

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590961

研究課題名(和文) IGF-Iを用いた肝の再生促進と機能改善：作用点を考慮した治療法の検討

研究課題名(英文) Stimulation of liver regeneration and function by IGF-I

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：肝不全の治療においては肝構成細胞の増殖および機能発現が促進されることが必要である。IGF-Iの肝における作用を検討した。肝細胞においては、IGF-Iは受容体を活性化し、蛋白合成、増殖、糖代謝を促進した。これらは培養条件によって調節されていた。一方、肝星細胞においては増殖は促進したが、コラーゲン分解系を促進することによりコラーゲン産生は抑制した。IGF-Iは肝細胞増殖、機能を促進する一方で、肝線維化を抑制する。肝疾患治療に有用と思われた。

研究成果の概要(英文)：Stimulation of proliferation and function by hepatic cells are important for the treatment of liver failure. We studied the stimulatory effect of IGF-I on hepatic cells. IGF-I activated its receptor on hepatocytes, and stimulated its proliferation as well as protein production and glucose metabolism. These effects were regulated by culture conditions of hepatocytes. In hepatic stellate cells, IGF-I enhanced the proliferation, while collagen production was reduced by IGF-I treatment through the enhancement of collagen degradation. IGF-I stimulates hepatocyte proliferation and function. In addition, it may suppress hepatic fibrosis. IGF-I is a candidate as a drug for the treatment of liver diseases including hepatic failure.

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 肝不全

### 1. 研究開始当初の背景

肝疾患、特に急性・慢性の肝不全の治療においては、肝再生の促進による十分な肝細胞数の確保、且つ肝細胞機能の発現促進を行うことが理想的である。肝細胞増殖と機能促進の優先度は病態によって異なると推定される。これらを目的として、様々な治療法の開発が試みられている。

IGF-1 は、Insulin と相同性を有し、受容体の cross-talk も一部認められるが、その生物活性は異なる点も多い。種々の細胞に対して糖のみならず蛋白、脂質などの代謝調節において重要な役割を果たしているが、更に、生存シグナルの増加、細胞分化・増殖・維持に関与していると考えられている。生体においては肝が主たる産生臓器であり、血中の IGF-1 は殆ど肝由来と考えられている。肝においては主として肝細胞にて産生される。必然的に肝障害時、肝機能低下時には産生が低下すると推定され、実際、肝硬変患者では肝障害の進展、肝予備能の低下に応じて血中 IGF-1 値は低下している。以上から、肝障害に対する IGF-1 補充療法の推進が想定される。これに関連して、従来、幾つかの *in vivo* の知見が報告されている。硬変肝動物モデルにおいて、IGF-1 投与による肝の線維化抑制等の効果が認められ、また少数例での検討ではあるものの、欧州において肝硬変患者に対する投与が行われ、アルブミン値の有意な上昇等肝機能の改善効果が報告されている。しかし、実際には議論が多い。肝(実質)細胞に対する直接の効果が不明、むしろ否定的な報告が主体であるため、肝機能の改善等の効果に関して懐疑的な意見が主流であること、IGF-1 が多彩な生物活性を有するため、投与した場合に目的とする効果が本当に得られるかが明確でないこと等が背景にあると推定される。肝における作用点、どの細胞(種)にどの様な効果をもたらしうるのか、を明らかにする必要があると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では IGF-1 の肝に対する作用点の検討を行う事を目的とする。

### 3. 研究の方法

肝星細胞の検討には、ラット株化肝星細胞を用いた。一般に星細胞は培養中活性化され形質変換が見られるが、この株化細胞は培養中に大きな変化をきたさないことが知られている。

対照としてのラット肝細胞は、5~6 週齢の Sprague-Dawley 雄性ラットを用いて、既報の Seglen の方法に準じてラット肝から単離し、実験に用いた。

p70S6 kinase、4E-BP1、AKT、ERK1/2、phospho-p70S6 kinase、phospho-AKT、phospho-ERK1/2、MMP-9、TIMP-1 発現は Western blotting にて、DNA 合成は BrdU の取り込みにて、細胞数は Water-soluble tetrazolium salt-8 assay にて、MMP 活性は Zymography にて、コラーゲン量は Sirius red dye binding 法にて、TGF-beta、HGF 濃度は ELISA 法にて、type I procollagen mRNA は RT-PCR にて測定した。

### 4. 研究成果

株化肝星細胞は培養中持続的に IGF-1 受容体を発現していた。IGF-1 添加 24 時間後の DNA 合成は、IGF-1 濃度依存的に増加した。この時、各群の細胞数に差は認められなかったが、添加 48 時間後の細胞数は濃度依存的に増加していた。一方、IGF-1 添加 24 時間後および 48 時間後の培地中の可溶性コラーゲン量は有意に低下をしていた。TGF-beta 濃度には有意な差は認められなかった。しかし、HGF 濃度は IGF-1 刺激により有意に上昇していた。type I procollagen mRNA 量は IGF-1 により抑制されなかった。一方、MMP-9、MMP-2 および活性化 MMP-2 は濃度依存的に増加した。また、TIMP-1 量は IGF-1 添加により著明に低下していた。また、細胞内情報伝達系においては、IGF-1 は、Akt、ERK1/2、および mTOR 系の p70S6 kinase および 4EBP-1 を活性化した。mTOR の抑制剤である rapamycin を添加すると、IGF-1 により活性化された Akt、ERK1/2 は影響を受けなかったが、p70S6 kinase および 4EBP-1 は抑制された。この時、MMP9 および MMP2 の発現および活性化も抑制されてい

た。更に Rapamycin は IGF-I による TIMP-1 の抑制作用を解除した。ラット培養肝細胞においてはやはり mTOR 系に依存的に DNA 合成および肝細胞機能が IGF-I によって刺激されたのに対比すると、肝星細胞においては増殖促進は同様であったが、細胞機能に関してはより複雑な反応を示すと考えられる。肝星細胞は活性化すると一般には増殖能が亢進し、TGF-beta 合成、コラーゲン産生などが促進されるとされている。また、HGF 産生は低下すると報告されている。しかし、IGF-I は、mTOR 系を介してコラーゲン分解系の促進からコラーゲン産生を抑制し、また TGF-beta の産生は不変、HGF は増加させた。IGF-I は単なる肝星細胞の活性化因子ではなく、肝線維化の治療に有用である可能性があるかと推定された。

#### 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 8 件)

・Tomiya T.

Treatment for minimal hepatic encephalopathy: Are we ghost busters? Hepatol Res, 2014, in press.

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

Induction of p53-dependent p21 limits proliferative activity of rat hepatocytes in the presence of hepatocyte growth factor.

PLoS One, 8: e78346, 2013.

・Uranbileg B, Enooku K, Soroida Y, Ohkawa R, Kudo Y, Nakagawa H, Tateishi R, Yoshida H, Shinzawa S, Moriya K, Ohtomo N, Nishikawa T, Inoue Y, Tomiya T., Koike K, Yatomi Y, Ikeda H.

High ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in hepatocellular carcinoma denotes a poor prognosis with highly-malignant potential.

Int J Cancer, 134: 2189-2198, 2014.

・Horii Y, Sakane H, Nogami S, Ohtomo N, Tomiya T., Shirataki, H.

Expression of  $\alpha$ -taxilin in the murine gastrointestinal tract: potential implication in cell proliferation.

Histochem Cell Biol, 141: 165-180, 2014.

・Kageyama Y, Ikeda H., Watanabe N, Nagamine M, Kusumoto Y, Yashiro M, Satoh Y, Shimosawa T, Shinozaki K, Tomiya T., Inoue Y, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Yokota H, Koyama T, Ishimaru K, Okamoto Y, Takuwa Y, Koike K, Yatomi Y.

Antagonism of sphingosine 1-phosphate receptor 2 causes a selective reduction of portal vein pressure in bile duct-ligated rodents.

Hepatology, 56: 1427-38, 2012.

・Horii Y, Nogami S, Kawano Y, Kaneko-Kawano T, Ohtomo N, Tomiya T., Shirataki H.

Interaction of  $\alpha$ -taxilin localized on intracellular components with the microtubule cytoskeleton.

Cell Struct Funct, 37: 111-26, 2012.

・Ikeda H., Tateishi R, Enooku K, Yoshida H, Nakagawa H, Masuzaki R, Kondo Y, Goto T, Shiina S, Kume Y, Tomiya T., Inoue Y, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Ono T, Koike K, Yatomi Y.

Prediction of hepatocellular carcinoma development by plasma ADAMTS13 in chronic hepatitis B and C.

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 20: 2204-11, 2011.

・Nakagawa H, Ikeda H., Nakamura K, Ohkawa R, Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, Watanabe N, Tejima K, Kume Y, Iwai T, Suzuki A, Tomiya T., Inoue Y, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Omata M, Igarashi K, Aoki J, Koike K, Yatomi Y.

Autotaxin as a novel serum marker of liver fibrosis.

Clin Chim Acta, 412: 1201-6, 2011.

[学会発表](計 11 件)

・Nishikawa T, Tomiya T., Ohtomo N, Inoue Y, Ikeda H., Shirataki H, Koike K.

Insulin-like growth factor I reduces collagen production by hepatic stellate cells even when their proliferative activity is stimulated.

22nd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver, Taipei, Taiwan, February 16-19 2012.

・Nishikawa T, Tomiya T, Ohtomo N, Inoue Y, Ikeda H, Shirataki H, Koike K.

Reduction of collagen production by Insulin-like growth factor I is independent of modulation of activation state in hepatic stellate cells.

63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of the Liver Diseases, Boston, Massachusetts, November 9-13 2012.

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

Effect of IGF-I and mechanisms of its action on proliferation and protein production by rat hepatocytes.

46th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Berlin, Germany, March 30-April 3 2011.

・Ohtomo N, Shirataki H, Tomiya T.

Expression of alpha-taxilin correlates with growth activity and malignant potential of hepatocellular carcinoma.

16th World Congress on Advances in Oncology and 14th international Symposium on Molecular Medicine, Rhodes Island, Greece, October 6-8 2011.

・西川尚子、富谷智明、大友夏子、井上有希子、池田均、白瀧博通、小池和彦

IGF-I reduces collagen production through induction of collagen degradation via mTOR dependent signaling pathway

第 20 回肝細胞研究会 大阪 9 月 26-27 日 2013 年

・西川尚子、富谷智明、大友夏子、井上有希子、池田均、白瀧博通、小池和彦

肝星細胞コラーゲン産生に対する IGF-I の調節作用およびその機序の検討

第 17 回日本肝臓学会大会 東京 10 月 9-12 日 2013 年

・西川尚子、富谷智明、大友夏子、井上有希子、池田均、白瀧博通、小池和彦

肝星細胞の増殖とコラーゲン産生に対する IGF-I の影響に関する検討

第 19 回肝細胞研究会 札幌 6 月 29-30 日 2012 年

・西川尚子、富谷智明、大友夏子、井上有希子、池田均、白瀧博通、小池和彦

肝星細胞におけるコラーゲン産生に対する IGF-I の直接作用

第 48 回日本肝臓学会総会 金沢 6 月 7 日-8 日 2012 年

・田上靖、富谷智明、大友夏子、西川尚子、井上有希子、池田均、白瀧博通、藤原研司、小池和彦

肝細胞に対する IGF-I の作用点

第 47 回日本肝臓学会総会 東京 6 月 2 日-3 日 2011 年

・中川勇人、池田均、増崎亮太、建石良介、吉田晴彦、渡邊尚子、富谷智明、井上有希子、西川尚子、大友夏子、田上靖、小池和彦

新たな肝線維化マーカーとしての血清 Autotaxin 抗原量

第 47 回日本肝臓学会総会 東京 6 月 2 日-3 日 2011 年

・池田均、建石良介、榎奥健一郎、吉田晴彦、中川勇人、増崎亮太、近藤祐爾、五藤忠、椎名秀一朗、富谷智明、井上有希子、西川尚子、大友夏子、田上靖、小池和彦

血中 ADAMTS13 による肝細胞癌発症予測

第 47 回日本肝臓学会総会 東京 6 月 2 日-3 日 2011 年

〔その他〕

ホームページ等

<http://gastro.m.u-tokyo.ac.jp/med/0202B3B.htm>

## 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