

Snell 下垂体性小人症マウスにおける成長ホルモン, 甲状腺ホルモンの腎発育への影響

東邦大学医学部泌尿器科学第2講座 (主任: 松島正浩教授)

徳 田 直 子

EFFECT OF GROWTH HORMONE AND THYROXINE ON RENAL DEVELOPMENT IN SNELL PITUITARY DWARF MICE

Naoko Tokuda

From the 2nd Department of Urology, School of Medicine, Toho University

To elucidate the effects of growth hormone (GH) and thyroxine (T_4) on renal development, we biochemically and morphologically examined the renal tissue of Snell pituitary dwarf mice (dw/dw) at different developmental stages. Differences in DNA, RNA and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) content between the dwarf and normal control mice first became apparent on the 10th day of age, and from this time that of dwarf mice showed no further increase in DNA and RNA content and decrease in IGF-1 content, whereas that of the normal control mice continued to increase.

These findings indicated that GH and T_4 may have effects on the renal development, and deficiency of these hormones to affect renal development from the 10th day of age.

(Acta Urol. Jpn. 41: 419-426, 1995)

Key words: Snell dwarf mouse, Renal development, Hormone

緒 言

Snell 下垂体小人症マウス (dw/dw)¹⁾ はクロモソーム16に異常をもち²⁾ 常染色体劣性遺伝形式をとるミュータントマウスである。下垂体前葉の先天的な形成不全により胎性期より成長ホルモン (GH), 甲状腺刺激ホルモン (TSH), プロラクチン (PRL), 副腎皮質刺激ホルモンがほとんどを欠損しており, 臓器の発育分化におよぼす GH や T_4 の効果を研究する上できわめて適した実験動物として用いられてきた。この内分泌異常マウスを用い, GH, T_4 の欠損が腎臓の発育にどのような影響をおよぼすかを, 幼若期から青年期にあたる0日齢から40日齢にかけて発育を追って生化学的, 組織学的に比較検討した。

方 法

1. 実験動物

実験動物は米国ジャクソン研究所よりヘテロ接合体 ($dw/+$) 雌雄マウスを購入し自家繁殖された Snell 下垂体性小人症マウスを用いた。なおヘテロ接合体 ($dw/+$) マウスと正常ホモ接合体 ($+/+$) マウスはその身体的特徴, 下垂体前葉および腎臓内の諸種生

学的所見などに差が認められなかったため, 正常対照群には同腹のヘテロ接合体マウスと正常ホモ接合体マウスを使用し, 以後これらを $+/+$ マウスと表記した。また, 生後2週齢までは $+/+$ マウスと dw/dw マウスとの間に身体的特徴の差が明らかでないため, 下垂体ホモジェネートを電気泳動し, GH バンドの有無により dw/dw マウスの検定を行った³⁾。

2. 実験方法

各日齢の両群マウスを瀕血断頭, 腎臓を摘出し湿重量測定後, 生化学的実験に供した。

(1)RNA, DNA の定量: Schmidt & Thannhauser の方法⁴⁾にて抽出し, Mejbaum らの方法⁵⁾, Burton らの方法⁶⁾に従いそれぞれ比色定量した。

(2)蛋白質の定量: Lowry らの方法⁷⁾により, 750 nm で比色定量した。標準標品として牛血清アルブミンを用いた。

(3)インシュリン様成長因子-1 (IGF-1) の定量: Sara らの方法⁸⁾で抽出し, Nichols 社製 SM-C RIA キットを用いて測定した。

(4)電気泳動: Laemmli の方法 (a) に従い10%のポリアクリルアミド平板を用いて, 30 mA の定電流下で行った。指標としてブタ GH (米国 Miles 研究

Table 1. Body weight and organ weight of the kidneys from normal control (+/?) and Snell dwarf (*dw/dw*) mice, at different development.

All data are expressed as means $\pm$ SD, with the number of animals shown in parentheses. The significance of differences between *dw/dw* and +/? was evaluated by Student's t test (*, $p < 0.001$).

Age (day)	Body weight (g)		Wet organ weight (mg wet wt.)	
	+/?	<i>dw/dw</i>	+/?	<i>dw/dw</i>
0	2.22 $\pm$ 0.31 (27)	2.21 $\pm$ 0.35 (8)	9.92 $\pm$ 0.64 (27)	8.31 $\pm$ 1.07 (8)
10	7.35 $\pm$ 0.64 (13)	6.05 $\pm$ 0.76 (5)	38.4 $\pm$ 2.36 (13)	31.6 $\pm$ 3.09 (5)
20	11.1 $\pm$ 0.64 (9)	6.18 $\pm$ 0.54 (6)*	75.5 $\pm$ 4.42 (9)	27.6 $\pm$ 2.06 (6)*
30	18.2 $\pm$ 1.19 (13)	5.98 $\pm$ 0.72 (12)*	109 $\pm$ 3.96 (13)	28.5 $\pm$ 1.49 (12)*
40	23.2 $\pm$ 1.93 (10)	5.75 $\pm$ 0.60 (9)*	163 $\pm$ 8.97 (10)	25.2 $\pm$ 1.16 (9)*

Table 2. RNA and DNA contents, protein/DNA ratio and RNA/DNA ratio of the kidneys from normal control (+/?) and Snell dwarf (*dw/dw*) mice, at different development.

All data are expressed as means $\pm$ SD, with the number of animals shown in parentheses. The significance of differences between *dw/dw* and +/? was evaluated by Student's t test (*, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.05$).

Age (day)	total RNA (μ g)		total DNA (μ g)	
	+/?	<i>dw/dw</i>	+/?	<i>dw/dw</i>
0	45.3 $\pm$ 5.12 (27)	46.5 $\pm$ 6.17 (8)	136 $\pm$ 12.1 (26)	140 $\pm$ 53.9 (8)
10	202 $\pm$ 20.1 (13)	174 $\pm$ 13.6 (5)	499 $\pm$ 39.8 (13)	378 $\pm$ 92.1 (5)
20	381 $\pm$ 10.9 (9)	113 $\pm$ 8.06 (6)*	953 $\pm$ 35.3 (9)	468 $\pm$ 38.2 (6)*
30	504 $\pm$ 26.2 (13)	122 $\pm$ 12.0 (12)*	1025 $\pm$ 114 (13)	526 $\pm$ 53.8 (12)*
40	516 $\pm$ 45.2 (10)	109 $\pm$ 4.82 (9)*	1273 $\pm$ 61.4 (10)	434 $\pm$ 36.9 (9)*

Age (day)	protein/DNA		RNA/DNA	
	+/?	<i>dw/dw</i>	+/?	<i>dw/dw</i>
0	3.51 $\pm$ 0.36 (27)	3.22 $\pm$ 1.04 (8)	0.32 $\pm$ 0.01 (27)	0.38 $\pm$ 0.09 (8)
10	14.8 $\pm$ 3.06 (13)	17.7 $\pm$ 3.89 (5)	0.51 $\pm$ 0.14 (13)	0.69 $\pm$ 0.28 (5)
20	14.8 $\pm$ 1.69 (9)	9.43 $\pm$ 0.43 (6)***	0.77 $\pm$ 0.34 (9)	0.25 $\pm$ 0.02 (6)**
30	20.5 $\pm$ 1.70 (13)	12.4 $\pm$ 1.89 (12)**	0.51 $\pm$ 0.06 (13)	0.30 $\pm$ 0.07 (12)***
40	26.2 $\pm$ 1.56 (10)	12.4 $\pm$ 1.59 (9)*	0.41 $\pm$ 0.04 (10)	0.35 $\pm$ 0.09 (9)***

所製)と一緒に電気泳動した。

(5)組織学的検索: 各日齢のマウスより腎臓を摘出した後, ホルマリン固定, パラフィン包埋し, 6 μ m の腎門部を通る前額断切片を作成し, ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色後光学顕微鏡による形態学的検索を行った。

結 果

1. 体重と腎重量の変化

dw/dw マウスは出生時から10日齢までは身体的特徴に+/?マウスと差が認められず, 体重の増加も同

じ割合で進行した (Table 1)。+/?マウスは生後10日目以後も体重は増加し続け, 40日齢では 23.2 $\pm$ 1.93 gを示した。これに対して *dw/dw* マウスの体重増加は生後10日目以後緩やかになり, 2週齢をすぎるとほとんど停止した。40日齢での *dw/dw* マウスの体重は 5.75 $\pm$ 0.60 g で+/?マウスの24.7%に過ぎなかった。

他方, *dw/dw* マウスの腎臓の湿重量も, 10日齢までは+/?マウスとの間に差は認められなかった。しかし10日齢以後の *dw/dw* マウスの腎重量増加は体重の変化と同様にほとんど停止した。40日齢での *dw/dw* マウスの腎湿重量は 25.2 $\pm$ 1.16 mg で+/?マウスのわ

ずか15.5%にすぎなかった。

2. 腎臓内 RNA 量と DNA 量の変化

腎臓1個当たりの RNA 含量および DNA 含量を发育を追って測定した (Table 2). 生後10日目までは *dw/dw* マウスと *+/?* マウスの腎臓内 RNA 含量並びに DNA 含量に有意な差はいずれも認められなかった。しかし20日齢以後も *+/?* マウスで RNA 含

量および DNA 含量ともに増加したのに対し, *dw/dw* マウスでは両者ともにその増加がほとんど停止してしまい, 40日齢の RNA 含量と DNA 含量は *+/?* マウスのそれぞれ21.1%, 34.1%にすぎなかった。

3. 腎臓内蛋白質量の変化

g 湿重量当たりの蛋白質は0日齢で *+/?* マウス, *dw/dw* マウスともに 59 mg/g-湿重量を示し, 10日齢以

Table 3. IGF-1 contents of serum and kidneys from normal control (*+/?*) and Snell dwarf (*dw/dw*) mice, at different development. All data are expressed as means $\pm$ SD, with the number of animals shown in parentheses. The significance of differences between *dw/dw* and *+/?* was evaluated by Student's t test (*, $p<0.001$; **, $p<0.01$).

Age (day)	Serum IGF-1 (ng/ml)		Kidney IGF-1 (ng/g wet wt.)	
	<i>+/?</i>	<i>dw/dw</i>	<i>+/?</i>	<i>dw/dw</i>
10	75 $\pm$ 15 (11)	56 $\pm$ 21 (3)	42.5 $\pm$ 8.03 (13)	44.2 $\pm$ 16.7 (5)
20	199 $\pm$ 42 (7)	113 $\pm$ 27 (4)**	66.7 $\pm$ 17.7 (9)	21.6 $\pm$ 12.1 (6)*
30	233 $\pm$ 31 (10)	77 $\pm$ 33 (4)*	72.7 $\pm$ 20.1 (13)	11.5 $\pm$ 2.88 (13)*
40	320 $\pm$ 12 (3)	69 $\pm$ 27 (6)*	62.5 (2)	27.0 (2)

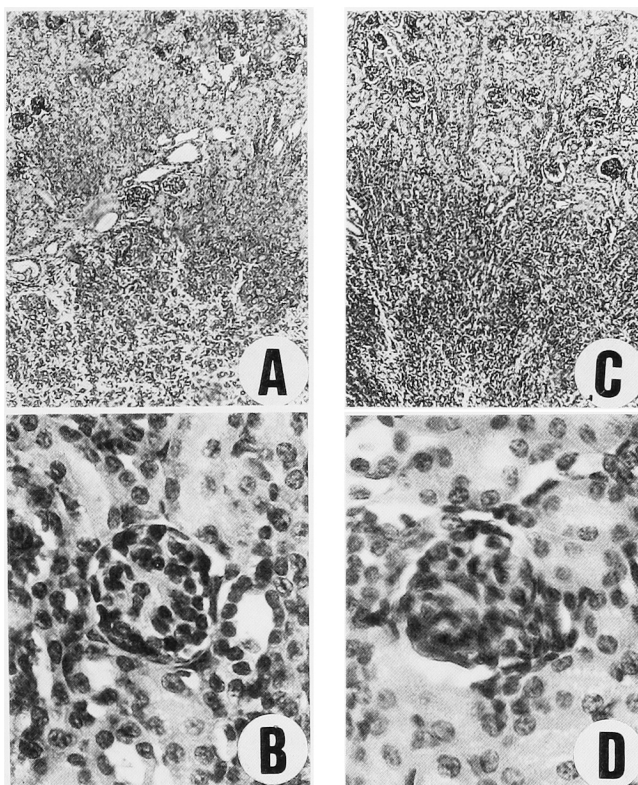


Fig. 1. Photomicrographs of kidney and glomeruli from normal control (*+/?*) and Snell dwarf (*dw/dw*) mice, at 10 days old.
A: (*+/?*) kidney ($\times 25$) B: (*+/?*) glomeruli ($\times 300$) C: (*dw/dw*) kidney D: (*dw/dw*) glomeruli

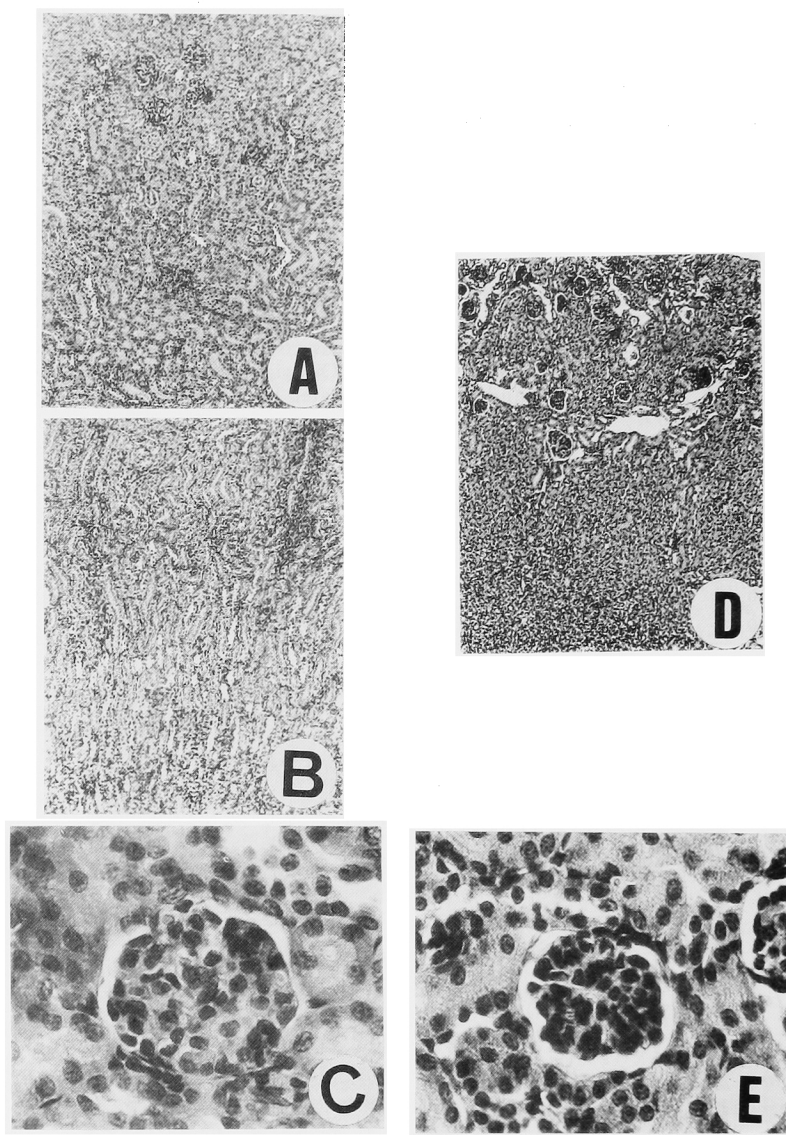


Fig. 2. Photomicrographs of kidney and glomeruli from normal control (+/?) and Snell dwarf (*dw/dw*) mice, at 20 days old.

A: (+/?) cortex (×25) B: (+/?) medulla (×25) C: (+/?) glomeruli (×300) D: (*dw/dw*) kidney E: (*dw/dw*) glomeruli

後では両者ともに160から 180 mg/g-湿重量の値で、いずれの時期においても差は認められなかった。

4. 腎臓内蛋白質/DNA 比の変化

生後10日齢までは+/?マウス、*dw/dw* マウスともに蛋白質/DNA 比がそれぞれ3.51から14.8 (422%), 3.22から17.7 (550%) とほぼ同じ割合で急激に増加した。+/? マウスでは10日齢から20日齢にかけて蛋白質/DNA 比は一時増加率が停止するが、30日齢以

後ふたたび緩やかに増加した。これに対し、*dw/dw* マウスでは20日齢にかけて蛋白質/DNA 比が約50% 減少し、以後その比はほとんど変化しなかった。+/? マウスと比較すると、*dw/dw* マウスの腎臓における蛋白質/DNA 比は生後20日目以後有意に低下していた (Table 2)。

5. 腎臓内 RNA/DNA 比の変化

+/?マウスでは出生時から20日齢まで RNA/DNA

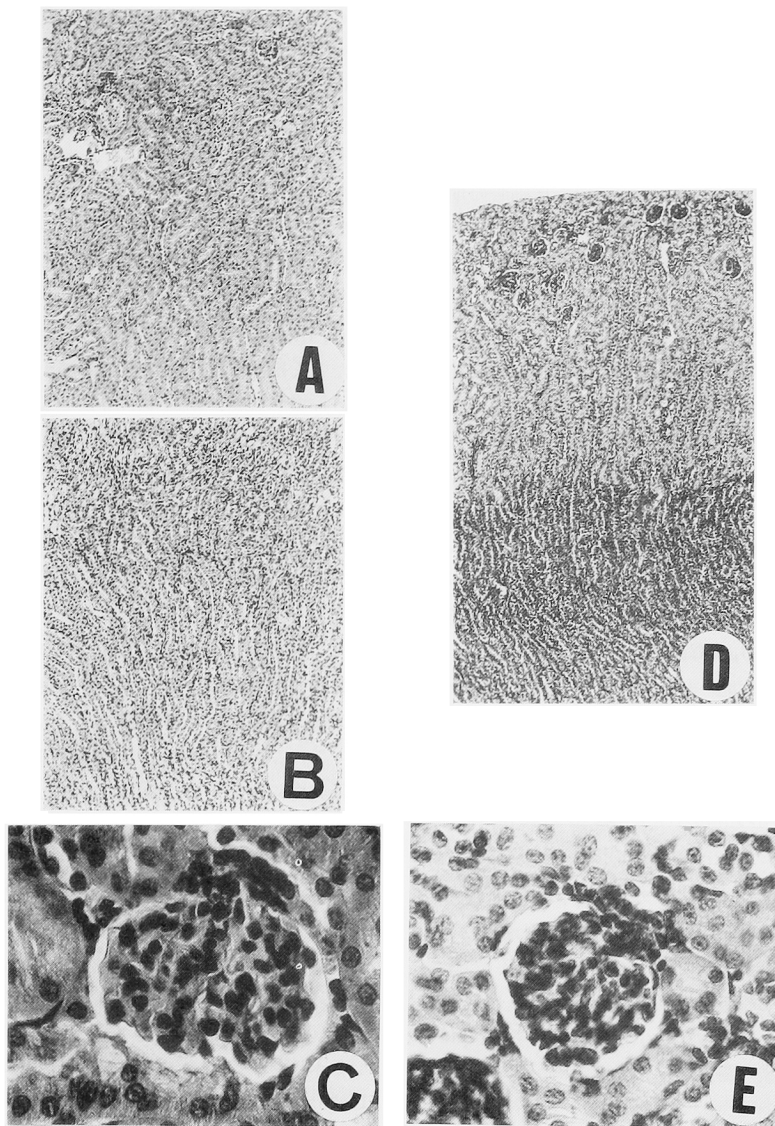


Fig. 3. Photomicrographs of kidney and glomeruli from normal control (+/?) and Snell dwarf (*dw/dw*) mice, at 40 days old.

A: (+/?) cortex ($\times 25$) B: (+/?) medulla ($\times 25$)
C: (+/?) glomeruli ($\times 300$) D: (*dw/dw*) kidney
E: (*dw/dw*) glomeruli

比は約50%ずつ増加するが、以後増加率は緩やかに減少した。これに対して、*dw/dw* マウスでも出生時から10日齢にかけて約80%の著しい増加が認められたが、20日齢にかけては急激にその比が減少し、以後ほぼ一定値を示した。+/?マウスと比較すると、20日齢以後で *dw/dw* マウスの RNA/DNA 比が有意に減少していた (Table 2)。

6. 腎臓内 IGF-1 の変化

腎臓内 IGF-1 含量は+/?マウスでは10日齢から20日齢にかけて約50%増加し、それ以降ほぼ一定値になるのに比して、*dw/dw* マウスでは10日齢までは+/?マウスとほぼ同じ値を示したが20日齢以降有意に減少した。また血清 IGF-1 含量では、+/?マウスが发育段階を追って著しく増加を示すのに対し、*dw/dw* マウスには发育に伴う増加傾向は認められず、20日齢以降+/?マウスと比較して有意に低値を示した (Table

3).

7 組織学的変化

+/?マウスの弱拡大(25倍)所見では出生時は間質が多く、全体的に粗な印象を受けた。皮質は薄く、糸球体は皮質外側に密集していた。10日齢になると皮質、髓質の層構造が明確となり、皮質で尿細管の増大とともに糸球体の髓質側への移動が認められた(Fig. 1-A)。20日齢以降、急激な尿細管、糸球体の増大が認められ、皮質髓質ともに厚くなった(Fig. 2-A, B, 3-A, B)。dw/dwマウスの弱拡大所見では、生下時は+/?マウスと明らかな変化は認められないが、10日齢では尿細管の増大が+/?マウスなど顕著ではなく、糸球体の移動も認められなかった(Fig. 1-C)。20日齢以降も10日齢とほぼ同様の所見で糸球体、尿細管の増大は認められなかった(Fig. 3-D)。

糸球体の強拡大(330倍)所見では、+/?マウスでは0日齢で糸球体を構成する細胞が凝集しているが、日齢を追うに従い構成細胞も大きくなり、糸球体径も増大する(Fig. 1-B, 2-C, 3-C)。

これに比して dw/dw マウスでは10日齢まで+/?マウスと同様の変化を示すが(Fig. 1-D)、20日齢以降明らかな変化は認められなかった(Fig. 2-E, 3-E)。

考 察

本研究で用いた Snell 下垂体性小人症マウスは、最近 GH・PRL・TSH- β サブユニット遺伝子のプロモーター領域に結合し、その転写を活性化する pit-1 遺伝子⁹⁾の異常が明らかにされた。ヒトにおいてもこのマウスと同様に3種のホルモンのみを欠損した複合分泌不全型の先天性下垂体性小人症が報告され、pit-1 遺伝子異常と病態の関連についての解析が進められている^{10,11)}。

したがって、GH・T₄の腎発育におよぼす効果を in vivo で研究するのにこの dw/dw マウスは好適なモデル動物である。

そこで本研究は dw/dw マウスを用いて GH, T₄の欠損が腎発育にどのような影響をおよぼしているかを、幼若期から青年期にあたる0日齢から40日齢にかけて、発育を追って比較検討した。

Van den Brande¹²⁾は体重、腎重量の成長パターンについて両者はほぼ相関し、+/?マウスでは生後週齢まで急速に増加し、以後緩徐に増加するのに対し、dw/dw マウスでは2週齢前後で成長が停止すると報告している。今回のわれわれの実験でも dw/dw マウスに著しい成長障害が認められ、40日齢の体重は+/?マウスの約1/4であった。また腎重量は+/?マウ

スの15%に過ぎなかった。

総 DNA 量は臓器の細胞数をあらわすとされている¹³⁾。dw/dw マウスでは20日齢以降増加が停止しており、この時期より細胞分裂による細胞数増加が停止していることが推測された。今回組織学的検索で細胞数については検討していないが、皮質髓質の厚み、糸球体の大きさに変化が認められないなどの結果を考慮すれば矛盾しないものと考えられる。

蛋白質/DNA 比は細胞の大きさを示すと考えられるが、dw/dw マウスでは20日齢以降増加が停止していたことから、この時点で細胞肥大も停止しているものと推察された。組織学的所見でも同様の結果をえられ、これらの結果を裏付けている。

RNA/DNA 比は臓器の蛋白合成能を示すと考えられているが、dw/dw マウスでは20日齢以降ほぼ一定値を示し、+/?マウスと比較して20日齢以降有意に低下していた。したがって dw/dw マウスの蛋白合成能は20日齢から低下しているものと考えられた。

さらに組織学的所見で、10日齢の dw/dw マウスでは尿細管細胞の増大が+/?マウスほど顕著ではなく、糸球体の髓質側への移動がほとんど認められなかった。このことはすでに10日齢前後より GH, T₄欠損が腎発育に影響をおよぼしているとも推察できる。

腎重量、DNA 含量、蛋白質/DNA 比、RNA/DNA 比、組織学的所見を総合的にみると、GH, T₄欠損による腎組織の発育障害は10日齢から20日齢の間に顕著となるが、すでに10日齢前後より発育障害が始まっているものと推察された。

IGF-1 は GH 依存性におもに肝臓で産生され、GH の二次ホルモンとして作用することが知られているが¹⁴⁾、腎臓を含めた肝臓以外の多数の組織でも IGF-1 が産生され、オートクリン因子として個々の臓器の蛋白合成、細胞増殖を促進していると考えられている¹⁴⁾。

+/?マウスにおいて腎臓 IGF-1 含量は10日齢から20日齢にかけて約50%増加し、それ以降ほぼ一定値になるのに対して、血清では発育段階を追って著しい増加を示した。このことから腎臓内の IGF-1 は腎組織内で単独に産生され、オートクリン因子として特に10日齢から20日齢にかけての蛋白合成、細胞増殖に強く関与していることが推察される。また dw/dw マウスについても、10日齢から20日齢にかけての血清 IGF-1 含量は+/?マウスとほぼ同様に約200%の増加を示しているのに対し、腎臓内含量については約1/2に減少しており、これらの推察を裏付けている。

10日齢で+/?マウスと dw/dw マウスの血中 IGF-

1 含量に明らかな変化が認められなかったことに関しては、胎盤ホルモンともに胎盤性ラクトゲンが IGF-1 産生を促進させるとの報告もあり¹⁵⁾ これらの因子が 10 日齢前後まで何らかの形で腎发育に関与している可能性も示唆された。

今回は回復実験を行っておらず、下垂体摘出マウスに GH, T₄, 男性ホルモンを投与すると腎 RNA, 蛋白質合成能が促進されるが、DNA 合成に対してはほとんど作用しないとの報告がある¹⁶⁾。また、原田¹⁷⁾によると、T₄ が腎臓全体に作用し、主として細胞数と細胞成熟に関与しているのに対し、GH は主として皮質特に尿細管に作用して細胞肥大に関与していることを形態学的に明らかにしている。したがって両ホルモン欠損の影響が出現する 10 日齢以前にホルモンを投与することで、*dw/dw* マウスでも良好な腎发育がえられるものと期待される。今後両ホルモン単独欠損下での腎の成長過程への影響ならびに回復実験による変化を生化学的、ならびに組織学的に検討し、また機能的変化についても今後検討する必要があると思われる。

結 語

1. Snell 下垂体性小人症マウスを用い、腎臓の成長過程におよぼす GH, T₄ の効果を生化学的、組織学的に検討した。

2. GH, T₄ 欠損による腎組織の发育障害は 10 日齢から 20 日齢の間に顕著となるが、すでに 10 日齢前後より发育障害が始まっているものと推察された。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました松島正浩教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究遂行にあたり直接御指導、御教授をいただきました東邦大学生理学第二講座野口鉄也教授、杉崎哲朗講師に衷心より感謝いたします。種々研究に御協力いただいた東邦大学生理学第二講座山田孝研究補助員に厚く御礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は第 491 回日本泌尿器科学会東京地方会、第 102 回東邦医学会例会にて報告した。本研究の一部は文部省科学研究費補助金（一般研究 C 04670983）の援助によるものである。

文 献

- 1) Snell GD: Dwarf, a new mendelian recessive character of the house mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 15: 733-734, 1929
- 2) Eicher EM and Beamer WG: New mouse *dw* allele: Genetic location and effects on lifespan and growth hormone levels. *J Hered* 71: 187-190, 1980
- 3) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970
- 4) Schmidt G and Thannhauser SJ: A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteins in animal tissue. *J Biol Chem* 161: 83-89, 1945
- 5) Meibbaum W: Über die Bestimmung Kleine Pentosemengen, insbesondere in Derivate der Adenylsäure. *Z Physiol Chem* 358: 171-120, 1939
- 6) Burton K: A study of the conditions and mechanism of the diphenylalanine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem J* 62: 315-323, 1956
- 7) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al.: Protein in measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
- 8) Sara VR Uvnäs-Moberg K, Uvnäs B, et al.: The distribution of somatomedins in the nervous system of the cat and their release following neural stimulation. *Acta Physiol Scand* 115: 467-470, 1982
- 9) Bodner M and Karin M: A pituitary-specific trans-acting factor can stimulate transcription from the growth hormone promoter in extracts of nonexpressing cells. *Cell* 50: 267-275, 1987
- 10) Ohta K, Nobukuni Y, Mitsubuchi H, et al.: Mutations in the Pit-1 gene in children with combined pituitary hormone deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 851-855, 1992
- 11) Radovick S, Nations M, Du Y, et al.: A mutation in the POU-homeodomain of Pit-1 responsible for combined pituitary hormone deficiency. *Science* 257: 1115-1118, 1992
- 12) Van den Brade JL: The growth of different organs of normal and dwarfed Snell mice, before and during growth hormone therapy. *Acta Endocrinol* 96: 46-58, 1981
- 13) Van Buul-Offers S and Van den Brande JL: Cellular growth in organs of dwarf mice during treatment with growth hormone, thyroxine and plasma fractions containing somatomedin activity. *Acta Endocrinol* 99: 150-160, 1982
- 14) 對馬敏夫: II ソマトメジン 7. 分泌調節機構 8. 生理的意義. 成長ホルモン・GRF・IGF. 鎮目和夫編. 第 1 版, pp. 174-177, 朝倉書店, 東京, 1989
- 15) Hall K, Enberg G, Lundin G, et al.: Somatomedin levels in pregnancy: longitudinal study in healthy subjects and patients with growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 29: 587, 1984
- 16) Nomura K, Nose J and Shizume K: Growth

th hormone inhibits renotropic action of
luteinizing hormone-isoform(s). *Endocrinol*
Jpn 35: 416-419, 1988

39 : 192-198, 1992

(Received on December 19, 1994)
(Accepted on March 4, 1995)

- 17) 原田昌幸：マウス腎発育におよぼす成長ホルモン
と甲状腺ホルモンの効果の検討. 東邦医会誌

(迅速掲載)