

Studies of Gene Expression in Liver of Insulin-Like Growth factor (IGF)- I , IGF-Binding Protein-3 and Growth Hormone (GH) Receptor / GH Binding Protein in rats Treated Neonatally with Monosodium Glutamate

メタデータ	言語: en 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: 久保田, 晃 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1027

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 174号	学位授与年月日	平成 6年 3月25日
氏名	久保田 晃		
論文題目	<p>Studies of Gene Expression in Liver of Insulin – Like Growth factor (IGF) – I, IGF – Binding Protein – 3 and Growth Hormone (GH) Receptor / GH Binding Protein in rats Treated Neonatally with Monosodium Glutamate (新生児期グルタミン酸ナトリウム大量投与による成長障害ラットにおけるインスリン様成長因子(IGF) –I、IGF 結合蛋白-3および成長ホルモン受容体/成長ホルモン結合蛋白の個体発生的遺伝子発現に関する研究)</p>		

医学博士 久保田 晃

論文題目

Studies of Gene Expression in Liver of Insulin-Like Growth factor (IGF) -I, IGF-Binding Protein-3 and Growth Hormone (GH) Receptor/GH Binding Protein in rats Treated Neonatally with Monosodium Glutamate

(新生児期グルタミン酸ナトリウム大量投与による成長障害ラットにおけるインスリン様成長因子 (IGF) - I、IGF 結合蛋白-3 および成長ホルモン受容体/成長ホルモン結合蛋白の個体発生的遺伝子発現に関する研究)

論文の内容の要旨

目的

新生児期のラットに大量のグルタミン酸ナトリウム (MSG) を注射すると視床下部弓状核に選択的に病変を作る。これにより、GH 放出ホルモン (GHRH) 産生神経線維をほぼ完全に破壊し、GHRH 分泌不全の成長障害モデルを作成することが出来る。この MSG ラットにおいて視床下部・下垂体を中心に多くの検討がなされているが、その病変による末梢組織におけるホルモン動態についてはほとんど明らかにされていない。

そこで、雄、雌両方 MSG ラットを用い正常対照群と比較することにより、中枢の障害による GH 分泌動態の変化が肝の IGF-I、GH 受容体 (GHR) /GH 結合蛋白 (GHBP) の遺伝子発現に成長段階でどのような影響を及ぼすか、さらに GH 依存性といわれる IGF 結合蛋白-3 (IGFBP-3) に対して影響があるかを検討した。

方法

MSG ラット作成のために Sprague-Dawley ラットを用い、出生後 2、4、6、8、10日目に MSG を 4 mg/g 体重または正常対照群として 10% NaCl を 0.01 ml/g 体重 皮下注射した。生後 2、4、6、8、10、12週目に断頭して血清と肝臓を採取した。血清は酸エタノール処理で結合蛋白を除去した総 IGF-I をラジオイムノアッセイで測定した。摘出した肝臓は液体窒素で急速冷凍して -80°C で保存し、acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform 法に proteinase K 処理を加えて total RNA を抽出した。抽出した RNA は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にてナイロンメンブレンに転写し、³²P で標識したラット IGF-I cDNA、ラット GHR/GHBP cDNA またはラット IGFBP-3 cRNA をプローブとしハイブリダイズさせた。終了後、X 線フィルムに感光させデンストメトリーで定量化した。有意差検定は t-検定を用いた。

結果

- 1) MSG ラットは対照群に比べ、生後 6 週より体重、尾長ともに小さく、成長障害を示した。特に、雄は雌より成長障害の程度が強く統計的に有意だった。生後 12 週では雄、雌ともに肥満傾向を認め MSG ラット特有の体型を示した。
- 2) 血清 IGF-I 濃度は対照群で生後 6 週目より急激に上昇し、雄、雌とも生後 10 週で最高値をとった。一方、MSG ラットでは上昇は緩徐で、生後 6 週より有意に低く、生後 10 週で対照群の約 45% だった。
- 3) 遺伝子発現は対照群の生後 2 週を基準として、雄と雌を別々に検討した。
IGF-I の遺伝子発現は雌は両群ともに生後 4 週から強くなり、生後 10 週からやや減弱した。一

方、雄は両群とも生後6週から強くなり、対照群は高い発現を維持したが、MSG群では生後12週にやや減弱した。MSG群では雄、雌とも生後4週より対照群に比べ有意に低い発現だった。

- 4) IGFBP-3の遺伝子発現は雄では各週齢でほぼ一定で、両群に差がみられなかった。しかし、雌では対照群は雄と同様にほぼ一定の遺伝子発現を示したのに対し、MSG群では生後6~8週で対照群に比べ約50%減少を示した。
- 5) GHR/GHBPの遺伝子発現においては、雌ではGHRの発現がMSG群で対照群に比べ弱かったが、GHBPの発現はほぼ同じだった。一方、雄ではMSG群と対照群でGHRの発現はほぼ同じだったが、GHBPの発現はMSG群で強かった。

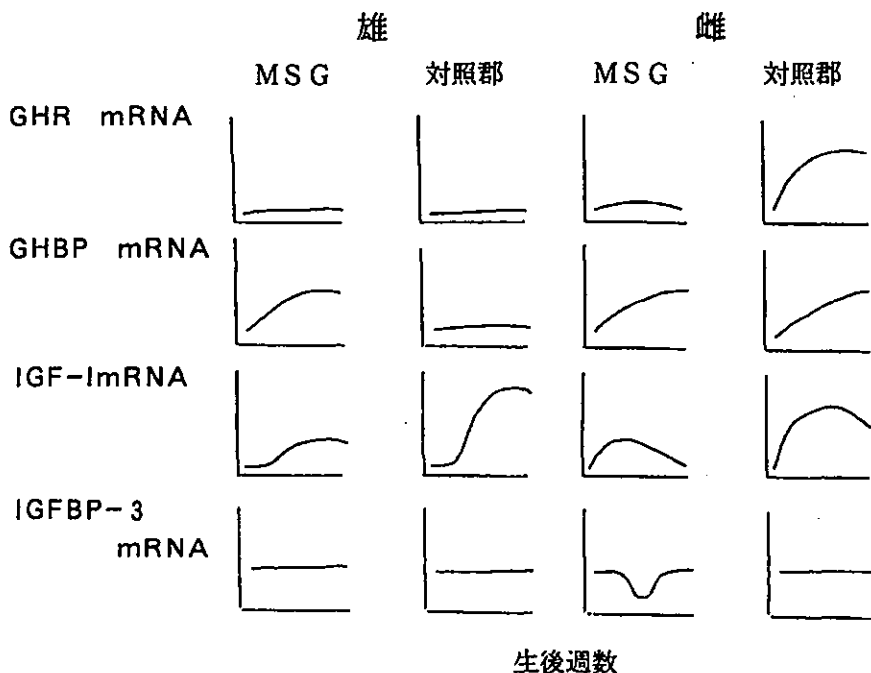
考案・結語

IGF-I、GHR/GHBPの遺伝子発現はGH分泌に依存し、特にGHR/GHBPの発現はGH分泌動態と関連し、GHの基礎値が高いとGHRの発現が増強し脈動性分泌が少ないとGHBPの発現が増強すると言われている。MSGラットにおけるIGF-I、GHR/GHBPの遺伝子発現は視床下部障害のGH分泌の低下を忠実に表現し、成長障害のモデルとして有用と思われた。IGFBP-3は常に血中でIGFと結合しているためGHによりIGFと同じ制御を受けていると考えられてきたが、今回の検討によりMSGラットの雄ではIGFBP-3の遺伝子発現はほとんど影響を受けないことが分かった。しかし、雌ではMSGラットと対照群と異なる発現を示しており、IGFBP-3の遺伝子発現に関してはGHの関与も考えられた。

論文審査の結果の要旨

新生児期のラットに大量のグルタミン酸-ナトリウム(MSG)を投与すると視床下部弓状核に選択的に病変ができる。GH放出ホルモン(GHRH)産生神経細胞がほぼ完全に破壊されるので、この方法を用いて、GHRH分泌不全の成長障害モデルラットを作成することができる。そこで申請者は、この成長障害モデルラットを用いて、中枢でのGH分泌の変化がその支配下にある末梢組織におけるホルモン動態にどのような影響を与えるかを明らかにしようとした。成長障害モデルラットは、出生後2、4、6、8、10日目にそれぞれ4mg/g体重のMSGを投与することにより作成し、対照ラットにはMSGの代わりに10% NaClを投与した。生後2、4、6、8、10、12週目に屠殺し、血清中インスリン様成長因子I(IGF-I)のレベルをラジオイムノアッセイで、肝臓IGF-I mRNA、GH受容体(GHR)/GH結合蛋白(GHBP)mRNA、IGF結合蛋白-3(IGFBP-3)mRNAをノーザンまたはドットプロット法で測定した。

実験の結果、成長障害ラットでは生後6週以降において、体重、尾長共対照群より小であり、成長障害を示した。成長障害の度合は雄の方が雌より大であった。血清IGF-I濃度は、対照群で生後6週より急激に上昇し、生後10週で最高値となったが、成長障害モデルラットでは上昇が緩徐で且つ低値(生後10週で対照群の45%)であった。肝臓のIGF-I mRNA、GHR/GHBP mRNA、IGFBP-3 mRNAの経時変動に関しては図に示したデータが得られた。雄と雌でかなり異なる挙動が観察されたが、それぞれの性の中で成長障害モデルラットと対照群を比較すると、IGF-IとGHR/GHBPに関してはその遺伝子発現が視床下部障害によるGH分泌の低下をかなり忠実に反映していることが示唆された。しかし、常にIGFと結合しているためIGFと同じ制御を受けると考えられているIGFBP-3のmRNAレベルが、少なくとも雄ではGH分泌低下の影響を受けないのは興味深い発見であった。



審査委員会では、以上の内容の研究発表と関連して次の試問を行った。

1. グルタミン酸-ナトリウムの作用機構、および弓状核 GHRH 細胞に特異的に作用するとすればその理由
2. GH 欠乏成長障害モデルラットで生後 6 - 8 週における IGF-I の増加を促している因子について
3. GH 分泌のパターンの雄、雌差の理由、および今回の実験で観察された雄、雌差と GH 分泌パターンの雄、雌差の因果関係、GH の持続投与と間欠投与では効果が異なるか、異なるとすればその理由等
4. GHR と GHBP の違い、GHBP の生合成過程、種類、所在、機能、および GHBP と結合した GH の活性
5. GHR 由来の GHBP と本来の (GHBP mRNA に由来する) GHBP の異同、識別法等
6. 対照群で、GHR mRNA も GHBP mRNA も雄では雌より低値であること理由
7. GHBP の血清レベルと GHR の機能の関連、先端巨大症の GHBP レベル、GHBP の日内リズムの有無等
8. IGFBP の種類と機能、GH 依存性 IGF-IGFBP の血中での存在様式、およびその中の "acid-labile subunit" の由来と役割
9. 申請者の実験係での血中 IGFBP のレベル

これらの質問にたいする申請者の応答は適切と認められ、本論文が博士 (医学) の学位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	藤田	道也	副査	教授	吉見輝也
	副査	助教授	本郷	輝明	副査	講師	田港朝彦