

称号及び氏名	博士（獣医学） 栗原 佐知	
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 31 日	
論 文 名	「Studies on age-related changes in growth hormone-releasing hormone and somatostatin neurons in the hypothalamus and in growth hormone cells in the anterior pituitary of mice（マウス視床下部成長ホルモン放出ホルモン、ソマトスタチンニューロンと下垂体前葉成長ホルモン細胞の加齢変化に関する研究）」	
論文審査委員	主査 教授	佐々木 文彦
	副査 教授	稲葉 俊夫
	副査 教授	岡田 利也

論文要旨

緒言

下垂体前葉で合成・分泌される成長ホルモン（GH）は、主に視床下部の2つの神経ペプチド、成長ホルモン放出ホルモン（GHRH）とソマトスタチン（SS）により調節されている。GHRHはGHの合成・分泌を刺激し、反対にSSは抑制する。GHRHニューロンは視床下部弓状核、SSニューロンは室周囲核に存在する。それらのニューロンから分泌された神経ペプチドは、正中隆起の神経終末から下垂体門脈を介して、下垂体前葉のGH細胞膜表面に発現しているそれぞれの受容体に結合する。

加齢に伴って血中GHの低下が認められることは、実験動物やヒトにおいて多くの報告があり、周知の事実である。このGHの減少は、筋量や骨量の低下、免疫機能の低下、脂肪組織の増加など、様々な器官や組織において望ましくない加齢性変化を惹起する原因の1つとなっていると考えられている。それゆえ、近年、GHの抗老化の働きが注目を浴びている。しかしながら、この加齢に伴う

GH 合成・分泌の減少に、視床下部 GHRH、SS ニューロンがどのように関与しているのかは、明らかにされていないのが現状である。また、幼若期から成熟期にかけて、視床下部 GHRH、SS ニューロンならびに下垂体 GH 細胞には性差が認められることが既に知られているが、加齢とともにそれらの性差がどのように変化するかは明らかではない。

本研究は、加齢に伴う GH 合成・分泌機能の退行原因を追究すべく、視床下部 GHRH、SS ニューロンと下垂体 GH 細胞の加齢変化、さらに視床下部 GHRH/SS - 下垂体 GH 軸の加齢に伴う性差の動向を明らかにすることを目的とした。

第 1 章 雄マウスの加齢変化

National Institute on Aging (NIA, MD, USA) より購入した 2 ヶ月齢、4 ヶ月齢、12 ヶ月齢、24 ヶ月齢の C57BL/6J 雄マウス（各群 5 匹）を用いて、以下の項目の加齢変化について検討した。

第 1 節 視床下部 GHRH ニューロンの加齢変化

視床下部弓状核を抗マウス GHRH 抗体を用いて免疫染色し、GHRH 免疫陽性ニューロン数を計量計測学的手法により算出した。その数は、2 ヶ月齢、4 ヶ月齢、12 ヶ月齢、24 ヶ月齢と加齢に伴い有意に減少していた。また、正中隆起部を GHRH 抗体にて免疫染色し、免疫陽性反応の強度を比較した。2 ヶ月齢および 4 ヶ月齢で類似した染色像を示していたが、12 ヶ月齢および 24 ヶ月齢では 2 ヶ月齢および 4 ヶ月齢に比べ、弱くなっていた。これらの結果から、GHRH ニューロンの機能は加齢に伴い低下していることが推測された。また、弓状核において TUNEL 法によりアポトーシス、PCNA 抗体により細胞増殖の組織学的検出を試みたが、全月齢において、アポトーシス像および増殖像は認められな

った。このことから、**GHRH** 免疫陽性ニューロン数の減少は **GHRH** ニューロン自体の消失が原因ではなく、加齢に伴い **GHRH** ニューロンにおけるタンパク合成機能が低下したため、免疫染色により検出できるニューロンが少なくなったものと考えられる。

第 2 節 視床下部 **SS** ニューロンの加齢変化

視床下部室周囲核を抗マウス **SS** 抗体にて免疫染色を行い、**SS** 免疫陽性ニューロン数を算出した。**SS** 免疫陽性ニューロン数は、どの月齢間においても有意な差は認められなかった。同様に、正中隆起部における **SS** 抗体の免疫陽性反応の強度にも明らかな差はみられなかった。また全月齢のマウスの室周囲核において細胞増殖やアポトーシス像は、観察されなかった。

第 3 節 下垂体 **GH** 細胞の加齢変化

下垂体前葉体積および実質細胞数を計量計測学的に算出した。12 ヶ月齢で顕著な減少が認められた。下垂体前葉細胞の **PCNA** 抗体による増殖像は、2 ヶ月齢および 4 ヶ月齢で認められたが、12 ヶ月齢および 24 ヶ月齢では認められなかった。**TUNEL** 法によるアポトーシス像は、2 ヶ月齢で多数認められ、4 ヶ月齢から 24 ヶ月齢ではわずかに認められた。これらの結果から、下垂体前葉細胞の増殖が 12 ヶ月齢および 24 ヶ月齢で少なくなったことにより、体積および実質細胞数が減少した可能性が考えられた。さらに下垂体前葉を抗ラット **GH** 抗体で免疫染色し、**GH** 免疫陽性細胞を検討した。**GH** 免疫陽性細胞の出現率は、2 ヶ月齢から 24 ヶ月齢、**GH** 免疫陽性細胞数は 4 ヶ月齢から 12 ヶ月齢、**GH** 免疫陽性細胞面積は 2 ヶ月齢から 4 ヶ月齢と 4 ヶ月齢から 12 ヶ月齢でそれぞれ有意な減少を示した。このように下垂体前葉における **GH** 細胞の機能は加齢に伴い（特に 4 ヶ月齢から 12 ヶ月齢において）減少している可能性がある。

以上の結果より、雄マウスにおいて、下垂体前葉における GH 免疫陽性細胞数の加齢に伴う減少は、視床下部 GHRH 免疫陽性ニューロン数の減少に起因していると考えられる。このことから、加齢に伴う視床下部からの GHRH ニューロンの機能低下が GH 細胞の機能低下の主な原因であると推測される。

第 2 章 雌マウスの加齢変化

雄と同時期に NIA より購入した 2 ヶ月齢、4 ヶ月齢、12 ヶ月齢、23 ヶ月齢の雌 C57BL/6J マウス(各群 5 匹)を用いた。本章では、雌マウスの視床下部 GHRH、SS ニューロンと下垂体 GH 細胞の加齢変化を検討するとともに、第 1 章で得られた雄の結果と比較して、性差の動向も検討した。

第 1 節 視床下部 GHRH ニューロンの加齢変化

雌マウス視床下部弓状核の GHRH 免疫陽性ニューロン数は、2 ヶ月齢、4 ヶ月齢、12 ヶ月齢、23 ヶ月齢と加齢に伴う有意な減少が認められた。正中隆起部の GHRH 抗体の免疫陽性反応は、2 ヶ月齢と 4 ヶ月齢に比べ、12 ヶ月齢と 23 ヶ月齢で顕著に弱くなっていたことから、雄同様、加齢に伴い GHRH ニューロンの機能が低下していると考えられた。また、弓状核には全月齢においてアポトーシス像および増殖像はみられなかった。

GHRH 免疫陽性ニューロン数は、雌雄とも加齢に伴い減少を示した。また、2 ヶ月齢においては明確な性差が認められたが、4 ヶ月齢以降は性差が認められなかった。

第 2 節 視床下部 SS ニューロンの加齢変化

視床下部室周囲核の SS 免疫陽性ニューロン数は、2 ヶ月齢から 4 ヶ月齢で増加したが、以後 12 ヶ月齢、23 ヶ月齢と有意に減少した。正中隆起部における

SS 免疫陽性反応は、2 ヲ月齡と 4 ヲ月齡に比べ、12 ヲ月齡、さらに 23 ヲ月齡と加齡に伴いに弱くなっていた。これらのことから室周囲核 SS ニューロンの機能は、老齡個体で低下していると考えられた。またどの月齡においても室周囲核においてアポトーシス像および増殖像は認められなかった。

SS 免疫陽性ニューロン数は、雌雄で異なった加齡変化（雄：変化なし；雌：減少）を示した。また、2 ヲ月齡および 4 ヲ月齡では性差が認められなかったが、12 ヲ月齡および 23-24 ヲ月齡において性差が認められた。

第 3 節 下垂体 GH 細胞の加齡変化

下垂体前葉体積および実質細胞数は、12 ヲ月齡と 23 ヲ月齡の間で明らかな減少がみられた。GH 免疫陽性細胞の出現率は 2 ヲ月齡から 4 ヲ月齡、GH 免疫陽性実質細胞数は 12 ヲ月齡から 23 ヲ月齡で、GH 免疫陽性細胞面積は 2 ヲ月齡から 4 ヲ月齡、12 ヲ月齡から 23 ヲ月齡でそれぞれ有意に減少していた。これらの結果から、下垂体前葉 GH 細胞の機能は加齡に伴い（特に 12 ヲ月齡から 23 ヲ月齡）減少すると考えられた。

GH 免疫陽性細胞出現率は、雌雄とも加齡に伴い減少していたが、全月齡で、雌より雄で割合が高くなっていた。GH 免疫陽性細胞数は 2 ヲ月齡から 12 ヲ月齡で性差がみられたが、23-24 ヲ月齡では性差が消失し、GH 陽性細胞面積は全月齡において雌より雄で有意に大きくなっていた。

雄同様、雌マウスにおいても下垂体前葉における GH 免疫陽性細胞数の加齡に伴う減少は、視床下部 GHRH 免疫陽性ニューロンの減少が原因であると考えられる。一方、雄とは異なり、雌では視床下部 SS 免疫陽性ニューロン数も老齡個体で減少しており、SS ニューロンの機能低下が推測される。しかしながら、視

床下部 GHRH 免疫陽性ニューロン数に対する SS 免疫陽性ニューロン数の比は加齢に伴い増加していた。この割合の増加もまた、GH 免疫陽性細胞の加齢に伴う減少の原因の 1 つと考えられる。

GHRH 免疫陽性ニューロン数の加齢に伴う減少は、精巣と卵巣の機能退行が原因の 1 つと考えられる。雌でみられる SS 免疫陽性ニューロン数の加齢に伴う減少は、卵巣機能の顕著な退行が原因と考えられる。

総括

GHRH ニューロンについては、雌雄とも加齢に伴い免疫陽性ニューロン数の顕著な減少が観察された。下垂体 GH 免疫陽性細胞の加齢に伴う減少は、GHRH ニューロンの機能低下が原因である可能性が示唆された。

SS ニューロンについては、雄では免疫陽性ニューロン数には加齢に伴う変化は認められなかったが、雌では減少しており、加齢変化には明らかな性差が認められた。雌でみられる SS 免疫陽性ニューロン数の加齢に伴う減少は、卵巣機能の顕著な退行が原因の 1 つと考えられる。しかしながら、視床下部 GHRH 免疫陽性ニューロン数に対する SS 免疫陽性ニューロン数の比は雌雄とも加齢に伴い増加しており、下垂体 GH 免疫陽性細胞数の減少を導く要因になっていると考えられる。

また、加齢に伴う GHRH あるいは SS 免疫陽性ニューロン数の減少は、ニューロン自体の消失が原因ではなく、ニューロンにおけるタンパク合成機能が低下したため、免疫染色により検出できるニューロンが少なくなったものと考えられる。

以上本研究で得られた成果は、複雑な老化の仕組みを解明するための基礎データとなること、さらにはその応用として効率的な老化防止プログラムへと繋がることが期待される。

審査結果の要旨

人類の寿命は近年急速に延び、高齢者人口が増加している。また獣医療の発展により、イヌ・ネコなどの伴侶動物の寿命も著しく延びている。しかし単なる延命だけでなく、その寿命をいかに健康に過ごすか、すなわち健康寿命をどのように維持するかが 21 世紀の大きな課題である。成長ホルモン (GH) は、成長期に成長を促すのに必須であるが、成熟後は主に代謝を調節している。GH の合成・分泌には 2 種類の視床下部ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン (GHRH) とソマトスタチン (SS) が関わっている。GHRH ニューロンは視床下部弓状核に存在し、GH の合成・分泌を刺激する。一方、SS ニューロンは視床下部室周囲核に存在し、GH の合成・分泌を抑制している。両ニューロンは、正中隆起に神経終末を持ち、下垂体門脈を介して GHRH あるいは SS を下垂体前葉に運び、GH 細胞に作用する。GH 細胞の GH 合成・分泌は、加齢に伴い低下するので、高齢者の GH 不足に対する治療として GH のホルモン補充療法が行われている。しかしながら、GHRH と SS の加齢変化についての研究はほとんど行われていないのが現状である。本研究は、GHRH と SS ニューロンの加齢変化を明らかにすることにより、視床下部-下垂体-細胞軸の老化のメカニズムを解明することを目的としている。

本研究は、National Institute on Aging (MD, USA) より購入した 2、4、12、23~24 ヶ月齢の virgin の雌雄 C57BL/6J マウスを用いた。弓状核 GHRH ニューロン、室周囲核 SS ニューロンと下垂体前葉 GH 細胞の加齢変化を免疫組織化学的ならびに計量計測学的手法により解析した。また雌雄の加齢変化を比較することにより、GHRH と SS ニューロンならびに GH 細胞にみられる性差の動向を検討した。

得られた成果は以下の通りである。

1) 雄マウスにおいて、弓状核の GHRH 免疫陽性ニューロン数は加齢に伴い減少していた。正中隆起部の免疫陽性反応も加齢に伴い減少していた。一方、室周囲核の SS 免疫陽性ニューロン数と正中隆起部の免疫陽性反応には加齢変化は認められなかった。下垂体 GH 細胞数は、加齢に伴い減少していた。

2) 雌マウスにおいて、弓状核の GHRH 免疫陽性ニューロン数と正中隆起部の免疫陽性反応は、加齢に伴い減少していた。室周囲核の SS 免疫陽性ニューロン数と正中隆起部における免疫陽性反応は、2 ヶ月齢から 4 ヶ月齢まで増加していたが、12 ヶ月齢以降加齢に伴い減少していた。下垂体 GH 細胞数は、加齢に伴い減少していた。

3) GHRH 免疫陽性ニューロン数に対する SS 免疫陽性ニューロン数の割合は雌雄とも加齢に伴い増加していた。

4) 精巣重量は加齢に伴い減少傾向にあったが、24 ヶ月齢で有意な減少がみられた。組織学的には 24 ヶ月齢においても完全な精子形成像が観察された。卵巣重量は 12 ヶ月齢以降有意に減少していた。また組織学的にも 12 ヶ月齢では卵胞、黄体が減少し、23 ヶ月齢ではともに消失していた。

5) 雌の加齢に伴う SS 免疫陽性ニューロン数の減少は、卵巣機能の退行が原因の 1 つと考えられた。

6) 弓状核と室周囲核のニューロンには増殖像あるいはアポトーシス像は観察されなかった。したがって、GHRH 免疫陽性ニューロン数と SS 免疫陽性ニューロン数の加齢に伴う減少は、ニューロンの消失によるものではなく、タンパク合成機能が低下したためと考えられた。

審査委員会の所見

このように、本研究において申請者は、視床下部 GHRH と SS ニューロン、下垂体 GH 細胞の加齢変化を明らかにすることにより、GH 細胞の加齢に伴う減少と視床下部 GHRH、SS ニューロンの関係、さらにそれらの加齢に伴う性差の動向を明らかにした。特に、視床下部 GHRH 免疫陽性ニューロン数の加齢に伴う減少が GH 合成・分泌の減少の大きな要因となっていることを示唆し、性腺の退行との関連を含めて、複雑なホルモン分泌調節機構を解明した。本研究の成果は、医学・獣医学分野における老化研究の発展に大きく貢献するものであり、最終試験の結果と併せて博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。