

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590329
 研究課題名(和文) IGF・PI3K・mTOR シグナルの抑制を中心とした癌の低酸素耐性機構の解明
 研究課題名(英文) Hypoxia resistance of cancer cells by suppressing IGF/PI3K/mTOR signaling
 研究代表者
 井上 正宏 (INOUE MASAHIRO)
 地方独立行政法人大阪府立病院機構
 大阪府立成人病センター(研究所)・研究所・総括研究員
 研究者番号：10342990

研究成果の概要：

従来の癌研究は増殖に代表される活動型の癌細胞を対象としてきたが、環境に応じて活動を抑制して潜在型に移行できる癌細胞の性質に着目した研究はほとんど行われていない。本研究では増殖シグナルが環境に応じて ON/OFF 切替えされる機構の重要性を検討した。つまり、低酸素下で抑制される増殖シグナルが持続することは癌細胞の生存に不利であり、癌細胞は環境に応じて増殖シグナルを抑制する仕組みを備えていることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、病態生化学

キーワード：分子腫瘍学 ①IGF②PI3K③mTOR④低酸素⑤細胞死

1. 研究開始当初の背景

臨床腫瘍が低酸素状態にあること、また低酸素領域が悪性化や治療抵抗性に重要な役割を演じていることは既に明らかにされているが、未だ低酸素領域を標的とした有効な治療法は確立されていない。従来の癌研究は増殖に代表される活動型の癌細胞を対象としてきたが、環境に応じて潜在型に移行できることに着目した研究はほとんど行われていない。我々は癌細胞の低酸素応答の中でも、分裂を停止してエネルギー代謝を抑制し生存できる特徴に着目し研究を行ってきた。

2. 研究の目的

本研究は、低酸素領域を標的とした治療法を開発するための基盤となる、癌細胞の低酸素耐性の分子機構を解明することを目的とする。具体的には、IGF/PI3K/mTOR シグナルの環境に応じた ON/OFF 切替え機構の重要性を明らかにする。第一に IGF/PI3K/mTOR シグナル抑制が慢性期低酸素下でのエネルギー代謝を制御していることを明らかにする。第二に、IGFBP が低酸素での IGF/PI3K/mTOR シグナル抑制と低酸素耐性に関与していることを明らかにする。第三に、in vivo 腫瘍の低酸素領域における IGF/PI3K/mTOR シグナルの活性化状態を検討する。

3. 研究の方法

膵臓癌細胞 AsPC-1 は RPMI 1640 (10% FBS) で培養した。低酸素培養は Multigas Incubator (ASTECC, Fukuoka, Japan)、無酸素培養は AnaeroPack system (Mitsubishi Gas Chemical, Tokyo, Japan) を用いた。細胞は所定の細胞数を plating 後 24 時間常酸素下で培養し、その後指定の時間、指定の酸素濃度で培養した。蛋白合成は [³⁵S] methionine/cysteine の取り込みで測定した。IGF-I は R&D systems (Minneapolis, MN)、LONG IGF-I は GroPep (Adelaide, Australia) から購入した。IGFBP-1 と IGFBP-3 の ELISA キットは RayBiotech, Inc. (Norcross, GA), R&D Systems (Minneapolis, MN) から購入した。IGFBP-3 蛋白の発現抑制は、pSuperRetro plasmid, Oligoengine (Seattle, WA) を用いた RNA 干渉法で行った。AKT, IGFBP3 蛋白の過剰発現は pMX/AKT, pMX/IGFBP-3 を用いておこなった。S6 のリン酸化抗体は Cell Signaling から購入した。

4. 研究成果

(1) AKT は mTOR シグナルの上流にあって、細胞増殖に必須である。また、AKT の活性化は細胞の生合成を促進する方向に作用するので、活動型と潜在型の分子スイッチの候補として AKT を予想した。低酸素下での潜在型として低酸素耐性である AsPC-1 細胞に AKT 遺伝子を導入して細胞死の変化を観察した。短期あるいは一週間以内においては細胞死に明らかな差は観察されなかったが、AKT 発現細胞では 10 日目より細胞死が増加し、14 日目では顕著に細胞死が増加した (図 A)

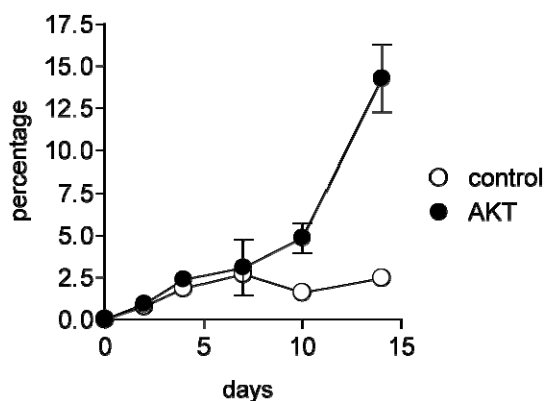


図 A
細胞死の時間的变化。白丸：コントロールベクター導入細胞、黒丸：AKT 導入細胞

次に AKT 活性化による代謝変化を見るために、培養液中のグルコース濃度変化を検討した。

コントロール細胞ではグルコース消費は時間経過とともに減少するが、AKT 導入細胞ではグルコース消費が進行し、14 日目ではほぼ枯渇状態であった (図 B)。このことは、AKT 活性が持続する癌細胞は低酸素下で潜在型に入ることができないことを示している。

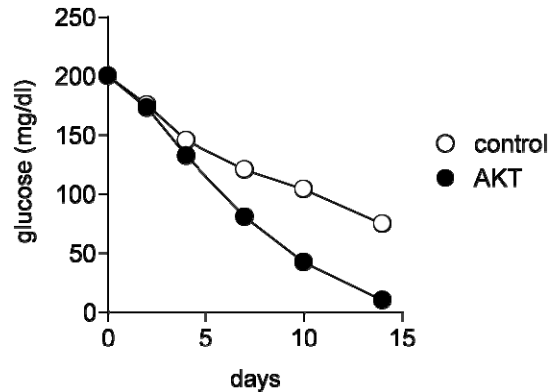


図 B
培養液中のグルコース濃度の変化

(2) AsPC-1 を低酸素 (1% O₂) 下で培養すると、蛋白合成は時間経過と共に低下し、4 日目には 20% まで低下する。低酸素でも分泌の持続する蛋白の同定を試みた。培養上清の蛋白質を電気泳動して銀染色すると、バンドの強度は全体的に低下するが、いくらかのバンドはむしろ強度が上昇した。バンドに含まれる蛋白質を質量分析機で解析したところ、低酸素で分泌量の増える蛋白質として、IGFBP-1 (28 kDa) と IGFBP-3 (32 kDa) を同定した (図 C, 左)。バンドサイズがそれぞれの蛋白質と一致することをウエスタンブロッティングで確認した (図 C, 右)。

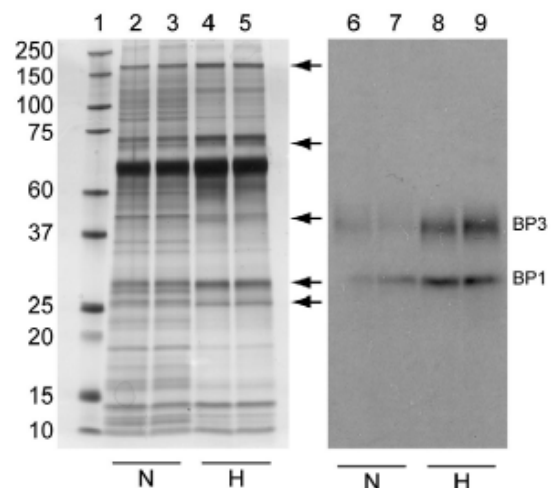
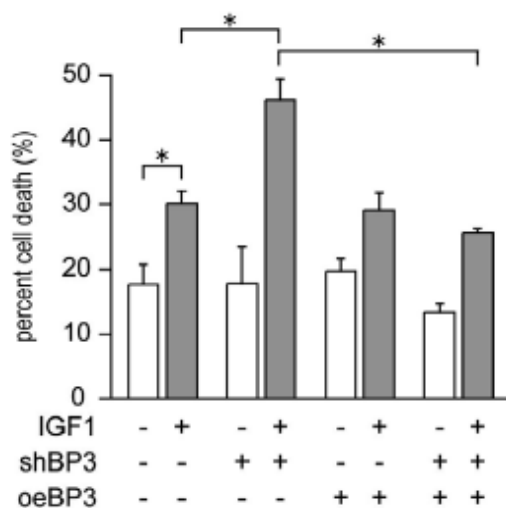


図 C 低酸素下でも IGFBP-1 と IGFBP-3 の分泌は持続する。N: normoxia, H: hypoxia, 左パネル：培養上清の銀染色。右パネル：BP1 と BP3 のウエスタンブロッティング

IGFBP-1 と IGFBP-3 は低酸素下で細胞内の mRNA レベルと蛋白レベルが上昇していた。培養上清中に分泌される IGFBP-1 と IGFBP-3 も低酸素培養下で時間経過と共に分泌量が上昇した。次に低酸素下での IGFBP の役割について検討した。中等度(1%)の低酸素では IGF-I 刺激は AsPC-1 細胞の細胞死を上昇させなかった。一方無酸素下では IGF 刺激は小胞体ストレスを惹起し、アポトーシスによる細胞死を誘導した。IGFBP に結合することのできない変異体 IGF-I (LONG IGF-I) で刺激した場合、野生型 IGF-I よりも強力に細胞死を誘導した。IGFBP-3 を RNA 干渉法で抑制したところ、低酸素下での IGF 刺激による下流のシグナル強度、小胞体ストレスはより増強された。IGF 刺激で誘導される細胞死も増強した (図D)。このような IGFBP-3 の RNA 干渉法による細胞死の増強は IGFBP-3 の過剰発現によって打ち消されることから、RNA 干渉法が特異的に IGFBP3 の発現を抑制していることが確認できた。

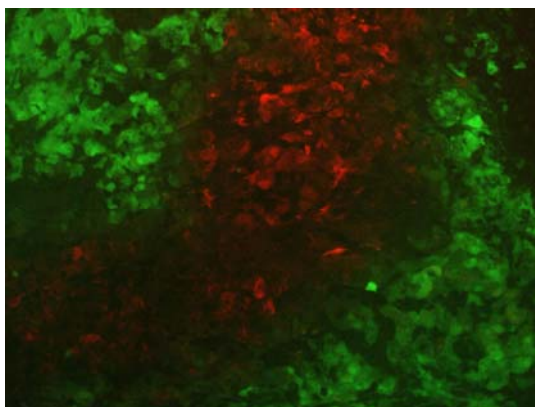


図D IGFBP-3 は低酸素下での IGF 刺激による細胞死の回避に関与する。ShBP3: BP3 の RNA 干渉、oeBP3:BP3 の過剰発現

IGF は生存因子として知られていることから、これまで低酸素で誘導される IGFBP は低酸素での細胞死に関与しているとされていた。本研究により、IGFBP はむしろ過剰な IGF シグナルを回避することによって低酸素での生存に寄与していることが明らかになった。癌細胞は低酸素下で IGFBP 発現を上昇させたり mTOR 活性を抑制したりすることによって、IGF シグナル活性を低下させ、エネルギー保持や小胞体ストレスの回避によって生存を図っていると考えられる。今後、このような癌細胞の生存戦略を標的にすることによって、新しい治療法を開発できる可能性

がある。

(3) In vivo 腫瘍における mTOR 活性化状態を知るために、ヌードマウス皮下に移植した AsPC-1 細胞由来の腫瘍切片を用いて mTOR 下流の pS6 の免疫染色を行った。低酸素領域を描出する pimonidazole と共染色したところ、pS6 は pimonidazole 染色領域とその辺縁を除く領域で陽性であった (図 E)。つまり、in vitro で観察された結果と同様に、mTOR シグナルは in vivo の低酸素領域で抑制されていることが確認された。



図E AsPC-1 腫瘍の免疫染色像。緑: pimonidazole (低酸素)、赤: pS6

まとめ

本研究は、癌細胞の低酸素耐性の分子機構を解明することを目的とした。具体的には、IGF/PI3K/mTOR シグナルの環境に応じた ON/OFF 切替え機構の重要性を明らかにすることを試みた。AKT の活性化が発癌と密接に関係している報告は多いが、環境に応じた AKT の抑制が潜在型としての癌の生存に必要なものであるという報告はない。PTEN を欠失したマウスでは血液幹細胞が枯渇するとする報告があるが、幹細胞と潜在型癌の共通性が示唆されていて興味深い。本内容に関しては現在投稿準備中である。

低酸素で誘導される IGFBP が、IGF/PI3K/mTOR シグナル抑制と低酸素耐性に関与していることを明らかにして論文発表した。IGF シグナルが酸素濃度によって機能を変えること、その調節に IGFBP の分泌が関与していることが明らかになったことは、今後のがんにおける低酸素耐性研究、およびそれを標的とした治療法の開発を行う上で重要である。次に低酸素下での IGF/PI3K/mTOR シグナルの抑制とエネルギー代謝の関係について検討した。AsPC-1 細胞は低酸素で長期間培養すると分裂を停止して長期間生存する。この際、グルコース消費と酸素消費は低い状態に維持されている。腫瘍内の低酸素領域では酸素だけでなく、グルコースの供給も

低下している可能性があり、ATP 要求量を下げて環境のエネルギー基質の枯渇を回避することはこのような環境での生存戦略として機能している可能性がある。我々は IGF/PI3K/mTOR シグナルがこのような休止期の状態では抑制されていることを明らかにした。休止状態の AsPC-1 に IGF を添加すると、低酸素下でもグルコース、酸素を消費して細胞分裂を開始する。IGFBP に結合しない IGF はこの刺激効果が増強することから、ここでも IGFBP による IGF シグナルの抑制が低酸素での生存に関与していることが明らかになった。

低酸素による mTOR シグナルの低下は試験管内でのみ見られる現象ではなく、in vivo 腫瘍内でも観察されることを明らかにした。今後 in vivo 腫瘍を用いて、潜在型癌の实在証明と治療抵抗性、IGF, PI3K, mTOR 経路の関与について研究を進める予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Isohashi, F., Endo, H., Mukai, M., Inoue, T., Inoue, M. Insulin-like growth factor stimulation increases radiosensitivity of a pancreatic cancer cell line through ER stress under hypoxic conditions
Cancer Sci 99, 2395-401, 2008 査読有

2. Koga, T., Endo, H., Miyamoto, Y., Mukai, M., Akira, S., Inoue, M. IGFBPs contribute to survival of pancreatic cancer cells under severely hypoxic conditions
Cancer Lett 268, 62-88, 2008 査読有

3. 井上正宏
mTOR 経路と小胞体ストレス
医学書院 生体の科学 59, 516-521, 2008
査読無

4. Endo, H., Murata, K., Mukai, M. Ishikawa, O., Inoue, M. Activation of insulin-like growth factor signaling induces apoptotic cell death under prolonged hypoxia by enhancing endoplasmic reticulum stress response.
Cancer Res 67, 8095-103, 2007 査読有

5. Harada, H., Kizaka-Kondoh, S., Li, G., Itasaka, S., Shibuya, K., Inoue, M., Hiraoka, M. Significance of HIF-1-active cells in angiogenesis and radioresistance
Oncogene 26, 7508-16, 2007 査読有

6. Zhou, J., Hara, K., Inoue, M., Hamada, S., Yasuda, H., Moriyama, H., Endo, H., et

al. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by glucose availability under hypoxic conditions.

Kobe J Med Sci 53, 283-296, 2007 査読有

7. 井上正宏
癌と低酸素
羊土社 実験医学 25, 2114-2119, 2007 査読無

8. 井上正宏
癌の低酸素応答
羊土社 実験医学 25, 2132-2138, 2007
査読無

[学会発表] (計 2 件)

1. 井上正宏, 遠藤洋子, Down-regulation of metabolism in cancer cells is an adaptive response to hypoxic conditions. 日本癌学会 2007. 10. 4, 横浜

2. Inoue M., Tumor dormancy in hypoxia
TARGET workshop 2008. 10. 17-19,
Stockholm, Sweden

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 正宏 (INOUE MASAHIRO)

地方独立行政法人大阪府立病院機構

大阪府立成人病センター (研究所)・研究所・
総括研究員

研究者番号 : 10342990

(2) 研究分担者

遠藤 洋子 (ENDO HIROKO)

地方独立行政法人大阪府立病院機構

大阪府立成人病センター (研究所)・研究所・
研究員

研究者番号 : 20359300