

# ヒト末梢血細胞におけるインスリン様成長因子I受容体の調節と機能的役割

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高桑, 聖 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9288">http://hdl.handle.net/2297/9288</a>

## ヒト末梢血細胞におけるインスリン様成長因子 I 受容体の調節と機能的役割

金沢大学医学部医学科小児科学講座 (主任: 小泉晶一教授)

高 桑 聖

インスリン様成長因子 I (insulin-like growth factor-I, IGF-I) 受容体は末梢血細胞に存在しているが, その存在意義は不明の点が多い. 本研究において, ヒト IGF-I 受容体抗体  $\alpha$ IR3 による免疫蛍光染色法により, 健常成人末梢血, 臍帯血, および成長ホルモン欠損症の成人と成長ホルモン治療前後の小児の末梢血の細胞における IGF-I 受容体の発現と, 逆転写 PCR 法によりリンパ球と顆粒球の IGF-I 受容体 mRNA の発現を解析した. また培養リンパ球における IGF-I 受容体の発現調節と, IGF-I のリンパ球や好中球機能に対する作用について検討した. 成人末梢血細胞において IGF-I 受容体はすべての細胞分画に存在し, 特に顆粒球と単球に強い発現がみられた. リンパ球分画における IGF-I 受容体は CD4 陽性細胞に強い発現, CD20 陽性細胞に弱い発現, CD8 陽性細胞と CD16 陽性細胞にその中間の発現を示した. また IGF-I 受容体は CD45RO (メモリー細胞) や HLA-DR 陽性細胞に弱い発現であった. 臍帯血の総リンパ球や顆粒球の IGF-I 受容体と IGF-I 受容体 mRNA の発現は健常成人末梢血細胞より強かったが, リンパ球分画において CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞では有意差はみられなかった. 成長ホルモン欠損症成人の末梢血細胞における IGF-I 受容体の発現は, CD20 陽性細胞で健常成人よりも強かったが, 他の末梢血細胞では有意差がみられなかった. 同一成長ホルモン欠損症小児の成長ホルモン治療前後の縦断的検討では, 治療前と比べ IGF-I 血中濃度の上昇に伴い IGF-I 受容体と IGF-I 受容体 mRNA の発現が減少した. 培養リンパ球の IGF-I 受容体と IGF-I 受容体 mRNA の発現は, 培養中の IGF-I の濃度や時間依存性に減少した. また培養リンパ球はフィトヘマグルチニン (phytohemagglutinin, PHA) やインターロイキン-2 (interleukin-2, IL-2) のリンパ球刺激因子により, IGF-I 受容体と IGF-I 受容体 mRNA の発現は増加した. IGF-I は培養リンパ球の幼若反応と IgG 産生を増強し, CD4 陽性細胞の IL-2 受容体  $\alpha$  鎖陽性率を増加させ, 一方で IGF-I はナチュラル・キラー (natural killer, NK) 細胞活性を低下させた. さらに IGF-I は好中球の  $H_2O_2$  産生を増強したが, 食食能に影響を与えなかった. 以上より, 1) IGF-I 受容体は広くヒト末梢血細胞に存在し, IGF-I 受容体は IGF-I 血中濃度のみならず, 特にリンパ球において, 細胞の活性化状態や各細胞分画に依存した発現を示すこと, および, 2) IGF-I は多様なリンパ球機能や好中球機能に対する調節を介して, 免疫機能に関与している可能性が示唆された.

**Key words** insulin-like growth factor-I (IGF-I), human peripheral blood cells, IGF-I receptor regulation, immune systems

ソマトメジン C は成長ホルモンの骨に対する作用を仲介する骨成長因子<sup>1)</sup>として知られている. しかしその作用は単なる骨成長因子だけではなく, インスリンに類似した構造とインスリン様の血糖降下作用を持つ<sup>2)</sup>ことから, インスリン様成長因子 I (insulin-like growth factor-I, IGF-I)<sup>3)</sup>と呼ばれ, 細胞増殖因子として種々の細胞増殖に関連した作用<sup>4)</sup>が知られるようになった. 諸家の研究により, IGF-I の特異受容体があらゆる細胞上に存在していることが判明してきており, 末梢血細胞においても特に赤血球やリンパ球における IGF-I 受容体の報告<sup>5-7)</sup>がみられている. IGF-I は生体外において末梢血細胞に対して血球増殖<sup>8,9)</sup>や様々な免疫担当細胞の機能を増強する<sup>10-12)</sup>とした報告が散見されているが, 統一された見解は未だなされていない. さらにヒトにおける研究報告は乏しく, 末梢血細胞の IGF-I 受容体の調節機構や存在意義などは不明の点が多い. このため本研究に

において, ヒトにおける末梢血細胞分画の IGF-I 受容体の発現を健常成人, 臍帯血, 成長ホルモン欠損症において比較検討し, また生体外においてヒトリンパ球における IGF-I 受容体の発現および, IGF-I のリンパ球, 好中球に対する作用について検討した. これらの結果よりヒト末梢血細胞における IGF-I 受容体調節について考察を加えた.

### 対象および方法

#### 1. 対 象

ヒト末梢血とヒト臍帯血を用いた. ヒト末梢血は, 平均的身長の健常成人と, 金沢大学医学部附属病院小児科外来に通院している厚生省診断基準を満たした成長ホルモン欠損症の患者で, 成長ホルモン治療終了後1年以上経過した成人6名と, 成長ホルモン治療を開始する小児2名の成長ホルモン治療前と治

平成8年11月28日受付, 平成9年1月29日受理

Abbreviations: bp, base pair; BSA, bovine serum albumin; DIG, digoxigenin; dNTP, deoxyribonucleotide triphosphate; FCS, fetal calf serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; IGF, insulin-like growth factor; IL-2, interleukin-2; NK, natural killer; PBS, phosphate-buffered saline; PE, phycoerythrin; PerCP, perdinin chorophyll protein; PHA,

療1ヶ月後とでそれぞれ採取した。ヒト臍帯血は、金沢大学医学部附属病院分娩部に母体に合併症のない満期正常分娩で妊娠週数相当体重児より、母親の了解を得て採取し、研究に供した。

## II. 方 法

### 1. IGF-I 血中濃度の測定

各検体より血清を分離し、測定まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。ソマトメジン'栄研'II (栄研化学, 東京) キットを用いて IGF-I 濃度を一括して金沢大学臨床検査学教室にて測定した。

### 2. フローサイトメトリーによる IGF-I 受容体の解析

Kooijman<sup>ら</sup>の方法を一部変更し以下のように行なった。末梢血および臍帯血の全血  $50\mu\text{l}$  中に一次抗体としてマウス抗ヒト IGF-I 受容体 IgG 抗体  $\alpha\text{IR3}$  (Oncogene Science Inc., Uniondale, USA)  $2\mu\text{l}$  を加え  $4^{\circ}\text{C}$  で15分間反応させた。一次抗体の陰性対照として等濃度の非特異的マウス IgG (DAKO, Copenhagen, Denmark) を使用した。赤血球解析以外は溶血用緩衝液 ( $155\text{mM NH}_4\text{Cl}$ ,  $10\text{mM KHCO}_3$ ,  $0.1\text{mM EDTA-2Na}$ ) を加え十分に溶血させた後、洗浄緩衝液 [1% 非働化牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS) (Nipro, 大阪),  $0.02\% \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ,  $\text{pH } 7.3$  リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS)] で2回洗浄した。赤血球解析の場合は溶血させずに2回洗浄した。1% 牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), 20% 健常ヒト血清を加えた  $\text{pH } 7.3$  イーグル MEM 培地 (日本製薬, 東京)  $50\mu\text{l}$  に再浮遊し、二次抗体としてビオチン化ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Amersham, Buckinghamshire, England)  $1\mu\text{l}$  を加え  $4^{\circ}\text{C}$  で15分間反応させた。洗浄緩衝液で2回洗浄後、洗浄緩衝液  $50\mu\text{l}$  に再浮遊し、フィコエリシン (phycoerythrin, PE) 標識ストレプトアビジン (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, USA)  $2.5\mu\text{l}$  を加え  $4^{\circ}\text{C}$  で15分間反応させた。ここでリンパ球分画解析の場合にはフルオレッセン・イソチオシアン酸 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識およびペリジニクロロフィル蛋白 (perdinin chlorophyll protein, PerCP) 標識の各種マウス抗ヒト CD 抗体 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) を加えた。洗浄緩衝液で1回洗浄後、フローサイトメーター (Cytron Absolute, Ortho Diagnostic Systems K. K, 東京) を用いて赤血球, 血小板, 顆粒球, 単球およびリンパ球それぞれにおける IGF-I 受容体の発現を解析した。各リンパ球分画における解析は, CD3, 4, 8, 16, 20 と T 細胞受容体 (T-cell receptor, TCR)  $\alpha\beta$ , TCR  $\gamma\delta$  の認識はそれぞれの FITC 標識抗体で二重蛍光染色にて, CD45RO, CD45RA の認識は FITC 標識抗 CD45RO 抗体と PerCP 標識抗 CD4 抗体または抗 CD8 抗体を, HLA-DR の認識は FITC 標識抗 HLA-DR 抗体と PerCP 標識抗 CD4 抗体, 抗 CD8 抗体または抗 CD20 抗体をそれぞれ加えた三重蛍光染色にて解析した。

### 3. 逆転写 PCR 法による IGF-I 受容体 mRNA の解析

#### 1) IGF-I 受容体 cDNA の精製

##### i. RNA の抽出

ヒト末梢血およびヒト臍帯血に1% デキストラン加 PBS を等量加え30分間  $37^{\circ}\text{C}$  で静置した。上清をフィコール・ハイパック比重遠心法で分離し、浮遊層をリンパ球, 沈殿層を顆粒球と

して別々の試験管に移した。混入した赤血球を溶血緩衝液で溶血させ PBS で2回洗浄後、それぞれ  $1 \times 10^6/\text{ml}$  に調節した。リンパ球または顆粒球の浮遊液  $1\text{ml}$  ( $1 \times 10^6$  個) を集積チューブに入れ遠心ペレット状とした後, RNAzol™B (Tel-Test Inc., Friendswood, USA)  $1\text{ml}$  と酵母由来の tRNA (Sigma Chemical Co.)  $10\mu\text{g}$  を加え混和し, クロロホルム  $100\mu\text{l}$  を加え攪拌した。 $4^{\circ}\text{C}$  で5分間静置しマイクロチューブに移し,  $4^{\circ}\text{C}$  で15分間15000回転遠心した。上清  $500\mu\text{l}$  を取り等量のイソプロパノールを加え  $4^{\circ}\text{C}$  で15分間静置後,  $4^{\circ}\text{C}$  で15分間15000回転遠心し, 精製されたペレットを80% エーテルで洗浄乾燥し, リンパ球および顆粒球の総 RNA を抽出した。

##### ii. cDNA の作成

抽出した総 RNA ペレットに2倍逆転写 PCR 緩衝液 [100mM Tris-HCl, 200mM KCl, 20mM  $\text{MgCl}_2$ , 20mM ジチオスレイトール, 各2mM デオキシリボヌクレオチド三リン酸 (deoxyribonucleotide triphosphate, dNTP)]  $25\mu\text{l}$ , 二炭酸ジエチル処理水  $21\mu\text{l}$  と  $10\mu\text{M}$  オリゴ-dT (Pharmacia LKB Biotechnology, Bromma, Sweden)  $4\mu\text{l}$  を加え,  $65^{\circ}\text{C}$  で15分間 RNA の変性とプライマーのアニーリングを行なった。 $42^{\circ}\text{C}$  にゆっくり冷却の後, 逆転写酵素 RAV-2 (宝酒造, 東京) 5単位加えて, 60分間反応させ cDNA を合成させた。反応終了後, セファデックス G-50 (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden) を入れたミニカラムを通して純化した。 $1 \times 10^6$  個のリンパ球および顆粒球より cDNA 浮遊液  $50\mu\text{l}$  を精製した。

##### iii. PCR 法

cDNA 浮遊液  $5\mu\text{l}$  を取り, 10倍 PCR 反応緩衝液 (100mM Tris-HCl,  $\text{pH } 8.3$ , 500mM KCl, 15mM  $\text{MgCl}_2$ )  $5\mu\text{l}$ , 各  $250\mu\text{M}$  dNTP  $5\mu\text{l}$ , Taq DNA ポリメラーゼ I (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA) 2単位を加え, さらに  $20\mu\text{M}$  IGF-I 受容体 PCR 用プライマー (フナコシ, 東京に合成委託)  $5'$ -TGGATCACAAACCCCTCGGAG- $3'$  と  $5'$ -TGGAGGAGAAGCCGATGTGTG- $3'$  をそれぞれ  $2\mu\text{l}$  加え, 滅菌蒸留水で総量  $50\mu\text{l}$  とした。蒸発防止のためにミネラルオイル (Sigma Chemical Co) を重層し, DNA サーマルサイクラーモデル480 (Perkin-Elmer Cetus) を使用して,  $94^{\circ}\text{C}$  で5分間熱変性させた後,  $94^{\circ}\text{C}$  で1分間の熱変性,  $58^{\circ}\text{C}$  で2分間のアニーリング,  $72^{\circ}\text{C}$  で2分間の伸張反応を1サイクルとして, 31, 34, 37サイクルの3種類の増幅を行い341塩基対 (base pair, bp) の IGF-I 受容体 cDNA を増幅した。比較コントロールのため各  $2\mu\text{M}$   $\beta$ -アクチン増幅用プライマー  $5'$ -TGGACTTCGAGCAAGAGATG- $3'$  と  $5'$ -GATCTTCATTGTGCTGGGTG- $3'$  (フナコシに合成委託) の混合液  $5\mu\text{l}$  を用いて同様に PCR で増幅し 415bp の  $\beta$ -アクチンを得た。PCR 増幅産物は1.5% アガロースゲルにて電気泳動後, エチジウムブロマイド (Sigma Chemical Co.) により発色させた。

2) ジゴキシゲニン (digoxigenin, DIG) 標識 IGF-I 受容体 cDNA プロローベの作成

IGF-I 受容体 cDNA (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA より供与) (570bp) 300ng を使用して DIG DNA 標識キット (Boehringer Mannheim, Mannheim,

Germany) により20時間反応させ DIG 標識 IGF-I 受容体 cDNA プローベを得た。これをプレハイブリダイゼーション緩衝液 (50%ホルムアミド, 5×SSC, 2%ブロッキング試薬, 0.1%ラウリル酸サルコシン, 0.02% SDS) 5ml に混和し, ハイブリダイゼーション緩衝液とした。

### 3) ハイブリダイゼーション

PCR 増幅産物である IGF-I 受容体 cDNA を1.5%アガロースゲルにて電気泳動後, ナイロンメンブレン Hybond-N+ (Amersham) にアルカリ吸引転写し, ナイロンメンブレンを120°Cで20分間 cDNA 固定を行った。プレハイブリダイゼーション緩衝液にて42°Cで2時間反応した後, ハイブリダイゼーション緩衝液にて42°Cで12時間反応させた。ナイロンメンブレンを室温にて2×SSC, 0.1% SDS で5分間2回洗浄し, 68°Cにて0.1×SSC, 0.1% SDS で15分間2回洗浄した。以降, 核酸検出用 DIG 蛍光検出キット (Boehringer Mannheim) に従って発色反応を行った。発光したナイロンメンブレンは X 線フィルム (FUJI MEDICAL X-RAY FILM New RX, 富士写真フィルム, 神奈川) に15分間感光させた。

### 4) 解析

$\beta$ -アクチンの PCR 増幅産物のエチジウムブロマイド発色強度は紫外線照射装置トランスルミネーター (フナコシ) 下で, DIG 標識 IGF-I 受容体 cDNA の感光した X 線フィルムは蛍光透過で, BIO-PROFIL 1-D (Vilber-Lourmat, Marne la Vallee, France) を使用して発色強度を測定した。IGF-I 受容体 mRNA の発現は,  $\beta$ -アクチンの PCR 増幅産物により発色強度を補正した。また各種細胞の IGF-I 受容体 mRNA の発現は PCR 34 サイクルにおける増幅産物で比較した。

### 4. ヒト培養リンパ球における IGF-I 受容体の発現調節

ヒト末梢血に PBS を等量加えフィコール・ハイパック比重遠心法で分離し, 浮遊層を PBS で十分に洗浄遠心後, 10% FCS を加えた RPMI1640 培養液 (Gibco Laboratories, Grand Island, USA) にリンパ球を浮遊させ  $1 \times 10^6$ /ml に調節した。以下に記す条件で炭酸ガス培養器 (湿潤37°C, 5% CO<sub>2</sub>) にて培養し, 各リンパ球分画につき培養液を 200  $\mu$ l を採取し洗浄緩衝液で洗浄後に洗浄緩衝液 50  $\mu$ l に再浮遊し, 前述した方法 2 に準じフローサイトメトリーにて IGF-I 受容体の発現を解析した。また各培養時間における IGF-I 受容体 mRNA の発現も解析した。

#### 1) IGF-I による影響

10% FCS 加 RPMI1640 リンパ球浮遊液にヒトリコンピナント IGF-I (藤沢薬品, 東京より供与) を, 0, 5, 40, 200, 1000, 5000ng/ml 濃度でそれぞれ添加し, 37°Cで12時間培養した。また IGF-I 1000ng/ml の濃度で, 0.5, 1, 3, 6, 12, 18, 24時間それぞれ培養し経時的変化を検討した。

#### 2) リンパ球刺激因子による影響

T 細胞刺激因子としてフィトヘマグルチニン (phytohemagglutinin, PHA) (Difco Laboratories, Detroit, USA) 2  $\mu$ g/ml, B 細胞刺激因子として黄色ブドウ球菌コーワン I 型株 (*Staphylococcus aureus* Cowan strain I, SAC) (Cabochem-Behring, San Diego, USA) 0.0025%とインターロイキン-2 (interleukin-2, IL-2) (塩野義製薬, 大阪) 200U/ml, ナチュラルキラー (natural killer, NK) 細胞刺激因子として IL-2 200U/ml をそれぞれ用いた。10% FCS 加 RPMI1640 リンパ球浮遊液にリンパ球刺激因子存在下と非存在下を設定し, それ

ぞれ IGF-I 1000ng/ml の存在下, 非存在下で12, 24, 48, 96時間培養した。

### 5. リンパ球機能における IGF-I の影響

ヒト末梢血に PBS を等量加えフィコール・ハイパック比重遠心法で分離し, 浮遊層を PBS で十分に洗浄遠心後, 10% FCS 加 RPMI1640 にリンパ球を浮遊させ  $1 \times 10^6$ /ml に調節した。

#### 1) <sup>3</sup>H-チミジン摂取率

96穴丸底培養プレート (No. 3870-096: 岩城硝子, 千葉) を使用し, 各穴にリンパ球  $1 \times 10^6$  (100  $\mu$ l) を分注し, PHA 1  $\mu$ g/ml または IL-2 200U/ml 添加培養した。それぞれに IGF-I 濃度を0, 40, 200, 1000ng/ml で添加し, 各条件につき5連でおこなった。PHA 刺激群は72時間後に, IL-2 刺激群は96時間後に <sup>3</sup>H-チミジン (New England Nuclear, Boston, USA) を添加した。リンパ球刺激因子非存在下でも同様の IGF-I 濃度を設定し, 72時間後に <sup>3</sup>H-チミジンを添加した。<sup>3</sup>H-チミジン添加12時間後に濾紙にハーベストし, 各濾紙をトルエンに浮遊させ液体シンシレーションカウンター LSC-5100 (アロカ, 東京) にて放射線強度を測定した。

#### 2) 免疫グロブリン産生能

96穴丸底培養プレートを使用し, 各穴にリンパ球  $2 \times 10^5$  (200  $\mu$ l) を分注し, ポークウイードマイトジェン (pokeweed mitogen, PWM) (Gibco Laboratories) を 1  $\mu$ l (200倍希釈) 添加した。IGF-I 濃度をそれぞれ0, 40, 200, 1000ng/ml とし, 各条件につき5連ずつ設定し, 37°Cで10日間培養した。PWM 非存在下でも同様の IGF-I 濃度を設定し培養した。上清をとり, ELISA により, アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒト IgG, IgA, IgM 抗体 (TAGO Inc., Burlingame, USA) を用いて, IgG, IgA, IgM をそれぞれ測定した<sup>15)</sup>。

#### 3) NK 細胞活性

12穴平底培養プレート (No. 25815: Corning Glass Works, Corning, USA) を使用し, 各穴にリンパ球  $1 \times 10^7$  を分注し, IL-2 200U/ml 添加した。IGF-I 濃度をそれぞれ0, 40, 200, 1000ng/ml とし, 37°Cで5日間培養した。標的細胞には赤白血病細胞株由来の K562 細胞と B 細胞株由来の Daudi 細胞を使用し, 37°C 1時間て放射性化合物 Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> (第一化学, 東京) を標識させた。各条件で培養したリンパ球と放射線標識された標的細胞の細胞比がそれぞれ3:1, 10:1として96穴丸底培養プレートに総量 200  $\mu$ l となるように混入し, 37°Cで4時間反応させた。自然破壊量として標的細胞のみ, 最大破壊量として標的細胞に最終濃度1%のトリトン X-100 (和光純薬工業, 大阪) を加えたものを設定し, コントロールとして用いた。各条件は5連で設定した。反応後, 上清を吸収材に吸着させオートウエルガンマカウンター ARC-500 (アロカ) にて放射線強度を測定し, 標的細胞破壊率 (%) を (各条件測定値 - 自然破壊量) / (最大破壊量 - 自然破壊量) × 100 の計算式にて算出した。

#### 4) 活性化細胞増加能

リンパ球を PHA 1  $\mu$ g/ml の存在下または非存在下で培養し, それぞれの IGF-I 濃度を 0, 40, 200, 1000ng/ml で設定した。培養4日目に PE 標識の抗 HLA-DR 抗体または抗 IL-2 受容体  $\alpha$  鎖抗体 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) と, FITC 標識の抗 CD4 抗体または抗 CD8 抗体をそれぞれ添加し, 4°Cで15分間反応させた後, 洗浄緩衝液で洗浄した。二重蛍光染色にてフローサイトメーターにより CD4 陽性細胞と CD8 陽性

細胞それぞれにおける HLA-DR 陽性率と IL-2 受容体  $\alpha$  鎖陽性率を解析した。

6. 好中球機能における IGF-I の影響

新鮮な健常成人末梢血と臍帯血それぞれにおいて、全血 100  $\mu$ l に IGF-I 濃度 0, 1000ng/ml をそれぞれ添加し、37°C で 30分間前処置した。また健常成人末梢血において、4°C での前処置をコントロールとした。いずれも IGF-I 存在下と非存在下とでのフローサイトメーターにおける蛍光強度の差を算出した。

1) 貪食能

全血を IGF-I による前処置後、カルボキシル化蛍光分散微粒子 (fluorescent monodisperse carboxylated microspheres) (Polysciences Inc., Warrington, USA) を  $1 \times 10^9$ /ml に調節したものを 5  $\mu$ l 加え、さらに 37°C で 25分間反応させた後、それぞれ溶血用緩衝液で溶血させ蛍光発色をフローサイトメーターにて解析した。

Cell counts

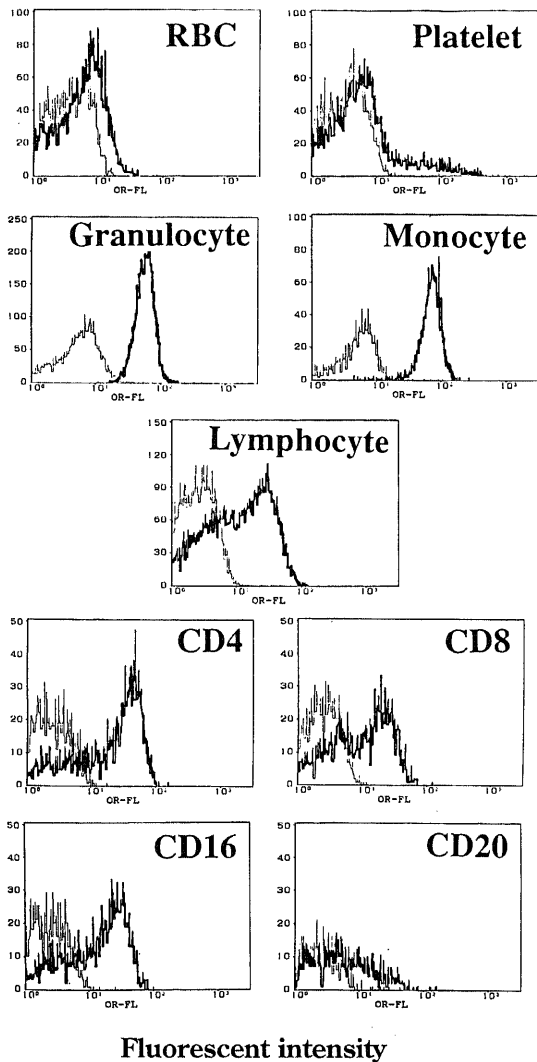


Fig. 1. Histograms of  $\alpha$ IR3 bindings on human peripheral blood cells. Histograms of peripheral blood cells stained with  $\alpha$ IR3 (bold curves) are superimposed over histograms of peripheral blood cells stained with isotype-matched mouse IgG (plain curves).

2)  $H_2O_2$  産生能

全血を IGF-I による前処置後、ジハイドロローダミン (dihydrorhodamine 123, DHR123) (Molecular Probe Inc., Eugene, USA) を 1  $\mu$ M 加え 37°C で 5分間、さらにホルボール 12-ミリスタート13-アセテート (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) (Sigma Chemical Co.) を 100ng/ml 加え 37°C で 15分間震盪させた。それぞれ溶血用緩衝液で溶血させ蛍光発色をフローサイトメーターにて解析した。

III. 統計学的検討

得られた数値は平均土標準偏差 (SD) で示した。2群間の平均値の差の検定には、フローサイトメトリーでは成長ホルモン治療前後の比較のみ paired-t 検定を用い、その他はウイルクソンの順位和検定を用いた。またリンパ球機能検査の活性化細胞増加能のみ  $\chi^2$  検定を用い、その他のリンパ球検査と好中球機能検査では Student-t 検定を用いた。いずれも危険率 5% 以下を統計学的に有意差ありと判定した。

成 績

I. 末梢血における IGF-I 受容体の発現

1. フローサイトメトリー

IGF-I 受容体の特異的マウス IgG 抗体である  $\alpha$ IR3 結合による蛍光染色と非特異的マウス IgG による蛍光染色で、蛍光強度の差が認められた (図 1)。このことより  $\alpha$ IR3 の結合が特異的に IGF-I 受容体発現を反映しているものと考え、以降はフローサイトメトリーによる蛍光強度の強弱を IGF-I 受容体の発現の強弱として表現した。

フローサイトメトリーによる蛍光染色の解析により各ヒト末梢血分画における IGF-I 受容体の発現が示された (図 1)。特に単球と顆粒球に強い発現がみられ、赤血球と血小板にも弱い発現がみられた。総リンパ球では中間の発現を示し、各リンパ球分画中では CD4 陽性細胞の発現が最も強く、次いで CD16 陽性細胞と CD8 陽性細胞が中間の発現を示し、CD20 陽性細胞が最も弱い発現を示した。T 細胞分画において、CD45RA 陽性細胞 (ナイーブ細胞) が CD45RO 陽性細胞 (メモリー細胞) よりも強い IGF-I 受容体の発現を示し、その差は CD4 陽性細胞により強く CD8 陽性細胞では僅かであった (図 2)。また TCR  $\gamma\delta$  陽性細胞が TCR  $\alpha\beta$  陽性細胞よりも弱い発現を示した。HLA-

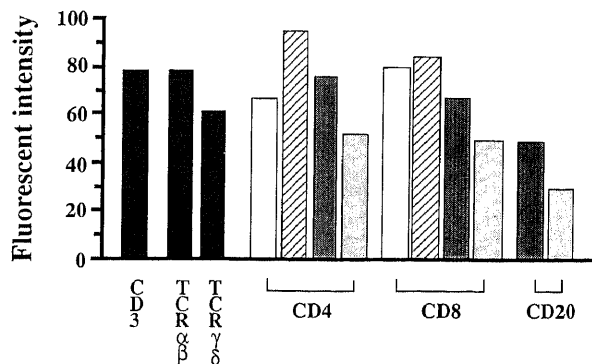


Fig. 2. Fluorescent intensity of  $\alpha$ IR3 bindings on various subpopulations of human peripheral lymphocytes. ■, T cells; □, CD45RO-positive cells; ▨, CD45RA-positive cells; ■, HLA-DR-negative cells; ■, HLA-DR-positive cells.

DR 陽性細胞は、T 細胞とB 細胞とも HLA-DR 陰性細胞より弱い発現を示した。

臍帯血では、単球、顆粒球と総リンパ球で成人末梢血より有意に IGF-I 受容体の発現が強かった (表 1)。成人末梢血と異なり、リンパ球分画中では CD16 陽性細胞に最も強い IGF-I 受容体の発現であった。また成人末梢血と比較して、IGF-I 受容体の発現は CD16 陽性細胞と CD20 陽性細胞が有意に強かった

が、CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞は成人末梢血と同程度の発現であった。

成長ホルモン治療終了後の成長ホルモン欠損症成人末梢血における IGF-I 受容体は、CD20 陽性細胞のみ健常成人よりも有意に強い発現を示した (表 2)。また成長ホルモン欠損症小児 2 名において、成長ホルモン治療 1 カ月後では成長ホルモンによる IGF-I 血中濃度の上昇に伴い、2 症例とも IGF-I 受容体の発

Table 1. Comparison of fluorescent intensity of  $\alpha$  IR3 bindings between human peripheral blood cells and cord blood cells

Cells	Fluorescent intensity ( $\bar{x} \pm SD$ )	
	Healthy adults (n=20)	Cords (n=20)
RBC	29.1 $\pm$ 2.7	27.3 $\pm$ 2.3
Platelet	29.5 $\pm$ 5.1	30.4 $\pm$ 4.9
Granulocyte	109.6 $\pm$ 8.1	118.3 $\pm$ 6.9**
Monocyte	117.1 $\pm$ 7.9	131.6 $\pm$ 9.7*
Lymphocyte	70.8 $\pm$ 12.2	83.3 $\pm$ 9.7*
CD4 <sup>+</sup> cell	79.6 $\pm$ 8.6	75.4 $\pm$ 14.6
CD8 <sup>+</sup> cell	66.2 $\pm$ 15.7	64.3 $\pm$ 12.4
CD16 <sup>+</sup> cell	69.3 $\pm$ 10.1	96.2 $\pm$ 8.9***
CD20 <sup>+</sup> cell	48.4 $\pm$ 17.9	70.9 $\pm$ 20.9*

Serum IGF-I concentration is 229  $\pm$  25 ng/ml in healthy adults, and 47  $\pm$  23 ng/ml in cords ( $p < 0.005$ ), respectively. IGF-I, insulin-like growth factor-I.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$  versus healthy adults.

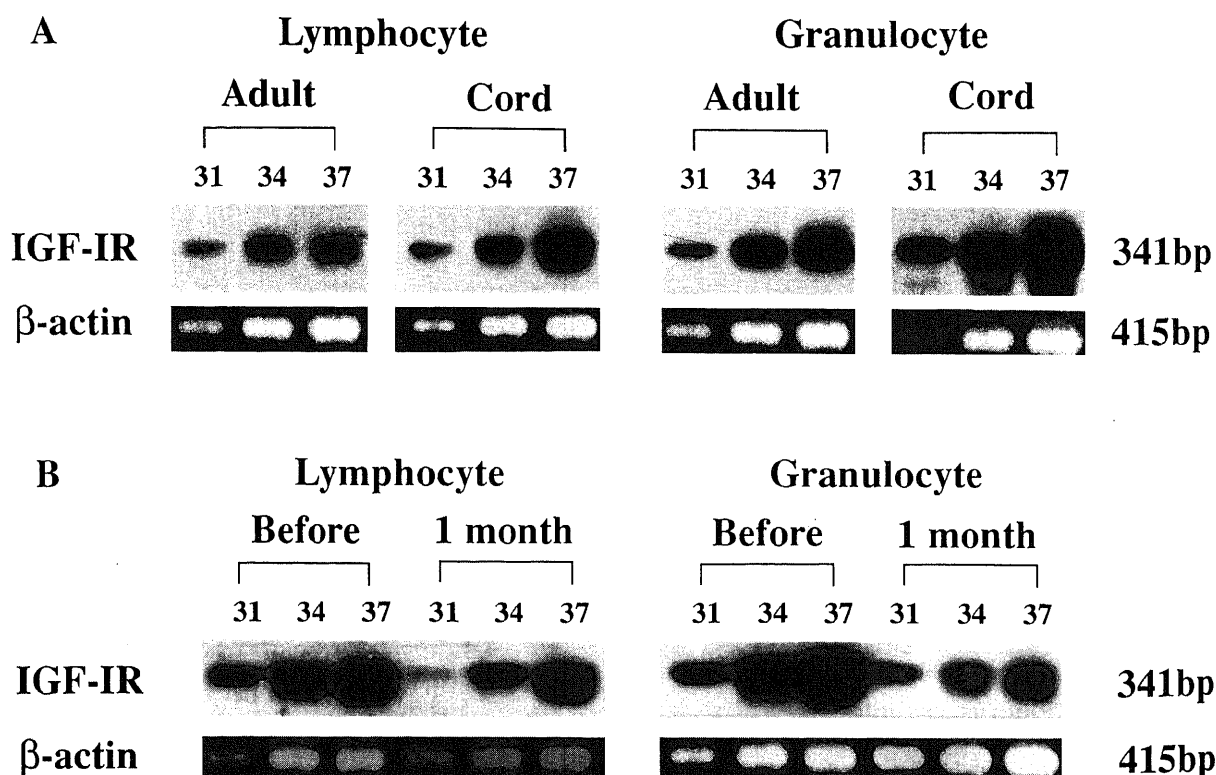


Fig. 3. Comparison of IGF-I receptor mRNA in lymphocytes or granulocytes in vivo. (A) Adult and cord. (B) GHD child before and 1 month after growth hormone therapy. bp, base pair; IGF-I, insulin-like growth factor-I; IGF-IR, IGF-I receptor; GHD, growth hormone deficient.

Table 2. Comparison of fluorescent intensity of  $\alpha$ IR3 bindings on peripheral blood cells between healthy adults and GHD adults

Cells	Fluorescent intensity ( $\bar{x} \pm SD$ )	
	Healthy adults (n=20)	GHD adults (n=6)
RBC	29.1 $\pm$ 2.7	32.1 $\pm$ 4.1
Platelet	29.5 $\pm$ 5.1	32.4 $\pm$ 3.4
Granulocyte	109.6 $\pm$ 8.1	109.8 $\pm$ 11.0
Monocyte	117.1 $\pm$ 7.9	116.6 $\pm$ 9.0
Lymphocyte	70.8 $\pm$ 12.2	73.0 $\pm$ 10.9
CD4 <sup>+</sup> cell	79.6 $\pm$ 8.6	77.6 $\pm$ 12.5
CD8 <sup>+</sup> cell	66.2 $\pm$ 15.7	66.7 $\pm$ 13.5
CD16 <sup>+</sup> cell	69.3 $\pm$ 10.1	74.7 $\pm$ 7.0
CD20 <sup>+</sup> cell	48.4 $\pm$ 17.9	57.2 $\pm$ 14.2**

Serum IGF-I concentration is 229  $\pm$  25 ng/ml in healthy adults, and 40  $\pm$  22 ng/ml in GHD adults ( $p < 0.005$ ), respectively. IGF-I, insulin-like growth factor-I; GHD, growth hormone deficient.

\*\*  $p < 0.01$  versus healthy adults.

Table 3. Influence of GH therapy to fluorescent intensity of  $\alpha$ IR3 bindings on peripheral blood cells of GHD children

Cells	Fluorescent intensity			
	Case 1		Case 2	
	Before <sup>a)</sup>	1 month <sup>b)</sup>	Before	1 month
RBC	30.5	22.3	25.5	25.0
Platelet	30.9	22.9	24.8	25.1
Granulocyte	103.8	86.1	110.7	98.9
Monocyte	115.5	100.5	130.5	127.0
Lymphocyte	73.1	55.6	74.8	69.6
CD4 <sup>+</sup> cell	80.2	57.9	75.1	74.4
CD8 <sup>+</sup> cell	69.1	44.7	53.8	54.9
CD16 <sup>+</sup> cell	91.4	65.3	73.6	61.5
CD20 <sup>+</sup> cell	59.4	54.9	56.5	53.4

In case 1 serum, IGF-I concentration increased from 70 ng/ml to 134 ng/ml one month after GH therapy, and in case 2, from <30 ng/ml to 178 ng/ml. IGF-I, insulin-like growth factor-I; GH, growth hormone; GHD growth hormone deficient.

a) Before GH therapy.

b) 1 month after GH therapy.

\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.005$  by paired t-tast.

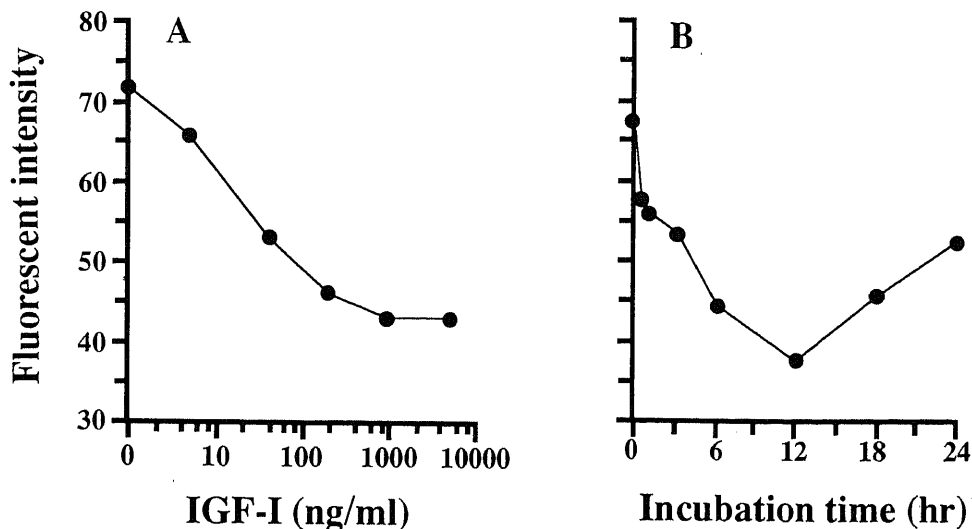


Fig. 4. Changes in fluorescent intensity of  $\alpha$ IR3 bindings on cultured human lymphocytes in IGF-I. (A) Dose dependent curve. Whole human lymphocytes were incubated in increasing concentration of IGF-I for 12 hours. (B) Time course curve. Whole human lymphocytes were incubated with 1000 ng/ml IGF-I for 1 to 24 hours. IGF-I, insulin-like growth factor-I.

現が有意に減少した(表3).

## 2. IGF-I 受容体 mRNA

臍帯血の IGF-I 受容体 mRNA の発現は健康成人末梢血と比較して、リンパ球で20%, 顆粒球で40%強かった(図 3A). 成長ホルモン治療前と治療開始1カ月後における IGF-I 受容体 mRNA の発現の比較では、リンパ球で40%, 顆粒球で30%の減少がみられた(図 3B). これらの IGF-I 受容体 mRNA の発現は、いずれもフローサイトメトリーによる解析と相関するものであった.

## II. ヒト培養リンパ球における IGF-I 受容体の発現

### 1. フローサイトメトリー

IGF-I 添加培養によって、IGF-I 1000ng/ml までは濃度依存性に IGF-I 受容体の発現が減少し、IGF-I 5000ng/ml では平衡状態となった(図 4A). このことから以下の実験では、IGF-I 受容体の濃度依存性がみられる IGF-I 1000 ng/ml までの濃度設定とした. IGF-I 1000ng/ml 添加後の経時変化をみると、培養リンパ球は培養12時間までは IGF-I 受容体の発現が経時的に減少し、その後再び増加した(図 4B).

PHA 刺激によって培養総リンパ球の IGF-I 受容体の発現は経時的に増加し、PHA 添加しない培養リンパ球よりも強い発現であった(図 5A). PHA 刺激による培養総リンパ球の IGF-I 受容体の発現の増強は IGF-I の添加により抑制された. リンパ球

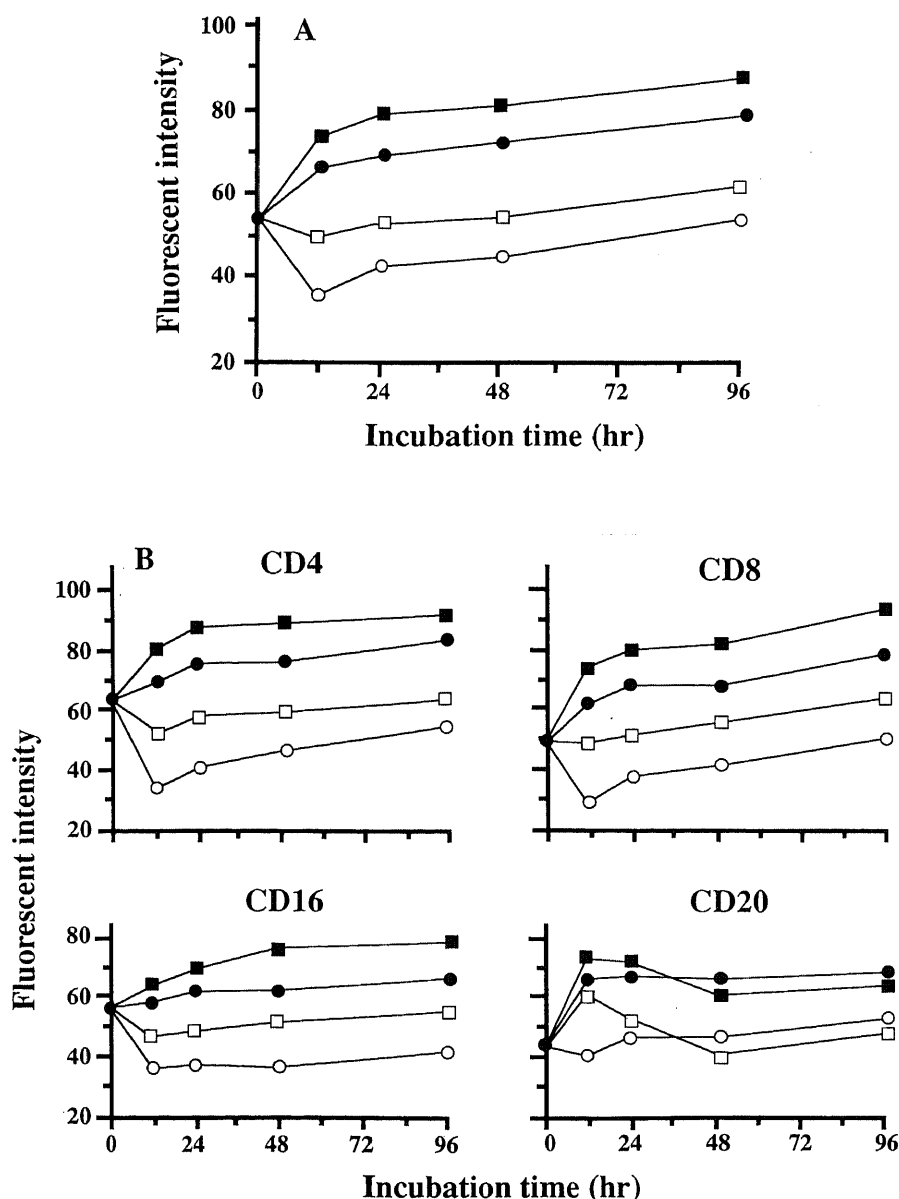


Fig. 5. Changes in fluorescent intensity of  $\alpha$ IR3 bindings on human lymphocytes cultured with lymphocyte stimulating factors. (A) Whole lymphocytes. (B) Subpopulations of lymphocytes. Whole human lymphocytes were incubated without IGF-I and stimulating factors (●), with 1000 ng/ml IGF-I (○), with stimulating factors, 2  $\mu$ g/ml PHA for T cells, 200U/ml IL-2 for NK cells, or 0.0025% SAC+ 200 U/ml IL-2 for B cells (■), and with IGF-I and stimulating factors (□). IGF-I, insulin-like growth factor-I; PHA, phytohemagglutinin; NK, natural killer; SAC, *Staphylococcus aureus* Cowan strain I; IL-2, interleukin-2.



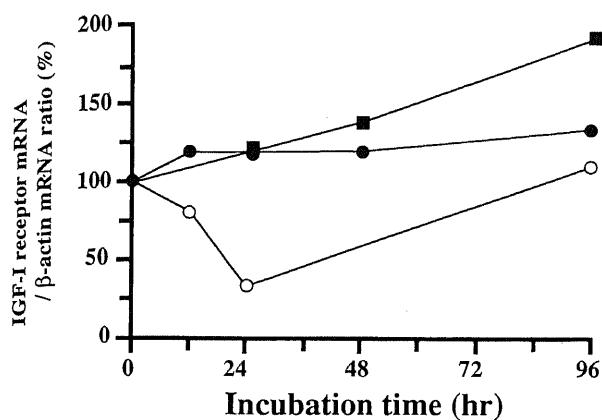


Fig. 6. Changes in IGF-IR mRNA/ $\beta$ -actin mRNA ratio in cultured human lymphocytes. IGF-IR mRNA/ $\beta$ -actin mRNA ratio was expressed as percentage control of that in pre-incubated human lymphocytes. ●, incubation without IGF-I and PHA; ○, incubation with 1000 ng/ml IGF-I; ■, incubation with 1  $\mu$ g/ml PHA. IGF-I, insulin-like growth factor-I; IGF-IR, IGF-I receptor; PHA, phytohemagglutinin.

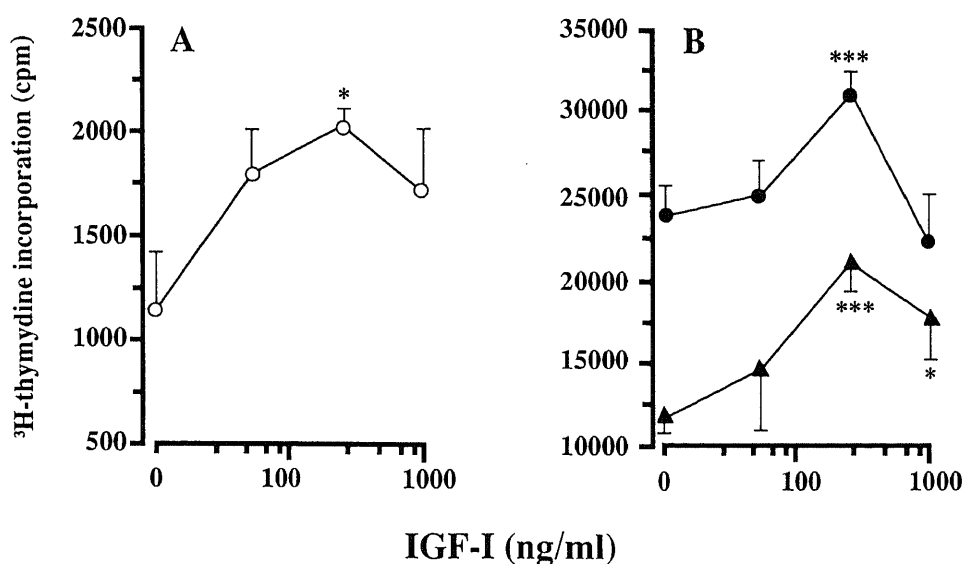


Fig. 7. Effects of IGF-I on  $^3$ H-thymidine incorporation of human lymphocytes. (A) IGF-I. (B) IGF-I+PHA or IL-2. Whole lymphocytes were stimulated by various concentrations of IGF-I without stimulating factors for 4 days (○), with 1  $\mu$ g/ml PHA for 4 days (●), or with 200U/ml IL-2 for 5 days (▲). All data are shown as  $\bar{x} \pm SD$  (n=5). IGF-I, insulin-like growth factor-I; PHA, phytohemagglutinin; IL-2, interleukin-2. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.005$  versus values at 0 ng/ml IGF-I.

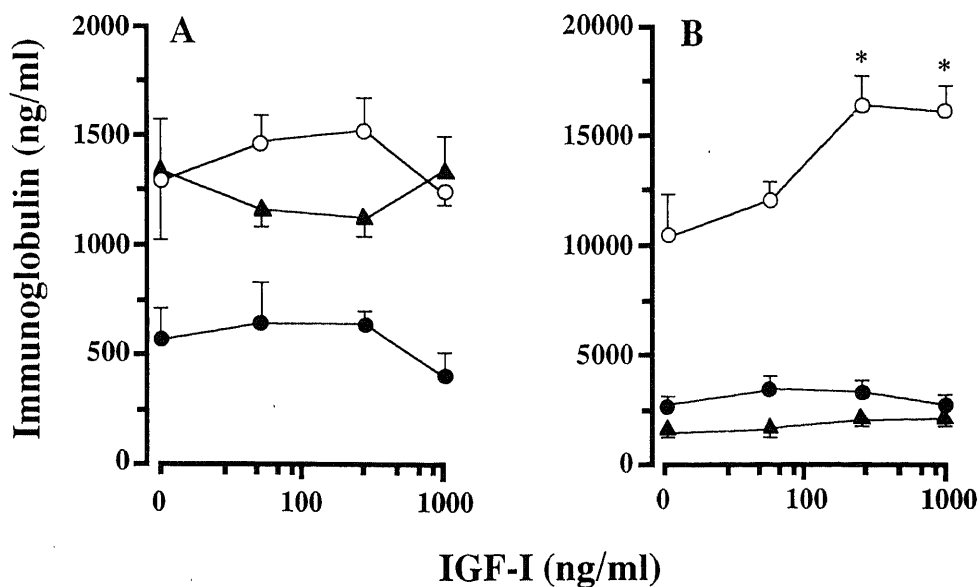


Fig. 8. Effects of IGF-I on immunoglobulin production of human lymphocytes. (A) IGF-I. (B) IGF-I+PWM. Whole lymphocytes were stimulated by various concentrations of IGF-I without stimulating factors, or with 200 times diluted PWM for 10 days. ○, IgG production; ●, IgM production; ▲, IgA production. All data are shown as  $\bar{x} \pm SD$  (n=5). IGF-I, insulin-like growth factor-I; PWM, pokeweed mitogen. \* $p < 0.05$  versus values at 0 ng/ml IGF-I.

各分画においても同様の IGF-I 受容体の発現の変化がみられた (図 5B)。ただしリンパ球刺激因子存在下で, PHA による T 細胞刺激と IL-2 刺激による NK 細胞刺激では, CD4 陽性細胞, CD8 陽性細胞および CD16 陽性細胞ともに刺激因子による IGF-I 受容体の発現の増強がみられたが, SAC, IL-2 による B 細胞刺激では, CD20 陽性細胞は培養48時間以降に IGF-I 受容体の発現が減少した。

2. IGF-I 受容体 mRNA

培養96時間の IGF-I 受容体 mRNA は培養前と比較して, PHA 刺激培養リンパ球では90%の増加, 非刺激培養リンパ球では30%の増加を示し, PHA 刺激培養リンパ球に強い増加であった (図 6)。また IGF-I 添加の培養において, 培養12時間の IGF-I 受容体 mRNA は20%の減少, 培養24時間では70%の減少を示した。これらの経時的な IGF-I 受容体 mRNA の変化は, フ

ローサイトメトリーによる IGF-I 受容体の解析と相関がみられた。

Ⅲ. リンパ球機能における IGF-I の影響

1. <sup>3</sup>H-チミジン摂取率

リンパ球刺激因子の非存在下では <sup>3</sup>H-チミジン摂取率が全体的に低いものの, IGF-I 200ng/ml で有意な増加を示した (図 7A)。また PHA 刺激下と IL-2 刺激下いずれにおいても, <sup>3</sup>H-チミジン摂取率は IGF-I 添加により濃度依存性に増強した (図 7B)。

2. 免疫グロブリン産生能

PWM 非存在下では IGF-I により有意な免疫グロブリン産生能の増強効果はみられなかった (図 8A)。また PWM 刺激下では IGF-I 添加により濃度依存性に IgG 産生が増強したが, IgM と IgA 産生には有意差はみられなかった (図 8B)。

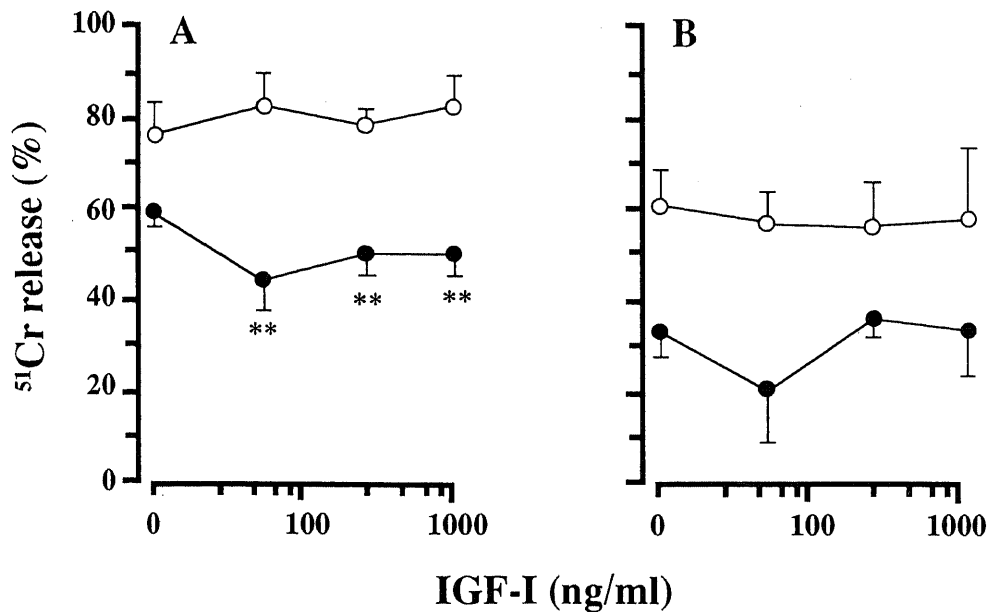


Fig. 9. Effects of IGF-I on NK cell activity. (A) K562 cells. (B) Daudi cells. Whole lymphocytes were stimulated by various concentrations of IGF-I with 200U/ml IL-2 for 5 days. ●, effector: target (E: T) ratio of 3: 1; ○, E: T ratio of 10: 1. All data are shown  $\bar{x} \pm$  SD (n=5). IGF-I, insulin-like growth factor-I; NK, natural killer; IL-2, interleukin-2. \*\*p<0.01 versus values at 0 ng/ml IGF-I.

Table 4. Effect of IGF-I on human lymphocyte activation

PHA ( $\mu$ g/ml)	IGF-I (ng/ml)	HLA-DR (%)		IL-2 receptor $\alpha$ -chain (%)	
		CD4	CD8	CD4	CD8
0	0	4.6	4.6	5.4	0.6
	40	5.2	4.8	4.7	0.3
	200	5.0	3.7	4.3	0.4
	1000	5.8	3.7	4.9	0.6
1	0	16.0	17.1	33.7	28.0
	40	20.8	23.5	48.3	33.3
	200	19.4	24.2	49.1	37.1
	1000	20.4	24.4	52.8	38.4

Whole lymphocytes were stimulated by various IGF-I concentrations with or without 1  $\mu$ g/ml PHA. IGF-I, insulin-like growth factor-I; IL-2, interleukin-2; PHA, phytohemagglutinin.  
\* p<0.05, \*\*\* p<0.005 by  $\chi^2$  test.

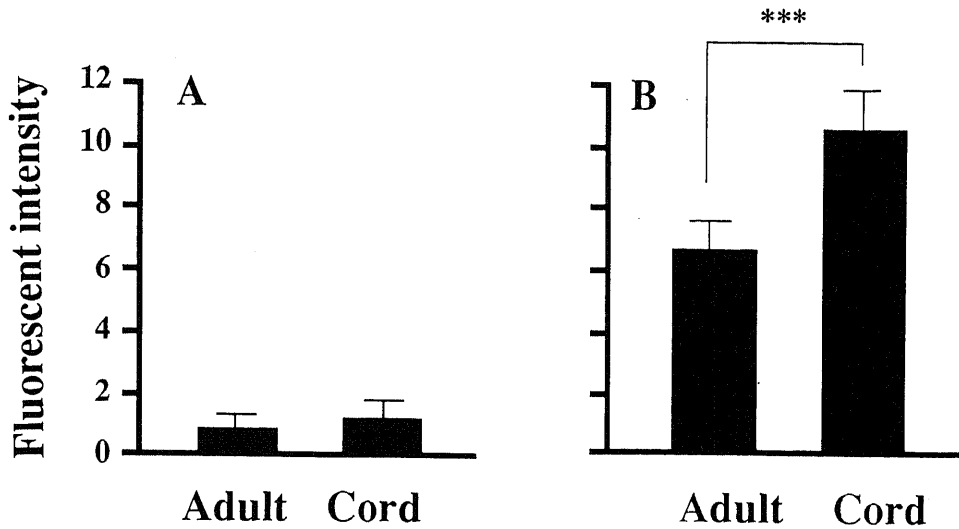


Fig.10. Effects of IGF-I on neutrophilic functions. Whole blood was pre-incubated with or without 1000ng/ml IGF-I for 30 minutes. (A) Phagocytosis. (B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. The bars indicate increment of fluorescent intensity pre-incubated with IGF-I. All data are shown as  $\bar{x} \pm SD$  (n=3). IGF-I, insulin-like growth factor-I. \*\*\*p<0.005.

### 3. NK細胞活性

NK細胞感受性のK562細胞では、リンパ球・標的細胞比が3:1でIGF-I添加により有意なNK細胞活性の減少を示したが、細胞比が10:1では変化はみられなかった(図9A)。NK細胞抵抗性のDaudi細胞ではIGF-I添加によるNK細胞活性の変化はみられなかった(図9B)。

### 4. 活性化細胞増加能

PHA非存在下では、HLA-DR陽性率とIL-2受容体 $\alpha$ 鎖陽性率のIGF-I添加による増加はみられなかった(表4)。PHA刺激下ではIGF-Iの添加により、CD8陽性細胞のHLA-DR陽性率と、CD4陽性細胞とCD8陽性細胞のIL-2受容体 $\alpha$ 鎖陽性率の濃度依存性の増加を示した(表4)。特にIGF-Iは、CD4陽性細胞のIL-2受容体 $\alpha$ 鎖陽性率において強い増強効果を示した。

### Ⅳ. 好中球機能におけるIGF-Iの影響

#### 1. 貪食能

健常成人末梢血と臍帯血ともに、IGF-I前処置にかかわらず貪食能に変化はみられなかった(図10A)。

#### 2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生能

健常成人末梢血と臍帯血ともに、37℃におけるIGF-I前処置によってPMA刺激によるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生能の増強を示し、これは臍帯血に有意に強かった(図10B)。また健常成人末梢血を4℃でIGF-I前処置した場合にはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生能に変化はみられなかった。

### 考 察

末梢血細胞におけるIGF-I受容体に関する研究は諸家によって報告されているが、その解析方法は<sup>125</sup>I標識<sup>27,29,10,23</sup>や蛍光標識<sup>20</sup>したIGF-Iを用いた解析と、抗ヒトIGF-I受容体に対する特異的抗体である $\alpha$ IR3を用いた免疫蛍光染色法<sup>25,26</sup>による解析に大別される。標識IGF-Iを用いた受容体の結合反応では、IGF-I受容体はインスリンやIGF-IIと交叉反応を認める<sup>27</sup>ことから、血清中のインスリンや他のIGF-I結合蛋白の影響を受け

ないように血清を除去し血球を分離する必要がある。さらにIGF-Iはインスリン受容体に対する交叉反応も認められている<sup>27</sup>。一方、 $\alpha$ IR3はインスリン受容体やIGF-I結合蛋白などの交叉反応を認めず<sup>28</sup>、その特異性よりIGF-I受容体の認識に有用であると考えられる。Kooijmanら<sup>29</sup>は<sup>125</sup>I-IGF-Iを用いた受容体結合試験と $\alpha$ IR3を用いた免疫蛍光染色を比較検討し、単球とT細胞、B細胞、NK細胞それぞれの分画における<sup>125</sup>I-IGF-Iの結合率と $\alpha$ IR3による免疫蛍光染色の強さは相関しており、また<sup>125</sup>I-IGF-Iの結合反応は $\alpha$ IR3により特異的に阻害されると報告している。これらのことより、本研究における $\alpha$ IR3を使用した免疫蛍光染色法は、末梢血細胞におけるIGF-I受容体の発現の量的解析に応用できるものと考えられた。

ヒト末梢血細胞におけるIGF-I受容体の存在の報告は、Thorssonら<sup>30</sup>が<sup>125</sup>I-ソマトメジンC(IGF-I)を用いて単核球における受容体の発現を示したのが最初である。以降リンパ球や赤血球における報告<sup>31</sup>が散見されているが、末梢血細胞すべての分画でのIGF-I受容体を解析比較した報告はみられない。本研究において、強弱はあるもののヒト末梢血細胞すべてにIGF-I受容体が発現していることが示された。またリンパ球分画におけるIGF-I受容体は、各CD表面抗原ごとに異なった発現が認められ、T細胞、特にCD4陽性細胞に強く、B細胞に弱いIGF-I受容体の発現を示した。以前の報告において、Kooijmanら<sup>29</sup>は本研究と同じ解析方法である全血で $\alpha$ IR3を用いた免疫蛍光染色法にて、T細胞に強くB細胞に弱いと報告している。一方、リンパ球分離操作を行った標識IGF-I<sup>24</sup>や $\alpha$ IR<sup>28</sup>による解析ではIGF-I受容体の発現がB細胞に強くT細胞に弱いと報告されている。この不一致についてKooijmanら<sup>29</sup>はリンパ球分離過程で損なわれるIGF-I受容体があり、IGF-I受容体全血で解析できる $\alpha$ IR3による免疫蛍光染色はより生体内のIGF-I受容体の発現状態に近いのではないかと報告している。さらに詳細なリンパ球分画において、Kooijmanら<sup>29</sup>の報告と同じく、ナイーブ細胞で強く、メモリー細胞で弱い発現が認

められ、また HLA-DR 陽性細胞は HLA-DR 陰性細胞よりも発現が弱いことが示された。この IGF-I 受容体の発現の差は、免疫応答を記憶する過程つまりナイーブ細胞からメモリー細胞への分化過程や、活性化過程つまり HLA-DR 陰性細胞から HLA-DR 陽性細胞への分化過程に、IGF-I が関与している可能性が考えられた。さらにリンパ球分画において IGF-I 受容体の発現が異なっていることは、それぞれのリンパ球における免疫機能に何らかの関与があるものと考えられた。

本研究において、臍帯血の顆粒球と単球、リンパ球において IGF-I 受容体の発現は健常成人よりも強く、これはまた IGF-I 受容体 mRNA においても健常成人よりも強い発現であった。しかし CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞では、IGF-I 受容体の発現の有意差は認められなかった。臍帯血における末梢血細胞の IGF-I 受容体の比較検討は  $^{125}$ I-IGF-I を使用した Rosenfeld ら<sup>19</sup>の報告があり、臍帯血の単核球の IGF-I 受容体の発現は成人末梢血より強いとしている。一方、本研究における成長ホルモン欠損症における末梢血細胞の IGF-I 受容体は、健常成人と比較して CD20 陽性細胞に IGF-I 受容体の発現が強く認められた以外に有意差はみられなかった。また成長ホルモン開始後に IGF-I 血中濃度の上昇に伴い、ほとんどの末梢血細胞分画で IGF-I 受容体の発現低下を認め、さらに IGF-I 受容体 mRNA の発現も成長ホルモン治療開始により減少した。これまでの報告では  $^{125}$ I-IGF-I による受容体解析のみであるが、成長ホルモン欠損症の赤血球において IGF-I 受容体が増加した<sup>20</sup>とされ、また Eshet ら<sup>19</sup>は成長ホルモン欠損症のリンパ球における IGF-I 受容体 mRNA の発現が強いと報告している。さらに成長ホルモン欠損症における成長ホルモン治療<sup>20,21</sup>や成長ホルモン受容体異常を示すラロン型小人症における IGF-I 治療<sup>22</sup>により、IGF-I 血中濃度の上昇に伴い赤血球の IGF-I 受容体が減少したとする報告がみられている。しかし、成長ホルモン欠損症における他の末梢血細胞分画の IGF-I 受容体の報告はみられていない。

臍帯血や成長ホルモン欠損症では、IGF-I 血中濃度は健常成人に比べ有意に減少しており、いずれの報告においても IGF-I 血中濃度の低下が IGF-I 受容体の発現を増加させ、成長ホルモン治療による IGF-I 血中濃度の上昇で IGF-I 受容体の発現は減少する<sup>19-23</sup>と結論している。本研究における培養リンパ球においても、IGF-I 受容体の発現が IGF-I 濃度や時間依存性に減少していることから、IGF-I 受容体の発現には IGF-I 濃度が関与しているものと考えられた。しかし本研究では生体内において、成長ホルモン治療による IGF-I 受容体の発現は減少したものの、臍帯血や成長ホルモン欠損症における IGF-I 受容体の発現は、特にリンパ球分画において IGF-I 血中濃度に依存した結果ではなかった。臍帯血では免疫刺激に乏しい環境であり、また成長ホルモン欠損症では NK 細胞の減少<sup>20</sup>、CD4/CD8 比の増加<sup>20</sup>や減少<sup>20</sup>、B 細胞の増加<sup>20</sup>などのリンパ球分画の健常成人との違いが報告されており、その分画による差や免疫刺激などによる違いが IGF-I 受容体の発現に影響している可能性が示唆された。以上より生体における末梢血細胞の IGF-I 受容体の発現は、IGF-I 血中濃度に依存した調節と、特にリンパ球において表面抗原による違いにより変化している可能性が考えられた。

一方、生体外でのリンパ球刺激因子により培養リンパ球の IGF-I 受容体の発現は経時的な増加を示し、CD20 陽性細胞のみ48時間以降は IGF-I 受容体の発現が減少した。Kozak ら<sup>20</sup>も  $\alpha$ IR3 による免疫蛍光染色法で PHA 刺激リンパ球における

IGF-I 受容体の発現の増加を報告している。培養リンパ球における IGF-I 受容体 mRNA の発現においても、免疫蛍光染色による IGF-I 受容体の発現と一致し、IGF-I 添加により IGF-I 受容体 mRNA の減少と PHA 刺激による増強が認められた。Johnson ら<sup>19</sup>は IL-2 刺激 T 細胞では培養4日目までは IGF-I 受容体の発現が増加たと報告し、同様に Hartmann ら<sup>19</sup>は PHA 刺激 T 細胞で IGF-I 受容体の発現は増強し培養72時間で最大であったと報告している。これらの培養 T 細胞の IGF-I 受容体の変化はリンパ球幼若反応のピークに一致しており、刺激リンパ球、特に培養 T 細胞における IGF-I 受容体の発現の増加はリンパ球増殖能に関与したものであると考えられた。また CD20 陽性細胞における IGF-I 受容体の発現の減少は、リンパ球活性化により IGF-I 受容体の発現の弱い HLA-DR 陽性細胞が増加したためであると考えられた。以上より生体外における培養リンパ球は免疫刺激により IGF-I 受容体の発現が変化したことから、IGF-I 受容体の発現は細胞増殖や活性度に影響を受けている可能性が考えられた。

IGF-I の末梢血細胞機能に対する作用については、種々の報告がみられている。生体内において、成長ホルモン欠損症における NK 細胞活性の低下<sup>24</sup>が報告されているが、NK 細胞活性も含めたリンパ球機能<sup>25-26</sup>や好中球機能<sup>27</sup>は正常であるとする報告が多い。また成長ホルモン治療によるリンパ球幼若反応の増加<sup>28</sup>の報告もあるが、リンパ球幼若反応の減少<sup>29</sup>の報告や、IgM 産生能の一過性の減少<sup>30</sup>なども報告されている。その他、成長ホルモン治療によるリンパ球分画の変化<sup>30,31</sup>も報告されており、成長ホルモン-IGF-I 系の免疫機構への関与が示唆されている。しかし末梢血細胞には成長ホルモン受容体も存在しており<sup>30</sup>、成長ホルモンによる生体外における免疫増強作用は、IGF-I 受容体抗体で抑制されず IGF-I を媒介しない作用である<sup>32-33</sup>とする報告があり、成長ホルモン欠損症や成長ホルモン治療による免疫機能の変化は IGF-I 濃度変化による影響のみとは判断できない。また生体内における IGF-I 治療による免疫機能の報告は、ヒトでは皆無である。ラットにおける IGF-I 投与では、B 細胞数が増加した<sup>34</sup>という報告や、免疫グロブリンの増加やリンパ球幼若反応の増加<sup>35</sup>の報告もあるが、IgG 産生が減少した<sup>36</sup>とする報告もあり、生体内における IGF-I の免疫機能への効果には一定した見解は得られていない。一方、生体外における IGF-I の免疫機能への効果は、リンパ球幼若反応<sup>37-39</sup>、免疫グロブリン産生能<sup>40</sup>、NK 細胞活性<sup>41</sup>、 $H_2O_2$  産生能<sup>42</sup>や貪食能<sup>43,44</sup>などを増強するとする報告が多い。さらに末梢血細胞増殖においても、赤血球ではエリスロポイエチン<sup>45</sup>、顆粒球では顆粒球コロニー刺激因子や顆粒球単球コロニー刺激因子<sup>46</sup>と共合して細胞増殖を増強すると報告されている。本研究における生体外での各機能検査ごとの結果について以下に考察した。

$^3$ H-チミジン摂取率についての本研究では、PHA 刺激と IL-2 刺激それぞれにおいて IGF-I による  $^3$ H-チミジン摂取率の増強を示した。これらは特に IGF-I 200ng/ml において有意であり、濃度依存性の増強であった。これまで IGF-I により  $^3$ H-チミジン摂取率が低下した<sup>40</sup>とする報告もあるが、増強に働く<sup>47-49</sup>とする報告が多い。Schillaci ら<sup>50,51</sup>は PHA 刺激下での  $^3$ H-チミジン摂取率を IGF-I 濃度依存性に増強すると報告しており、Johnson ら<sup>19</sup>は IL-2 刺激下で IGF-I 50ng/ml までの低濃度では濃度依存性に増強するが、リンパ球刺激因子の非存在下では増強作用はないと報告している。しかし本研究ではリンパ球刺激

因子の非存在下でも IGF-I による増強が認められた。このことから IGF-I はリンパ球刺激因子との相乗作用だけでなく、IGF-I 単独でもリンパ球増殖能を増強している可能性が示唆された。

免疫グロブリン産生能についての本研究では、PWM 刺激下において IgG 産生にのみ IGF-I による増強作用が認められた。また  $^3\text{H}$ -チミジン摂取率と同様に IGF-I 200ng/ml において特に有意で濃度依存性の増強であった。Kimata ら<sup>43)</sup>は、B 細胞由来の腫瘍化細胞株では SAC 刺激下で、IGF-I は IgG、IgM、IgA とそのサブクラスも含めた免疫グロブリンを増強したと報告している。この違いは、本研究が T 細胞依存性 B 細胞活性をみているのに対し、Kimata ら<sup>43)</sup>は B 細胞刺激系を用いている違いと考えられた。このことから IGF-I は直接の B 細胞刺激だけでなく、T 細胞を介した B 細胞刺激系においても、免疫グロブリン産生を増強すると考えられた。

NK 細胞活性についての本研究では、NK 細胞感受性の K562 細胞で IGF-I により NK 細胞が標的細胞に対し 3:1 の細胞比でのみ、NK 細胞活性の低下が認められた。しかし NK 細胞の割合を増加 (10:1) すると IGF-I の NK 細胞活性に対する変化は認められず、また NK 抵抗性の Daudi 細胞でも変化を示さなかったことから、IGF-I の抑制効果は弱いものと考えられた。一方、Kooijman ら<sup>44)</sup>は一部を除いて IGF-I により NK 細胞活性は増強したと報告している。Kooijman ら<sup>44)</sup>は IGF-I による前処置後の短時間での IL-2 刺激に対し、本研究では IGF-I と IL-2 とを同時に添加培養して 5 日間培養していることが異なっており、このことが結果の違いとなっているものと考えられた。

活性化細胞増加能についての本研究では、PHA 刺激下において IGF-I により T 細胞の HLA-DR 陽性細胞率と IL-2 受容体  $\alpha$  鎖陽性細胞率の増強が認められた。同様に Schillaci ら<sup>45)</sup>は PHA 2 $\mu\text{g}$ /ml 以下の濃度で IGF-I がリンパ球における IL-2 受容体  $\alpha$  鎖の発現を増強したと報告している。本研究において、IGF-I は CD8 陽性細胞より CD4 陽性細胞に強く IL-2 受容体  $\alpha$  鎖の発現を増強した。このことから、PHA 刺激下で、IGF-I が特に CD4 陽性細胞における IL-2 の作用を増強し、免疫機能を増強する可能性が示唆された。

好中球機能についての本研究では、 $\text{H}_2\text{O}_2$  産生能の増強が認められた。 $\text{H}_2\text{O}_2$  産生能に関して、37℃での IGF-I 前処置では健康成人末梢血よりも IGF-I 受容体の発現の強い臍帯血に有意に  $\text{H}_2\text{O}_2$  産生が強く、4℃での IGF-I 前処置では  $\text{H}_2\text{O}_2$  産生に変化を示さなかったことから、IGF-I の作用は受容体の発現に依存した作用であると考えられた。これまでに  $\text{H}_2\text{O}_2$  産生能<sup>46)</sup>と貪食能<sup>44,45)</sup>とも、IGF-I 濃度依存性に増強したと報告されている。しかし本研究では貪食能に関して IGF-I による効果は認められなかった。

本研究における結果より、IGF-I 受容体は全ヒト末梢血細胞分画に存在し、IGF-I 受容体の発現は IGF-I 血中濃度と、特にリンパ球では細胞活性度や細胞分画による違いによって影響されているものと考えられた。さらに IGF-I は様々な免疫機能に関与しており、生体外において、リンパ球幼若反応の増強と、リンパ球刺激因子下で IgG 産生能、活性化細胞増加能、好中球  $\text{H}_2\text{O}_2$  産生能に増強を示し、好中球貪食能に変化なく、NK 細胞活性で抑制効果があるものと考えられた。しかし本研究の結果も含め、生体内と生体外それぞれにおける IGF-I の免疫機能が報告により異なり、一致した見解はみられていない。この理由として、IGF-I の免疫機能への作用は単独ではなく、他のホル

モンや免疫因子などが関連しているものと考えられた。さらに生体外ではリンパ球腫瘍化細胞株<sup>47,48)</sup>やラットのリンパ球では<sup>49)</sup>成長ホルモン誘導による、または独立した IGF-I 分泌機能を持つことも報告されており、ヒト末梢血細胞においても IGF-I の自己分泌機能がある可能性が考えられる。この IGF-I 自己分泌が、外来性の IGF-I の変動による末梢血細胞に対する作用や IGF-I 受容体の発現にも影響を与えている可能性も考えられた。以上より、IGF-I の末梢血細胞に対する作用は多岐にわたるものと考えられ、IGF-I と末梢血細胞との相互関係にはさらなる究明が必要であろう。

## 結 論

ヒト末梢血細胞における IGF-I 受容体の発現を、健康成人、臍帯血および成長ホルモン欠損症について、ヒト IGF-I 受容体抗体  $\alpha\text{IR}3$  を用いた免疫蛍光染色法により解析した。またヒト培養リンパ球における IGF-I 受容体の発現調節および、リンパ球機能と好中球機能における IGF-I の機能的役割を解析し、以下に示す結果を得た。

1. IGF-I 受容体はヒト末梢血細胞のすべてに存在し、顆粒球と単球に強い発現であった。各リンパ球分画では、CD4 陽性細胞で強く CD20 陽性細胞で弱く、また CD45RO 陽性細胞 (メモリー細胞) や HLA-DR 陽性細胞で弱いなど表面抗原の違いにより IGF-I 受容体の発現は異なっていた。IGF-I 受容体の発現は健康成人に比べ臍帯血で強く、成長ホルモン欠損症では有意差は認められず、また成長ホルモン治療によって IGF-I 受容体の発現は減少した。リンパ球と顆粒球における IGF-I 受容体 mRNA の発現はそれぞれの IGF-I 受容体の発現強度に相関した。

2. ヒト培養リンパ球における IGF-I 受容体の発現は、IGF-I 濃度依存性に減少を認めた。リンパ球刺激因子により CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞と CD16 陽性細胞では、IGF-I 受容体の発現の経時的増加を示し、CD20 陽性細胞では培養48時間以降に IGF-I 受容体の発現が減少した。培養リンパ球における IGF-I 受容体 mRNA の発現はその IGF-I 受容体の発現強度に相関した。

3. リンパ球機能において、IGF-I による  $^3\text{H}$ -チミジン摂取率の増強作用と、IgG 産生能の増強作用と、さらに特に CD4 陽性細胞の IL-2 受容体  $\alpha$  鎖陽性率の増加を認めた。NK 細胞活性は IGF-I 添加により減弱した。また好中球機能では IGF-I により  $\text{H}_2\text{O}_2$  産生能の増強を認めたが、貪食能に変化を認めなかった。

以上より、ヒト末梢血細胞には広く IGF-I 受容体が存在しており、IGF-I 受容体の調節は IGF-I 血中濃度だけでなく、特にリンパ球において、細胞活性度や各細胞分画に依存した調節を受けているものと考えられた。また IGF-I にはリンパ球や好中球機能を調節する作用が認められたことから、免疫機能に深く関与していることが示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、研究の御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部小児科学講座小泉晶一教授に深甚なる感謝の意を表します。また直接御指導頂きました小児科学講座五十嵐 登助手、および貴重な御指導や御助言を頂いた、金沢大学医学部医療情報部佐藤 保教授、金沢大学医学部保健学科関 秀俊教授、小児科学講座谷内江昭宏助教授をはじめとする小児科学講座の諸先生方、技術補佐員松川はるみさんに、深謝い

たします。また快く臍帯血を提供して頂いた金沢大学医学部附属病院分娩部の諸先生、および IGF-I 濃度を測定して頂いた金沢大学医学部臨床検査学講座橋本琢磨教授、検査技官の方々に深く御礼申し上げます。

### 文 献

- 1) Salmon Jr.WD, Daughaday WH. A hormonally controlled serum factor which stimulated sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med* 49: 825-836, 1957
- 2) Daughaday WH, Hall K, Raben MS, Salmon Jr.WD, van den Branden JL, van Wyk JJ. Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature* 235: 107, 1971
- 3) Froesch ER, Buerger H, Ramseier EB, Bally P, Labhart A. Antibody-suppressible and nonsuppressible insulin-like activities in human serum and their physiologic significance. *J Clin Invest* 42: 1816-1834, 1963
- 4) Klapper DG, Svoboda ME, van Wyk JJ. Sequence analysis of somatomedin-C: confirmation of identity with insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 112: 2215-2217, 1983
- 5) Froesch ER, Schmid C, Schwander J, Zapt J. Actions of insulin-like growth factors. *Ann Rev Physiol* 47: 443-467, 1985
- 6) Thorsson AV, Hintz RL. <sup>125</sup>I-somatomedin receptors on circulating human mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun* 74: 1566-1573, 1977
- 7) Dooghe C, Grizard G, Labbe A, Dardevet D, Meyer M, Grizard J. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and insulin binding to erythrocytes of normal prepubertal children and adult. *Horm Metab Res* 23: 545-552, 1991
- 8) Stuart CA, Meehan RT, Neale LS, Cintron NM, Furlanetto RW. Insulin-like growth factor-I binds selectively to human peripheral blood monocytes and B-lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 72: 1117-1122, 1991
- 9) Kooijman R, Willem, M, De Haas JC, Rijkers GT, Schuurmans ALG, van Buul-Offers C, Heijman CJ, Zegers BJM. Expression of type I insulin-like growth factor receptors on human peripheral blood mononuclear cells. *Endocrinology* 131: 2244-2250, 1992
- 10) Merchav S, Silvan-Drachler I, Tatarsky I, Lake M, Skottner A. Comparative studies of the erythroid-potentiating effect of biosynthetic human insulin-like growth factor-I and -II. *J Clin Endocrinol Metab* 74: 447-452, 1992
- 11) Merchav S, Lake M, Skottner A. Comparative studies of the granulopoietic enhancing effects of biosynthetic human insulin-like growth factor-I and II. *J Cell Physiol* 157: 178-183, 1993
- 12) Johnson EW, Jones LA, Kozak RW. Expression and function of insulin-like growth factor receptors on anti-CD3-activated human T lymphocytes. *J Immunol* 148: 63-71, 1992
- 13) Schillaci R, Rabauda CM, Randinone CM, Roldan A. Role of insulin-like growth factor-1 on kinetics of human lymphocytes stimulation in serum-free medium. *Immunol Cell Biol* 72: 300-305, 1994
- 14) Schillaci R, Brocardo MG, Roldan A. Co-operative effect between insulin-like growth factor-1 and interleukin-2 on DNA synthesis and interleukin-2 receptor- $\alpha$  chain expression in human lymphocytes. *Immunol Cell Bio* 73: 340-345, 1995
- 15) Yarchoan R, Tosato G, Blaese RM, Simon RM, Nelson DL. Limiting dilution analysis of Epstein-Barr virus-induced immunoglobulin production by human B cells. *J Exp Med* 157: 1-14, 1983
- 16) Rosenfeld RG, Thorsson AV, Hintz RL. Increased somatomedin receptor sites in newborn circulating mononuclear cells. *J Clin Endocrinol Metab* 48: 456-461, 1979
- 17) Tapson VF, Boni-Schnetzler M, Pilch PF, Center DM, Berman JS. Structural and functional characterization of the human T lymphocyte receptor for insulin-like growth factor I in vitro. *J Clin Invest* 82: 950-957, 1988
- 18) Hartmann KK, Baier TG, Papa V, Kronenwett M, Brown EJ, Goldfine ID, Rosenthal SM. A monoclonal antibody to the T-cell receptor increases IGF-I receptor content in normal T-lymphocytes: comparison with phytohemagglutinin. *J Cell Biochem* 48: 81-85, 1992
- 19) Eshet R, Werner H, Klinger B, Silbergeld A, Laron Z, Le Roith D, Roberts CT Jr. Up-regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor gene expression in patients with reduced serum IGF-I levels. *J Mol Endocrinol* 10: 115-120, 1993
- 20) Eshet R, Klinger B, Silbergeld A, Laron Z. Modulation of IGF-I receptors by exogenous hGH treatment in constitutionally short children. *Clin Endocrinol* 39: 687-693, 1993
- 21) Mandel S, Moreland E, Nichols V, Hann, C, Lafranchi S. Changes in insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-binding protein-3, growth hormone (GH)-binding protein, erythrocyte IGF-I receptors, and growth rate during GH treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 190-194, 1995
- 22) Eshet R, Klinger B, Silbergeld A, Laron Z. Modulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) binding sites on erythrocytes by IGF-I treatment in patients with Laron syndrome (LS). *Regul Pept* 48: 233-239, 1993
- 23) el-Andere W, Lerario AC, Giannella N, Wajchenberg BL. Erythrocyte insulin-like growth factor-I receptor evaluation in normal subjects, acromegalics, and growth hormone-deficient and insulin-dependent diabetic children. *Metabolism* 44: 923-928, 1995
- 24) Xu X, Mardell C, Xian CJ, Zola H, Read LC. Expression of functional insulin-like growth factor-1 receptor on lymphoid cell subsets of rats. *Immunology* 85: 394-399, 1995
- 25) Kozak RW, Haskell JF, Greenstein LA, Rechler MM, Waldmann TA, Nissley SP. Type I and II insulin-like growth factor receptors on human phytohemagglutinin-activated T lymphocytes. *Cell Immunol* 109: 318-331, 1987
- 26) Kooijman R, Scholtens LE, Rijkers GT, Zegers BJM. Differential expression of type I insulin-like growth factor receptors in different stages of human T cells. *Eur J Immunol* 25: 931-935, 1995
- 27) Rechler MM, Nissley NP. The nature and regulation of the receptors for insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol* 47: 425-442, 1985
- 28) Kull FC, Jacobs S, Su YF, Svoboda ME, van Wyk JJ, Cuatrecasas P. Monoclonal antibodies to receptor for insulin and somatomedin C. *J Biol Chem* 258: 6561-6566, 1983

- 29) Span JP, Pieters GF, Smals AG, Koopmans PP, Kloppenborg PW. Number and percentage of NK-cells are decreased in growth hormone-deficient adults. *Clin Immunol Immunopathol* 78: 90-92, 1996
- 30) Gupta S, Fikrig SM, Noval MS. Immunological studies in patients with isolated growth hormone deficiency. *Clin Exp Immunol* 54: 87-90, 1983
- 31) Kiess W, Malozowski S, Gelato M, Butenand O, Doerr H, Crisp B, Eisl E, Maluishi A, Belohradsky BH. Lymphocyte subset distribution and natural killer activity in growth hormone deficiency before and during short-term treatment with growth hormone releasing hormone. *Clin Immunol Immunopathol* 48: 85-94, 1988
- 32) Rao JK, Gebhardt BM, Blethen SL. Somatomedin production and response to mitogen by lymphocytes in children with growth hormone deficiency. *Growth* 50: 456-460, 1986
- 33) Rapaport R, Oleske J, Ahdieh H, Solomon S, Delfaus C, Denny T. Suppression of immune function in growth hormone-deficient children during treatment with human growth hormone. *J Pediatr* 109: 434-439, 1986
- 34) Bozzola M, Ciaternino M, Valtorta A, Moretta A, Biscaldi I, Maghnie M, De-Amici M, Schimpff RM. Effect of biosynthetic methionyl growth hormone (GH) therapy on the immune function in GH-deficient children. *Horm Res* 31: 153-156, 1989
- 35) Petersen BH, Rapaport R, Henry DP, Huseman C, Moore WV. Effect of treatment with biosynthetic human growth hormone (GH) on peripheral blood lymphocyte populations are function in growth hormone-deficient children. *J Clin Endocrinol Metab* 70: 1756-1760, 1990
- 36) Badolato R, Bond HM, Valerio G, Petrella A, Morrone A, Waters MJ, Venuta S, Tenore A. Differential expression of surface membrane growth hormone peripheral blood lymphocytes by dual flow fluorescence flow cytometry. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 984-990, 1994
- 37) Yoshida A, Ishioka C, Kimata H, Mikawa H. Recombinant human growth hormone stimulates B cell immunoglobulin synthesis and proliferation in serum-free medium. *Acta Endocrinol (Copenh)* 126: 524-529, 1992
- 38) Warwick DJ, Lowrie DB, Cole PJ. Growth hormone is a human macrophage activating factor. Priming of human monocytes for enhanced release of  $H_2O_2$ . *J Immunol* 154: 1909-1918, 1995
- 39) Kimata H, Yoshida A. Differential effect of growth hormone and insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-II, and insulin on Ig production and growth in human plasma cells. *Blood*: 1569-1574, 1994
- 40) Jardieu P, Clark R, Mortenson D, Dorshkind K. In vivo administration of insulin-like growth factor-I stimulates primary B lymphopoiesis and enhances lymphocyte recovery after bone marrow transplantation. *J Immunol* 152: 4320-4327, 1994
- 41) Clark R, Strasser J, McCabe S, Robbins K, Jardieu P. Insulin-like growth factor-1 stimulation of lymphopoiesis. *J Clin Invest* 92: 540-548, 1993
- 42) Schurmann A, Spencer GSG, Berry CJ, Decuyper E, Goddeeris B. Evidence for suppression of immune function by insulin-like growth factor-1 in dwarf rats in vivo. *Experientia* 52: 55-59, 1996
- 43) Kimata H, Yoshida A. Effect of growth hormone and insulin-like growth factor-I on immunoglobulin production by and growth of human B cells. *J Clin Endocrinol Metab* 78: 635-641, 1994
- 44) Bjerknes R, Aarskog D. Priming of human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes by insulin-like growth factor I: increased phagocytic capacity, complement receptor expression, degeneration, and oxidative burst. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 1948-1955, 1995
- 45) Jin GF, Guo YS, Ball C, Houston CW. Insulin-like growth factors enhance phagocytosis by human neutrophils in vitro. *Regul Pept* 49: 125-131, 1993
- 46) Hunt P, Eardley DD. Suppressive effect of insulin and insulin-like growth factor-1 (IGF1) on immune responses. *J Immunol* 136: 3994-3999, 1986
- 47) Merimee TJ, Grant MB, Broder CM, Cavalli-Sforza LL. IGF-I secretion by human B-lymphocytes: a comparison of cells from normal and pigmy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 69: 978-984, 1989
- 48) Geffer ME, Bersch N, Lippe BM, Rosenfeld RG, Hintz RL, Golde DW. Growth hormone mediates the growth of T-lymphoblast cell lines via locally generated insulin-like growth factor-I. *J Clin Endocrinol Metab* 71: 464-469, 1990
- 49) Baxter JB, Blalock JE, Weighent DA. Characterization of immunoreactive insulin-like growth factor from leukocytes and its regulation by growth hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 74: 1727-1734, 1991

**Expression and Regulation of Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) Receptor on Human Peripheral Blood Cells and Functional Effects of IGF-I on Immune Systems** Satoshi Takakuwa, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med Soc., **106**, 128—142 (1997)

**Key words** insulin-like growth factor-I (IGF-I), human peripheral blood cells, IGF-I receptor regulation, immune systems

**Abstract**

In this study, the expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor on human peripheral blood cells from healthy adults and growth hormone (GH) deficient patients, and on cord blood cells were analyzed by immunofluorescent assay using  $\alpha$ IR3, anti-human IGF-I receptor antibody. The expression of IGF-I receptor mRNA in human lymphocytes and neutrophils was analyzed by reverse transcribed PCR method. Furthermore, *in vitro*  $\alpha$ IR3 bindings on human lymphocytes, and immunological functions of human lymphocytes and neutrophils were examined in various concentrations of IGF-I. *In vivo*,  $\alpha$ IR3 bindings were detectable on all human peripheral blood cells, strongly expressed on granulocytes and monocytes. In subpopulations of human lymphocytes,  $\alpha$ IR3 bindings presented different intensities; high intensity on CD4<sup>+</sup> cells, low intensity on CD20<sup>+</sup> cells, and much lower intensity on HLA-DR<sup>+</sup> cells and CD45RO<sup>+</sup> cells. Compared with  $\alpha$ IR3 bindings on peripheral blood cells from healthy adults, those on cord blood cells were more intensive, but those on CD4<sup>+</sup> cells and CD8<sup>+</sup> cells were not significant. The expression of IGF-I receptor mRNA was more intensive in cord blood cells than in peripheral blood cells from healthy adults. In GH deficient adults,  $\alpha$ IR3 bindings on peripheral blood cells, except for on CD20<sup>+</sup> cells, did not present a higher intensity than in healthy adults. While GH therapy raised serum IGF-I level,  $\alpha$ IR3 bindings and the expression of IGF-I mRNA decreased in GH deficient children. Subsequently, *in vitro*  $\alpha$ IR3 bindings on human lymphocytes decreased with concentration of IGF-I, and increased after stimulation with phytohemagglutinin and interleukin-2 (IL-2). The expression of IGF-I receptor mRNA corresponded to the intensity of  $\alpha$ IR3 bindings. In immunologically functional analysis, IGF-I built up <sup>3</sup>H-Thymidine incorporation and IgG production of human lymphocytes, and IGF-I produced the expression of IL-2 receptor  $\alpha$ -chain on CD4<sup>+</sup> cells. In contrast, IGF-I showed an adverse effect on natural killer cell activity. IGF-I also stimulated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production of neutrophils, but did not enhance phagocytosis. This study suggested that IGF-I receptors, shown as intensity of  $\alpha$ IR3 bindings, exist on all human peripheral blood cells. Because of different expressions of IGF-I receptors on subpopulations of human lymphocytes and various immunologic functions of IGF-I, the expression of IGF-I on those cells was suggested to be regulated not only by serum IGF-I levels but by the functional states of those cells.