

Fig. 1 罹患疾患

総被験者61名のうち、27名の被験者は、主に“生活習慣病”に対する治療を受けていた。いずれも軽症であり、非薬物治療のみの者も含まれる。主な疾患の罹患患者数を示す。

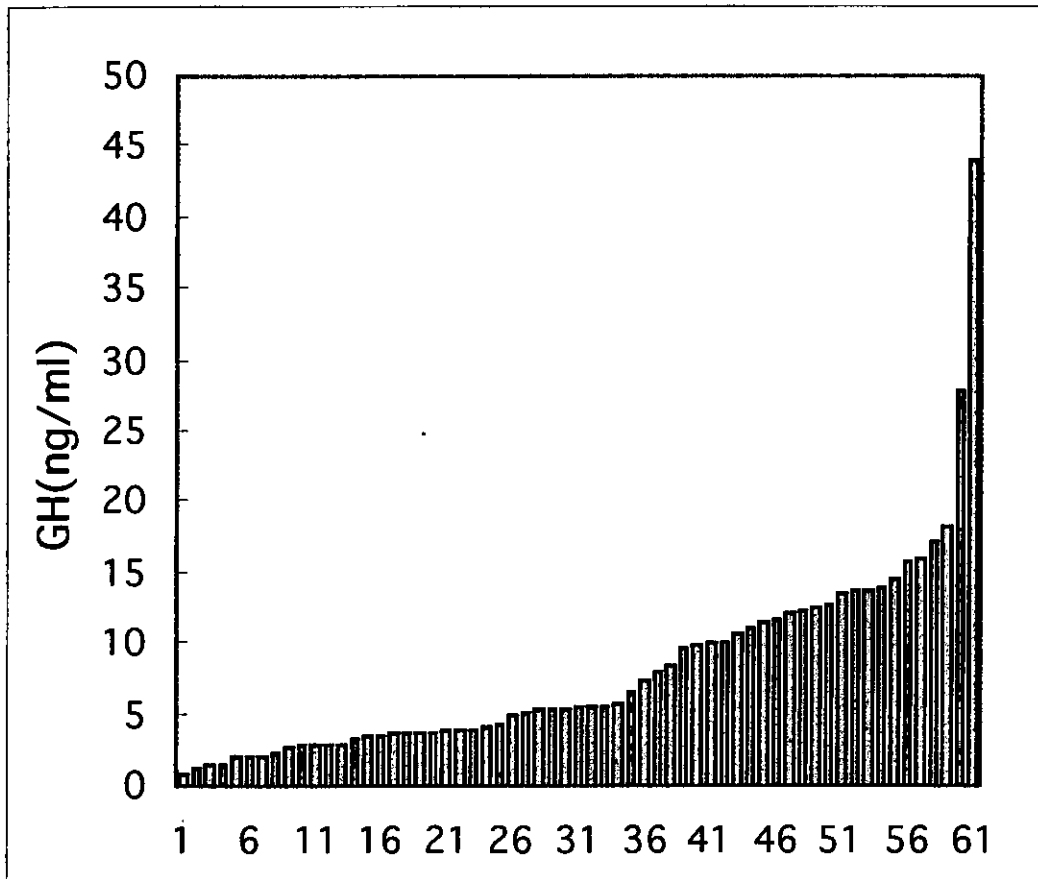


Fig.2 アルギニン試験における GH 頂値

61名の被験者のうち、GH 頂値が低い者から高い者の順に並べている。平均値は 8.1 ± 7.1 ng/ml、中央値は 5.5 ng/ml であった。

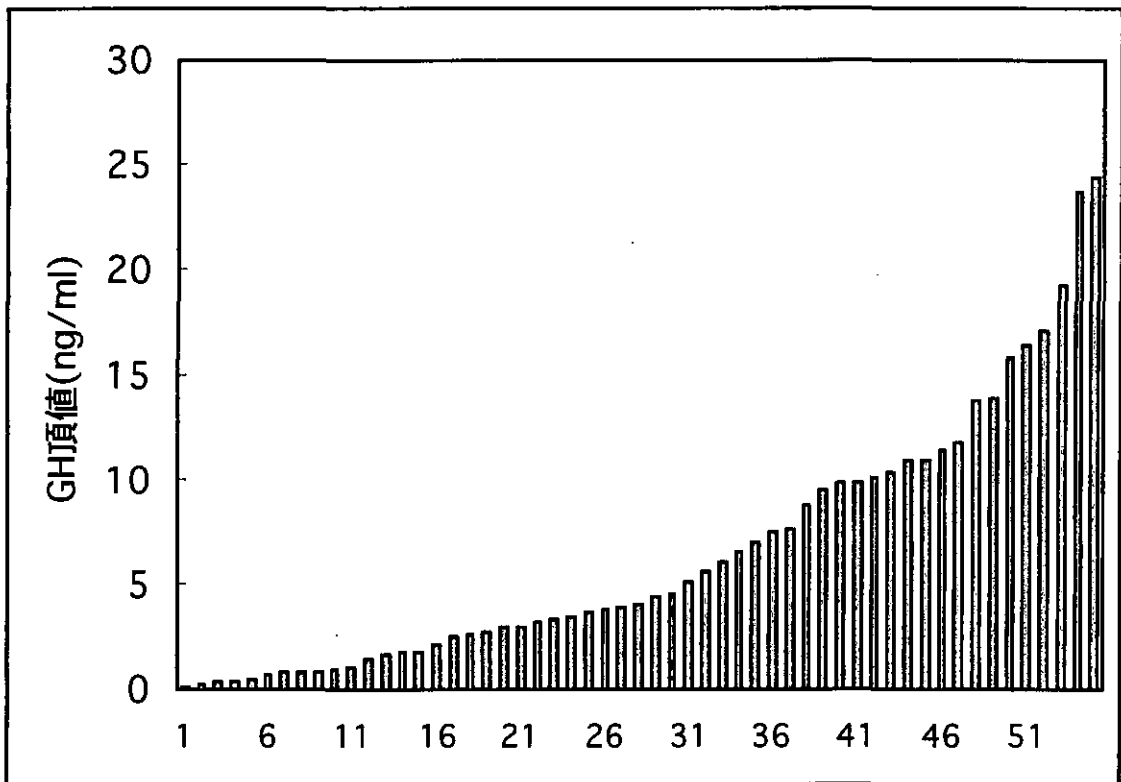


Fig. 3 L-ドーパ試験における GH 頂値

55名の被験者のうち、GH 頂値が低い者から高い者の順に並べている。平均値は 5.9 ± 6.1 ng/ml、中央値は 4.0 ng/ml であった。

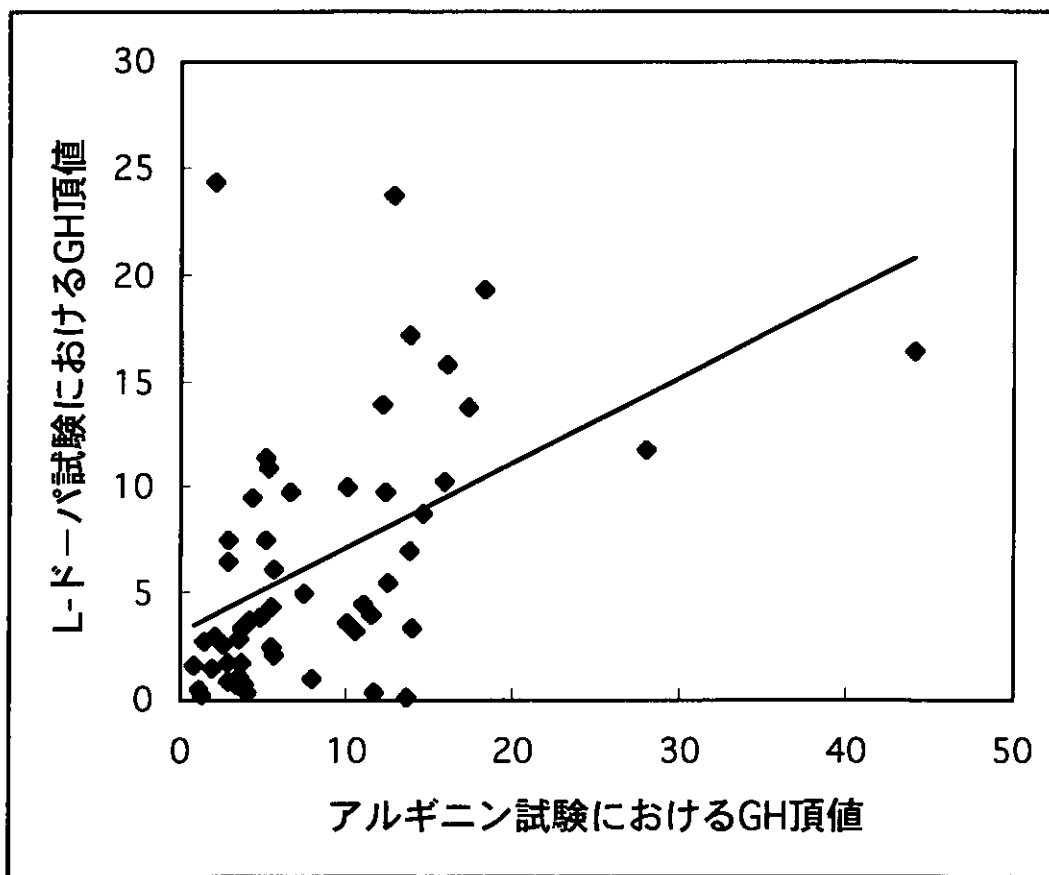


Fig. 4 アルギニン試験、およびL-ドーパ試験における GH 頂値の相関 (n=55)
両者の間に有意な相関 ($r=0.49, P<0.05$) がみられた。

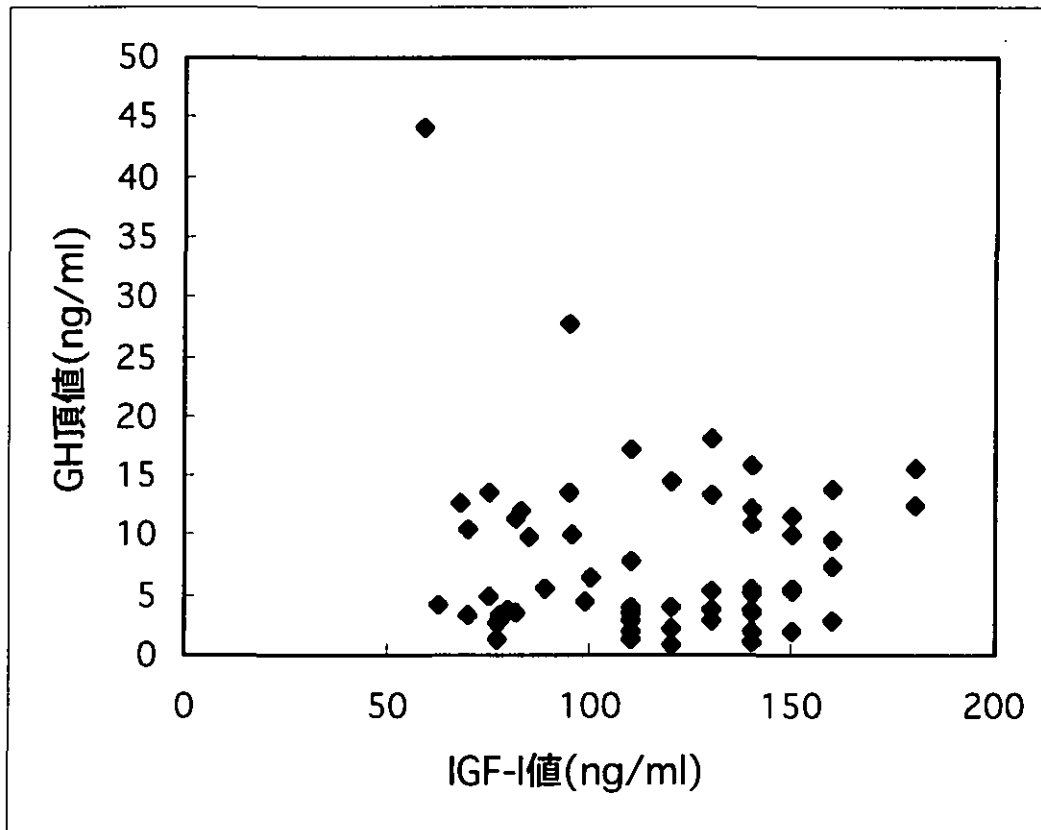


Fig. 5 血漿 IGF-I 値とアルギニン試験における GH 頂値の相関 (n=61)
 両者間に明らかな相関はみられなかった。血漿 IGF-I 値が低値であった被験者のうち、著しい GH 分泌反応を示した例があった。

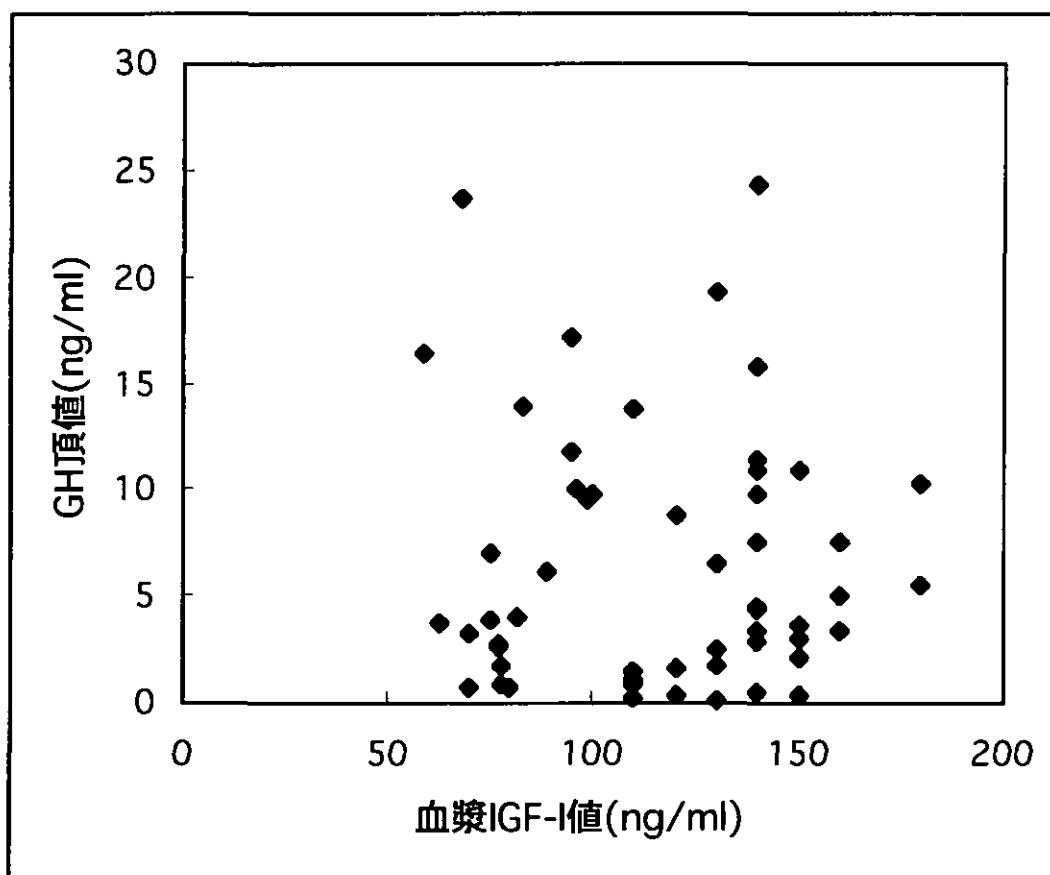


Fig. 6 血漿 IGF-I 値と L-ドーパ試験における GH 頂値の相関 (n=55)
明らかな相関は認められなかった。

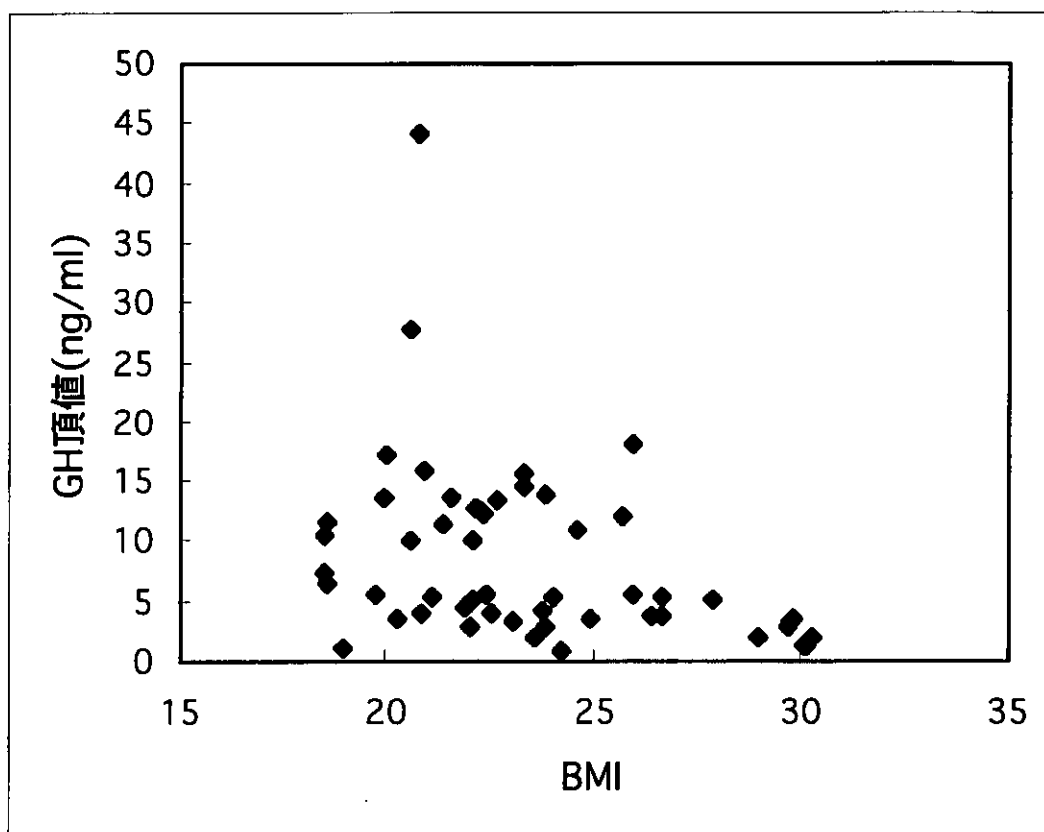


Fig. 7 BMI とアルギニン試験における GH 頂値の相関
統計学的に有意な相関は確認できなかった。

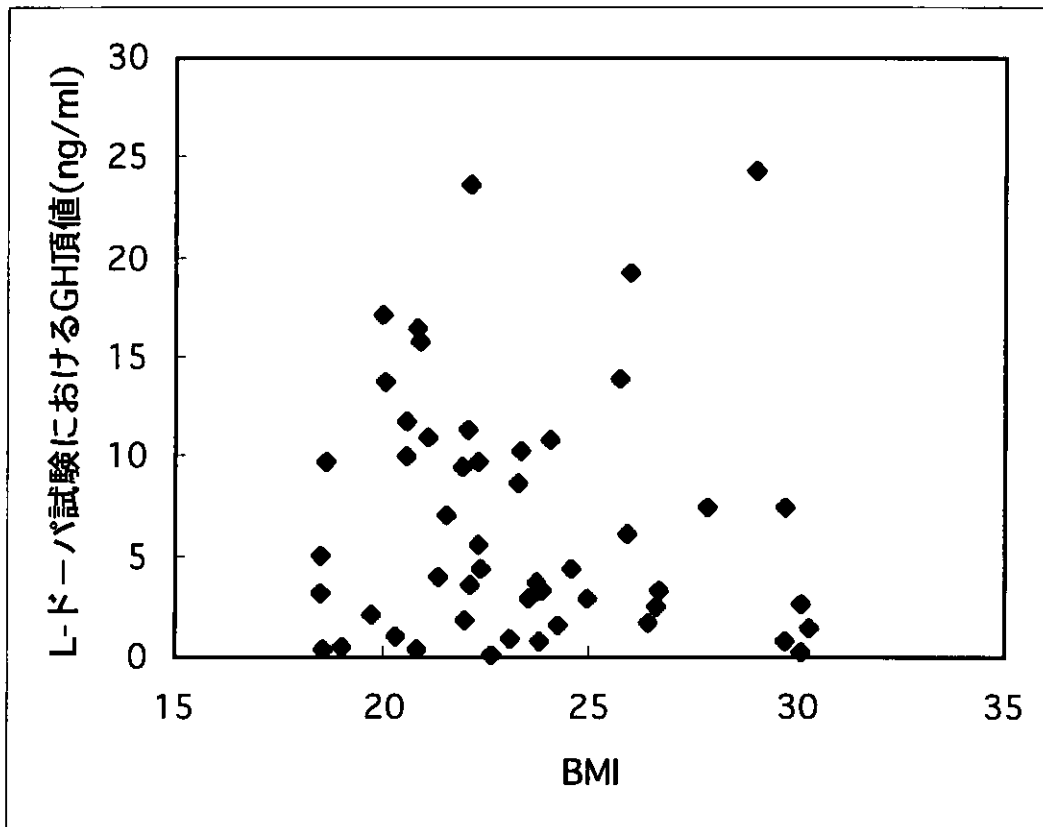


Fig. 8 BMI と L-ドーパ試験における GH 頂値の相関

BMI と L-ドーパ試験における GH 頂値に間に相関はみられなかった。

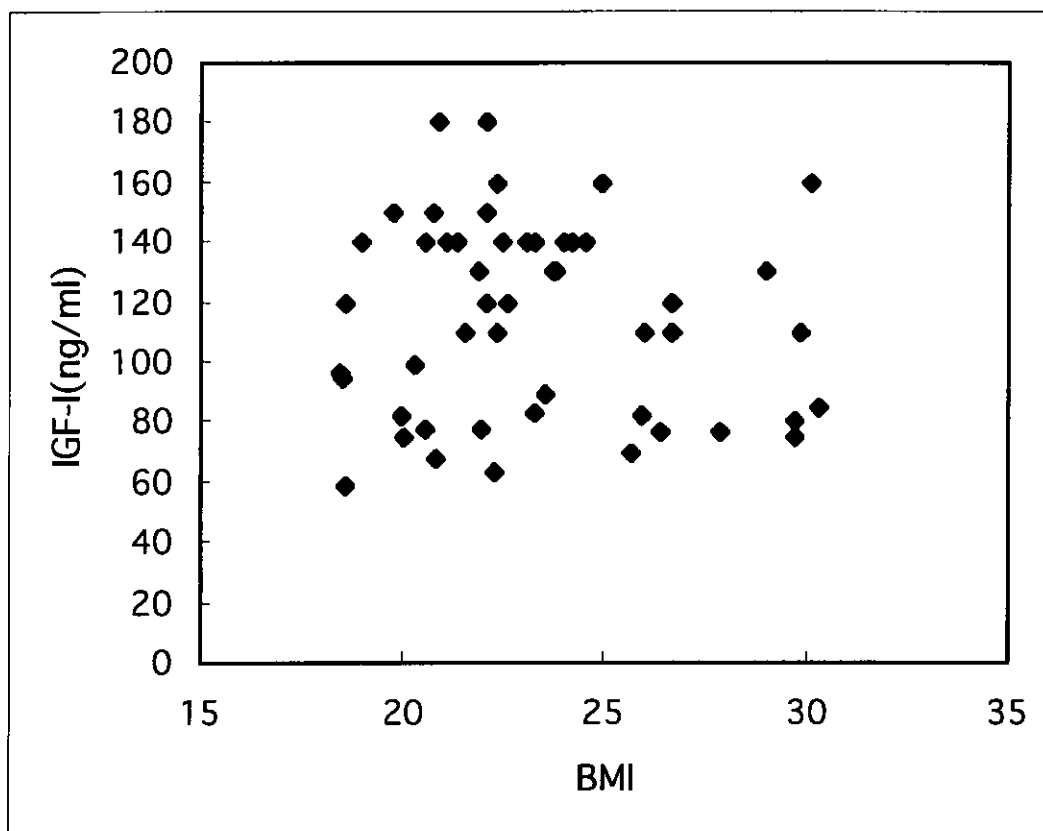


Fig. 9 BMI と血漿 IGF-I 値の相関

BMI と IGF-I 値の間に相関はみられなかった。

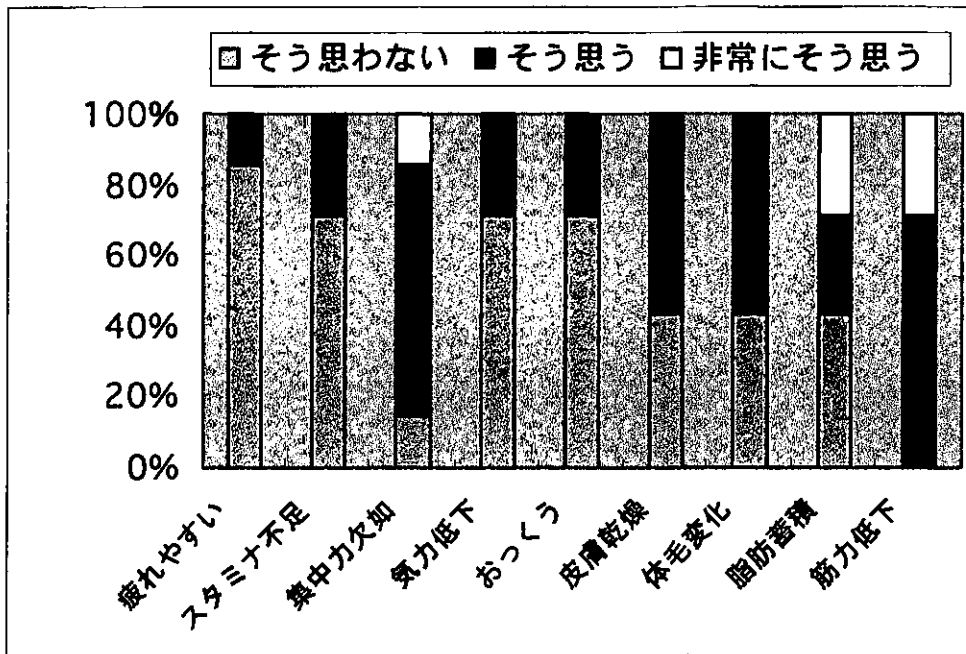


Fig. 14 GH 分泌不全者における自覚症状 (アンケートによる調査)

GH 分泌不全者 (アルギニン試験および L-ドーパ試験において、GH 頂値がともに 3 ng/ml 以下であった者) では、GH 分泌不全が確認できなかった被験者に比べ、集中力の欠如、筋力低下を自覚する者が多い。

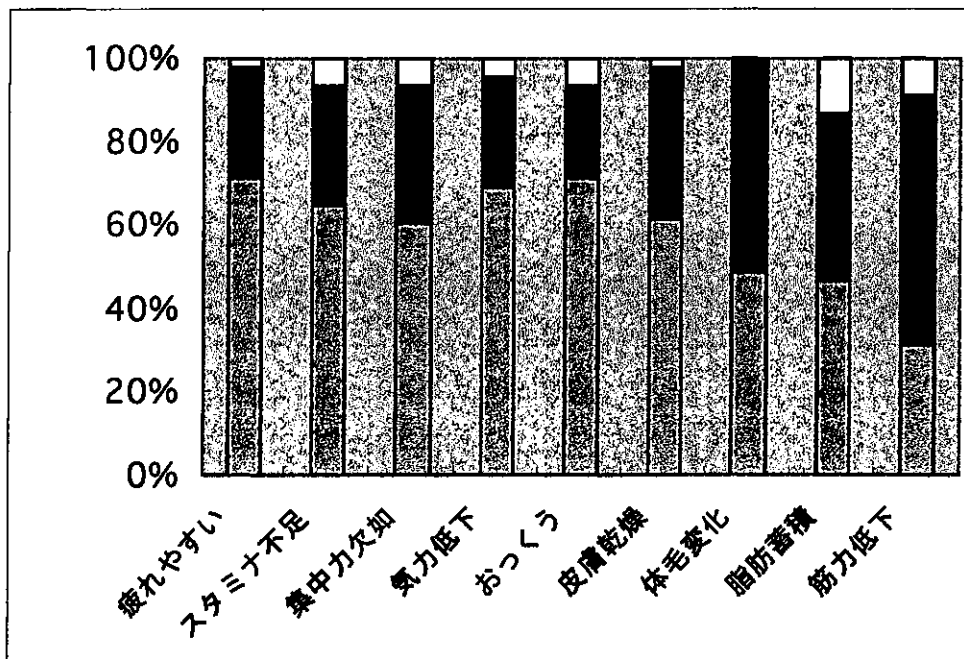


Fig. 15 GH 分泌不全が確認されなかった被験者における自覚症状 (アンケート調査)

	GH 分泌不全者	GH 分泌良好者
IGF-I	108 ± 26.8 ng/ml	118 ± 32.5
Adiponectin	10.5 ± 5.1 ug/ml	10.2 ± 4.7
BMI	25.4 ± 4.3	23.1 ± 3.1
ARG→GH	1.9 ± 0.8 ng/ml	9.2 ± 7.2
L-dopa→GH	1.6 ± 1.0 ng/ml	6.9 ± 6.3
Age	70.7 ± 6.3 yr	71.3 ± 6.7

表 1

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

GH 分泌不全の動脈硬化におよぼす影響
—成人および小児期発症成人 GH 分泌不全症患者における
頸動脈内膜・中膜複合厚の比較—

分担研究者 加治秀介 兵庫県立看護大学
村田雅弘 神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座
内分泌代謝、神経、血液腫瘍内科学
水野石一 同
櫻井達也 同
飯田啓二 同
置村康彦 神戸大学医学部保健学科
千原和夫 神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座
内分泌代謝、神経、血液腫瘍内科学

研究要旨

34 例の成人成長ホルモン分泌不全症患者（AGHD）34 例（小児発症（CO）（15 歳未満の発症）17 例、成人発症（AO）17 例）、および年齢、性別を合致させた対照者 34 名の内頸動脈内膜・中膜複合厚（IMT）を高分解度エコーカラー Doppler システム（LOGIQ700MR, GE Yokogawa Medical system）で計測した。IMT は CO, AO 両者ともに対照群に比べ肥厚していた。両群間で IMT を比較した時、CO は 0.82 ± 0.08 , AO は 0.79 ± 0.03 mm であり差を認めなかったが、日本人の年齢別基準値から年齢を補正した Z-score を算出すると CO は 2.07 ± 0.68 、AO は 0.35 ± 0.48 と CO でより肥厚がみられた。

A 研究目的

成人における下垂体機能低下症では心血管死の頻度が増加すると報告されている(1)。この原因のひとつには以前は成人では補充されることの

なかった GH の欠損が考えられている。また内頸動脈の超音波所見で、内膜・中膜複合厚（IMT）の肥厚が中高年の下垂体機能低下例(2)、および成人 GH 欠損症（AGHD）の小児発症例(3)でみ

られること、さらに最近 GH 治療が AGHD 例の IMT 肥厚を改善することが報告された(4, 5)。本邦の AGHD 例でも合併症に関する疫学調査が進行中であるが、IMT はほとんど調べられていないので、精度の高いカラードップラーエコー装置を用いて検討した。

B 研究方法

対象は当院通院中の 34 例の AGHD 例(小児発症(C0) (15 歳未満の発症) 17 例、成人発症(A0) 17 例)、および年齢、性別を合致させた対照者 34 名。GHD は主として ITT などの GH 分泌刺激試験の GH 頂値 <3 ng/ml で診断した(6)。年齢は 22-73 歳で、C0 症例が A0 より若く、逆に GH 欠損の罹病期間は有意に長かった。病因としては C0 では頭蓋咽頭腫、胚芽腫、特発性などが多いのに対して、A0 では大半が下垂体腺腫ないし腺腫摘出術後であった。糖尿病、高血圧、心疾患の罹患例は含まれていない。内頸動脈内膜・中膜複合厚(IMT)は高分解度エコーカラードップラーシステム (LOGIQ700MR, GE Yokogawa Medical system) を用いて単一の計測者が左右各々 2 方向より 3 点計測し平均値を算出、その最大値を代表値とした(7)。日本人の各年齢別平均 IMT (mean \pm SD)(7)を参考に Z-score

を算出し、AGHD 例の IMT 肥厚度を C0 と A0 で比較検討した。また年齢その他の各種パラメーターとの関連性についても検討した。両群間比較にはノンパラメトリック法(Wilcoxon 検定)を、相関関係は Pearson の相関係数により有意検定した。

C 研究結果

C0 と A0 を比較すると、年齢は C0 が有意に低年齢であった (C0; 29 ± 7 vs A0; 48 ± 12 , $P<0.01$)。また罹病期間は C0 が有意に長かった (C0; 21 ± 9 vs 14 ± 9 yr, $P<0.01$)。IMT は実測値では C0 は 0.82 ± 0.08 , A0 は 0.79 ± 0.03 mm と差を認めなかったが、同じ方法で計測された日本人の年齢別基準値から年齢を補正した Z-score を算出すると C0 は 2.07 ± 0.68 , A0 は 0.35 ± 0.48 と C0 でより肥厚がみられた ($P<0.05$)。血圧、血中 IGF-I や脂質レベルは両群間に有意差を認めなかった。IMT は BMI, 血圧、血中 IGF-I, 総コレステロール、LDL コレステロール、HDL コレステロール、中性脂肪とは C0, A0、AGHD 全例のいずれにおいても、有意の相関を認めなかった。

D 考察

AGHD 例での IMT は年齢毎の基準値で補正した Z-score の平均を算出す

ると CO, AO ともに正の値であり、平均を上回っていたので、最近の諸外国の報告を支持するものであった(2,3)。特に CO で Z-score が高かった理由については CO, AO 間に BMI, 血圧、血中 IGF-I, 脂質レベルなどに差がなく、糖尿病、心疾患の合併例も除外しているため、少なくともこれらの要因に拠るものではなく GHD の発症時期そのものが関与する可能性がある(8)。骨塩量低下においても同様に AO では顕著でなかったが CO では明らかであった(9)。

今回のこの結果についての理由として CO は AO より若年者であったため、年齢で補正したとはいえ加齢による IMT 増加と重ならず、より顕在化した可能性がある。言い換えれば CO でも AO でも GHD が同様に IMT を肥厚させるが AO の対照群はより高齢であるため、高齢そのものによる IMT 肥厚に隠れて効果が見えにくくなっている可能性がある。同年令の CO と AO を比較することによりこの点は明白に示す。さらに今回の CO では GHD の罹病期間が AO より長く、CO では GHD の罹病期間と IMT に正相関を認めることからこの差は単に GHD の罹病期間を反映している可能性も否定できない。いずれにせよ GHD そのものが IMT 肥厚に関わることを示唆する結果である。

GH, IGF-I 欠損による直接的な動脈肥厚機序の詳細は不明であるが、IGF-I が血管内皮からの NO 産生を促進すること(10)、また AGHD では NO 産生が低下し、GH 投与が NO 産生を回復させることが報告されている(11)。また GHD では内蔵脂肪が増加し、動脈硬化を惹起する種々のサイトカインが増加することも知られる。今後その機序の詳細についてはさらに解明が必要であろう。またより多数の高年令の CO の AGHD 例でも同年令対照に比して顕著な IMT 肥厚がみられるかどうかを検討することは AGHD への GH 補充を考える上で重要である。

E 結論

CO および AO において、GHD により IMT は肥厚する。年齢毎の基準値で補正した Z-score で評価すると、特に、CO において明瞭であった。この理由として、1) AO の対照群はより高齢で、高齢による他の要因のため IMT の肥厚が生じ、GHD の効果が見えにくくなっていた可能性、2) GHD の罹病期間が CO では AO より長く、GHD の罹病期間と IMT に正相関を認めることから、GHD の罹病期間を反映している可能性が考えられた。

参考文献

1. Rosen T, Bengtsson AB
Premature mortality due to cardiovascular disease in hypopituitarism. *Lancet* 336, 285-288, 1990
2. Markussis V, Beshyah SA, Fisher C, Sharp P, Nicolaidis AN, Johnston DG
Detection of premature atherosclerosis by high-resolution ultrasonography in symptom-free hypopituitary adults. *Lancet* 340, 1188-1192, 1992
3. Capaldo B, Patti L, Olivero U, Longobardi S, Pardo F, Vitale F, Fazio S, Rella F, Biondi B, Lombardi G, Sacca L
Increased arterial intima-media thickness in childhood-onset growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 1378-1381, 1997
4. Borson-Chazot F, Serusclat A, Kalfallah Y, Ducottet X, Sassolas G, Bernard S, Labrousse F, Pastene J, Sassolas A, Roux Y, Berthezene F
Decrease in carotid intima-media thickness after one year growth hormone (GH) treatment in adults with GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 1329-1333, 1999
5. Gibney J, Wallace JD, Spinks T, Schnorr L, Ranicar A, Cuneo RC, Lockhart S, Burnand KG, Salomon F, Sonksen PH, Russell-Jones D
The effects of 10 years of recombinant human growth hormone (GH) in adult GH-deficient patients. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 2596-2602, 1999
6. Growth hormone research society, Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of adults with growth hormone deficiency: summary statement of the growth hormone research society workshop on adult growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 379-381, 1998
7. Yamasaki Y, Kawamori R, Matsushima H, Nishizawa H, Matsumoto M, Kamada M, Kajimoto Y, Morishima T, Kamada T
Atherosclerosis in carotid artery of young IDDM patient monitoring by ultrasound high-resolution

B-mode imaging. *Diabetes* 43, 634-639, 1994

8. Attanasio AF, Lamberts SWJ, Matranga AMC, Birkett MA, Bates PC, Valk NK, Hilsted VJ, Bengtsson EA, Strasburger CJ, AGHD study group Adult growth hormone (GH)-deficient patients demonstrate heterogeneity between childhood onset and adult onset before and during human GH treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 82-88, 1997

9. Kaji H, Abe H, Fukase M, Chihara K Normal bone mineral density in patients with adult onset GH deficiency. *Endocrinol Metab* 4, 163-166, 1997

10. Tsukahara H, Gordienko DV, Tonshoff B, Gelalto MC, Goligorsky MS. Direct demonstration of insulin-like growth factor-I-induced nitric oxide production by endothelial cells. *Kidney Int.* 45, 598-604, 1994

11. Boger RH, Skamira C, Bode-Boger SM, Brabant G, Muhlen A. Nitric oxide may

mediate the hemodynamic effects of recombinant growth hormone in patients with acquired growth hormone deficiency. A double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Invest* 98, 2706-2713, 1996

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

A study of carotid intima-media thickness in GH-deficient Japanese adults during onset among adults and children.

Murata M, Kaji H, Mizuno I, Sakurai T, Iida K, Okimura Y, Chihara K.

Euro J Endocrinol 148:333-338, 2003

Diverse regulation of full-length and truncated growth hormone receptor expression in 3T3-L1 adipocytes.

Iida K, Takahashi Y, Kaji H, Yoshioka S, Murata M, Iguchi G, Okimura Y, Chihara K.

Mol Cell Endocrinol. 210:21-9, 2003

Cloning of a protein binding to the most proximal Pit-1 binding element of prolactin gene from human pituitary cDNA library.

Fumoto M, Okimura Y, Sakagami Y, Iguchi G, Kishimoto M, Takahashi Y, Kaji H, Chihara K.

Mol and cell Endocrinol 207:31-38, 2003

Lactogenic hormone responsive element reporter gene activation assay for human growth hormone.

Sakatani T, Kaji H, Takahashi Y, Iida K, Okimura Y, Chihara K.

Growth Horm IGF Res 13:275-81, 2003.

Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene.

Kishimoto M, Okimura Y, Iguchi G, kudo T, Takahashi Y, Kaji H, Chihara K.

Biochemical and Biophysical Research Communications 305:186-92, 2003

Mutant form of Pit-1 (R271W) does not act as a dominant inhibitor of Pit-1 action to activate the promoters of growth hormone and prolactin genes.

Kishimoto M, Okimura Y, Fumoto M, Iguchi G, Iida K, Kaji H, Chihara K.

Euro J Endocrinol 148:619-25, 2003

The role of circulating ghrelin in growth hormone (GH) secretion in freely-moving rats.

Okimura Y, Ukai K, Hosoda H, Murata M, Iguchi G, Iida K, Kaji H, Kojima M, Kangawa K, Chihara K

Life Sci. 72:2517-24, 2003

Up-regulation of mitochondrial transcription factor1 mRNA levels by GH in VSMC

Yoshioka s, Okimura Y, Takahashi Y, Iida K, Kaji H, Matsuo M, Chihara K.

Life Sci. in press

H 知的財産権の出願・登録状況
該当無し

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

血管平滑筋細胞における成長ホルモン投与による遺伝子発現の変化 - differential display 法を用いた検討

分担研究者 置村康彦 神戸大学医学部保健学科
吉岡嗣朗 神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座
内分泌代謝、神経、血液腫瘍内科学
高橋裕 同
井口元三 同
加治秀介 兵庫県立看護大学
千原和夫 神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座
内分泌代謝、神経、血液腫瘍内科学

研究要旨

成長ホルモン（GH）は動脈硬化に影響を及ぼすことが報告されているが、そのメカニズムは不明確である。動脈硬化において血管平滑筋は重要な役割を果たすので、GH の血管平滑筋に及ぼす効果に注目した。ラット血管平滑筋細胞培養液に GH を加え、それにより変化する遺伝子群を differential display 法を用いて同定した。その結果、cytochrome oxidase subunit II/III や pristanoyl Co-A oxidase などの mRNA が GH 投与により増加し、ADAMST-1 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeat) などの mRNA が減少していることが観察された。cytochrome oxidase subunit II/III はミトコンドリア遺伝子にコードされており、その発現は、ゲノム遺伝子にコードされた転写因子である mitochondrial transcription factor 1 (mtTF1) によって制御されている。GH 添加により、cytochrome oxidase subunit II/III mRNA が増加したことから、GH が mtTF1 遺伝子の発現を制御しているのではないかと考え、定量 PCR を使いその発現量を測定したところ、GH 投与により mtTF1 mRNA が用量依存性に増加し、さらに、この反応は JAK2 阻害剤である AG490 投与によりコントロールレベルまで抑制されることが明らかとなった。この成績より、血管平滑筋において GH は、JAK2 を介して mtTF1 量を変化させ、ミトコンドリア遺伝子の転写、複製を制

御している可能性が示唆された。

A 研究目的

成長ホルモン (GH) は下垂体から分泌され、成長や代謝調節だけでなく、老化の進展に深く関与するホルモンである。脳腫瘍等の器質的疾患によって早期に GH 分泌能が低下した患者では、筋力低下、骨粗鬆症に加えて高脂血症、動脈硬化の早期発症、その進展に伴う血管合併症の増加など、生理的な加齢に伴って出現する変化に酷似した諸症状や所見が年齢不相応に早期に出現すること (成人 GH 欠損症)、さらに、これらは補充量の GH の投与によって改善することが最近明らかとなってきた。

この成人 GH 欠損症が注目される一方、GH 過剰状態では動脈硬化が進行する可能性が示唆されている。たとえば、先端巨大症患者は動脈硬化のリスクが高いこと、オクトレオチドの投与により GH や IGF-I の値を正常化させると、そのリスクが低下することが報告されている。しかし、GH がどのようなメカニズムで動脈硬化の進展に関与しているのかは未だ明らかではない。

動脈硬化の進展において血管平滑筋は重要な役割を担っている。血管平滑筋細胞は本来血管の中膜に存在するが、動脈硬化では様々な刺激を

受けてその形態を収縮型から合成型に変化させ、内膜に遊走し、そこで増殖し、様々なタンパク質を分泌する。すでに GH が血管平滑筋の増殖を制御しているかもしれないという報告があるが、その分子基盤は明確ではない。今回、私どもは、GH の血管平滑筋に対する作用に注目し、differential display 法を用いて、血管平滑筋において GH が発現制御する遺伝子を同定した。それらのうち、特に mitochondrial cytochrome oxidase subunit II / III の発現機構において GH が果たす役割について、定量 PCR 法で検討した。

B 研究方法

細胞培養

血管平滑筋細胞は 3 週齢の雌の Sprague-Dawley ラットの胸部大動脈から、Gunther らの方法により分離した。直径 100 mm のコラーゲンコートしたディッシュを使用し、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に 10% の牛血清、100 mg/L ペニシリン-G、15.5 mg/L カナマイシンを添加した培養液中で、この血管平滑筋細胞を 37 C、5% CO₂ 条件下で培養した。トリプシン/EDTA を使用して 1:5 の比率で継代培養を行ない、

実験には継代 7-9 代目の細胞を使用した。ラット L6 細胞 (GH 受容体が存在しない骨格筋の筋芽細胞) も同様の培養液で培養した。

RNA 抽出と differential display 法

細胞が 70%コンフルントに到達した時点で、培養液を 0.1%のウシ血清アルブミン(BSA)を含んだ血清無添加の DMEM に交換した。6 時間後、処置群ではリコンビナトヒト GH (rhGH) を 100 ng/ml の終濃度となるよう培養液に加え、コントロール群では 0.1 % BSA を含んだ phosphate buffered saline(PBS) を同量加えた。JAK2 の関与を検討する実験では、JAK2 のインヒビターである AG490(10nM, Wako Pure Chemical Industries)を GH 投与 30 分前に培養液に加えた。GH 投与 6 時間後、トータル RNA を、トリゾール(GIBCO BRL)を用いてそれぞれの群より抽出した。RT-PCR 後、作製した cDNA を使用し、Peng Liang らの報告した方法に基づいた differential display を行なった。コントロール群と rhGH 投与群の cDNA 産物を、6%ポリアクリルアミド尿素ゲルで 2000V、2 時間の条件で電気泳動した。ゲルを乾燥させた後、Kodak X-OMAT AR フィルム上で 2 日間曝露し、コントロール群と rhGH 投与群間で比較、増加した cDNA バンド、及び減少した cDNA バンドを抽出した。この cDNA バンドをテンプレートに使用し、

再度同じセットのプライマーを使用して PCR を行った。増幅された cDNA のバンドを切り出し、pT7 Blue ベクター(Novagen)にクローニング後、PRISM model 310 genetic analyzer (Applied Biosystems)を使用してその塩基配列を決定した。

定量 PCR

GH により発現調節される mRNA 量は、定量 PCR で評価した。PCR 産物が一定の値に到達するときの回数であるスレッシュホールドサイクルを、それぞれの mRNA の量を定量化するために計算した。

有意検定

結果は、mean \pm SD で表した。ANOVA で解析後、多重比較には Fisher の PLSD post hoc testing を使った。P 値 0.05 以下で統計学的有意とみなした。

C 研究結果

differential display

5つの mRNA が rhGH によって増加した。その塩基配列を決定したところ、増加した mRNA は mitochondrial cytochrome oxidase subunit II / III と pristanoyl-CoA oxidase であることが判明した。一方、rhGH によって発現が減少した mRNA の一つは、ADAMST-1 であることが判明した。他の増減した mRNA は、現在のところ DNA データベースに未登録である。