

シンポジウム1 子宮頸癌の発生と進展—その制御を目指して—

子宮頸癌の発生における IGF-I レセプターの役割と

IGF-I レセプター分子標的治療の試み

岡山大学助手 本 郷 淳 司

目 的

I型インスリン様増殖因子(IGF-I)およびその受容体(IGF-IR)はヒト正常細胞に広く発現している。腫瘍細胞では過剰発現を示すものが多く、予後不良因子との報告が多い。IGF-IRはさまざまな正常細胞、腫瘍細胞の増殖・分化に関与するのみならず、腫瘍細胞においては悪性形質の獲得と維持に必須である。また近年、IGF-IRを介した survival signal 伝達が明らかになり、IGF-IRがさまざまな細胞を各種抗癌剤や放射線などによるアポトーシスから防御する働きが脚光を浴びている。我々はIGF-IRノックアウトマウス胎仔繊維芽細胞由来R⁻細胞に各種の mutant IGF-IR を遺伝子導入するに手法により、以上3つのIGF-IR働きの責任部位を解明し、またIGF-IR情報伝達系を各種方法で遮断することにより、ヒト子宮頸癌、卵巣癌、glioma等の培養細胞のin vitroでの足場非依存性増殖能とin vivoでの腫瘍形成能を著しく抑制し、またin vivoにおいて強力に腫瘍細胞にアポトーシスを惹起することを報告してきた。

子宮頸癌患者では、およそ90%にヒトパピロウイルス(HPV)が検出され、HPVの初期蛋白産物であるE6, E7による主要癌抑制遺伝子産物のp53およびpRBの不活化はよく知られている。また野性型のp53はIGF-IRの転写を抑制するとの報告があり、我々は32D細胞を用いてIGF-IRがp53誘導アポトーシスの標的であることを明らかにした。HPV陽性の子宮頸癌ではE6がp53をユビキチン化分解することを介して、ひいてはIGF-IRの転写・発現を増強している可能性が予想される。今回、ヒト子宮頸癌の発癌過程におけるIGF-IRの果たす役割をHPVによる転写制御も含めて検討するとともに、IGF-IRを分子標的とした

治療の子宮頸癌に対する有効性を解明することを目的とした。

方 法

子宮頸癌発癌過程におけるIGF-IRの果たす役割を検討するために、i)円錐切除および摘出子宮より得たCINから浸潤癌に至る各期の切片を抗IGF-IR抗体および抗リン酸化IGF-IR(Y1316)抗体を用いて免疫組織染色し、IGF-IRの発現程度、活性化の程度を比較検討した。次にp53を介したE6のIGF-IR転写制御の生物学的意義を検討するために、ii)HPVが1~2コピー組み込まれているSiHa細胞に対してE6発現ベクターを、そしてHPVがおよそ50コピー組み込まれているHeLa S3細胞に対してE6, E7の転写制御領域であるE2発現ベクターをそれぞれ一過性に遺伝子導入し、E6発現量を変化させることにより、p53, IGF-IRの発現量、そして各々の足場非依存性増殖能に及ぼす影響を検討した。IGF-IRを分子標的とした治療の有用性の検討のため、iii)HPV16型陽性のSiHa細胞、18型陽性のHeLa S3細胞、HPV陰性のC33A細胞にIGF-IRアンチセンスmRNA発現ベクターを遺伝子導入した恒久発現クローンを各々樹立して、in vitroでの足場非依存性増殖能、in vivoでの腫瘍形成能、そしてタキソールへの感受性の変化を検討した。最後に臨床応用を念頭に、iv)バースタンダー効果を有する dominant negative である486/STOP 組換え蛋白を作成し、SiHa細胞の腫瘍形成抑制効果を検討した。

成 績

i)免疫組織染色によるIGF-IRの発現程度の検討では、CINから浸潤癌に至るまで、ほぼ全例でIGF-IRの過剰発現が認められた。発現の程度は初期浸潤癌<CIN II, III<浸潤癌の順の傾向を認め

た.特に浸潤癌ではIGF-IRの過剰発現とともにチロシンがリン酸化された活性化型受容体が高頻度に認められた. ii) HPV E6 蛋白がp53を介してIGF-IR発現に関与しているかの検討では, SiHa細胞にE6を過剰発現させたところ, ウェスタンブロットにより, p53の減弱と引き続いてIGF-IR発現量の増強を認めた. またHeLa S3細胞にE2蛋白を過剰発現させE6蛋白の発現抑制を試みたところ, p53発現の上昇とIGF-IR発現量の減少を認めた. 軟寒天培地での検討では, E6導入SiHa細胞, およびE2導入HeLa S3細胞での親細胞と比較して, それぞれ足場非依存性増殖能の有意な増強および減弱が認められた. iii) IGF-IRに対するアンチセンスmRNAをHSP70 inducible promoter下に恒久発現するクローンをSiHa, HeLa S3, C33Aにて作成したところ, およそ30~70%のIGF-IR発現抑制が得られた. いずれのクローンも単層培養での増殖能にはほとんど変化は認められなかった. しかし, 軟寒天培地を用いたin vitroでの足場非依存性増殖能およびヌードマウス皮下移植によるin vivoでの腫瘍形成能はこれを著しく抑制した. またアンチセンス導入クローンはIGF-IRが本来有する抗アポトーシス能が減弱したため, タキソールに対する感受性が有意に亢進した. iv) ヌードマウス皮下接種SiHa細胞の腫瘍形成は486/STOPの局所投与により抑制可能であった.

結 論

子宮頸癌病巣の免疫組織染色の結果より, CINではepisomeに多数のHPVが存在するため, また浸潤癌では宿主染色体に取り込まれた際にE6,

E7の転写調節領域であるE1, E2が欠損・寸断しE6, E7が高発現するため, ともにp53の分解が亢進し, その結果としてIGF-IRの発現が増大している可能性が示唆された. また浸潤癌ではbulkyに発育した腫瘍細胞から分泌されたIGF-Iがparacrine, auto-crineにIGF-IRを活性化している可能性が示唆された. 子宮頸癌培養細胞を用いたHPV E6, E2遺伝子導入の結果では, 感染したHPVのE6蛋白がp53を分解不活化することにより, IGF-IRの発現を増強しており, 子宮頸癌の発生と進展においてHPV感染によるIGF-IR発現亢進が子宮頸癌発癌における悪性形質転換能獲得に重要な役割を果たしている可能性が示唆された. 一方, HPV 18型強陽性で, IGF-IRを過剰発現し, 腫瘍形成能も著しいHela S3細胞でもアンチセンス法により完全に腫瘍形成能を消失させることが可能であり, HPVの有無, サブタイプにかかわらず, IGF-IRは子宮頸癌治療のよい分子標的となり得ることが実証された. また486/STOP組換え蛋白投与は, 体表癌である子宮頸癌への治療応用のうえで非常に有利と考えられた. IGF-IRを分子標的とした場合, これを抑制しても単層培養での細胞増殖にはほとんど関与しない. Survival factorを必要とする腫瘍細胞では遮断・減弱によりin vivoで急速なアポトーシスを生ずるが, 正常細胞では決してアポトーシスは生じない. この効果の腫瘍細胞特異性, すなわち副作用の少なさもIGF-IR治療の最大の利点と考えられる. 今後, 難治性子宮頸癌に対するIGF-IR分子標的治療の臨床応用を目指したい.