

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590392

研究課題名（和文）マウス肝癌細胞におけるラパマイシン耐性蛋白合成

研究課題名（英文）Mechanism of rapamycin-resistant translation in mouse hepatocellular carcinoma cells

研究代表者

小川 勝洋 (OGAWA KATSUHIRO)

旭川医科大学・医学部・名誉教授

研究者番号：50045514

研究成果の概要（和文）：

マウス肝発癌過程では PI3K-Akt-mTOR 経路の下流で蛋白翻訳が活性化しているが、担肝癌マウスに mTOR 阻害剤であるラパマイシン処理を行っても約 30%の肝癌で壊死が起こるものの、残りでは効果が部分的か、全く見られず、また前癌病変では全く効果がない。ラパマイシン耐性肝腫瘍では蛋白翻訳マシナリーはラパマイシンにより十分抑制されているにもかかわらず、HIF-1 α ような癌関連蛋白の発現は依然として維持されている。本研究ではこのようなラパマイシン耐性 HIF-1 α 合成は HIF-1 α mRNA の Cap site からではなく、mRNA の途中から開始される internal ribosomal entry site (IRES) によることが明らかになった。さらにラパマイシン処理による肝癌壊死はラパマイシンの肝癌細胞に対する直接作用ではなく、腫瘍血管細胞を特異的に障害するためであることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Although protein translation is activated by the PI3K-Akt-mTOR pathway in mouse hepatocarcinogenesis, rapamycin, a mTOR inhibitor, shows the limited antitumor effect on hepatocellular carcinomas and no effect on hepatic adenomas despite the fact that the cap-dependent protein translation is inhibited by rapamycin. Under the condition with rapamycin treatment, HIF-1 α can continue to be expressed by the internal ribosomal entry site (IRES) mechanism. Furthermore, the mechanism of tumor necrosis induced by rapamycin was not due to the direct action against hepatocellular carcinoma cells but rather due to the angiotoxic effect of rapamycin against the vasculature of hepatocellular carcinomas.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：実験病理学

科研費の分科・細目：基盤研究(C)

キーワード：IRES, 肝癌, 蛋白合成

1. 研究開始当初の背景

我々はマウス肝発癌過程では PI3K-Akt 経路

の下流で mTOR が活性化していることに注目して担肝癌マウスに mTOR 阻害剤である

ラパマイシン処理を行ったところ、約 30%の肝癌で壊死が見られたが、残りのものでは効果が部分的か、または全く見られず、また前癌病変では全く効果が見られなかった。これらのラパマイシン耐性肝腫瘍組織について mTOR により活性化され、蛋白翻訳のカギとなる 4E-BP1、S6K のリン酸化を調べたところ、著明に低下していたことからラパマイシンは十分に mTOR 活性を抑制していると考えられた。しかし、ラパマイシンが蛋白翻訳マシナリーを抑制しているにもかかわらず、肝発癌に重要な役割を果たす HIF-1 α の発現は依然として持続していた。したがって、肝癌ではラパマイシン耐性の蛋白合成メカニズムがあり、Cap 依存的な蛋白翻訳マシナリーが抑制されても癌関連遺伝子の発現を維持できる機能を備えている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

1) Cap 非依存的メカニズムとして蛋白翻訳が Cap site からではなく、mRNA の途中から開始される internal ribosomal entry site (IRES) によるものが知られている。本研究では肝癌細胞でラパマイシン処理時に HIF-1 α 蛋白が IRES 依存的メカニズムにより翻訳されるか否かを検討した。

2) ラパマイシンが一部の肝癌組織で壊死を誘発するメカニズムは、肝癌細胞に対する直接作用とは別の働きが考えられる。ラパマイシンは血管障害作用をもつことからラパマイシン処理後の肝腫瘍血管障害およびラパマイシンの血管内皮由来細胞株に対する作用を検討した。

3. 研究の方法

(1) 肝腫瘍組織は生後 2 週令の B6C3F1 雄マウスへの DEN (5 mg/Kg 体重) 投与、またはマウス肝癌細胞株を背部に移植することにより誘発した。これらのマウスにラパマイシン (3 mg/Kg/日) 処理後、腫瘍組織を採取して凍結保存およびホルマリン固定・パラフィン包埋を行った。

(2) ラパマイシン処理マウスの肝腫瘍組織のヘマトキシリン-エオジン染色標本を作製して顕微鏡観察により、前癌病変 (foci, adenoma) および肝癌について壊死範囲 30% 以上、29% 以下、壊死なしの 3 段階に分類した。

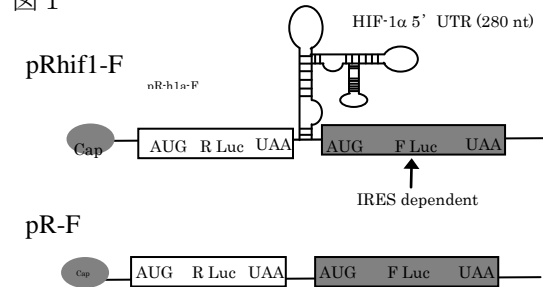
(3) マウス肝癌細胞株を様々な濃度のラパマイシン処理後、細胞数変化、HIF-1 α 蛋白発現および 4E-BP1、S6K、Akt などのリン酸化状態を Western blot 法により検討した。また、ラパマイシン処理細胞についてシクロヘキサミド法および ³H-methionine 標識法により新たな HIF-1 α 蛋白合成を検討した。

(4) renilla luciferase と firefly luciferase

の cDNA の間に HIF-1 α 遺伝子の 5' 非翻訳領域を組み込んだベクター (pRh1-F) およびそれを含まないコントロールベクター (pR-F)

(図 1) を作製してマウス肝癌細胞に導入し、Rap 処理を行った後、renilla luciferase と firefly luciferase の発現をルミノメーターにより測定し、それらの比を調べた。

図 1



(5) 背部に肝癌細胞を移植して誘発した肝癌を持つマウスにラパマイシン処理を行い、経時的に腫瘍組織を採取してパラフィン切片を作製して CD31 免疫染色を行い、血管密度の変化を測定した。

(6) ラット大動脈内皮由来細胞株 (RACES) にラパマイシン処理を行い、細胞数の変化、HIF-1 α 蛋白の発現、および 4E-BP1、S6K、Akt などのリン酸化状態を Western blot 法により検討した。

4. 研究成果

(1) ラパマイシン処理により 3/13 個の肝癌で組織面積の 30% 以上に壊死が見られ、5/13 個で 29% 以下に見られたが、5/13 では変化は見られなかった。また、前癌病変である foci, adenoma では全く壊死は見られなかった。

(2) Western blot 法により Akt 蛋白の発現は adenoma および肝癌では正常肝と変わりはないが、Akt のリン酸化については亢進しており、特に肝癌では強く亢進していた。また mTOR のリン酸化標的である 4E-BP1、S6K のリン酸化が亢進していたことから PI3K-Akt-mTOR 経路が活性化していることが明らかになった。一方、ラパマイシン処理により 4E-BP1、S6K のリン酸化が顕著に低下したが、肝癌における HIF-1 α の発現はラパマイシン処理により変化は見られなかった。また、免疫染色によってもラパマイシン処理後、adenoma および肝癌組織での HIF-1 α の発現は維持されていた。

(3) マウス肝癌細胞株ではラパマイシン処理 (10, 100, 500 nM) による細胞数の減少は軽微であった。またラパマイシン存在下で 1 時間シクロヘキサミド処理を行ったところ HIF-1 α の発現は著明に低下したが、シクロヘキサミドを除去したところ、HIF-1 α が再び発

現した。さらにラパマイシン処理および非処理肝癌細胞に対して³H-メチオニン標識を行い、免疫沈降法によりHIF-1 α 蛋白を回収して³H-メチオニンの取り込みを調べたところ、ラパマイシン処理、非処理群で違いは見られなかった。以上の結果から、HIF-1 α 蛋白合成はラパマイシン存在下で新に起こることが明らかになった。

(4) pR-F コントロールベクターを導入したマウス肝癌細胞ではラパマイシン処理によりF-Lucの発現亢進は見られなかったが、pRh1-Fベクターを導入した細胞ではラパマイシン処理によりF-Lucの発現が非処理細胞に比して約10倍に亢進した。このことによりラパマイシン存在下ではHIF-1 α mRNAのIRESから翻訳がおこることが明らかになった。

(5) 背部皮下に肝癌細胞を移植して誘発した肝癌ではラパマイシン処理により強い出血が見られた。また、ラパマイシン処理1週目ではCD31免疫染色により微小血管密度が約1/4に低下したことが明らかになった。

(6) 血管内皮由来細胞(RACES)ではラパマイシン処理(10, 100, 500nM)により細胞数が48時間目でそれぞれ1/4, 1/6, 1/8に減少し、さらに4E-BP1, S6Kのリン酸化が低下するとともにHIF-1 α の発現も濃度依存的に低下した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1) Tanaka H, Yamamoto M, Hashimoto N, Miyakoshi M, Tamakawa S, Yoshie M, Tokusashi Y, Yokoyama K, Yaginuma Y, Ogawa K. Hypoxia-independent overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α as an early change in mouse hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 66:11263-11270, 2006.

2) Ogawa K. Molecular pathology of early stage chemically-induced hepatocarcinogenesis. *Pathol Int* 59:605-622, 2009.

3) 小川勝洋 肝発癌過程 病理と臨床 29:1-8, 2011.

[学会発表] (計7件)

1) Tanaka H, Yamamoto M, Hashimoto N, Miyakoshi M, Tamakawa S, Yoshie M, Tokusashi Y, Yokoyama K, Yaginuma Y, Ogawa K. Expression of hypoxia-inducible factor 1 α in the early step of hepatic carcinogenesis. American Association for Cancer Research Annual Meeting, Anaheim, CA, 2005.

2) Tanaka H, Yamamoto M, Hashimoto N, Miyakoshi M, Tamakawa S, Yoshie M, Tokusashi Y, Yokoyama K, Yaginuma Y, Ogawa K. Hypoxia-independent overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α as an early change in mouse hepatocarcinogenesis. American Association for Cancer Research Annual Meeting, Washington DC, 2006.

3) Tanaka H, Yamamoto M, Hashimoto N, Miyakoshi M, Tamakawa S, Yoshie M, Tokusashi Y, Yokoyama K, Yaginuma Y, Ogawa K. Reciprocal activation of PI3K/Akt signaling and HIF-1 α in progression of mouse hepatocarcinogenesis. American Association for Cancer Research Annual Meeting, Los Angeles, CA, 2007.

4) Tanaka H, Yamamoto M, Hashimoto N, Miyakoshi M, Tamakawa S, Yoshie M, Tokusashi Y, Yokoyama K, Yaginuma Y, Ogawa K. Rapamycin induces necrosis in mouse hepatocellular carcinomas by antiangiogenic activity, but also activates cap-independent translation of HIF-1 α in hepatocellular carcinoma cells. American Association for Cancer Research Annual Meeting, Denver, CO, 2009.

5) Tanaka H, Yamamoto M, Miyakoshi M, Tamakawa S, Yoshie M, Tokusashi Y, Yaginuma Y, Ogawa K. Angiotoxic effect of rapamycin in mouse HCC cells and rapamycin-resistant mechanism of HCC cells. 日本癌学会 2008.

6) Tanaka H, Yamamoto M, Miyakoshi M, Tamakawa S, Yaginuma Y, Ogawa K. Rapamycin activates cap-independent translation of HIF-1 α in hepatocellular carcinoma cells. 日本癌学会 2009.

7) 田中宏樹、山本雅大、宮腰昌明、玉川 進、吉江真澄、徳差良彦、柳沼裕二、小川勝洋: Rapamycin処理マウス肝癌細胞におけるIRES依存的HIF-1 α 蛋白翻訳の活性化. 分子生物学会 2008

[図書] (計1件)

小川勝洋 第一部疾患モデルの作製と利用 第2章がん第3節消化器系 第2項肝臓 (2) 誘発モデル 『実験動物利用マニュアル』 エー・シー・アイ出版 (印刷中)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別：

○取得状況（計◇件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 勝洋 (OGAWA KATSUHIRO)
旭川医科大学・医学部・名誉教授
研究者番号：50045514

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

田中 宏樹 (TANAKA HIROKI)
旭川医科大学・医学部・特任助教
研究者番号：70596155