



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | インスリン様成長因子結合蛋白の生理機能研究                                                                                                                           |
| Author(s)    | 岡島, 敏広                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 1993, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/38529">https://hdl.handle.net/11094/38529</a>                                                             |
| rights       |                                                                                                                                                 |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 おか 島 敏 広

博士の専攻分野の名称 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 第 1 0 9 8 1 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 5 年 12 月 3 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学 位 論 文 名 インスリン様成長因子結合蛋白の生理機能研究

論文審査委員 (主査)  
教 授 三村 務(副査)  
教 授 近藤 雅臣 教 授 眞弓 忠範 教 授 田中 慶一

## 論 文 内 容 の 要 旨

本研究では、代謝促進活性(インスリン様活性)と成長促進活性の2つの活性を持つインスリン様成長因子(IGF)のそれぞれの活性を精度良く定量するため、無血清かつ放射性同位元素を用いない条件でマウス線維芽細胞 BALB/c3T3を用いて、2つのバイオアッセイを確立した。さらにこのバイオアッセイを利用して IGF 結合蛋白(IGFBP)の生理機能を推定した。

まず、この確立したバイオアッセイの作用機序をレセプターの解析と天然及びアナログペプチドの反応性により調査した。BALB/c3T3細胞膜にヨードラベルペプチドを親和性架橋してレセプターを検出すると、type1及び type2 IGF レセプターは明確に検出されたが、インスリンレセプターは確認できなかった。次に反応性を調べると天然型ペプチドでは、IGF- I が最も低い濃度で活性を示し、インスリンは天然型ペプチドで最も活性が低かったので、インスリンレセプターは数が少ないか、存在しても機能していないと考えられた。また、IGF- II 分子でインスリン及び type1 IGF レセプターとの結合に重要なアミノ酸 Tyr<sup>27</sup> が Leu に置換され、これらのレセプターへの反応性を失った [Leu<sup>27</sup>] -IGF- II アナログを用いて type2 IGF レセプターの機能を調べた。その結果、このアナログで type2 IGF レセプターのみを特異的に刺激しても活性はインスリンよりも小さく、type2 IGF レセプターは増殖及び代謝活性発現にまったく関与していないことが明らかとなった。以上の結果から、本バイオアッセイ系での反応はほぼ type1 IGF レセプターのみに媒介されていることが明らかとなった。

次に、IGFBP作用の研究の前段階として、細胞の IGFBP 産生を調べた。細胞の順化培養液を直接ウェスタンリガンドプロットにより調べると、かすかにしか IGFBP が検出されなかった。さらに、IGFBP と結合しない変異型 IGF- I の des (1-3) -IGF- I (N 末端3残基が欠失した IGF- I) は、IGFBP による阻害を受けないので天然型の IGF- I に比べ活性を発現するはずであるが、本バイオアッセイ系では天然型 IGF- I とほぼ同一の活性を示した。この結果も、細胞による IGFBP の産生が微量であることを示している。このように、アッセイに用いた細胞は内因性 IGFBP の産生がほとんどなく、その影響の考慮する必要がない。

このようなアッセイ系のうちグルコース消費をみる代謝促進アッセイを用い、IGFBP- 1 及び- 3 の作用から IGFBP

の生物学的機能を推定した。まず、細胞に IGF と IGFBP を同時添加し、IGFBP の作用を調べると、IGFBP-3 は IGF-II に強い阻害作用を示したが、IGFBP-1 は IGF-I 及び-II の両方にほぼ同等の阻害作用を示した (IGFBP-1 の  $IC_{50}$ : 1 ng/ml IGF に対し 100~200 ng/ml; IGFBP-3: 1 ng/ml IGF-I に対し >250 ng/ml, IGF-II では 30 ng/ml)。インスリンには影響がなく、この阻害強度は、IGFBP と IGF との親和性では説明できる。ところが、IGFBP の添加スケジュールを変え、IGF 添加24時間前に IGFBP を加えて前培養し、洗浄後、IGF と IGFBP とで同時刺激すると、IGFBP-1 は同時添加時と同等の結果であったが、IGFBP-3 では同時添加のみよりも阻害効果が増強され、特に IGF-I に対する阻害作用は約50倍も上昇した (前培養無→有の  $IC_{50}$ : 0.1 ng/ml IGF-I, 160→3 ng/ml; 1 ng/ml IGF-II, 30→15 ng/ml)。細胞を IGFBP と前培養後、IGF のみにより刺激すると IGFBP の影響はほとんどないか、弱いものであった。このように、前処理等 IGFBP 添加スケジュールに応じ作用強度の変化は見られたが、調査した IGFBP-1 及び-3 は共に、IGF 活性に対して阻害作用を示した。これら  $IC_{50}$  と生理的血中 IGFBP 濃度との比較から、IGFBP-1 はこれのみでは生理条件下で阻害作用を発揮できないが、IGFBP-3 は阻害作用を発揮しようと推定された。

本来 IGFBP は細胞により産生されるので、細胞は IGF 刺激の前にすでに IGFBP の前処理を受けた状態にあると考えられる。IGFBP-3 存在下での前培養が特徴的な影響を示したことから、より生理的条件に近いと考えられる内因性 IGFBP の作用を調べるため、上記細胞にヒト IGFBP-3 遺伝子を導入した (Tx-BP-3 細胞)。この細胞は IGFBP-3 を産生するのに加えて、倍化時間がプラスミドのみを導入した対照細胞に比べ2.5倍長く (Tx-BP-3 細胞  $2.8 \pm 0.4$  日及び対照細胞  $1.1 \pm 0.2$  日)、飽和細胞密度も4分の1と増殖が抑制された ( $3.8 \pm 0.5 \times 10^4$  及び  $1.0 \pm 0.1 \times 10^4$  細胞/dish)。このように、内因性 IGFBP-3 も増殖抑制因子として働くことが明らかとなった。この抑制作用は IGFBP-3 の影響を受けないインスリンを用いても回復しなかったので、IGFBP-3 がリガンドと type I IGF レセプターの結合を阻害しているわけではない。

以上の結果より、IGFBP-1 及び-3 は血中において相互作用によりそれぞれ IGF 活性の微調節及び主調節作用を示すと推測され、特に内因性 IGFBP-3 はそれに加え、細胞内又は表面において別の経路による阻害作用も発揮していると考えられた。このように、新規バイオアッセイの確立により、現在その生理機能について議論のある IGFBP の研究にうまく応用できた。特に内因性 IGFBP の機能について直接情報を与える研究結果としては初めてといえる。IGFBP の明かな生物学的機能の説明は今後の研究結果を待たねばならないが、新規バイオアッセイの設定が IGFBP の作用の解釈に対して新たに問題提起を行なうことになった。

## 論文審査の結果の要旨

Insulin様成長因子 (IGF) は代謝促進活性 (インスリン様活性) と成長促進活性を併せ持っている。これら二つの活性をより精度を高めて定量するため、無血清かつ放射性同位元素を用いない条件下でマウス線維芽細胞 BALB/c3T3を用いて新規なバイオアッセイを確立した。さらにこれらのバイオアッセイ系を用いて IGF 結合蛋白 (IGFBP) の生理機能をしらべ以下の如き結果を得た。すなわち

- (1) IGF-I の増殖及び代謝促進活性を BALB/c3T3を用いるバイオアッセイで検討した結果、2つの活性はいずれも Type I IGF レセプターを介して発現されている。
- (2) IGFBP-1 及び3のを外因的に添加するといずれも IGF の活性を阻害する。
- (3) 内因性 IGFBP の機能をしらべる目的で IGFBP-3 の遺伝子を BALB/c3T3細胞に導入したところ、倍化時間は2.5倍長くなり、増殖も抑制され、IGFBP-3 は増殖に対して負の調節因子として働いていることが明らかになった。

以上のように本論文は IGF の作用機構とその生理的調節を知る上で大きく寄与する成果を得ており、博士論文として価値あるものと認める。