

## IGF-I 受容体を分子標的とした k-ras 変異を伴う膵臓癌に対する治療

足立 靖<sup>1), 2)</sup>、松永 康孝<sup>1)</sup>、須河 恭敬<sup>1)</sup>、中澤 眞由美<sup>1)</sup>、谷口 博昭<sup>3)</sup>、  
能正 勝彦<sup>1)</sup>、鈴木 拓<sup>1)</sup>、山本 博幸<sup>1)</sup>、有村 佳昭<sup>1)</sup>、今井 浩三<sup>3)</sup>、篠村 恭久<sup>1)</sup>

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・結腸(直腸)・肝臓・膵臓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。これら悪性腫瘍は罹患率に比較し、死亡原因として上位にあることから、消化器癌に対する新規治療法の開発が求められている。特に膵臓癌は悪性度が高く、手術以外に根治療法はなく、さらに、早期に発見することが極めて困難なため、新たな治療戦略が必要とされている。

近年、各種増殖因子受容体に対する分子標的薬が開発され、臨床応用されている。抗上皮増殖因子受容体(EGFR)抗体である cetuximab は大腸癌に対する第一選択薬となりつつあり、erlotinib は膵臓癌に対して効能が認められた。一方、k-ras 遺伝子に機能獲得性変異が起こると癌の進展につながり、抗EGFR抗体の抗腫瘍効果は限定的になると報告されている。K-ras 変異は大腸癌の40-50%、膵臓癌の70-90%に認められることから、k-ras 変異を伴う消化器癌に対するさらなる治療の開発が必要とされている。

インスリン様増殖因子(Insulin-like growth factors, IGF-I および IGF-II) は I 型インスリン様増殖因子受容体(Insulin-like growth factor-I receptor, IGF-IR) のリガンドである。IGF-IR はリガンドと結合後に、自己リン酸化および基質のリン酸化が起こり、下流シグナルが伝達される。下流シグナルの代表的なものに phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) / Akt-1系と Ras / Raf / mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK) 系がある(図1)<sup>1), 2)</sup>。食道癌、胃癌、大腸癌、膵臓癌、胆道癌など消化器癌で、IGFのリガンドと受容体は過剰発現している<sup>1), 3), 4)</sup>。血清IGF-I高値と、その調節因子であるIGF結合蛋白3(IGF binding protein 3, IGFBP3)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系の過剰なシグナルは腫瘍の発生に関与し、細胞増殖、アポトーシス回避など、癌細胞の生存に有利に働くため、癌の進展に寄与することとなる。さらに、IGFシグナルは癌細胞の遊走能、浸潤能、血管増生能を亢進させ、癌の転移・悪性化に関与していることをわれわれは報告してきた<sup>5), 6)</sup>。

一方、IGF-IRを阻害することで、腫瘍細胞にはアポトーシスが誘導されるが、正常細胞には増殖抑制のみである。野生型と比較してIGF-IRのノックアウト・マウスは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。そのため、IGF-IRは良い分子標的となると考えている。そこでわれわれは、消化器癌においてIGF-IRを標的とした治療法を開発を目指し、研究を進め報告してきた。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。

上記のように、膵臓癌においてIGFsおよびIGF-IRは過剰発現しており、腫瘍発生と進展に大きな役割を果たしている<sup>7)</sup>。膵臓癌は、k-rasが高頻度に変異していることもあり、k-ras変異陽性消化器癌に対するIGF-IR標的治療法開発のための良いモデルとなると考えられた。

よって本研究では、IGF-IR阻害療法の臨床応用を目指し、膵臓癌におけるIGF-IR阻害効果と変異k-rasの影響を解析した。

### 方法

本研究において、k-ras野生型(WT)株であるBxPC3、k-ras変異(MT)株であるMIAPaca2、Panc-1、As-PC-1等のヒト膵臓癌細胞株を用いた。

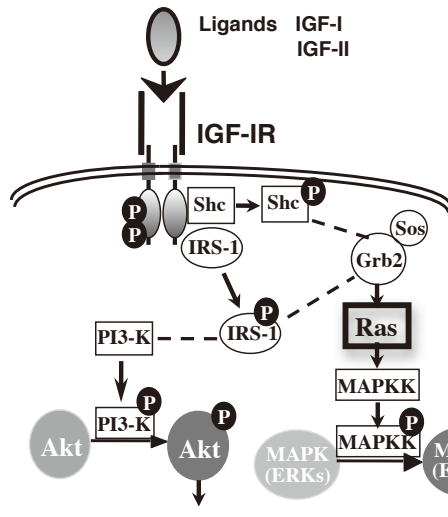


図1 IGF/IGF-IRシステムにおける、Rasを含む下流シグナル。

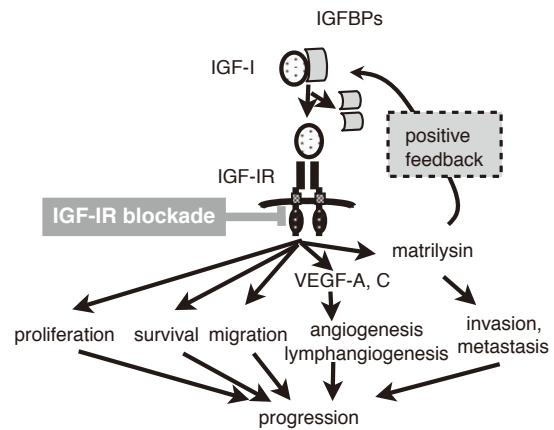


図2 消化器癌の進展における IGF-IR の機能、分子標的としての可能性。

IGF-IR を阻害するため、IGF-IR/dn を発現するアデノウイルス発現ベクター、Ad-IGF-IR/dn と抗 IGF-IR 抗体、figitumumab (CP-751, 871) を用いた。

膵臓癌に対する IGF-IR 阻害の影響を調べるため、in vitro 細胞増殖阻害効果、アポトーシス誘導効果について検討し、その下流シグナルに与える影響を評価した。in vitro 増殖能の評価には、trypan blue アッセイ、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 アッセイ、DNA fragmentation アッセイおよび Annexin-V アッセイを用いた。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、ヌードマウスを用いて、皮下移植モデルおよび腹膜播種モデルを樹立した。これら 2 モデルを使用し、生体内における IGF-IR 標的治療の効果を検討した。

### 結果

膵臓癌細胞において、figitumumab は IGF-IR のリン酸化および下流シグナルである Akt、ERKs のリン酸化を抑制した。IGF-IR/dn も同様に受容体のリン酸化と下流シグナルのリン酸化を抑制した。IGF-IR 阻害による効果は、今回用いた k-ras 野生株、k-ras 変異株いずれにおいても、ほぼ同程度に認められた。一方、いずれの細胞株においても、IGF-IR 阻害はインスリ

ン・シグナルへ影響しなかった。

CP-751, 871 は BxPC-3 (k-ras WT) と MIAPaca-2 (k-ras MT) のコロニー形成を抑制した。また、IGF-IR/dn は BxPC-3 (k-ras WT)、AsPC-1 (k-ras MT)、Panc-1 (k-ras MT) の in vitro 細胞増殖を抑制した。

Figitumumab は、BxPC-3 と MIAPaca-2 のアポトーシスを誘導した。さらに、抗 IGF-IR 療法は 5-FU、gemcitabine による抗腫瘍効果を増強した。同様に、IGF-IR/dn は BxPC-3 と AsPC-1 においてアポトーシスを誘導した。

抗 IGF-IR 抗体はマウス皮下に生着した BxPC-3 腫瘍と MIAPaca-2 腫瘍の発育・進展を抑制した。Figitumumab は gemcitabine との併用により著明な抗腫瘍効果を発揮したが、マウスの体重・血糖には影響しなかった。AsPC-1 を用いた腹膜播種モデルで、IGF-IR/dn は、腹腔内腫瘍量を減らし、担癌マウスの生存を延長した。

以上のように、複数の k-ras 変異型膵臓癌細胞株における IGF-IR 阻害の効果は、k-ras 野生型株における効果と比較し、大きな差を認めなかった。

### 考察

Ras 蛋白質は低分子 GTP 結合蛋白質の一種で、細胞増殖などにかかわる遺伝子群の転写を調節している。

Ras 遺伝子は癌原遺伝子 (proto-oncogene) であり、ras の異常は癌化に大きくかかわることになる。K-ras に G12V などの遺伝子変異が起こると、上流に位置する各種増殖因子受容体のシグナルがなくても、自己リン酸化が繰り返され、下流シグナルを活性化し続け、癌の発生・進展に働く。さらに、抗 EGFR 阻害薬に対する耐性化機序のひとつに、この様な機能獲得性遺伝子変異が k-ras に起きていることが指摘されている。一方、膵臓癌の 7 - 9 割に k-ras 変異がかかわっていると報告されている。したがって、EGFR 阻害剤が無効な患者のために、新たな治療法が必要とされており、IGF-IR は次の標的候補とされている。

今回の研究を通し、抗 IGF-IR 抗体 figitumumab のみでなく、IGF-IR/dn も k-ras 変異を伴う膵臓癌細胞株に抗腫瘍効果を認めた。さらに、MIA-Paca-2 以外の複数の k-ras MT 膵臓癌細胞株に対しても、IGF-IR 阻害法は有効であった。以上から、IGF-IR 分子標的治療は、k-ras 遺伝子変異している頻度の高い、ヒト膵臓癌の治療法として大いに期待された。

EGFR と IGF-IR は共に受容体型チロシンキナーゼ (receptor tyrosine kinase, RTK) で、それぞれ RTK class I、RTK class II に属する。両受容体は、共に下流シグナルのひとつに k-ras を有するが、なぜ、それぞれを分子標的とした治療で効果に差が生じるのか、その機序は今後の検討課題である。いくつかの理由が推測され、そのひとつに膵臓癌細胞における、両受容体の発現量の差が関与した可能性があろう。また、これまでの研究から、膵臓癌における IGF-IR の下流シグナルとして、PI3-K/Akt 系は ras/raf/MAPK 系より重要な役割を担っていた。そのため、k-ras に変異を認めていても、抗 IGF-IR 治療が有効であった可能性もある。さらに、RTK の diagram において、class I と class II は距離が離れて位置することから、RTK のクラスの差を反映している可能性もある。例えば、class I の下流に存在しないが、class II にはある遺伝子群のひとつに insulin receptor substrates (IRS) がある。IRS のような分子の関与が、両治療法の差に影響していることも考えられる。今後、これらの可能性を含めて検討を続けていく予定である。

今回の検討から、膵臓癌に対する IGF-IR 阻害の効果は、k-ras 変異の有無に影響を受けなかった。よって、変異型 k-ras を発現している膵臓癌において、IGF-IR は良い標的となると考えられた。さらに、IGF-IR 分子標的治療は、単独使用においても、他の抗癌剤との併用においても効果を認めたため、大きな可能性を持つと期待された。今後も、IGF-IR 標的治療の臨床応用に向け、解析を続けていきたい。

### 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;18:245-51.
- 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;16:5779-89.
- 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;28:947-56.
- 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;103:252-61.
- 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;30:1305-13.
- 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;117:3135-47.
- 7) 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;63:6432-41.