Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Enhanced oxidative stress in GH-transgenic rat and acromegaly in humans

西澤, 衡

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2012-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲5608
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005608

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

Enhanced oxidative stress in GH-transgenic rat and acromegaly in humans

成長ホルモン過剰発現ラットおよび先端巨大症における酸化ストレスの亢進

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻
糖尿病・内分泌内科学
（指導教員：清野 進教授）

西澤 衡

（要約）

背景： 先端巨大症は過剰な成長ホルモン（GH）とインスリン様成長因子（IGF-I）によって生じる病態であり、四肢末端の肥大や、軟部組織の肥厚などの症状とともに、糖尿病、高血圧症、心不全を高率に合併する。これまでに、先端巨大症患者では、動脈硬化の進展と心血管疾患による死亡率の増加が報告されているが、その機序については不明な点が多い。活性酸素（ROS）は老化や動脈硬化症など様々な老化関連疾患の原因の一つだが、IGF-I などの成長因子によってROS が産生されることが報告されている。我々は先端巨大症に伴う病態が、過剰な GH あるいはIGF-I によってもたらされた ROS 産生、酸化ストレス亢進と関連するのではないかという仮説を立て研究を行った。

方法： 先端巨大症の動物モデルである GH トランスジェニック（GHTG）ラットにおいて血清および組織中の酸化ストレスレベルを評価した。さらに、ヒト先端巨大症患者と健常人における血清中酸化ストレスの測定を行った。そしてその機序を明らかにするために C2C12 筋細胞における GH／IGF-I による ROS 産生の評価を行った。

結果： 酸化ストレスマーカーである血清チオバルビタール酸反応物質（TBARS）のレベルはGHTG ラットにおいて増加していた。組織中の酸化ストレスを、8-Hydroxy-2-deoxyguanosine（8-OH d G）抗体染色で評価したところ、GHTG ラットの心筋細胞および大動脈平滑筋細胞において亢進していた。またヒト先端巨大症において、血清中 TBARS レベルおよび 8-OH d G レベルが増加していた。C2C12 筋細胞において、GH では変化を認めなかったが、IGF-I は濃度依存性に ROS の産生を誘導した。

結論： これらの結果から、ラットおよびヒトにおいて IGF-I の増加が酸化ストレスの亢進に関連することが示され、ROS の増加がヒト先端巨大症の合併症や寿命の短縮に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

（背景）

GH と IGF-I の過剰産生がもたらされる先端巨大症の臨床所見は、四肢末梢の肥大、軟部組織の肥厚や、高血圧、糖尿病、心不全、骨・関節病変など多岐にわたり、活動性のある先端巨大症では心血管疾患による死亡率の増加が認められる。GH と IGF-I の上昇がその死亡率増加に最も寄与するとされているが、その詳細な機序については不明な点が多い。

ROS は細胞代謝の副産物として産生され細胞の抗酸化能力を超えると、脂質や蛋白質、DNA などに対する傷害をもたらす。過剰な ROS は有害であり、寿命の短縮に関連し、動脈硬化、心肥大、インスリン抵抗性などの加齢関連疾患の原因因子と考えられている。

一方で ROS には重要な生体調節機能もあり、これまでの研究で PDGF、EGF、インスリン、IGF-I などの成長因子が ROS を産生し、シグナル伝達を修飾することが報告されている。低濃度の ROS は IGF-I のシグナル伝達およびその作用の調整に関わっている一方、IGF-I による過剰な ROS 産生と先端巨大症の病態の関連性は明らかではない。本研究では、ヒト先端巨大症およびラットモ

デルにおいて過剰なIGF-IによるROS産生への影響と病態との関連について解析を行った。

（方法）

遺伝子組み換えブタ成長ホルモンとヒトIGF-IはNational Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease (NIDDK)とFujisawa Parmaceutical Companyから購入した。動物実験はすべて東京大学農学部動物使用委員会の許可のもと、東京大学大学院生命科学研究科の実験動物愛護と取扱いのためのガイドラインにのっとって行われた。GHTGラットはヒトGH遺伝子のコーディング領域をマウスWhey acidic proteinのプロモーター下に発現した。臨床研究については神戸大学大学院医学部倫理委員会の承認を得た上で、参加者には文書での同意を得た。神戸大学附属病院受診者から14人の活動性の先端巨大症患者を連続的に抽出し、喫煙者や病的肥満、顕性糖尿病の罹患患者を除外、最終的に10人での解析を行った。血清中TBARS値の測定はTBARS assay kit（Cayman Chemical社）、血清中8-OH d Gの測定はDNA Extractor® キットと高感度8-OHdG測定キット（NIKKEN SEIL Co., Ltd,）を用いた。免疫組織染色は、10%の中性緩衝ホルマリンで固定した組織を用いて、モノクローナル抗8-OHdG抗体で免疫染色し、定量的評価を行った。C2C12筋細胞は10%ウシ胎児血清を加えたDMEM培養液にて培養し、分化誘導は、細胞数が75%に達した段階で、2%ウマ血清を加えたDMEM培養液に変更して行った。分化誘導後96時間でC2C12筋細胞にGHあるいはIGF-Iにより15分間の刺激したのち解析を行った。C2C12筋細胞内の細胞内ROSレベルはdichlorofluorescein assayによって測定した。得られた結果は平均±標準誤差で表示した。データはunpaired two-tailed Student's t test法あるいは、ANOVA法を用いて解析し、P値が0.05未満を有意とした。

（結果）

先端巨大症の病態生理を明らかにするために、GHTGラットをin vivoモデルとして使用した。血清中のIGF-Iレベルはコントロールラットと比して2.4倍上昇し、過成長をきたした。

過剰なGHおよびIGF-Iによる酸化ストレスへの影響を評価するために、酸化ストレスマーカーとして血清中TBARS濃度を測定したところ、GHTGラットの血清中で3.2倍に上昇していた。また、GHTGラット心筋と大動脈において組織の酸化ストレスマーカーである8-OH d Gの染色を行ったところ、陽性細胞はGHTGラットの左心室筋層、大動脈において有意に増加していた。

次にヒト先端巨大症患者における酸化ストレスの評価を行った。対象患者から、喫煙者や糖尿病、病的肥満の症例を除いた患者群と、年齢・性別・BMIをマッチさせた健常人において血中酸化ストレスマーカーを測定した。患者群において血清中GHおよびIGF-Iレベルはそれぞれ8.9±3.8ng/ml（正常は1ng/ml未満）、452.6±97.7 ng/ml（年齢、性別ごとの正常値の+7.6±5.4SD）と上昇していた。背景となる年齢、性別、BMI, 血糖値、HbA1c値はコントロールと先端巨大症群の間で有意差は認められなかった。血清中TBARSおよび8-OHdG濃度はコントロール群に比較して、先端巨大症群においてそれぞれ1.5倍、2.5倍と有意に増加を示した。

GHあるいはIGF-Iのいずれが原因であるかを明らかにするために、C2C12筋細胞を用いて

ROS産生への影響を解析した。C2C12筋細胞ではGH受容体とIGF-I受容体が発現しており、GHによるSTAT5のリン酸化、IGF-IによるIRS-1のリン酸化が認められたことから、いずれに対しても反応し得ることが示された。GH刺激ではROSの増加は全く認めらなかったが、IGF-I刺激によって用量依存性に有意なROSの増加が認められた。

（考察）

本研究では、GHTGラットの血清中、心臓・大動脈組織における酸化ストレスが増加していること、さらに活動性のヒト先端巨大症患者で血清中の酸化ストレスマーカーであるTBARSと8-OH d Gが増加していることから、GH／IGF-I過剰が酸化ストレス亢進と関連していることを示した。さらにC2C12筋細胞における結果から、過剰なIGF-Iが酸化ストレスの増加に関与している可能性が示唆された。

動脈硬化病変において血管平滑筋細胞の増殖と遊走が病変の進展に関与しているが、興味深いことにIGF-Iは血管平滑筋細胞においてROSの産生をもたらし、そのROSを介して増殖と遊走を刺激することが報告されている。今回の結果においてもGHTGの血管平滑筋細胞で酸化ストレスが亢進していることから、IGF-Iの過剰がROSを介してヒト先端巨大症における動脈硬化性変化を促進している可能性が示唆された。

ROSは老化と加齢関連疾患において重要な役割を果たしており、過剰なIGF-Iによって増加したROSが先端巨大症における高血圧、糖尿病、動脈硬化、骨関節病変や寿命の短縮に重要な役割を果たしているのかもしれない。

結論として、ラットおよびヒトにおいて酸化ストレスの増加がIGF-I濃度の上昇と関連していた。これらの結果は、先端巨大症の病態生理を理解するための新たな手掛かりの一つとなりうると考えられた。

神戸大学大学院医学研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 2264 号	氏 名	西澤 衡
論文題目 Title of Dissertation	Enhanced oxidative stress in GH-transgenic rat and acromegaly in humans 成長ホルモン過剰発現ラットおよび先端巨大症における酸化ストレスの亢進		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 平田健一 副 査 Vice-examiner 衛康博 副 査 Vice-examiner 林祥剛		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

先端巨大症は過剰な成長ホルモン（GH）とインスリン様成長因子（IGF-I）によって生じる病態であり、四肢末端の肥大や、軟部組織の肥厚などの症状とともに、糖尿病、高血圧症、心不全を高率に合併する。これまでに、先端巨大症患者では、動脈硬化の進展と心血管疾患による死亡率の増加が報告されているが、その機序については不明な点が多い。活性酸素（ROS）は細胞代謝の副産物として産生され細胞の抗酸化能力を超えると、脂質や蛋白質、DNA などに対する傷害をもたらす。過剰な ROS は有害であり、寿命の短縮に関連し、動脈硬化、心肥大、インスリン抵抗性などの加齢関連疾患の原因因子と考えられている。一方で ROS には重要な生体調節機能もあり、これまでの研究で PDGF、EGF、インスリン、IGF-I などの成長因子が ROS を産生し、シグナル伝達を修飾することが報告されている。低濃度の ROS は IGF-I のシグナル伝達およびその作用の調整に関わっている一方、IGF-I による過剰な ROS 産生と先端巨大症の病態の関連性は明らかではない。申請者らは、先端巨大症に伴う病態と過剰な GH あるいは IGF-I によってもたらされた ROS 産生、酸化ストレス亢進との関連性について研究を行った。

＜方法＞

先端巨大症の動物モデルである GH トランスジェニック（GHTG）ラットはヒト GH 遺伝子のコーディング領域をマウス Whey acidic protein のプロモーター下に発現した。そして、GHTG ラットにおいて血清および組織中の酸化ストレスレベルを評価した。さらに、臨床研究については神戸大学附属病院受診者から 14 人の活動性の先端巨大症患者を連続的に抽出し、喫煙者や病的肥満、顕性糖尿病の罹患患者を除外し、最終的に 10 人での解析を行った。ヒト先端巨大症患者と健常人における血清中酸化ストレスの測定を行った。そしてその機序を明らかにするために C2C12 筋細胞における GH／IGF-I による ROS 産生の評価を行った。分化誘導後 96 時間で C2C12 筋細胞に GH あるいは IGF-I により 15 分間の刺激したのち解析を行った。C2C12 筋細胞内の細胞内 ROS レベルは dichlorofluorescein assay によって測定した。

＜結果＞

先端巨大症の病態生理を明らかにするために、GHTG ラットを *in vivo* モデルとして使用した。血清中の IGF-I レベルはコントロールラットと比して 2.4 倍上昇し、過成長をきたした。過剰な GH および IGF-I による酸化ストレスへの影響を評価するために、酸化ストレスマーカーとして血清中 TBARS 濃度を測定したところ、GHTG ラットの血清中で 3.2 倍に上昇していた。また、GHTG ラット心筋と大動脈において組織の酸化ストレスマーカーである 8-OHdG の染色を行ったところ、陽性細胞は GHTG ラットの左心室筋層、大動脈において有意に増加していた。

次にヒト先端巨大症患者における酸化ストレスの評価を行った。対象患者から、喫煙者や糖尿病、病的肥満の症例を除いた患者群と、年齢・性別・BMI をマッチさせた健常人において血中酸化ストレスマーカーを測定した。患者群において血清中 GH および IGF-I レベルはそれぞれ 8.9±3.8ng/ml（正常は 1ng/ml 未満）、452.6±97.7 ng/ml（年齢、性別ごとの正常値の+7.6±5.4SD）と上昇していた。背景となる年齢、性別、BMI，血糖値、HbA1c 値はコントロールと先端巨大症群の間で有意差は認められなかった。血清中 TBARS および 8-OHdG 濃度はコントロール群に比較して、先端巨大症群においてそれぞれ 1.5 倍、2.5 倍と有意に増加を示した。

GH あるいは IGF-I のいずれが原因であるかを明らかにするために、C2C12 筋細胞を用いて ROS 産生への影響を解析した。C2C12 筋細胞では GH 受容体と IGF-I 受容体が発現しており、GH による STAT5 のリン酸化、IGF-I による IRS-1 のリン酸化が認められたことから、いずれに対しても反応し得ることが示された。GH 刺激では ROS の増加は全く認めらなかったが、IGF-I 刺激によって用量依存性に有意な ROS の増加が認められた。

本研究では、GHTG ラットの血清中、心臓・大動脈組織における酸化ストレスが増加していること、さらに活動性のヒト先端巨大症患者で血清中の酸化ストレスマーカーである TBARS と 8-OH d G が増加していることから、GH／IGF-I 過剰が酸化ストレス亢進と関連していることを示した。さらに C2C12 筋細胞における結果から、過剰な IGF-I が酸化ストレスの増加に関与している可能性が示唆された。これらの結果は、先端巨大症の病態生理を理解するための新たな手掛かりの一つとなりうると考えられた。

本研究は、ラットおよびヒトにおいて IGF-I の増加が酸化ストレスの亢進に関連することを明らかにし、ROS の増加がヒト先端巨大症の合併症や寿命の短縮に重要な役割を果たしている可能性を示した価値ある研究である。よって申請者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。