



## Studies on Gene Expression in Calvaria and Serum Levels of Insulin-Like Growth Factor- I and Bone Gla Protein in the methimazole-Induced Congenital Hypothyroid Rat

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 竹内, 浩視 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1000">http://hdl.handle.net/10271/1000</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 147号	学位授与年月日	平成 5年 3月26日
氏名	竹内浩視		
論文題目	<p>Studies on Gene Expression in Calvaria and Serum Levels of Insulin – Like Growth Factor-I and Bone Gla Protein in the Methimazole – Induced Congenital Hypothyroid Rat                      (メチマゾール投与による先天性甲状腺機能低下症ラットにおけるインスリン様成長因子-I(IGF-I)および bone gla protein の頭蓋骨における遺伝子発現および血清中濃度に関する研究)</p>		

医学博士 竹内浩視

論文題目

Studies on Gene Expression in Calvaria and Serum Levels of Insulin-Like Growth Factor-I and Bone Gla Protein in the Methimazole-luduced Congenital Hypothyroid Rat (メチマゾール投与による先天性甲状腺機能低下症ラットにおけるインスリン様成長因子-I (IGF-I) および bone gla protein の頭蓋骨における遺伝子発現および血清中濃度に関する研究)

論文の内容の要旨

【目的】 甲状腺ホルモン (TH) は小児期の成長・発達に必須で、無治療の先天性甲状腺機能低下症では、成長ホルモン (growth hormone : GH) 分泌不全が合併しやすく、GH分泌状態を反映する末梢血中のインスリン様成長因子-I [insulin-like growth factor-I (IGF-I)] は低値で、著しい成長障害を呈する。しかしながら、骨組織の成長に対する IGF-I の作用は、肝臓で産生された IGF-I が循環系を介して働く、いわゆる内分泌 (endocrine) による作用よりも、局所における自己分泌 (autocrine) もしくは傍分泌 (paracrine) による作用が重要である可能性が示唆されている。一方骨形成時の石灰化に先行して骨芽細胞より産生される bone gla proteint (BGP ; 別名 オステオカルシン) は、骨代謝回転の判定に特異的で有用な指標とされ、その発現はTHおよびGHなどの影響を受けることが知られているが、生後早期の種々の病態下の骨組織において、BGPの発現について、IGF-I と同時に in vivo で検討した報告はない。本研究では、抗甲状腺剤である 1-methyl-2-mercaptoimidazole (methimazole : MMI) を投与して作成した先天性甲状腺機能低下症ラット (congenital hypothyroid rat : CHT ラット) において、生後早期の頭蓋骨での IGF-I および BGP の遺伝子発現と血清中濃度を経時的に検討した。

【方法】 産前検査で確認した妊娠14日の Sprague-Dawley 系雌ラットを購入して CHT 群と対照群に分け、前者に購入直後より0.025%の MMI を混じた水を与え甲状腺機能を抑制した。同群の出産後は、仔は無処置で母体に MMI 投与を続け、離乳後は母体と同様に MMI を与えた。1母体あたりの仔数は8-10匹に揃え、定期的に両群の体重・尾長を計測しつつ生後1、7、14、21、28日に断頭し血清と頭蓋骨 (生後1日を除く) を採取した。血清は総 thyroxine [T<sub>4</sub>; radioimmunoassay (RIA) 法]、酸エタノール処理で結合蛋白を除去した総 IGF-I (RIA法)、フラグメントを除く完全型 BGP (enzyme-linked immunosorbent assay法) を測定した。頭蓋骨からは、acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform法に proteinase K 処理を加えて total cellular RNA を抽出した。抽出した RNA をグリオキサールで変性後、ノーザンまたはドットプロットで転写したメンブレンに、<sup>32</sup>Pで標識した rat genomic IGF-I または rat BGP cDNA のプローブをハイブリダイズさせた。終了後オートラジオグラフィによりX線フィルムに感光させ、デントメトリにて定量化した。有意差検定は t 検定を用いた。

【結果】 (1) CHT 群の血清総 T<sub>4</sub> 濃度は、出生直後より観察終了まで測定感度以下に抑制された。(2) CHT 群では、出生後早期より体重・尾長が対照群に比べ有意に低値で、対照群で3週齢前後より出現した growth spurt を認めなかった。(3) 生後28日の血清 IGF-I 濃度は、CHT 群で有意に低値を示した。(4) 血清 BGP 濃度は、生後1日では両群に差はないが、生後14、28日では CHT 群が有意に低値を示した。(5) 頭蓋骨における IGF-I の発現は、両群とも生後7日を対照として各群の経時的变化を検討すると、対照群では growth spurt の出現に一致して IGF-I の発現が著しく増強するのに対して、CHT 群では発現の増強は軽度に留まっ

た。(6)同部位における BGP の発現は、対照群での生後 7 日を対照として両群の経時的変化を検討すると、CHT 群は常に対照群よりも発現が低かったが、両者の経時的変化の傾向に差はなかった。生後 14、28 日において、骨組織における BGP の発現と完全型 BGP の血清中濃度はよく一致した。

【考察・結語】 CHT ラットの頭蓋骨を用いた、in vivo における IGF- I の局所の発現の経時的変化は、骨形成の指標となる BGP の同部位における発現および血清中濃度、さらに身体発育とよく一致し、IGF- I の骨組織における成長作用は autocrine あるいは paracrine に働くとされる従来の見解が、CHT ラットを用いた in vivo における検討でも支持された。

## 論文審査の結果の要旨

甲状腺ホルモンは小児期の成長・発達に必須であり、無治療の先天性甲状腺機能低下症では著しい成長障害が見られるが、これらの現象の機構は未だ分子レベルで十分解明されていない。甲状腺機能低下症では、しばしば成長ホルモンの分泌不全が合併し、末梢血中のインスリン様成長因子- I (insulin-like growth factor- I、IGF- I と略) も低値となる。しかし、骨組織の成長に対する効果という観点から、肝臓で産生された IGF- I 循環血を介して働く内分泌作用よりも、局所で産生された IGF- I の傍分泌作用の方が重要であることを示唆する報告もある。

一方、骨形成時の石灰化に先行して骨芽細胞で産生される骨グラ (Gla) 蛋白 (bone Gla protein, BGP と略、別名オステオカルシン) の発現は、甲状腺ホルモンや成長ホルモンなどの影響を受けることが知られている。そこで、申請者は、局所における IGF- I の発現が実際に甲状腺ホルモンの骨成長促進作用に関与するか否かを査定するための一つの手段として、ラットを用いて、正常対照群と先天性甲状腺機能低下症群における血清 BGP 濃度及び頭蓋骨中の IGF- I と BGP の mRNA レベルの生後における経時的変化を比較検討した。

先天性甲状腺機能低下症ラットは、抗甲状腺剤であるメチマゾールを雌ラットに妊娠 14 日目から経口的に投与し (0.025% 溶液, ad libitum) 生まれた仔に離乳前は母乳を介して、離乳後は母体と同じ方法で投与することにより作成した。このラットでは、生後上昇し 14 日目に最大となるべき血清総 T<sub>4</sub> 濃度が生後 28 日間にわたる全実験期間を通じて測定感度以下であり、甲状腺機能不全が顕著であった。また、体重および尾長も出生後早期から対照群より低値であり、対照群では 3 週令前後から出現した成長の立ち上がり (growth spurt) も認められなかった。

実験の結果、血清 BGP 濃度は生後 1 日では両群に差はないが、生後 14 日では甲状腺機能不全群が対照群より著しく低い値を示した。生後 28 日でも対照群より低い値が測定されたが、14 日と 28 日の間の増加に関する限り、対照群と甲状腺機能不全群の間に大きな差はなかった。甲状腺機能不全群の頭蓋骨における BGP-mRNA の量は、生後 7 日で対照群より顕著に低く (約 50%)、生後 14 日では生後 7 日の約 2 倍に増加していたが、依然として対照群より低値であった。さらに、対照群で顕著に認められた生後 21 日頃からの成長の立ち上がりと一致して起こる BGP-mRNA 量の生後における経時的変化の相違は、血清 BGP 濃度の経時的変化の相違とよく符合した。一方、頭蓋骨における IGF- I の mRNA の量は、対照群では生後 21 日頃からの成長の立ち上がりと一致して著しく増加したのに対して、甲状腺機能不全群ではこの時期の増強は軽度であった。生後 7 日から 14 日にかけての増加は両群において軽度であった。血清中 IGF- I の濃度は生後 28 日のみで測定されたが、甲状腺機能不全群では対照群よりも著しく低値 (約 22%) を示した。

以上の結果より、少なくとも 3 週令前後から出現する成長の立ち上がりにおいては、骨組織における IGF

- I の発現が甲状腺ホルモンの骨成長促進作用に関与すると推定された。

論文審査委員会では、以上の内容の本研究について討議し、精力的になされた立派な研究と評価した。本論文の審査過程において、以下の事項が討議された。

- (1) メチマゾールの作用機構
- (2) 骨グラ蛋白の分子種
- (3) RNA 抽出に用いた “modified acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform” 法の改良点及び改良法での RNA の回収率
- (4) 対照群において生後 2 週で見られる血清総 T<sub>4</sub> 濃度のピークの原因、およびこの時の TSH の動き、リバース T<sub>4</sub> の動き
- (5) 生後 3 週前後で見られる成長の立ち上がりの原因
- (6) 骨形成のマーカ―としての骨グラ蛋白を選択した理由およびその妥当性
- (7) IGF- I の効果を骨端軟骨を用いないで、骨を用いて検討した理由
- (8) 尾長による成長査定の妥当性
- (9) メチマゾール投与を妊娠中から開始した理由

これらに対する申請者の応答は概ね適切であり、この研究の今後の進展についての展望も示された。したがって、本論文が博士（医学）の学位授与に値する内容を備えていると、審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	市山	新			
	副査	教授	井上	哲郎	副査	教授	寺尾俊彦
	副査	教授	吉見	輝也	副査	助教授	本郷輝明