

# 論文の内容の要旨

論文題目 肝細胞に対するインスリン様成長因子 I の効果に関する検討

田上 靖

背景)

IGF-I は主に肝細胞で産生され、肝硬変では肝機能の低下とともにその濃度は低値となる。IGF-I 投与が肝機能を改善しうる事がラット肝硬変モデル及びヒト患者において報告されているが、IGF-I が肝に作用する機序は明確ではない。

肝細胞における IGF-I 受容体の発現は肝星細胞や内皮細胞などと比較して少なく、これらの非実質細胞を介して作用するとの報告もある。しかし肝細胞に対する IGF-I の直接作用に関する検討はきわめて少ない。さらに肝細胞近傍の IGF-I の動態に関して不明な点が多い。多量の IGF-I が肝細胞表面の IGFBP3 に捕捉されるため、ある程度以上の IGF-I を添加しない限り、*in vivo* 同様の IGF-I の作用は認めないと考えられる。よって、今回、使用するラットの血清及びラット初代培養肝細胞を培養した無血清培地におけるラット total IGF-I を測定した。そして、それらの値を基にして、算定しうる IGF-I の投与量のある程度の範囲を持って初代培養肝細胞に対し添加し、DNA、アルブミン、グリコーゲン合成、及び、細胞膜受容体、細胞内情報伝達系のリン酸化について検討を行った。

方法)

## 1. ラット初代培養肝細胞の単離

Seglen のコラゲナーゼ門脈灌流法によって Sprague-Dawley 系雄性ラット (6 週令) 肝臓より肝細胞を単離した。3 種類の細胞密度 ( $2.5 \times 10^4$ 、 $5.0 \times 10^4$ 、 $1.2 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) で播種し、4 時間後、血清不含有 WE 培地またはグルコース不含有 DMEM 培地に交換してさらに 20 時間培養し、実験に供した。

## 2. 細胞溶解液の調製

10 cm ディッシュ上の肝細胞に NP-40 溶解液を加えて可溶化し、 $20,000 \times g$  で 10 分間遠心後、上清を回収した。細胞溶解液のタンパク濃度を Lowry 法で測定し、等量化した。

## 3. 免疫沈降法とウエスタンブロット法

プロテイン A セファロース<sup>TM</sup> CL-4B ビーズに標的とするタンパクに対する抗体を付着

させ、細胞溶解液を加えて免疫沈降した。細胞溶解液、免疫沈降物を SDS-PAGE にて展開し、PVDF 膜へ転写した。4 °Cで一晩一次抗体と反応させた後、horseradish peroxidase 標識二次抗体と反応させ、シグナルを検出した。

#### 4. 実験

##### 実験 1 ラット血清及び初代培養肝細胞培地中の total IGF-I 濃度に関する検討

6、14、20 週の Sprague-Dawley 系雄性ラットより血清を採取し、血清 total IGF-I を Quantikine® IGF-I ELISA (R&D systems Inc.) で測定した。また、96 ウェルプレートに播種した肝細胞 (細胞播種密度  $5.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) を無血清 WE 培地で培養し、24 時間後回収した培地中のラット total IGF-I を Quantikine® IGF-I ELISA で測定した。

##### 実験 2 肝細胞増殖能・機能に対する IGF-I の効果に関する検討

###### 2-1) DNA 合成能の評価

96 ウェルプレートに播種した肝細胞の WE 培地を、IGF-I 0、100、500、1000 ng/ml 及び 5-Bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) 10 μM を添加した WE 培地に交換した。24 時間後、BrdU 取り込み能を ELISA で、培地中のアルブミン濃度をサンドイッチ ELISA で測定した。

###### 2-2) グリコーゲン合成能の評価

10 cmディッシュに播種した肝細胞をグルコース不含有 DMEM 培地で 20 時間培養し、グリコーゲンを枯渇させた後、培地を IGF-I 0、100、500、1000 ng/ml を添加した WE 培地に交換した。24 時間後、回収した細胞の溶解液にアミログルコシダーゼを加え 40 °Cで 3 時間振盪し、グリコーゲンの加水分解によって得られたグルコース濃度をアッセイキットで定量した。酵素処理を行わないサンプルで肝細胞中のグルコース濃度を定量し、両者の差をグリコーゲン合成量とした。

##### 実験 3 細胞膜受容体及び細胞内情報伝達系タンパクのリン酸化に関する検討

IGF-I 1000 ng/ml を添加して 0、0.5、5、10、20、40、60 分後に肝細胞を回収し、免疫沈降法とウエスタンブロット法を用い、細胞膜受容体及び細胞内情報伝達系タンパクのリン酸化を評価した。細胞膜受容体としては、他の細胞種において IGF-I 刺激によるリン酸化が報告されている IGF-I 受容体、インスリン受容体、epidermal growth factor (EGF) 受容体について評価した。細胞内情報伝達系としては、Akt、extracellular signal regulated kinase (ERK) 1/2、さらに Akt の下流に位置する glycogen synthase kinase (GSK) 3α/β、Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) 系の下流に位置する p70 S6 kinase (p70S6K) 及び eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) について評価した。

##### 実験 4 mTOR と ERK 1/2 のアンタゴニストを用いた検討

mTOR のアンタゴニストとして rapamycin、ERK 1/2 のアンタゴニストとして PD98059 を用いた。rapamycin 100 ng/ml または PD98059 100  $\mu$ M を添加した培地で肝細胞を 4 時間培養した後、IGF-I 1000 ng/ml を添加し、細胞内情報伝達系タンパクのリン酸化、DNA 合成、タンパク合成、グリコーゲン合成を評価した。

#### 実験 5 IGF-I 受容体のアンタゴニストを用いた検討

IGF-I 受容体のアンタゴニストとして H1356 (Bachem)、Picropodophyllin (PPP、CALBIOCHEM®) を用いた。肝細胞に対する H1356、PPP の影響に関する検討は今まで行われたことはなく、他の細胞種での報告より高濃度の H1356、PPP を用いて細胞内情報伝達系のリン酸化を検討することとした。H1356 80  $\mu$ g/ml または PPP 1  $\mu$ M を添加した培地で肝細胞を 4 時間培養した後、IGF-I を 1000 ng/ml 添加し、Akt、ERK 1/2 のリン酸化を評価した。

#### 結果と考察)

##### 実験 1 ラット血清及び初代培養肝細胞培地中の total IGF-I 濃度に関する検討

6、14、20 週の Sprague-Dawley 系雄性ラット血清 total IGF-I 濃度は 674  $\pm$  40、880  $\pm$  19、946  $\pm$  42 ng/ml (mean  $\pm$  SEM、各々 n=3) であり、既報と大きな差を認めなかった。また、 $5.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の細胞密度で播種した初代培養肝細胞を無血清 WE 培地で培養し、24 時間後回収した培地中のラット total IGF-I 濃度は 4.04  $\pm$  0.39 ng/ml (mean  $\pm$  SEM、n=8) であった。

##### 実験 2 肝細胞増殖能・機能に対する IGF-I の効果に関する検討

$5.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の細胞密度で播種した肝細胞に 500 ng/ml 以上の IGF-I を添加すると、肝細胞の BrdU 取り込み能、アルブミン合成、グリコーゲン合成は促進された。また、統計上有意ではないが、IGF-I 100 ng/ml 添加による、BrdU 取り込み能及びグリコーゲン合成の軽度の促進効果の可能性が示唆された。

##### 実験 3 細胞膜受容体及び細胞内情報伝達系タンパクのリン酸化に関する検討

肝細胞に対する IGF-I の刺激により IGF-I 受容体、インスリン受容体、Akt、ERK 1/2、GSK 3 $\alpha$ / $\beta$ 、p70S6K、4E-BP1 のリン酸化の亢進を認めた。IGF-I による Akt、GSK 3 $\alpha$ / $\beta$ 、p70S6K のリン酸化の亢進は IGF-I 添加 60 分後まで認められたが、ERK 1/2、4E-BP1 のリン酸化の亢進は IGF-I 添加 20 分後には有意ではなかった。

##### 実験 4 mTOR と ERK 1/2 のアンタゴニストを用いた検討

mTOR に対するアンタゴニスト rapamycin は、IGF-I による p70S6K、4E-BP1 のリン酸化

亢進を抑制した。さらに mTOR 系とは独立しているとされる GSK 3 $\alpha/\beta$  のリン酸化も抑制した。一方、mTOR 系、GSK 3 $\alpha/\beta$  の上流に位置する Akt のリン酸化は抑制を受けなかった。また、rapamycin は IGF-I による肝細胞の DNA、アルブミン、グリコーゲン合成促進効果を抑制した。

ERK 1/2 に対するアンタゴニストである PD98059 は IGF-I による ERK 1/2 のリン酸化亢進を抑制した。しかし、肝細胞の DNA、アルブミン、グリコーゲン合成能は影響を受けなかった。

#### 実験 5 IGF-I 受容体のアンタゴニストを用いた検討

肝細胞における IGF-I の効果に対する IGF-I 受容体の関与を検討するため、IGF-I 添加の 4 時間前から IGF-I と競合、非競合的に阻害する 2 種類の IGF-I 受容体に対するアンタゴニストを添加した培地で培養した。他の細胞種での既報より高濃度の H1356、PPP を添加したにもかかわらず、IGF-I による Akt、ERK 1/2 のリン酸化の明らかな抑制は認めなかった。

#### 結論)

IGF-II は肝細胞の DNA 合成、タンパク合成、グリコーゲン合成を促進し、IGF-II は IGF-I 受容体、インスリン受容体のリン酸化、mTOR 系を介して肝細胞に直接作用しうると考えられた。