

## 非小細胞肺癌における eIF-4E、VEGF、survivin の発現と臨床意義

名 和 公 敏 <sup>1)</sup>	垣 花 昌 俊 <sup>1)</sup>	坂 田 義 詞 <sup>1)</sup>
前 田 純 一 <sup>1)</sup>	本 多 英 俊 <sup>1)</sup>	中 嶋 英 治 <sup>1)</sup>
野 村 将 春 <sup>1)</sup>	大 平 達 夫 <sup>1)</sup>	坪 井 正 博 <sup>1)</sup>
池 田 徳 彦 <sup>2)</sup>	平 野 隆 <sup>1)</sup>	加 藤 治 文 <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>東京医科大学外科学第一講座

<sup>2)</sup>国際医療福祉大学三田病院呼吸器センター

**【要旨】** 転写調節因子翻訳制御の異常は細胞増殖や癌化と密接に関連している。我々は翻訳開始因子、増殖因子がヒト肺癌においてリンパ節転移や血行性転移に関与する可能性の有無を検討するべく、細胞蛋白合成の開始因子である eIF-4E、血管内皮細胞成長因子の VEGF、抗アポトーシス関連蛋白質の survivin の発現様式を免疫染色で調べ、リンパ節転移などの臨床予後の関連性を肺切除標本よりそれぞれの症例につき検討を行った。survivin および eIF-4E 共に染色陽性群と共に陰性群を比較すると 5 年生存率はそれぞれ 47.8% と 83.5% で両者染色陽性群の予後が有意に悪いことが認められた ( $P=0.036$ )。またこれらの因子の発現に関し、直接抗癌剤によって蛋白発現を制御しうるかどうかが肺癌細胞株を用い検討を行った。シグナル伝達経路で翻訳開始因子 eIF-4E の上流に存在する m-TOR を抑制するラパマイシンを肺癌細胞株に投与することにより eIF-4E の活性は抑制された。またラパマイシンは細胞周期を G1 期で停止させることを確認したことより、ラパマイシンが肺癌の治療の一助となりうると考えられた。m-TOR 阻害剤を用い eIF-4E を抑制することで蛋白翻訳や細胞増殖を抑制しうることから eIF-4E は治療の標的因子として重要であること、また予後因子の指標の一つになりうると考えられた。

### はじめに

肺癌は初期症状が乏しく早期診断が困難であり、有症状で来院された症例は初診時にはすでに進行していることが多い。さらに、遠隔転移やリンパ節転移をきたしやすく上皮性腫瘍のなかでも治りにくい癌の一つである。肺癌の治療成績に影響する因子として原発巣の進展度とリンパ節、遠隔転移の有無が重要であり、病期分類は予後を反映する重要な因子である<sup>1)</sup>。分子生物学的研究の進歩により発癌過程や癌の進展に

関係する遺伝子、蛋白が同定されるようになった。細胞周期、遺伝子複製に関わるさまざまな因子がこれらの過程に関係していることが明らかになってきており、これら因子の制御が癌の治療につながると思われる。癌細胞が抗癌剤や放射線、修復不能な遺伝子損傷から回避して生存し続けていく防御機能にアポトーシスからの回避が挙げられる<sup>2)</sup>。アポトーシスを抑制する蛋白質のひとつに survivin が挙げられる。survivin とは 16.5 kDa からなる抗アポトーシス蛋白の一種で染色体 17q25 に存在する。種々の抗アポト

2008 年 1 月 22 日受付、2008 年 2 月 5 日受理

キーワード：アポトーシス、蛋白翻訳調節、eukaryotic initiation factor-4E(eIF-4E)、vascular endothelial growth factor (VEGF)、Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1(4E-BP1)

(別冊請求先：〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学外科学第一講座 垣花 昌俊)

Tel: 03-3342-6111 (5070) Fax: 03-3349-0326

シス蛋白の中でも最も単純な構造をしており、抗アポトーシス作用を主に規定する baculovirus IAP repeat (BIR) を1つだけ含む。inhibitor of apoptosis (IAPs) ファミリーに属する抗アポトーシス蛋白8種類のうちの1つでカスパーゼ-3、-7、-9に選択的に結合しカスパーゼの働きを阻害する<sup>16)</sup>他に、悪性腫瘍細胞の増殖、血管新生に関与していると考えられている<sup>17)</sup>。survivin は元来、胎生期正常細胞に発現しているが、胎生期を過ぎると survivin の転写は停止し、成人正常組織ではほとんど検出されないとされている<sup>18)</sup>。近年、大腸癌<sup>19)</sup>、悪性リンパ腫<sup>20)</sup>など悪性腫瘍における survivin の発現が相次いで報告されており、肺癌においても Western blotting 解析によりその発現が認められ<sup>21)</sup>、生存期間との相関が示された<sup>22)</sup>。survivin 発現量が正常組織と悪性腫瘍との間で差が大きいことから、腫瘍マーカーとしての意義と survivin 蛋白を直接阻害する抗腫瘍治療の分子標的となりうる可能性がある。癌抑制遺伝子である p53 は DNA に損傷を受けた細胞に対し細胞周期の進行を G1 期で停止させ DNA の修復を行うが、修復が不可能な細胞に対してはアポトーシスを誘導するか、あるいは不可逆的に細胞増殖を停止させる老化を誘導し、損傷 DNA を持った細胞の複製を防ぐ機能を持つ<sup>34)</sup>。この p53 遺伝子は肺癌細胞においては変異を来しており肺癌の多段階発癌過程における早期の段階で重要な役割を果たしていると考えられている<sup>56)</sup>。増殖因子を介するシグナル伝達経路のひとつとして知られているホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ (PI-3K)/Akt/mammalian target of rapamycin (m-TOR) シグナルの亢進により抗アポトーシス機構が癌細胞の保護に働く。悪性腫瘍において Akt の下流経路に存在する m-TOR を標的とした化学療法は 70-kDa 40S ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) と Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 (4E-BP1) の二つの蛋白のリン酸化を阻害し、シグナル伝達経路を遮断することにより抗腫瘍効果を発揮する<sup>8)</sup>。細胞増殖は蛋白合成が開始されることで起こる。その際に eukaryotic initiation factor-4E (eIF-4E) が活性化されることで、mRNA による蛋白質の翻訳が開始する。肺癌において成長因子、翻訳開始因子 eIF-4E、抗アポトーシス関連蛋白が肺癌の予後に寄与すると考え、東京医科大学病院呼吸器外科で手術を施行した肺癌症例を対象として細胞蛋白質合成の開始因子 eIF-4E、血管成長因子 VEGF、アポトーシス抑制蛋白 survivin の発現様式

を免疫染色で調べ、これらの因子の発現頻度と予後との関連性について検討を行った。また eIF-4E を抑制することで細胞増殖を抑え、腫瘍の抗アポトーシス機構を回避できると仮説をたて、これら癌関連蛋白質を直接抑制する薬剤、エルロチニブ (erlotinib)、MS-275、PS-341、ラパマイシン (rapamycin) を用い実際に肺癌細胞株において蛋白質レベルの発現の有無を調べ腫瘍抑制に繋がるかを検討したので報告する。

## 対 象

2001年1月～2002年12月に手術を施行した肺癌切除症例で、病理学的に N0、N1、N2 と診断された症例を対象とし、インフォームドコンセントが得られた全 85 例を対象とした。対象症例の臨床的背景を Table 1 に示した。

## 方 法

### 試薬

エルロチニブ (erlotinib; LC Laboratories 社、Massachusetts, USA)、MS-275 (Schering AG 社、Berlin, Germany)、PS-341 (LC Laboratories 社、Massachusetts, USA)、ラパマイシン (rapamycin; Sigma 社、Missouri, USA)、抗 VEGF 抗体 (Abcam 社、Cambridge, UK)、抗 eIF-4E 抗体 (Cell-Signalling 社、Massachusetts, USA)、抗 survivin 抗体 (Cell-Signalling 社、Massachusetts, USA)、抗 caspase-3 抗体 (Cell-Signal-

**Table 1** Clinicopathological characteristics of patients with NSCLCs.

	No. of Patients (n=85)	%
Gender		
Males	50	59
Females	35	41
Age (yr)		
Median(range)	64(27~82)	
Histology		
Squamous cell carcinoma	22	26
Adenocarcinoma	53	62
Other	10	12
Stage at diagnosis		
I	32	38
II	22	26
III	30	35
IV	1	1

ling Technology 社、Massachusetts、USA)、抗 Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 抗体 (Cell-Signaling Technology 社、Massachusetts、USA)、抗 eIF-3h 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社、Santa Cruz、California USA)

#### A 臨床材料

##### 1) 組織片作製

手術により採取された肺組織は直ちに 10% 緩衝ホルマリン溶液を用いて固定した後パラフィン包埋した。パラフィン包埋した組織を 4  $\mu$ m 厚に薄切し連続切片を作製した。

##### 2) 免疫染色

薄切した標本を脱パラフィン後、3% 過酸化水素・メタノール液を用いて内因性ペルオキシダーゼを阻害し、0.01 M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 内で 10 分間マイクロウェーブ処理を行った後、抗原性を賦活化した。抗 VEGF 抗体 (X50) 抗 eIF-4E 抗体 (X50)、抗 survivin 抗体 (X100) を用いて染色を行った。その後 diaminobenzidine (DAB) を用いて発色を行い、ヘマトキシリンで核染色を行った。

##### 3) 免疫染色判定法

eIF-4E、survivin、VEGF は腫瘍細胞と薄切切片に含まれる非腫瘍細胞のうち上皮成分との発現度の差を比較した。腫瘍細胞に強い発現を認める症例を陽性例とした。腫瘍細胞と非腫瘍細胞に同程度あるいは非腫瘍細胞に強く発現している症例を陰性例とした。腫瘍細胞に強い発現を認める割合を全体の細胞と比較することでスコア化し 50% 以上のものを陽性例、25% 以下のものを陰性例とした。

##### 4) 統計的処理法

eIF-4E、survivin および VEGF の発現形式と生存期間の関係を Kaplan-Meier 法を用いて検討した。また、eIF-4E と survivin の組み合わせによる発現形式と生存期間の関係も Kaplan-Meier 法を用いて検討した。それぞれ、有意差は Log Rank (Mantel-Cox)(カイ 2 乗) 検定を用いて算出した。

#### B 肺癌細胞株

##### 1) 細胞

ヒト由来の肺癌細胞株および中皮腫細胞株 NCI-H28、-H69、-H157、-H290、-H292、H358、-H417、-H513、-H647、-H661、H1334、-H1648、-H1793、-H2122、A549、ヒト由来腎癌細胞株 SKRC17、SKRC39、ヒト胎児由来腎細胞株 (human embryonic kidney cell line) FI293T-Rex を用いた。これら細胞株

を 5%FCS 添加 RPMI1640 培地を用い、5%CO<sub>2</sub>、37°C で培養した。

##### 2) 細胞周期の定量

1  $\times$  10<sup>6</sup>/ml の細胞を 100 mm ディッシュに播敷し、各抗癌剤を添加し 48 時間培養した後細胞回収し、それらをサポニンおよび propidium iodide (PI) を用いて染色し、フローサイトメーターで定量化した。

##### 3) ウェスタンブロット解析

肺癌細胞株に各抗癌剤を添加し培養した後蛋白抽出溶液 (RIPA buffer; 150 mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 50 mM Tris, pH 7.2, containing 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5  $\mu$ g/ml aprotinin, 5  $\mu$ g/ml leupeptin) に浮遊させ、超音波細胞破碎装置を使用して細胞膜を破碎した後、15,000 回転 10 分間遠心し、蛋白を回収した。得られた蛋白を sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を用いて解析を行った。抗体は抗 caspase-3 抗体 (X2000)、抗 PARP 抗体 (X2000)、抗 eIF-3h 抗体 (X500) をそれぞれ用いた。

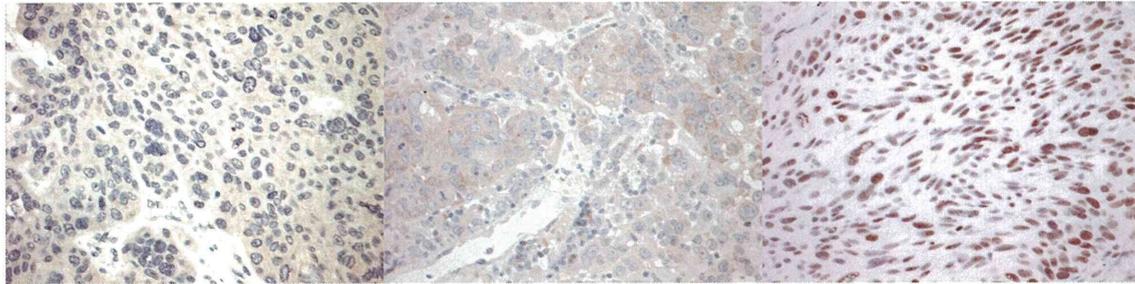
##### 4) m7-GTP-sepharose 沈降

上記 3) で得られた蛋白をさらに 7-Methyl GTP Sepharose4B (GE Healthcare Bio-Science 社、New Jersey、USA) と共に 4°C 下に 3 時間沈降させた。そののち再び蛋白を回収し、得られた蛋白で SDS-PAGE を行い、4E-BP1 および eIF-3h の発現解析を行った。

## 結 果

### 肺癌切除標本における各蛋白発現

正常肺および肺癌組織における蛋白発現を抗 eIF-4E 抗体、抗 survivin 抗体、抗 VEGF 抗体を用いて免疫組織化学法で解析した。eIF-4E、survivin、VEGF のそれぞれは、正常肺組織内では細気管支上皮細胞の管腔側のみが弱く染色され<sup>14)20)30)</sup>、それに対し肺癌組織では、多くの癌細胞の細胞質がびまん性に強く染色される。我々の検討においても同様の染色結果が示された (Fig. 1)。500 個の腫瘍細胞数を数え、染色陽性細胞数が 50% 以上の症例を陽性例とした場合 survivin の陽性例は 85 症例中 37 症例 (44%) で認められた。Log Rank (Mantel-Cox) (カイ 2 乗) 検定を用いて算出した有意確率は ( $P < 0.148$ ) であった。eIF-4E の陽性例は、85 症例中 51 症例 (60%) で認められた。有意確率は ( $P < 0.125$ ) であった。VEGF の陽性例は 85 症例中 40 例 (47%) で認められた。有意確率は ( $P < 0.083$ ) であり、いずれにおいても有意差は認められなかった。

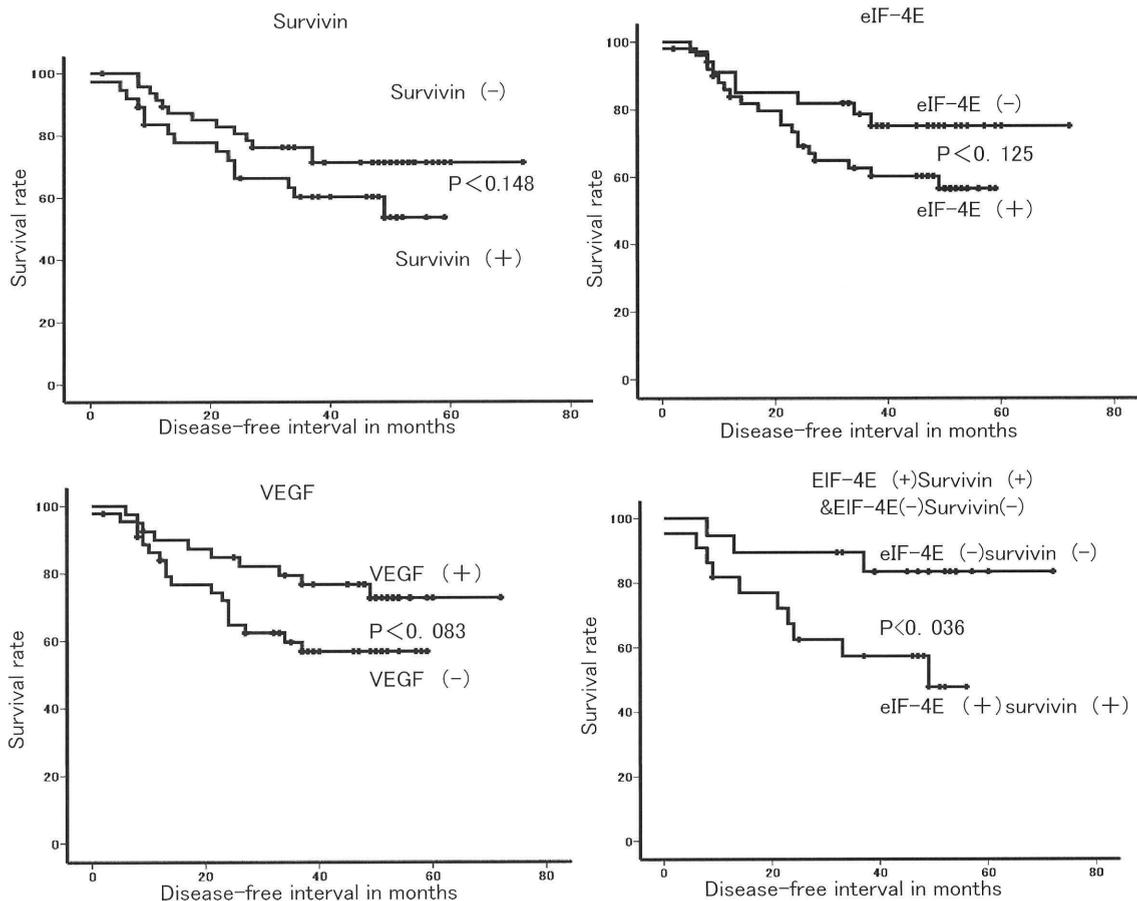


**VEGF**

**eIF-4E**

**survivin**

**Fig. 1** Expression of eIF-4E (a), survivin (b), and VEGF (c) protein in non-small cell lung carcinomas. The normal epithelium cells showed only weak staining. All proteins are expressed in cytoplasm.



**Fig. 2** Kaplan-Meier disease-free curves for (a) 48 survivin-negative and 37 survivin-positive, (b) 34 eIF-4E-negative and 51 eIF-4E-positive, (c) 45 VEGF-negative and 40 VEGF-positive, and (d) 19 both eIF-4E and survivin-negative and 22 both eIF-4E and survivin-positive in NSCLCs.

しかし、survivin と eIF-4E の組み合わせの中で survivin 陽性かつ eIF-4E 陽性 22 例 (26%) と survivin 陰性かつ eIF-4E 陰性例 19 例 (22%) との間における有意確率は ( $P < 0.036$ ) であり、ともに陽性である群は陰性の群に比べて予後が悪い結果となった (Table 2)。

**細胞周期解析およびアポトーシス解析**

使用した抗癌剤、すなわちプロテアゾーム阻害薬

PS-341 は G2/M 期で<sup>7)</sup>、m-TOR 阻害薬ラパマイシン<sup>8)</sup>、HDAC 阻害薬 MS-275<sup>9)</sup>、チロシンキナーゼ受容体阻害剤エルロチニブ<sup>25)</sup> はそれぞれ、細胞周期を G1 期で停止することが知られている。H460、A549、H358 細胞株に対して、細胞周期の検討を行ったところ、ラパマイシン治療に対し、H460 細胞の G1 期は 29.12% から 68.59%、A549 細胞の G1 期は 44.95% から 77.20%、H358 細胞の G1 期は 38.15% から 81.50% と、

それぞれ G1 期の細胞の割合が増加する事を認めた (Table 3)。エルロチニブによる治療を行った細胞も G1 期での細胞周期の停止を認めた (Table 3)。PS-341 では G2/M 期の停止を顕著に認めなかった。MS-275 においては A549 細胞を用い細胞周期の検討を行った。用量依存性に G1 期停止の比率の増加を認めた (Fig. 3D)。ついでウェスタンブロット解析を用いて MS-275 が細胞に対してアポトーシスを誘導している

かを検討した。検討はカスパー-3 と Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) の断片化の検出を行うことにより判定を行った。MS-275 を 2  $\mu$ M、5  $\mu$ M、10  $\mu$ M と濃度を増加させると断片化するカスパー-3 および PARP の量の増幅を認めた。さらに 5  $\mu$ M において治療後 24 時間、36 時間、48 時間治療した後に同様にカスパー-3 と PARP の断片化を解析したところ、同様に時間依存的に断片化の増幅を認めた (Fig. 3E, F)。

**Table 2** The results of immunohistochemistry staining.

category	No. of patients	%
survirvin	(n=85)	
(+)	37	44
(-)	48	56
eIF-4E	(n=85)	
(+)	51	60
(-)	34	40
VEGF	(n=85)	
(+)	40	47
(-)	45	53
survirvin, eIF-4E	(n=41)	
(+), (+)	22	54
(-), (-)	19	46

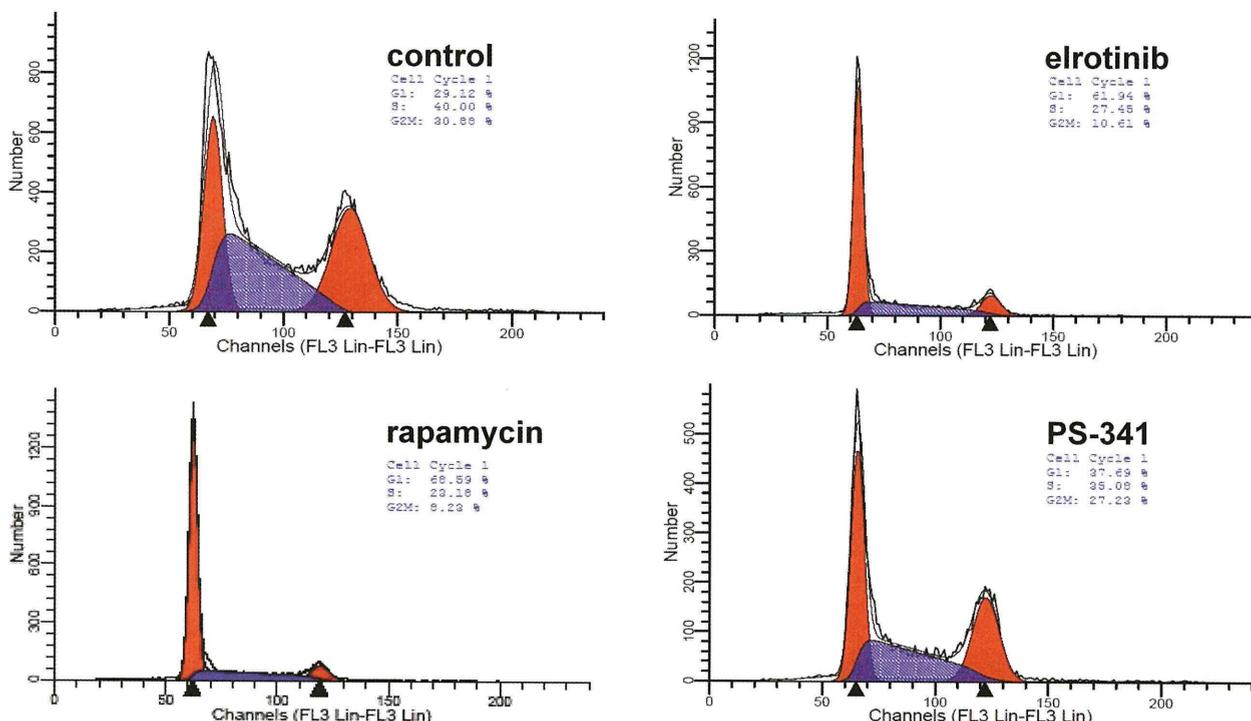
**翻訳開始因子**

各種の成長因子により活性化される PI3K/Akt/mTOR シグナルの亢進が悪性腫瘍細胞の増殖、抗アポトーシスに寄与すると報告されている<sup>10)</sup>。Akt の下流

**Table 3** Cell cycle analysis

H460	control	rapamycin	elrotinib	PS-341
G1 (%)	29.12	68.59	61.94	37.69
S (%)	40.00	23.18	27.45	35.08
G2/M (%)	30.88	8.23	10.61	27.23
A549	control	rapamycin	elrotinib	PS-341
G1 (%)	44.95	77.20	73.89	45.90
S (%)	36.74	15.73	17.58	35.22
G2/M (%)	18.32	7.07	8.53	18.88
H358	control	rapamycin	elrotinib	PS-341
G1 (%)	38.15	81.50	76.21	40.14
S (%)	35.33	12.32	15.81	34.46
G2/M (%)	26.52	6.18	7.98	25.40

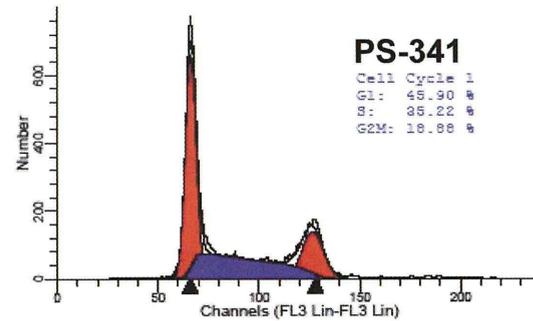
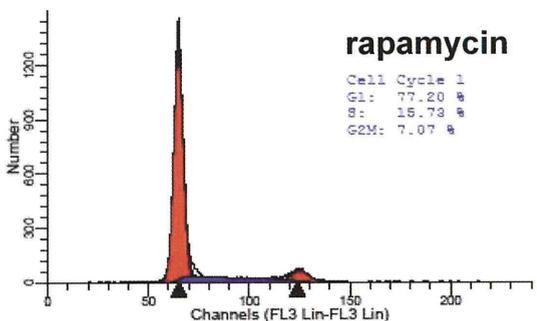
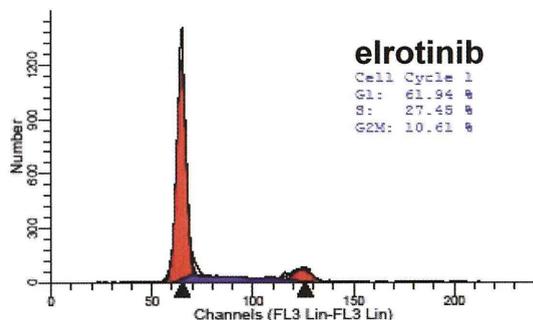
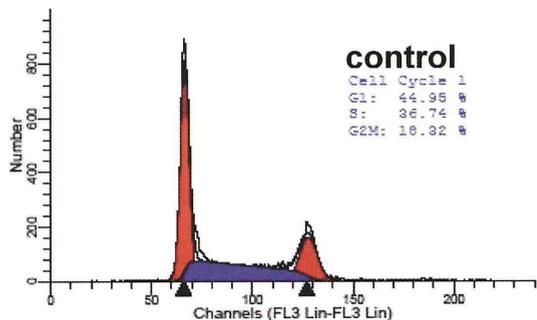
**A. H460 cells**



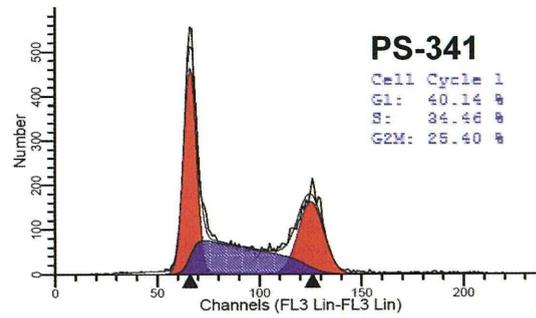
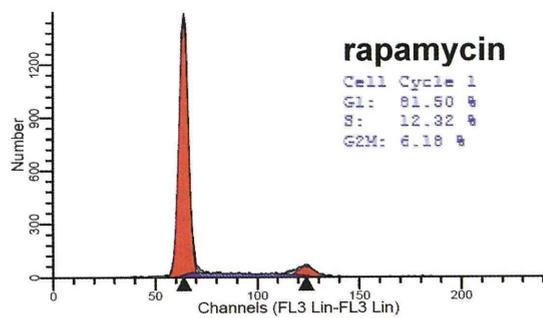
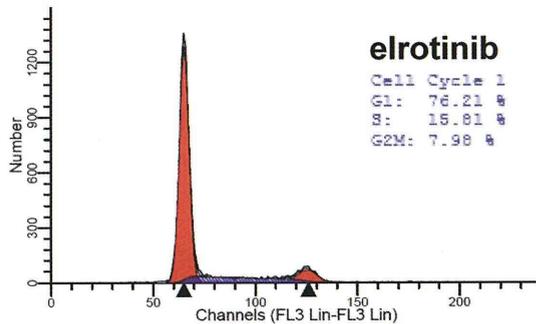
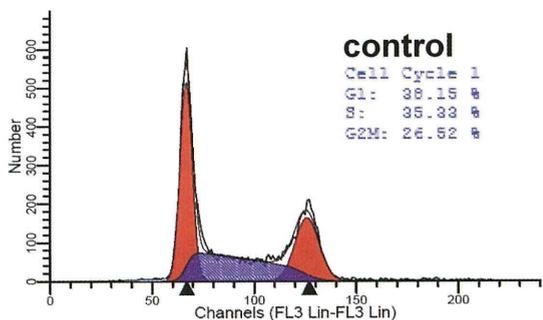
経路に存在する m-TOR はマクロライド系抗生物質のラパマイシンの標的蛋白質として同定され、p70S6K と 4E-BP1 をリン酸化するセリンスレオニン

キナーゼである。4E-BP1 は eIF-4E と結合し eIF-4E による転写を抑制しているが 4E-BP1 がリン酸化されると eIF-4E と離れ eIF-4E は eIF-4G、eIF-4A と

### B.A549 cells



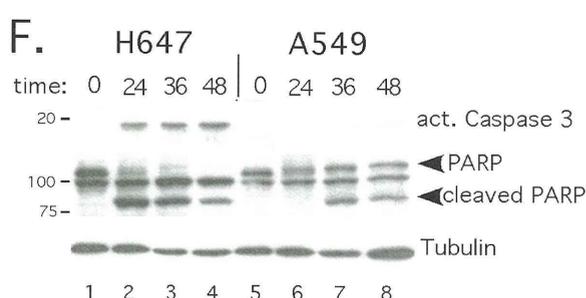
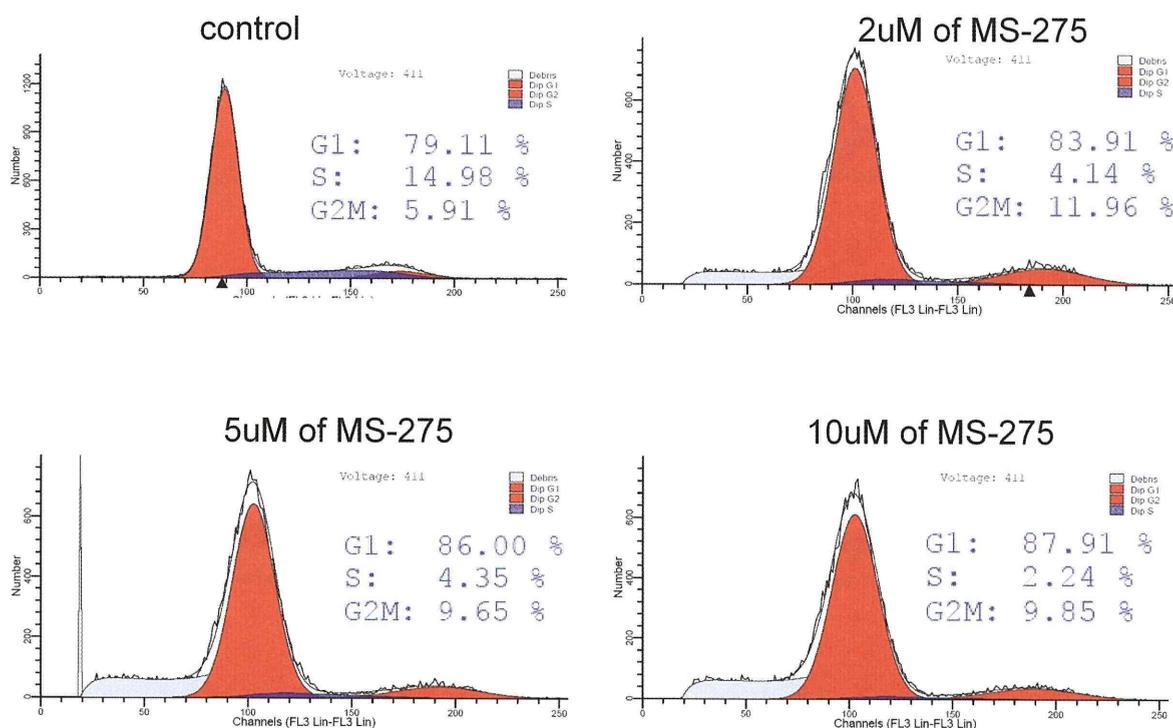
### C.H358 cells



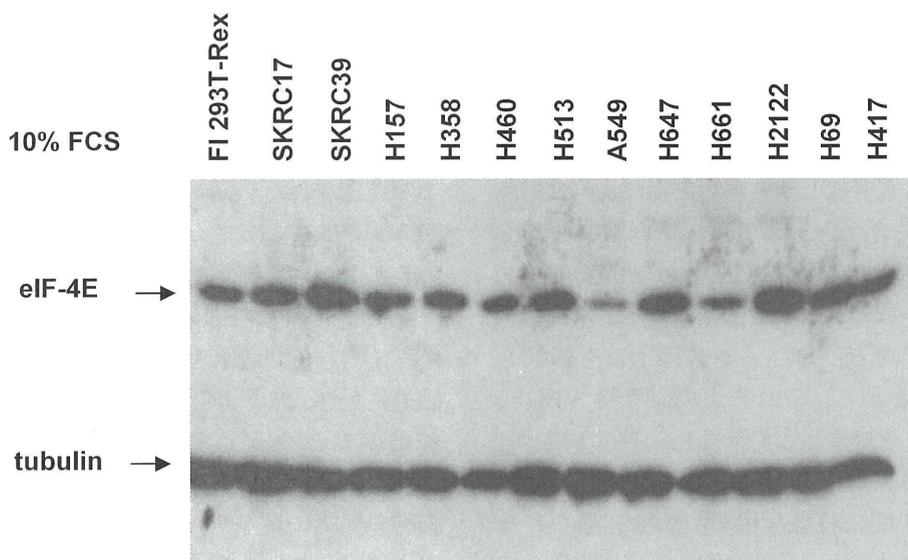
共に eIF-4F 複合体を形成しキャップ依存性の転写を開始する。ラパマイシンが m-TOR を抑制すると 4E-BP1 はリン酸化されないことより eIF-4F 複合体が形成されずキャップ依存性転写量は減少し、40S リボゾームに結合する eIF-3h もキャップ構造と複合体を形成することはない<sup>23)</sup>。そこで、肺癌細胞株をラパマイシンに 72 時間接触させた後に回収し m7-GTP セ

ファロースビーズと共に沈降させ、4E-BP1 の出現量とキャップ構造と複合体を形成する eIF-3h 量を SDS-PAGE により観察した (Fig. 5)。(a) リン酸化 4E-BP1 量はラパマイシンにより減少した。(b) eIF-3h のキャップ構造への結合量は減少した。

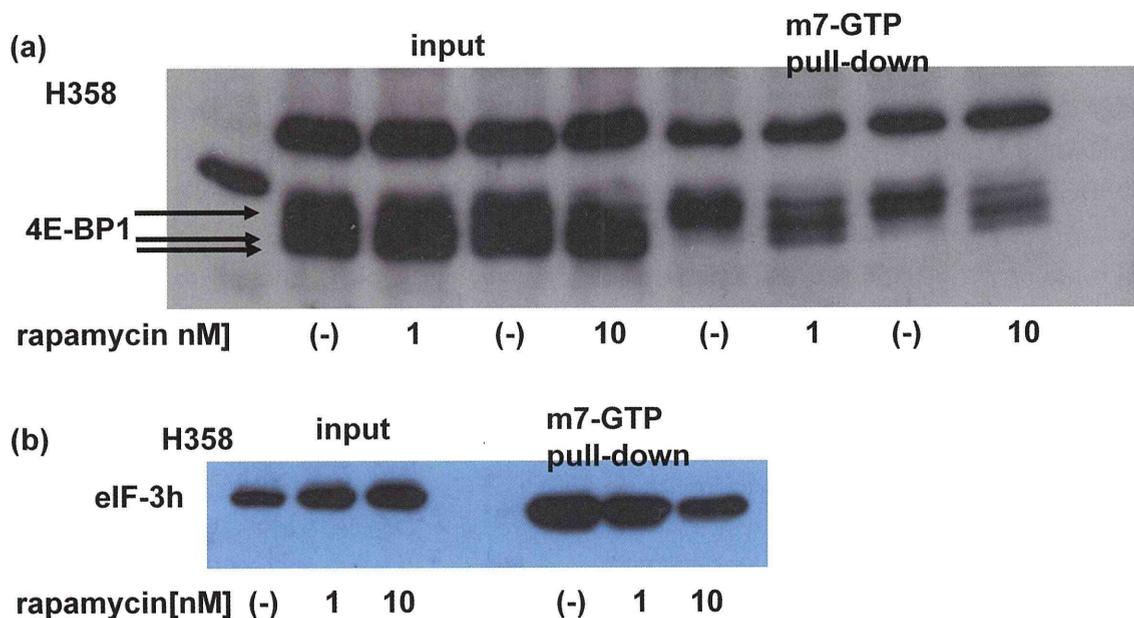
### D.A549cells



**Fig. 3** Therapeutic agents induce cell growth arrest and apoptosis. (AtoC) Erlotinib and rapamycin induce G1 phase arrest in NSCLC cells but PS-341 does not induce G2/M phase arrest clearly. (D) A549 cells demonstrated an accumulation of G1 phase after 48 hours MS-275 exposure, and this accumulation is dose-dependent. A549 were treated for 48 hours with the indicated doses of MS-275. The indicated NSCLC cell lines were incubated with medium (controls), MS-275 (5 μM) rapamycin (10 nM) and erlotinib (10 μM) for 48 h, as indicated. The percentage of accumulation cells was determined by flow cytometry using dual staining with Saponin and propidium iodide. (E and F) MS-275 induces apoptosis in sensitive NSCLC cell lines. Two cell lines deemed moderately sensitive (H647, IC<sub>50</sub>=1.74 ± 0.3 μM) and resistant (A549, IC<sub>50</sub>=3.42 ± 0.9 μM) to MS-275 were examined for biochemical changes indicative of apoptosis. (E) Cultures were treated for 36 hours with the indicated doses of MS-275, then protein lysates analyzed by Western blot for activated caspase 3 and poly ADP ribose polymerase (PARP) cleavage. (F) Cell lines were treated for increasing times, as indicated, using 5 μM MS-275. Activation of caspase 3 and PARP cleavage was assayed as in (E). Tubulin provided loading controls.



**Fig. 4** eIF-4E expression in NSCLC cell lines. eIF-4E protein levels were measured in 13 cell lines, as indicated. Each lane contained 10  $\mu$ g of protein lysate from exponentially growing cells. SKRC17 and SKRC39 are renal cell carcinoma cells, HEK 293 is a human embryonic kidney cell line. A tubulin provided a loading control.



**Fig. 5** rapamycin decreases the phosphorylation of 4E-BP1. (a and b) H358 cells were treated with vehicle (DMSO) or with increasing concentrations of rapamycin as indicated and harvested after 48 hours. Proteins were resolved by SDS electrophoresis and expression was examined by immunoblotting with antibodies specific for eIF-3h, and 4E-BP1. Cells were treated as described above and harvested after 48 hours. Protein expression was examined by immunoblotting with antibodies specific for eIF-3h and 4E-BP1. eIF-4E was affinity precipitated with m7GTP-sepharose 3 hours at 4°C after treatment. Affinity-precipitated proteins were resolved by SDS-electrophoresis and analyzed by immunoblotting with antibodies specific for eIF-3h and 4E-BP1.

### 考 察

全ての病期を含めた非小細胞肺癌の5年生存率は13%であるが、外科的に切除されたI期、II期のみで集計すると47%にまで改善する<sup>11)</sup>。このことから外科的に肺癌を治療する方法は非小細胞肺癌の予後を左右

する重要な因子の一つとして挙げられる。病期は、T因子、N因子、M因子の組み合わせより成り立ち、I期で2通り、II期で3通りの組み合わせから成る。I期、II期の外科的切除例の半数以上が再発していることから、同じ病期でもTNM因子の組み合わせなど多種多様な予後因子が存在していることが予想され

る<sup>11)</sup>。分子マーカーとして様々な蛋白、遺伝子が転移や予後の評価に用いられているが複数のマーカーの組み合わせが候補として挙げられている<sup>12-14)</sup>。治療の標的として、またマーカーとして両者に有用であるものが予後因子として評価しうるものと考え、その候補として増殖因子を介するシグナル伝達経路のなかで代表的なものの一つである PI3K/Akt/m-TOR シグナルに着目した。このシグナル伝達経路は、蛋白翻訳調節因子のみならず抗アポトーシス因子にも影響を及ぼしていることから、それらに関連する VEGF、survivin、eIF-4E を対象として予後との関連を検討した。肺癌切除標本における VEGF の免疫染色の結果と 5 年生存率との間に有意な相関関係は認められなかった。血管新生は発生、組織修復、炎症や腫瘍の進展など数多くの生理学的、病理的過程で重要な役割を果たしている。サイトカイン、成長因子、その他の多くのメディエーターが血管造成に関与している。組織の血管新生の間、内皮細胞は、細胞外マトリックス成分や他の内皮細胞に接着するが、これは血管造成には必須の過程である。血管内皮成長因子 (VEGF) は内皮細胞に特異的な分裂誘導物質であり、血小板由来成長因子 (PDGF) と約 20% 構造上の相同性を示す直接的メディエーターである。VEGF は *in vivo* で血管新生を誘導し、*in vitro* では内皮細胞の増殖を促進し、血管の浸透性を高める<sup>15)</sup>。血管新生のメディエーターによる内皮細胞の刺激、あるいは細胞接着分子を経由する内皮細胞の接着は細胞膜を貫通する様々なシグナル伝達メカニズムを活性化し、次いで毛細管形成を引き起こす。正常細胞の血管新生と同様に悪性腫瘍細胞は VEGF をはじめとする血管新生因子を産生し、血管内皮細胞の増殖および遊走を促進し、宿主血管を腫瘍内へ誘導し、血管を発達させることにより増殖を続ける<sup>15)</sup>。このことから血管新生は悪性腫瘍の増殖に不可欠であり、転移を起こす際の進入路となりうると思われる。今回対象とした症例の再発形式を詳細に検討し免疫染色結果との相関を比較する必要があると考えられた。survivin、eIF-4E 共に単独で染色陽性であったものでは予後に相関は認められなかったが、survivin と eIF-4E の両者とも染色陽性群と両者とも陰性群を比較すると両者とも陽性群において生存率が低下することが確認された。悪性腫瘍の発現過程においても、悪性腫瘍が生存し続けるためにも複数の因子を要することは間違いなく、一連のシグナル伝達経路において予後に相関する因子を確認できたことは

興味深い。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 MS-275 を培地に添加し肺癌細胞を培養したところ細胞は G1 期において細胞分裂を停止した。同時にウェスタンブロット解析にてアポトーシスの誘導が起きていることが確認された。survivin はカスパー-3 を阻害するが MS-275 によってカスパー-3 の活性が上昇していることから、MS-275 が survivin の活性を抑制することでカスパー-3 の活性を上昇させている可能性が考えられる。増殖因子を介し、細胞増殖、分化、細胞の走化性、血管新生などに関するシグナル伝達経路のひとつとして知られている PI-3K/Akt/mTOR シグナルの亢進により抗アポトーシス機構が癌細胞の保護に働く<sup>19)23)</sup>。PI-3K が活性化されるとホスファチジルイノシトール-3 リン酸 [PI(3, 4, 5)P3] が産生され、[PI(3, 4, 5)P3] はセリンスレオニンキナーゼである Akt と結合してその活性化を促進する。Akt の下流経路に存在する m-TOR はマクロライド系抗生物質のラパマイシンの標的蛋白質として同定され<sup>23)</sup>、p70S6K と 4E-BP1 をリン酸化するセリンスレオニンキナーゼである<sup>24)</sup>。Akt の下流経路に存在する m-TOR を標的とした化学療法はこの二つの蛋白質のリン酸化を阻害し、シグナル伝達経路を遮断することにより効果を発揮する<sup>25)</sup>。多くの腫瘍細胞において cyclinD、p53、pRB、p16、p27 の異常や、PI-3K の活性化の亢進が観察されるので、m-TOR 阻害剤は有効な抗腫瘍薬剤として期待できる。遺伝子の発現には DNA から mRNA への遺伝情報の転写と mRNA からタンパク質への翻訳の二つの過程がある<sup>26)</sup>。これまでは主に、転写レベルでの研究が多くされてきたが、翻訳レベルでの調節も細胞の増殖、分化に重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた<sup>27)</sup>。悪性腫瘍細胞が VEGF などの成長因子や cyclin D1 によって刺激を受けると蛋白合成が開始されるが、その蛋白質の翻訳が、eIF-4E と mRNA の 5'-末端に存在するキャップ構造 (7mGTP) と結合することにより開始される<sup>28)29)</sup>。eIF-4E は普遍的な蛋白翻訳の開始因子であるが、翻訳制御の異常と、キャップ依存性の翻訳開始因子による蛋白翻訳量の増加を調べることが腫瘍発育のメカニズムとして重要な課題と考えられ、Lazaris-Karatzas ら<sup>30)</sup> により eIF-4E は proto-oncogene であることが指摘された。この結果を踏まえ、eIF-4E が多くの乳癌、結腸癌および頭頸部癌に過剰発現し、腫瘍の悪性度や患者の予後とも相関すると報告された<sup>31)</sup>。さらに eIF-4E の発現量の増加は腫瘍の

増殖を助け、抗アポトーシスに寄与することも指摘された<sup>32-34</sup>)。m-TOR 阻害剤であるラパマイシンを培地に添加し肺癌細胞を培養したところと G1 期に細胞周期は停止した。さらにラパマイシンは蛋白質合成開始因子である eIF-4E の翻訳開始を抑制する 4E-BP1 のリン酸化量を減少させた。mRNA キャップ構造に eIF-3h は結合し mRNA の転写翻訳を担うが<sup>24</sup>)、ラパマイシンの 4E-BP1 リン酸化抑制効果により eIF-3h のキャップ構造への結合を抑制した。成長因子の受容体のチロシンリン酸化酵素を阻害する薬剤は肺癌において目覚しい治療効果をもたらすが、その効果の一つに細胞を G1 期に停止させることが挙げられる<sup>35)36</sup>)。チロシンリン酸化阻害剤であるエルロチニブを用いた実験で我々はエルロチニブが肺癌細胞株を G1 期に停止させることを確認した。このことよりエルロチニブは成長因子から始まるシグナル伝達経路を停止させその下流の m-TOR からの蛋白翻訳開始因子へのシグナルも抑制しうることを示唆された。我々の免疫染色の結果と予後の関連性を比較すると、eIF-4E および survivin 発現が予後に寄与しうることから、肺癌に対する化学療法の薬剤の選択として、アポトーシスを誘導する薬剤と m-TOR 阻害剤との組み合わせが、肺癌において新しい抗癌剤治療の可能性として期待しうるかもしれないと考えられた。また m-TOR 阻害剤を用い eIF-4E を抑制することにより、蛋白翻訳や細胞増殖を抑制しうることから eIF-4E は治療の標的因子として重要であること、かつ、予後因子の指標の一つになりうると考えられた。

## 謝 辞

本研究の一部は、財団法人東京医大がん研究事業団がん研究助成金の研究助成により行われたことを記しここに謝意を表します。また本研究の免疫染色を遂行するにあたり、当教室の龔雲波先生より多大な尽力を頂いたことをあわせて深謝致します。

## 文 献

- Asamura H, Goya T, Koshiishi Y, Sohara Y, Eguchi K, Mori M, Nakanishi Y, Tsuchiya R, Shimokata K, Inoue H, Nukiwa T, Miyaoka E: A Japanese Lung Cancer Registry study: prognosis of 13,010 resected lung cancers. *J Thorac Oncol* **3**: 46-52, 2008
- Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70, 2000
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ: Surfing the p53 network. *Nature* **408**: 307-310, 2000
- Sengupta S, Harris CC: p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 44-55, 2005
- Takahashi T, Nau MM, Chiba I, Birrer MJ, Rosenberg RK, Vinocour M, Levitt M, Pass H, Gazdar AF, Minna JD: p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* **246**: 491-494, 1989
- Sozzi G, Miozzo M, Donghi R, Pilotti S: Cariani CT, Pastorino U, Porta GD, Pierotti MA: Deletions of 17p and p53 mutations in preneoplastic lesions of the lung. *Cancer Res* **52**: 6079-6082, 1992
- Ling YH, Liebes L, Jiang JD, Holland JF, Elliott PJ, Adams J, Muggia FM, Perez-Soler R: Mechanisms of Proteasome Inhibitor PS-341-induced G2-M-Phase Arrest and Apoptosis in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines. *Clin Cancer Res* **9**: 1145-1154, 2003
- Huang S, Liu LN, Hosoi H, Dilling MB, Shikata T, Houghton PJ: p53/p21 cooperate in enforcing rapamycin-induced G1 arrest and determine the cellular response to rapamycin. *Cancer Res* **61**: 3373-3381, 2001
- Saito A, Yamashita T, Mariko Y, Nosaka Y, Tsuchiya K, Ando T, Suzuki T, Tsuruo T, Nakanishi O: A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 4592-4597, 1999
- Nicholson KM, Anderson NG: The Akt/PKB signaling pathway in human malignancy. *Cell signal* **14**: 381-395, 2002
- Fleehinger BS, Kimmel M, Melamed MR: The effect of surgical treatment on survival from early lung cancer; Implication for screening. *Chest* **101**: 1013-1018, 1992
- Strauss GM: Prognostic markers in resectable non-small cell lung cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* **11**: 409-434, 1997.
- Moldvay J, Scheid P, Wild P, Nabil K, Siat J, Borrelly J, Marie B, Farré G, Labib T, Pottier G, Sesboüé R, Bronner C, Vignaud JM, Martinet Y, Martinet N: Predictive survival markers in patients with surgically resected non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* **6**: 1125-1134, 2000
- Mineo TC, Ambrogi V, Baldi A, Rabitti C, Bollero P, Vincenzi B, Tonini G: Prognostic impact of VEGF, CD31, CD34, and CD105 expression and tumour vessel invasion after radical surgery for IB-IIA non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* **57**: 591-597, 2004
- Sunderkötter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C: Macrophages and angiogenesis. *J*

- Leukoc Biol **55**: 410-422, 1994
- 16) Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiere DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC: IAP-Family Protein survivin Inhibits Caspase Activity and Apoptosis Induced by Fas (CD95), Bax, Caspases, and Anti-cancer Drugs. *Cancer Res* **58**: 5315-5320, 1998
  - 17) Verhagen AM, Coulson EJ, Vaux DL: Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biology* **2**: 1-10, 2001
  - 18) Ambrosini G, Adida C, Altieri DC: A novel anti-apoptotic gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* **3**: 917-921, 1997.
  - 19) Kawasaki H, Altieri DC, Lu C-D, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N: Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* **58**: 5071-5074, 1998
  - 20) Adida C, Haioun C, Gaulard P, Lepage E, Morel P, Briere J, Dombret H, Reyes F, Diebold J, Gisselbrecht C, Salles G, Altieri DC, Molina TJ: Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* **96**: 1921-1925, 2000
  - 21) Kuo PC, Liu HF, Chao JI: survivin and p53 modulate quercetin-induced cell growth inhibition and apoptosis in human lung carcinoma cells. *J Biol Chem* **279**: 55875-55885, 2004
  - 22) Shinohara ET, Gonzalez A, Massion PP, Chen H, Li M, Freyer AS, Olson SJ, Andersen JJ, Shyr Y, Carbone DP, Johnson DH, Hallahan DE, Lu B: Nuclear survivin predicts recurrence and poor survival in patients with resected nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* **103**: 1685-1692, 2005
  - 23) Chiu MI, Katz H, Berlin V: RAP1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 12574-12578, 1994
  - 24) Hay N, Sonenberg N: Upstream and downstream of m-TOR. *Genes Dev* **18**: 1926-1945, 2004
  - 25) Shi Y, Frankel A, Radvanyi LG, Penn LZ, Miller RG, Mills GB: rapamycin enhances apoptosis and increases sensitivity to cisplatin in vitro. *Cancer Res* **55**: 1982-1988, 1995
  - 26) Crick F: Central dogma of molecular biology. *Nature* **227**: 561-563, 1970
  - 27) Clemens MJ, Bommer UA: Translational control: the cancer connection. *Int J Biochem Cell Biol* **31**: 1-23, 1999
  - 28) Lee JS, Kim HS, Kim YB, Lee MC, and Park CS: Expression of PTEN in renal cell carcinoma and its relation to tumor-behavior and growth. *J Surg Oncol*, **84**: 166-172, 2003
  - 29) Stoneley M, Willis AE: Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene* **23**: 3200-3207, 2004
  - 30) Lazaris-Karatzas A, Montine KS, Sonenberg N: Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature* **345**: 544-547, 1990
  - 31) De Benedetti A, Graff JR: eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* **23**: 3189-3199, 2004
  - 32) Li S, Sonenberg N, Gingras AC, Peterson M, Avdulov S, Polunovsky VA, Bitterman PB: Translational Control of Cell Fate: Availability of Phosphorylation Sites on Translational Repressor 4E-BP1 Governs Its Proapoptotic Potency. *Mol Cell Biol* **22**: 2853-2861, 2002
  - 33) Graff JR, Zimmer SG: Translational control and metastatic progression: Enhanced activity of the mRNA cap-binding protein eIF-4E selectively enhances translation of metastasis-related mRNAs. *Clin Exp Metastasis* **20**: 265-273, 2003
  - 34) Zimmer SG, DeBenedetti A, Graff JR: Translational control of malignancy: the mRNA cap-binding protein, eIF-4E, as a central regulator of tumor formation, growth, invasion and metastasis. *Anticancer Res* **20**: 1343-1351, 2000
  - 35) Helfrich BA, Raben D, Varella-Garcia M, Gustafson D, Chan DC, Bemis L, Coldren C, Barón A, Zeng C, Franklin WA, Hirsch FR, Gazdar A, Minna J, Bunn PA Jr: Antitumor activity of the epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839, Iressa) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with gene copy number and EGFR mutations but not EGFR protein levels. *Clin Cancer Res* **12**: 7117-7125, 2006
  - 36) Ling YH, Li T, Yuan Z, Haigentz M Jr, Weber TK, Perez-Soler R: Erlotinib, an effective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, induces p27 (KIP1) up-regulation and nuclear translocation in association with cell growth inhibition and G1/S phase arrest in human non-small-cell lung cancer cell lines. *Mol Pharmacol* **72**: 248-258, 2007

## Clinical analysis of resectable non-small cell lung cancers and determination the level of eIF-4E, survivin and VEGF

Kimitoshi NAWA<sup>1)</sup>, Masatoshi KAKIHANA<sup>1)</sup>, Yoshinori SAKATA<sup>1)</sup>,  
Junichi MAEDA<sup>1)</sup>, Hidetoshi HONDA<sup>1)</sup>, Eiji NAKAJIMA<sup>1)</sup>,  
Masaharu NOMURA<sup>1)</sup>, Tatsuo OHIRA<sup>1)</sup>, Masahiro TSUBOI<sup>1)</sup>,  
Norihiko IKEDA<sup>2)</sup>, Takashi HIRANO<sup>1)</sup>, Harubumi KATO<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>First Department of Surgery, Tokyo Medical University Faculty of Medicine

<sup>2)</sup>Respiratory Disease Center Mita Hospital, International University of Health and Welfare

### Abstract

The expression of eIF-4E, survivin and VEGF was immunohistochemistry investigated in 85 surgically resected non-small cell lung cancers (NSCLCs), and the results of expression status were correlated with patient clinical data. Using Kaplan-Meier survival curves, for the survivin negative and eIF-4E negative staining had a significantly better survival than either the survivin positive and the eIF-4E positive staining group (83.5% versus 47.8%,  $P=0.036$ ). We hypothesized that the induction of prohibiting the PI3K/AKT/m-TOR signaling pathway may lead to reduce tumor progression. We demonstrated that the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (erlotinib), m-TOR inhibitor (rapamycin), and histone deacetylase inhibitor (MS-275) induced cell growth inhibition in human NSCLCs cells were accompanied by G1/S phase arrest. We showed the suppression level of inhibitory eIF-4E binding protein (phospho-4E-BP1) rapamycin. This immunohistochemical study suggests that both eIF-4E and survivin may be a therapeutic target and a marker of tumor recurrence. Furthermore, the results provide insights into the cell cycle effects of erlotinib and rapamycin may be used as potential surrogate endpoints of drug action in clinical studies.

---

〈Key words〉 apoptosis, translation initiation, eukaryotic initiation factor-4E (eIF-4E), vascular endothelial growth factor (VEGF), Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 (4E-BP1)

---