

# ヒト膵癌におけるタンパク翻訳開始制御因子 eIF4E 発現の 意義と eIF4E 結合タンパク-1 (4E-BP1) 遺伝子導入 およびラパマイシン併用による治療法の開発

## 学位論文内容の要旨

**【背景と目的】** 膵癌は先進国において罹患率が高く、きわめて予後不良な悪性疾患であり、より効果的な治療の早急な開発が望まれている。

哺乳類細胞内のタンパク翻訳開始はeukaryotic initiation factors (eIFs) と呼ばれるタンパクによって制御されている。そのうち、eIF4Eはヒトにおいて染色体4q21-q25にコードされる25kDaのタンパクで、すべてのmRNAで存在している5' m7GpppNキャップ構造 (mはメチル基、Nは任意のヌクレオチド) に結合する機能をもつ。また、いくつかの癌種ではeIFsの過剰発現が予後不良因子であることが報告されている。一方、eIF4E-binding protein-1 (4E-BP1) はPI3K/AKT経路の上流にあるmolecule mammalian target of rapamycin (mTOR) によってリン酸化される。ラパマイシンはmTORの特異的な抑制剤で、免疫抑制薬や抗真菌薬として臨床応用されており、mTORと強く結合するFK結合タンパク質 (FKBP-12) と複合体を形成する。脱リン酸化した 4E-BP1は翻訳開始要因eIF4Eと相互に作用して、キャップ構造に依存するタンパク合成と細胞増殖を妨げる。

以上をふまえて、膵癌におけるeIF4Eの発現状況を調べると同時に、膵癌細胞に対して4E-BP1遺伝子を発現する非増殖型組み換えアデノウイルスベクターを構築し、mTOR抑制剤であるラパマイシンと併用治療の有用性について検討した。

**【対象と方法】** 1992年から1998年までに北海道大学病院腫瘍外科およびその関連病院で根治手術を施行された膵癌患者80例を対象とした。ホルマリン固定パラフィン包埋組織より4 $\mu$ mの薄切切片を作成し、eIF4Eに対する免疫組織染色を施行した。一次抗体として200倍希釈した抗eIF4Eマウスモノクローナル抗体(sc-9976)を4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた後発色させた。正常の膵管上皮で認められる淡い染色を基準にし、強く染色されている細胞を陽性細胞と判断し、陽性細胞の比率によって3群に群分けした。非増殖型アデノウイルスベクターは、GFP遺伝子を発現するAd-GFPを対照ベクターとし、GFPとヒト4E-BP1遺伝子の両方を発現するAd-BP1を治療ベクターとして、アデノウイルス発現システムを用いて作製した。HEK293細胞で増殖させたアデノウイルスを塩化セシウム濃度勾配で遠心分離して精製し、感染効率をFACSscanでGFP発現細胞を計数することで算出した。細胞株を用いた実験では、膵癌細胞株KP-4、KP1N、Panc-1、MIAPaCa-2を用い、作製したベクターを各細胞株に感染させて増殖能の変化を評価し、さらにラパマイシンを曝露して4E-BP1遺伝子発現とラパマイシンの相乗効果を調べた。次に、ヌードマウスに膵癌細胞株を移植し、Ad-BP1とラパマイシンの併用療法について

検討した。細胞の増殖能およびウイルスやラパマイシンの増殖抑制効果は WST-8 を用いて評価した。細胞株におけるタンパク発現およびタンパクのリン酸化は、抗 eIF4E マウスモノクローナル抗体 (sc-9976) と抗 4E-BP1 マウスモノクローナル抗体 (sc-9977)、抗リン酸化 4E-BP1 ウサギポリクローナル抗体 (9451)、抗 GFP マウスモノクローナル抗体 (MAB 150-1R) を一次抗体とし、ウエスタンブロットで評価した。相関は $\chi^2$  検定または拡張型 Fisher の正確率法を用い、生存分析は Kaplan-Meier 法で生存曲線を作成し、log-rank 法で有意差判定を行った。遺伝子治療研究データの差は Mann-Whitney U 検定を用いて検討した。p<0.05 を有意差ありとした。

- 【結果】 1. 膵癌細胞株における eIF4E、4E-BP1 発現：用いた膵癌細胞株 4 株すべてで eIF4E 発現が確認されたのに対し、4E-BP1 発現が確認されたのは 1 株だけであった。
2. 膵癌症例における免疫染色：eIF4E は膵癌症例の 85%で過剰発現が認められたが、発現状況と膵癌の病理組織学的因子および予後との間に相関は認められなかった。
3. Ad-BP1 感染細胞株における 4E-BP1 発現およびリン酸化の評価：ウエスタンブロットでは Ad-BP1 を感染させた膵癌細胞株 4 株全てで 4E-BP1 の過剰発現が認められ、MIA PaCa-2 を除く 3 株で 4E-BP1 の強いリン酸化が認められた。
4. Ad-BP1 感染による膵癌細胞株の増殖抑制効果：Ad-BP1 または Ad-GFP を感染させた膵癌細胞株では共に未処理の細胞と比較して増殖抑制が認められたが、Ad-BP1 と Ad-GFP の比較においては、KP-4 で Ad-BP1 感染細胞で著明に増殖が抑制された。他の細胞株では Ad-BP1 と Ad-GFP の感染細胞間での増殖に大きな差は認められなかった。
5. Ad-BP1 とラパマイシン併用による増殖抑制相乗効果：KP-4 を除く膵癌細胞株 3 株で、Ad-BP1 とラパマイシン併用による増殖抑制相乗効果が認められた。
6. ラパマイシンによる 4E-BP1 リン酸化抑制効果：全ての膵癌細胞株において、ラパマイシンの濃度依存性に 4E-BP1 リン酸化の減少が認められた。
7. 膵癌移植マウスモデルにおける治療実験：膵癌細胞株 2 株を用いた in vivo 実験では、いずれの株においても Ad-BP1 とラパマイシン併用群が対照群と比較して有意な腫瘍増大抑制効果を示した。

【考察】 ヒト膵癌症例から切除した切片では、癌細胞における eIF4E は明らかに正常膵管と比較して過剰発現しており、発癌によるタンパク翻訳の増大との関係が示唆された。他の癌種とは異なり、膵癌症例では eIF4E の過剰発現が予後不良因子ではなかった理由として、膵癌では ras の変異のようなより強い予後因子が存在しているためであると推察した。細胞株に対して Ad-BP1 と Ad-GFP は同様に軽度の増殖抑制を示したが、これはウイルス感染による細胞障害性によると考えられた。KP-4 以外の細胞株では、4E-BP1 遺伝子の過剰発現だけでは増殖抑制が起こらない理由として、発現させた 4E-BP1 タンパクの多くがリン酸化されるために eIF4E を抑制できないからであると考え、ラパマイシンの併用を検討した。ラパマイシン単独投与で細胞障害性が見られない濃度であっても、Ad-BP1 と併用することで強い増殖抑制効果を示した。この際にはラパマイシンによる 4E-BP1 のリン酸化が抑制されていることが確認された。

以上より、eIF4E 発現亢進は膵癌においては予後因子ではないが、アデノウイルスベクターによる 4E-BP1 遺伝子導入と mTOR 抑制剤ラパマイシンの併用治療は膵癌に対する効果的な補助療法として有用であると考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 秋 田 弘 俊

副 査 教 授 今 村 雅 寛

副 査 教 授 近 藤 哲

学 位 論 文 題 名

## ヒト膵癌におけるタンパク翻訳開始制御因子 eIF4E 発現の 意義と eIF4E 結合タンパク-1 (4E-BP1) 遺伝子導入 およびラパマイシン併用による治療法の開発

膵癌は先進国において罹患率が高く、きわめて予後不良な悪性疾患であり、より効果的な治療の早急な開発が望まれている。哺乳類細胞内のタンパク翻訳開始は eukaryotic initiation factors (eIFs) と呼ばれるタンパク質によって制御されており、そのなかで eIF4E はヒトにおいて染色体 4q21-q25 に存在する遺伝子によってコードされる 25kDa のタンパクで、すべての mRNA で存在している 5' m<sup>7</sup>GpppN キャップ構造 (m はメチル基、N は任意のヌクレオチド) に結合する機能をもつ。また、いくつかの癌種では eIFs の過剰発現が予後不良因子であることが報告されている。一方、eIF4E-binding protein-1 (4E-BP1) は PI3K/AKT 経路の上流にある molecule mammalian target of rapamycin (mTOR) によってリン酸化される。rapamycin は mTOR の特異的な阻害剤で、免疫抑制薬や抗真菌薬として臨床応用されており、mTOR と強く結合する FK 結合タンパク質 (FKBP-12) と複合体を形成する。脱リン酸化した 4E-BP1 は翻訳開始要因 eIF4E と相互に作用して、キャップ構造に依存するタンパク合成と細胞増殖を妨げる。以上をふまえて、膵癌における eIF4E の発現状況を調べると同時に、膵癌細胞に対して 4E-BP1 遺伝子を発現する非増殖型組み換えアデノウイルスベクターを構築し、mTOR 阻害剤である rapamycin と併用治療の有用性について検討した。

1992 年から 1998 年までに北海道大学病院腫瘍外科およびその関連病院で根治手術を施行された膵癌患者 80 例を対象とし、eIF4E に対する免疫組織染色を施行した。一方で非増殖型アデノウイルスベクターは、GFP 遺伝子を発現する Ad-GFP を対照ベクターとし、GFP とヒト 4E-BP1 遺伝子の両方を発現する Ad-BP1 を治療ベクターとして、アデノウイルス発現システムを用いて作製した。Ad-BP1 を感染させた膵癌細胞株の増殖抑制効果、さらに rapamycin を併用した場合の増殖抑制効果を WST-8 アッセイで、このときの 4E-BP1 タンパクの発現とリン酸化について Western blot 法で検討した。最後に、ヌードマウス膵癌細胞移植モデルにおいて、Ad-BP1 と rapamycin の併用療法の効果について検討した。

膵癌症例において、eIF4E の発現状況と臨床病理学的因子、患者の生存率には有意な相関は見られなかった。Ad-BP1 を感染させた膵癌細胞株の増殖は、1 細胞株のみで Ad-GFP と比較して抑制されたが、他の細胞株では差がみられなかった。Ad-BP1 を感染させた場合、発現する 4E-BP1 の多くはリン酸化されることが判明した。Ad-BP1 に rapamycin を併用する

ことで、対照群と比較して有意な相乗効果が得られ、細胞増殖が抑制された。このとき 4E-BP1 のリン酸化が rapamycin の濃度依存性に抑制されることが確認された。さらに、マウス膵癌移植モデルにおいても、Ad-BP1 と rapamycin の併用療法が対照群と比較して有意に腫瘍増大を抑制することが確認された。以上より、eIF4E の発現は膵癌において予後因子ではないが、eIF4E の活性化を抑制する Ad-BP1 と rapamycin の併用療法は有用であることが示された。

口頭発表に続き、副査今村雅寛教授より eIF4E 発現が生存曲線と相関しない理由について、臨床応用を考慮する際に期待できる効果についてなど質問があり、次に副査近藤哲教授より rapamycin の投与方法や血中濃度について、あるいは膵臓の正常腺房細胞で eIF4E が過剰発現している理由について質問があった。最後に主査秋田弘俊教授より併用療法を臨床で行った場合の有害事象について質問があった。

いずれの質問に対しても申請者はその主旨をよく理解し、自らの研究内容と文献的考察を混じえて適切に回答した。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有すると判定した。