

成長ホルモンの Life Span に及ぼす 影響の分子機構の解明

(研究課題番号 15591078)

平成 15 年度～平成 16 年度科学研究費補助金 (基盤研究 (C) (2))
研究成果報告書

平成 17 年 5 月

研究代表者 藤 枝 憲 二

(旭川医科大学 医学部 教授)

はしがき

これまでに生命の寿命を規定するメカニズムに関しては、酵母、線虫、ショウジョウバエなどを用いておこなわれ、老化、寿命に関わる遺伝子が同定され、さらにそのシグナル経路も同定されつつある。線虫における研究ではインスリン/IGF-1 シグナル経路が寿命の調節に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。一方、哺乳動物では、成長ホルモン欠損マウス (Ames dwarf, Snell dwarf) および成長ホルモン受容体欠損マウスは、IGF-1 濃度が著しく低く、インスリン濃度および血糖値が減少し、寿命の延長を呈することが知られている。さらには IGF-1 受容体欠損マウスのヘテロ結合体が寿命の延長を呈することが報告され、インスリン/IGF-1 シグナル経路が哺乳動物の寿命調節に何らかの役割を担っていることが示唆されている。しかし、成長ホルモン作用の欠如における延命効果において、インスリン/IGF-1 シグナル経路の下流にある詳細な分子機構は明らかになっていない。この分子機構を研究することは、未だ解明されていない哺乳動物個体における加齢現象の分子メカニズムを明らかにする上で有益であると考えられる。

研究組織

研究代表者：藤枝 憲二（旭川医科大学・医学部・教授）H15～16年度

研究分担者：中江 淳（旭川医科大学・医学部・講師）H15年度

交付決定額（配分類）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 15年度	1,500	0	1,500
平成 16年度	1,800	0	1,800
総計	3,300	0	3,300

研究発表

(1)学会誌発表

1. Tajima T, Hattori T, Nakajima T, Okuhara K, Sato K, Abe S, **Nakae J, Fujieda K** : Sporadic heterozygous frameshift mutation of HESX1 causing pituitary and optic nerve hypoplasia and combined pituitary hormone deficiency in a Japanese patient. J Clin Endocrinol Metab 88:45-50, 2003
2. Takezaki T, Nakai S, Tajima T, Okuhara K, Satoh K, Iwasaki Y, **Fujieda K** : A case of achondroplasia associated with cervicomedullary-junction compression. Clin Pediatr Endocrinol 12:39-42, 2003
3. Ueda O, Fujine M, Mukai T, Ito Y, **Fujieda K** : A male patient with severe growth retardation, immunodeficiency and diabetes mellitus: a new syndrome?. Clin Pediatr Endocrinol 12(Suppl 20): 47-49, 2003
4. Hribal ML, **Nakae J**, Kitamura T, Shutter JR, Accili D : Regulation of insulin-like growth factor-dependent myoblast differentiation by Foxo forkhead transcription factors. J Cell Biol 162(4):535-541, 2003
5. Hanew K, Tachibana K, Yokoya S, **Fujieda K**, Tanaka T, Igarashi Y, Shimatsu A, Tanaka H, Tanizawa T, Teramoto A, Nishi Y, Hasegawa Y, Hizuka N, Hirano T, Fujita K : Studies of very severe short stature with severe GH deficiency : From the data registered with the foundation for growth science. Endocrine Journal 52(1):37-43, 2005

6.藤枝憲二：内分泌疾患原因遺伝子の解明-成長に関わる遺伝子とその異常-、医学のあゆみ、206(9)：572-578、2003

7.藤根美穂、古賀康嗣、田中敏章、田島敏広、藤枝憲二：生物学的不活性型成長ホルモンによる低身長症の1例、ホルモンと臨床、52：53-57、2004

(2)学会発表

1. 河野斉、高野加寿恵、藤枝憲二、田中敏章：成長ホルモン治療の脂質代謝に及ぼす影響、第37回日本小児内分泌学会、札幌、平成15年10月1-3日

2. 藤根美穂、中江淳、古賀康嗣、田中敏章、田島敏広、藤枝憲二：GH-I 遺伝子変異を同定した生物学的不活性型GHによる低身長症の一例、第37回日本小児内分泌学会、札幌、平成15年10月1-3日

3. 梶野浩樹、向井徳男、上田修、伊藤善也、藤枝憲二：成長ホルモン欠損ラットに対する成長ホルモン投与の心臓に与える効果-投与開始週齢による違い-、第77回日本内分泌学会学術総会、京都、平成16年6月24-26日

4. 竹田津原野、蒔田芳男、中村英紀、長屋建、林時仲、藤枝憲二：IGFI 受容体遺伝子多型の子宮内発育不全に伴う成長不全への関与、第49回日本未熟児新生児学会、横浜、平成16年12月5-7日

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

特になし

目 次

1. 研究の概要	1
2. 緒言	1
3. 研究方法	4
4. 研究成果	5
5. 考察	9
参考文献	10
研究発表	11

1. 研究の概要

成長ホルモンの寿命に及ぼす影響の分子機構を解明するため、寿命の延長を呈する成長ホルモン受容体欠損マウス (*Ghr*^{-/-}マウス) と成長ホルモン受容体欠損でフォークヘッド転写因子 *Foxo1* ヘテロ欠損マウス (*Ghr*^{-/-}*Foxo1*^{+/-}マウス) を比較することにより成長ホルモン作用の欠如における延命効果において、*Foxo1* がその下流にあるかどうか解析することを試みた。

本マウスの基本的な性状を確認する目的で成長と糖代謝について検討した。

成長について解析するため体重を比較したところ *Ghr*^{-/-}マウスに対して *Ghr*^{-/-}*Foxo1*^{+/-}マウスは、有意な体重増加を示し、成長ホルモン欠損マウスのインスリン様成長因子低下に伴う成長障害に *Foxo1* が関与している可能性を示唆した。

次に糖代謝に関して解析した。絶食時の血糖値を経時的 (2,4,6 ヶ月齢) に測定したところ雄では *Ghr*^{-/-}マウスに対して *Ghr*^{-/-}*Foxo1*^{+/-}マウスは、2 ヶ月齢において若干ではあるが有意に低い値を示し、他の月齢においても平均値は若干低かったが、雌においてはほぼ同等の値を示した。また、6 ヶ月齢での摂食時の血糖値は、*Ghr*^{-/-}マウス、*Ghr*^{-/-}*Foxo1*^{+/-}マウス間には雌雄ともに違いが見られなかった。しかし、血漿インスリン濃度は、雄では *Ghr*^{-/-}*Foxo1*^{+/-}マウスの方が有意に低くインスリン感受性が亢進していたが、雌ではほぼ同等の値を示した。この結果は、*Foxo1* のヘテロ欠損がおよぼすインスリン感受性亢進作用に雌雄差があることを示した。

今回の研究で確認された、*Ghr*^{-/-}と *Ghr*^{-/-}*Foxo1*^{+/-}マウスとの違い (体重増加と雄におけるインスリン感受性の亢進) が加齢によりどうなるのか、または、寿命に及ぼす影響については、マウスの寿命が数年と長いため、現在継続して検討中である。

2. 緒言

これまでに生命の寿命を規定するメカニズムに関しては、酵母、線虫、ショウジョウバエなどを用いた研究により、老化、寿命に関わる遺伝子が同定され、さらにそのシグナル経路も同定されつつある。

線虫は、元来 L1,L2,L3,L4 の 4 つのステージを経てその短い一生を終えるが、高温、飢餓状態、高フェロモンの状態では、L2 ステージの後、ある特殊なステージ(*dauer larvae*)に入り、成長、生殖、代謝の抑制、脂肪滴の貯留、寿命の延長を呈する。しかしながら、インスリン受容体 *daf-2* 遺伝子の突然変異体では、正常な環境下においても、*dauer larvae* ステージに入ることが知られている。さらに興味深いことに、フォークヘッド転写因子 *daf-16* 遺伝子と *daf-2* 遺伝子

のダブルミュータントでは、この *daf-2* 遺伝子の変異体の表現型が、正常に戻ることを示されている。したがって、線虫においては、DAF-2 は、DAF-16 の下流に位置し、DAF-2 と拮抗する働きを持つことが示された。このことは、線虫ではインスリン/IGF-1 シグナル経路が寿命の調節に重要な役割を果たしていることを示唆している¹²⁾。

一方、哺乳動物では、成長ホルモン欠損マウス (Ames dwarf, Snell dwarf) および成長ホルモン受容体欠損マウスは、IGF-1 濃度が著しく低く、インスリン濃度および血糖値が減少し、寿命の延長を呈することが知られている¹⁾。さらに、IGF-1 受容体のヘテロノックアウトマウスが寿命の延長を呈することが近年報告されている³⁾。また、長期のカロリー制限に寿命の延長作用があることが明らかになっているが、カロリー制限を行ったマウスにおいてもインスリン、IGF-1、血糖値の減少が見られる²⁾。これらの知見より、哺乳動物においてもインスリン/IGF-1 シグナル経路が酵母、線虫、ショウジョウバエと同様に寿命調節に何らかの役割を担っていることが示唆される (図1)。

Foxo1 は、線虫におけるインスリン受容体、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase)、protein kinase B (PKB/AKT) と相同な DAF-2、AGE-1、AKT の下流に存在し、DAF-2 シグナル経路の負の調節因子である DAF-16 と相同な転写因子である⁴⁾。Foxo1 は、フォークヘッド転写因子ファミリーに属し、約 100 個のアミノ酸からなるフォークヘッド DNA 結合部位と、その C 末端の transactivation domain を有する。Foxo1 には、3つの PKB/AKT リン酸化部位(threonine24,serine253,serine316)が存在し、インスリン、IGF-1 刺激により、主に PI3K-PKB/AKT 依存的にリン酸化を受け、核内より細胞質内へ移行し、その転写活性が失われる^{5),6)}。Foxo1 の標的遺伝子としては、すでに *Fas ligand*⁷⁾、*p27*⁸⁾、*p21*⁹⁾、*Igfbp-1*⁶⁾、*Gadd45*¹⁰⁾、*G6pase*¹¹⁾などが同定されており、細胞死誘発、細胞増殖の抑制、ストレスに対する抵抗性、糖産生に関与することが知られている。

本研究の目的は、成長ホルモン作用の欠如における延命効果において、Foxo1 がその下流にあるかどうかを明らかにし、未だ解明されていない哺乳動物個体における加齢現象の分子メカニズムを明らかにしていくことである。

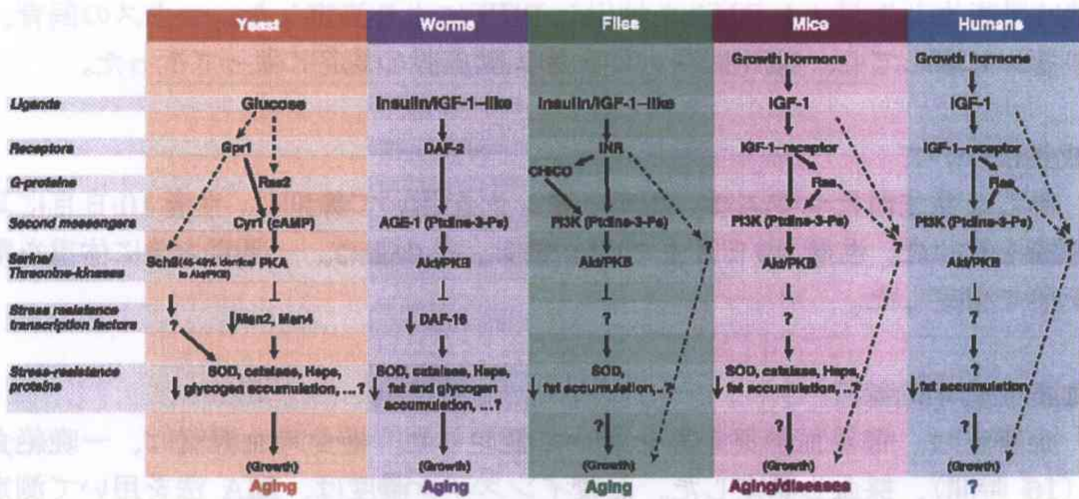


図1 酵母、線虫、ショウジョウバエ、マウス、ヒトにおける IGF-1 シグナル伝達経路の相同性と成長及び寿命への関与

Valter D.Longo and Caleb E. Finch : Science (2003) 299 : 1342-1346 より引用

3. 研究方法

解析に用いるマウスの作製と飼育について

Ghr^{+/-} マウスは、コロンビア大学 Argiris Efstratiadis 博士より供与されたものを用い、*Foxo1*^{+/-} マウスは、コロンビア大学 Domenico Accili 博士より供与されたものを用いた^{12),13)}。*Ghr*^{+/-} マウスと *Foxo1*^{+/-} マウスを交配することにより、*Ghr*^{+/-Foxo1}^{+/-} マウスを得、さらにそのマウスと *Ghr*^{+/-} マウスを交配することにより正常型、*Foxo1*^{+/-}、*Ghr*^{-/-}、*Ghr*^{-/-Foxo1}^{+/-}、*Ghr*^{+/-}、*Ghr*^{+/-Foxo1}^{+/-} マウスを作製した。マウスは、室温約 23°C、明期 14 時間（点灯 5 時、消灯 19 時）の環境で飼育した。水と餌は、自由に摂取させた。遺伝子型は尾断片よりゲノム DNA を抽出し PCR により決定した。マウスの飼育、取り扱いに関しては、旭川医科大学動物実験施設の規定に従って行った。

成長について

新しく生まれたマウスは、カラーインクを用いて識別し、生後 10 日目に耳に標識を付けた。生後 49 日目までは、毎日、その後は、一週間おきに体重を電子天秤で測定した。

血液生化学的解析

血糖値は、簡易血糖測定器を用いて測定した。絶食時血糖値は、一晩絶食後（16 時間）、採血し測定した。血漿インスリン濃度は、RIA 法を用いて測定した。

統計解析

群間の解析は、Fisher の検定の後、Student の t 検定を行い解析した。有意差は、 $p < 0.05$ を有意差ありと判断した。グラフ中のエラーバーは、標準偏差を表示した。

4. 研究成果

1) 寿命の解析

現在、寿命を解析するため、正常型、*Foxo1*^{+/-}、*Ghr*^{-/-}、*Ghr*^{-/-}*Foxo1*^{+/-}、*Ghr*^{+/-}、*Ghr*^{+/-}*Foxo1*^{+/-}マウスを正常環境下で飼育している（表1）。マウスは、線虫、酵母、ショウジョウバエなどのモデル生物と比べて寿命が数年と長いいため、最終的に *Foxo1* がマウスの寿命に影響するのか、現在継続して検討中である。

性別	遺伝子型	数
雄	正常型	14
	<i>Foxo1</i> ^{+/-}	11
	<i>GHR</i> ^{+/-}	24
	<i>GHR</i> ^{+/-} <i>Foxo1</i> ^{+/-}	23
	<i>GHR</i> ^{-/-}	16
	<i>GHR</i> ^{-/-} <i>Foxo1</i> ^{+/-}	27
雌	正常型	15
	<i>Foxo1</i> ^{+/-}	9
	<i>GHR</i> ^{+/-}	22
	<i>GHR</i> ^{+/-} <i>Foxo1</i> ^{+/-}	23
	<i>GHR</i> ^{-/-}	15
	<i>GHR</i> ^{-/-} <i>Foxo1</i> ^{+/-}	11

表1 寿命の解析に用いているマウスの性別、遺伝子型、数

2) 成長

生後 49 日目までは、毎日、その後は、一週間おきに体重を測定し 84 日目までのデータを示した (図 2)。その結果、*Ghr*^{-/-}*Foxo1*^{+/-}マウスは、*Ghr*^{-/-}マウスに対して有意な体重差が確認された。有意差が見られた期間において雄では約 16%、雌では、約 9%の体重増加が見られた。

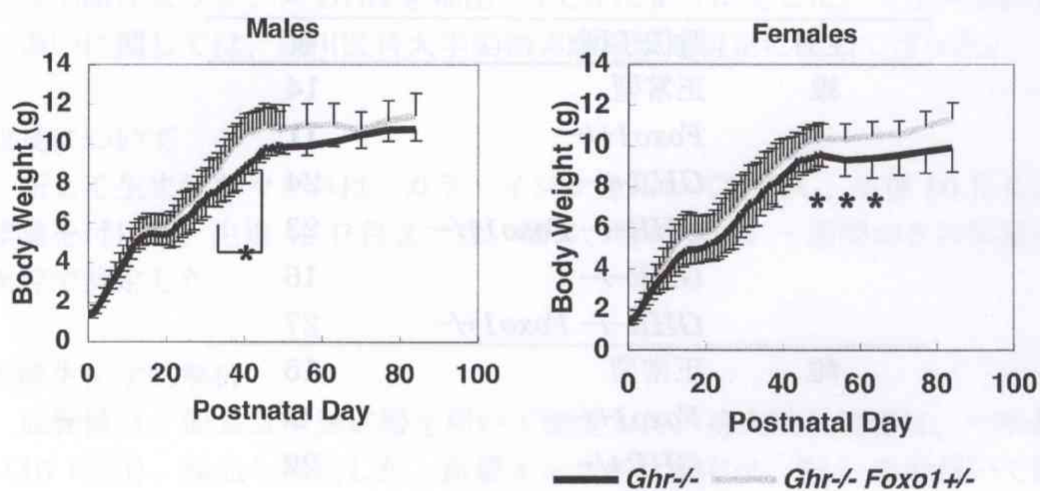


図 2 *Ghr*^{-/-}マウスと *Ghr*^{-/-}*Foxo1*^{+/-}マウスの体重の比較
(* $p < 0.05$)

3) 血液生化学的解析

絶食時の血糖値を経時的 (2,4,6 ヶ月齢) に測定したところ雄では *Ghr*^{-/-}マウスに対して *Ghr*^{-/-Foxo1}^{+/-}マウスは、2 ヶ月齢においてわずかではあるが有意に低い値を示し、他の月齢においても平均値は若干低かったが、雌においては同等の値であった(図3)。また、6 ヶ月齢での摂食時の血糖値は、*Ghr*^{-/-}マウス、*Ghr*^{-/-Foxo1}^{+/-}マウス間には雌雄ともに違いが見られなかったが、血漿インスリン濃度は、雄では *Ghr*^{-/-Foxo1}^{+/-}マウスの方が有意に低く *Ghr*^{-/-}マウスの 53.3%であった。しかし、雌では *Ghr*^{-/-Foxo1}^{+/-}マウスの方が平均値で約 20%高い値を示した (有意差なし)。正常型マウス、*Foxo1*^{+/-}マウスにおいても摂食時の血糖値は雌雄ともに違いが見られなかったが、雄では、*Foxo1*^{+/-}マウスの血漿インスリン濃度は正常型マウスに対して有意に低く、正常型の 54.7%であった (図4)。雌では平均値は正常型の 68.9%であったが有意差はなかった (図4)。

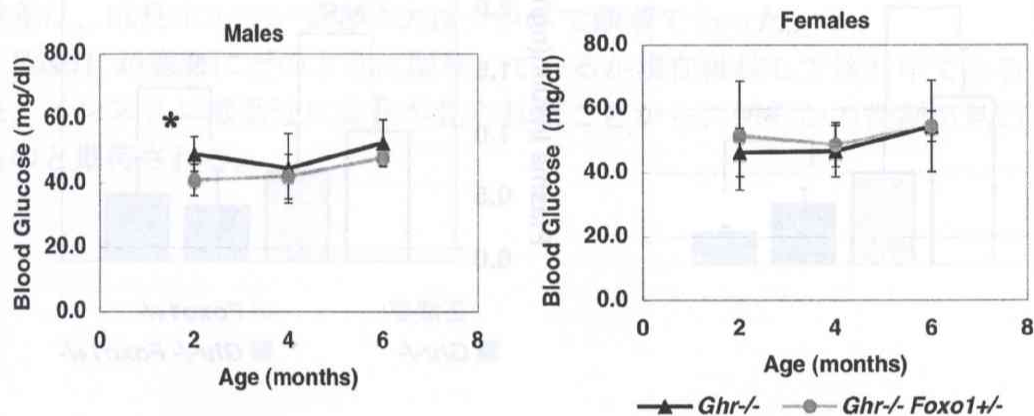


図3 *Ghr*^{-/-}マウスと *Ghr*^{-/-Foxo1}^{+/-}マウスの絶食時の血糖値の比較 (* $p < 0.05$)

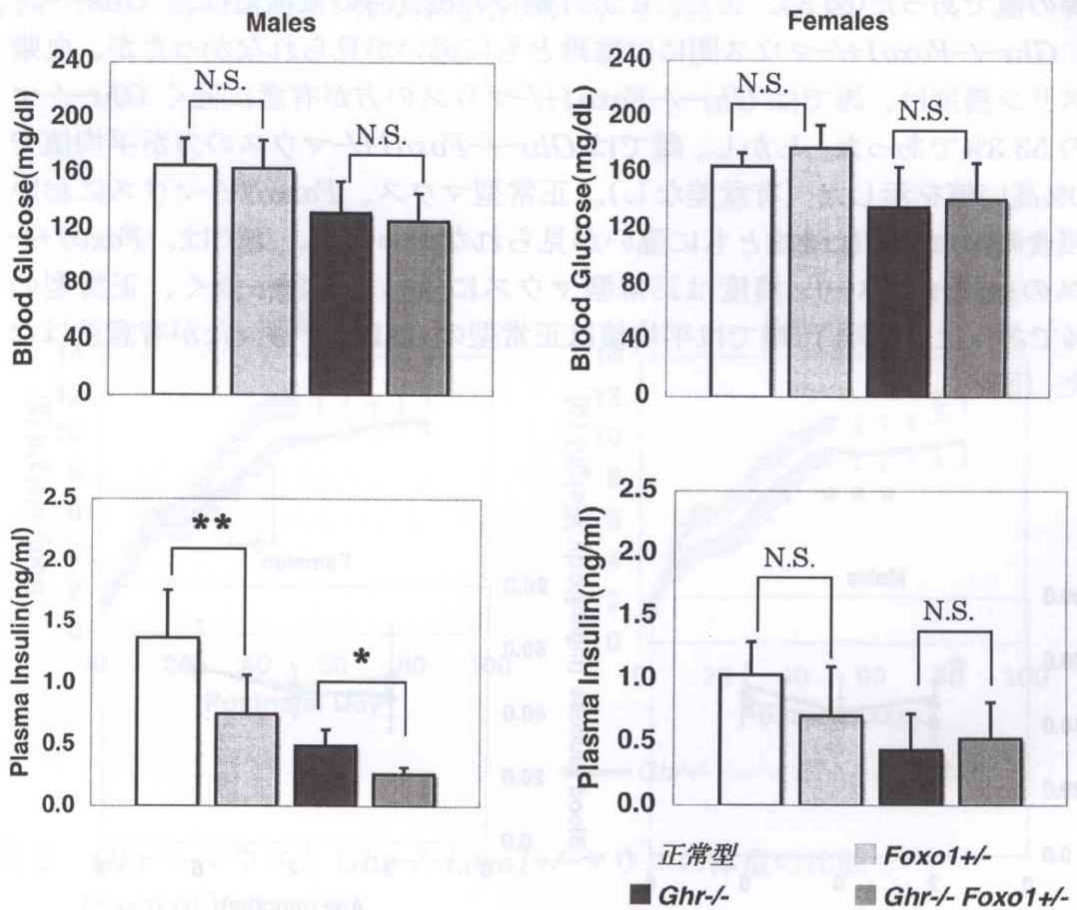


図4 6ヵ月齢時の正常型、*Foxo1*^{+/-}、*Ghr*^{-/-}、*Ghr*^{-/-}*Foxo1*^{+/-}マウスの摂食時血糖値と血漿インスリン値の比較 (**p*<0.05、***p*<0.005、N.S.:有意差なし)

5. 考察

Ghr^{-/-}マウスでは、成長ホルモンシグナル伝達が無いため IGF-1 濃度が著しく低く、そのため著しい成長障害が見られる。今回、我々は、*Ghr*^{-/-}マウスに対して *Ghr*^{-/-Foxo1}^{+/-}マウスは、有意に体重が増加することを示した。これは、成長ホルモン受容体欠損マウスの IGF-1 低下に伴う成長障害に *Foxo1* が関与している可能性があると考えられた。

また、我々は、軟骨前駆細胞株 ATDC5 が *Foxo1* を発現していることを確認し (データは示さない)、*Foxo1* の標的遺伝子の一つであるサイクリン依存性キナーゼインヒビター *p21* が軟骨前駆細胞株 ATDC5 の軟骨細胞への分化に重要な役割を担っていることが報告されていることから *Foxo1* が骨分化に関与していると考えている^{9),14)}。

糖代謝においては、6 ヶ月齢時において雄においては、摂食時血漿インスリン濃度の有意な低下が見られ、インスリン感受性が亢進していると考えられた。しかし、雌においては有意差が見られなかった。*Foxo1* のヘテロ欠損がおよぼすインスリン感受性亢進作用に雌雄差が存在すると考えられた。また、その雌雄差は、成長ホルモン受容体欠損マウスで顕著であった。

Foxo1 が寿命にどのように関与しているか現在継続して検討中であるが、成長、インスリン感受性に変化が見られたことから、何らかの役割が見いだせるものと期待される。

参考文献

- 1) Tator M, et al : Science (2003) 299 : 1346-1351
- 2) Longo VD, et al : Science (2003) 299 : 1342-1346
- 3) Holzenberger M, et al : Nature (2003) 421 : 182-187
- 4) Ogg S, et al : Nature (1997) 389 : 994-999
- 5) Nakae J, et al : J Biol Chem (1999) 274 : 15982-15985
- 6) Nakae J, et al : EMBO J (2000) 19 : 989-996
- 7) Brunet A, et al : Cell (1999) 96 : 857-868
- 8) Kops GJ, et al : Nature (1999) 398 : 630-634
- 9) Nakae J, et al : Dev Cell (2003) 4 : 119-129
- 10) Tran H, et al : Science (2002) 296 : 530-534
- 11) Nake J, et al : J Clin Invest (2001) 108 : 1359-1367
- 12) Floria Lupu, et al : Dev Biol (2001) 229 : 141-162
- 13) Nakae J, et al : Nat Genet (2002) 32 : 245-253
- 14) Negishi Y, et al : J Biol Chem (2001) 276 : 33249-33256