

# Growth Retardation in Chronic Renal Failure: Characterization of Growth Hormone-Insulin-like Growth Factor Axis

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8321">http://hdl.handle.net/2297/8321</a>

## 慢性腎不全における成長障害：成長ホルモノーインスリン様 成長因子系の異常に関する研究

金沢大学医学部小児科学講座（主任：谷口 昂教授）

住 田 亮

（平成4年2月4日受付）

慢性腎不全 (chronic renal failure, CRF) 患児における成長障害は臨床上的大きな問題点である。この原因の一つとして近年、成長ホルモン (growth hormone, GH)-インスリン様成長因子 (insulin-like growth factor, IGF) 系の異常、特に IGF 結合蛋白 (IGF-binding protein, IGF-BP) の変化が注目されているがその詳細は未だ明確ではない。本研究では腎不全患児の血清、赤血球および80%腎摘除することで作製した腎不全モデルラットを用いて腎不全時の GH, IGF, 特に IGF-I をめぐる諸問題について検討を加えた。ヒトにおける検討では CRF 患児の GH 基礎値および IGF-I 値は軽度増加していたが IGF-I の受容体に対する親和性は低下していた。又、培養ヒト線維芽細胞の培養液中に CRF 血清を添加することによって細胞の増殖能、蛋白合成能は有意に抑制され IGF-I の生物学的活性の低下が示唆された。患児血中 IGF-BP は有意に増加しており、従来の説と異なり低分子量の IGF-BP のみならず高分子量のものまで全般的な増加を示した。赤血球 IGF-I 受容体には著変を認めなかった。ラットにおける検討でも CRF では成長障害が認められ、ヒト同様 IGF-BP の増加、GH 結合蛋白 (GH binding protein, GHBP) 及び肝 GH 受容体の低下が認められたが IGF-I 受容体、GH 投与による IGF-I 産生能には異常を認めなかった。CRF ラットに対し GH 投与を行うことで成長障害の程度は軽減した。これは IGF-BP は変化せず IGF-I が増加したため遊離 IGF-I が増加したことによるものと推察された。以上のことから CRF に伴う成長障害では GH 分泌、GH 受容体、IGF 産生、IGF 受容体に大きな異常は認められなかったが IGF-BP が有意に増加しておりこれが IGF の生物学的活性低下を惹起し、ひいては成長障害の一因となる可能性が考えられた。又、CRF の成長障害に対する GH 治療は有効な手段と考えられ、今後広く臨床応用されるものと思われる。

**Key words** chronic renal failure, growth retardation, insulin-like growth factor (IGF), IGF-binding protein, growth hormone

慢性腎不全 (chronic renal failure, CRF) 患児における成長障害は臨床上的大きな問題点の一つであり、この原因として慢性的な低栄養、代謝障害や繰り返す感染等が挙げられている<sup>1)</sup>が、いまだ明確なものではない。近年この成長障害の成因の一つとして成長ホルモン (growth hormone, GH)-インスリン様成長因子 (insulin-like growth factor, IGF) 系の異常が指摘され<sup>2)</sup>特に IGF 結合蛋白 (IGF binding protein, IGF-BP) の変化が注目されている<sup>3)</sup>。

IGF には IGF-I と IGF-II の2種類あることが知られており<sup>4)</sup>このうち成長に大きく関与するのは IGF-I である<sup>5)</sup>。IGF-I は以前はソマトメジン-C (somatomedin-C, SM-C) と呼ばれていた分子量7649の塩基性ポリペプチド<sup>6)</sup>で軟骨細胞において DNA, RNA の合成を促進し骨の成長をもたらす他に蛋白合成促進作用、ごく軽度の血糖降下作用 (インスリン様作用) を有する<sup>7)</sup>。多くのペプチドホルモンと同様に IGF もその多くは結合蛋白と結合して血液中に存在し、遊離型の IGF は数%と

されている<sup>8)</sup>。IGF-BP は現在 BP1 から BP4 までの4種類が同定されており<sup>9)~10)</sup>血中のみならず羊水、脳脊髄液、各種細胞の培養上清中に見いだされている<sup>10)</sup>。血液中でも BP1 から BP4 の4種類の IGF-BP の存在が確認されているが、血中インスリン量および血糖値によって鋭敏に増減する分子量 25kD の BP1 と GH, IGF によって制御され比較的ゆるやかな変動を示す分子量 53kD で糖鎖を有する BP3 が主であり、BP2 および BP4 はごくわずかである<sup>11)</sup>。特に BP-3 は IGF および  $\alpha$ -サブユニットと呼ばれる分子量 80kD 程度の蛋白と高分子量複合体 (large complex) を形成し、多くの IGF はこの形で血中に存在する<sup>9)~10)</sup>。これら IGF-BP の役割、動態は未だ確たるものではないが通常ホルモン結合蛋白と異なり IGF の働きを修飾することや年齢、種々の疾患、栄養状態等によって変動することが知られている<sup>12)</sup>。

本研究では CRF の成長障害の成因の一つとして GH-IGF 系の異常があるのではないかと考え、腎不全患児および腎不全モ

Abbreviations: BP, binding protein; BSA, bovine serum albumin; BUN, blood urea nitrogen; BW, body weight; cpm, count per minute; Cr, creatinine; CRF, chronic renal failure; DMSO, dimethyl sulfoxide; DSS, disuccinimidyl suberate; Endo-F, endoglycosylase-F; FCS, fetal calf serum; GH, growth hormone; GHBP, GH binding protein; hIGF, human IGF; <sup>3</sup>H-TdR, <sup>3</sup>H tritiated-thymidine; IC<sub>50</sub>, inhibitory concentration of 50%;

デルラットを用いて IGF-BP の異常を中心に検討した。

### 対象および方法

#### I. 対象

##### 1. 腎不全患者

本研究で検討したのは1989年10月から1990年10月の間に金沢大学医学部附属病院小児科及び関連施設に通院または入院していた CRF 患児7人で詳細を表1に示す。年齢は6歳から18歳で男子2人, 女子5人であった。身長は症例1が発症後約10ヶ月と日が浅いため正常域にある他はいずれも $-2.5$ から $-3.9$  SD と著明な低身長であった。また血清尿素窒素 (blood urea nitrogen, BUN), クレアチニン (creatinine, Cr) はそれぞれ  $88.8 \pm 59.7$  mg/dl,  $10.1 \pm 6.5$  mg/dl と著増していた。また IGF-I 値は  $1.5 \pm 0.74$  U/ml, GH 基礎値は  $9.97 \pm 10.2$  ng/ml といずれも正常ないし軽度増加していた。4例は血液または腹膜透析施行中である。

正常対照として成長障害及び腎障害の無い28例の同年齢児の血液を用いた。任意の時間に採血し血清, 血漿は測定までの間 $-20^\circ\text{C}$ で保存した。

##### 2. 腎不全ラット

生後5週前後のウイスター系雄ラットを用い, 以下のプロトコルに従って腎不全ラットを作製した。麻酔はネブタール<sup>®</sup> 20mg/kg を腹腔内投与し, 腹膜外到達法で可及的に開腹せぬように右腎を周囲から剝離し腎動脈, 尿管を結紮, 切離し右腎を摘出した。7日後に右腎と同様な手技で左腎に到達し腎盂

の穿破に留意しつつ, 上下極をそれぞれ1/3ずつ切除した上で腎を元の位置に還納し閉創した。この操作によって約80%の腎垂全摘がなされたことになり, この群を腎不全群とした。又, 同様の日程および方法にて腎周囲の剝離まで行い, 腎を温存したものを対照群とした。腎不全群をさらに2群に分け1群には術後1週目から6週間にわたって遺伝子組替えヒト成長ホルモン (recombinant human GH, rhGH (住友製薬, 大阪より供与)) 0.8単位皮下注を週5日間行い GH 投与群とした。腎不全群, GH 投与群共に7日ごとに体重および鼻-尾長を測定し8週間後ネブタール<sup>®</sup> 麻酔下に開腹し大静脈より採血し併せて肝, 腎および脛骨も摘出した。血液は血清分離後測定までの間 $-20^\circ\text{C}$ で保存し, また肝, 腎は以下に述べる方法でそれぞれ実験に供し, 脛骨はホルマリン固定後, 顕微鏡標本を作製し成長軟骨の評価を行った。

#### II. 方法

##### 1. 患者血清 IGF-I の HPLC による分離およびラット血中 IGF-I 値の定量

内因性 IGF-I の分子量別の量を検討するために患者血清  $100 \mu\text{l}$  を以下の条件下にゲル濾過した。HPLC システム (Pharmacia, Uppsala, スウェーデン) はカラム, Superose<sup>®</sup> 12HR10/30 (Pharmacia); 移動相, 50mM 磷酸緩衝液 (150 mM NaCl, 0.02%NaN<sub>3</sub>, pH7.4); 流速, 0.5ml/min; で行い 7.5~17.5ml にかけて 2ml ごとの分画を採取しそれぞれ凍結乾燥した。それぞれを 50mM 磷酸緩衝液 (pH7.4) 200 $\mu\text{l}$  に再溶解した後 Daughaday ら<sup>12)</sup> の方法に従って酸-エタノール抽出

Table 1. Clinical findings of CRF patients

Age	Sex	Height (SD)	BUN (mg/dl)	Cr (mg/dl)	IGF-I (U/ml)	GH (ng/ml)	Dialysis
6y	F	119.0cm (+0.7SD)	57	6.0	1.16	26.89	+
12y	F	124.0cm (-3.9SD)	117	11.2	1.18	2.64	+
13y	F	135.5cm (-3.3SD)	39	2.9	>2.9	15.95	
16y	F	143.0cm (-2.8SD)	34	2.0			
18y	F	138.7cm (-3.8SD)	78	11.4	1.68	0.95	+
16y	M	153.0cm (-2.8SD)	141	20.1	0.79	11.19	
18y	M	156.0cm (-2.5SD)	156	19.2	1.26	2.21	+
mean $\pm$ SD (-2.6 $\pm$ 1.7SD)			88.8 $\pm$ 59.7	10.1 $\pm$ 6.5	1.5 $\pm$ 0.74	9.97 $\pm$ 10.2	

CRF, chronic renal failure; BUN, blood urea nitrogen; Cr, creatinine; IGF-I, insulin-like growth factor-I; GH, growth hormone (basal levels).

IGF, insulin-like growth factor; 2-ME, 2-mercaptoethanol; NTL, nose tail length; PAGE, poly-acrylamide gel electrophoresis; rhGH, recombinant human GH; RIA, radioimmuno assay; RRA, radio-receptor assay; SDS, sodium dodecyl sulfate; SM-C, somatomedin-C; T-BP, total IGF-BP; U-BP, unsaturated IGF-BP;

し、市販の IGF-1 (SM-C) ラジオイムノアッセイ (radio-immuno assay, RIA) キット (栄研化学, 東京) を用いて IGF-1 を定量した。

またラット血中の IGF-1 は血清 200  $\mu$ l を同様に酸-エタノール抽出し、キットを用いて定量した。

2. ヒト胎盤を用いた IGF-1 のラジオレセプターアッセイ (radio-receptor assay, RRA)

Cuatrecasas の方法<sup>13)</sup>に従って作製し、蛋白量を 4 mg/dl に調整したヒト胎盤膜分画を用いて CRF 患児血清中の IGF-1 の RRA を行った。膜分画溶液 100  $\mu$ l, <sup>125</sup>I-IGF-1 (Amersham Japan, 東京) (以下標識 IGF-1) 50  $\mu$ l (15ng) にヒト IGF-1 (human IGF-1, hIGF-1) (藤沢製薬, 大阪より供与) を 1000 ng/100  $\mu$ l から 0.01ng/100  $\mu$ l まで緩衝液 (50mM tris-HCl, 0.5% bovine serum albumin, (BSA) (fraction V, Sigma, St Louis, 米国) pH7.4) で段階的に希釈したものを各々 100  $\mu$ l および緩衝液 250  $\mu$ l を加え 4  $^{\circ}$ C, 18時間インキュベートした。更に緩衝液を 1ml 加えた後 15000回転で10分間遠心し上清を吸引した後沈渣の放射活性をオートウエルガンマカウンター ARC-600 (アロカ, 東京) で測定し胎盤膜分画に対する IGF-1 の標準解離曲線を作製した。ついで同様の実験系で hIGF-1 の代わりに CRF 患児および正常対照の血清を 5, 10, 20倍したものを 100  $\mu$ l 加え、同様にインキュベート及び測定を行い、標準解離曲線から IGF-1 量を算出した。

3. ヒト赤血球上 IGF-1 受容体の定量

CRF 患児及び対照群の赤血球を分離し、生理食塩水で  $3.0 \times 10^9$ /ml の濃度に調整した後 Morris らの方法<sup>14)</sup>に従って赤血球浮遊液 400  $\mu$ l, 標識 IGF-1 50  $\mu$ l (15ng) および 0.2~1000ng/100  $\mu$ l の濃度に段階的に希釈した hIGF-1 をそれぞれ 50  $\mu$ l 加え 4  $^{\circ}$ C, 18時間インキュベートし、遠心後沈渣の放射活性をガンマカウンターで測定した。総放射活性に対する特異結合率で結合能を表し、赤血球に対する IGF-1 の解離曲線を作製した。

4. ラット肝、腎における IGF-1, GH 受容体の定量

CRF における肝、腎の IGF, GH 受容体結合能の変化を評価するためにラット肝、腎を摘出後 Igarashi らの方法<sup>15)</sup>に従って速やかに各々の膜分画溶液 (蛋白濃度 4 mg/ml) を調整し方法 2. と同様な手技で IGF-1, GH の各膜分画に対する解離曲線を作製した。結合率は総放射活性に対する特異結合率で表した。

5. 非飽和 IGF 結合蛋白量 (unsaturated IGF-BP, U-BP) の測定

Powell ら<sup>16)</sup>のチャコール沈澱法を一部改変して行った。血清 100  $\mu$ l に緩衝液 (50mM tris-HCl, 0.5% BSA, pH7.4) 350  $\mu$ l および標識 IGF-1 50  $\mu$ l (15ng) を加え 4  $^{\circ}$ C, 18時間インキュベートした。インキュベーション後先述した緩衝液に 1% 活性炭を加えたものを 1ml 加え混和後さらに 15分間静置し 4  $^{\circ}$ C, 2500回転で15分間遠心、上清 1ml 中の放射活性をガンマカウンターで測定した。IGF 特異結合能は個々の検体の総放射活性から血清のかわりに緩衝液を加えた検体の放射活性を差し引いて求めた。又、結合蛋白量はヒト検体については健康成人男子 8 人 (平均年齢 30歳) より採取した血清より作製したプール血清を、ラット検体については体重 250~300g のウイスター系雄ラット 5 匹から採取した血清より作製したプール血清の結合蛋白量をそれぞれ 100% として表示した。

6. 総 IGF 結合蛋白量 (total IGF-BP, T-BP) の測定

内因性の IGF を除去し異なった結合蛋白相互の結合を解離するために血清 200  $\mu$ l を以下の条件で酸性下にゲル濾過した。HPLC システム (Pharmacia) はカラムを Superose<sup>®</sup> 12HR10/30 (Pharmacia), 移動相を 1N 酢酸, 0.15M NaCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 流速を 0.5ml/min とし, 10~20ml の分画を採取し 50mM tris-HCl pH7.4 に対して 24時間透析したものを凍結乾燥した後、磷酸緩衝液 (50mM PO<sub>4</sub>, 150mM NaCl, pH7.4) 1ml に再溶解し検体とした。結合蛋白測定は U-BP 測定同様チャコール沈澱法を用いて行った。結合蛋白量はヒト, ラット共に酸性下にゲル濾過したプール血清中の結合蛋白量を 100% として表示した。

7. U-BP, T-BP のポリアクリルアミド電気泳動 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)

Wilkins らの方法<sup>17)</sup>を一部改変して行った。U-BP は血清 10  $\mu$ l に 50mM 磷酸緩衝液 pH7.4 を 80  $\mu$ l, 標識 IGF-1 10  $\mu$ l (100ng) を、又、T-BP は T-BP 量測定と同様の方法で作製した検体 20  $\mu$ l に磷酸緩衝液 70  $\mu$ l, 標識 IGF-1 10  $\mu$ l をそれぞれ加え 4  $^{\circ}$ C で 18時間インキュベートした後、ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide, DMSO) に溶解した 20mM ジサクシニミディルスプレート (disuccinimidyl suberate, DSS) を 5  $\mu$ l 加え室温に 10分間放置することで化学的架橋を行った。次いでサンプル用緩衝液 (125mM tris, 4% ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS), 20% グリセリン, 1.4M 2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol, 2-ME), pH6.8) 25  $\mu$ l を加えた後数分間煮沸し 4% 粗孔ゲルおよび濃度勾配 7~15% の細孔ゲルを用い、以下の条件で PAGE を行った。検体量は 25  $\mu$ l, 通電量は定常流で 20mA, 通電時間は約 2時間、泳動用緩衝液には 50mM tris, 1.44% グリシン, 1% SDS, pH8.3 を用いた。泳動終了後ゲルを乾燥し X線フィルム (Fuji X-ray film RX, 富士写真フィルム, 神奈川) とカセット内で 5~7日間密着露光することによってオートラジオグラフィを行った。分子量は 6種類の蛋白から成る分子量マーカー (Bio-Rad, Richmond, 米国) の泳動パターンから算出した。一部の検体ではバイオイメージアナライザー BA100 (富士写真フィルム) を用いて各分画の定量を行った。又、BP-3 の糖鎖を切断するために血清 10  $\mu$ l にエンドグリコシダーゼ-F (endoglycosidase-F, (Endo-F), Sigma) 180mU, 0.02N 塩酸 20  $\mu$ l を加え 37  $^{\circ}$ C で 4時間インキュベートし<sup>18)</sup> さらに 100mM 磷酸緩衝液 20  $\mu$ l, 50mM 磷酸緩衝液 10  $\mu$ l, 標識 IGF-1 10  $\mu$ l を加え同様にインキュベートした検体も PAGE に供した。

8. U-BP の HPLC による分画

患者血清 100  $\mu$ l に緩衝液 (50mM 磷酸緩衝液, 150mM NaCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>, pH7.4) 200  $\mu$ l, 標識 IGF-1 10  $\mu$ l (100ng) を加え 4  $^{\circ}$ C で一晩インキュベートしこのうち 200  $\mu$ l を HPLC でゲル濾過 (カラム, Superose<sup>®</sup> 12HR10/30; 移動相, 先述の緩衝液と同組成; 流速, 0.5ml/min), 10~40ml の間を 1ml の分画で採取し各々の放射活性をガンマカウンターで測定した。

9. T-BP の分画と定量

T-BP 量測定と同様な方法で酸性下に血清をゲル濾過し一分画 2ml ずつを採取、凍結乾燥後 50mM 磷酸緩衝液 pH7.4 200  $\mu$ l に再溶解し各々の T-BP 量をチャコール沈澱法を用いて測定した。

10. ヒト線維芽細胞に対する CRF 患者血清処理

継代正常ヒト線維芽細胞 (4~6代) を5%非働化ウシ胎児血清 (fetal calf serum, FCS (Flow Laboratories, McLean, 米国)), 0.3mg/ml L-グルタミンを含むイーグルMEM培養液 (日本製薬, 東京) に浮遊し一穴あたり  $2 \times 10^4$  の細胞を6穴平底培養プレート (No. 3046, Falcon, Becton Dickinson Labware, Oxnard, 米国) に2mlずつ分注し炭酸ガス培養器 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) にて24時間培養し, 培養液に種々の濃度で無処理, および50mM 磷酸緩衝液 pH7.4 に対して24時間透析した CRF 患者, 対照群の血清を加え更に24時間培養し培養上清中の IGF-BP をU-BP 同様チャコール沈澱法を用いて測定した. IGF-BP 量は総放射活性に対する特異結合率で表した. 又, 同様の培養液に細胞を  $4 \times 10^4$ /ml の濃度で浮遊し一穴あたり 200  $\mu$ l を96穴平底マイクロタイタープレート (No.25860, Corning Glass Works, NY, 米国) に分注し, 24時間後種々の濃度で血清および T-BP 測定と同様の手技で作製した分画血清を含んだ培養液と

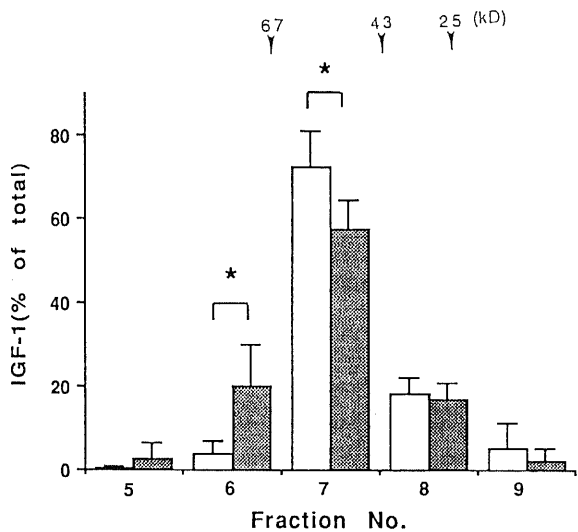


Fig. 1. HPLC elution patterns of endogenous IGF-I. Data are presented as mean  $\pm$  SD.  $\square$ , control (n=5);  $\blacksquare$ , CRF patients (n=5); \*, P<0.05.

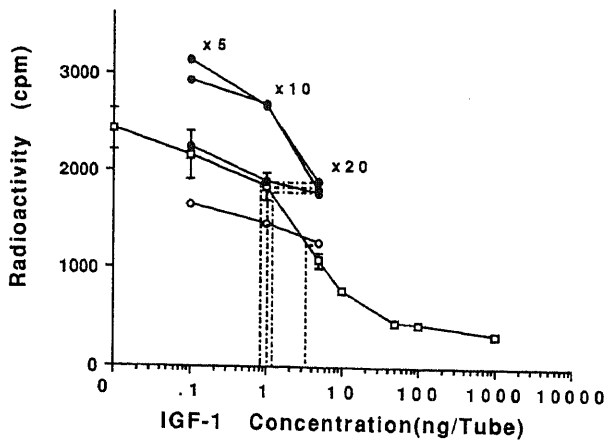
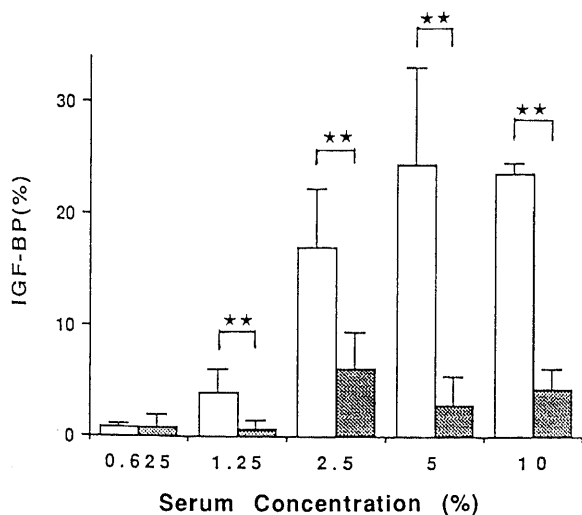


Fig. 2. RRA of endogenous IGF-I using human placental IGF receptor. Endogenous IGF-I concentration was 60ng/tube in control and 20ng/tube in CRF.  $\square$ , displacement of IGF-I tracers by increasing concentrations of unlabeled IGF-I;  $\circ$ , IGF-I RRA activities of each dilutions in serum of control;  $\bullet$ , sera of CRF patients.

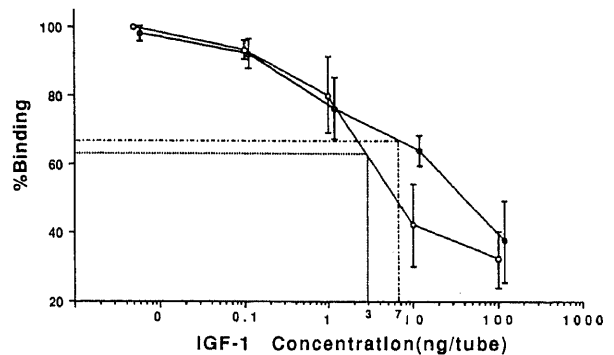


Fig. 3. IGF-I tracer binding to erythrocytes. Each value is presented as mean  $\pm$  SD. Maximum bound value of control and CRF patients were 100% and 98.2% respectively. IC<sub>50</sub> were 2.9ng/tube for control and 6.8ng/tube for CRF patients.  $\circ$ , erythrocytes from normal male adults (n=4);  $\bullet$ , erythrocytes from CRF patients (n=4).

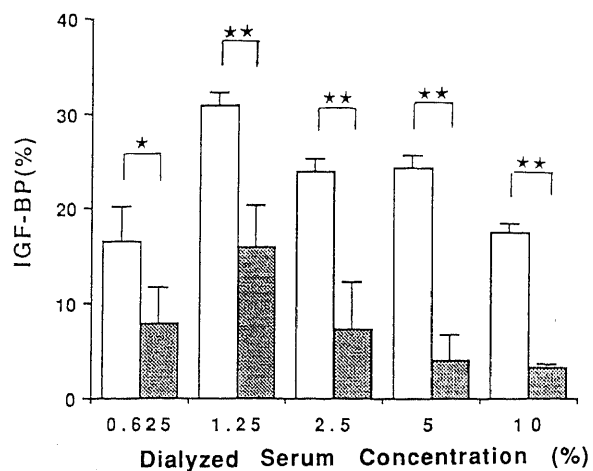


Fig. 4. Effect of native (left) and dialyzed (right) serum on IGF-BP productions in cultured human fibroblasts. Each value is presented as mean  $\pm$  SD.  $\square$ , medium containing sera from control (n=4);  $\blacksquare$ , medium containing sera from CRF patients (n=4). \*\*, P<0.01; \*, P<0.05.

交換し更に  $^3\text{H}$ -チミジン ( $^3\text{H}$ -tritiated-thymidine,  $^3\text{H}$ -TdR) を  $50 \mu\text{l}$  (200000cpm) 加え24時間後にハーベストし線維芽細胞中への  $^3\text{H}$ -TdR の取り込みを液体シンチレーションカウンターを用いて測定し、個々の放射活性 (count per minute, cpm) で表示した。

11. ラット血中 GH 結合蛋白 (GH binding protein, GHP) 量の測定

五十嵐ら<sup>19)</sup>の免疫沈降法によって CRF, GH 投与および対照ラットの GHP 量を測定した。GHP 量は総放射活性に対する結合率で表した。

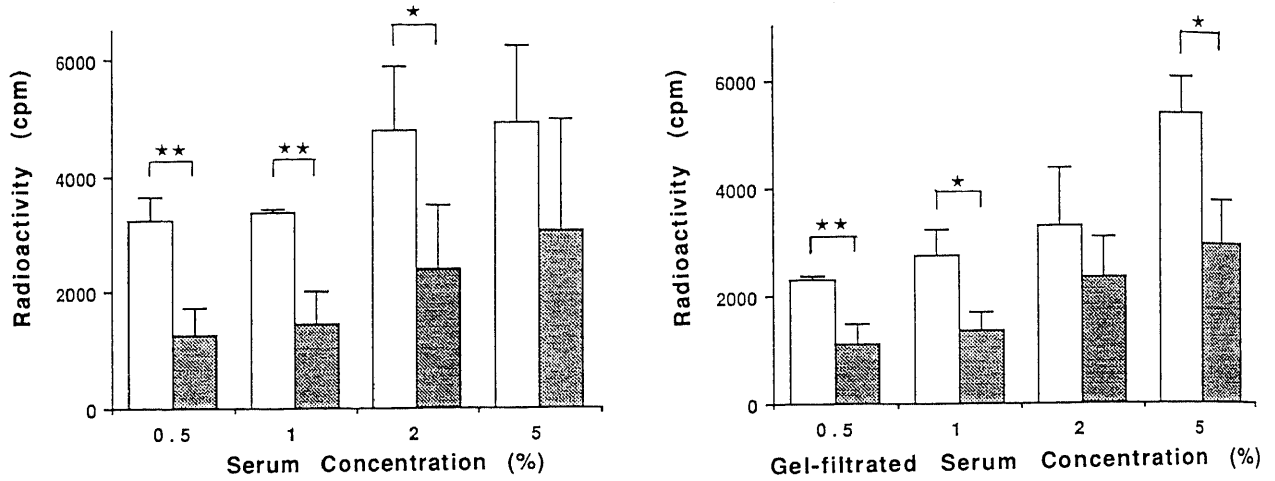


Fig. 5. Effect of serum on  $^3\text{H}$ -TdR uptake in cultured human fibroblasts. Each value is presented as mean  $\pm$  SD. In the left panel, medium contained native serum and in the right panel, medium contained acid gel-filtrated serum.  $\square$ , mediums containing sera from control (n=3);  $\blacksquare$ , medium containing sera from CRF patients (n=3).  $\star\star$ ,  $P < 0.01$ ;  $\star$ ,  $P < 0.05$ .

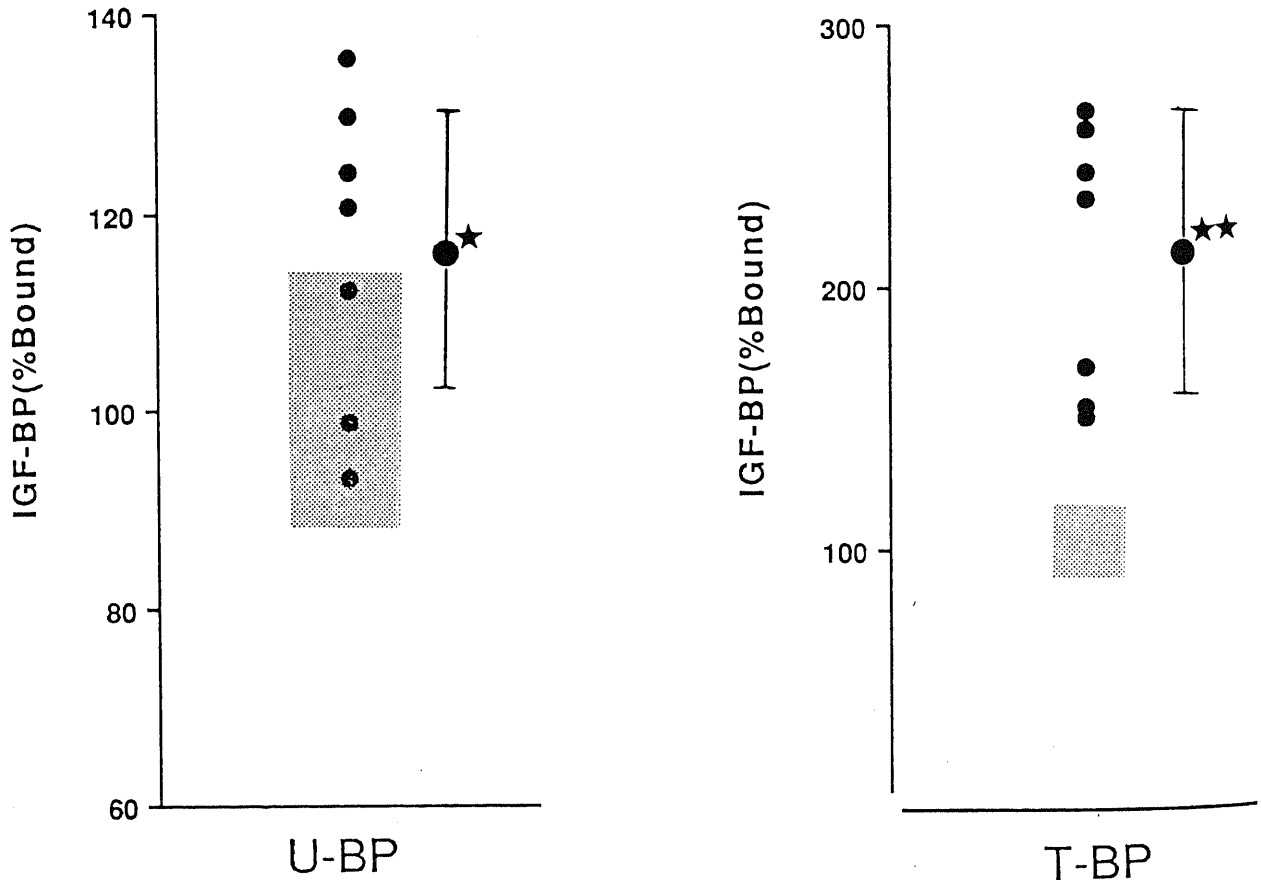


Fig. 6. Quantitation of U-BP (left panel) and T-BP (right panel).  $\bullet$  (small), value of IGF-BP in each CRF patients.  $\bullet$  (large), the mean  $\pm$  SD of CRF patients. Shadow, the mean  $\pm$  SD of normal children aged between 6-18yrs (n=28) and 6 for U-BP and T-BP).  $\star\star$ ,  $P < 0.01$  vs control;  $\star$ ,  $P < 0.05$  vs control.

## 12. 統計学的処理

得られた数値は平均±標準偏差で示した。2群間の平均値の差の検定には Student-t 検定を、多群間の平均値の差の検定には一元配置分散分析後 Scheffe または Duncan の多重比較法を用いた。危険率 5% 以下を統計学的に有意差ありと判定した。

## 成 績

## 1. CRF 患児における検討

## 1. IGF-I の存在様式

内因性 IGF-I の HPLC の溶出パターンを図 1 に示す。分画ごとの IGF-I 量を各群の IGF-I 全体に対する割合で示した。分画数が少ないため厳密な評価は難しいが CRF 群では 150kD のいわゆる高分子量複合体のしめる割合が多く、50kD 前後のものは対照と比較してむしろ減少しており CRF 群において内因性 IGF-I の低分子領域における増加は認められなかった。

2. CRF 患者血清中 IGF-I の受容体結合能および CRF 患者における赤血球表面の IGF 受容体の評価

胎盤膜分画に対する標識 IGF-I の標準解離曲線から求めた血清中の IGF-I 値は対照が 60ng/tube であったのに対し CRF 群では 20ng/tube であり RIA で求めた IGF-I 値とは異なり CRF 群では低下していた (図 2)。

そこで赤血球表面の IGF 受容体に対する IGF-I の解離曲線を作製し、受容体の容量、親和性について検討した (図 3)。特異結合能は対照群を 100% とした場合、CRF 群は 98.2%、1/2 特異結合抑制濃度 (inhibitory concentration of 50%,  $IC_{50}$ ) で表される受容体親和性は対照が 2.9ng/tube、CRF 群が 6.8ng/tube と受容体容量、親和性共両群の間に大きな差は認められなかった。

3. ヒト線維芽細胞の IGF-BP 産生および増殖分化に対する CRF 血清の影響

無処理の血清を培養液に加えることによって図 4 に示すように対照群では血清濃度が 5% までは濃度依存性に IGF-BP 産生量が増加し、最大  $24.6 \pm 8.7\%$  に達したのに対し、CRF 群の最大 IGF-BP 産生量は  $6.1 \pm 3.3\%$  と CRF 血清添加によって線維芽細胞の IGF-BP 産生は有意に抑制された。同様に透析後の血清を添加しても IGF-BP の産生は抑制されていた (図 4, 右)。又、血清を加えることによって線維芽細胞への  $^3H$ -TdR 取り込みは血清の濃度依存性に促進されるが対照群と比較して CRF 群では 0.5, 1, 2% の血清濃度で有意に低値であり、同様に酸性下にゲル濾過した検体を添加しても CRF 群では 0.5, 1, 5% の各濃度で  $^3H$ -TdR の取り込みが有意に抑制されていた (図 5)。

4. IGF-BP 量の変化

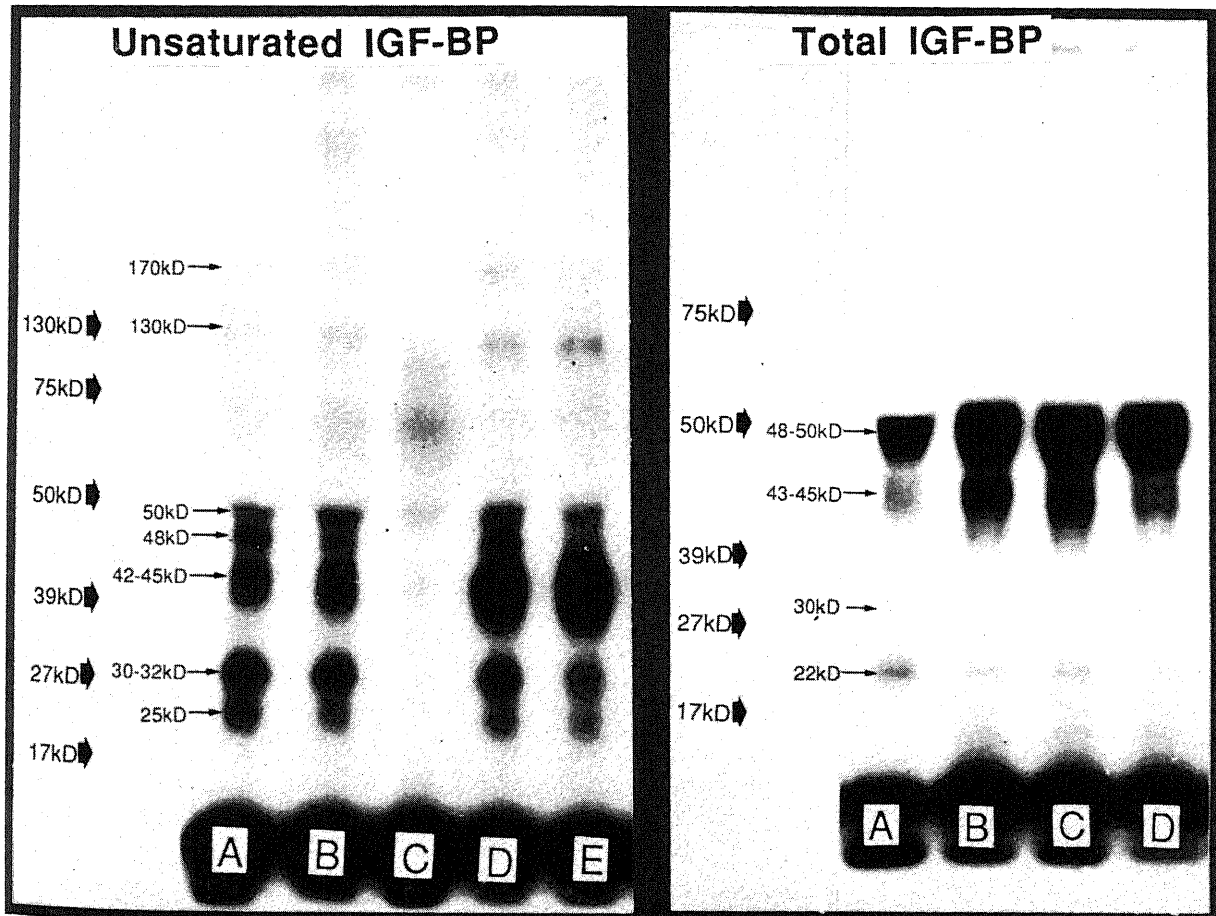


Fig. 7. SDS-PAGE of U-BP (left panel) and T-BP (right panel) cross-linked with  $^{125}I$ -IGF-I. [Left panel] A, pooled serum from 6 children aged 5-15yrs; B, pooled serum from 8 adult men (mean age 30yrs); C, pooled serum from adult incubated with excess unlabeled IGF-I; D and E, sera from CRF patients. [Right panel] A, pooled serum from adult men; B, C and D, sera from 3 CRF patients.

プール血清の IGF-BP 値を100%として表すと CRF 患児の U-BP 量は図 6, 左に示すように正常ないし増加しておりその平均±標準偏差は115.3±15.0%と同年齢対照群28例の100.4±12.8%と比較して有意な差を認めた. 一方 T-BP 量は図 6, 右に示すように全例で著明に増加しており, 対照群 6 例が101.2±12.8%であるのに対し, 210.0±54.3%と有意の差を認めた. 個々の症例の U-BP 値, T-BP 値と身長, BUN, Cr, SM-C の各指標の間には有意な相関は無かった.

5. IGF-BP の PAGE による分析

U-BP では過剰量の IGF-I を加えることで置換される 170kD, 130kD, 50kD, 48kD, 42~45kD, 30~32kD, 25kD の 7 つの分画 (標識 IGF-I-結合蛋白複合体) が認められ基本的に対照と CRF は同じパターンを示した. しかし CRF では特に 42~45kD の分画が増強していた (図 7, 左). 又, 50kD, 48kD, 42~45kD の三者はいずれも Endo-F 処理にて 30kD 付近に移動しておりこれらは IGF-BP3 と推察された.

IGF や他の蛋白等との結合が無い T-BP では 48~50kD, 43~45kD, 30kD, 22kD の 4 つの分画が認められ CRF において前 2 者の増強が明らかであった (図 7, 右).

6. IGF-BP の存在様式

CRF 症例 2 例について U-BP の存在様式について検討した

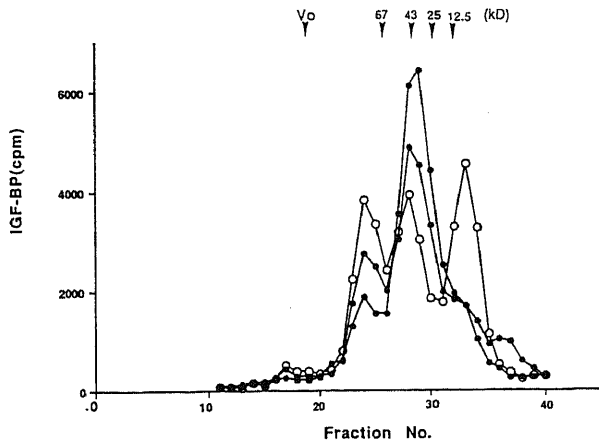


Fig. 8. HPLC elution patterns of U-BP of normal adult sera (○) and CRF patient's sera (●). In normal serum, three bulks of the radioactivity were observed in 150kD, 40kD and 10kD. In 2 patients with CRF, two bulks were observed; the bulk of 150kD was decreased but 40kD was increased.

(図 8). 各分画ごとの U-BP 量を放射活性 (cpm) で表したが プール血清では BP と結合した 15kD, 40kD, および遊離 IGF-I と思われる 10kD の 3 つのピークが認められた. 一方 CRF では 40kD 付近にプール血清と較べて大きなピークが認められたが 150kD 付近のピークはむしろ低い傾向にあり, 又 10kD 付近に認められる遊離 IGF-I は殆ど認められなかった.

酸性下にゲル濾過し内因性の IGF を除いた T-BP の溶出パターンでは CRF 群において全ての分画が増加しており特に 50kD 付近の分画でより顕著であった (図 9).

II. CRF ラットにおける検討

1. CRF ラットの腎機能, 発育, IGF-I 値と GH 投与の影響

80%腎摘除によって CRF 群では BUN 61.1±16.7mg/dl, Cr 1.44±0.19mg/dl GH 投与群ではそれぞれ 57.8±13.0mg/dl, 1.47±0.15mg/dl と対照群の 18.3±2.1mg/dl, 0.91±0.11mg/dl と比較して有意の上昇が認められた. CRF 群と GH 投与群の間には差は無かった (表 2).

鼻-尾長 (nose-tail length, NTL) は腎摘後 2 週目頃より CRF 群と対照群との差が目立ち始め, 術後 3 週目には有意差

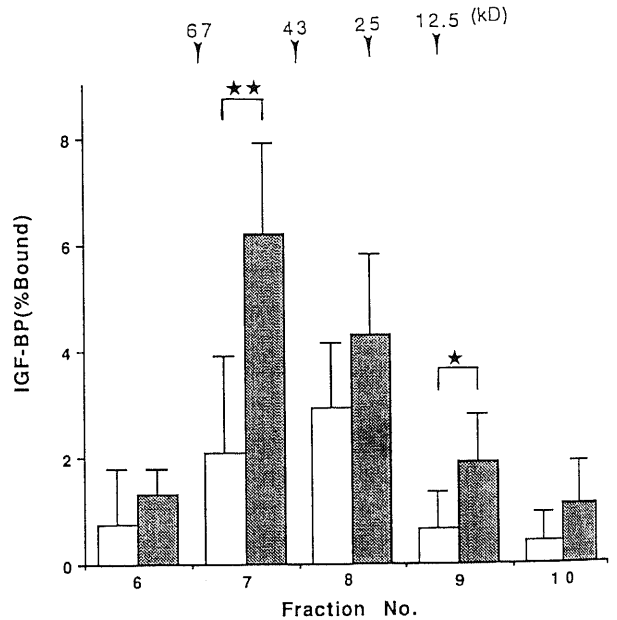


Fig. 9. HPLC elution patterns of T-BP. Data are presented as mean±SD. □, sera from normal children (n=6); ■, sera from CRF patients (n=7).

Table 2. Comparison of BUN, Cr, IGF-I, U-BP, T-BP, IGF-I/T-BP ratio and GHBP in CRF rats, GH-treated CRF rats and controls

	CRF	CRF+GH	Control
BUN (mg/dl)	61.1±16.7**	57.8±13.0**	18.3±2.1
Cr (mg/dl)	1.44±0.19**	1.47±0.15**	0.91±0.11
IGF-I (U/ml)	2.35±1.13	4.60±1.10* #	2.57±1.00
U-BP (%)	121.8±21.2*	113.7±10.3*	90.8±20.4
T-BP (%)	172.3±35.7*	188.7±71.7	125.5±31.6
IGF-I/T-BP	1.11±0.12*	2.83±0.72*	2.14±0.41
GHBP (%)	10.7±1.3	21.3±5.0* #	11.7±1.3

Each value is presented as mean±SD. \*, P<0.05 vs control; \*\*, P<0.01 vs control; #, P<0.05 vs CRF.



が生じ、術後7週目には対照群が $39.5 \pm 1.2$ cm であるのに対し CRF 群は $35.2 \pm 1.8$ cm と大きな差を認めた。一方 GH 投与群は CRF 群で認められた発育不良が改善され、7週目で $37.3 \pm 1.5$ cm と CRF 群、対照群の中間値であり又、この両群との間に有意差は認められなかった(図10, 左)。体重 (body weight, BW) も術後2週目頃から CRF 群と GH 投与群の間に差が生じ7週目には CRF 群  $251.2 \pm 34.1$ g に対し対照群  $315.3 \pm 11.6$ g と CRF 群に有意の体重増加不良が認められた。NTL と異なる

りこの傾向は GH 投与によっても改善されず、GH 投与群と対照群との間にも有意の差を認めた(図10, 右)。

IGF-1 値は CRF 群が  $2.35 \pm 1.13$ U/ml、対照群が  $2.57 \pm 1.00$ U/ml と有意差を認めないのに対し GH 投与群では  $4.60 \pm 1.10$ U/ml と著明に上昇していた(表2)。

脛骨近位端の成長軟骨は図11に示すように CRF で著明な低形成を示したが GH 投与ラットではこの程度が軽減していた。

2. 肝、腎の IGF 受容体の性質(図12)

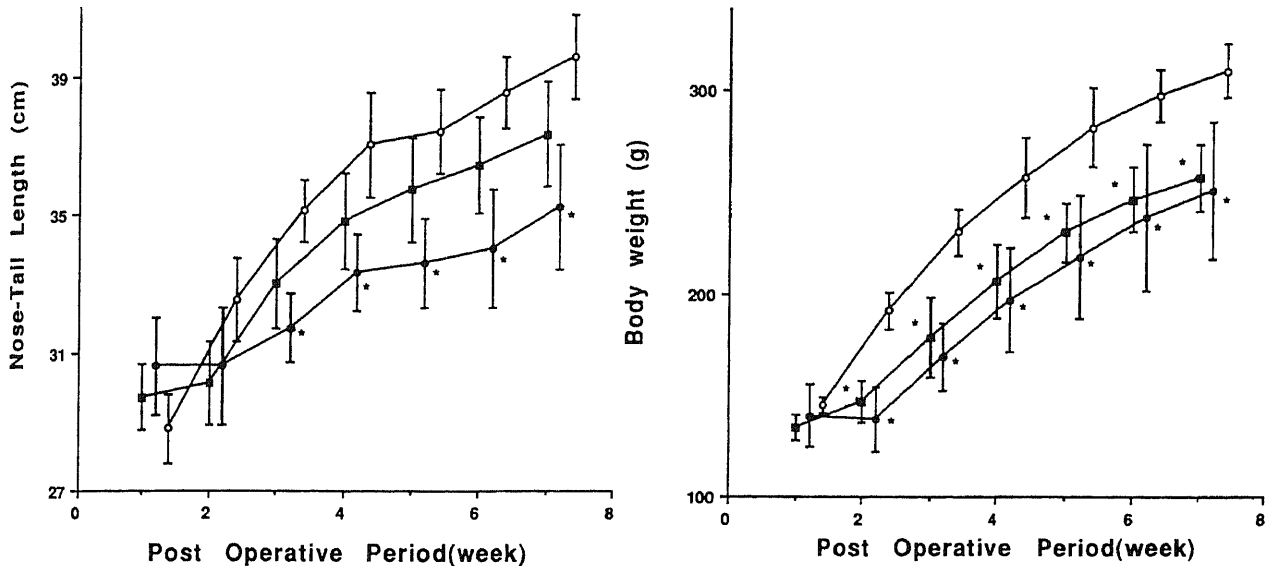


Fig.10. Changes of the nose-tail length (left panel) and body weight (right panel) after operation of kidney in rats. Data are presented as mean  $\pm$  SD.  $\circ$ , control rats (n=5);  $\bullet$ , CRF rats (n=5);  $\blacksquare$ , CRF with GH treatment rats (n=5).  $\star$ ,  $P < 0.05$  vs control.

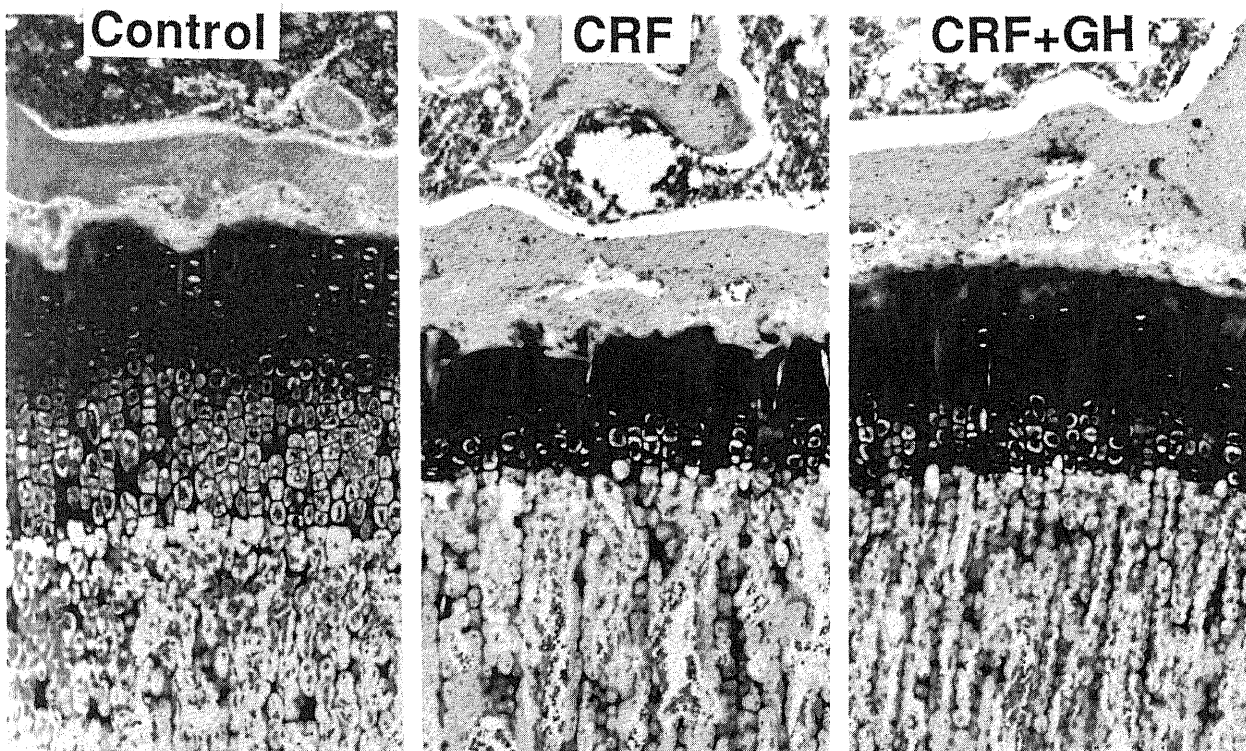


Fig.11. Metaphyseal plate of rat tibia. HE stain; original magnification,  $\times 200$ .

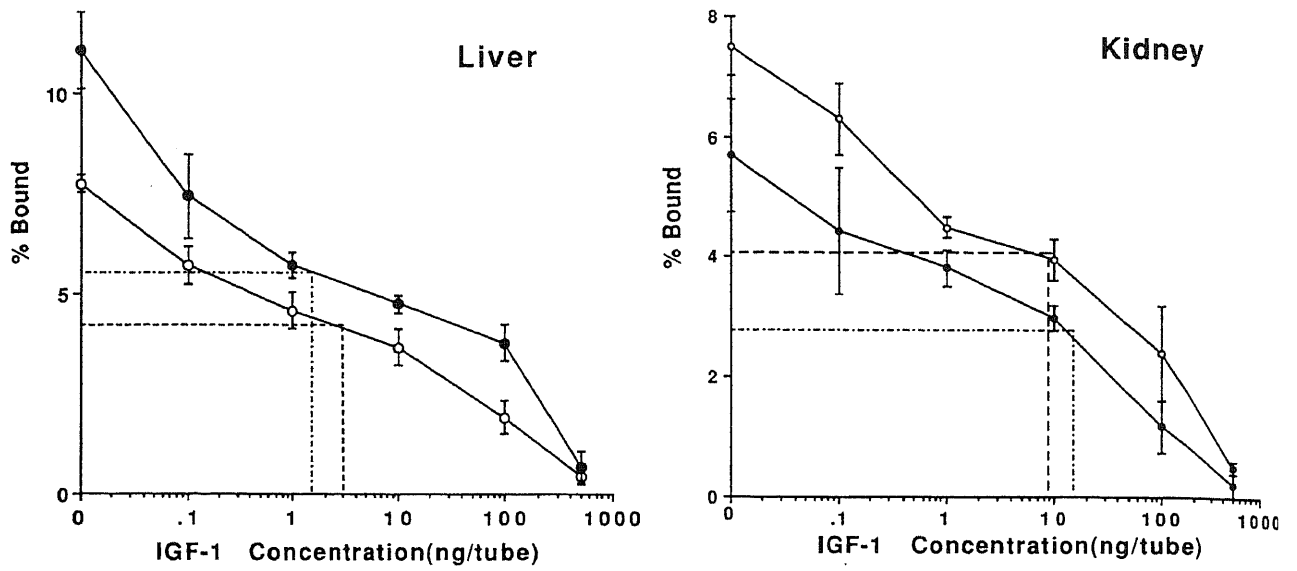


Fig.12. Competitive inhibition of  $^{125}\text{I}$ -IGF-I binding to rat liver (left panel) and kidney (right panel) by increasing concentration of unlabeled IGF-I. Each value is presented as mean  $\pm$  SD. In liver, maximum affinities of IGF-I tracers to the fraction were  $7.74 \pm 0.23\%$  in control,  $11.05 \pm 0.94\%$  in CRF, then value of  $\text{IC}_{50}$  was  $3\text{ng/tube}$  in control,  $1.5\text{ng/tube}$  in CRF. In kidney, maximum affinities were  $7.51 \pm 0.49$  in control,  $5.69 \pm 0.19\%$  in CRF, value of  $\text{IC}_{50}$  was  $8.5\text{ng/tube}$  in control,  $15\text{ng/tube}$  in CRF. ○, microsomal fractions from control rats; ●, microsomal fractions from CRF rats.

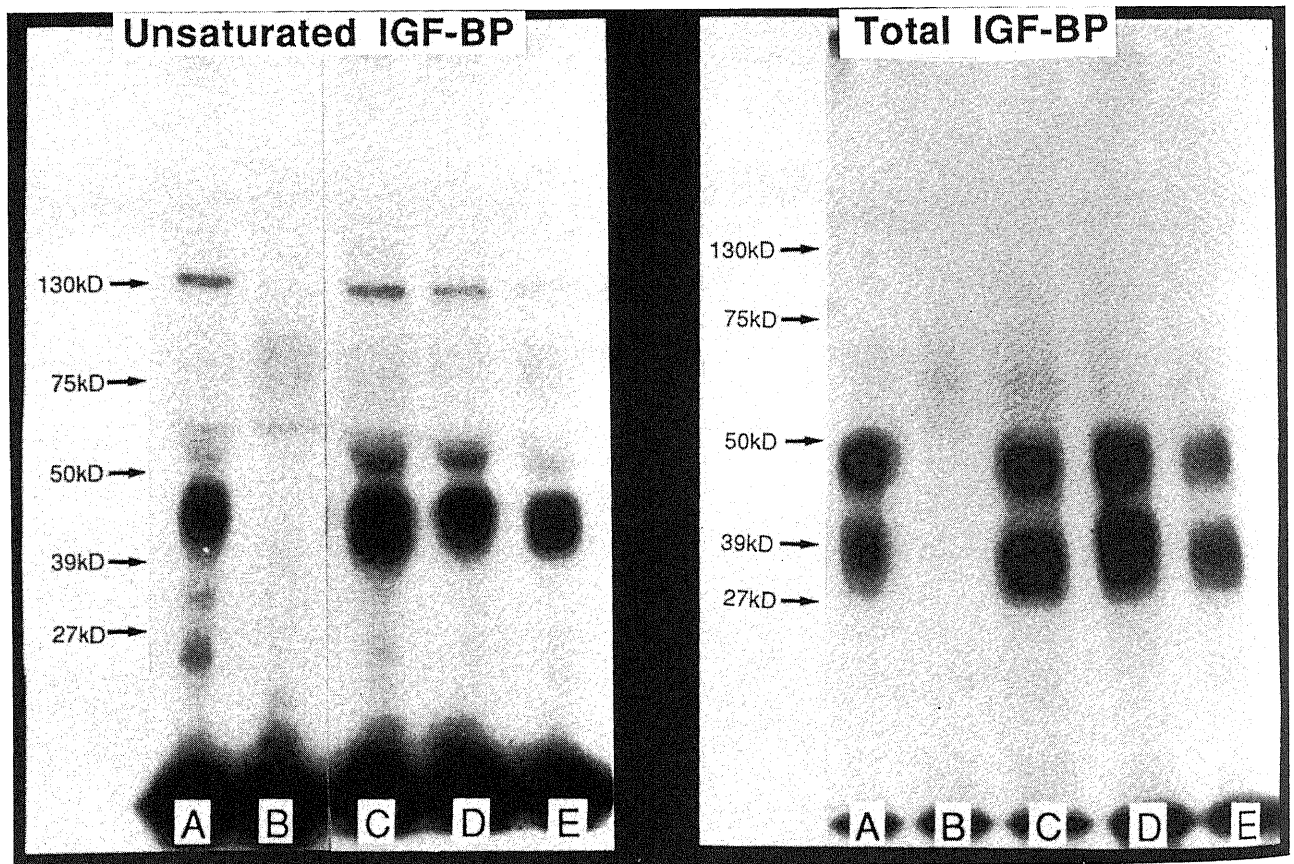


Fig.13. SDS-PAGE of U-BP (left panel) and T-BP (right panel) in rats cross-linked with  $^{125}\text{I}$ -IGF-I. A, pooled serum from 5 male adult rats; B, pooled serum from rats incubated with excess unlabeled IGF-I; C, serum from CRF rat; D, serum from CRF with GH-treatment rat; E, serum from control rat.

CRF ラットの肝, 腎 IGF 受容体容量はそれぞれ最大結合率で  $11.05 \pm 0.94\%$ ,  $5.69 \pm 0.19\%$  又,  $IC_{50}$  で表される受容体親和性は  $1.5\text{ng}/\text{tube}$ ,  $15\text{ng}/\text{tube}$  であった. 一方対照群の肝, 腎では最大結合率がそれぞれ  $7.74 \pm 0.23\%$ ,  $7.51 \pm 0.49\%$ ,  $IC_{50}$  が  $3\text{ng}/\text{tube}$ ,  $8.5\text{ng}/\text{tube}$  でありいずれも受容体容量には差があるものの親和性には著変なかった.

### 3. IGF 結合蛋白量

ラットプール血清の IGF-BP 値を100%として表すと U-BP 値は表2に示すように対照群が  $90.8 \pm 20.4\%$  であるのに対し CRF 群では  $121.8 \pm 21.2\%$  と有意に増加していた. 一方 GH 投与群でも  $113.7 \pm 10.3\%$  と有意の増加を認めたもののその程度は CRF 群に較べて軽度であった. 一方 T-BP 値は表2に示すように対照群が  $125.5 \pm 31.6$  であるのに対し CRF 群では  $172.3 \pm 35.7\%$  と有意に増加していた. 又, GH 投与群では  $188.7 \pm 71.1\%$  と個々の値が分散したため統計学的な有意差はみられないものの, むしろ CRF 群より増加している傾向を認めた.

内因性 IGF-1 と T-BP との比をとってみると CRF 群では  $1.11 \pm 0.12$  と対照群の  $2.14 \pm 0.41$  と較べて有意に低下していた. しかし, GH 投与群では  $2.83 \pm 0.72$  と対照群を越えて上昇していた (表2).

### 4. IGF-BP の PAGE による分析 (図13)

図13, 左に示す U-BP の泳動パターンでは  $125\text{kD}$ ,  $50\text{kD}$ ,  $39\sim 44\text{kD}$ ,  $30\text{kD}$ ,  $25\text{kD}$  と5つの分画が認められた. CRF では  $39\sim 44\text{kD}$  の分画が軽度増強していた. 一方, 低分子量の分画はやや減弱しており, この部分の標識 IGF-1 集積率はプール血清を100%とした場合 BP2 に相当する  $30\text{kD}$  の分画では対照が  $104.5\%$  であるのに対し CRF では  $58.9\%$  と低値であった. 一方 GH 投与ラットでは特に  $39\sim 44\text{kD}$  の分画においては CRF と比較して減弱しており,  $30\text{kD}$  の分画でも  $51.4\%$  と CRF 同様低値であった. 図13, 右の T-BP では  $46\sim 52\text{kD}$ ,  $36\sim 42\text{kD}$  の2つの分画が主でありこれに加えて  $25\text{kD}$  付近の

分画が弱く認められた. CRF と対照では CRF において  $36\sim 42\text{kD}$  の分画が軽度増強している程度で大きな差はないが GH 投与ラットでは  $46\sim 52\text{kD}$ ,  $36\sim 42\text{kD}$  いずれの分画も増強していた.

### Ⅲ. CRF ラットにおける GH 結合蛋白および肝 GH 受容体の変化

CRF 群の血清中 GHBP は  $10.16 \pm 0.61\%$  で対照群の  $12.1 \pm 1.09\%$  と比較して軽度の低下傾向を示したが有意差は無かった. 一方 GH 投与群では  $21.3 \pm 5.03\%$  と著明に上昇していた (表2). また肝 GH 受容体結合能は最大結合率が対照群の  $24.6 \pm 0.38\%$  に対し CRF 群では  $19.5 \pm 0.25\%$  と有意に減少していたが  $IC_{50}$  は対照群  $30\text{ng}/\text{tube}$ , CRF 群  $20\text{ng}/\text{tube}$  と著変を認めなかった (図14).

## 考 察

CRF における成長障害には種々の原因が想定されている<sup>1)</sup>. 近年この原因の一つとして GH-IGF 系の異常が指摘されており<sup>2)</sup>, CRF において RIA で測定した血中 IGF-1 値は我々の結果と同様に正常ないしやや増加しているにもかかわらず, その生物学的活性が低下しているという事実から<sup>20)</sup>特に IGF をめぐるとの異常が中心ではないかと考えられている.

IGF, 特に IGF-1 は GH の分泌動態と密接に関与し, GH の成長に関わる作用を仲介していることが知られており<sup>21)</sup>, GH 分泌不全による小人症 (下垂体性小人症) では IGF-1 値が低値になり, 逆に GH 分泌が亢進する末端肥大症では高値を示すこと<sup>22)</sup>は周知の事実である. CRF において血中 GH 値はむしろ高値を示し, インスリン負荷等の GH 分泌刺激試験に対しても過剰反応を呈することが多い<sup>23)~25)</sup>. 本研究で対象にした CRF 患児でも GH 基礎値は  $9.97 \pm 10.2\text{mg}/\text{ml}$  と分散しているものやや高値であり, 刺激試験こそ施行していないが CRF における GH 分泌能には問題が無いと思われる.

CRF 患児において GH 受容体の細胞外ドメインである GHBP が低値であることは既に報告した<sup>26)</sup>. 本実験では CRF ラットの GHBP および肝の GH 受容体について検討を加えたが血中 GHBP は対照と比較して軽度低下していたものの有意差は無かった. また肝における GH 受容体数は CRF で有意に低下していたが受容体の GH に対する親和性には差が無く CRF における GH 受容体の変化は量的なものが中心で質的な変化は少ないものと思われた. この機序及び成長障害に及ぼす影響については明らかではないものの GH 基礎値が高いことや腎機能障害による栄養, 代謝異常との関連が注目されている<sup>26)27)</sup>.

CRF において RIA による IGF-1 の値はむしろ軽度の上昇を示すことは先述した. 我々が対象とした CRF 患児においても血中 IGF-1 値は  $1.5 \pm 0.74\text{U}/\text{ml}$  と正常ないし軽度上昇しており, CRF モデルラットの IGF-1 値も対照群と差は無かった. 又, GH 投与群のラットにおいて血中 IGF-1 値は  $4.60 \pm 1.10\text{U}/\text{ml}$  と対照群の  $2.57 \pm 1.00\text{U}/\text{ml}$ , CRF 群の  $2.35 \pm 1.13\text{U}/\text{ml}$  と比較して有意に増加しており GH 投与に反応したものと思われた. よって GH 受容体数は減少しているものの血中 IGF-1 値が正常であり, GH 投与によって IGF-1 値の著明な上昇を認めたことから CRF における GH 受容体減少はその成長障害の主たる要素ではなく, CRF においても GH 分泌-GH 受容体-IGF 産生という系には大きな異常は無いものと推察さ

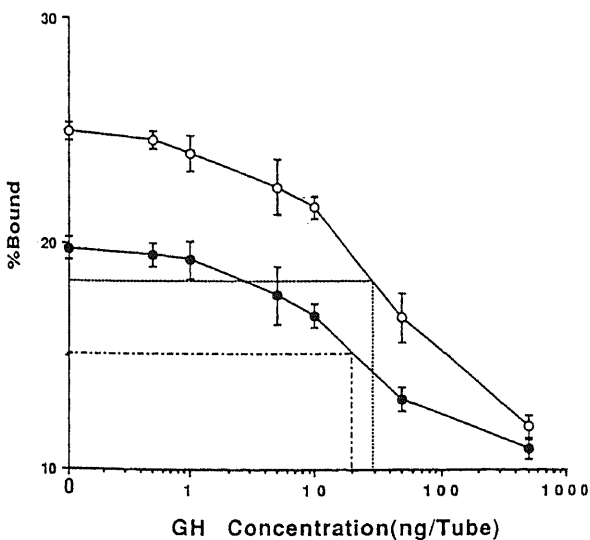


Fig.14. Competitive inhibition of GH tracer binding to rat liver by increasing concentrations of unlabeled GH. Each value is presented as mean  $\pm$  SD. Maximum affinities of GH tracers to the fractions were  $24.6 \pm 0.38\%$  in control,  $19.5 \pm 0.25\%$  in CRF. The value of  $IC_{50}$  was  $30\text{ng}/\text{tube}$  in control,  $20\text{ng}/\text{tube}$  in CRF. ○, microsomal fraction from control rats; ●, microsomal fraction from CRF rats.

れた。しかし、ヒト胎盤膜分画を用いた IGF-I の RRA では正常の約 1/3 に低下しており CRF では IGF-I の受容体に対する親和性が低下していることが確認された。CRF における IGF 受容体の評価は CRF 患児の赤血球および CRF ラットの肝、腎膜分画を用いて行ったが膜分画において受容体容量に若干の差があった以外いずれも対照との間に大きな違いは認められなかった。よって CRF における IGF の受容体親和性低下は受容体ではなく IGF に問題があるものと考えた。

ヒト線維芽細胞の培養液中に血清を加えたところ CRF 血清では細胞の増殖能、IGF-BP 合成能共に抑制されており、この傾向は血清の無処理、透析後、酸性下ゲル濾過後のいずれも同じであった。培養線維芽細胞は自ら産生した IGF によってさらにその増殖が促進される<sup>28,29)</sup> (autocrine regulation) が、この結果は CRF 血清中にこのような IGF をはじめとする線維芽細胞に対する成長因子の作用を阻害する物質が存在し、この物質が透析やゲル濾過によって除去されないことを示している。以前から CRF<sup>30)</sup> やステロイド投与時<sup>31)</sup> における低分子量 (20~30kD) の IGF 活性阻害物質の存在が示唆されてきたが、最近この物質が IGF-BP の一部であると言われており<sup>9)</sup> 分子量が 25kD 前後の IGF-BP が IGF の生物学的活性を阻害することも示された<sup>32)</sup>。

IGF は線維芽細胞における IGF-BP 合成を促進することが知られているが<sup>33,34)</sup> CRF 血清添加によって線維芽細胞の IGF-BP 産生が抑制されたことは IGF の生物学的活性が阻害されたとも考えられ、細胞増殖が抑制されたことも併せ、CRF において IGF-BP が IGF の作用に干渉し成長障害の一因を成している可能性が示唆された。

IGF-BP は現在 BP4 まで 4 種類が同定されており、血中にもこの 4 種類が認められるが<sup>9-11)</sup> このうち BP1 と BP3 が主な結合蛋白として存在している<sup>9)</sup>。GHBP は GH 受容体の細胞外ドメインが血中に遊離したものであるが<sup>35)</sup>、IGF-BP は IGF 受容体とは異なる蛋白であることがそのアミノ酸配列からも明らかである<sup>9)</sup>。IGF-BP は栄養、代謝等種々の生体内環境の変化に加えて GH、副腎皮質ステロイド、性ステロイドなどのホルモンの変動、年齢によって変化することが知られており<sup>10)</sup>、GH が欠損している下垂体性小人症や新生児期には BP3 が少なく、BP1、2 が増加し逆に GH 分泌が増加する末端肥大症や成人では BP3 が増加する<sup>36,37)</sup>。IGF-BP3 は IGF および  $\alpha$  サブユニットと高分子量複合体と呼ばれる複合体を形成し血中 IGF の殆どはこの形で存在する<sup>9,10)</sup>。これ以外の IGF の多くは BP1 と結合しており遊離型の IGF は数%である<sup>8,38)</sup>。IGF-BP の生体内における役割は明らかではないが一般的に血中 IGF の半減期を延長し<sup>39)</sup>、加えて細胞に対する IGF の効果を抑制するとされてこの作用は BP1、BP2 で著しく<sup>39)</sup>、BP3 では弱いとされている<sup>40)</sup>。しかし、これと反する考えも示されており<sup>9,12)</sup> 定説となっていない。

本研究で検討した IGF-BP は内因性の IGF と結合していない U-BP と内因性 IGF を除去した T-BP の 2 者であり、CRF 患児において U-BP が  $115.3 \pm 15.0\%$ 、T-BP が  $210.0 \pm 54.3\%$  といずれも対照群と比較して有意に上昇しており、この傾向は、ラットにおいても同様であった。IGF-BP の上昇は腎不全発症後 10 ヶ月で成長障害の無い患児でも認められ比較的早期にこの変化が成長障害の発症に先行して形成されると思われる。ヒトにおいて U-BP と T-BP の増加率に隔たりがあるのは

CRF 患児の内因性 IGF-I がやや高値であることから IGF-BP 自体は増加しているが内因性 IGF-I も増加して IGF-BP と結合したためと考えられ、U-BP のゲル濾過パターンで遊離 IGF-I のピークが消失しているのも増加した IGF-BP と標識 IGF-I が結合したためと推察された。前述したようにこれまで CRF において増加している IGF-BP は低分子量のものが主とされてきた<sup>30,41)</sup>。しかし、本研究の T-BP における PAGE および HPLC でみた存在様式のパターンからは低分子量の IGF-BP ばかりでなく大きな分子量のものも増加していた。Liu ら<sup>42)</sup> も同様の報告をしており、CRF における IGF-BP の増加はその種類によらず全般的なものと思われ、CRF 患児における IGF-I の存在様式でも低分子量の IGF-I よりも高分子量のものが多い傾向にありこのことを裏付けている。この IGF-BP が CRF の成長障害の主因であるか否かは判断としない。Powell ら<sup>43)</sup> も CRF の成長障害は IGF のみならず栄養面の問題が大きな要素だと報告している。ただ今まで述べてきた GH-GH 受容体-IGF 産生-IGF 受容体という一連の系の中で CRF において明らかに異常と考えられたのは IGF-BP のみでありこれが何らかの役割を担っているものとするのが妥当であろう。増加した IGF-BP が成長障害をもたらす機序は明確ではないが IGF 受容体に対する親和性の低下<sup>9)</sup> や特に低分子量の IGF-BP が有する細胞増殖能抑制作用<sup>32)</sup> によるもの、あるいは IGF-BP の増加によって遊離型 IGF-I が減少したためと推察される。

CRF による成長障害に対して近年 rhGH 投与が試みられており<sup>44)</sup>、本研究でも CRF モデルラットに対し rhGH を投与したが鼻-尾長、脛骨近位端成長軟骨幅はいずれも GH 投与群で有意に大きく、成長障害に対する効果は明らかであった。GH 投与によって内因性 IGF-I 値は著明に上昇するが IGF-BP に大きな変化は認められず、このため IGF-I と IGF-BP との比が正常に近くなり成長障害が改善されたものと推察された。Tonshoff ら<sup>45)</sup> も成長障害を伴う CRF 患児に対し大量の GH を投与した結果、成長速度の改善が得られこれは IGF-I の増加によって遊離型 IGF-I も増加したため、CRF の成長障害は IGF-BP 増加による遊離型 IGF-I 減少によるものではないかと推論している。遺伝子工学の進歩により GH が大量、安定供給されるようになった現在、CRF の成長障害に対する GH 療法は有望な治療法と思われる。この GH 投与によってラット血中 GHBP は著明に上昇しており GH 受容体の増加を反映したものであるが成長障害に及ぼす影響は不明である。GH 投与が GHBP に及ぼす影響については諸説あり<sup>46,47)</sup> いまだに定説と呼べるものはないが今回認められた GH 長期投与による GHBP の上昇は興味深い結果であり今後さらに追求すべき課題である。

## 結 論

1. CRF に伴う成長障害において GH 分泌、GH 受容体、血中 IGF-I 値、IGF 受容体にはいずれも大きな変化を認めなかったが血中 IGF-BP はその種類を問わず全般に増加していた。増加した IGF-BP と各種腎機能指標、成長障害の程度との間に有意な相関は無かった。

2. CRF 血中 IGF-I の IGF 受容体親和性は低下しており又、CRF 血清は線維芽細胞の増殖能、IGF-BP 合成能を抑制しこれらは増加した IGF-BP の影響と考えた。これらのことより

CRF に伴う成長障害の成因の一つは IGF-BP の異常であると考えた。

3. CRF の成長障害に対し GH を投与したところ IGF-I 値の著明な上昇を認めたが IGF-BP には大きな変化は無く、CRF において相対的に IGF-BP 過剰状態であった IGF-I と IGF-BP との関係が正常化し、成長障害の程度は改善された。これは IGF-I と IGF-BP との比が変化し遊離型の IGF-I が増加したこともその一因であると考えた。GH 投与によって血中 GHBP は著増したがこのことが成長障害に対する GH の効果とどのように関連するのかは明確ではなかった。

4. CRF の成長障害に対する GH 治療は有効な治療法と見られ、今後広く臨床応用されるべきである。

## 謝 辞

稿を終るに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師谷口 昂教授に心より深甚なる謝意を表します。また、終始直接の御指導を頂きました佐藤 保助教授、五十嵐登助手をはじめとする小児科内分泌グループ並びに教室員の諸先生方に深謝いたします。研究遂行にあたり貴重な検体を提供していただきました国立療養所富山病院石原俊二先生並びに国立療養所医大病院上野良樹先生、梶原莊平先生、ヒト胎盤を御提供下さいました金沢聖霊病院産婦人科大下陸郎先生、本学附属病院分娩部橋本茂先生、また、顕微鏡標本作製していただきました本学附属病院中央検査部病理特殊検査室の諸姉に厚く御礼申し上げます。

本論文の一部は第24回日本小児内分泌学会(1990年, 旭川)、第10回国際成長と成長障害シンポジウム(1990年, Madrid) および第64回日本内分泌学会秋期学術大会(1991年, 前橋)で発表した。

## 文 献

- 1) Potter, D. E. & Greifer, I.: Statural growth of children with renal disease. *Kidney Int.*, **14**, 334-339 (1978).
- 2) Goldberg, A. C., Trivedi, B., Delmez, J. A., Harter, H. R. & Daughaday, W. H.: Uremia reduces serum insulin-like growth factor-I, increases insulin-like growth factor-II, and modifies their serum protein binding. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **52**, 1040-1045 (1982).
- 3) Lee, P. D. K., Hintz, R. L., Sperry, J. B., Baxter, R. C. & Powell, D. R.: Insulin-like growth factor binding protein in growth-retarded children with chronic renal failure. *Pediatr. Res.*, **26**, 308-315 (1989).
- 4) Daughaday, W. H.: Divergence in binding sites, in vitro action, and secretory regulation of the somatomedin peptides, IGF-I and IGF-II. *proc. Soc. Biol. Med.*, **170**, 257-263 (1982).
- 5) Rinderknecht, E. & Humbel, R. E.: Amino-terminal sequences of two polypeptides from human serum with nonsuppressible insulin-like and cell-growth-promoting activities: Evidence for structural homology with insulin B chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 4379-4381 (1976).
- 6) Schoenle, E., Zapf, J., Humbel, R. E. & Froesch, E. R.: Insulin-like growth factor-I stimulates growth in hyposectomized rats. *Nature*, **296**, 252-253 (1982).
- 7) Hall, K., Takano, K., Fryklund, L. Sievertsson, T.: Somatomedins. *Adv. Metab. Disord.*, **8**, 19-46 (1975).
- 8) Daughaday, W. H., Ward, A. P., Goldberg, A. C., Trivedi, B. & Kapadia, M.: Characterization of somatomedin binding in human serum by ultracentrifugation and

- gelfiltration. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **55**, 916-921 (1982).
- 9) Clemmons, D. R.: Insulin-like growth factor binding proteins. *Trends Endocrinol. Metab.*, **1**, 412-417 (1990).
  - 10) Baxter, R. C. & Martin, J. L.: Binding protein for the insulin-like growth factors: Structure, regulation and function. *Prog. Growth factor Res.*, **1**, 49-68 (1989).
  - 11) Davies, S. C., Wass, J. A. H., Ross, R. J. M., Cotterill, A. M., Buchanan, C. R., Coulson, V. J. & Holly, J. M. P.: The induction of a specific protease for insulin-like growth factor binding protein-3 in the circulation during severe illness. *J. Endocrinol.*, **130**, 469-473 (1991).
  - 12) Daughaday, W. H., Mariz, I. K. & Blethen, S. L.: Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites: A comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol extracted serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **51**, 781-788 (1980).
  - 13) Cuatrecasas, P.: Isolation of the insulin receptor of liver and fat cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 318-322 (1972).
  - 14) Morris, A. H., Joyce, J. L. & Reuter, E. O.: Increased insulin-like growth factor-I binding protein to RBC of normal prepubertal children. *Pediatr. Res.*, **125**, 409-413 (1989).
  - 15) Igarashi, N., Minami, S., Kajiwara, S. & Sato, T.: Correlative study of radioreceptor assay and radioimmunoassay of serum growth hormone (GH): Screening for bioinactive GH in short stature. *Acta Paediatr. Jpn.*, **29**, 269-276 (1987).
  - 16) Powell, D. R., Rosenfeld, R. G., Sperry, J. B., Baker, B. K. & Hintz, R. L.: Serum concentration of insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-2 and unsaturated somatomedin carrier proteins in children with chronic renal failure. *Am. J. Kidney Dis.*, **287**, 287-292 (1987).
  - 17) Wilkins, J. R. & D'Ercole, J.: Affinity-labeled plasma somatomedin-C/insulin-like growth factor-I binding protein. *J. Clin. Invest.*, **75**, 1350-1358 (1985).
  - 18) Lamson, G. Oh, Y., Pham, H. Ciudice, L. C. & Rosenfeld, R. G.: Expression of two insulin-like growth factor binding proteins in a human endometrial cancer cell line: Structural, immunological, and genetic characterization. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **69**, 852-859 (1989).
  - 19) 五十嵐登, 住田 亮, 竹谷良平, 佐藤 保: 抗成長ホルモン受容体抗体を用いた免疫沈降法による成長ホルモン結合蛋白の測定. *日本小児科学会誌* (印刷中)
  - 20) Schwalbe, S. L., Betts, P. R., Rayner, P. H. & Rudd, B. T.: Somatomedin in growth disorders and chronic renal insufficiency in children. *Br. Med. J.*, **1**, 679-682 (1977).
  - 21) Kemp, S. R., Rosenfeld, R. G. & Liu, F.: Acute somatomedin response to growth hormone: Radioreceptor assay versus radioimmunoassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **52**, 616-621 (1981).
  - 22) Zapf, J., Walter, H. & Froesch, R.: Radioimmunological determination of insulin-like growth factor I and II in

- normal subjects and in patients with growth hormone disorders and extrapancreatic tumor hypoglycemia. *J. Clin. Invest.*, **68**, 1321-1330 (1981).
- 23) **Broyer, M.**: Growth in children with renal insufficiency. *Pediatr. Clin. North Am.*, **29**, 991-999 (1982).
- 24) **Rees, L., Rigden, S. P. A. & Ward, G. M.**: Chronic renal failure and growth. *Arch. Dis. Child.*, **64**, 573-577 (1989).
- 25) **Chesney, R. W.**: Growth retardation in childhood renal disease: A hormonal or nutritional problem? *Am. J. Nephrol.*, **7**, 253-256 (1987).
- 26) 五十嵐登, 住田 亮, 竹谷良平, 佐藤 保: 慢性腎不全 (CRF) 患児及び CRF ラットにおける血清成長ホルモン (GH) 結合蛋白並びに肝 GH 受容体に関する検討. 日本小児科学会誌 (印刷中)
- 27) **西川 健**: 血中成長ホルモン結合蛋白の生理及び病的動態とその意義. 十全医会誌, **100**, 283-295 (1991).
- 28) **Clemmons, D. R.**: Multiple hormones stimulate the production of somatomedin by cultured human fibroblasts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **58**, 850-856 (1984).
- 29) **Adams, S. O., Kapadia, M., Mills, B. & Daughaday, W. H.**: Release of insulin-like growth factors and binding protein activity into serum-free medium of cultured human fibroblasts. *Endocrinology*, **115**, 520-526 (1984).
- 30) **Phillips, L. S., Fusco, A. C., Unterman, T. G. & Greco, F.**: Somatomedin inhibitor in uremia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **59**, 764-772 (1984).
- 31) **Unterman, T. G. & Phillips, L. S.**: Glucocorticoid effect on somatomedins and somatomedin inhibitor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **61**, 618-626 (1985).
- 32) **Ritvos, O., Ranta, T., Jalkanen, J., Suikkari, A., Voutilainen, R., Bohn, H. & Rutanen, E.**: Insulin-like growth factor (IGF) binding protein from human decidua inhibits the binding and biological action of IGF-I in cultured choriocarcinoma cells. *Endocrinology*, **122**, 2150-2157 (1988).
- 33) **Martin, J. L. & Baxter, R. C.**: Production of an insulin-like growth factor (IGF)-inducible IGF-binding protein by human skin fibroblasts. *Endocrinology*, **127**, 781-788 (1990).
- 34) **Hill, D. J., Hubner, C. C., Rashid, P., Strain, A. J. & Clemmons, D. R.**: Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein release by human fetal fibroblasts: dependency on cell density and IGF peptides. *J. Endocrinol.*, **122**, 87-98 (1989).
- 35) **Leung, D. W., Spencer, S. A., Cachianes, G., Hammonds, G., Collins, C., Henzel, W. J., Barnard, R., Waters, M. J. & Wood, W. I.**: Growth hormone receptor and serum binding protein: Purification, cloning and expression. *Nature*, **330**, 537-543 (1987).
- 36) **Hall, K., Lundin, G. & Pova, G.**: Serum levels of the low molecular weight form of Insulin-like growth factor binding protein in healthy subjects and patient with growth hormone deficiency, acromegaly and anorexia nervosa. *Acta Endocrinol.*, **118**, 321-326 (1988).
- 37) **Hardouin, S., Gourmelen, M., Noguez, P., Seurin, D., Roghani, N., Bouc, Y. L., Pova, G., Merimee, T. J., Hossenlopp, P. & Binoux, M.**: Molecular forms of serum insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in man: Relationships with growth hormone and IGFs and physiological significance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **69**, 1291-1301 (1989).
- 38) **Pova, G., Enberg, G., Jornvall, H. & Hall, K.**: Isolation and characterization of a somatomedin-binding protein from mid-term human amniotic fluid. *Eur. J. Biochem.*, **144**, 199-204 (1984).
- 39) **Cohen, K. L. & Nissley, S. P.**: The serum half-life of somatomedin activity: Evidence for growth hormone dependence. *Acta Endocrinol.*, **83**, 243-258 (1976).
- 40) **Zapf, J., Schoenle, E., Jagars, G., Sand, I., Grunwald, J. & Froesch, E. R.**: Inhibition of the activity of nonsuppressible insulin-like activity on isolated rat fat cells by binding to its carrier protein. *J. Clin. Invest.*, **63**, 1077-1084 (1979).
- 41) **Tonshoff, B., Mehls, O., Heinrich, U., Blum, W. F., Ranke, M. B. & Schauer, A.**: Growth-stimulating effects of recombinant human growth hormone in children with end-stage renal disease. *J. Pediatr.*, **116**, 561-566 (1990).
- 42) **Liu, F., Powell, D. R. & Hintz, R. L.**: Characterization of insulin-like growth factor-binding protein in human serum from patient with chronic renal failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **70**, 620-628 (1990).
- 43) **Powell, D. R., Rosenfeld, R. G. & Hintz, R. L.**: Effect of growth hormone therapy and malnutrition on the growth of rats with renal failure. *Pediatr. Nephrol.*, **2**, 425-430 (1988).
- 44) **Koch, V. H., Lippe, B. M., Nelson, A. P., Boechat, M. I., Sherman, B. M. & Fine, R. N.**: Accelerated growth after recombinant human growth hormone treatment of children with chronic renal failure. *J. Pediatr.*, **115**, 365-371 (1989).
- 45) **Hochberg, Z., Barkey, R. J., Even, L., Peleg, I., Youdim, M. B. H., & Amit, T.**: The effect of human growth-hormone (GH) therapy on GH binding protein in GH-deficient children. *Acta Endocrinol. (Copenh)*, **125**, 23-27 (1991).
- 46) **Baxter, R. C. & Zaltsman, Z.**: Induction of hepatic receptor for growth hormone (GH) and prolactin by GH infusion is sex independent. *Endocrinology*, **115**, 2009-2014 (1984).

**Growth Retardation in Chronic Renal Failure: Characterization of Growth Hormone-Insulin-like Growth Factor Axis** Ryo Sumita, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 - J. Juzen Med Soc., **101**, 330 - 343 (1992)

**Key words** chronic renal failure, growth retardation, insulin-like growth factor (IGF), IGF binding protein, growth hormone

#### Abstract

The cause of growth retardation in children with chronic renal failure (CRF) has not been well explained. In this study, we examined the pathogenesis of growth retardation in 7 cases of CRF, aged from 6 to 18 years, and in subtotally (80%) nephrectomized rats, especially on growth hormone (GH) -insulin-like growth factor (IGF) axis. Six of our CRF patients showed a marked growth failure, and the height gain of CRF rats 6 weeks after nephrectomy was definitely less than those of control rats. Serum GH and IGF- I levels determined by RIA were normal or slightly elevated in CRF patients. In contrast, the bioactivities of IGF- I, assessed by 1) the receptor binding activity using placental membrane fraction, 2) the growth promoting activity of human fibroblasts, and 3) the stimulatory effects of IGF-binding protein (IGFBP) production by human fibroblasts, were significantly decreased compared with control subjects. Serum levels of unsaturated and total IGFBP, which regulate the IGF- I bioactivity in an inhibitory manner, were quantitatively increased by charcoal-precipitate assay and gel-electrophoretic analysis, and resulted in the significant reduction of IGF- I /IGFBP ratios. There were no significant differences in the capacity and affinity of the tissue IGF- I receptors between CRF and control conditions. The administration of hGH five times per week for six weeks to CRF rats diminished their growth retardation associated with the significant increment of serum IGF- I levels and the recovery of reduced IGF- I /IGFBP ratios. These results indicate that in CRF 1) the GH secretion, the IGF- I production, and the IGF- I receptor function are not impaired, 2) the apparent reduction of IGF- I bioactivity, probably due to the quantitative increments of IGFBP, may be involved in the development of growth failure, and 3) the improvement of growth retardation treated with hGH could be explained by the restoration of reduced IGF- I /IGFBP ratios and in result the increment of IGF- I bioactivity.