

# 低出生体重-非肥満型高血糖発症マウスモデルにおける 成長ホルモンによる治療効果

長野 伸彦<sup>1)</sup>

## Therapeutic effects of growth hormone in a low birth weight-non-obese diabetes mouse model

Nobuhiko NAGANO<sup>1)</sup>

### 要旨

日本人の小児2型糖尿病では顕著な肥満を生じない非肥満型2型糖尿病の症例が比較的多く、我々も実臨床でこの低出生体重-非肥満型2型糖尿病を発症する患者が存在することを報告した。近年、未熟性の強い早産児が成人期に至るまでインスリン抵抗性を示すとの報告が散見され、その原因の一つとして早産・極低出生体重で出生した児が、正期産児に比べて除脂肪量（主に筋肉量）が成人期に至るまで少ないことが挙げられている。我が国では、超早産児の救命率が向上し、将来的に早産・極低出生体重で出生した糖尿病の患者数は増加することが予想され、その予防法や治療法の開発が喫緊の課題である。本研究では、我々の開発した低出生体重-非肥満型高血糖発症マウスモデルに体組成改善効果（筋肉量を増やし、脂肪量を減らす）を持つ成長ホルモンを投与し、その予防・治療効果を検討した。そして幼仔期からの成長ホルモン投与は、酸化ストレスの減少によりミトコンドリア機能異常を改善し、インスリン抵抗性を改善する作用を有する可能性があることを見出した。今後、ヒトの非肥満型糖尿病発症にミトコンドリア機能異常が関連しているのか、成長ホルモンによる発症予防・治療効果があるのかを検証していく必要がある。

### 1. はじめに

日本は先進国の中で、平均出生体重が減少し、低出生体重児の出生頻度が増加している唯一の国である（2005年以降、約10%の割合で低出生体重児が出生している）。子宮内で低栄養に曝露された胎児は体重が減少するのみならず、その環境に適合するための体質変化が生じる。そして、出生後に児の栄養環境が改善すると相対的な過栄養状態となるために成人期に2型糖尿病などの生活習慣病を発症するリスクが高くなることが提唱された<sup>1) 2)</sup>。日本人の小児2型糖尿病では顕著な肥満を生じない非肥満型2型糖尿病の症例が比較的多く<sup>3)</sup>、我々も、実臨床でこの低出生体重-非肥満型2型糖尿病を発症する患者が存在すること<sup>4)</sup>、小児の2型糖尿病患者の中の

一定数が低出生体重児であることを報告してきた<sup>5)</sup>。それゆえ、その予防法の開発が喫緊の課題である。我々は、低出生体重児-非肥満型糖尿病の病態メカニズムを明らかにするため、子宮内虚血操作により低出生体重-非肥満型高血糖発症マウスモデルの開発（特願2020-116354）に成功し、その高血糖発症機序が除脂肪重量の低下による筋原性インスリン抵抗性の増加とミトコンドリア機能異常であることを明らかにした<sup>6)</sup>。成長ホルモン（Growth Hormone: GH）には、身長促進効果以外にも筋肉量を増やし脂肪量を減らす体組成改善効果があることが報告されている<sup>7)</sup>。低出生体重-非肥満型高血糖発症マウスモデルを用いて、幼仔期からの成長ホルモン投与が非肥満型糖尿病の治療効果があるかを明らかにす

1) 日本大学医学部小児科学系小児科学分野  
長野伸彦：nagano.nobuhiko@nihon-u.ac.jp

ることができれば、低出生体重児の健康増進に大きく貢献できる可能性がある。

本研究の目的は、子宮内虚血を用いた低出生体重-非肥満型高血糖発症マウスモデルに成長ホルモンを幼仔期から投与することで高血糖の発症を予防できるかを明らかにすることである。

## 2. 対象及び方法

### 1) 低出生体重-非肥満型高血糖発症マウスモデルの作製

妊娠しているICR系統のマウスを用いて、妊娠16.5日にイソフルラン吸入麻酔下（導入5%，維持2%）に下腹部を切開した。子宮動脈を露出し、胎仔マウスを傷つけないようにクリップで子宮動脈の血流を15分間遮断した。その後、子宮動脈のクリップを外して胎仔を母親マウスの腹腔内に還納し、下腹部を縫合した。母親マウスはホットプレートで37.5°Cに温めた。非虚血群として、同様の麻酔と下腹部切開を加えた妊娠16.5日のマウスをコントロール群とした。

### 2) 高血糖発症機序の解明

その後、妊娠19日に出生した新生仔マウスの雌を虚血群、非虚血（コントロール）群の2群に分類し、連日体重計測を行った。8週齢の体重測定後、イソフルランで吸入麻酔（導入5%，維持2%）を行ない、腹囲、身長、体組成の測定を行い、心臓より全採血を行い、その後臓器を摘出した。マウスの体組成は、実験動物用体組成計を用いて、除脂肪量、脂肪量を測定した。肝臓を用いてメタボローム解析を行い、血液サンプルを用いて、糖代謝（空腹時血糖値、インスリン濃度、HOMA-R）、脂質代謝に関する生化学的検査を行った。脂質代謝に関しては、High Performance Liquid Chromatography法を用いたりポ蛋白質粒子サイズ解析による血中脂質プロファイルを行った。HPLC法を用いたりポ蛋白質粒子サイズ解析については、ゲルろ過HPLC法で、主格分画（カイロミクロン、VLDL、LDL、HDL）とトリポ蛋白サブクラスのコレステロールとトリグリセライド（TG）が測定可能である<sup>8)</sup>。

### 3) 成長ホルモンの効果に関する検討

妊娠19日に出生した新生仔マウスの雌を虚血群、非虚血（コントロール）群の2群に分類し、連日体重計測を行った。生後4週から成長ホルモンをマウ

スの頸背部皮下に週6回注射した（0.5mg/kg/weekを4週間使用）。実験動物用体組成計を用いて、除脂肪量、脂肪量を8週齢に測定した。その後、採血を行い、肝臓を摘出した。血液を用いて、糖代謝（空腹時血糖値、インスリン濃度、HOMA-R）、脂質代謝に関する生化学的検査、肝臓を用いてメタボローム解析を行った。

## 3. 結果

### 1) 低出生体重-非肥満型高血糖発症マウスモデルの作製

出生体重の中央値は虚血群1.5g、非虚血（コントロール）群1.9gと虚血群で有意に低かった（ $p < 0.05$ ）。成獣期（雌）の体重、空腹時血糖値、インスリン濃度、HOMA-Rはそれぞれ中央値で虚血群36.9g、196.9mg/dL、 $3.9 \mu\text{IU/mL}$ 、1.9、非虚血群41.2g、75.0mg/dL、 $1.4 \mu\text{IU/mL}$ 、0.3であった。成獣期になっても虚血群は非虚血群に比べて低体重（特に除脂肪重量が低下）であるにも関わらず、血糖、インスリン濃度、HOMA-R、総TGが有意に高かった（表1,  $p < 0.05$ ）。

### 2) 高血糖発症機序の解明

肝臓のメタボローム解析（ $n$ はそれぞれ3）では、ATP、乳酸の中央値はそれぞれ虚血群16.0nmol/g、14.9nmol/g、非虚血群37.0nmol/g、5.7nmol/gと虚血群では、ATPが低く、乳酸が高値であり（ $p < 0.05$ ）、ミトコンドリア機能異常の存在が確認された（図1）。高血糖発症の機序は、ミトコンドリア機能異常による筋肉量減少に伴うインスリン抵抗性の増加が考えられた。

### 3) 成長ホルモンの効果に関する検討

虚血群のGH投与群と非投与群（ $n$ はそれぞれ6）の比較では、8週齢の空腹時血糖値に有意な差を認めなかった（虚血GH投与群平均：166.3mg/dL、虚血GH非投与群：171mg/dL）。一方で、脂肪重量と除脂肪重量についてはそれぞれ平均値で、虚血GH投与群が10.9 g、21.3 gで虚血GH非投与群が18.7 g、16.6 gと虚血GH投与群で有意に脂肪重量の減少と除脂肪重量の増加を認めた（ $p < 0.01$ ）。肝臓のメタボローム解析（ $n$ はそれぞれ3）の結果（階層的クラスター解析）では、明らかにGH投与群は非投与群では代謝産物が異なっていた（図2）。

特に着目すべき点として、GH投与により、虚血

表 1 低出生体重-非肥満型高血糖発症マウスモデル

	Control (n=7)	Ischemia (n=7)	p-Value
<b>Blood glucose (mg/dL)</b>	<b>75.0</b>	<b>196.9</b>	<b>&lt;0.01</b>
<b>IRI (μIU/mL)</b>	<b>1.4</b>	<b>3.9</b>	<b>0.03</b>
<b>HOMA-R</b>	<b>0.3</b>	<b>1.9</b>	<b>&lt;0.01</b>
<b>Fat mass (g)</b>	<b>17.7</b>	<b>16.6</b>	<b>0.95</b>
<b>Free fat mass (g)</b>	<b>22.6</b>	<b>19.1</b>	<b>0.01</b>
<b>Total-triglyceride (mg/dL)</b>	<b>37.3</b>	<b>82.1</b>	<b>0.02</b>

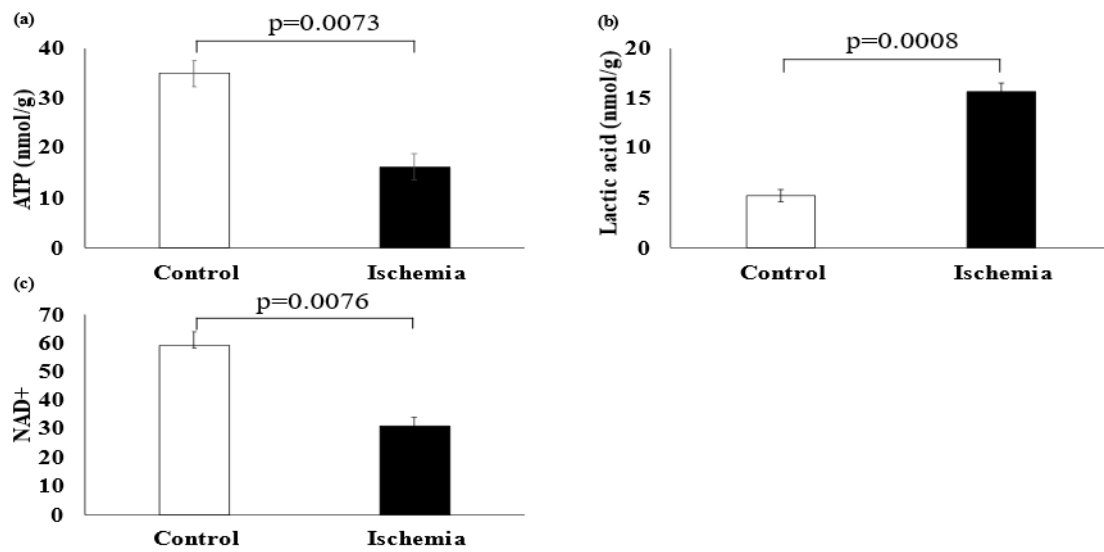


図 1 肝臓のメタボローム解析 (ミトコンドリア機能関連)

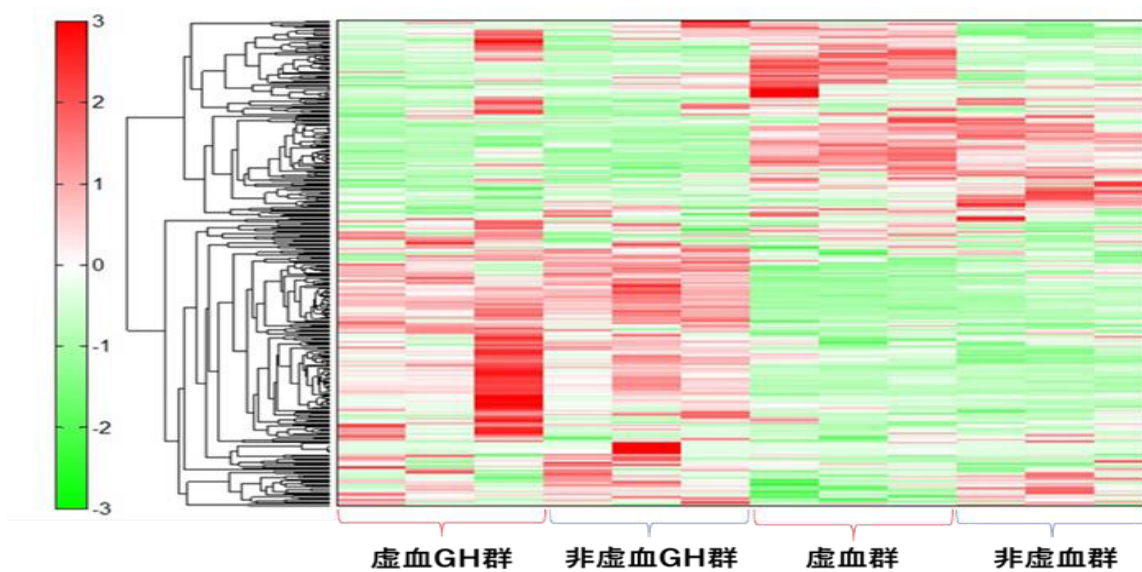


図 2 成長ホルモン投与の有無による肝臓のメタボローム解析の違い (階層的クラスター解析)

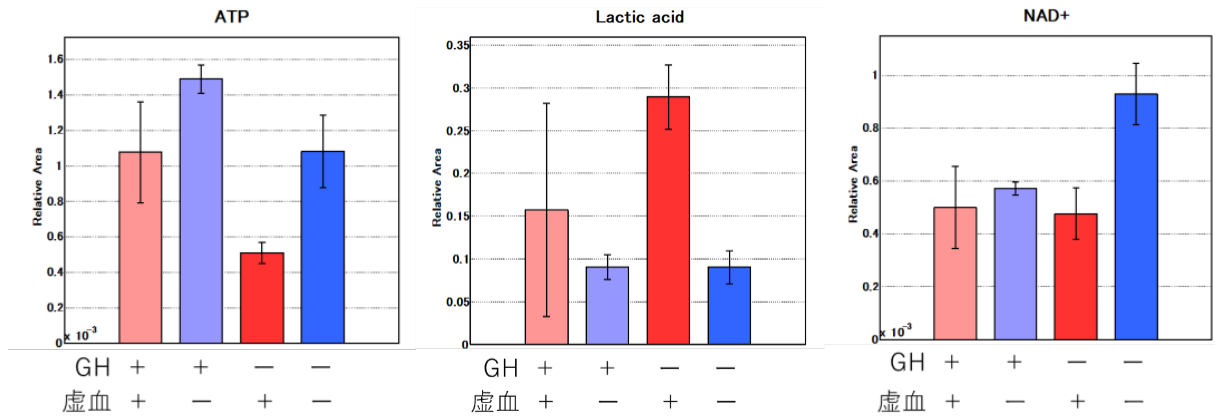


図3 成長ホルモン投与の有無による肝臓のメタボローム解析 (ミトコンドリア機能関連)

Major Category	Compound name	Comparative Analysis							
		Ischemia vs Control		IschemiaGH+ vs Control		IschemiaGH+ vs Ischemia		Control GH+ vs Control	
		Ratio <sup>†</sup>	p-value <sup>‡</sup>	Ratio <sup>†</sup>	p-value <sup>‡</sup>	Ratio <sup>†</sup>	p-value <sup>‡</sup>	Ratio <sup>†</sup>	p-value <sup>‡</sup>
Anti-oxidant	Ascorbic acid	1.1	0.184	1.1	0.566	1.0	0.802	1.3	0.073
	Carnosine	0.9	0.684	1.1	0.740	1.3	0.451	0.8	0.605
	Ergothioneine	0.5	0.008	0.9	0.814	2.0	0.108	0.9	0.563
	Glutathione (GSH)	1.9	0.030	1.6	<0.001	0.8	0.164	1.6	0.035
	Hypotaurine	1.3	0.359	1.8	0.041	1.5	0.076	1.9	0.100
Oxidative stress	3-Indoxylsulfuric acid	1.6	0.024	1.2	0.296	0.8	0.175	1.1	0.632
	Cysteine	2.3	0.032	6.8	0.188	3.0	0.265	4.7	0.034
	Methionine sulfoxide	1.2	0.444	1.4	0.564	1.2	0.723	1.8	0.131
	N,N-Dimethylglycine	0.9	0.677	0.5	<0.001	0.6	0.109	0.6	0.059
	S-Adenosylmethionine	1.6	0.005	0.6	0.055	0.4	0.004	0.4	0.005

各群 n=3 (自施設データ)

図4 成長ホルモン投与の有無による肝臓のメタボローム解析 (酸化ストレス関連)

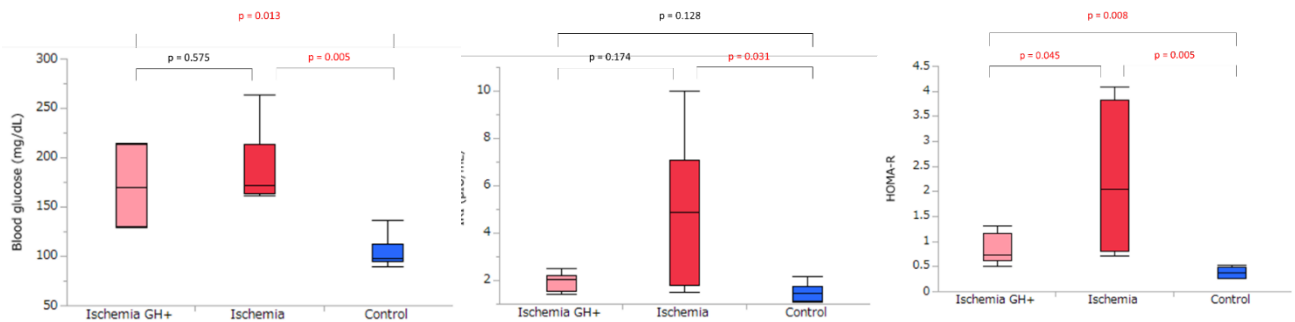


図5 成長ホルモン投与の有無による血糖, インスリン濃度, HOMA-Rの比較

群と非虚血群間で認められていたATPや乳酸の産生の差が認められなくなっていた(図3)。また、成長ホルモン投与は、非投与群と比較して肝臓において抗酸化物質が増加し、酸化ストレスマーカーが減少した(図4)。

またインスリン濃度とHOMA-Rの検討では、GH投与により虚血群と非虚血群間に認められていたインスリン濃度の差がなくなり、HOMA-Rの低下を認めた(図5)。

#### 4. 考 察

##### 1) 早産児のインスリン抵抗性

超低出生体重で出生した平均32歳の成人100例を対象とした報告によると、正期産出生の成人と比べて4倍の耐糖能異常リスクがある<sup>9)</sup>。163例の早産出生の成人を対象とした報告によると、正期産出生の成人と比べて空腹時血清インスリン値やインスリン抵抗性指数(HOMA-R)が有意に高い。近年未熟性の強い早産児が、成人期に至るまでインスリン抵抗性を示すとの研究が散見される<sup>10)</sup>。

##### 2) 早産・低出生体重児のインスリン抵抗性の要因

要因としては、以下の2つが考えられている。

###### ①筋肉量減少に伴う筋原性インスリン抵抗性

我々のモデルマウスでは、除脂肪重量が少なかった。早産・極低出生体重で出生した児は、5歳時点で正期産児に比べて除脂肪量(主に筋肉量)が少ないという報告<sup>11)</sup>があり、低出生体重で出生した児が成人期において、筋容積減少や筋細胞機能異常を呈するとも報告されている<sup>12) 13)</sup>。また、出生時に発育不全を伴っていたマウスが成獣期に筋容量低下や筋組成の変性を認め、インスリン抵抗性と関連していたとする報告もある<sup>14)</sup>。成長ホルモンは、筋肉量増加効果を持ち、実臨床でも我々は低出生体重児が成長ホルモン投与開始2年後にインスリン抵抗性の改善を認めることを見出している<sup>15)</sup>。

###### ②ミトコンドリア機能異常

我々のモデルでは虚血群がコントロール群と比して、ATPが低く、乳酸が高値であり、ミトコンドリア機能異常の存在が示唆された。虚血、血流の再灌流によってreactive oxygen species (ROS)などの酸化ストレスが産生されミトコンドリア機能の低下をもたらすと報告されている<sup>16-19)</sup>。我々のモデルで、虚血群はコントロール群と比較して酸化ストレス

マーカーが高かった。また実際の2型糖尿病患者でも健常者と比較して、ミトコンドリア呼吸鎖複合体あるいはミトコンドリア代謝関連遺伝子の発現低下を認めるという報告<sup>20) 21)</sup>や末梢血細胞中のミトコンドリアDNA量の低下が、インスリン抵抗性と相関するという報告<sup>22)</sup>もある。一方、成長ホルモンは、肝臓脂肪合成の抑制作用<sup>23)</sup>を持ち、成長ホルモンの代謝産物であるinsulin-like growth factor-1 (IGF-1)は肝細胞における酸化ストレスを軽減すると報告されている<sup>24)</sup>。成長ホルモン投与による酸化ストレス軽減作用が、ミトコンドリア機能の改善と関連している可能性がある。

#### 5. 結 語

虚血による酸化ストレスの増加は、ミトコンドリア機能障害を引き起こす。ミトコンドリア機能障害は筋萎縮を引き起こし、非肥満型糖尿病の原因となる筋肉量減少によるインスリン抵抗性の増加と関連している可能性がある。成長ホルモンの投与は、酸化ストレスの減少によりミトコンドリア機能異常を改善し、インスリン抵抗性を低下させる作用を有する可能性がある。今後、ヒトの非肥満型糖尿病発症にミトコンドリア機能異常が関連しているのか、成長ホルモンによる発症予防・治療効果があるのかを検証していく必要がある。

#### 謝 辞

本研究は、日本大学学術研究助成〔若手研究者環境整備支援助成金〕を受けたものです。

#### 文 献

- 1) De Boo HA, Harding JE. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2006, 46: 4-14.
- 2) Barker DJP, et al. Trajectories of growth among children who have coronary events as adults. *N Engl J Med* 2005, 353: 1802-9.
- 3) Urakami T, Kuwabara R, Habu M, et al. Clinical characteristics of non-obese children with type 2 diabetes mellitus without involvement of  $\beta$ -cell autoimmunity. *Diabetes Res Clin Pract* 2013, 99: 105-11.
- 4) Nagano N, Kaneko C, Ohashi S, et al. Non-obese type 2 diabetes with a history of being an extremely preterm small-for-gestational-age infant without early adiposity rebound. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2022, 19: 8560.
- 5) Abe Y, Urakami T, Hara M, et al. The Characteristics of abdominal fat distribution in Japanese adolescents



- with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2019, 12: 2281-2288.
- 6) Katayama D, Nagano N, Shimizu S, et al. A Non-Obese Hyperglycemic Mouse Model that Develops after Birth with Low Birthweight. *Biomedicines* 2022, 10(7): 1642.
  - 7) Bengtsson BA, Brummer RJ, Bosaeus I. Growth hormone and body composition. *Horm Res* 1990, 33 Suppl 4: 19-24.
  - 8) Nagano N, Okada T, Yonezawa R, et al. Early postnatal changes of lipoprotein subclass profile in late preterm infants. *Clinica Chimica Acta* 2012, 18: 109-12.
  - 9) Morrison KM, Ramsingh L, Gunn E, et al. Cardiometabolic health in adults born premature with extremely low birth weight. *Pediatrics* 2016, 138.
  - 10) Hovi P, Andersson S, Eriksson JG, et al. Glucose regulation in young adults with very low birth weight. *N Engl J Med* 2007, 356: 2053-2063.
  - 11) Gianni ML, Roggero P, Piemontese P, et al. Boys who are born preterm show a relative lack of fat-free mass at 5 years of age compared to their peers. *Acta Paediatr* 2015, 104: e119-e123.
  - 12) Jensen CB, Martin-Gronert MS, Storgaard H, et al. Altered PI3-kinase/Akt signalling in skeletal muscle of young men with low birth weight. *PLoS One* 2008, 3: e3738.
  - 13) Jensen CB, Storgaard H, Madsbad S, et al. Altered skeletal muscle fiber composition and size precede whole-body insulin resistance in young men with low birth weight. *J Clin Endocrinol Metab* 2007, 92: 1530-1534.
  - 14) Beauchamp B, Ghosh S, Dysart MW, et al. Low birth weight is associated with adiposity, impaired skeletal muscle energetics and weight loss resistance in mice. *Int J Obes (Lond)* 2015, 39: 702-711.
  - 15) Suzuki J, Urakami T, Morioka I. Greater insulin resistance in short children born small-for-gestational age than in children with growth hormone deficiency at the early period of growth hormone therapy. *Pediatr Int* 2021; 63: 1180-1184.
  - 16) Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol* 2015, 6, 524-551.
  - 17) Crabtree MJ, Hale AB, Channon KM. Dihydrofolate reductase protects endothelial nitric oxide synthase from uncoupling in tetrahydrobiopterin deficiency. *Free Radic. Biol. Med.* 2011, 50: 1639-1646.
  - 18) Rasola A, Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis* 2007, 12: 815-833.
  - 19) Yu N, Wang S, Wang P, Li Y, Li S, Chen H, Wang T. The calcium uniporter regulates the permeability transition pore in isolated cortical mitochondria. *Neural Regen. Res* 2012, 7: 109-113.
  - 20) Kelley DE, He J, Menshikova EV, et al. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002, 51: 2944-2950.
  - 21) Petersen KF, Dufour S, Befroy D, et al. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2004, 350: 664-671.
  - 22) Song J, Oh JY, Sung YA, et al. Peripheral blood mitochondrial DNA content is related to insulin sensitivity in offspring of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2001, 24: 865-869.
  - 23) Cordoba-Chacon J, Majumdar N, List EO, et al. Growth Hormone Inhibits Hepatic De Novo Lipogenesis in Adult Mice. *Diabetes* 2015, 64: 3093-103.
  - 24) Higashi Y, Sukhanov S, Anwar A, et al. IGF-1, oxidative stress and atheroprotection. *Trends Endocrinol Metab.* 2010, 21: 245-54.