HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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
Author(s)	Mishra, Roshan
Description	『北海道医学雑誌』84(2), 2009年3月1日発行, pp.117-125に掲載されたもの
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第8960号
Issue Date	2009-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k8960
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39278
Type	doctoral thesis
File Information	mishra_2009.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

【博士学位論文】

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

Roshan Mishra（ローシャン・ミシュラ）

北海道大学大学院医学研究科　腫瘍外科学

［主任：近藤　哲教授］

緒　言

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る．欧米では年間およそ0.001%が膵癌と診断され[1]，全病期をまとめて算出した５年生存率は4%未満とも報告されることから，より効果的な治療の早急な開発が望まれており[2]，これを目的に細胞増殖，増殖，分化および浸潤に影響する腫瘍タンパクの解析が広く行われている．これらのタンパクの解析は，患者の予後を予測するための分子生物学的診断や新しい治療法を開発することにつながると考えられている．

哺乳類細胞のタンパク翻訳開始は，eukaryotic initiation factors (eIFs) と呼ばれる一連のタンパクによって制御されている．eIF4Eはヒトにおいて染色体4q21-q25にコードされる25 kDa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．翻訳のステップは２つの他のサブユニットから成るeIF4F複合体の形成から始まる[3]，また，eIFsは細胞増殖において重要な役割を演ずることが示され，さらにそれらの過剰発現は乳癌，頭頸部癌および胃癌で予後不良な因子として報告されている[4–8].

以上の背景をもとに，我々は手術から得られたヒト膵癌検体におけるeIF4Eの発現を調べ，臨床病理学的因子との相関関係を統計学的に解析した．

一方で，翻訳開始はPI3K/AKT経路の上流にあるmolecule mammalian target of rapamycin (mTOR) で制御される翻訳抑制因子であるeIF4E-binding protein-1 (4E-BP1) のリン酸化状態に依存する[9–13]．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[14–17]，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[18–22].

以上の背景をふまえて，我々は膵癌に対して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．

材料と方法

１．細胞株

ヒト胎児膵臓から樹立された膵管上皮細胞株1C3D3と1B2C6，ヒト膵癌細胞株Panc-1，MIAPaCa-2とKP-4は理研細胞バンク（筑波，日本）から入手した．ヒト膵癌細胞株SUIT-2とKP1Nは，ヒューマンサイエンス研究資源バンク（大阪，日本）から入手した．ヒト膵癌細胞株PK-9とヒト白血病細胞株K-562は東北大学（仙台，日本）より提供された．ヒト胃癌細胞株MKN-1とMKN-45は医薬基盤研究所（筑波，日本）から入手した．すべての細胞株はそれぞれ推奨された培養液に10%のFBS，1%のペニシリンとストレプトマイシン（GIBCO, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA）を添加した溶液で，37℃で5%のCO_2の環境で培養された．

２．対象症例

This manuscript is a treatise for the Doctor's degree to be conferred by the Graduate School of Medicine, Hokkaido University (received 3/Dec/'08, accepted 24/Dec/'08).

80人の膵癌症例から外科的に切除された組織検体が対象として本研究に使用された．すべての症例は，北海道大学病院第二外科とその関連病院で1992～1999年に外科的切除を受けた．80例のうち61例は膵十二指腸切除術が施行され，14例は膵体尾部切除術が，５例は膵全摘術が施行された．すべての症例にはリンパ節郭清が行われた．明らかな門脈浸潤が認められた23例中17例には門脈切除が施行された．全症例にたいしては放射線療法および化学療法のいずれも施行されていなかった．対象症例の平均年齢は62歳（31～83歳）で，男性45例，女性35例であった．追跡調査期間の中央値は95ヵ月（50～141ヵ月）であり，71例（88.8%）は追跡調査期間の間に死亡していた．このうち再発死亡は65例であり，再発様式が明らかであった症例は48例であった．腫瘍の組織学的分類は，WHOの基準に基づいて決定した．また，腫瘍の病期分類はThe International Union against CancerのTumor-Node-Metastasis（TNM）分類第５版に従った．17例は病期Ⅱ，32例は病期Ⅲで31例が病期Ⅳと分類された．本研究の倫理的配慮は，北海道大学大学院医学研究科医の倫理委員会の指針に従った．すべての標本は10%のホルマリンで固定され，固形パラフィンに包埋された．パラフィンブロックより未染の4 μm厚切片を免疫組織染色研究のために切り出された．免疫染色された組織切片は，患者の臨床情報を知らない２名の検者が，１名の病理医の指導のもとに評価した．

３．マウス

６週齢の雌ヌードマウス（BALB/c-nu/nu）が，日本チャールス・リバー（横浜，日本）より入手され，*in vivo*実験に用いられた．すべての動物実験は『北海道大学動物実験指針』に従った．

４．試薬

ラパマイシン（Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA）を*in vitro*実験で用いる場合には1 mg/mlの濃度でジメチルスルホキシド（DMSO，和光純薬工業，大阪，日本）に溶解し，遮光され–20℃で保存されたのち，適宜希釈して使用した．マウスを用いた*in vivo*実験に用いる場合は，ラパマイシンは10 mg/mlの濃度でエタノールに溶解したのち，5%のPEG400，5%のTween80と4%のエタノールで希釈された．

５．アデノウイルスベクターの構築

非増殖型アデノウイルスベクターは，green fluorescent protein（GFP）遺伝子をサイトメガロウイルス（CMV）プロモーター制御で発現する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（Invitrogen Corp.）を用いて構築した．具体的には，それぞれの全長cDNAをpENTRベクターにクローニングし，相同組換え法を利用してアデノウイルスゲノムを含むpAd/CMV/V5-DESTベクターに組み込まれた．最終産物として得られるプラスミドは，PacI（New England BioLabs Ltd., Herts, UK）で処理され，線形化されたのち，8 μgのDNAがリポフェクタミン2000と混和され，培養されているHEK293細胞に加えられた．標準的なプロトコールに従って，HEK293細胞をパッケージング細胞として増殖させた後，塩化セシウム勾配で超遠心分離によって処理され，Amicon Ultra Centrifugal Filter Device（Millipore, Bedford, MA, USA）を用いてウイルスを精製し–80℃に保存された[23][24]．各ウイルスベクターの濃度は，Adeno-X力価測定キット（BD Biosciences Clontech，Palo Alto, CA，USA）を使用して測定された．本論文で記述されるウイルスの濃度はinfection-forming unit/ml（ifu/ml）とし，感染力価であるmultiplicity of infection（MOI）は1 ifu/cell=1 MOIとして定義した．

各細胞株へのアデノウイルスベクターの遺伝子導入効率は，Ad-GFPを使って評価された．5×10^5個の各細胞株は，6ウェルの培養プレートに撒かれ37℃で６時間培養された．培養後，PBSで洗浄した後に，各細胞にMOI 0～800の異なる力価でAd-GFPを感染させた．感染した細胞は37℃で48時間処理された後，PBSで２回洗浄され，FACScan（BD Biosciences, San Jose, CA, USA）を用いてGFP発現細胞数を計測した．細胞の80%以上が常にGFP発現陽性となる最小のMOIを実験に用いた．

６．ヌードマウス皮下移植モデル

膵癌細胞株であるKP1NまたはMIAPaCa-2（5×10^6 cells/100 ml PBS）をヌードマウスの左側腹部の皮下に移植した．これらの細胞株移植で生じる腫瘍が直径3～5 mmに達した日を0日目として，マウスを６つの異なる群（各群10匹）に群分けした．群分けは未治療群（対照群），ラパマイシン単独投与群，Ad-GFP単独投与群，Ad-BP1単独投与群，ラパマイシンとAd-GFP併用投与群，ラパマイシンとAd-BP1併用投与群とした．ラパマイシンは1 mg/kgの量を１日おきに４週間腹膜内注射で投与された．アデノウイルスベクターはMOI 100で0および14日目に腫瘍内投与された．対照群にはアデノウイルスベクター投与と同じ日程でPBSの腫瘍内注射を行い，ラパマイシンの投与日と同じ日程で溶媒を腹腔内投与した．腫瘍は毎日確認され，７日間ごとに径を測定した．腫瘍体積は長径×短

径^2×1/2で計算した．腫瘍内への遺伝子導入確認のために，アデノウイルスベクターを腫瘍内注射した72時間後に1匹のマウスを犠牲死させ，切除した腫瘍を切除し液体窒素を用いて超低温下に凍結保存した．

7．ウエスタンブロット

未処理の細胞株，Ad-GFPまたはAd-BP1をMOI 100～200で感染させた細胞株，またはそれらに対して様々な濃度でラパマイシンを投与した細胞株から総タンパクを抽出した．すべてのタンパク抽出液は電気泳動で分離されたのち，ニトロセルロース膜（Schleicher and Schuell BioScience, Inc., Dassel, Germany）に転写され，以下に示す抗体で処理して発現やリン酸化を解析した．抗eIF4Eマウスモノクローナル抗体（sc-9976, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA）と抗4E-BP1マウスモノクローナル抗体（sc-9977, Santa Cruz Biotechnology），抗リン酸化4E-BP1ウサギポリクローナル抗体（Ser65）（9451, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA），抗GFPマウスモノクローナル抗体（MAB 3580, Chemicon International, Temecul, CA, USA），抗ヒトアクチンマウスモノクローナル抗体（MAB 150-1R, Chemicon International）をそれぞれ一次抗体として推奨される濃度で使用した．次に，1:10000に希釈されたペルオキシダーゼ結合抗マウスIgGヤギモノクローナル抗体（69779, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA），またはペルオキシダーゼ結合抗ウサギIgGヤギモノクローナル抗体（72323, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.）が二次抗体として用いられた．一次抗体に結合した二次抗体はECLシステム（GE Healthcare, Buckinghamshire, UK）によって視覚化された．

8．免疫組織染色

80例の膵癌患者から得られた腫瘍組織標本の免疫組織化学染色が施行された．各切片はキシレンで脱パラフィン化した後，脱水化し，蒸留水で5分間3回洗浄，圧力釜を用いてpH 6.5のクエン酸緩衝液中で2分間高温高圧処理した．0.3%の過酸化水素とメタノールで内因性のペルオキシダーゼを失活させ，10%のヤギ抗血清で処理した後，希釈した抗eIF4Eマウスモノクローナル抗体を一次抗体として1:200に希釈して4℃で一晩処理した．翌日，切片をヒストファインシンプルステインキット（ニチレイバイオサイエンス，東京，日本）を用いて発色させた後，ヘマトキシリンで核染色を行った．陰性対照として，マウスアイソタイプIgG1を一次抗体に用いた．

染色の判定基準として，癌細胞における染色強度（濃淡）の差は多少みられたが，正常の膵管上皮でのわずかな染色を基準にして，それよりも明らかに強く染色されている細胞を陽性細胞と判断した．その結果，80例を低発現群（癌細胞の20%未満に細胞質の染色が見られる），中発現群（癌細胞の20～50%に細胞質の染色が見られる）と高発現群（癌細胞の50%以上に細胞質の染色が見られる）の3群に分類した．

9．細胞増殖アッセイ

細胞の増殖能またはウイルスやラパマイシンの増殖抑制効果はwater soluble tetrazolium（WST-8，同仁化学研究所，熊本，日本）を用いて評価した．細胞の増殖能として，膵癌細胞株（KP-4，KP1N，Panc-1，MIAPaCa-2）（5×10^3 cells/well）を96ウェルプレートに撒き，37℃で24時間，48時間 および72 時間目に計測した．各ウェルにWST-8を10 μl加え，37℃で4時間反応させた後，Spectra Max-190（Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA）を用いて450/650 nmの吸光度を測定した．アデノウイルスベクターによる細胞増殖抑制効果は，膵癌細胞株KP-4とPanc-1および胃癌細胞株MKN-1とMKN-45を用いて行った．各細胞（5×10^3個/well）は96ウェルプレートに撒かれ，37℃で6時間培養された後，異なる力価のAd-GFPまたはAd-BP1で処理された．

Ad-BP1とラパマイシン併用による増殖抑制効果の評価を行うために，膵癌細胞株（KP-4，KP1N，Panc-1，MIAPaCa-2）をそれぞれ96ウェルプレート撒き，MOI 100～200でAd-GFPまたはAd-BP1を感染させた．24時間後，細胞株は1～10^4 nmol/lの異なる濃度のラパマイシンで処理され，37℃で48時間培養された後，細胞数をWST-8法によって評価した．

10．統計学的手法

統計分析は，拡張Fisher's exact test以外はStatView Software Ver 5.0（SAS Institute Inc., Cary, NC, USA）を用いて計算された．拡張Fisher's exact testはウェブサイトhttp://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/exact/fisher/getpar.html.を利用して計算した．各因子の相関はカイ二乗検定か拡張型Fisher's exact testで計算した．生存分析は，Kaplan-Meier法を用いて表示し，logrank法を用いて分析された．Mann-WhitneyのU検定が2群間の差を分析するのに用いられた．各検定においてp値が0.05未満のとき，統計学的有意差ありと定義した．

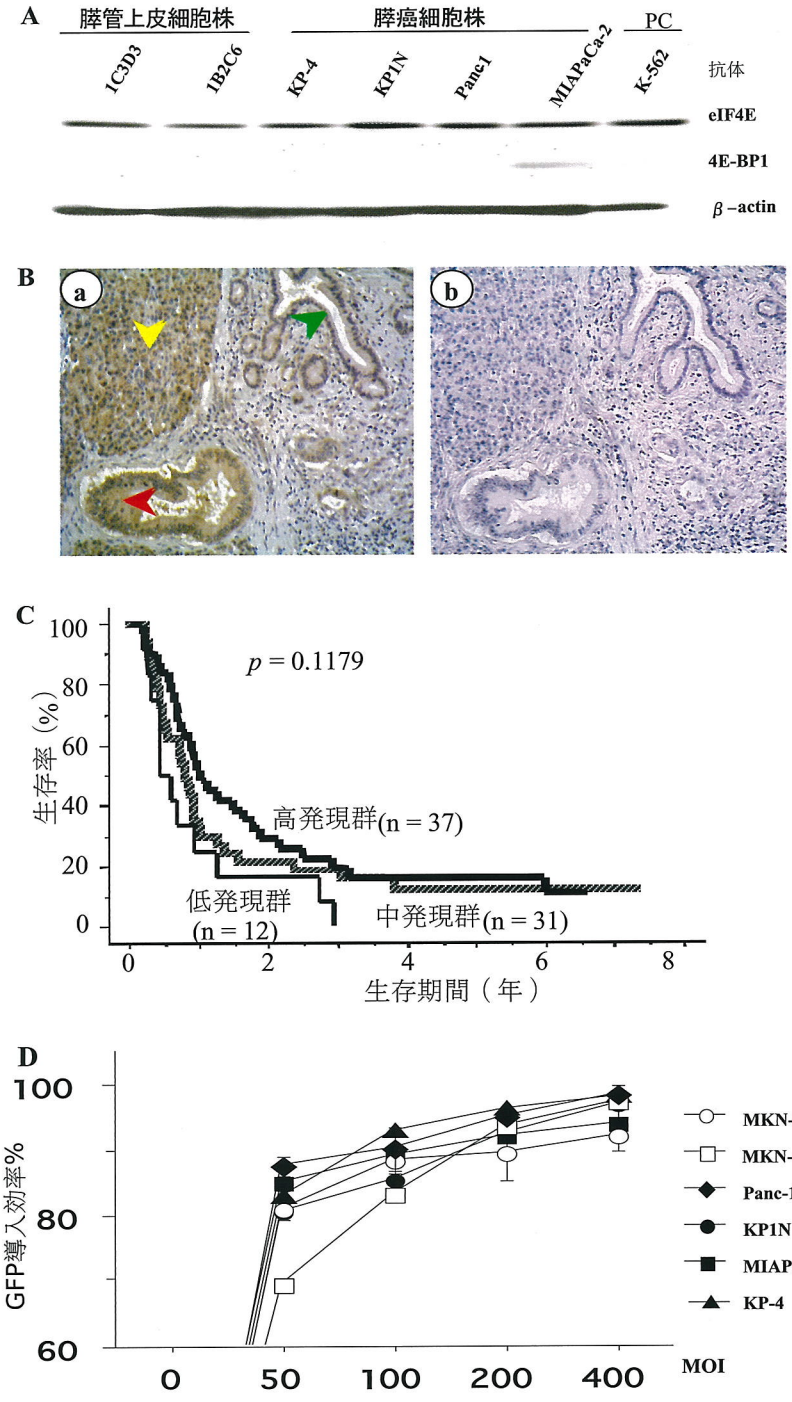

図1． ヒト細胞におけるeIF4E発現とその意義．**A**）ヒト胎児膵管上皮細胞株（1C3D3，1B2C6），ヒト膵癌細胞株（KP-4，KP1N，Panc-1，MIAPaCa-2）とヒト慢性白血病細胞株（K562）のeIF4Eおよび4E-BP1発現．ウエスタンブロットは「材料と方法」に記載した方法にて施行した．K562をeIF4Eと4E-BP1発現に対する陽性対照，インターナルコントロールとしてアクチンを用いた．eIF4Eはすべての細胞株でK562と同等の過剰発現を認めたが，4E-BP1の発現はMIAPaCa-2のみで認められた．PC：陽性対照．**B**）免疫組織染色によるヒト膵癌組織のeIF4E発現解析．免疫組織染色は「材料と方法」に記載した方法にて施行した．a）正常の膵管細胞（緑の矢頭），腺房細胞（黄の矢頭）と癌細胞（赤の矢頭）を示す（×200）．正常膵管上皮の多くは細胞質がわずかに染色されるのみであるのに対し，腺房細胞では濃染される細胞が多く観察された．癌細胞では正常膵管上皮と比較して明らかに濃染されている．b）陰性対照として同一切片をアイソタイプIgGで染色したもの（×200）．**C**）eIF4E発現にたいする膵癌症例の生存分析．癌における発現状況で3群に分けられた症例をKaplan-Meier法を用いてグラフにした．各群間において生存曲線に差は見られなかった．**D**）胃癌および膵癌細胞株に対するアデノウイルスベクターの感染効率．胃癌細胞株MKN-1，MKN-45と膵癌細胞株Panc-1，KP1N，MIAPaCa-2，KP-4にMOI 0～400のAd-GFPを感染させ，FACScanを用いて感染効率を計測した．KP1N，MKN-1とMKN-45はMOI 100で80%以上の細胞がGFP発現陽性となり，Panc-1，MIAPaCa-2とKP-4はMOI 50で80%以上の細胞がGFP発現陽性となった．

結　果

1．eIF4E発現解析

1）細胞株におけるウエスタンブロット解析

用いたヒト胎児膵管上皮細胞株および膵癌細胞株の全てで，25 kDaのeIF4Eタンパクを発現していた（図1A）．一方で，13 kDaの翻訳抑制タンパク4E-BP1を発現する細胞株はMIAPaCa-2のみであった．

2）ヒト切除組織における免疫染色による解析

ヒト膵癌標本において，eIF4Eの細胞質での発現は，膵癌細胞のみならず正常の腺房細胞でも認められた（図1Ba）．マウスアイソタイプIgGで処理された同じ症例の切片を陰性対照（図1Bb）として用いた．発現強度に差はみられたが，癌細胞での発現陽性症例は正常の膵管上皮と比較して明らかに濃染されていた．80例中，正常の腺房細胞が高発現している症例は42例（53%）で，正常の膵管上皮では3例（4%）であった．37例（46%）は癌細胞でeIF4Eが

表1．膵癌症例80例におけるeIF4E発現と臨床病理学的因子との相関

因子	症例数	EIF4E発現			P値
		高発現群 (n=37)	中発現群 (n=31)	低発現群 (n=12)	
性別					0.2246
男性	45	17	20	8	
女性	35	20	11	4	
年齢					0.4826*
65歳未満	47	20	18	9	
65歳以上	33	17	13	3	
T因子					0.4793
T2，T3	48	21	21	6	
T4	32	16	10	6	
リンパ節転移					0.0810*
なし	23	9	13	1	
あり	57	28	18	11	
病期（TNM）					0.5257
Ⅱ，Ⅲ	49	22	21	6	
Ⅳ	31	15	10	6	
分化度					0.6959
高分化	27	12	12	3	
中・低分化	53	25	19	9	

*拡張型Fisher's exact test

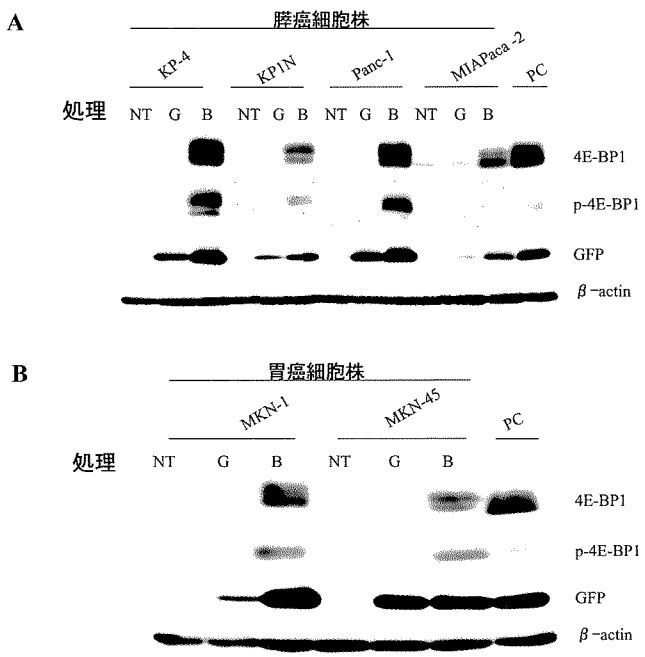

図2．膵癌細胞株と胃癌細胞株における4E-BP1，p4E-BP1（Ser65リン酸化4E-BP1）とGFPの発現解析．ウエスタンブロットは「材料と方法」に記載した方法にて施行した．Ad-GFPまたはad4E-BP1を感染させた細胞株すべてにおいて，GFPの発現が確認され，Ad-BP1感染細胞株すべてで4E-BP1の発現が確認された．同時に3株ではリン酸化された4E-BP1であるp4E-BP1の増加も認められたが，MIAPaCa-2ではp4E-BP1はほとんどみられなかった．NT：未処理，G：Ad-GFP，B：Ad-BP1，PC：陽性対照．

高発現であった．低発現と評価された症例は，正常膵管上皮で63例（79%），正常の腺房細胞で17例（21%），癌細胞では12例（15%）であった．80例のうち癌における発現状況で3群に分類した結果，37例は高発現群，31例が中発現群，12例が低発現群に分類された．

3）eIF4E発現と臨床病理学的因子間の相関関係

各群と臨床病理学的因子との相関を調べた．免疫染色によるeIF4E発現解析結果と臨床病理学的因子の間に統計学的有意差は認められなかった（表1）．

4）生存率分析

分類された3群で，症例の生存率との相関を検討した．それぞれの群の生存曲線間には有意な差は認められなかった（図1C）．

2．*In vitro*におけるAd-BP1とラパマイシンによる併用治療実験

1）各細胞株に対するアデノウイルスベクター導入効率

膵癌細胞株と胃癌細胞株へのアデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率は，FACScanを用いてGFP発現陽性の細胞数を計測することで評価した（図1D）．KP1Nは MOI 100で80%以上の細胞がGFP発現陽性となり，Panc-1，MIAPaCa-2とKP-4はMOI 50で80%以上の細胞がGFP発現陽性となった．胃癌細胞株MKN-1とMKN-45はMOI 100で80%以上の細胞がGFP発現陽性となった．以上より，以後のアデノウイルスベクターを用いた検討はMOI 100の力価で施行することとした．

2）遺伝子導入による4E-BP1発現とリン酸化

4E-BP1とリン酸化4E-BP1は，4つの膵癌細胞株（KP-4，KP1N，Panc-1，MIAPaCa-2）と2つの胃癌細胞株を用いたウエスタンブロットで評価した．6つの細胞株にAd-BP1をMOI 100で感染させた場合に4E-BP1の過剰発現が観察された．6細胞株全てアデノウイルスベクターで導入された4E-BP1を発現したが，MIAPaCa-2は内因性4E-BP1を発現していると同時に，他の細胞株と比較してリン酸化された4E-BP1はほとんど見られなかった（図2）．

3）Ad-BP1を用いた増殖アッセイ

細胞増殖に対するAd-BP1の影響は，胃癌細胞株（MOI 100のMKN-1とMOI 200のMKN-45）と2つの膵癌細胞株（MOI 200のPanc-1とMOI 100のKP-4）でAd-BP1とAd-GFP感染症の後，24時間間隔で3日間検討した．アデノウイルスベクターを感染させた細胞株は，未処理の細胞株と比較して，やや増殖抑制傾向が見られた．72時間後において3株ではAd-BP1とAd-GFPの間で増殖に差は認めなかったが，KP-4はAd-BP1で強く増殖が抑制された（図3A）．

4）Ad-BP1とラパマイシン併用による増殖抑制効果

膵癌細胞株（KP-4，KP1N，Panc-1，MIAPaCa-2）にAd-GFPまたはAd-BP1を感染させ，異なる濃度（0～10^4

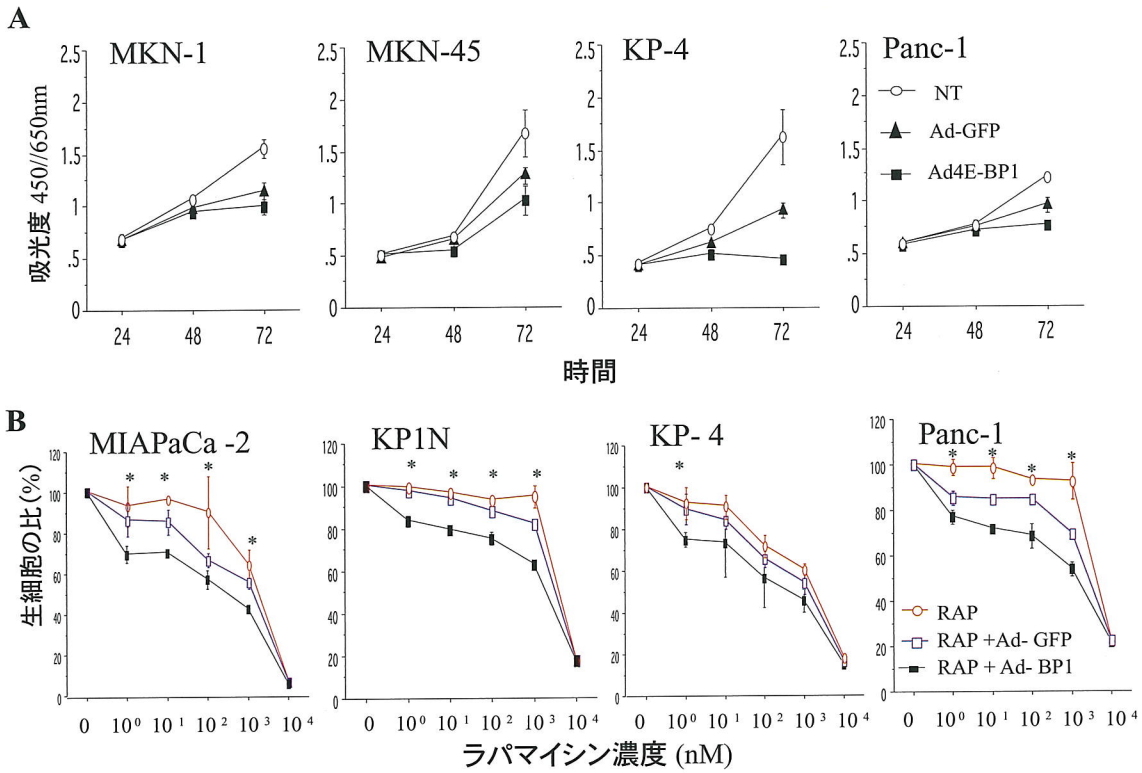

図3． *In vitro*における細胞株増殖抑制効果．増殖アッセイは「材料と方法」に記載した方法にて施行した．グラフには各値の平均値を記し，エラーバーは標準偏差を示す．**A**）Ad-GFPまたはad-BP1による胃癌または膵癌細胞株の増殖抑制．胃癌細胞株MKN-1，MKN-45と膵癌細胞株KP-4，Panc-1にそれぞれAd-GFPまたはAd-BP1を感染させて増殖を調べた．MKN-1，MKN-45，Panc-1では，未処理の細胞と比較していずれのアデノウイルスベクターにおいても軽度の増殖抑制を認めた．他の膵癌細胞株においても同様であった（図は省略）が，KP-4に限ってはAd-BP1の感染によって強い増殖抑制が見られた．NT：未処理．**B**）膵癌細胞株に対するAd-GFPまたはAd-BP1とラパマイシン併用による増殖抑制効果．膵癌細胞株4株にそれぞれAd-GFPまたはAd-BP1を感染させ，0～10^4 nMのラパマイシンを添加した結果，MIAPaCa-2，KP1N，Panc-1では10^0～10^3 nMまでのすべての濃度でAd-BP1感染細胞の増殖がAd-GFP感染細胞の増殖と比較して有意に抑制されていた．KP-4に限っては10^0 nMのラパマイシン濃度でのみ有意な増殖抑制がみられた．星印はAd-BP1+ラパマイシンの併用投与群の増殖がAd-GFP+ラパマイシン群と比較して有意に抑制されていることを示す．RAP：ラパマイシン．

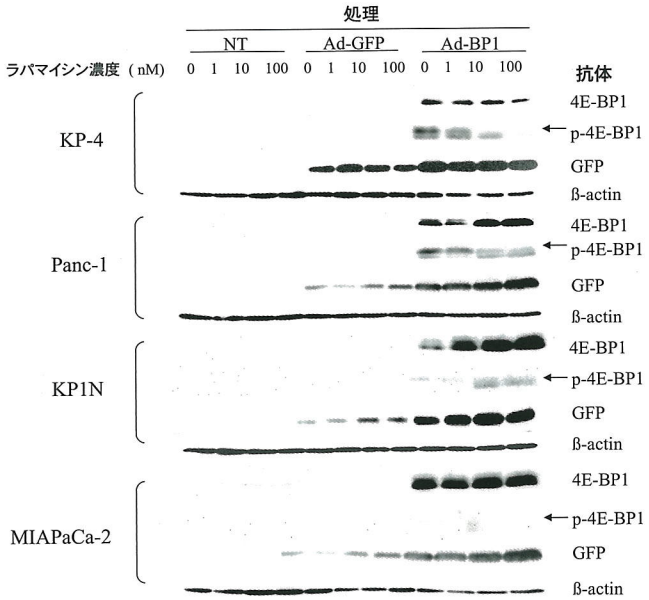

図4． ラパマイシンによる4E-BP1のリン酸化抑制．ウエスタンブロットは「材料と方法」に記載した方法にて施行した．4株の膵癌細胞株すべてにおいて，Ad-BP1感染細胞で見られたリン酸化4E-BP1（矢印で示した上のバンド）がラパマイシンの濃度依存性に減弱することが確認された．NT：未処理．

nmol/l）でラパマイシンを加えた場合の細胞増殖抑制効果を調べた．MIAPaCa-2，KPIN，Panc-1では，Ad-BP1とラパマイシンの併用がAd-GFPとラパマイシンの併用と比較して強い増殖抑制効果を示した（図3B）．併用による効果の増強は，KP-4ではほとんど見られなかった．同様の増殖抑制効果は，胃癌細胞株でも見られた（図は省略）．

5）ラパマイシンによる4E-BP1のリン酸化抑制効果

ウエスタンブロット解析によって，ラパマイシンが4E-BP1のリン酸化を抑制する現象を確認した（図4）．用いたすべての膵癌細胞株で，4E-BP1のリン酸化はラパマイシンの濃度に依存して抑制された．同様のリン酸化抑制効果は，胃癌細胞株でも見られた（図は省略）．

3．ヌードマウス膵癌移植モデルにおける治療実験

膵癌細胞株（KP1N，MIAPaCa-2）をヌードマウスに移植したモデルを用いて，Ad-BP1とラパマイシンの併用効果を評価した．いずれの細胞株においてもAd-BP1とラパマイシンの併用が最も腫瘍増大抑制効果を示し，有意差

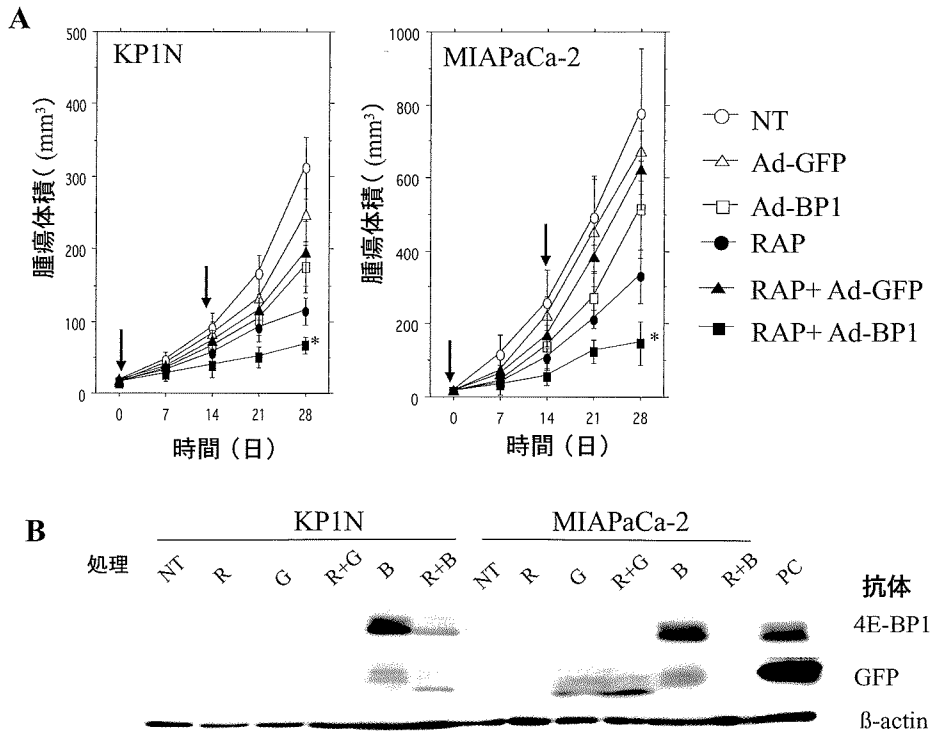

図5．ヌードマウス膵癌移植モデルにおける治療実験．本実験は「材料と方法」に記載した方法にて施行した．**A**）各群10匹ずつのヌードマウス皮下に移植されたKP1N，MIAPaCa-2に対して各処理における腫瘍増殖曲線．0日目と14日目に各ウイルスベクターまたはPBSを腫瘍内注射し（矢印），1 mg/kgのラパマイシンまたはPBSを2日に1回腹腔内投与した．腫瘍体積は4週間にわたって計測した．グラフの値は各群における腫瘍体積の平均値を示し，エラーバーは標準偏差を示す．いずれの細胞株においても，Ad-BP1とラパマイシン併用群が最も腫瘍増大抑制が強く，Ad-GFPとラパマイシン併用投与群と比較した場合のp値はKP1Nで0.005，MIAPaCa-2では0.009であった．星印は有意差ありを示す．**B**）マウス移植腫瘍に対するアデノウイルスベクターの遺伝子導入の確認．ウエスタンブロットは「材料と方法」に記載した方法にて施行した．マウスの移植腫瘍を切除して遺伝子導入の有無を確認した．アデノウイルスを感染させた全ての腫瘍群でGFPの発現が確認され，Ad-BP1を感染させた腫瘍における4E-BP1の過剰発現が確認された．NT：未処理，R：ラパマイシン投与，G：Ad-GFP投与，B：Ad-BP1投与，PC：陽性対照．

を認めた（図5A）．アデノウイルスベクターを腫瘍内注射した72時間後に腫瘍から抽出したタンパクをウエスタンブロット解析したところ，それぞれのベクターに一致するGFP，4E-BP1発現を認めた．一方で，MIAPaCa-2の腫瘍では培養細胞とは異なり，内因性4E-BP1発現を認めなかった（図5B）．

考　察

悪性腫瘍は，多段階発癌における遺伝子異常の蓄積で，無秩序な腫瘍増大を起こす．悪性腫瘍の増大は細胞分裂に依存しており，その速度はタンパクの翻訳に依存する[10–12]．タンパクの翻訳はphosphatidylionostiol 3-kinase（PI3K）mitogen activated protein-kinase（MAPK）の活性化によるmTORのリン酸化がおこり，その下流にある70 kDaのS6 kinase（S6K1）や4E-BP1のリン酸化を促進することで増強される[3][9][11][14]．

ウエスタンブロットでは膵癌細胞株と胃癌細胞株および膵臓由来非癌細胞すべてにeIF4E発現を認めたが，MIAPaCa-2以外では4E-BP1は発現していなかった．非癌細胞細胞にけるeIF4Eの過剰発現は不死化によって引き起こされている可能性がある．また，ほとんどの細胞株における4E-BP1の発現低下は，癌細胞としてのタンパク翻訳の増強と関係しているかもしれない．

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．過去の報告にもあるように，他の癌種ではeIF4Eの過剰発現が患者の予後不良因子であることから，腫瘍形成の重要な因子としてタンパク翻訳の増大が挙げられているが[4–8]，膵癌においてはeIF4E発現と臨床病理学的因子には有意な相関関係が見られず，予後との明らかな相関も見られなかった．他の腫瘍とは異なり，膵癌ではほとんどでeIF4Eが過剰発現していることと，eIF4E よりも癌の進行や予後に影響する因子が存在する可能性[21]を考えた．しかし，eIF4Eの過剰発現状況を考慮すると，膵癌においても翻訳抑制遺伝子4E-BP1による増殖抑制が期待できると考え，治療実験を試行した．

アデノウイルスベクターは，低い毒性で高い感染性と遺伝子発現効率を有しているため，遺伝子治療モデルにおいて有用なベクターである[23]．本研究で用いたベクターはCMVプロモーターによって能率よく4E-BP1とGFPを発現した．Ad-BP1とAd-GFPは同じよう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，4E-BP1遺伝子発現による細胞障害性はKP-4以外ではほとんど認められなかった．この理由として，ベクターによって4E-BP1遺伝子を発現させただけでは細胞内で強くリン酸化されるためであること考えられ，ウエスタンブロット解析でそれが示された．つまり，4E-BP1遺伝

子による遺伝子治療単独ではほとんど意味がないことを意味する．4E-BP1のリン酸化状態は上流のPI3K/AKT経路に属するmTORによって制御される[9–11]．また，リン酸化された4E-BP1は，mTOR抑制剤であるラパマイシンによって選択的に妨げられる[19][20]．mTOR活性化は大部分の癌種で観察される[25–28]．したがって，mTORの抑制が4E-BP1のリン酸化を抑制し，最終的に癌細胞の増殖を抑制することが予想され，膵癌を用いた本研究でも同様の結果が得られた．

この併用効果は，ヌードマウスを用いた治療モデルでも確認された．

以上より，本研究結果は，4E-BP1とラパマイシンの併用療法はきわめて予後不良な疾患である膵癌の進行を抑制することを示した．

結　語

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と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．

謝　辞

本研究を行うにあたり，研究の機会を与えて頂き，ご指導を下さいました，北海道大学大学院医学研究科腫瘍外科学分野 近藤　哲教授に深く感謝いたします．また，研究方法に際してあらゆるご指導を下さいました，北海道大学大学院医学究科腫瘍外科学分野 宮本正樹助教に深く感謝致します．免疫組織化学的染色技術的な補助として志田　拓氏と斎藤直美氏に深く感謝致します．

文　献

1 Jemal A, Murray T, Ward T, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics. CA Cancer J Clin 2005; **55**: 10–30.
2 Kleef J, Michalski C, Friess H, Büchler MW. Pancreatic cancer: from bench to 5-year survival. Pancreas 2006; **33**: 111–118.
3 Sonenberg N, Gingras AC. The mRNA 5`cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. Curr Opin Cell biol 1998; **10**: 268–275.
4 Kerekatte V, Smiley K, Hu B, Smith A, Gelder F, De Benedetti A. The proto-oncogene/translation factor eIF4E: a survey of its expression in breast carcinomas. Int J Cancer 1995; **64**: 27–31.
5 Li BDL, McDonald JC, Nassar R, De Benedetti A. Clinical outcome in stage I to Ⅲ breast carcinoma and eIF4E over expression. Ann Surg 1998; **227**: 756–763.
6 Nathan CO, Franklin S, Abreo FW, Nassar R, De Benedetti A, Glass J. Analysis of surgical margins with the molecular marker eIF4E: A prognostic factor in patients with head and neck cancer. J Clin Oncol 1999; **17**: 2909–2914.
7 Franklin S, Pho T, Abreo FW, Nassar R, De Benedetti A, Stucker FJ, Nathan CO. Detection of the proto-oncogene eIF4E in larynx and hypopharynx cancers. Arch Otolaryngol 1999; **125**: 177–182.
8 Chen CN, Hsieh FJ, Cheng YM, Lee PH, Chang KJ. Expression of eukaryotic initiation factor 4E in gastric adenocarcinoma and its association with clinical outcome. J Surg Oncol 2004; **86**: 22–27.
9 Gingras AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hoekstra MF, Aebersold R, Sonenberg N. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. Gene & Dev 1999; **13**: 1422–1437.
10 Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. Nat Med 2004; **10**: 789–799.
11 Adjei AA, Hidalgo M. Intracellular signal transduction pathway proteins as targets for cancer therapy. J Clin Oncol 2005; **23**: 5386–5403.
12 De Benedetti A, Graff JR. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. Oncogene 2004; **23**: 3189–3199.
13 Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. Cell 2000; **103**: 253–262.
14 Huang S, Houghton PJ. Targeting mTOR signaling for cancer therapy. Curr Opin Pharmacol 2003; **3**: 371–377.
15 Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy. Nat Rev Cancer 2004; **4**: 335–348.
16 Rubio-Viqueira B, Hidalgo M. Targeting mTOR for cancer treatment. Curr Opin Investig Drugs 2006; **7**: 501–512.
17 Abraham RT, Gibbons JJ. The mammalian target of rapamycin signaling pathway: twist and turns in the road to cancer therapy. Clin Cancer Res 2007; **13**: 3109–3114.
18 Dancey JE. Inhibitors of the mammalian target of rapamycin. Expert Opin Investig Drugs 2005; **14**: 313–328.
19 Hidalgo M, Rowinsky EK. The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy. Oncogene 2000; **27**: 6680–6686.
20 Huang S, Bjornsti MA, Houghton PJ. Rapamycin: mechanism of action and cellular resistance. Cancer Biol Ther 2003; **2**: 222–232.
21 Shaw RJ, Cantley LC. Ras. PI(3)K and mTOR signaling controls tumor cell growth. Nature 2006; **441**: 424–430.
22 Petroulakis E, Mamane Y, Le Bacquer O, Shahbazian D, Sonenberg N. mTOR signaling: implication for cancer and anticancer therapy. Br J Cancer 2007; **94**: 195–199.
23 He TC, Zhou S, Da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; **95**: 2509–2514.
24 Ugai H, Yamasaki T, Hirose M, Inabe K, Kujime Y, Terashima M, Liu B, Tang H, Zhao M, Murata T, Kimura M, Pan J, Obata Y, Hamada H, Yokoyama KK. Purification of infectious adenovirus in two hours by ultracentrifugation and tangential flow filtration. Biochem Bioph Res Co 2005; **331**: 1053–1060.
25 Guba M, Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW, Geissler EK. Rapamycin

inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. Nat Med 2002; **8**: 128–135.
26 Jacobson BA, Alter MD, Kratzke MG, Frizelle SP, Zhang Y, Peterson MS, Avdulov S, Mohorn RP, Whitson BA, Bitterman PB, Polunovsky VA, Kratzke RA. Repression of cap-dependent translation attenuates the transformed phenotype in non-small cell lung cancer both *in vitro* and *in vivo*. Can Res 2006; **66**: 4256–4262.
27 Stephan S, Datta K, Wang E, Li J, Brekken RA, Parangi S, Thorpe PE, Mukhopadhyay D. Effect of rapamycin alone and in combination with antiangiogenesis therapy in an orthotopic model of human pancreatic cancer. Clin Cancer Res 2004; **10**: 6993–7000.
28 Ito D, Fujimoto K, Mori T, Kami K, Koizumi M, Toyoda E, Kawaguchi Y, Doi R. In vivo antitumor effect of the mTOR inhibitor CCI-779 and gemcitabin in xenograft models of human pancreatic cancer. Int J Cancer 2006; **118**: 2337–2343.