

機関番号 : 12601

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20590761

研究課題名 (和文) 肝におけるアミノ酸を用いた IGF-I の産生促進 : 硬変肝における意義の検討

研究課題名 (英文) Induction of IGF-I production by amino acids in the liver: Its significance in the cirrhotic liver

研究代表者

富谷 智明 (TOMIYA TOMOAKI)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号 : 90227637

研究成果の概要 (和文) : 増殖、代謝調節など種々の生物活性を有する IGF-I (insulin-like growth factor I) は、主として肝、中でも肝細胞で産生される。肝硬変患者では IGF-I の血中濃度が低下しており、肝硬変患者に対する投与試験では肝機能の回復が報告されている。アミノ酸の投与による IGF-I の産生促進作用を評価した上で、肝硬変における IGF-I の誘導を介した病態改善作用を検討する事为目标とした。培養肝細胞における IGF-I 産生に対するアミノ酸添加の影響を検討したところ、branched-chain amino acids、中でも leucine が産生促進作用を有する事を見出した。また、この IGF-I は肝細胞に直接作用して mTOR 系を中心に活性化し、肝細胞増殖、肝細胞蛋白合成能、糖代謝能を促進することを見出した。これらの効果は inhibitor 添加により抑制された。我々の検討で IGF-I は直接肝細胞に対して効果を持ちうる事が明らかになった。肝機能低下状態にある肝硬変において、IGF-I を up-regulate する事は、肝細胞に直接作用して肝機能改善に有効と推定された。

研究成果の概要 (英文) : Insulin-like growth factor I (IGF-I) plays an important role in growth, metabolism, survival and oxidative stress of various types of cells. IGF-I is produced predominantly by the liver, especially by hepatocytes. Serum IGF-I levels are decreased in patients with liver cirrhosis. Supplementation of IGF-I induces the improvement of liver function in patients with liver cirrhosis. In this study, we examined stimulatory effect of amino acids on IGF-I production by hepatocytes, and the effect of IGF-I on hepatocyte growth and function to investigate the possibility that amino acid administration improves liver function in patients with liver cirrhosis.

Among various amino acids, branched-chain amino acids, especially leucine, increased IGF-I production by rat primary cultured hepatocytes. Addition of IGF-I stimulated proliferation, protein production and glucose metabolism by rat hepatocytes. In these cells, mTOR dependent signaling pathway was up-regulated. The stimulatory effect of IGF-I was abrogated by the addition of an inhibitor of mTOR pathway. These observations suggest that IGF-I stimulates hepatocyte function directly, and stimulation of IGF-I production is a possible therapeutic candidate in patients with liver cirrhosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：再生医学、栄養学、内科、トランスレイショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

肝硬変では様々な代謝異常が認められ、予後に関与していることが知られている。また、肝の脂肪化の意義は特にC型肝硬変において重視され、肝発癌との関連が示唆されている。更にNASH (non-alcoholic steatohepatitis) は本邦においても増加が懸念されており、今後肝硬変の成因の中で重要な地位を占める可能性がある。また、これら代謝異常は、活性酸素（種）の増加との関連性も指摘され、肝障害の進展、肝発癌の一つの誘因になりうると報告されている。以上から、近年、肝疾患領域において代謝改善の重要性が認識され、代謝異常の制御により肝硬変の予後に好影響を及ぼす可能性がある事が示唆されている。

IGF-I は、Insulin と異なり主として肝臓で産生され、糖のみならず蛋白質・脂質などの代謝調節においても重要な役割を有すると考えられている。更に、種々の臓器において生存シグナルの増加、活性酸素の軽減などの作用が報告され、細胞分化・増殖・維持に関与していると考えられている。肝においては主として肝細胞、一部星細胞で産生される。ウイルス性慢性肝障害、NASH などにおいて、特に肝硬変に進展した場合、血中濃度の低下が認められ、肝予備能低下や肝線維化進展と相関することが報告されている。動物モデルにおいて、IGF-I の投与により肝線維化抑制等の効果がみられ、また欧州における少数例での検討ではあるが、肝硬変患者における投与試験において肝機能の改善効果が報告されている。肝発癌に対する効果は未知ではあるものの、IGF-I の投与は慢性肝疾患の新しい治療戦略として注目されている。また IGF-I の産生を刺激し得れば、同等の効果が得られる事が期待される。

現在、慢性肝疾患、特に肝硬変に対して、分枝鎖アミノ酸 (BCAA: branched-chain amino acids) を主成分としたアミノ酸製剤を用いた栄養療法が行われている。同療法は、肝硬変患者において血中BCAA値が低下していることから、当初はその補充を主眼として開始された治療法であるが、単に血中BCAA値の是正だけでは説明の困難な効果も報告されている。即ち、近年、内外にて比較対照試験が行われ、栄養状態、低蛋白血症の改善のみならず、糖代謝、肝発癌、肝機能、更には予後にも良い影響を与えるとの報告が認められる。これら新しく見出された効果に関しては、どの成分が有効かという点を含めて機序は明確ではない。また、現状のアミノ酸製剤の組成が最適か否かに関しても未だ十分な検討がなされていない。

近年、アミノ酸は単に蛋白質の素材となるだけでなく細胞内情報伝達系の調節、遺伝子発現調節、蛋白質代謝調節等のいわば薬理学的作用を有する点が注目されている。これらの作用に関する研究は、BCAA、中でもleucineに関するものが主体であったが、他のアミノ酸も作用を発揮する事が最近報告されている。我々はleucineが肝星細胞におけるHGF (hepatocyte growth factor) の産生を促進する事を見出した。またこのleucineの効果はin vitroのみならずラットにおいても発揮される事を報告している。更に、このleucineによる肝星細胞におけるHGF産生促進作用は細胞内情報伝達系であるmTOR (mammalian target of rapamycin) を介したものである事を見出している。このHGFは、肝（細胞）に対しては増殖促進作用が広く知られているが、アルブミン等、蛋白合成促進作用も有する事も報告し、また、BCAA以外のアミノ酸に関しては、glutamine及びprolineがin vitro及びin vivoにおいてleucineと同等のHGF産生促進作用を

有するが、mTOR系の関与は少ない、即ち他の機序が主体で有る事を見出している。以上から、肝硬変患者に対するアミノ酸療法の効果の一端はHGFを介したものである可能性があるかと推定している。また、これらの結果はBCAA及びBCAA以外のアミノ酸がmTOR-dependent及びindependentに肝における因子産生を調節し、肝に対して良好な影響を及ぼし得る事を示している。アミノ酸がIGF-Iの産生を刺激し得る事を確認出来れば、現状の栄養療法の作用機序を更に解明する事が出来る可能性があるだけでなく、個々のアミノ酸の効果を検討する事により、更に効果的な療法の開発が可能と思われる。

2. 研究の目的

本研究においては、生理活性物質であるアミノ酸の中から、肝細胞におけるIGF-Iの産生促進作用を有する物質を培養細胞及び動物を用いて見出す事を目的とする。その促進作用の機序を解明するとともに、複数、機序が異なる物質を見出し得た場合、相乗、相加効果を検討し、新たなアミノ酸製剤の開発の基礎となる組成を検討する。またそれによる、IGF-Iを介した肝細胞、硬変肝に対する作用を検証する。肝硬変における病態改善に寄与する事を目標とする。

3. 研究の方法

5-6週齢のSprague-Dawley雄性ラットを用いた。室温 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、12時間明暗cycleの環境下で通常の実験動物用固形飼料、飲料水を自由摂取として飼育した。Seglenの方法に準じてラット肝から単離した肝細胞を、FCS、インスリン、デキサメサゾン添加Williams E培地を用いて細胞培養プレート上にて3時間培養した。培地を交換した後、肝細胞を以下の実験に供した。

(1) IGF-I 発現に対するアミノ酸の影響に関する検討

各種アミノ酸をそれぞれ単独に無アミノ酸培地中に添加して、培養上清中のIGF-I濃度を測定した。IGF-Iの測定にはsandwich ELISA法を用いて、定量的に行った。

(2) IGF-Iによる培養肝細胞に対する効果
IGF-Iを生理的濃度を考慮して添加し、培養肝細胞の増殖、蛋白合成能、糖代謝能を検討した。増殖はBrdUの取り込みをELISA法にて、蛋白合成は培養上清中のアルブミンおよびフィブリノーゲンをELISA法にて、糖代謝能は細胞中のグリコーゲン合成を測定した。

(3) IGF-Iによる培養肝細胞のIGF-I受容体の発現およびリン酸化

IGF-I添加後、経時的にcell lysateを作成し、抗IGF-I受容体抗体にて免疫沈降後、Western BlottingによりIGF-I受容体、更に

は抗phosphotyrosine抗体を用いてそのリン酸化を検討した。

(4) IGF-Iによる培養肝細胞の細胞内情報伝達系の活性化

同様にIGF-I添加後、経時的にcell lysateを作成し、p70S6 kinase、4E-BP1、AKT、ERK1/2、GSK3 α/β の活性化をwestern blottingにて検討した。

(5) 細胞内情報伝達系抑制による肝細胞に対するIGF-Iの効果に対する影響

細胞内情報伝達系の意義を確認するため、mTORの抑制剤であるrapamycinおよびERK1/2の抑制剤であるPD98059を用いて、IGF-Iの肝細胞に対する効果にたいするこれら抑制剤の影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 各種アミノ酸を検討した結果、branched-chain amino acids、なかでもLeucineは肝細胞によるIGF-I産生を刺激すると推定された。他のアミノ酸にも可能性はあると考えられる結果が認められたが、その明確な効果発現には複数のアミノ酸を組み合わせることが必要である可能性も示唆された。

(2) 100ng/mlのIGF-I添加では有意な効果は認められなかったが、正常ラットの血中濃度に匹敵する濃度(500ng/ml)を添加するとDNA合成は有意に促進された。更に、培養液中のアルブミン、フィブリノーゲン濃度は有意に上昇した。また、肝細胞におけるグリコーゲン合成もIGF-I刺激により有意に上昇していた。

(3) 免疫沈降後のWestern blottingにて肝細胞IGF-I受容体の発現を認めた。また、IGF-I受容体のリン酸化もIGF-I添加1分以内から確認された。

(4) IGF-I刺激5分後にはAKT、ERK1/2、p70S6 kinaseのリン酸化の亢進、4E-BP1の高リン酸化状態を示す δ -bandの出現を認めた。更にグリコーゲン合成の律速酵素を制御するGSK3 α/β のリン酸化の亢進も認めた。

(5) mTORの阻害剤であるrapamycinによりIGF-Iによる増殖促進作用、蛋白合成促進作用は抑制された。一方、ERK1/2リン酸化阻害剤の添加ではIGF-IによるERK1/2のリン酸化阻害は認められるものの、IGF-Iによる増殖促進作用、蛋白合成促進作用に対しては影響を与えなかった。

以上から、アミノ酸は肝細胞によるIGF-I産生を刺激し得、そのIGF-Iは肝細胞の増殖、機能を直接刺激する。その作用は受容体のリン酸化、mTOR系の活性化を介すると推定された。肝硬変における肝機能低下時に、これらの機構を応用することは肝機能回復を目的とした新しい治療法になりうると推定された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

① Ohtomo N, Tomiya T, Tanoue Y, Inoue Y, Nishikawa T, Ikeda H, Seyama Y, Kokudo N, Shibahara J, Fukayama M, Koike K, Shirataki H, Fujiwara K.

Expression of alpha-taxilin in hepatocellular carcinoma correlates with growth activity and malignant potential of the tumor. *Int J Oncol*, 37:1417-23, 2010.

(査読有)

② Tomiya T.

Sex difference in non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res*, 40:108-110, 2010. (査読有)

③ Ikeda H, Ohkawa R, Watanabe N, Nakamura K, Kume Y, Nakagawa H, Yoshida H, Okubo S, Yokota H, Tomiya T, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Koike K, Yatomi Y.

Plasma level of bioactive lipid mediator sphingosine 1-phosphate is reduced in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta*, 411:765-770, 2010. (査読有)

④ Watanabe N, Ikeda H, Kume Y, Satoh Y, Kaneko M, Takai D, Tejima K, Nagamine M, Mashima H, Tomiya T, Noiri E, Omata M, Matsumoto M, Fujimura Y, and Yatomi Y.

Increased production of ADAMTS13 in hepatic stellate cells contributes to enhanced plasma ADAMTS13 activity in rat models of cholestasis and steatohepatitis. *Thromb Haemost*, 102:389-396, 2009. (査読有)

⑤ Ikeda H, Watanabe N, Ishii I, Shimosawa T, Kume Y, Tomiya T, Inoue Y, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Iitsuka S, Fujita R, Omata M, Chun J, Yatomi Y.

Sphingosine 1-phosphate regulates regeneration and fibrosis after liver injury via sphingosine 1-phosphate receptor 2. *J Lipid Res*, 50: 556-64, 2009.

(査読有)

⑥ Tomiya T, Omata M, Imamura H, Fujiwara K.

Impaired liver regeneration in acute liver failure: the significance of cross-communication of growth associated factors in liver regeneration. *Hepatol Res*, 38: S29-S33, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

① Tanoue Y, Tomiya T, Ohtomo N, Nishikawa T, Inoue Y, Shirataki H, Ikeda H, Koike K,

Fujiwara K.

Insulin-like growth factor I stimulates proliferation and protein production in rat hepatocytes through an mTOR signaling pathway.

Annual Meeting of the American Association for the Study of the Liver Diseases, Boston, Massachusetts, October 29–November 2, 2010.

② Tanoue Y, Tomiya T, Ohtomo N, Inoue Y, Nishikawa T, Ikeda H, Shirataki H, Koike K, Fujiwara K.

Direct effect of insulin-like growth factor I on proliferation and protein production by rat hepatocytes.

FASEB Summer Research Conference: Liver Growth, Injury and Metabolism, Basic and Applied Biology, Snowmass, Colorado, USA, August 15–20, 2010.

③ Ohtomo N, Tomiya T, Tanoue Y, Inoue Y, Nishikawa T, Watanabe N, Ikeda H, Koike K, Seyama Y, Kokudo N, Shibahara J, Shirataki H, Fujiwara K.

Expression of alpha-taxilin may reflect malignant potential of hepatocellular carcinoma.

60 th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Liver Diseases, Boston, Massachusetts, October 30–November 3, 2009.

④ Ohtomo N, Tomiya T, Tanoue Y, Inoue Y, Nishikawa T, Watanabe N, Ikeda H, Omata M, Seyama Y, Kokudo N, Shibahara J, Fukayama M, Shirataki H, Fujiwara K.

Alpha-taxilin, a postulated vesicle traffic protein, may be involved in hepatocyte proliferation.

44 th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Copenhagen, Denmark, April 22–26, 2009.

⑤ Ohtomo N, Tomiya T, Tanoue Y, Inoue Y, Nishikawa T, Watanabe N, Ikeda H, Omata M, Shirataki H, Fujiwara K.

Alpha-taxillin, a novel syntaxin-binding protein, is involved in cell proliferation in rat liver.

FASEB Summer Research Conference: Liver Biology, Development and Disease, Snowmass, Colorado, USA, August 3–8, 2008.

[その他]

ホームページ等

<http://gastro.m.u-tokyo.ac.jp/med/0201.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富谷智明 (TOMIYA TOMOAKI)
東京大学・医学部附属病院・特任講師
研究者番号：90227637

(2) 研究分担者

池田 均 (IKEDA HITOSHI)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：80202422

(3) 連携研究者 なし