

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461590

研究課題名(和文) インスリン様成長因子が神経芽腫細胞の生存・増殖に果たす役割の解明

研究課題名(英文) Function of Insulin-like growth factor in neuroblastoma cell proliferation

研究代表者

駒田 美弘 (Komada, Yoshihiro)

三重大学・学内共同利用施設等・学長

研究者番号：80186791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：インスリン様成長因子受容体はがん細胞の増殖に重要な役目を果たしている。神経芽腫は、インスリン様成長因子に対する増殖反応性から、インスリン様成長因子を自ら産生して増殖できる群、自らは産生することはできないが、インスリン様成長因子が作用することにより増殖できる群、インスリン様成長因子には依存せずに増殖する群に分類された。さらに、神経芽腫の細胞内におけるインスリン様成長因子受容体を介した増殖シグナルの伝達には、複数の経路が用いられていた。これらの結果より、細胞内シグナル伝達を阻害する薬剤を神経芽腫患者の臨床治療に用いる場合には、増殖シグナル伝達の多様性を十分に考慮することが大切であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Insulin-like growth factor receptor (IGF-R) plays an important role on cancer cell proliferation.

It has been shown that neuroblastoma (NB) cells can be categorized into three groups by the patterns of IGF-R pathway response. The IGF-R pathway can be activated by endogenous IGF in group 1 NB cells. Stimulation of IGF-R pathway can be induced by exogenous IGF in group 2 NB cells. Activated IGF-R pathway hardly accelerate the cell proliferation of group 3 NB cells. In addition, IGF-R growth stimulation can be mediated by several different intracellular signal transduction pathways. These results suggest that the significant heterogeneity of NB cells in IGF-R-mediated cell proliferation response should be taken enough into consideration, when any signal transduction inhibitors are used in the clinical treatment of NB patients.

研究分野：小児がん

キーワード：神経芽腫 インスリン様成長因子 細胞内増殖シグナル

## 1. 研究開始当初の背景

神経芽種における生存・増殖シグナル伝達には、種々の protein kinase (PI3K、AKT、ALK、FAK)、転写因子 (Kf- B、N-MYC、p53)、細胞増殖因子 (IGF、EGF、PDGF、VEGF) の関与が明らかにされつつあり、新しい治療ターゲットとして注目を集めている。本研究課題で取り上げるインスリン様成長因子-1 受容体 (IGF-1R) は、そのリガンドである IGF-1/2、インスリンの結合により活性化され、種々の腫瘍細胞の生存・増殖シグナル伝達に重要な役目を果たしている。また、インスリン受容体 (IR) のうち、IR-B がグルコースの取り込みに関与するのに対し、IR-A は、IGF-1R とハイブリッド受容体を形成して、IGF-1/2、インスリンに結合し、細胞の生存・増殖を誘導することが示されており、新しい癌治療のターゲット分子として注目されつつある。神経芽腫細胞の生存・増殖における IGF-1R を介したシグナルの役割に関しては、IGF-1R への IGF-1/2 の結合を阻害することにより、神経芽種細胞の増殖が抑制されることが報告されている。しかし、その抑制効果の発現は、使用した腫瘍細胞間で異なっており、神経芽腫においては、IGF-1R、IR を介したシグナルが、生存・増殖シグナルとして機能している細胞群と機能していない細胞群が存在する可能性が示唆される。IGF-1R、IR を介したシグナルの細胞内伝達機構は、神経芽腫治療の新しいターゲットとしての可能性があると考えられるが、腫瘍細胞の生物学的悪性度との関連性を含めて、さらに詳細な検討が必要である。

## 2. 研究の目的

本研究では、神経芽腫細胞における IGF-1R、および IR を介したシグナルが神経芽腫細胞の生存・増殖機構として機能しているか否かを明らかにする。さらに、IGF-1R、IR を介した細胞内シグナルの伝達経路を解析し、IGF-1R を介した生存・増殖シグナルの活性化の視点から、神経芽腫細胞の癌細胞としての生物学的特性を明らかにするとともに、治療の新しいターゲットとしての可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

IGF-1/2 の神経芽腫細胞における生存・増殖因子としての役割の解析

- (1) 神経芽腫細胞株 (31 株) における IGF-1R と IR-A の発現をウエスタンブロット法を用いて解析
- (2) 無血清培地、および IGF-1/2、インスリンの存在下での神経芽腫細胞株 (31 株) の生存能と増殖能を Trypan-blue dye exclusion 法、WST-8 法を用いて解析
- (3) 抗 IGF-1/2 ブロッキング抗体の添加による神経芽種細胞の生存、増殖への影響
- (4) IGF-1/2 の IGF-1R への結合を阻害する Picropodopyllin (PPP) 添加による神経芽腫細胞の生存・増殖抑制効果を Trypan-blue dye exclusion 法、WST-8 法を用いて解析

IGF-1R を介したシグナル伝達経路の活性化の解析

- (1) IGF-1/2、インスリンを添加し、神経芽腫細胞における Raf ファミリー分子 (B-Raf、Raf-1、A-Raf)、MEK1/2、ERK1/2、Akt (threonine308 と serine473 のリン酸化)、mTOR、p70S6K、PTEN、SHIP1/2 の蛋白発現とそのリン酸化の継時的変化を、ウエスタンブロット法を用いて解析
- (2) 神経芽腫細胞株を、Ras 活性化阻害剤 (R115777/SCH66336)、Raf 活性化阻害剤 (geldanamycin/coumermycin/ZM336372/Bay43-9006)、MEK 活性化阻害剤 (PD98059/U0126/PD184352)、PI3K 活性化阻害剤 (Wortmannin/Ly294002)、Akt 活性化阻害剤 (MK2206)、mTOR 活性化阻害剤 (AZD8805) を添加培養し、インスリン、IGF-1/2 により誘導される細胞増殖、細胞回転の増強が阻害されるかを、WST-8 法とフローサイトメトリー法を用いた DNA ヒストグラム解析にて検索

## 4. 研究成果

- (1) 神経芽腫細胞株 (31 株) における IGF-1R と IR-A の発現を、ウエスタンブロット法を用いた解析では、発現強度は個々の細胞間で差異が認められるものの、検索

したすべての神経芽腫細胞には受容体の発現が認められた。

- (2) 検索した 31 種類の神経芽腫細胞株のうち 3 種類は、IGF1/2、インスリンを含まない無血清培地にて生存・増殖が可能であったが、抗 IGF-1/2 ブロッキング抗体の添加により、その増殖は阻害された。また、10 種類の神経芽腫細胞株は、IGF1/2、インスリンを添加した無血清培地にて増殖が可能であった。その他の 18 種類の神経芽腫細胞株は、IGF1/2、インスリンを含む無血清培地では生存・増殖できず、牛胎児血清の存在下でのみ、生存・増殖が可能であった。
- (3) 神経芽腫細胞の IGF1/2、インスリンによる細胞増殖シグナルは、PI3K-AKT 経路の活性化をきたしており、Akt 活性化阻害剤 (MK2206) の添加によって、神経芽腫の増殖は著しく抑制された。
- (4) MK2206 による細胞増殖阻害作用に対して耐性を獲得した神経芽腫細胞株においては、PDK1 を介して mTOR-S6K 経路が活性化し細胞増殖が誘導されている細胞群と PDK1 に依存しない経路によって mTOR-S6K 経路が活性化されている 2 つの細胞群が存在していた。また、両群とも、mTOR 活性化阻害剤 (AZD8805) により細胞増殖の抑制が誘導された。

以上の結果より、IGF1/2は神経芽腫細胞の生存・増殖に重要な役目を果たしているが、神経芽腫は、IGF1/2に対する増殖反応性から、IGF1/2を自ら産生して増殖する群、自らはIGF1/2を産生できず、外因性IGF1/2が作用することにより増殖できる群、IGF1/2に依存せず増殖する群に分類された。また、神経芽腫の細胞内におけるIGF/インスリン刺激による増殖シグナルは、AKT-mTOR-S6K経路、PDK1-mTOR-S6K経路、あるいは、その他の経路を介して活性化されるmTOR-S6K経路のいずれかを介していることが明らかになった。mTOR-S6K経路は、いずれの神経芽腫にも共通する増殖シグナル伝達経路であり、神経芽腫の治療標的となり得ることが示唆された。同時に、細胞内シグナル伝達を阻害する薬剤を神経芽腫患者の臨床治療に用いる場合には、増殖シグナル伝達の多様性を考慮することが大切であると考えられた。

## 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2件)

1. Lei Qi, Hidemi Toyoda, Dong- qing Xu, Ye Zhou, Naoto Sakurai, Keishirou Amano, Kentaro Kihira, Hiroki Hori, Eiichi Azuma, Yoshihiro Komada. PDK1-mTor signaling pathway inhibitors reduce cell proliferation in MK2206 resistant neuroblastoma cells. Cancer Cell International, 15:91-104, 2015.  
査読 有
2. Lei Qi, Hidemi Toyoda, Vipin Shankar, Naoto Sakurai, Keishirou Amano, Kentaro Kihira, Tadasu Iwasa, Takao Deduchi, Hiroki Hori, Eiichi Azuma, Esteba, C. Gabazza, Yoshihiro Komada. Heterogeneity of neuroblastoma cell lines in insulin-like growth factor 1 receptor/Akt pathway-mediated cell proliferative response. Cancer Science, 104:1162-1171, 2013.  
査読 有

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0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0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

なし

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

駒田 美弘 (Komada, Yoshihiro)  
三重大学・学内共同利用施設等・学長  
研究者番号：80186791

### (2)研究分担者

豊田 秀実 (Toyoda, Hidemi)  
三重大学・医学(系)研究科(研究院)・  
助教  
研究者番号：60525327

### (3)連携研究者

( なし )

研究者番号：