



# Regional distribution of rat growth hormone releasing factor-like immunoreactivity in rat hypothalamus

喜多, 哲也

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1986-05-28

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1038

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001038>

※ 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。



氏名・（本籍）	き　　た　　てつ　　や　　（兵庫県） 喜　　多　　哲　　也
学　位　の　種　類	医　学　博　士
学　位　記　番　号	医博ろ第895号
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位授与の日付	昭和61年5月28日
学位論文題目	Regional Distribution of Rat Growth Hormone Releasing Factor-Like Immunoreactivity in Rat Hypothalamus （ラット視床下部におけるラット成長ホルモン 分泌促進因子（GRF）様免疫活性の局在）
審　査　委　員	主査 教授 藤　田　拓　男 教授 松　本　　悟　教授 山　鳥　　崇

## 論　文　内　容　の　要　旨

### 緒　　言

成長ホルモン（GH）はソマトスタチン（SRIF）により抑制的に，GH releasing factor（GRF）により促進的に分泌調節されていると考えられている。ヒトGRFの一次構造は1982年にGuillemin ら，および Rivier らによって明らかにされ，次いでラットGRFの構造が1983年に Spiess らにより決定された。ラットGRFは43ケのアミノ酸よりなるペプチドでGRF様免疫活性を含有するニューロンはラット視床下部に存在することが免疫組織化学的に，既に証明されている。しかし，ラット視床下部各部におけるラットGRFの含有量は未だ不明である。本研究で私どもは，ヒトGRF（1-44）NH<sub>2</sub>を家兔に免疫して得られた抗血清を用い，ラットGRFを標識用および標準品とするラットGRFの heterologous radioimmunoassay（RIA）系を確立し，ラット視床下部諸核におけるラットGRF様免疫活性（rGRF-LI）の局在について検討した。

### 方　　法

体重200g～250gのSD系雄ラットを断頭屠殺後，すみやかに脳を摘出，液体窒素で凍結し，Cryostatで300  $\mu$ mの前額断面の連続切片を作製した。Palkovits の方法に準じて，実体顕微鏡で観察しつつ，内径300  $\mu$ mおよび500  $\mu$ mのステンレスカニューレで視床下部の諸核を打ち抜いた。これらの組織を各々の部位で10匹分を集め1サンプルとして扱い，2 mlの2 N酢酸中で sonication により homogenize した。0.1mlを Lowry 法による蛋白定量用に分取した後，残りを100℃温浴中に10

分間静置し、 $20,000 \times g$  4℃30分間遠心した後、上清を凍結乾燥し、GRF、SRIFの測定時まで-20℃で保管した。GRF-LIは以下に述べるRIAで、SRIF-LIは既報のRIAで測定した。尚、このSRIFのRIAに用いた抗SRIF血清の抗原認識部位は、SRIF(1-14)のCys<sup>3</sup>-Thr<sup>12</sup>であり、SRIF(1-28)、SRIF(1-14)両者を等モルで認識した。

#### (ラットGRF-RIA)

合成ヒトGRF(1-44)NH<sub>2</sub>を牛サイログロブリンと glutaraldehyde 法で結合したものを抗原として、Freund's complete adjuvant と混合乳化したものを家兔に免疫して得られた抗血清R71483を最終希釈1:24,000で用いた。標識ラットGRFは、合成ラットGRF(1-43)OHをクロラミンT法でヨード化し、0.1%牛アルブミン(BSA)を含む0.1N酢酸を溶出液として1cm×50cmの Sephadex G-50カラムで精製して用いた。RIA用緩衝液として、0.08M NaCl, 0.05M EDTA, 0.02% Sodium azide, 1% BSA, 0.1% Triton X-100, および250 KIUの Trasylol を含む0.05M phosphate buffer (pH7.4)を使用し、標準物質として合成ラットGRF(1-43)OHを用いた。<sup>125</sup>I-ラットGRFと抗血清との結合は、非標識ラットGRF(1-43)OH 39~1,250pg/tubeで用量反的に阻害され、最小検出感度は39pg/tubeであった。また、VIP, PHI, secretin, glucagon, GIP, avian PP, TRH, LHRH, neurotensin, CK 8, substance P, AVP, Met-enkephalin, human calcitonin, SRIF(1-14), SRIF(1-28), および ovine corticotropin releasing factor (CRF) とは1 μg/tubeまで全く交叉反応を示さなかった。

またラット視床下部抽出物を1N酢酸を溶出液とし、0.7cm×100cmの Sephadex G-50カラムでゲルろ過した。溶出液を1mlずつ分画採取し、凍結乾燥後、前記RIAでGRF-LI, SRIF-LIを測定した。

#### 結 果

視床下部抽出物の希釈曲線は、ラットGRFのRIAの標準曲線と平行した。またゲルろ過では、ラット視床下部抽出物のGRF-LIは、void volume (fraction No. 14)にごく小さいピークが、fr. No. 23~26に大きいピークが出現する二峰性の溶出パターンを示し、後者の大きいピークは、合成ラットGRF(1-43)OHの溶出部位と一致した。

一方、ラット視床下部抽出物のSRIF-LIの溶出パターンは、fr. No. 27~30, fr. No. 35~40に2つのピークが見られ、各々SRIF(1-28), SRIF(1-14)の溶出部位と一致した。なおこれら、SRIF(1-28)とSRIF(1-14)の視床下部含有量をモル濃度で比較すると、1:3.02であった。

視床下部内のGRF-LIの含有量は、正中隆起に最多で、(32.28±11.42ng/mg蛋白)、次いで弓状核に多く(3.50±0.47)、その他の部位では、腹内側核(1.41±0.15)、背内側核(1.16±0.15)、および視床下部前野(1.29±0.42)に検出されたが、その他の視床下部および大脳皮質、海馬、扁桃

核には検出されなかった。

SRIF-LIは視床下部全体に広く分布しているが、その局在は以前から報告されているように、正中隆起に $109.9 \pm 19.2$  (ng/mg蛋白)と最多で、次いで弓状核 ( $12.88 \pm 0.60$ )、腹内側核 ( $6.53 \pm 2.25$ )、視交叉上核 ( $6.29 \pm 0.81$ )、脳室周囲核 ( $8.52 \pm 3.37$ )、視床下部前野 ( $5.61 \pm 2.47$ )、腹側乳頭体前核 ( $6.12 \pm 2.20$ ) に比較的高濃度であった。

## 考 察

近年、免疫組織化学的に、ヒトやサルと同様にラット視床下部においても、GRF陽性神経線維が、正中隆起に多数見られ、GRF陽性細胞体が、主に弓状核に局限して存在していることが明らかにされている。しかし、これらのGRF-LIの視床下部における含有量は、未だ明らかではない。今回の研究で、私どもは、ラットGRFの heterologous RIA系を確立し、このRIAを用いて、ラット視床下部のGRF-LIの含量をはじめて明らかにした。今回のRIAに用いた抗GRF血清はヒトGRF (1-44) NH<sub>2</sub>を抗原として家兎に免疫して得られたものだが、ラットGRF (1-43) OHとも交叉反応を示した。ラットとヒトのGRFの一次構造には15ケのアミノ酸残基の相違があり、これらは主にC端側に存在している。したがって私どもの抗血清にはラットGRF (1-43) OHのN端側、或は中央部に対する抗体が含まれていると考えられる。一方、ラットGRF (1-43) OHの一次構造は glucagon family のペプチドと類似していることが知られているが、私どもの抗GRF血清と<sup>125</sup>I標識ラットGRF (1-43) OHとの結合は、glucagon family に属する、PHI (1-27)、VIP、secretin、glucagon、GIPによっては全く影響を受けず、非標識のラットGRF (1-43) OHによって用量反応的に阻害されたことから、このラットGRFのRIA系は、ラットGRF (1-43) OHに特異的なRIA系と考えられる。

私どもは、今回、ラットGRF-LIが主に正中隆起に存在し、次いで、弓状核に多く含まれていることを示したが、これは前述の免疫組織化学的研究の結果ともよく一致する。しかし、弓状核にラットGRF-LIが高濃度検出されるということは、弓状核にGRF含有ニューロンの細胞体が存在することを必ずしも示すものではない。通常、視床下部の神経ペプチドを産生しているニューロンの細胞体の存在している部位には、産生されているペプチドの免疫活性はあまり多量には検出されず、むしろその神経終末に多量の活性が見出される。例えば、正中隆起にCRF陽性神経終末を投射しているCRF産生ニューロンの細胞体の大部分は室傍核に存在しているが、そこには、CRF様免疫活性は僅かしか検出されない。したがって、弓状核にラットGRF-LIが高濃度検出されたことは、弓状核付近でGRF含有ニューロンが密な神経線維網を作っていることを示唆しており、これが正中隆起に投射したり、他のニューロンとシナプスを作っている可能性が考えられる。また、弓状核以外の視床下部に細胞体の存在するGRF含有ニューロンの神経線維が、弓状核を通過している可能性もある。事実、Merchenthaler らは、コルヒチン処置されたラットの脳を免疫組織化学的方法で調べ、ラットGRF陽性ニューロンの細胞体は主に弓状核に存在するが、それ以外に、外側視床下部の脳弓周囲、腹内側核、背内側核、および室傍核にも少数存在していると報告している。これらの成績は、今回の

私どもの少量のGRF-LIが、正中隆起、弓状核以外の視床下部のいくつかの部位で検出された結果とよく一致していると思われる。

視床下部のGH分泌調節機構については未だ十分には明らかではないが、視床下部への種々の情報が集約され、最終的にはGRFとSRIFの合成・放出に変換され、GRFとSRIFの量的差に基づいて下垂体GH分泌が規定されると考えられる。さて、視床下部のGRFとSRIFのどちらがより主要な働きをしているのであろうか。視床下部内側基底部を破壊したり、下垂体茎を切断して視床下部と下垂体との連絡を遮断すると下垂体GH合成・分泌は低下することが知られている。したがって正常なGH分泌を維持するためにはSRIFよりもGRFの方がより重要であるようにみえる。今回得られた私どもの成績では、視床下部内GRF含量はSRIF含量と比べて明らかに少なかった。この成績はGRFの作用の重要性を考える時、意外な印象を与えるかもしれない。しかし、正中隆起のSRIFおよびGRFの含量は、視床下部におけるこれらペプチドの合成量と下垂体門脈への放出量とによって決定される。視床下部におけるGRFの含有量がSRIFよりも低いという私どもの成績から、GRFは合成されるとすぐ放出される、すなわち代謝回転率が非常に速いため、視床下部には少量のGRFしか存在しないという可能性が考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

下垂体前葉から分泌される成長ホルモンの分泌調節は主として視床下部から下垂体門脈系を介して運搬される神経内分泌物質によって行われることが知られており、ことに成長ホルモン分泌を抑制するソマトスタチンについては古くから知られていたが成長ホルモン分泌を促進する成長ホルモン分泌刺激因子（GRF）は比較的最近ヒト膵癌組織から分離されその構造も決定され43個のアミノ酸から成るペプチドであることが明きらかになった。免疫組織学的研究によるとGRF陽性のニューロンはヒトを始めラット・サルで視床下部ことに正中隆起と弓状核に存在することが報告されているが、その量的分布など詳細については明きらかではなく、GRFの生理的意義を解明する上にこの様なGRFの分布を研究することは重要で不可欠なことである。

本研究者は合成ヒトGRF 1-44アミドによって兔を免疫して得た高力価且つ特異的な抗体を用い又合成ラットGRF 1-43をクロラミンTを $I^{125}$ で標識してラジオイムノアッセイを開発し、これによってラット脳内のGRFの分布を正確に測定することを試みた。

体重200-250グラムの雄ラットを断頭により屠殺し、脳を速かに分離し液体窒素中に凍結后クリオスタットで300マイクロメートルの厚さの冠状面切片を作成し、視床下部の核はパルコビットの方法で、注射針を用いて分離した。各部位から採取した検体は10頭分をプールし2規定醋酸中で音波処理し、10分間煮沸後 $20,000 \times g$ で30分4℃で遠沈して上清をラジオイムノアッセイして用いた。GRFと同時にソマトスタチンをも測定して比較した。

GRF及びソマトスタチン活性はともに正中隆起でもっとも高く、これについて弓状核に高いこと

がみとめられた。腹側及び背側正中核では前視床下部同様GRF活性は低く、他の視床下部諸核では全く認められなかった。しかし乍らソマトスタチンの免疫活性は旁脳室核、腹側正中核、副脳室核及び前視床下部にかなりの量が証明された。又、大脳皮質、扁桃核、海馬、等脳の他の部位にもソマトスタチンは少量証明されたが、GRFは全く証明されなかった。即ち脳内におけるGRFの分布はソマトスタチンと略々同一の部位に大量がみとめられて成長ホルモンの分泌調節の上に共通の機序があることを示唆するが、ソマトスタチンの分布の方がはるかに広範囲にみとめられ、ソマトスタチンは成長ホルモンの分泌抑制以外にも他のホルモンの分泌調節等の作用もある可能性を示唆した。

又、視床下部の正中基底部の電気凝固や視床下部下垂体間の連絡の切断は成長ホルモンの分泌の亢進をおこすことが知られており、このことから、視床下部からの成長ホルモン分泌調節は主としてGRFによる分泌亢進刺激であり、ソマトスタチンによる分泌抑制の因子は重要ではないと思われる。

以上本研究者は従来殆ど行われていなかったGRFの脳内分布の直接測定によって成長ホルモンの分泌調節機序について重要な知見を得たものであり、価値ある集積とみとめられる。よって本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。