

K-ras 変異を伴う消化器癌における インスリン様増殖因子受容体を標的とした治療

足立 靖^{1), 2)}、井伊 正則¹⁾、須河 恭敬¹⁾、中澤 眞由美¹⁾、谷口 博昭³⁾、
能正 勝彦¹⁾、鈴木 拓¹⁾、山本 博幸¹⁾、有村 佳昭¹⁾、今井 浩三³⁾、篠村 恭久¹⁾

1) 札幌医科大学第一内科、2) 札幌しらかば台病院、3) 東京大学医科学研究所

はじめに

胃・大腸・肝・膵癌などの消化器癌は本邦における悪性新生物の死亡原因として男女共に上位 5 位の中に 4 種を占めていることから、消化器癌に対する新規治療戦略の確立が必要とされている。

インスリン様増殖因子受容体 (Insulin-like growth factor-I receptor; IGF-IR) はリガンドであるインスリン様増殖因子 (Insulin-like growth factors; IGF-I および IGF-II) 結合後に、自己リン酸化および基質のリン酸化が起こり、下流にシグナルが伝達される。代表的な下流経路に phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) /Akt-1 系と Ras/Raf/Mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK) 系がある (図 1)^{1), 2)}。IGFs および IGF-IR は、食道癌、胃癌、大腸癌、膵癌、肝癌、胆道癌など消化器癌で過剰発現している^{1), 3), 4)}。血清 IGF-I 高値と、その調節因子である IGF 結合蛋白 (IGFBP) -3 低値が大腸癌を含む種々の癌の危険因子となることが知られている。IGF-IR の過剰なシグナルは腫瘍発生に関与し、細胞増殖、アポトーシ回避

など、癌細胞の生存に有利に働く。さらに、IGF シグナルは遊走能、浸潤能、血管増生能を亢進させ、癌の転移・進展に関与していることをわれわれは報告してきた^{5), 6)}。外因性 IGF 添加により癌細胞の増殖が刺激される。一方、IGF-IR のシグナルを抑制することにより、腫瘍細胞にアポトーシスが誘導されるが、正常細胞は増殖抑制を認めるのみである。IGF-IR ノックアウトマウスは野生型と比較して小振りだが生誕することから、IGF-IR が欠損してもある程度の分化・増殖が可能と考えられる。そこでわれわれは、消化器癌において IGF-IR を分子標的とした治療法を開発することを目指してきた。これまでの検討から、われわれは抗 IGF-IR 療法が有望な治療法となりうることを報告してきた (図 2)。IGF/IGF-IR シグナルを阻害する方法は各種あるが、われわれは IGF-IR に対する dominant negative (dn, IGF-IR/dn) を主に用いてきた。

一方、k-ras 遺伝子に機能獲得性変異が起こることが、消化器癌の発生・伸展に深く影響することも知られている。K-ras 変異を持つ消化器癌は抗上皮成長因

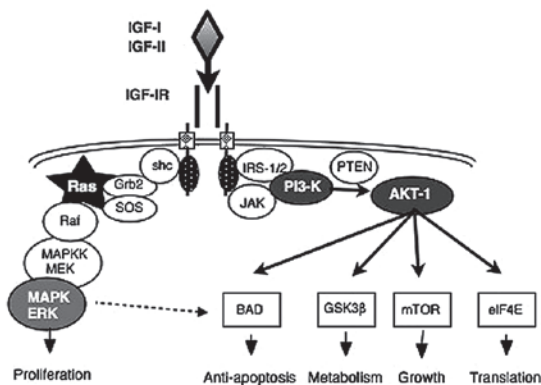


図 1 IGF-IR の役割と Ras を含む下流シグナル

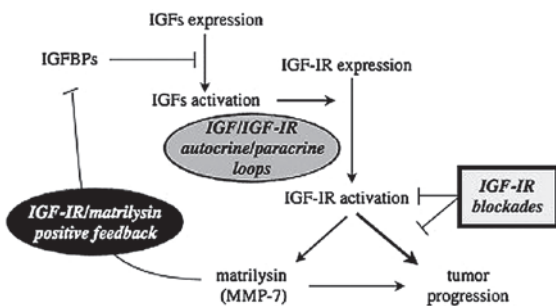


図 2 消化器癌の進展における IGF-IR の役割と分子標的

子受容体 (epidermal growth factor receptor; EGFR) 抗体に抵抗性を示すため、このような k-ras 変異消化器癌に対する新たな治療戦略が必要とされている。本研究では、k-ras 変異を有する消化器癌に対する IGF-IR 標的治療の可能性を検討する。

方法：

消化器癌細胞株のなかで、k-ras 野生株として大腸癌 HT29、膵癌 BxPC-3などが、k-ras 変異株として大腸癌 DLD1、膵癌 MIAPaca2などがある。これらの細胞株を用いて、IGF-IR 阻害による、増殖抑制効果、アポトーシス誘導効果、シグナル伝達抑制を検討した。in vitro 増殖能の評価には、WST-1アッセイ、コロニー形成アッセイを用いた。アポトーシスの検討は caspase-3 assay および Anesin-V assay を用いた。Western blot 法、免疫沈降法を用いて IGF-IR 下流のシグナル伝達を検討した。

さらにヌードマウス皮下移植モデルを用いて、IGF-IR 阻害治療を行い、生体における IGF-IR 分子標的治療の抗腫瘍効果を評価する。

なお、IGF-IR を阻害する方法として、抗 IGF-IR モノクローナル抗体、CP-751,871を用いた。さらに、アデノウイルス発現ベクターに組み込んだ IGF-IR/dn (Ad-IGF-IR/dn) を用いた。

結果：

IGF-IR を阻害することにより、消化器癌細胞株のコロニー形成は著明に抑制された (図 3)。コロニー形成は用量依存的に抑制された。

5-FU や gemcitabine などの抗癌剤は消化器癌細胞株にアポトーシスを誘導することができる。IGF-IR を抑制することにより、抗癌剤によるアポトーシスの誘導能は明らかに増強された (図 4)。

リガンドの刺激により、IGF-IR はリン酸化を受け、その下流シグナルが活性化する。IGF-IR 阻害により、リガンドによる受容体の活性化は抑制された。さらに受容体の下流シグナルである Akt-1、ERKs 等のリン酸化を抑制することができた。

以上の結果は、k-ras 野生株である大腸癌 HT29、膵癌 BxPC-3において認められ、さらに k-ras 変異株である大腸癌 DLD1、膵癌 MIAPaca2においても同様であった。

消化器癌細胞株をヌードマウス皮下に生着させた後に、IGF-IR シグナルを抑制したところ、コントロールと比較して腫瘍の進展は明らかに抑制された。さらに、CP-751,871は5-FU や gemcitabine などの抗癌剤の抗腫瘍効果を増強した。一方、マウスに明らかな有害事象は認められなかった。k-ras 野生株を用いた実験と、k-ras 変異株を用いた検討で、IGF-IR 抗体の腫瘍抑制効果に大きな差は認めなかった。この様に、マウスを用いた実験においても、in vitro の結果と同様に、IGF-IR 阻害効果は k-ras の変異に影響を受けなかった。

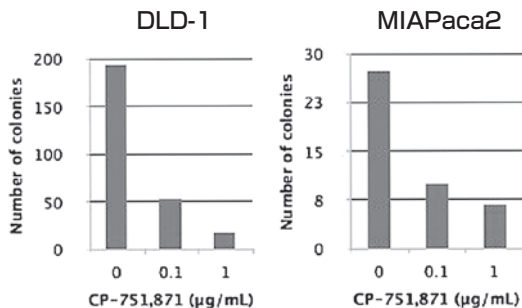


図 3 IGF-IR 抗体による消化器癌のコロニー形成抑制効果

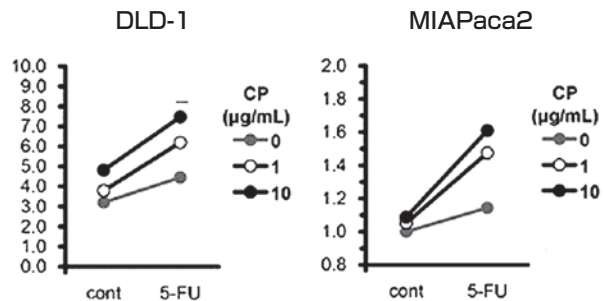


図 4 IGF-IR 阻害によるアポトーシス増強
Caspase-3を用いた検討で、IGF-IR 阻害は5-FU のアポトーシス誘導効果を増強した

考察：

K-ras 遺伝子に機能獲得性変異を伴う症例は、大腸癌において40-45%、膵臓癌では70-90%に認められるといわれ、k-ras 変異は癌の伸展にかかわっていると報告されている。最近の研究成果により、いくつかの分子標的薬が臨床の現場において消化器癌に対して使用可能となってきた。抗 EGFR 抗体である cetuximab は大腸癌をはじめとする消化器癌の治療に有用な治療薬であり、世界的に大腸癌に対する first line 治療薬となろうとしているが、k-ras 変異を有する腫瘍に対しては効果が極めて限定的と報告されている。従って、k-ras 変異を持つ消化器癌に対する新たな分子標的が望まれており、IGF-IR がその候補の一つと考えられている。

IGF-IR は他の増殖因子受容体と異なり、腫瘍において遺伝子変異は見つかっていない。一方、消化器癌細胞において、IGF および IGF-IR が過剰発現しており、IGF は autocrine/paracrine 的に腫瘍進展にかかわっている (IGF/IGF-IR autocrine/paracrine loops, 図2)²⁾。さらに、IGF-IR シグナルは matrilysin (matrix metalloproteinase-7) の産生/活性化を通して、IGFBP を分解し、非結合型 (活性化) IGF-I を増加し、IGF シグナルを活性化するという IGF-IR/matrilysin positive feedback も、腫瘍進展に大きくかかわっていることをわれわれは報告してきた (図2)⁵⁾。

今回われわれは、IGF-IR 阻害薬が k-ras の変異の有無にかかわらずに抗腫瘍効果をもつことを明らかにした (図3、4)。しかし、なぜ k-ras 変異があっても、抗 IGF-IR 療法が有効であるのか、その詳細なメカニズムは分かっていない。今回実験に用いた、DLD-1、MIAPaca2にはたまたま有効であったのか？ さらなる検討が必要と思われた。われわれの検討では、k-ras に変異がある食道扁平上皮癌細胞株 TE-1 に対しても、CP-751, 871は抗腫瘍効果を示していたことから、IGF-IR 標的治療は広範な消化器癌に有効では、と期待している。

これらのメカニズムを検討するため、k-ras 野生型の消化器癌細胞株に、機能獲得型 k-ras 変異を強制発現させ、抗 IGF-IR 治療の効果を比較検討したいと考えている。さらに、下流シグナルを詳細に検討していくことも必要であろう。これまでの検討から、消化

器癌において IGF-IR シグナルの下流のうち、PI3-K/Akt の経路が Ras/Raf/ERK (MAPK) の経路より重要な役割を担っており、IGF-IR 阻害の際に Akt-1経路がより著明に抑制されていた印象がある。このことが、抗 EGFR 治療が無効であるにもかかわらず、抗 IGF-IR 療法が有効であった理由の一つであるかもしれない。EGFR と IGF-IR は receptor tyrosine kinase (RTK) superfamily に属するが、IGF-IR はインスリン受容体とともに、他の RTK と別グループに位置している。このことも、ともに下流シグナルの一つとして k-ras を持ちながら、治療効果の差となっている可能性もあろう。

今回の検討から、IGF-IR 阻害は k-ras 変異型を含む消化器癌に対して広く有用であると期待された。今後、検討を重ねることにより、その機序を解析し、臨床応用に向けて取り組んで行きたい。

文献

- 1) Adachi Y, Yamamoto H, Imsumran A, et al. Insulin-like growth factor-I receptor as a candidate for a novel molecular target in the gastrointestinal cancers. *Dig Endosc.* 2006;18(4):245-51.
- 2) Adachi Y, Yamamoto H, Ohashi H, et al. A candidate targeting molecule of insulin-like growth factor-I receptor for gastrointestinal cancers. *World J Gastroenterol.* 2010;16(46):5779-89.
- 3) Imsumran A, Adachi Y, Yamamoto H, et al. Insulin-like growth factor-I receptor as a marker for prognosis and a therapeutic target in human esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis.* 2007;28(5):947-56.
- 4) Ohashi H, Adachi Y, Yamamoto H, et al. Insulin-like growth factor receptor expression is associated with aggressive phenotypes and has therapeutic activity in biliary tract cancers. *Cancer Sci.* 2012;103(2):252-61.
- 5) Adachi Y, Li R, Yamamoto H, et al. Insulin-like growth factor-I receptor blockade reduces the invasiveness of gastrointestinal cancers via blocking production of matrilysin. *Carcinogenesis.* 2009;30(8):1305-13.
- 6) Li H, Adachi Y, Yamamoto H, et al. Insulin-like growth factor-I receptor blockade reduces tumor angiogenesis and enhances the effects of bevacizumab for a human gastric cancer cell line, MKN45. *Cancer.* 2011;117(14):3135-47.