

ソマトメジン-Cの生体内における生理的及び薬理的作用
に関する研究

(研究課題) 61440052

昭和 61, 62, 63年度科学研究補助金(一般研究A)
研究成果報告書

平成 元年 3月



研究代表者 鎮 目 和 夫
(東京女子医科大学第2内科教授)

研究組織

研究代表者

鎮目和夫 (東京女子医科大学第2内科教授)

研究分担者

對馬敏夫 (東京女子医科大学第2内科教授)

高野加寿恵 (東京女子医科大学第2内科助教授)

肥塚直美 (東京女子医科大学第2内科講師)

安本(浅川)久美子 (東京女子医科大学第2内科助手)

研究協力者

佐治元康 (東京女子医科大学第2内科助手)

助川(田中)泉 (東京女子医科大学第2内科助手)

堀川玲子 (東京女子医科大学第2内科大学院生)

宮川めぐみ (東京女子医科大学第2内科非常勤講師)

研究経費

昭和61年度 10,000千円

昭和62年度 4,000千円

昭和63年度 3,000千円

計 17,000千円

研究成果

- 1) Hizuka N., Takano K., Asakawa K., Miyakawa M., Tanaka I., Horikawa R., Hasegawa S., Mikasa Y., Saito S., Shibasaki T. and Shizume K.: In vivo effects of insulin-like growth factor I in rats. *Endocrinol. Japon.* 34(Suppl. No. 1):115-121, 1987.
- 2) Hizuka N., Takano K., Tanaka I., Asakawa K., Horikawa R. and Shizume K.: Demonstration of insulin-like growth factor I in human urine. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64:1309-1312, 1987.
- 3) Saji M., Tsushima T., Isozaki O., Murakami H., Ohba Y., Sato K., Arai M. and Shizume K.: Interaction of insulin-like growth factor I with porcine thyroid cells cultured in monolayer. *Endocrinology* 121:749-759, 1987.
- 4) 肥塚直美: IGF-Iの生物学的作用. *内分泌学の進歩*, 5:129-140, 1987.
- 5) Hizuka N., Takano K., Asakawa K., Sukegawa I., Horikawa R., Kikuchi H. and Shizume K.: Biological action of insulin-like growth factor-I in vivo. In: Bercu B.B. (ed), *Basic and Clinical Aspects of Growth Hormone*, Plenum Press, New York, p.223-231, 1988.
- 6) Hizuka N., Takano K., Asakawa K., Shizume K. and Kikuchi H.: Biological effects of insulin-like growth I in vivo. *Gunma Symposia on Endocrinology* 25:137-147, 1988.

- 7) Hizuka N., Takano K., Asakawa K., Sukegawa I., Horikawa R., Yoshizawa K., Saito S. and Shizume K.: Urinary insulin-like growth factor I measurement and its clinical application. *Acta Paediatr. Scand.* Suppl. 347:127-133, 1988.
- 8) Saji M., Isozaki O., Tsushima T., Arai M., Miyakawa M., Ohba Y., Tsuchiya Y., Sano T. and Shizume K.: The inhibitory effect of iodide on growth of rat thyroid (FRTL-5) cells. *Acta Endocrinol.* 119:145-151, 1988.
- 9) Miyakawa M., Saji M., Tsushima T., Wakai K. and Shizume K.: Thyroid volume and serum thyroglobulin levels in patients with acromegaly: Correlation with plasma insulin-like growth factor I levels. *J Clin Endocrinol. Metab.* 67:973-978, 1988.
- 10) 肥塚直美, 高野加寿恵, 浅川久美子, 助川泉, 堀川玲子, 鎮目和夫: IGF-Iの生理的意義. *ホルモンと臨床*, 36(増刊):97-102, 1988.

I G F - I の生物学的作用 p. 5

Biological effects of insulin-like growth factor I in vivo. p. 31

別冊 (3 編)

Biological action of insulin-like growth factor-I in vivo.

In vivo effects of insulin-like growth factor I in rats.

I G F - I の生理的意義

I G F - I の生物学的作用

はじめに

Insulin-like growth factor I (I G F - I)の作用には成長ホルモンの作用を仲介する成長促進作用のみならず、種々の細胞における細胞増殖作用、又、インスリン様作用が報告されている。更に最近ではこれらの作用に加えて、細胞の分化を促進することが注目されている。しかしこれらの作用はI G F - Iの純品の不足から、in vitroの系で主に観察されており、このin vitroの系での作用がすべて生体内で生理的意義をもっているかは明らかではない。最近、遺伝子工学によりI G F - Iの作製が可能となり、この遺伝子工学で作製されたI G F - Iを用いてin vivoにおけるI G F - Iの作用の研究が可能となった。本稿では、I G F - Iのin vivoの生物学的作用について述べる。

1) Insulin-like growth factor (I G F) / somatomedin (S M)とは

I G F / S Mは血中濃度がG H依存性であり軟骨細胞の増殖及びsulphate (硫酸基)の取り込みを促進し、又インスリン作用を有するペプチドの総称である。これに属する物質としてヒト血漿より軟骨の硫酸基の取り込みを指標としてソマトメジンA (S M - A), ソマトメジンC (S M - C)が精製され、又、インスリン抗体で中和されないインスリン様作用を指標として、insulin-like growth factor I (I G F - I), I G F - IIが精製されてきた。更に、ラ

ット肝細胞培養液より multiplication stimulating stimulating activity (MSA) が精製されてきた。これらの化学構造の解明により SM は IGF-I と IGF-II の2つの物質に代表されることが明らかとなった。すなわち, SM-C, SM-A は IGF-I とほぼ同一であることが報告され, MSA は IGF-II と極めて類似し, ラット IGF-II と報告されている。現在では SM と IGF は同義語として用いられている。

2) 成長促進作用

a) 下垂体摘除及び正常ラットについての検討

下垂体摘除ラットおよび正常ラットに IGF-I 120 μ g/day を osmotic minipump で7日間持続皮下投与し, 成長が促進するか否か検討した。7日間 IGF-I 治療後の血中 IGF-I 値は下垂体摘除ラットおよび正常ラットにおいても未治療対照ラットに比べ明らかに高値を示し, IGF-I 投与法は有効であったと考えられた (図1)。

下垂体摘除ラットにおいては IGF-I 投与により, 体重は投与3日目より対照群に比べ有意の増加を認めた (図2)。脛骨骨端軟骨幅も対照群に比べ, IGF-I 投与群において明らかな増加を認めた (図3)。正常ラットにおいても同様に体重および脛骨骨端軟骨幅は IGF-I 投与ラットで対照群に比べより大であった (図4, 5)。これらの成績は IGF-I が GH 欠乏ラットのみならず正常ラットにおいても *in vivo* で個体の成長を促進することを示すものである。これらの成績は *in vitro* で IGF-I が軟骨の sulphate の

取り込みおよびDNA合成をGH依存性に増加させること等の成績、更に臨床的に下垂体性小人症にhGH治療を行うと血中IGF-I値は増加し、身長が増加が認められるという成績と考えあわせるとIGF-Iが個体の成長に生理的に役割を演じていることは疑いのないところである。

IGF-Iの主な産生臓器は肝臓であることが、mRNAレベルでも証明されているが、最近IGF-Iが種々の臓器でも産生されることが報告され、軟骨もその一つである。GHの成長促進作用についてはIGFを介する間接作用と長く考えられていたが、Isakssonらは下垂体摘除ラットの1側の脛骨骨端軟骨にGHを局所注入すると、注入側の骨の成長が他側の骨成長に比べて促進されたと報告し、GHの成長促進には直接作用も存在することを報告した。その後、このGHの作用は抗IGF-I抗体で抑制されること、又免疫組織化学的に脛骨骨端軟骨部にIGF-Iの存在を認め、このIGF-IがGH依存性であることが示された。更に、最近成長軟骨部のmRNAがGH依存性に増加することが示された。すなわち、これらの成績はGHが軟骨に作用して軟骨においてIGF-Iを産生し、このIGF-Iがautocrine又はparacrine的に作用していると考えられる。外因性に投与したIGF-Iが個体の成長を促進した著者ら成績は、血中に存在するIGF-Iが軟骨のIGF-I受容体に結合することにより、作用を示したと考えられる。しかし、IGF-Iの成長促進作用は生理的には局所で産生されるIGF-Iが主に役割を演じているのか、又はいわゆるendocrineとしてのIGF-Iが重要なのかは現在のところ明らかではない(図6)。

下垂体摘除ラット及び正常ラットに IGF-I を投与すると成長促進作用が認められたが、この IGF-I 投与ラットの血中尿素窒素の変化について検討した。IGF-I 投与ラットにおいては対照ラットに比べ血中尿素窒素の有意な低下を認め、この作用は下垂体摘除ラットでより顕著であった(図7)。これらの成績は IGF-I が *in vivo* において蛋白同化作用を有することを示している。

b) 糖尿病ラットについての検討

糖尿病小児では成長障害が認められるが、この原因の1つには血中 IGF-I の低値があげられる。糖尿病ラットにインスリンを投与すると血中 IGF-I は増加するが hGH を投与しても血中 IGF-I は増加しないと報告されている。そこで糖尿病ラットに IGF-I を投与し成長促進効果が認められるか否か検討した。

ストレプトゾトシン糖尿病ラットを作製し、ミニ浸透圧ポンプを用いて IGF-I 120 μ g/day を7日間投与し、インスリン治療と比較した。実験期間中の体重の変動を図8に示す。STZ投与により体重の増加は健常ラットに比べ低下し、インスリン投与により回復した。しかし、IGF-I 投与によってはインスリン投与と異なり体重増加は少なく、未治療糖尿病ラットと差を認めなかった。体重と同様に体長も IGF-I 投与によっては増加せず、未治療糖尿病ラットと差を認めなかった(図9)。未治療糖尿病ラットでは脛骨骨端軟骨幅は健常ラットに比べて小さく、インスリン投与により増加したが、IGF-I の投与によってやや増加傾向を示すものの、未治療糖尿病ラットと有意差を認めなかった(図10)。このように糖尿病ラットにおいては血中 IGF-I が低値にもかかわらず、正

常ラットで成長促進作用の認められる量の IGF-I を投与して、血中 IGF-I が上昇しても IGF-I の成長促進作用は認められませんでした。Froeshらは糖尿病ラットに我々の用いた2.5倍量の IGF-I 300 μ g/dayを投与し成長促進効果を認めたと報告しており、もっと大量投与すれば IGF-I の成長促進作用が認められる可能性はある。

3) インスリン様作用

IGFはFroeshらによりヒト血中にインスリン抗体で中和されないインスリン作用を有する物質として純化精製されてきた物質である。IGF-Iはin vitroにおいてインスリンと同様にglucoseの酸化、glucoseの輸送等を促進し、このIGF-Iの力価はインスリンの約1/100と報告されている。in vivoでの成績は少ないが、関らは、正常ラットにIGF-I 1000 μ g/kgを静脈内1回投与すると血糖は明らかに低下し、投与後15分で投与前値の55%まで低下し60分後に回復すること、又、下垂体摘除ラットでは100 μ g/kgのIGF-Iで血糖降下作用が認められ、1000 μ g/kgでは投与後2時間でも投与前値の45%の低値を示したと報告している。FroeshらはヒトにおいてもIGF-I 100 μ g/kgを静注し、血糖降下作用を認めたと報告している。前述した糖尿病ラットにIGF-Iを7日間投与した際の血糖値を図11に示すが、IGF-I投与により僅かではあるが血糖降下作用を認めた。このようにIGF-Iがin vivoにおいてもインスリン様作用を有することが認められる。生理的状态において、IGF-Iがどの程度糖代謝に影響を及ぼしているかは

現在のところ明らかではないが、ある病的状態では糖代謝に影響しうると考えられる。

4) 細胞の分化に及ぼす作用

最近、IGF-Iが細胞の増殖を促進するのみならず、細胞の分化を促進することが注目されている。骨芽細胞、筋原細胞、卵巣の顆粒膜細胞、Leydig細胞の分化及びerythropoiesisを促進することが報告されている。

GH単独欠損症患者の2次性徴の発来は一般的に遅延しhGH治療を開始すると2次性徴の発来をみるものがしばしば認められる。この性腺発育に及ぼすhGH治療による効果は性腺刺激ホルモンとの協同によるhGHの直接作用、あるいはIGF-Iを介しての間接作用が考えられる。そこで、この点を明らかにする1つとして、Leydig細胞のtestosterone分泌に及ぼすIGF-Iの効果について検討した。IGF-I単独ではtestosterone分泌に影響を与えないが、hCG存在下ではIGF-IはhCGのtestosterone分泌刺激作用をより増強した(図12)。すなわち、この成績は性腺発育過程にIGF-Iが関与している可能性を示すものである。

5) GH分泌に及ぼす作用

ラットにおいてIGF-Iはin vitroにおいて視床下部のソマトスタチン分泌を促進し、GRF分泌を抑制、GRFに対するGH分泌を抑制することが報告されている。又、下垂体レベルではIGF-IがGHの合成を抑制することが報告され、in vivoにおいては

無麻酔ラットに IGF-I を脳室内に投与すると内因性の GH の分泌が抑制されることが報告されている。これらの成績は IGF-I と GH の negative feedback 機構が存在することを支持している。

正常ラットに IGF-I を7日間投与すると、体重の増加に伴い他の臓器と同様に下垂体重量は増加した(図13)。そこで下垂体抽出物中の GH, 及び TSH の含量を測定した。IGF-I 投与ラットの下垂体抽出物中の蛋白量当りの TSH 含量は対照群と差を認めなかった。一方、下垂体抽出物中の蛋白量当りの GH 含量は対照群と比べ増加していた(図14)。この in vivo での成績は IGF-I が下垂体からの GH 分泌を抑制する可能性を示唆するものである。

おわりに

以上 IGF-I の in vivo での成績を中心に IGF-I の作用について考えてみた。IGF-I が個体の成長に、又、GH 分泌調節機構に生理的役割を担っていると考えられる。インスリン様作用の生理的意義については現在明らかではないが、ある病的状態において IGF-I が生体内で作用を及ぼし得ると考えられる。更に、最近 IGF-I が種々の細胞で GH 依存性にあるいは非依存性に産生されることが証明されている。これら局所で産生される IGF-I が局所において paracrine 又は autocrine 的に作用し、これら細胞の増殖、或いは機能に関与していることが考えられ、今後の研究が期待されるところである。

文献

1. Zapf J, Schmid CH, Froesch ER: Biological and immunological properties of insulin-like growth factors (IGF) I and II. *Clin. Endocrinol. Metab.* 13:3, 1984.
2. Niwa M, Sato S, Saito Y, Uchiyama F., Ono H., Yamashita M, Kitaguchi T, Shiga Y, Notani J, Yamada H, Ishii Y, Ueda I, Takagi Y: Chemical synthesis, cloning and expression of genes for human somatomedin C (insulin-like growth factor I) and ⁵⁹Val-somatomedin C. *Ann. NY. Acad. Sci.* 469:31, 1986.
3. Schalch D, Reismann D, Emler C, Humbel R, Li CH, Peters M, Lau E: Insulin-like growth factor I/somatomedin C (IGF-I/Sm C): Comparison of natural, solid phase synthetic and recombinant DNA analog peptides in two radioligand assays. *Endocrinology* 115:2490, 1984.
4. Horlein D, Buell G, Schultx F, Hirschi M, Burleigh BD. Characterization of two forms of somatomedin-C produced by recombinant bacteria. 67th Annual Meeting of The Endocrine Society, Baltimore, Abstract No. 250, 1985.
5. Hizuka N, Takano K, Shizume K, Asakawa K, Miyakawa M, Tanaka I, Horikawa R: Insulin-like growth factor I stimulates growth in normal growing rats. *Eur. J. Phamacol.* 125:143, 1986.

6. Zapf J, Hauri C, Waldvogel M, Froesch ER: Acute metabolic effects and half lives of intravenously administered insulinlike growth factor I and II in normal and hypophysectomized rats. *J. Clin. Invest.* 77:1768, 1986.
7. Scheiwiller E, Guler H-P, Merryweather J, Scandella C, Maerki W, Zapf J, Froesch ER: Growth restoration of insulin-deficient diabetic rats by recombinant human insulin-like growth factor I *Nature* 323:169, 1986.
8. Valliant SW, Peters M, Finley S, Fagin K: Insulin-like growth factor-I[Thr59]: Hypoglycemic potency and pharmacokinetics in conscious rats. 68th Annual Meeting of The Endocrine Society, Anaheim, Abstract No. 392, 1986.
9. Hizuka N, Takano K, Asakawa K, Miyakawa M, Tanaka I, Horikawa R, Hasegawa S, Mikasa Y, Saito S, Shibasaki T, Shizume K: In vivo effects of insulin-like growth factor I in rats. *Endocrinol. Japon.* 34 (Suppl. 1): 115, 1987.
10. Mathews LS, Norstedt G., Palmiter R.D: Regulation of insulin-like growth factor I gene expression by growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:9343, 1986.
11. Hynes MA, Van Wyk JJ, Brooks PJ, D'Ercole AJ, Jansen M, Lund PK: Growth hormone dependence of somatomedin C/ insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II messenger ribonucleic acids. *Mol. Endocrinol.* 1:233, 1987.

12. Victor KM, Han A, D'Ercole AJ, Lund PK: Cellular localization of somatomedin (insulin-like growth factor) messenger RNA in the human fetus. *Science* 236:193, 1987
13. Isaksson OGP, Jansson JO, Gause IAM: Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science* 216:1237, 1981.
14. Schlechter NL, Russel SM, Spencer EM, Nicoll CS: Evidence suggesting that the direct growth-promoting effect of growth hormone on cartilage in vivo is mediated by local production of somatomedin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:7932, 1986.
15. Nilsson A, Isgaard J, Lindahl A, Dahlstrom A., Skottner A, Isaksson OGP: Regulation by growth hormone of number of chondrocytes containing IGF-I in rat growth plate. *Science* 233:571, 1986.
16. Isgaard J, Nilsson A, Isaksson O, Moller C, Norstedt G: Regulation of IGF-I mRNA in rat growth plate by growth hormone. 69th Annual Meeting of The Endocrine Society, Indianapolis, Abstract No. 305, 1987.
17. Takano K, Hizuka N, Shizume K, Hasumi Y, Kogawa M, Tsushima T: Effect of insulin and nutrition on serum levels of somatomedin A in the rat. *Endocrinology* 107:1614, 1980.
18. Phillips LS, Orawski AT. Nutrition and somatomedin III. Diabetic control, somatomedin, and growth in rats. *Diabetes* 26:864, 1977.

19. 関二郎, 浅田孝, 堀合東雄, 元山行雄, 小野隆治, 柴山文男, 菊地博之: 遺伝子工学性 IGF-I / Sm C の生物活性: インスリン様作用について. 日本内分泌学会誌 62:495, 1986.
20. Guler HP, Zapf J, Merryweather J, Sandellac C, Maerki W, Froesch ER: Acute metabolic effects of recombinant human insulin-like growth factor I (rh IGF I) in man. Diabetes 35 (Suppl. 1): Abstract No. 207, 1986.
21. Froesch ER, Schmid C, Schander J, Zapf J: Actions of insulin-like growth factors. Annu. Rev. Physiol. 47:443, 1985.
22. Berelowitz M, Szabo M, Frohman LA, Firestone S, Chu L, Hintz RL: Somatomedin-C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and the pituitary. Science 212:1279, 1981.
23. Shibasaki T, Yamauchi N, Hotta M, Masuda A, Imaki T, Demura H, Ling N, Shizume K: In vitro release of growth hormone-releasing factor from rat hypothalamus: effect of insulin-like growth factor-1. Regulatory Peptides 15:47, 1986.
24. Brazeau P, Guillemin R, Ling N, Van Wyk JJ, Humble R: Inhibition par les somatomedines de la secretion de l'hormone de croissance stimulee par le facteur hypothalamique somatocrinine (GRF) ou le peptide de synthesehpGRF. C. R. Seances. Acad. Sci. III 295:651, 1982.

25. Yamashita S, Melmed S: Insulin-like growth factor I action on rat anterior pituitary cells: suppression of growth hormone secretion and messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 118:176, 1986.

26. Abe H, Molitch M, Van Wyk JJ, Underwood LE: Human growth hormone and somatomedin-C suppress the spontaneous release of growth hormone in unanesthetized rats. *Endocrinology* 113:1319, 1983.

図 1 : 下垂体摘除 (HYPOX) 及び正常ラットに IGF-I (120 μ g/day) を 7 日間投与後の血中 IGF-I 値。
 - : 平均値

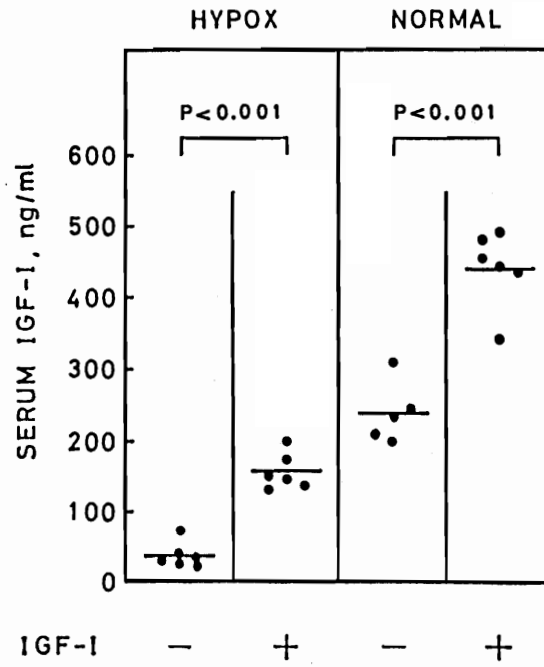


図 2 : 下垂体摘除ラットに IGF-I 120 μ g/day を7日間投与期間中の体重の変化 (●—●) 。対照 (●---●) は0.1N酢酸を投与。 ; 平均 \pm SEM

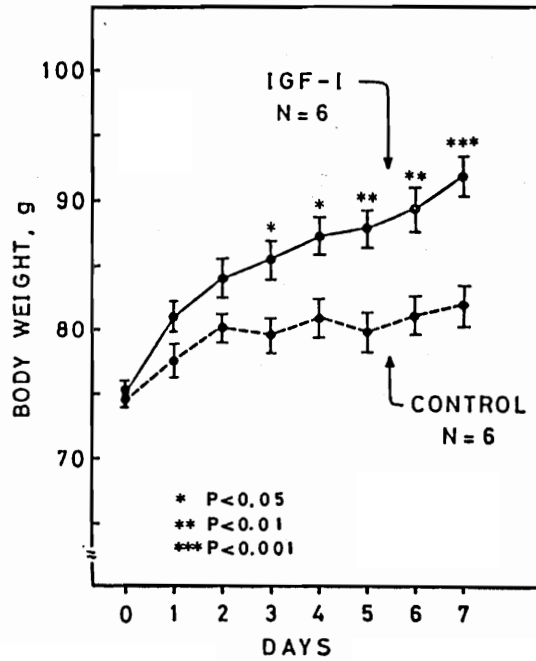


図3：下垂体摘除ラットの脛骨骨端軟骨幅に及ぼすIGF-I治療
(120 μ g/day 7日間)の効果。

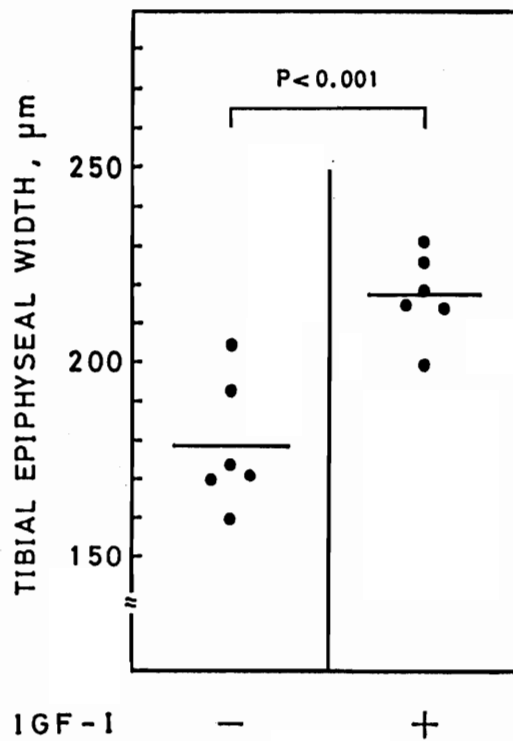


図4：正常ラットに I G F - I 120 μ g/day を7日間投与期間中の体重の変化 (●—●)。対照 (●---●) は0.1N酢酸を投与。

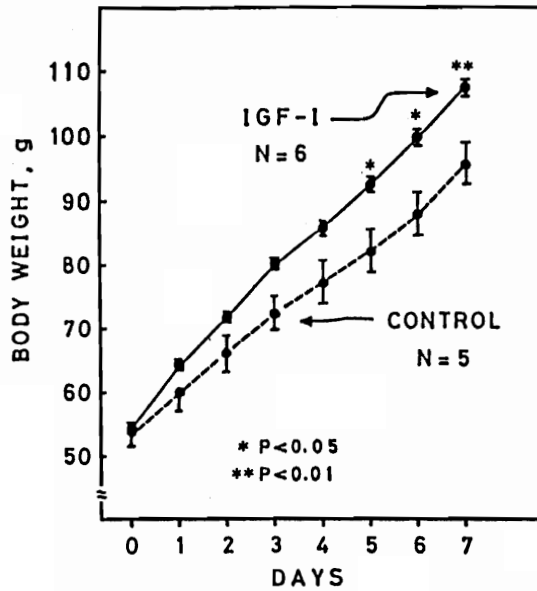


図5：正常ラットの脛骨骨端軟骨幅に及ぼすIGF-I治療
(120 μ g/day 7日間)の効果。

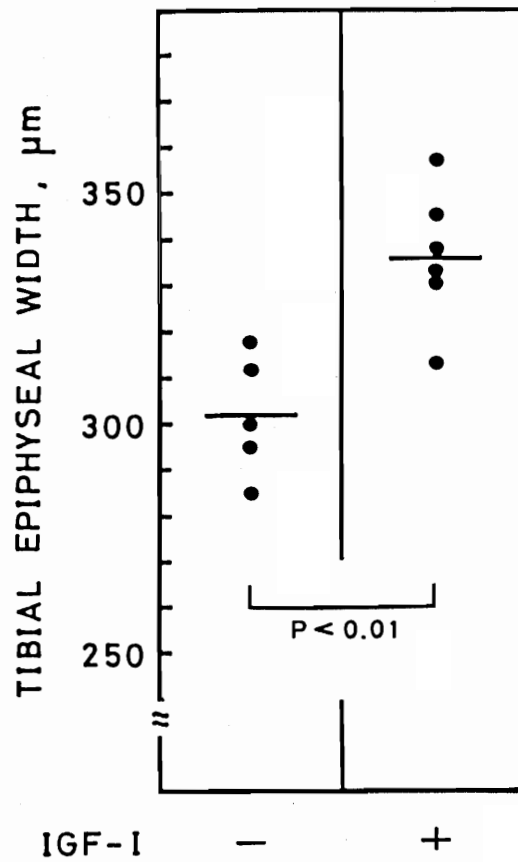


図6：成長ホルモン（GH）及びIGF-Iの骨成長に及ぼす作用点

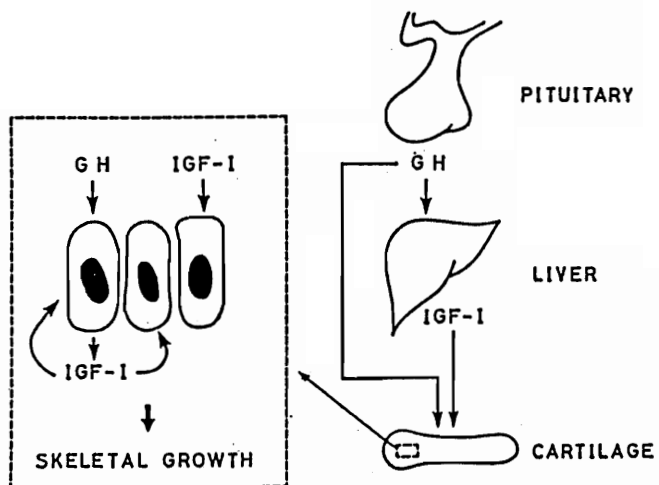


図7：下垂体摘除及び正常ラットの血中尿素窒素（BUN）に及ぼすIGF-I治療（120 μg/day, 7日間）の効果

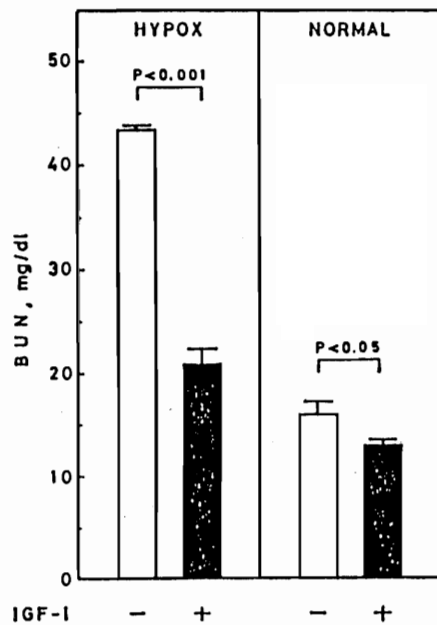


図8：糖尿病ラット（DM）の体重の変化に及ぼすIGF-I及び
インスリン治療の影響

ストリプトツツ100mg/kgを静注し糖尿病ラットを作製し、3日後
IGF-I 120 μ g/dayあるいはインスリン1 U/dayを7日間
投与した。投与期間中の各治療群の体重の平均値の変動。

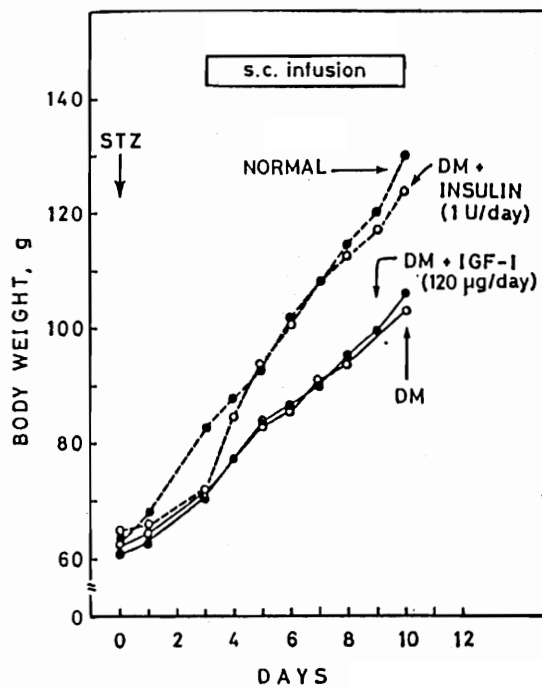


図9：糖尿病ラットの体重（下段）及び体長（上段）に及ぼすIGF-I (120 μ g/day)及びインスリン(1 U/day)治療（7日間）の影響。*：p<0.05

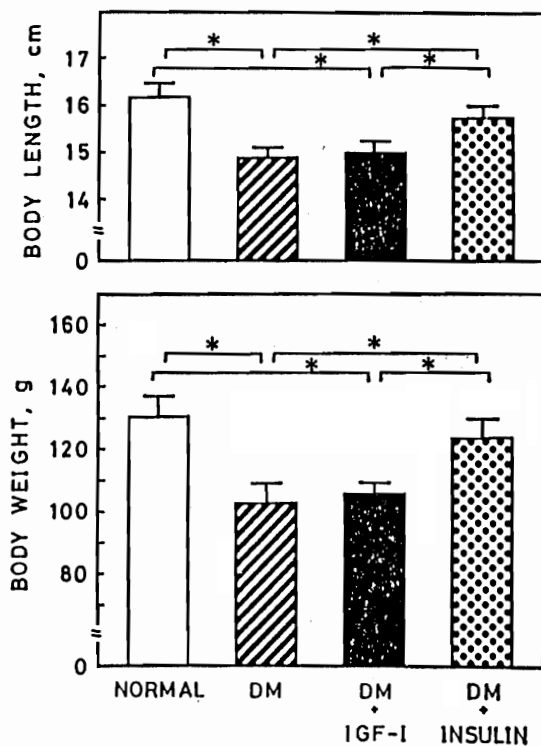


図10：糖尿病ラットの脛骨骨端軟骨幅に及ぼす IGF-I 及びインスリン治療（各々，120 μ g/day, 1 U/day 7日間）の効果。

*: $p < 0.05$

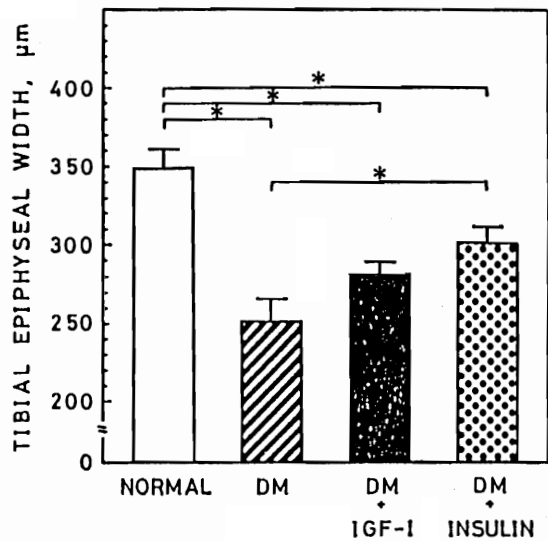


図11：糖尿病ラットの血糖値に及ぼすIGF-I及びインスリン治療（各々、120 μ g/day, 1 U/day 7日間）の効果。

*: $p < 0.05$

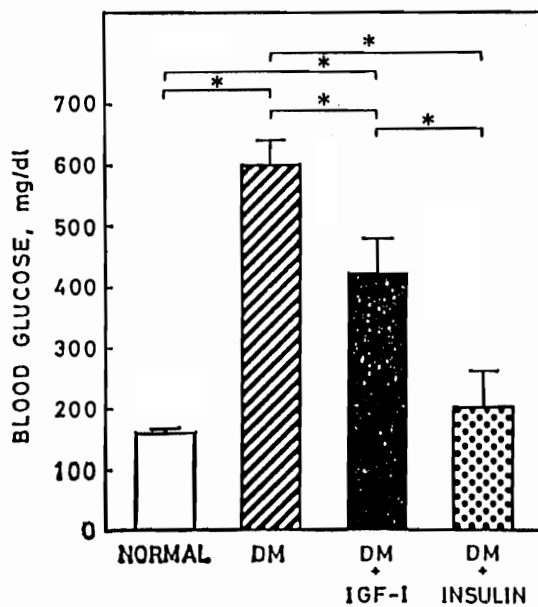


図12: Leydig細胞のテストステロン分泌に及ぼすIGF-Iの効果。
 Leydig細胞とIGF-Iを24時間preincubateし、その後
 IGF-IとhCG 1 ng/mlを添加(右)あるいはIGF-I
 を単独添加(左)し24時間後培養液中のテストステロンを
 測定した。

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

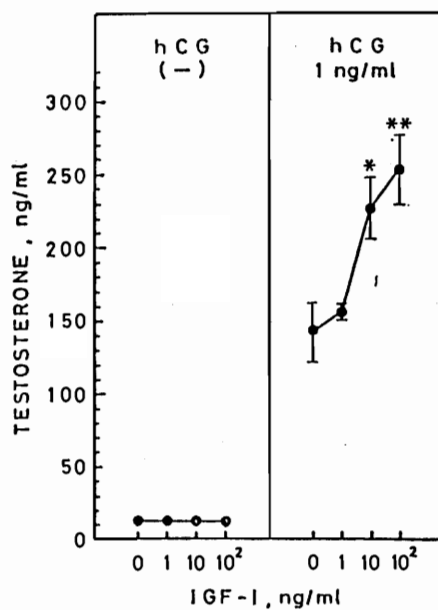


図13：正常ラットの腎，肝，睾丸，下垂体重量に及ぼすIGF-I治療(120 μ g/day 7日間)の効果。

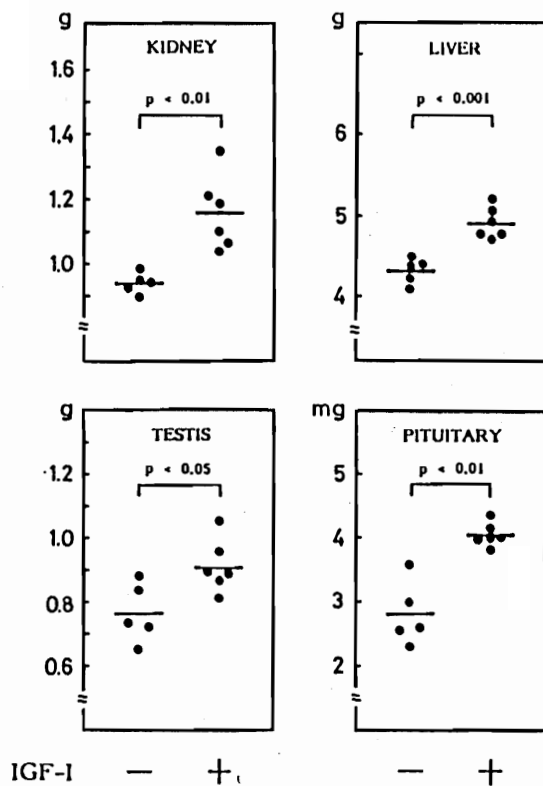


図14：下垂体GH含量 ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$ 蛋白)に及ぼすIGF-I治療 (120 $\mu\text{g}/\text{day}$ 7日間)の効果。

