

Insulin-like growth factor-I receptor の dominant negative を用いた胃癌に対する治療

足立 靖、関 永芬、Arisa Imsumran、山本 博幸、
有村 佳昭、石田 禎夫、遠藤 高夫、今井 浩三

札幌医科大学 第一内科

1. はじめに

わが国において胃癌は依然、発生率が高く、死因として多い悪性腫瘍である。胃癌は組織型が多様であり、低分化癌は発見時にしばしば転移を形成している。さらに、腹膜播種することも少なくなく、手術、抗癌剤など既存の治療法以外の治療手段の確立が望まれている。最近、正常細胞と比較して癌細胞に発現が多い分子・蛋白を標的とすることにより、副作用を抑えつつ効果が得られる、分子標的療法に関心が集まってきている。このような状況の元で、Bcr-abl、Her2-neu、EGF receptorなどを標的とした治療薬が実際の臨床の場で使用できるようになってきている。

インスリン様増殖因子 Insulin-like growth factor (IGF) とその受容体 IGF-I receptor (IGF-Ir) は様々な腫瘍の発生・進展に関与している¹⁾。胃癌においても IGF-Ir とそのリガンドである IGF-I、IGF-II が癌細胞増殖に重要な働きをしていることが報告されている²⁻⁴⁾。

IGF-Ir は受容体型チロシンキナーゼ群に属し、 α 鎖（細胞外ドメイン）2本と β 鎖（膜貫通ドメイン+チロシンキナーゼ・ドメイン）2本からなる4量体を形成している（図1）⁵⁾。リガンドと結合した後にチロシンキナーゼのリン酸化が起これ、MAPK、Aktなどの下流のシグナルが活性化され、細胞増殖・アポトーシス回避など癌細胞の生存に有利に作用する。

これまでの知見から、① IGF-Ir のノックアウトマウスは、野生型に対し個体は小さいものの生まれてくる⁶⁾。② IGF-Ir の発現を抑制した場合に、

癌細胞においてはアポトーシスが誘導されるが、正常細胞では増殖停止しか起こらない⁷⁾。以上から、IGF-Ir は必ずしも生存に不可欠なものではないと考えられる。一方、IGF-Ir とそのリガンドである IGF-I、IGF-II は様々な腫瘍に過剰発現していることが知られており、さらに、血清 IGF-I 高値は大腸癌をはじめとする種々の癌の危険因子となりうるということが報告されている⁸⁾。従って、IGF-Ir は癌治療における良い分子標的となりうるということが考えられ、その開発が重要と考えられる。

われわれは IGF-Ir cDNA 全長からアミノ酸 950bp で終了する IGF-Ir/950st と 482bp で終了する IGF-Ir/482st の 2 種類の IGF-Ir に対する dominant negative (dn), IGF-Ir/dn を作成した（図1）^{9, 10)}。IGF-Ir/950st は IGF-Ir の細胞外ドメインおよび細胞膜貫通ドメインからなるが、チロシンキナーゼ・ドメインを欠く構造を持つ。一方、IGF-Ir/482st は IGF-Ir の細胞外ドメインのみからなり、分泌型の蛋白として発現されるため、いわゆる bystander 効果が期待される。

以上の2種類の IGF-Ir/dn をアデノウイルス発現ベクターに組み込んだ（Ad-IGF-Ir/dn; Ad-IGF-Ir/482st, Ad-IGF-Ir/950st）。

これまでわれわれは、IGF-Ir/dn を大腸癌・膵癌・肺癌細胞株に導入し、以下の知見を得ることができ、報告してきた。① IGF-Ir/dn が大腸・膵・肺癌細胞株の *in vitro* での腫瘍形成・増殖を抑制し、アポトーシスを誘導し、抗癌剤の治療効果を増強した。② IGF-Ir/482st は分泌型のため、いわゆる bystander 効果を持ち、導入細胞周囲の細胞

に対しても効果を認めた。③ IGF-Ir/dn の効果は、主に Akt-1 を介したシグナルを障害することにより得られていた。④ マウスを用いた研究で IGF-Ir/dn は皮下腫瘍形成を抑制し、生着した腫瘍を縮小することができるなど、IGF-Ir/dn の *in vivo* における効果を明らかにした⁹⁻¹¹⁾。

今回、Ad-IGF-Ir/dn を用いて胃癌細胞株に IGF-Ir/dn を発現させ、腫瘍細胞増殖の抑制、アポトーシスの誘導を検討するとともに、IGF-Ir 阻害による下流シグナルの変化を解析した。さらに、マウスを用いて Ad-IGF-Ir/dn の *in vivo* における効果を検討し、進行胃癌に対する治療の確立を目指した。

2. 方法

今回の研究に、2種類の IGF-Ir/dn 発現ウイルスとコントロール・ウイルス (Ad-LacZ) を用いた。IGF-Ir のリガンドとして IGF-I、IGF-II を使用した。

Ad-IGF-Ir/dn を用いて胃癌細胞株 MKN45 に IGF-Ir/dn を発現させ、胃癌細胞株の *in vitro* における増殖能に与える影響を trypan blue assay を用いて評価した。

5%エタノール (1時間)、抗癌剤 (5FU)、放射線、等の刺激はアポトーシスを誘導することが知られている。IGF-Ir/dn を強制発現させることにより、これらのアポトーシス誘導能に与える影響を検討した。アポトーシスの検討には、DNA fragmentation assay と Caspase-3 colorimetric protease assay を用いた。

IGF-Ir の下流シグナルの代表的なものに PI3-K を介した Akt-1 の系、ERK-1/-2, p38 を含む MAPK スーパーファミリーを介した系などが知られている。IGF-Ir/dn によってもたらされる胃癌細胞株における IGF-Ir の下流シグナルに起こる変化を、PI3-K/Akt-1系と MAPK 系を中心に解析した。なお、IGF-Ir の下流シグナルの解析には、Western blot assay, kinase assay を用いた。

IGF-Ir/482st は分泌型蛋白であり、bystander effect が期待できる。Ad-IGF-Ir/482st の感染が成立

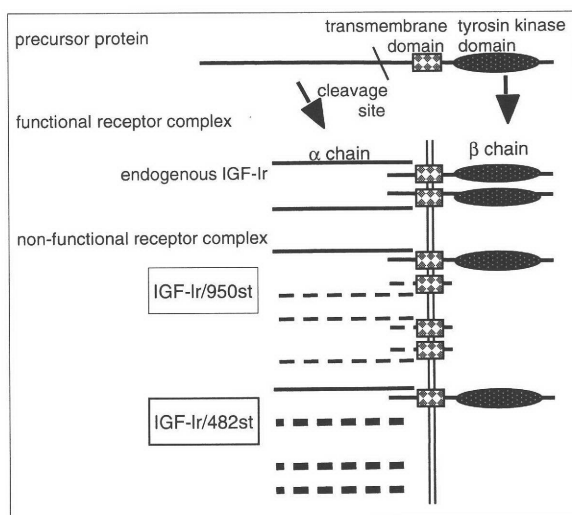


図1 IGF-Ir は α 鎖 2 本と β 鎖 2 本からなる 4 量体である。IGF-Ir/950st は α 鎖と膜貫通ドメインからなり導入細胞の細胞膜上に発現する。IGF-Ir/482st は膜貫通ドメインを欠き、 α 鎖のみからなる分泌型で bystander 効果が期待される。

した細胞周囲の胃癌細胞に与える影響を、細胞増殖能およびアポトーシス誘導能を中心として解析した。

IGF-Ir/dn の生体内での効果を評価するため、マウスを用いた実験を行った。① Ad-IGF-Ir/dn および Ad-LacZ を感染させた胃癌細胞株をマウス皮下に移植し、IGF-Ir/dn の *in vivo* 腫瘍発生に対する抑制効果を検討した。② マウス皮下に形成させたヒト胃癌腫瘍に対して Ad-IGF-Ir/dn を腫瘍内注入することにより、その抗腫瘍効果を評価した。③ さらに、マウス皮下腫瘍に対する Ad-IGF-Ir/dn と化学療法 (5-FU など) との併用効果について調査した。④ マウスを用いた実験を通して、生体に与える副作用を評価し、Ad-IGF-Ir/dn の安全性に関する検討を行った。

以上から、IGF-Ir/dn の臨床研究への可能性を検討した。

3. 結果

12種類のヒト胃癌細胞株において、IGF-I, IGF-II の mRNA 発現は様々であったが、IGF-Ir mRNA はほぼ全ての細胞株で発現を認めた。その中で、

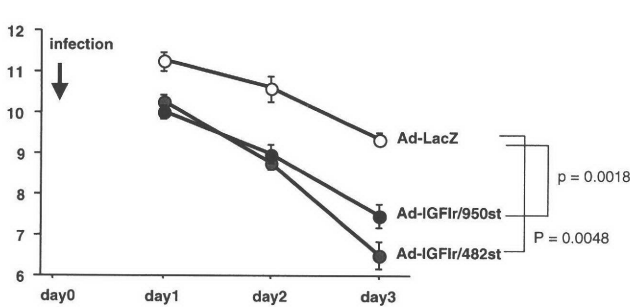


図2 ウイルスを感染させた胃癌細胞株 MKN45 は増殖が低下した。2種類の Ad-IGF-Ir/dn はコントロール細胞に比較して、さらに有意に増殖を抑制した。

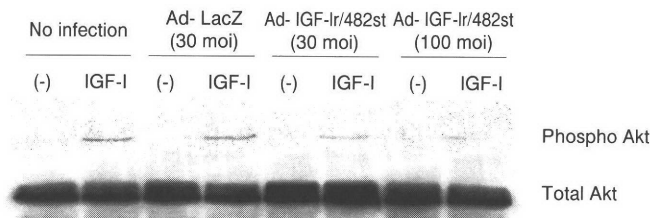


図4 IGF-I の刺激で Akt-1 はリン酸化を受ける (Western blot assay)。2種類の IGF-Ir/dn は IGF-I による Akt リン酸化を抑制した。

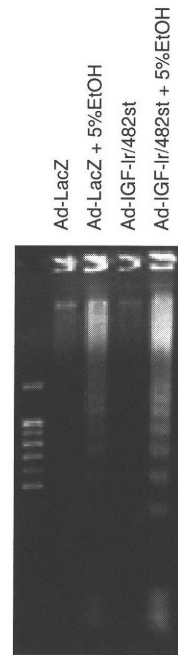


図3 MKN45を5% ethanolで刺激すると、アポトーシスが誘導されることがDNA fragmentation assay から判る。IGF-Ir/dn 発現細胞においてアポトーシスは増強される。

胃癌細胞株 MKN45 を用いて Ad-IGF-Ir/dn を感染させたところ、IGF-Ir/dn が用量依存的に発現増加した。胃癌細胞株に IGF-Ir/dn を発現させたところ、コントロールに比較して *in vitro* 増殖能を有意に抑制した (図2)。IGF-Ir の dn を強制発現させると5% ethanol によるアポトーシスの誘導能を明らかに増強した (図3)。IGF-Ir/dn は *in vitro* における5-FU によるアポトシス誘導効果を増幅し、さらに、放射線によるアポトーシス誘導能を増強した。dn の増殖抑制とアポトーシス誘導効果は IGF-Ir/482st の方が950st より大きかった。

さらに、ヌードマウスを用いた実験系においても、IGF-Ir/dn は腫瘍形成を抑制し、生着した腫瘍の進展を明らかに抑制した。IGF-Ir/dn は5-FU の腹腔内投与による抗腫瘍効果を増強した。なお、マウスに対して明らかな有害事象は認めなかった。

IGF-Ir の下流シグナルの解析から、以上の効果は主として Akt-1 の抑制を介して発現されていた

(図4)。

胃癌細胞における IGF-Ir/dn の効果は、大腸癌・膵癌・肺癌細胞に対する効果に遜色のないものであった。

4. 考察

アデノウイルス発現ベクターを利用した IGF-Ir の dominant negative による癌治療の試みは、現時点において、われわれの大腸・膵・肺癌をターゲットとした研究以外には報告されていない⁹⁻¹¹⁾。IGF-Ir/dn は胃癌細胞株に対しても有効であったことから、より広範な癌に対してその効果が期待されよう。

また、臨床応用を目指す点から、今回の研究にはアデノウイルスベクターを用いた。近年、アデノウイルスベクターの問題点が明らかになってきているが、他の遺伝子導入ベクターに比較すると臨床的な使用が可能であることから、より安全で

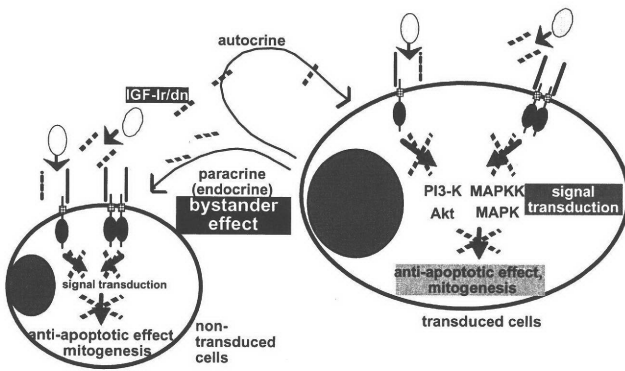


図 5 *in vitro*、*in vivo* 共に IGF-Ir/482st は IGF-Ir/950st に比較してより効果が強かった。その理由として、IGF-Ir/482st は分泌型蛋白のため、導入細胞のみならず周囲の細胞に対しても機能したためと思われた (bystander 効果)。

有効なベクターが得られれば臨床研究も充分可能と考えている。

今回の研究においても、IGF-Ir/482st が 950st より、強い抗腫瘍効果を示していた。その理由としては、分泌型である IGF-Ir/482st はいわゆる bystander effect を持ち併せていたためと考えられた (図 5)。なお、われわれのこれまでの検討から、dominant negative による IGF-Ir の抑制効果は、IGF-Ir の antisense DNAs を用いたものと比較してより効果的であった^{11, 12)}。

一方、化学療法・放射線療法に伴う問題点の一つに耐性がある。抗癌剤 (放射線) 誘導性アポトーシスを回避した癌細胞にアポトーシス誘導可能になることは、癌治療の可能性が広がることと考えられる。

今回の研究過程において、IGF-Ir/dn は胃癌細胞株の遊走能を低下させる可能性、浸潤能を抑制する可能性を有することが示唆された。一方、IGF-Ir/dn はマウス皮下腫瘍の腫瘍血管の数を減少させたことから、IGF-Ir シグナルが血管生成に関与することも考えられた。今後、胃癌における運動能、浸潤能、血管新生に対する IGF-Ir/dn の効果を検討していきたい。

【文献】

- 1) Baserga R: The IGF-I receptor in cancer research. *Exp Cell Res* 1999; 253(1): 1-6.
- 2) Shiraishi T, Mori M, Yamagata M, Haraguchi M, Ueo H, Sugimachi K: Expression of insulin-like growth factor 2 mRNA in human gastric cancer. *Int J Oncol* 1998; 13(3): 519-23.
- 3) Yi HK, Hwang PH, Yang DH, Kang CW, Lee DY: Expression of the insulin-like growth factors

(IGFs) and the IGF-binding proteins (IGFBPs) in human gastric cancer cells. *Eur J Cancer* 2001; 37(17): 2257-63.

- 4) Pavelic K, Kolak T, Kapitanovic S, et al.: Gastric cancer: the role of insulin-like growth factor 2 (IGF 2) and its receptors (IGF 1R and M6-P/IGF 2R). *J Pathol* 2003; 201(3): 430-8.
- 5) Ullrich A, Gray A, Tam AW, et al.: Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *Embo J* 1986; 5(10): 2503-12.
- 6) Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A: Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 1993; 75(1): 59-72.
- 7) Baserga R: Oncogenes and the strategy of growth factors. *Cell* 1994; 79(6): 927-30.
- 8) Yu H, Rohan T: Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(18): 1472-89.
- 9) Adachi Y, Lee CT, Coffee K, et al.: Effects of genetic blockade of the insulin-like growth factor receptor in human colon cancer cell lines. *Gastroenterology* 2002; 123(4): 1191-204.
- 10) Lee CT, Park KH, Adachi Y, et al.: Recombinant adenoviruses expressing dominant negative insulin-like growth factor-I receptor demonstrate antitumor effects on lung cancer. *Cancer Gene Ther* 2003; 10(1): 57-63.
- 11) Min Y, Adachi Y, Yamamoto H, et al.: Genetic Blockade of the Insulin-like Growth Factor-I Receptor: A Promising Strategy for Human Pancreatic Cancer. *Cancer Res* 2003; 63(19): 6432-41.
- 12) Lee CT, Wu S, Gabrilovich D, et al.: Antitumor effects of an adenovirus expressing antisense insulin-like growth factor I receptor on human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1996; 56(13): 3038-41.