

[課程—2]

審査の結果の要旨

氏名 田上 靖

本研究は肝細胞におけるIGF-Iの作用を明らかにするため、ラット初代培養肝細胞を用い、ラット血清total IGF-I濃度を測定し、その値より算定しうる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ものであり、下記の結果を得ている。

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 ± 40 、 880 ± 19 、 946 ± 42 ng/ml (mean \pm SEM、各々n=3) であった。また、 5.0×10^4 cells/cm² 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 ± 0.39 ng/ml (mean \pm SEM、n=8) であった。

2. 肝細胞の DNA、タンパク、グリコーゲンの合成能に対する IGF-I の効果

5.0×10^4 cells/cm² 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。

3. 肝細胞における IGF-I による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

IGF-I による IGF-I 受容体のリン酸化に関しては IGF-I 無添加の状態でも軽度のリン酸化を示した。さらに、IGF-I 添加 0.5 分後にリン酸化の亢進を認めたが、IGF-I 添加 5 分後には減弱していた。一方、IGF-I によるインスリン受容体のリン酸化に関しては、IGF-I 無添加の状態では明らかなリン酸化は認めず、IGF-I 添加 0.5 分後にリン酸化の亢進を認めたが、IGF-I 添加 5 分後には IGF-I 受容体同様減弱していた。また、EGF 受容体のリン酸化に関しては IGF-I の添加によるリン酸化状態の明らかな変化は観察時間内には認めなかった。

次に、IGF-I による Akt、ERK 1/2、GSK 3 α/β 、p70S6K、4E-BP1 のリン酸化を評価した。IGF-I 添加の 5 分後には Akt、GSK 3 α/β 、p70S6K、4E-BP1 のリン酸化の亢進を認め、60 分後でもリン酸化の亢進状態は継続していた。ERK 1/2 について

は、IGF-I添加の5分後にリン酸化の亢進を認めたが、それ以降はリン酸化の亢進は減弱していた。

4. 肝細胞におけるIGF-Iの効果に対するmTORとERK 1/2のアンタゴニストによる影響

IGF-Iによるタンパク合成・増殖促進効果はmTORに対するアンタゴニスト (rapamycin) により抑制されたが、ERK 1/2に対するアンタゴニスト (PD98059) には明らかな影響は受けなかった。

5. 肝細胞におけるIGF-Iの効果に対するIGF-I受容体のアンタゴニストによる影響

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 (H1356、PPP) を添加した培地で培養したが、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

以上、本論文は初代培養肝細胞に対して IGF-I を添加する実験系から、IGF-I が肝細胞の DNA 合成、タンパク合成、グリコーゲン合成を促進し、細胞膜受容体 (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

直接作用する可能性を示唆した。本研究はこれまで十分検討されてこなかった肝細胞に対する IGF-I の作用を増殖、タンパク合成、糖代謝、細胞膜、細胞内情報伝達と複数の面から検討している。肝細胞における IGF-I の autocrine、paracrine な作用の解明に関しては肝細胞近傍の微小環境における IGF-I の動態のさらなる解明を必要とするが、IGF-I の肝細胞における作用の解明や IGF-I の今後の臨床応用に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。