

Title	IGFBPs contribute to survival of pancreatic cancer cells under severely hypoxic conditions
Author(s)	古我, 匠
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49975
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	古 我 匠 (たくみ)
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 3 2 4 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 21 年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	IGFBPs contribute to survival of pancreatic cancer cells under severely hypoxic conditions (IGFBP は強度の低酸素環境下での膵臓癌細胞の生存に寄与する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 審 良 静 男 (副査) 教 授 菊 谷 仁 教 授 宮 坂 昌 之

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

癌細胞は制御されない分裂を特徴とする疾患で、それを標的として癌治療が行われてきた。しかしながら実際の腫瘍内部は血管構築が不完全なために酸素や栄養に乏しい部分が存在する。そのような低酸素領域の癌細胞に対しては現在の化学療法や放射線療法では十分な効果を上げることはできない。従って、今後有効な癌治療法について考えていく上で癌と低酸素の問題は重要である。

〔 方 法 なら び に 成 績 〕

低酸素環境に耐性を示すヒト膵臓癌細胞AsPC-1 は通常酸素濃度下では5日目までピークとしてその後細胞死により急速に細胞数は減少する。しかしながら1%の酸素濃度下で培養すると18 日目を越えても細胞数は維持される。この時細胞分裂は停止しており、細胞死も観察されない。このように活動が低下した状態で長期間、低酸素下で生存することが可能なAsPC1細胞を用いて低酸素耐性に関わる因子について検討した。

低酸素では癌細胞でもタンパク合成が低下することが以前から知られている。これは低酸素環境下でエネルギー消費を抑制することによって、生存に必要なエネルギーを維持する癌細胞の適応戦略である可能性がある。そこでAsPC1のタンパク合成能を35Sラベルで観察したところ、低酸素環境下では経時的にタンパク合成能が低下した。しかしながら一部のタンパク質は低酸素でも産生が維持されている。このようなタンパクはあえてエネルギーを消費して産生されることから低酸素耐性に関与している可能性がある。そこで、AsPC1細胞において低酸素下でも産生の維持される蛋白、特に分泌タンパクに焦点を絞って同定を試みた。

AsPC1の総分泌タンパク量は低酸素環境下では経時的に減少する傾向が見られた。しかしながらSDS-PAGEで 詳細に検討したところ、低酸素環境下でも 通常酸素と比較してバンド濃度が濃くなっているもの、あるいは維持されているものが観察された。そこでこれらについて質量分析によるタンパク解析を行いIGFBP1、3、6 を同定した。IGFBP1 は高いレベルで維持されており、IGFBP3 と6は低酸素で分泌が上昇していた。IGFBP1とIGFBP3についてELISAで 培養液中濃度の経時的変化を調べたところ、分泌タンパク全体では減少傾向にあるのに対してこれらは逆に増加傾向にあることを確認した。

IGFBPファミリーは これまでに1から 6 までの存在が知られており、IGF と結合してそのシグナルを抑制する。一方IGFは膜受容体を解してPI3K, AKT, mTOR経路を活性化する。IGFは通常酸素下では増殖因子、あるいは生存因子として働くことが広く知られている。そこで、低酸素におけるIGFシグナルについて検討した。低酸素では通常酸素下と比較してmTOR下流の4EBP1とS6KおよびS6のリン酸化が低下した。血清がない状態では更にAKTのリン酸化も低下した。

組換え蛋白のIGF1 と、IGFBPと結合しないIGF1のmutantであるLONG-IGF1をAsPC1の培養系に添加した場合の細胞死誘導効果を比較したところ、野生型のIGF1と比較してLONG-IGF1では低濃度で細胞死を誘導した。これは野生型のIGF1では培養液中に豊富に存在するIGFBPにトラップされてしまうことを反映しているものと考えられた。その際の細胞内シグナルを確認すると、DES-IGF1では低濃度でAKTやS6のリン酸化が起きていた。更に、IGFBPの産生を強制的に低下させた場合の低酸素耐性に及ぼす影響を検討した。IGFBP3のshRNAを用いたRNAiを行ったところ、shRNAをトランスフェクトした細胞はベクターと比較してIGFBP3蛋白の低下が観察された。そこでIGFBP3をノックダウンした細胞shBP3のIGFによる細胞死を検討した結果、shBP1ではベクターよりも細胞死が促進され、その一方でIGFBP3を過剰発現させたoeBP3では細胞死が抑制された。その際の細胞内シグナルを確認すると、IGF刺激でshBP1はvectorよりも強いAKTやS6のリン酸化が観察された。すなわち、IGFBP は低酸素下におけるIGF による細胞死を緩衝することが明らかになった。

〔 総 括 〕

AsPC-1細胞の低酸素耐性のメカニズムとして、IGFBPによるIGFシグナルの抑制が関与していることを明らかにした。IGFBP1、3、6は以前から低酸素誘導遺伝子として知られているが、低酸素における遺伝子誘導は細胞の生存戦略に基づくものである可能性がある。また低酸素でmTORシグナルが抑制されることは知られているが、それ以外にもIGFBPなど複数の段階でIGFシグナルを抑制するシステムが存在するのではないかと考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

酸素や栄養に乏しい低酸素領域に存在する癌細胞は化学療法や放射線療法に対して難治療性を示すことはよく知られているが、低酸素耐性メカニズムについてはこれまであまり注目されてこなかった。本研究では、低酸素耐性を示すヒト膵臓癌細胞であるAsPC-1が、低酸素および無酸素下でIGFBP-1及びIGFBP-3を細胞外に分泌し、これがIGFをトラップすることで過剰なIGFシグナルがAKT/mTOR経路に入るのを抑えていることを明らかにした。

その結果、低酸素下で不必要なタンパク合成を抑制して細胞内エネルギーを保持したり、ERストレスの発生を抑制することで環境の変化に適応することが、癌細胞の生存戦略の一つであることが示唆された。またそれに対して、逆に低酸素領域特異的に過剰なmTORシグナルを入れることができれば、エネルギー枯渇やERストレスの誘導によって細胞死を誘発できる可能性があると考えた。この結果は、従来の方法では治療が困難な低酸素耐性の癌細胞に対する新しい治療法に向けた可能性を示す知見であり、学位の授与に値するものと考えられる。