

## インスリン様増殖因子 (IGF)-II の組織分布の 特異性とその *in vitro* 活性

福島県立医科大学病理学第二 鈴木利光

Selective Localization of Insulin-like Growth factor  
(IGF)-II Immunoreactivity in human tissues  
and *in vitro* activity of IGF-II

Toshimitsu SUZUKI

*Second Department of Pathology Fukushima Medical College*

Insulin-like growth factor (IGF)-II immunoreactivity in human tissues was detected with use of monoclonal antibody against rat IGF-II, which crossreacts to human IGF-II. The results indicated that IGF-II immunoreactivity localized selectively in normal paraganglionic cells including carotid body, adrenal medulla and retroperitoneal paraganglion. In addition, fetal kidney of 14th gestational week revealed IGF-II immunoreactivity in limited proximal convolution to its beginning segment. Other tissues were regularly negative for the immunoreactivity. All of 29 tumors originated from this paraganglionic system harbored IGF-II immunoreactive tumor cells with high frequency, although one tumor of glomus jugulare in origin failed to immunolabelling.

IGF-II induced morphological differentiation of rat pheochromocytoma cell line PC 12 and also enhanced cell growth of human neuroblastoma cell line NB-45-nu F *in vitro*, as potent as nerve growth factor which caused same effects on these two cell lines. From these results, IGF-II might be a kind of "nerve growth factor" of human paraganglionic system.

---

Key words: IGF-II, paraganglionic cell, paraganglioma, nerve growth factor

インスリン様増殖因子-II, 旁神経節, 旁神経節腫, 神経成長因子

---

Reprints requests to: Toshimitsu SUZUKI,  
Department of Pathology, Fukushima  
Medical College, 1 Hikariga-oka,  
Fukushima-shi, 960-12, JAPAN.

別刷請求先: 〒960-12 福島市光が丘 1  
福島県立医科大学病理学第二  
鈴木利光

インスリン様増殖因子（以下 IGF）は、その名の通り、インスリンに構造・機能ともゆるやかながら類似している。そして、I と II に分けられ、I は70アミノ酸残基、II は67アミノ酸残基からなる単鎖ポリペプチドである<sup>1)</sup>。この両者は全体として62%のアミノ酸に相同性があるが<sup>2)</sup>、特にN端では31アミノ酸残基のうち22ケが同じである<sup>3)</sup>。また、IGF-II はプロインスリンのAおよびBドメインと38~48%の相同性があり<sup>2)</sup>、牛血清のエリスロトロピンとも類似している<sup>4)</sup>。

IGF-II あるいは IGF-II mRNA はヒトでは胎児腎、肝、副腎、横紋筋<sup>5)</sup>、脊髄液<sup>6)</sup>、卵胞および精囊液<sup>7)</sup>、下垂体前葉<sup>8)</sup> および成人脳<sup>9)</sup> などに証明されている。一方、ラット成体では脳に強く、肝に弱く発現している<sup>10)</sup>。ラット脳では、IGF-II mRNA は胎令14日の脳で最も高く、生後も脳の各領域ならびに脊髄にかなり発現しているとする成績<sup>11)</sup> と、ラット成体では脳軟膜と脈絡叢上皮細胞にのみ IGF-II cDNA のシグナルが検出されるにすぎないとする成績<sup>12)</sup> とがある。また、腫瘍ではヒト副腎褐色細胞腫<sup>13)</sup> およびウィルムス腫瘍<sup>13)</sup> <sup>14)</sup> で mRNA の発現が亢進している。それに応じて、褐色細胞腫では IGF-II の含有量が高いが、ウィルムス腫瘍では何故かそのような傾向がみられない<sup>13)</sup>。ヒト肝癌でも IGF-II mRNA の発現亢進の有無が調べられているが、症例毎に異なり、一定の結果は得られていない<sup>15)</sup>。

IGF-II は in vitro で各種動物（ヒトを含む）の線維芽細胞の分裂を促すことが知られている<sup>16)-19)</sup>。その他に、平滑筋、軟骨細胞、骨細胞の増殖ないし基質産生能を高めることも報告されている<sup>18)20)</sup>。

これまでの研究で、IGF-I は成長ホルモンの分泌量に依存して血中濃度が高まり、成長ホルモンの成長促進作用の主要なメディエーターとみなされている。が、IGF-II には成長ホルモン依存性がなく、in vivo でどのような役割を担っているかは全く不明であった。ただ、ラットでは胎児諸臓器でその mRNA の発現が高いこと<sup>21)</sup>、胎児の血中濃度は成体よりもはるかに高く、生後、速やかに減少すること<sup>22)</sup>、胎児線維芽細胞は in vitro で、胎盤性ラクトゲンの刺激によって IGF-II の産生が亢進すること<sup>2)</sup> などから、胎児成長の重要な因子ではないかと推測されている。ところが、ヒトでは胎児あるいは臍帯血中に IGF-II が検出されるが、妊娠中期よりも後期に高く、さらに新生児、成人になるにしたがってその値が高くなる<sup>24)25)</sup>。つまり、ラットとは逆の現象を呈し、胎児増殖因子とは考えにくい。また、つい最近

までヒトでは IGF-II の組織および細胞レベルでの局在が、有用な抗体が入手できなかったこともあり、我々が検索するまで全く不明であった。そして、その生物活性を究明するよいモデルも存在しなかったため、ヒト IGF-II の機能については断片的な知識しか得られていなかった。したがって本論文では主にヒト正常ならびに腫瘍組織における IGF-II 免疫活性の局在と in vitro での生物活性に主眼をおいて述べることにする。

**IGF-II 免疫活性の局在：**免疫細胞化学的に、ヒト正常諸組織について、IGF-II 免疫活性の局在を調べた。用いた単クローン抗体はラット IGF-II に対する抗体である<sup>26)</sup>（ラット IGF-II とヒト IGF-II はアミノ酸組成上93%の相同性がある<sup>27)</sup>）が、本抗体はヒト IGF-II とは100%の交叉反応性を示す。しかし、インスリン、プロインスリン、C-ペプチド、上皮成長因子（EGF）とは全く反応しない。ただし、ラジオイムノアッセイではヒト IGF-I と10%程度の交叉反応性を示す。したがって、念の為、IGF-I で前吸収した抗体を用いて免疫染色を行なった<sup>28)29)</sup>。

免疫染色の結果、成人では頸動脈小体主細胞、副腎髄質細胞および後腹膜旁神経節細胞のみが陽性に染色された。それ以外の臓器組織は、肝・腎・脳を含め、いずれも陰性であった。胎児では、限られた胎令、14週令の胎児腎の近位尿管管起始部の尿管管上皮に局限して陽性所見が得られたにすぎず、副腎髄質も陰性であった。なお、成熟ラットでは、蜘蛛膜上皮細胞と脈絡叢細胞にかなり多数の IGF-II 免疫活性を示す細胞が存在し、Stylianolou ら<sup>12)</sup> の成績と一致した。が、副腎髄質には稀に少数の陽性細胞が認められるにすぎなかった。

ヒト腫瘍では、頸動脈小体腫瘍4例、迷走神経小体腫瘍1例に多数の IGF-II 免疫活性を示す腫瘍細胞が認められた。しかし、頸静脈小体由来と思われる腫瘍1例には、陽性細胞が検出できなかった<sup>28)</sup>。一方、副腎褐色細胞腫18例は、良性（15例）、悪性（3例）の別なく、また、原発巣、転移巣を問わず、高頻度に陽性細胞が認められた（図1-a）。また、この中には4例の多発内分泌腺腫（Ⅱ型、Ⅲ型各1例、Ⅳ型2例）の症例も含まれるが、いずれも通常の褐色細胞腫と同様の陽性所見を呈した。副腎外の腹腔内旁神経節腫6例（後腹膜3例、膀胱2例、ツッカーカンドル器官1例）も全て多数の IGF-II 免疫活性を示す細胞を保有していた。これらの結果を一括して表1に示す。なお、免疫電子顕微鏡により IGF-II 免疫活性は、褐色細胞腫および頸動脈小体腫瘍細胞の神経分泌顆粒に一致して存在した（図1-b, c）。この他

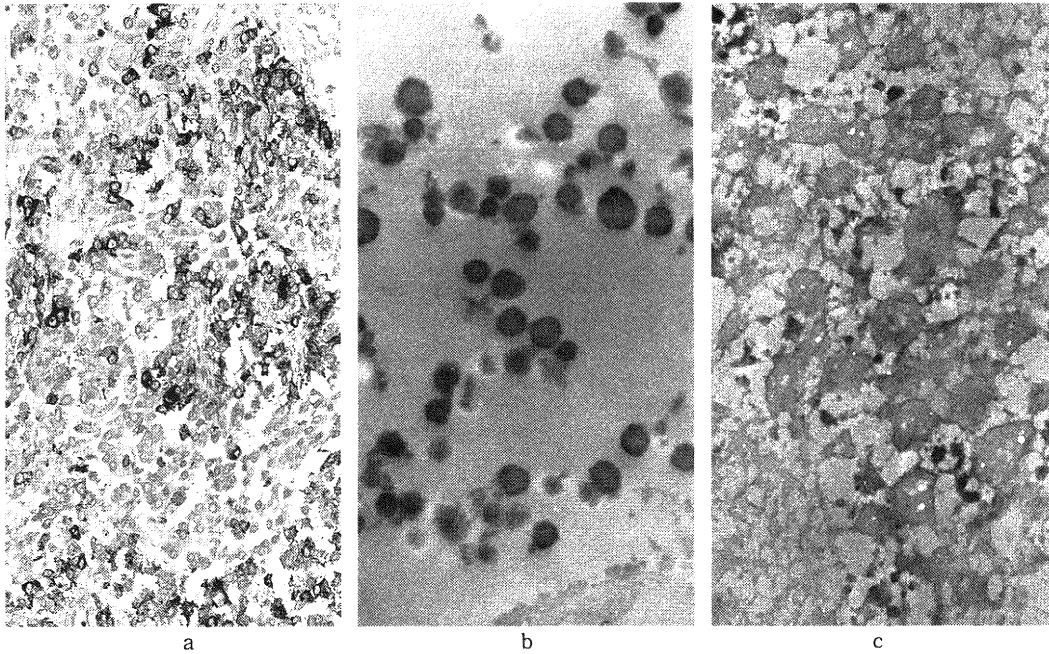


図 1 後腹膜原発悪性パラガングリオーマ：肝転移巣の IGF-II 免疫染色陽性細胞 (a) と免疫電子顕微鏡による内分泌顆粒上の特異的免疫活性 (b: 副腎褐色細胞腫, c: 頸動脈小体腫瘍)。

Table 1 Frequency of IGF-II-Immunoreactive Cells

	Positive cases (%)	Frequency of positive cells (%)
Adrenal (n=6)	6/6 (100)	27.0±18.6
Carotid body (n=2)	2/2 (100)	10%, <1%
Paraganglion (n=3)	3/3 (100)	48.9, 24.0, <1%
Pheochromocytoma (n=18)	18/18 (100)	85.8±16.5
Paraganglioma, craniocervical (n=6)	5/6 (83.0)	46.1±13.1
Paraganglioma, abdominal (n=6)	6/6 (100)	63.5±29.3

に、副腎髄質由来の神経節芽腫では3例中2例に陽性細胞を認めたが、より未熟な神経芽腫では5例中1例も陽性例はみられなかった。その他ではヒト髄膜腫10例中6例に陽性細胞が認められ、平均13%の腫瘍細胞が陽性に染色された。しかし、腎細胞癌2例、ウィルムス腫瘍2例、脾島腫瘍4例、甲状腺髄様癌5例、網膜芽腫4例(3例は培養細胞株)、メラニン非産生黒色腫2例などは全て陰性であった。

**IGF-IIの生物活性：**ヒト神経芽腫株 NB-45nuF は小児副腎原発の腫瘍に由来するが、本株は IGF-II によってその増殖が亢進した。牛胎児血清を含まない培地中でもその効果が認められた(図2)。また、本細胞株は神経成長因子 (NGF) に対しても同様の反応を示し、増殖が促進された(結果、略)。この細胞株には少数ながら IGF-II 免疫活性を示す細胞が存在するので、いわゆるオートクライン機序でその増殖が維持されているのかもしれない。一方、IGF-II はニワトリやラットの筋芽細胞の分化(筋管形成の促進)<sup>30)31)</sup> やヒト神経芽腫株 SK-SY-5Y の形態学的分化を促すことが知られている<sup>32)</sup>。ラット副腎褐色細胞腫株 PC12 は NGF によって形態学的ならびに生化学的分化を遂げる<sup>33)</sup>。この細胞株を

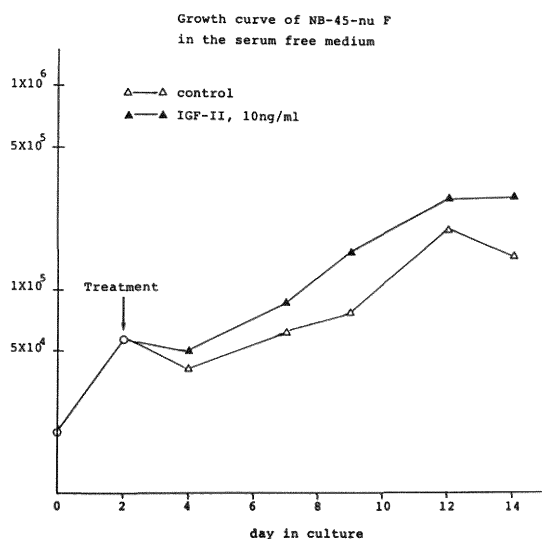


図2 IGF-II 添加培養により, NB-45nu F は50~80%増殖が促進される。

IGF-IIで処理すると, NGF 程著明ではないが, 神経突起様の突起の伸長が観察され, 形態学的分化が誘導された(図3)。これらの結果は, IGF-IIが胎児細胞のみならず, 旁神経節由来のヒトあるいはラット腫瘍細胞の増

殖ないしは分化を促進することを示している。

IGF-IIはヒト成人ではクロム親和性(副腎髄質, ツッカーカンドル器官), 非親和性(頸動脈小体)を問わず, 旁神経節系の細胞に広く分布し, それらの細胞に由来する腫瘍にもほとん例外なく存在する。しかも, 正常状態よりも腫瘍化した場合に高頻度に陽性細胞が出現する傾向にあり, おそらく腫瘍細胞自身の生存維持あるいは分裂・増殖に関与しているものと思われる。事実, IGF-IIはin vitroで, ヒト神経芽腫培養細胞株の細胞分裂を増強し, 一方, ラット褐色細胞株の形態学的分化を促進した。しかも, これらの細胞株はいずれもNGFに感受性を有し, NGFによって同様の現象が惹起される。このことは, IGF-IIがヒト旁神経節細胞のNGFである可能性を強く示唆している。

一般に, 増殖因子はそのリセプターを持つ標的細胞の増殖を促すのみでなく, 形態ならびに機能的な分化をも誘導する。それは, NGFあるいはエリスロポエチンなどでもよく知られている。したがって, IGF-IIの二面的な作用も何ら例外的なものではない。これは標的細胞が分化のどの段階にあるかによって規定されているようである。つまり, 褐色細胞腫というかなり分化した状態の“褐色細胞”から腫瘍化した細胞ではIGF-IIによって分化の方向に誘導され, 一方, 神経芽腫のように未熟

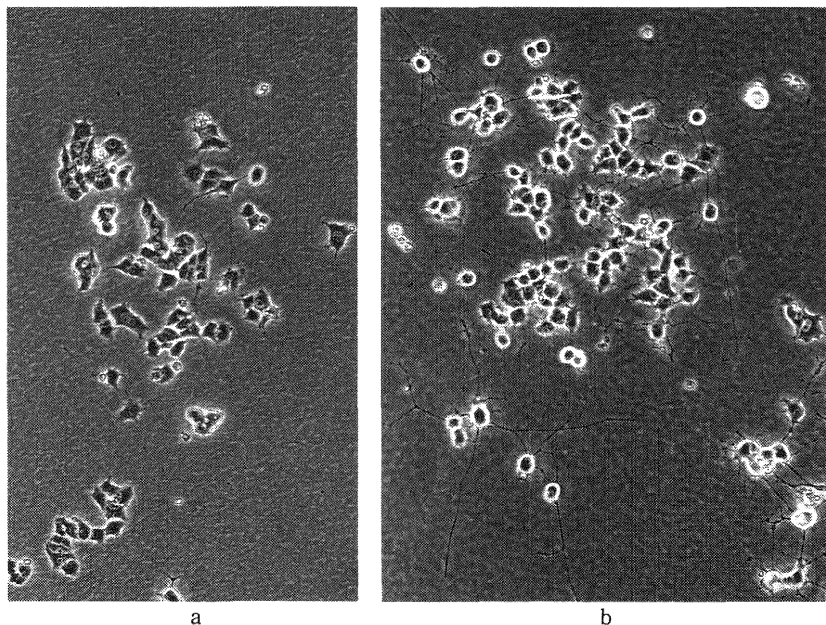


図3 IGF-II $10^{-7}$  M を添加して培養すると, PC12 細胞は突起を著明に伸ばす。処置後14日目 (b)。aは無添加対照群。

な神経芽細胞を母細胞とする腫瘍細胞では、本来分化傾向の乏しいことから細胞分裂へと導かれるものと考えられる。

神経栄養因子として現在まで広く知られ、実験に供されてきた物質は NGF であるが、その産生部位は非常に特異（雄マウス顎下腺、ジャコウネズミの唾液腺、モルモット、ウシ、ウサギなどの前立腺など<sup>34)</sup>）で、成熟した神経系をもつ成体で果して有効に働いているのかどうかかなり疑問である。それにかわり、最近塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) が、広く神経系に存在し、神経細胞の生存を維持し、発達を促進することから<sup>35)</sup>、注目されつつある。ただし、bFGF は神経細胞そのものに存在する<sup>36) 37)</sup>。一方、ラット中枢神経のグリア細胞は *in vitro* で IGF-II mRNA を発現すること<sup>11)</sup> が知られている。実際、*in vivo* で神経細胞が障害された場合、グリアが栄養因子を産生・供給する方が好都合のように思われる。勿論この両者がそれぞれ別種の神経細胞を標的として、相補って機能している可能性を否定することはできない。が、今後は、IGF-II が果して本当に旁神経節細胞ひいては中枢神経系のカテコールアミンニューロン（旁神経節細胞はカテコールアミンを合成する）の“NGF”であるか否かを解明したいと考えている。

## 参 考 文 献

- 1) Rindeknecht, E. and Humble, R.E.: The amino acid sequence of human insulin-like growth factor II and its structural homology with proinsulin. *J. Biol. Chem.*, **253**: 2769~2776, 1978.
- 2) Adams, S.O., Nissley, S.P., Handwerger, S. and Rechler, M.M.: Developmental pattern of insulin-like growth factor-I and-II synthesis and regulation in rat fibroblasts. *Nature*, **302**: 150~153, 1983.
- 3) Rindeknecht, E. and Humble, R.E.: Amino terminal sequence of two polypeptides from human serum with nonsuppressible insulin-like growth-promoting activities: Evidence for structural homology with insulin B chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 4379~4381, 1976.
- 4) Congote, L.E.: Similarities in structure and function of bovine serum erythropoietin and human insulin-like growth factor II: Two fetal erythroid cell stimulating factors. *B.B.R.C.*, **126**: 653~659, 1985.
- 5) Scott, J., Cowell, J., Robertson, M.E., Priestley, L.M., Wadey, R., Hopkins, B., Pritchard, J., Bell, G.I., Rall, L.B., Graham, D.G. and Knott, T.J.: Insulin-like growth factor-II gene expression in Wilms' tumor and embryonic tissues. *Nature*, **317**: 260~262, 1985.
- 6) Haselbacher, G. and Humbel, R.: Evidence for two species of insulin-like growth factor (IGF II and "big" IGF II) in human spinal fluid. *Endocrinology*, **110**: 1822~1824, 1982.
- 7) Ramasharma, K., Cabera, C.M. and Li, C.H.: Identification of insulin-like growth factor-II in human seminal and follicular fluids. *B.B.R.C.*, **140**: 536~542, 1986.
- 8) Haseblacher, G., Schwab, M.E., Pasi, A. and Humbel, R.E.: Insulin-like growth factor II (IGF-II) in human brain: Regional distribution of higher molecular mass forms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 2153~2157, 1985.
- 9) Carlsson-Skewir, C., Jörnval, H., Holmgren, A., Andersson, C., Bergman, T., Lundquist, G., Shögren, B. and Sara, V.R.: Isolation and characterization of variant IGF-1 as well as IGF-2 from adult human brain. *FEBS Lett.*, **201**: 46~50, 1986.
- 10) Murphy, L.J., Bell, G.I. and Friesen, H.G.: Tissue distribution of insulin-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat. *Endocrinology*, **120**: 1279~1282, 1987.
- 11) Rotwein, P., Burgess, S.K., Milbrandt, J.D. and Krause, J.M.: Differential expression of insulin-like growth factor genes in rat central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 265~269, 1988.
- 12) Stylianopoulou, F., Herbert, J., Soares, M.B. and Efstratiadis, A.: Expression of the insulin-like growth factor II gene in the choroid plexus and the leptomeninges of the adult rat central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 265~269, 1988.
- 13) Haselbacher, G., Irminger, J.-C., Zapf, J., Ziegler, W.H. and Humbel, R.E.: Insulin-like growth factor II in human adrenal pheochromocytomas and Wilms tumors; Expression at the mRNA

- and protein level. *Nature*, **317**: 258~262, 1985.
- 14) **Reeve, A.E., Eccles, M.R., Wilking, R.J., Bell, G.L. and Millow, L.J.**: Expression of insulin-like growth factor-II transcripts in Wilms' tumor. *Nature*, **317**: 258~262, 1985.
  - 15) **Su, T.-S., Liu, W.-Y., Han, S.-H., Jansen, M., Yang-Fen, T.L., P'eng, F.K. and Chou, C-K.**: Transcripts of the insulin-like growth factors I and II in human hepatoma. *Cancer Res.*, **49**: 1773~1777, 1989.
  - 16) **Rechler, M.M., Flyklund, L., Nissley, S.P., Hall, K., Podskalny, J.M., Skotter, A. and Moses, A.C.**: Purified human somatomedin A and rat multiplication stimulating activity. Mitogens for cultured fibroblasts that crossreact with the same growth peptide receptors. *Eur. J. Biochem.*, **82**: 5~12, 1978.
  - 17) **Zapf, J., Schoenle, E. and Froesch, R.**: Insulin-like growth factors I and II: Some biological actions and receptor binding characteristics of two purified constituents of nonsuppressible insulin-like activity of human serum. *Eur. J. Biochem.*, **87**: 285~296, 1978.
  - 18) **Froesch, E.R., Schmid, C., Schwander, J. and J.**: Actions of insulin-like growth factors. *Ann. Rev. Physiol.*, **47**: 443~467, 1985.
  - 19) **Conover, C.A., Rosenfeld, R.G. and Hintz, R.L.**: Insulin-like growth factor II binding and action in human fetal fibroblasts. *J. Cell. Physiol.*, **133**: 560~566, 1987.
  - 20) **Ashton, I.K. and Pocock, A.E.**: Action of multiplication-stimulating activity on <sup>3</sup>(H) thymidine incorporation in rabbit and human fetal chondrocytes in vitro. *J. Endocr.*, **99**: 93~98, 1983.
  - 21) **Brown, A.L., Graham, D.E., Nissley, S.P., Hill, D.J., Strain, A.J. and Rechler, M.M.**: Developmental regulation of insulin-like growth factor II mRNA in different rat tissues. *J. Biol. Chem.*, **261**: 13144~13150, 1986.
  - 22) **Moses, A.C., Nissley, S.P., Short, P.A., Rechler, M.M., White, R.M., Knight, A.B. and Higa, O.Z.**: Increased levels of multiplication-stimulating activity, an insulin-like growth factor, in fetal rat serum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 3649~3653, 1980.
  - 23) **Romanus, J.A., Yang, Y.W.-H., Adams, S.O., Sofair, A.N., Tseng, L.Y.-H., Nissley, S.P. and Rechler, M.M.**: Synthesis of insulin-like growth factor II (IGF-II) in fetal rat tissues: Translation of IGF-II ribonucleic acid and processing of pre-pro-IGF-II. *Endocrinology*, **122**: 709~716, 1988.
  - 24) **Bennett, A., Wilson, D.M., Liu, F., Nagashima, R., Rosenfeld, R. and Hintz, R.L.**: Levels of insulin-like growth factors I and II in human cord blood. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **57**: 609~312, 1983.
  - 25) **Ashton, I.K., Zapf, J., Einchenk, I. and Mackenzie, I.Z.**: Insulin-like growth factor (IGF) 1 and 2 in human foetal plasma and relationship to gestational age and foetal size during mid-pregnancy. *Acta Endocrinol.*, **110**: 558~563, 1985.
  - 26) **Tanaka, H., Asami, O., Hayano, T., Sasaki, I., Yoshitake, Y. and Nishikawa, K.**: Identification of a family of insulin-like growth factor II secreted by cultured rat epithelial cell line, 18, 54-SF: Application of a monoclonal antibody. *Endocrinology*, **124**: 870~877, 1989.
  - 27) **Marquardt, H., Todaro, J., Henderson, L.E. and Oroszlan, S.**: Purification and primary structure of a polypeptide with multiplication-stimulating activity from rat liver cell cultures. Homology with human insulin-like growth factor II. *J. Biol. Chem.* **256**: 6859~6865, 1981.
  - 28) **Suzuki, T., Iwafuchi, M., Takahashi, H., Ikuta, F., Nishikawa, K., Tanaka, H. and Yanaihara, N.**: Immunocytochemical demonstration of IGF-II-like immunoreactivity in human paraganglioma of the craniocervical region. *Virchows Archiv. A Pathol. Anat.*, **414**: 515~521, 1989.
  - 29) **Suzuki, T., Iwafuchi, M., Yanaihara, C., Hatanaka, H., Tao, Z., Yanaihara, N., Tanaka, H. and Nishikawa, K.**: IGF-II-like immunoreactivity in human tissues, neuroendocrine tumors, and PC12 cells. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **7**: S21~S27, 1989.
  - 30) **Schmidt, C.H., Steiner, T.H. and Froesch, E.R.**:

- Preferential enhancement of myoblast differentiation by insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) in primary cultures of chicken embryonic cells. *FEBS Lett.*, **161**: 117~129, 1983.
- 31) **Ewton, D.Z., Erwin, G.B., Pegg, A.E. and Florini, J.R.**: The role of polyamines in somatomedin-stimulated differentiation of L6 myoblasts. *J. Cell. Physiol.*, **120**: 263~270, 1984.
  - 32) **Recio-Pinto, E. and Ishii, D.N.**: Effect of insulin, insulin-like growth factor-II and nerve growth factor on neurite outgrowth in cultured human neuroblastoma cells. *Brain Res.*, **302**: 323~334, 1984.
  - 33) **Greene, L.A. and Tischler, A.S.**: Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 2424~2428, 1976.
  - 34) **鈴木利光**: NGF (nerve growth factor), 新潟医学会雑誌, **103**: 337~345, 1989.
  - 35) **Ferrari, G., Minozzi, M.C., Toffano, G., Leon, A. and Skaper, S.D.**: Basic fibroblast growth factor promotes the survival and development of mesencephalic neurons in culture. *Develop. Biol.*, **133**: 140~147, 1989.
  - 36) **Pettmann, B., Labourdette, G., Weibel, M. and Sensenbrenner, M.**: The brain fibroblast growth factor (FGF) is localized in neurons. *Neurosci. Lett.*, **68**: 175~180, 1986.
  - 37) **Janet, T., Grothe, C., Pettmann, B., Unsicker, K. and Sensenbrenner, M.**: Immunocytochemical demonstration of fibroblast growth factor in cultured chick and rat neurons. *J. Neurosci. Res.*, **19**: 195~201, 1988.
-