉率より計算し, 除外したうえでフリー α サブユニットの単独量とした²⁾。また, LH, FSH はそれぞれ栄研 RIA キットを用いて測定した。

血中に hCG, LH, フリー α サブユニットの混在する絨毛癌症例では, LH-RH 刺激前後の血清のそれぞれ 1ml ずつにつき Sephadex G-100 によるゲル濾過を行ない, 各溶出分画について, hCG 免疫活性は hCG- β RIA, LH 免疫活性は hCG RIA, フリー α サブユニットは hCG- α RIA により測定した。この場合カラムサイズを $1.5 \times 90\text{cm}$ とし, 0.05M sodium phosphate buffer pH 7.4 で十分に緩衝化後, 4°C , 流速 $10\text{ml}/\text{h}$ でゲル濾過を行ない, 2.5ml 分画を採取した。

結 果

1) 正常月経周期婦人 (卵胞期)

LH-RH 刺激によって血中 LH, FSH はもとより, フリー α サブユニットの増加を認めた。これは, 15~30 分後にピークに達し, その後, 減少した。それぞれの増加率を比べると, フリー α サブユニットのそれが最も高値であった (Fig. 1)。

Fig. 1. The responses of free α -subunit, LH and FSH to LH-RH administration in the women of normal menstrual cycle.

Fig. 2. The responses of free α -subunit, LH and FSH to LH-RH administration in the patients with polycystic ovary syndrome.

2) 多嚢胞卵巣症候群 (Polycystic ovary syndrome: PCO)

2例とも組織学的にPCOと確認された症例である。LHと同様に、フリー α サブユニットの基礎値も高く(4ng/ml, 3ng/ml)、また、LH-RH刺激による反応性も過剰に認められ、ピーク値では26ng/ml, 23ng/mlに達した (Fig. 2)。

3) Sheehan 症候群

フリー α サブユニットの基礎値は低く、また、LH-RH刺激に対する反応性も低下していた (Fig. 3)。

Fig. 3. The responses of free α -subunit, LH and FSH to LH-RH administration in the patient with Sheehan's syndrome.

Fig. 4. The responses of free α -subunit and hCG to LH-RH administration in the patient with choriocarcinoma secreting low level of hCG.

Fig. 5. The responses of free α -subunit and hCG to LH-RH administration in the patient with choriocarcinoma secreting high level of hCG.

4) 絨毛癌症例

3例の絨毛癌症例にLH-RH刺激を行なった成績を (Fig. 4, 5) に示す。血中hCGの基礎値は、hCG- β RIA系でそれぞれ18mIU/ml, 25mIU/ml, 1000mIU/mlであった。

hCG値が低値の2症例では、LH-RH刺激前後で、血中hCG値に変化は認めなかったが、LH及びフリー α サブユニットの増加を認めた (Fig. 4)。また、hCG高値の症例では、LH-RH刺激後も、hCG値、フリー α サブユニット濃度のいずれにも変化は認めなかった (Fig. 5)。

hCG値が18mIU/mlの症例について、LH-RH刺激前後の血清につきSephadex G-100ゲル濾過を行なった成績では、負荷後、 125 I-LH、 125 I-hCG- α の溶出部位における免疫活性の増加が認められたのに反し、 125 I-hCGの溶出部位のそれには、負荷前後で有意の変化を認めなかった (Fig. 6)。

Fig. 6. The elution profile of sera before and after LH-RH administration in gel chromatography on Sephadex G-100.

Fig. 7. Serum concentration of free α -subunit, LH and FSH before and during LH-RH constant infusion in the normal men.

Fig. 8. The responses of free α -subunit, LH and FSH to LH-RH administration. Case 1; isolated ectopic α -subunit producing tumor. Case 2; rectal cancer secreting high level of free α -subunit and LH.

5) 健康成人男子例

静注開始後より、LH、FSHとともにフリー α サブユニットの増加を認めた。LHは40分後にピークに達し、漸減したが、その後再び上昇する傾向を示した。FSHは注入開始後やや増加したのみで、その後大きな変動は示さなかった。

一方、フリー α サブユニットは、注入開始後30分でピークに達したのち、急激に減少した。その後LHが減少しつつづけている90分後より再び増加し、240分後まで漸増傾向を示した (Fig. 7)。

6) 異所性 α サブユニット産生腫瘍例

Case 1は、32歳女性で、大腿内側部に原発したと思われる未分化癌の患者である。血中、尿中に大量のフリー α サブユニットを認め、免疫組織化学的な検討などにより、異所性 α サブユニット単独産生腫瘍と診断された。本症例にLH-RH刺激を行なうと、LHやFSHの増加は認められたが、フリー α サブユニットは増加せず、むしろ減少傾向が認められた。

Case 2は、40歳女性で、直腸癌の症例である。血中フリー α サブユニットは14ng/mlと高値を示し、異所性 α サブユニット産生腫瘍を疑わせた。LH-RH刺激を行なうと、基礎値の高かったゴナドトロピンは、負荷後、更に過剰反応を示し、血中フリー α サブユニットも35ng/mlのピークとなった。なお、免疫組織化学的検索でも、腫瘍組織内に α サブユニットの局在を認めなかった (Fig. 8)。

考 察

1) 正常月経周期婦人

LH-RH 100 μ gの静脈内投与により、末梢血中で、LH、FSHとともにフリー α サブユニットの増加が認められた。しかも、その増加率は、LHやFSHに比して大であった。すでに、LH-RH刺激によって下垂体からフリー α サブユニットが分泌されることが報告されており⁸⁾、今回の成績でも、ゴナドトロピンに比べ、 α サブユニットのLH-RH刺激後の増加率が高いことや、またその放出ピークがより早期におこる場合が多いことから、末梢血中のフリー α サブユニットは、ゴナドトロピンの血中分解産物ではなく、下垂体より独立して放出されているものと考えられた。

2) 性腺機能不全例

血中フリー α サブユニット濃度を測定した諸家の報告をみると、高濃度のLHやFSHが分泌されている場合には、フリー α サブユニットも高値を示すという成績^{13) 24)}と、逆に、低値となるという報告とがある²⁵⁾。今回のわれわれの結果では、"hypergonadotropic"な状態では、その基礎値は高く、反応性も著明であり、また逆に、"hypogonadotropic"な状態では、基礎値、反応性のいずれもが低下しており、ゴナドトロピン産生の機構へのサブユニットの関与が推定された。

3) 成人健康男子 (LH-RH持続静注例)

LH-RHの静脈内持続投与を行なうと、LHのみではなく、フリー α サブユニットも2つのピークを示して推移した。従来より、LH-RHを持続的に投与すると、LHには2つのピークが認められており⁵⁾、Yen¹²⁾らは下垂体においてPool 1(放出)、Pool 2(合成・貯蔵)という2つの機能的なプールを想定し、これによって血中での2つのピークが出現すると説明している。

LH-RH静注を開始すると、フリー α サブユニットもLHの第一のピークにはほぼ一致してピークをつくったので、 α サブユニットにも放出のためのプールが存在すると推定される。この第一のピークのあと、フリー α サブユニットは急激に低下するし、LHもこれに伴って低下するが、 α サブユニットの低下がより急峻であるのは、その血中半減期がLHのそれに比べて短いためと考えられる⁶⁾。

α サブユニットはその後徐々に増加するが, LH の増加傾向が認められるようになるには, 更に時間を要する。このフリー α サブユニットの第二のピークを, Yen らの第二のプールとアナロジーに考えると, LH-RH によって, この第二のプールから第一のプールへの移動がおり, フリー α サブユニットの第二のピークの形成がなされ, また一方で, LH の前駆物質としてのフリー α サブユニットの LH 合成への動員がおり, LH の第二のピークを形成するのではなかろうかと推定される。

4) 絨毛性疾患例

絨毛性疾患患者血中には, hCG とは別に, フリーの α サブユニットも存在し, その血中動態を知ることが臨床的に腫瘍マーカーとして有用であることを既に Nishimura¹⁷⁾ は明らかにしている。しかしながら, α サブユニットが糖蛋白ホルモンの共通部分であるため, 腫瘍性 α サブユニットが低濃度になると下垂体性 α サブユニットとの鑑別が問題となる。In vitro では, 絨毛組織は LH-RH 刺激によって hCG やサブユニットの放出が促進されることが明らかにされているが, このような実験では非生理的濃度の大量の LH-RH が用いられており, 生体内現象としてはかかる現象の成立は考え難い³⁾。そこで in vitro で下垂体性ゴナドトロピンやフリー α サブユニットの分泌を惹起させるに充分量である 100 μ g の LH-RH の静注が, 絨毛組織や腫瘍組織に対してどのような影響を与えるかについて検討した。

絨毛性疾患症例のうち, 血中 hCG 値が 1000 mIU/ml のものでは, LH-RH 刺激を行っても血中下垂体性ゴナドトロピンやフリーの α サブユニット濃度に変化はみられず, これは, 高濃度 hCG の下垂体に対する negative feedback のためと理解できるし¹⁸⁾, 血中 hCG 濃度にも変化はみられないことから, 絨毛組織はこの外因性 LH-RH に対して反応しないものと考えられる。一方, 低単位 hCG の 2 症例では, LH-RH 刺激により, 下垂体性ゴナドトロピンの放出が明らかに認められ, 下垂体は hCG による negative feedback を受けていないものと考えられる。また hCG 値は LH-RH 刺激後も有意の増加をみないことから, ここで増加して来たフリーの α サブユニットは, 絨毛組織由来のものではなく, 下垂体由来であろうと推定される。

5) 異所性 α サブユニット産生腫瘍

近年, hCG のみならずフリーの α サブユニットがさまざまな腫瘍組織で産生分泌されることが明らかにされている²¹⁾。また HeLa 細胞をはじめとした培養細胞が α サブユニットのみを産生・分泌することも報告され, Lieblisch¹⁹⁾ らは, 細胞の腫瘍化や継代培養に伴い, α サブユニット合成遺伝子の derepression が起こるものと推定している。Dosogne-Guerin⁷⁾ は, 種々の腫瘍患者について, 2.4 ng/ml 以上を異常値として血中のフリー α サブユニットの免疫活性を調べ, 良性腫瘍で 17%, 悪性腫瘍では 21% の陽性率を報告した。しかしながら, 今回, PCO 症例や直腸癌患者症例で示したように, 下垂体性 free α サブユニット濃度が 20 ng/ml 以上を示す場合があり, 単に血中フリー α サブユニット濃度の免疫学的測定結果のみで異所性 α サブユニット産生腫瘍と判定することには問題があると考えられる。従ってわれわれは異所性 α サブユニット産生腫瘍の検索には, 少なくとも次の点に留意する必要があると考えている。

- 1) LH-RH 刺激に対して, ゴナドトロピンの正常な反応があるにもかかわらず, サブユニットの増加が認められない。
- 2) 性ステロイドなどによる下垂体性ゴナドトロピン分泌能の抑制下でもフリーの α サブユニットの分泌抑制がおこらない。
- 3) 免疫組織化学的に腫瘍組織内に α サブユニットの局在が認められる。
- 4) 臨床経過と血中におけるフリーの α サブユニット動態が平行している

結 語

LH-RH 刺激下での末梢血中 LH, FSH, hCG ならびにフリー α サブユニットの分泌動態を検討して、以下の成績が得られた。

- 1) LH-RH 刺激により、末梢血中にフリー α サブユニットが増加することが認められ、これは LH や FSH とは別個に独立して下垂体より放出されているものと考えられた。
- 2) LH-RH 持続静注により、LH のみではなくフリー α サブユニットにも 2 つのピークが認められ、 α サブユニットに関しても Yen らのいうように、下垂体で 2 つの機能的プールが存在することが推定された。
- 3) Hypergonadotropic な状態では、フリー α サブユニットの基礎値は高く、また LH-RH 刺激に対しても過剰反応を呈したが、hypogonadotropic な状態では、いずれも低下しており、ゴナドトロピン産生の機構へのサブユニットの関与が推定された。
- 4) 絨毛性疾患々々や、異所性 α サブユニット産生腫瘍患者に LH-RH 負荷試験を行なっても血中 hCG やフリー α サブユニット濃度に変化が認められないことから、腫瘍組織内でのこれらの自律的な産生・分泌がうかがわれた。更に、これらの患者に LH-RH 負荷試験を行なうことは、 α サブユニットの由来を知るうえで、すなわち腫瘍の性格を解析するために有用であると考えられた。

本研究の一部は文部省科研費 No. 00548285 (1980), No. 56770726 (1981) に負うものである。

なお、本論文の要旨は、第53回日本内分泌学会秋期大会（昭和55年10月・大阪）において発表した。

文 献

- 1) Ashitaka, Y., Nishimura, R., Endoh, Y. and Tojo, S.: Subunits of human chorionic gonadotropin and their radioimmunoassays. *Endocrinol. Japon.*, 21: 429–435, 1974.
- 2) Ashitaka, Y., Nishimura, R., Futamura, K., Ohashi, M. and Tojo, S.: Serum and chorionic tissue concentration of human chorionic gonadotropin and its subunits during pregnancy. *Endocrinol. Japon.*, 21: 547–550, 1974.
- 3) Ashitaka, Y., Nishimura, R., Takemori, M. and Tojo, S.: Production and secretion of hCG and hCG subunits by trophoblastic tissue. *Chorionic Gonadotropin*, 147–175, Ed. by J. Segal, Plenum Press. New York and London.
- 4) Boime, I., Landefeld, T., McQueen, S. and McWilliams, D.: The biosynthesis of chorionic gonadotropin and placental lactogen in first- and third-trimester human placenta. *Structure and function of gonadotropin*, 235–258, Ed. by McKerns, K.W., et al. Plenum Press. New York.
- 5) Bremner, W.J. and Plaulsen, C.A.: Two pools of luteinizing hormone in the human pituitary: evidence from constant administration of luteinizing hormone-releasing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 39: 811–815, 1974.
- 6) Braunstein, G.D., Vaitukaitis, J.L. and Ross, C.T.: The in vivo behavior of human chorionic gonadotropin after dissociation into subunits. *Endocrinology*, 91: 1030–1036, 1972.
- 7) Dosogne-Guerin, M., Stolarczyk, A. and Borkowski, A.: Prospective study of the alpha and beta subunit of hCG in the blood of patient with various benign and malignant tumors. *Europ. J. Cancer*, 14: 525–532, 1978.
- 8) Edmonds, M., Molitch, M., Pierce, J.G. and Odell, W.D.: Secretion of alpha subunit of human luteinizing

hormone by anterior pituitary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 41: 555, 1975.

- 9) Francimont, P., Gaspard, V., Reuter, A. and Heynen, A.: Polymorphism of protein and polypeptide hormones. *Clin. Endocrinol.*, 1: 315–336, 1972.
- 10) Hagen, C. and McNeilly, A.S.: Identification of human luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, luteinizing hormone beta subunit and gonadotropin alpha subunit in foetal and adult pituitary. *J. Endocrinol.*, 67: 49–57, 1975.
- 11) Hartree, A.S., Thomas, M., Braikévitch, M., Christie, D.W., Spaul, G.V., Taylor, R. and Pierce, J.G.: Preparation and properties of subunits of human luteinizing hormone. *J. Endocrinol.*, 51: 169–180, 1971.
- 12) Hoff, J.G., Lasley, B.L., Wang, C.F. and Yen, S.C.C.: The two pools of pituitary gonadotropin: regulation during pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 44: 302–312, 1977.
- 13) Kourides, I.A., Weintraub, B.J., Ridgway, E.C. and Maloof, F.: Pituitary secretion of free alpha and beta subunits of human thyrotropin in patients with thyroid disorders. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 40: 872–879, 1975.
- 14) La Burthe, M.C., Dolais, J.R. and Rosselin, G.E.: Evidence for circulating alpha subunit of pituitary gonadotropin in plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 37: 156–159, 1973.
- 15) Liebllich, J.M., Weintraub, B.D. and Rosen, S.W.: HeLa cells secrete alpha subunit of glycoprotein tropic hormones. *Nature*, 260: 530–532, 1976.
- 16) Miyake, A., Tanizawa, O., Aono, T., Yasuda, M. and Kurachi, K.: Suppression of luteinizing hormone in castrated women by the administration of human chorionic gonadotropin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 43: 928–932, 1976.
- 17) Nishimura, R., Ashitaka, Y. and Tojo, S.: The clinical evaluation of the simultaneous measurements of human chorionic gonadotropin and its alpha subunit in sera of patient with trophoblastic diseases. *Endocrinol. Japon.*, 26: 575–583, 1970.
- 18) Pierce, J.G., Liao, T., Howard, S.M., Shome, B. and Cornell, J.S.: Studies on the structure of thyrotropin: its relationship to luteinizing hormone. *Recent. Prog. Horm. Res.*, 27: 165–212, 1971.
- 19) Pierce, J.G.: The subunits of pituitary thyrotropin: their relationship to other glycoprotein hormones. *Endocrinology*, 89: 1331–1334, 1971.
- 20) Prentice, L.J. and Ryan, R.J.: LH and its subunits in human pituitary and urine. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 40: 303–312, 1975.
- 21) Rosen, S.W. and Weintraub, B.D.: Ectopic production of the isolated alpha subunit of the glycoprotein hormones: a quantitative marker in certain cases of cancer. *N. Engl. J. Med.*, 290: 1441–1447, 1974.
- 22) Saxena, B.B. and Rathnum, P.: Dissociation phenomenon and subunit nature of follicle-stimulating hormone from human pituitary. *J. Biol. Chem.*, 246: 3549–3554, 1971.
- 23) Styne, D.M., Kaplan, S.L. and Grumbach, M.M.: Plasma glycoprotein hormone alpha-subunit in the neonate and in prepubertal and in pubertal children: effects of luteinizing hormone-releasing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 50: 450–455, 1980.
- 24) Swaminathan, N. and Bahl, O.P.: Dissociation and recombination of the subunits of human chorionic gonadotropin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 40: 422–427, 1970.
- 25) 山路 徹: 糖蛋白ホルモンの α サブユニットに関する知見, ホルモンと臨床 23: 9–14, 1975.

(受付日: 56.12.2)