〔東女医大誌　第67巻　第1・2号〕
〔頁　1～6　平成9年2月〕

原　著

IGF-Ⅱ産生腫瘍中のIGF-Ⅱの血中存在様式に関する検討

東京女子医科大学　第二内科学（主任：出村　博教授）

福田いずみ・肥塚　直美・大久保由美子
安本久美子・高野加寿恵・出村　博

（受付　平成8年9月11日）

Circulating Forms of IGF-Ⅱ in IGF-Ⅱ Producing Tumor

Izumi FUKUDA, Naomi HIZUKA, Yumiko OKUBO, Kumiko YASUMOTO,
Kazue TAKANO and Hiroshi DEMURA
Department of Medicine, Institute of Clinical Endocrinology,
Tokyo Women's Medical College

Extrapancreatic tumor associated with hypoglycemia (non-islet-cell tumor hypoglycemia: NICTH) is one of major causes of fasting hypoglycemia. In some patients with NICTH, insulin-like growth factor Ⅱ (IGF-Ⅱ) produced by tumors is thought to be a hypoglycemic agent. However, the mechanisms of hypoglycemia is still unknown, because serum IGF-Ⅱ levels are not always elevated in patients with NICTH. One of the possible mechanisms of hypoglycemia is an increase of free form of IGF-Ⅱ in serum. In the present study, we investigated whether free form of IGF-Ⅱ in serum is increased using gel filtration method. Furthermore, heterogeneity of IGF-Ⅱ was studied by Western immunoblot. When normal serum was gel filtered at pH 7.4, 150 kDa and 40 kDa complexes of IGF-Ⅱ with IGF binding proteins (IGFBPs) were found. In patients with NICTH, the 150 kDa and 40 kDa complexes were not found but a peak of IGF-Ⅱ with IGFBPs eluted as 60～80 kDa was found. In this fraction, four IGFBPs (IGFBP-1, -2, -3, -4) were found by Western ligand blot. A small peak of IGF-Ⅱ eluted in approximately 17 kDa was found in sera from six of ten patients with NICTH. In the peak fraction (17 kDa), IGFBPs were not found by Western ligand blot and big form of IGF-Ⅱ (11～18 kDa) was observed by Western immunoblot. These data indicated that free form of big IGF-Ⅱ was increased in sera from these patients. Furthermore, IGF-Ⅱ eluted as 60～80 kDa complex in patients with NICTH was mainly big form of IGF-Ⅱ. These data suggest that big IGF-Ⅱ binds IGFBPs, and the big IGF-Ⅱ with IGFBP-3 dose not bind acid labile subunit, resulting in decreased 150 kDa complex formation. An increase of free form of big IGF-Ⅱ and decreased 150 kDa complex formation in sera from patients with NICTH, might be related to hypoglycemia.

緒　言

我が国において空腹時低血糖症をきたす原因疾患として最も頻度の高い疾患はインスリノーマであるが，次いで2番目に多いのが膵外腫瘍による低血糖（non-islet-cell tumor hypoglycemia：NICTH）である1)．一部のNICTH症例では，腫瘍からインスリン様成長因子（insulin-like growth factorⅡ：IGF-Ⅱ）を産生，分泌すること，腫瘍組織中のIGF-Ⅱ mRNAが増加していることが証明されている2)3)．IGF-Ⅱは分子量が7.5kDaのポリペプチドであり，その構造はインスリンに類似し，in vitro，in vivoにおいて血糖降下作用

を有するため[4]腫瘍から産生，分泌されたIGF-IIがNICTHにおける低血糖の原因物質であると推測されている．しかしながらNICTH症例では血中IGF-II値が必ずしも高値を呈するわけではなく[5)6]，本症における低血糖の発症機序は解明されていない．

1988年にDaughadayらは1例の低血糖を呈する平滑筋肉腫で血中および腫瘍抽出物中に大分子量IGF-IIが存在することを初めて報告した[3]．以後，NICTHの多くの例で同様に，血中に大分子量IGF-IIの存在が確認されている[7)~10]．NICTHでは，手術で腫瘍を摘出すると血中の大分子量IGF-IIは消失することより[10]，大分子量IGF-IIの存在と低血糖との関連が示唆されている．しかしながら大分子量IGF-IIの血中存在様式は明らかではない．

一方IGFの生物活性はIGF結合蛋白（IGF-binding proteins : IGFBPs）によって調節されており，現在6種のIGFBPsの存在が知られている[11]．NICTHにおいては血中IGFBP-2が増加するなどIGFBPsのパターンが変化し，腫瘍摘出術後に正常化することが報告されている[10)12)~14]．低血糖をきたすその他のメカニズムとして血中における遊離型IGF-IIが増加している可能性もある．今回，著者らはNICTHにおける低血糖の機序を明らかにするためにNICTHにおけるIGF-IIの血中存在様式とIGFBPsについて検討を行なった．

対象および方法

1. 対象

10例のNICTH症例の血中IGFs，IGFBPsについて検討した．各症例の臨床成績を表に示す．

2. 方法

血中IGFs，IGFBPsの検討には血清を用い，血清は測定まで−20°Cで保存した．また対照として健常成人3例の血清を用いた．

1) ペプチド

IGF-I，IGF-IIは遺伝子工学により作製されたヒトIGF-I（rhIGF-I，藤沢薬品工業より提供）およびヒトIGF-II（rhIGF-II，Eli-Lilly社より提供）を使用した．IGF-I，IGF-IIのヨード化はクロラミンT法で行ないspecific activityは各々5.2～7.4，4.4～7.4MBq/μlであった．

2) 中性条件下での血中IGF-IIのゲル濾過法

血清0.25mlをSephacryl S-200カラム（1.5×75cm）にapplyし，4°Cで0.15M NaCl含有0.1M燐酸緩衝液（pH 7.4）で溶出した．0.9mlずつ分画採取し，凍結乾燥後，各分画を酸エタノールで抽出し[15]，トリス塩基で中和してIGF-II濃度をradioimmunoassay（RIA）にて測定した．

3) IGFsのRIA

IGF-I，-IIは血清を酸エタノールで抽出後，既報のRIA法にて測定した[16)17]．本測定系における血中IGF-I，-IIの正常範囲は各々88～240，374～804 ng/mlである．

4) IGF-IIのSep-Pak抽出法

ゲル濾過分画中の150，60～80，17kDaに相当する分画を集め，凍結乾燥後，Sep-Pak法にて抽出した[18]．すなわちSep-Pak C_{18} Cartridgeをイソプロパノール5ml，メタノール5ml，4％酢酸10mlで平衡化し0.5M HCl 5mlにて処理したゲル濾過分画をapplyした．Cartridgeは4％酢酸10mlで洗浄しエタノール2mlで溶出した．溶出液はSpeed-Vac Concentrationで乾固後，Laemmli's sample buffer[19]で溶解し，IGF-IIのWestern immunoblot法に用いた．

5) IGF-IIのWestern immunoblot法

ゲル濾過分画のうち健常成人については150 kDa（fraction no. : fr. no. 51～70），17kDa（fr. no. 81～100）に相当する分画，NICTH症例については60～80kDa（fr. no. 56～80），17kDa（fr. no. 81～100）に相当する分画を集め，Sep-Pak法にて抽出後，分画中のIGF-IIの分子量をWestern immunoblot法にて検討した．すなわち検体を非還元条件下で16％SDS-polyacrylamideゲルにて電気泳動を行なった後，蛋白をニトロセルロース膜に転写した．膜は5％（w/v）スキムミルクでblockし，抗IGF-II抗体（天野製薬社製）とインキュベートした．膜を十分洗浄後horse radish peroxidase（HRP）-結合抗マウスIgGとインキュベートした．最後にIGF-II-抗IGF-II抗体複合体をenhanced chemiluminescence（ECL）法

(Amersham 社製）にて検出した．

6）IGFBPs の検討

NICTH 症例および健常成人の血清をゲル濾過した分画のうち150，60～80，40，17kDa に相当する分画（各々fr.no. 59，69，73，89）における IGFBPs につき Western ligand blot 法にて検討した．Western ligand blot 法の検討には各分画液より80μl を apply した．

結　果

1．血中の IGF-Ⅰ，-Ⅱ 値

10例の NICTH 症例の血中 IGF-Ⅰ，-Ⅱ 値を表に示す．血中 IGF-Ⅱ 値は10例中７例で軽度上昇していた．しかしながら３例（#1，9，10）では，IGF-Ⅱ 値は正常範囲内であった．一方，血中 IGF-Ⅰ 値は全症例で抑制されていた．

2．血中 IGF-Ⅱ の中性条件下でのゲル濾過パターンおよび IGFBPs の分布

NICTH における IGF-Ⅱ の血中存在様式の検討のために血清を中性条件下でゲル濾過した（図）．正常血清をゲル濾過すると150kDa と40 kDa の部位に IGF-Ⅱ の免疫活性が２峰性のピークとして認められた．しかしながら10例の NICTH では150，40kDa の部位に IGF-Ⅱ の免疫活性は認められず，その中間の部位に60～80kDa（fr. no. 56～80）の単峰性のピークが認められた（図）．これらの症例では本来の分子量7.5kDa の遊離型 IGF-Ⅱ の増加は認められなかった．健常成人の血清では総 IGF-Ⅱ 免疫活性の1.7～3.3%が17kDa の部位（fr. no. 81～100）に溶出したのみであったが，NICTH 症例では検討した10例中６例（#1，4～8）で，総 IGF-Ⅱ 免疫活性の10%以上が17kDa の分画に溶出した（表）．

次に Western ligand blot 法にてゲル濾過分画中の150，60～80，40，17kDa に相当する分画の IGFBPs の分布を検討した．NICTH，健常成人いずれにおいても150，60～80，40kDa に相当する分画中に IGFBPs-1～-4を認めた（図）．健常成人では IGFBP-3は主として150kDa 分画に認められたが，NICTH 症例では150kDa 分画のみではなく60～80kDa 分画にも検出された．一方ゲル濾過で17kDa に相当する分画中には７日間の exposure にもかかわらず IGFBPs は検出されなかった．

3．IGF-Ⅱ の分子量の検討

ゲル濾過分画中，健常成人血清では150，17kDa に相当する分画，NICTH 血清では60～80，17kDa に相当する分画に溶出した IGF-Ⅱ の分子量につき Western immunoblot 法にて検討した．健常成人血清では150kDa 分画に分子量7.5kDa の本来の IGF-Ⅱ を認めたものの，17kDa 分画には IGF-Ⅱ は検出されなかった．NICTH 症例の血清では60～80，17kDa の分画両方に大分子量 IGF-Ⅱ（11～18kDa）が検出された（図）．

考　察

1988年に Daughaday らが１例の低血糖を呈する平滑筋肉腫から得た腫瘍組織が大分子量 IGF-

表　低血糖を伴った膵外腫瘍10例の臨床データ

症例	性	年齢	診　断	血中 IGF-Ⅱ (ng/ml)	血中 IGF-Ⅰ (ng/ml)	遊離型大分子量 IGF-Ⅱ (%)*
1	M	68	Gastric cancer	600	18	15.6
2	M	56	Mesothelioma	1,492	45	9.9
3	M	67	Fibrosarcoma of the liver	991	<22	5.8
4	F	25	Renal cancer	1,014	<22	20.9
5	F	45	Retroperitoneal tumor	971	36	15.6
6	F	26	Breast tumor	1,118	68	12.1
7	M	81	Prostatic cancer	1,030	<22	42.4
8	F	82	Epitheloid leiomyosarcoma	1,043	<22	11.5
9	F	72	Hepatoma	683	13	3.6
10	F	80	Liposarcoma	804	30	5.3

正常範囲：血中 IGF-Ⅰ：88～240 ng/ml，IGF-Ⅱ：374～804 ng/ml，

*：([17kDa 分画（fr. no. 81～100）中の IGF-Ⅱ量]／[IGF-Ⅱの総量（fr. no. 56～100]）×100（%）．

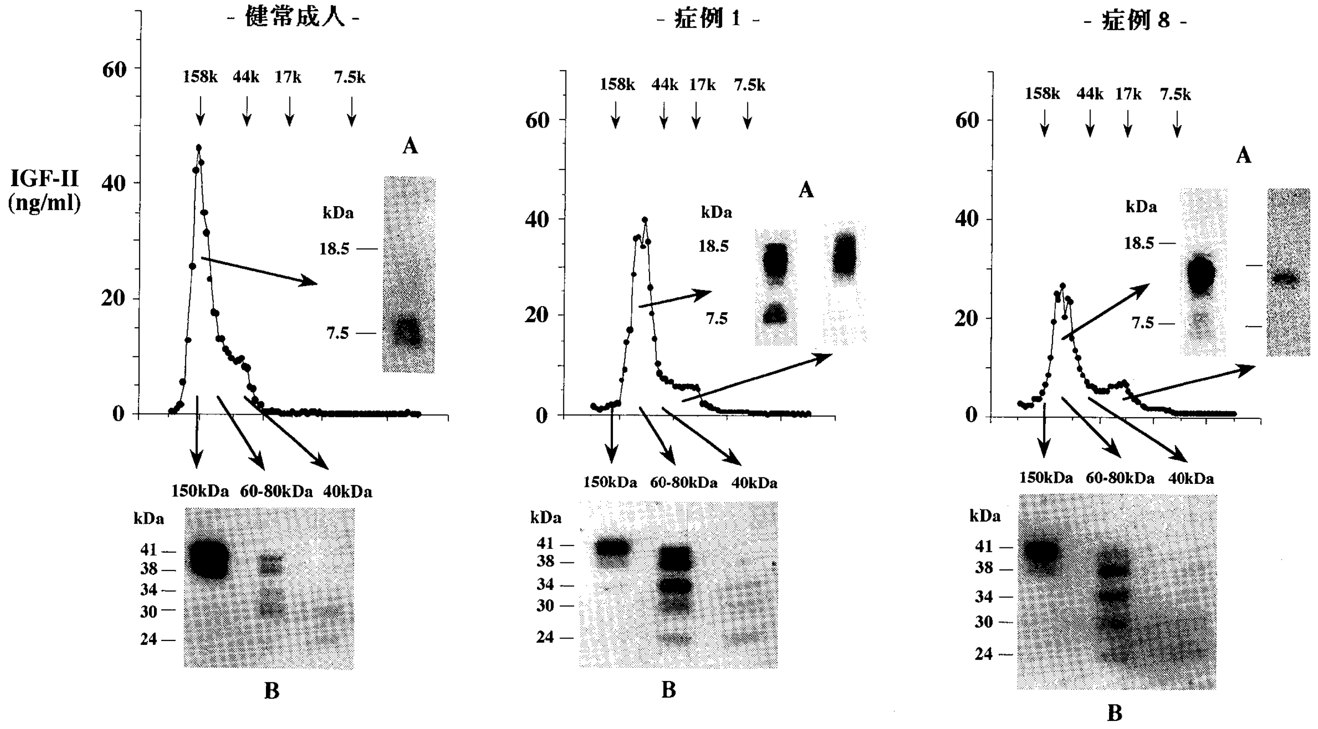

図　健常成人および NICTH 血清（#1, 8）における IGF-Ⅱ の血中存在様式
グラフは血清を Sephacryl S-200（pH 7.4）を用いてゲル濾過した時の IGF-Ⅱ の溶出パターン．矢印左より bovine gamma globulin (158kDa)，chicken ovalbumin (44kDa)，myoglobin (17kDa)，IGF-Ⅱ（7.5kDa）の溶出部位を示す．
A：健常成人における7.5kDa 分画中（fr. no. 51〜70），NICTH 症例（#1, 8）における60〜80kDa 分画中（fr. no. 56〜80），17kDa 分画中（fr. no. 81〜100）の IGF-Ⅱ の Western immunoblot.
B：健常成人と NICTH 症例（#1, 8）における150（fr. no. 59），60〜80（fr. no. 69），40（fr. no. 73）kDa のゲル濾過分画中の IGFBPs の Western ligand blot.
41/38, 34, 30, 24kDa の部位に検出されたバンドは各々IGFBP-3, -2, -1, -6. と-4に匹敵する．

Ⅱを産生，分泌していることを報告3)して以来，IGF-Ⅱ産生 NICTH の存在が明らかとなり，腫瘍自体が産生する IGF-Ⅱ と低血糖との関与が推測されている．しかし IGF-Ⅱ 産生 NICTH 症例での低血糖の発現機構はいまだ明らかではない．低血糖をきたし得る一因として，IGF-Ⅱ 産生腫瘍症例において血中遊離型 IGF-Ⅱ が増加している可能性が考えられる．

この点を検討するために，中性条件下で NICTH 症例の血清を Sephacryl S-200カラムを用いてゲル濾過した．その結果10例中 6 例の NICTH 血清で，17kDa の部位に IGF-Ⅱ の小さなピークが認められた．このピークの分画における IGF-Ⅱ の分子量を Western immunoblot 法にて検討すると，大分子量 IGF-Ⅱ が検出され，一方 Western ligand blot 法ではこの分画中に IGFBPs は検出されなかった．これらの成績から NICTH では血中に遊離型大分子量 IGF-Ⅱ が増加している可能性が示唆された．このように血中に遊離型大分子量 IGF-Ⅱ が増加することが NICTH における低血糖発現の一因となっている可能性がある．

次に NICTH における IGFBPs の変化について検討した．健常成人では血中 IGFs の大部分は150kDa，また一部は約40kDa のサイズに相当する結合型 IGF として存在することが明らかとなっている20)．

150kDa 複合体は分子量7.5kDa の IGF が IGFBP-3と直接結合し，さらにこの IGF-IGFBP-3複合体が分子量約84kDa の acid labile subunit (ALS) と結合した三量体である21)．しかしながら今回，NICTH 症例の血清を中性条件下で Sephacryl S-200にてゲル濾過すると，全例において150，40kDaのIGF-II-IGFBP複合体は認められず，60～80kDaのIGF-II-IGFBP複合体のみが検出された．この60～80kDaの部位に溶出したIGF-IIの分子量をWestern immunoblot法で検討したところ，ほとんどのIGF-IIは大分子量IGF-IIであった．またNICTH症例では健常人と異なり，ゲル濾過における150kDa複合体の溶出部位に比べ60～80kDa複合体の溶出部位におけるIGFBP-3が増加していた．以上の結果よりNICTHでは150kDaのIGF-II-IGFBP複合体の形成不全が生じ，大分子量IGF-IIがIGFBP-3と，分子量の小さい二量体を形成して血中に存在していることが推測される．

近年，ZapfらはNICTH症例において血中大分子量IGF-IIが分子量約50kDaの複合体を形成しており，この50kDa分画中のIGFBP-2と-3が増加していることを報告した$^{8)}$．今回著者らはIGF-IIのWestern immunoblot法およびIGFBPsのWestern ligand blot法を用いてZapfらの成績と同様の結果を得た．

BaxterらはNICTH症例での遊離型ALSは外因性のIGFBP-3-IGF-I複合体と結合する能力を有することを報告しており，NICTHにおいてALS自体の異常が150kDa複合体の形成不全の原因となっている可能性は少ないものと考えられる$^{14)}$．

今回の結果より，大分子量IGF-II-IGFBP-3複合体は分子量7.5kDaのIGF-II-IGFBP-3複合体と異なりALSと結合し得ない可能性も考えられる．IGF-IGFBPsの二量体は，分子量が150kDa複合体に比較して小さく，毛細血管壁を通過し得ることより$^{22)}$，NICTH血中に存在する大分子量IGF-II-IGFBP複合体が血中から標的細胞へ容易に到達し，NICTH症例における生体内でのIGF-IIの生物学的活性を増強している可能性も考えられる．

結　語

10例のIGF-II産生NICTHにおけるIGF-IIの血中存在様式について検討した．

① 10例中6例のNICTHにて血中遊離型大分子量IGF-IIの増加を認めた．

② 全例においてゲル濾過法では血中に分子量150kDaのIGF-IGFBP複合体は検出されなかった．

③ 血中大分子量IGF-IIがIGFBPsと結合し分子量60～80kDaの小分子結合体を形成しているNICTH症例を認めた．

以上の結果よりIGF-II産生NICTHでは血中遊離型IGF-IIの増加と150kDa複合体の減少が低血糖発現に関与している可能性がある．

本研究の一部は岡本糸枝学術研究助成金，文部省科学研究費奨励研究(No. 07770842)，同一般研究C(No. 06671058, 06671059)，成長科学協会研究助成金により行なわれた．

文　献

1) **Takayama-Hasumi S, Eguchi Y, Satoh A et al:** Insulin autoimmune syndrome is the third leading cause of spontaneous hypoglycemic attacks in Japan. Diabetes Res Clin Practice **10**：211-214, 1990

2) **Daughaday WH:** Autocrine, paracrine and endocrine manifestation of insulin-like growth factor secretion by tumors. *In* Modern Concepts of Insulin-Like Growth Factors (Spencer EM ed) pp557-565, Elsevier Science Publishing Co, New York (1991)

3) **Daughaday WH, Emanuele MA, Brooks MH et al:** Synthesis and secretion of insulin-like growth factor II by a leiomyosarcoma with associated hypoglycemia. N Engl J Med **319**：1434-1440, 1988

4) **Zapf J, Hauri C, Waldvogel M et al:** Acute metabolic effects and half-lives of intravenously administered insulin like growth factors I and II in normal and hypophysectomized rats. J Clin Invest **77**：1768-1775, 1986

5) **Zapf J, Walter H, Froesch ER:** Radioimmunological determination of insulin-like growth factors I and II in normal subjects and in patients with growth disorders and extrapancreatic tumor hypoglycemia. J Clin Invest **68**：1321-1330, 1981

6) **Widmer U, Zapf J, Froesch ER:** Is extrapancreatic tumor hypoglycemia associated with elevated levels of insulin-like growth factor II? J Clin Endocrinol Metab **55**：833-839, 1982

7) **Ron D, Powers AC, Pandian MR et al:**

Increased insulin-like growth factor II production and consequent suppression of growth hormone secretion; a dual mechanism for tumor-induced hypoglycemia. J Clin Endocrinol Metab 68 : 701-706, 1989

8) **Zapf J, Futo E, Peter M et al :** Can "big" insulin-like grwoth factor II in serum of tumor patients account for the development of extrapancreatic tumor hypoglycemia? J Clin Invest 90 : 2574-2584, 1992

9) **Enjoh T, Hizuka N, Perdue JF et al :** Characterization of new monoclonal antibodies to human insulin-like growth factor-II and their application in Western immunoblot analysis. J Clin Endocrinol Metab 77 : 510-517, 1993

10) **Fukuda I, Hizuka N, Takano K et al :** Characterization of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF binding proteins in patients with non-islet-cell tumor hypoglycemia. Endocr J 40 : 111-119, 1993

11) **Shimasaki S, Ling N :** Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1,-2,-3, -4,-5 and -6). Prog Growth Factor Res 3 : 243-266, 1991

12) **Zapf J, Schmid C, Guler HP et al :** Regulation of binding proteins for insulin-like growth factors (IGF) in humans. J Clin Invest 86 : 952-961, 1990

13) **Daughaday WH, Kapadia M :** Significance of abnormal serum binding of insulin-like growth factor II in the development of hypoglycemia in patients with non-islet-cell tumors. Proc Natl Acad Sci USA 86 : 6778-6782, 1989

14) **Baxter RC, Daughaday WH :** Impaired formation of the ternary insulin-like growth factor-binding protein complex in patients with hypoglycemia due to nonislet cell tumors. J Clin Endocrinol Metab 73 : 696-702, 1991

15) **Daughaday WH, Mariz IK, Blethen SL :** Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites: A comparison of radioreceptorassay and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol-extracted serum. J Clin Endocrinol Metab 51 : 781-788, 1980

16) **Miyakawa M, Hizuka N, Takano K et al :** Radioimmunoassay for insulin-like growth factor I using biosynthetic IGF-I. Endocrinol Jpn 33 : 795-801, 1986

17) **Asakawa K, Hizuka N, Takano K et al :** Radioimmunoassay for insulin-like growth factor II. Endocrinol Jpn 37 : 607-614, 1990

18) **Daughaday WH, Kapadia M, Mariz IK :** Serum somatomedin binding proteins : Physiologic significance and interference in radioligand assay. J Lab Clin Med 109 : 355-363, 1987

19) **Hossenlopp P, Seurin D, Segovia-Quinson B et al :** Analysis of serum insulin-like growth factor binding proteins using western blotting : Use of the method for titration of the binding proteins and competitive binding studies. Anal Biochem 154 : 138-143, 1986

20) **肥塚直美：**ソマトメジン．「成長ホルモン・GRF・IGF-I」(鎮目和夫 編)pp157-201，朝倉出版，東京 (1989)

21) **Baxter RC, Martin JL :** Structure of the Mr. 140,000 growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein complex : Determination by reconstitution. Proc Natl Acad Sci USA 86 : 6898-6902, 1989

22) **Bar RS, Boes M, Clemmons DR et al :** Insulin differentially alters transcapillary movement of intravascular IGFBP-1, IGFBP-2 and endothelial cell IGF binding proteins in rat heart. Endocrinology 127 : 497-499, 1990