

## 放射線誘発マウス肝癌における Insulin-like growth factor binding protein-related protein-1 (IGFBP-rP1) の発現低下

亭 島 淳

広島大学原爆放射能医学研究所分子生体制御研究分野 (指導: 神谷研二教授)

受付 平成 14 年 1 月 10 日

受理 平成 14 年 1 月 30 日

*Insulin-like growth factor binding protein related protein-1* (以下 *IGFBP-rP1*) は, *IGFBP* ファミリーに属する遺伝子で, IGF との結合を介した IGF 依存性の作用の他に, IGF 非依存性の多岐にわたる作用経路の存在が示唆されている。*IGFBP-rP1* は乳癌や前立腺癌などの悪性腫瘍において発現の低下が認められており, 前立腺癌や骨肉腫の細胞株に導入することにより増殖抑制効果がみられることから tumor suppressor gene の可能性が示唆されている。本研究では, 肝癌の発生, 増殖における *IGFBP-rP1* の役割を明らかにするため, 放射線誘発マウス肝癌とその培養系細胞株を用いて *IGFBP-rP1* の発現とその機能について解析した。まず B6C3F1 マウスの正常肝組織と肝癌組織における *IGFBP-rP1* の発現をノーザンブロット法で比較したところ, 肝癌組織では正常肝に比し *IGFBP-rP1* の発現の低下がみられた。また, 培養系細胞株では足場非依存性増殖能の強い細胞株において *IGFBP-rP1* の発現低下が著明であった。そこでマウス正常肝より作製した cDNA library から *IGFBP-rP1* 遺伝子をクローニングし, 発現ベクターを用いて肝癌細胞株へ導入し, その増殖能への影響について検討した。その結果, *IGFBP-rP1* を導入した細胞株では倍加時間の延長と細胞増殖能の低下が観察され, 同時に足場非依存性増殖能の著明な低下を認めた。さらにこの導入細胞を同系マウスに移植しその増殖能を検討したところ, 導入細胞の腫瘍形成能の低下を認めた。またヒト肝癌についてもノーザンブロット解析において, *IGFBP-rP1* の発現低下を認めた。これらの結果より, *IGFBP-rP1* の発現低下が肝癌の発生, 増殖に関与している可能性が示唆された。

**Key words** : *IGFBP-rP1*, 肝癌, 放射線発癌

Insulin-like growth factor (以下 IGF) は肝癌, 前立腺癌や乳癌などの様々な悪性腫瘍においてその発生や増殖に重要な役割を担っている事が知られている<sup>4,29)</sup>。IGF binding protein (以下 IGFBP) は, N 末端側に IGF binding domain を有するファミリーで, IGF と結合してその作用を増強もしくは減弱することがその主たる生理活性であると考えられている。IGFBP ファミリーは IGF との結合を介して悪性腫瘍の発生や増殖に関与しているとの報告が散見される<sup>20,28,29)</sup>。例えば肝癌の発生に IGF-II が促進的に作用するが, IGFBP-3 は IGF-II に結合し IGF-II の IGF レセプターへの結合を阻害することにより IGF-II の作用を抑制している。肝癌ではこの IGFBP-3 の発現が低下していることが知られている。そして SV40T 抗原を導入

したトランスジェニックマウスにおける肝癌において, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 の強制発現は IGFBP-3 の分解を阻害することにより肝癌の発生を抑制することが示されている<sup>14)</sup>。IGFBP のうち IGFBP-7~10 は, これまでに報告されてきた IGFBP-1~6 とは異なり, N 末端側のみにも相同性を有し C 末端側での相同性が低い構造を有する。また IGFBP-7, 8 では, IGF との親和性が IGFBP-1~6 に比べて低いことが示されている<sup>12,21,32)</sup>。これらの事から, 最近では, IGFBP-7~10 はそれぞれ, IGFBP related protein (IGFBP-rP) 1~4 として分類されている<sup>7)</sup>。

*IGFBP-rP* ファミリーのうち *IGFBP-rP1* は, 前立腺癌や乳癌において正常組織に比べて発現の低下がみられ, また前立腺癌や骨肉腫の細胞株への導入により増

殖抑制効果を認めることから, tumor suppressor gene である可能性が示唆されている<sup>3,6,9,11,20,26</sup>). 肝癌では, Komatsu による SV40T 抗原を導入したトランスジェニックマウスに発生した肝癌の解析結果が報告されており, *IGFBP-rP1* のプロモーター領域のメチル化亢進と, それによる *IGFBP-rP1* の発現抑制が認められている<sup>13</sup>). また, 染色体上では *IGFBP-rP1* は 4q12 に位置しているが<sup>27</sup>, この 4q12 では肝癌をはじめ, 肺癌, 膀胱癌, 子宮頸癌など, 様々な悪性腫瘍において LOH が認められている<sup>2,8,24,25</sup>). このように IGFBP ファミリーとりわけ *IGFBP-rP1* の肝癌への重要な関与の可能性をうかがわせる報告がある<sup>2,13</sup>). *IGFBP-rP1* は IGF との親和性が低いため, *IGFBP-rP1* の作用機序としては IGF との結合を介した IGF 依存性の経路の他に IGF との結合を介さない IGF 非依存性の経路が重要であると考えられている<sup>20</sup>). IGF 非依存性の経路については, transforming growth factor- $\beta$  (以下 TGF- $\beta$ ) スーパーファミリーのアクチビンの活性化による細胞周期調節経路や fibroblast growth factor (以下 FGF) の経路への関与の可能性について報告されている<sup>10,11</sup>). しかし, *IGFBP-rP1* は多彩な作用経路を有している可能性があるものの, その確立された知見は乏しい。そこで本研究では我々は B6C3F1 マウスに放射線誘発した肝癌およびその肝癌から樹立した肝癌細胞株を用いて, 肝癌発症における *IGFBP-rP1* 遺伝子の役割を明らかにする目的で, *IGFBP-rP1* 遺伝子の発現とその増殖能におよぼす影響について解析を行った。さらにヒト肝癌における *IGFBP-rP1* 遺伝子の発現についても検討を加えた。

## 材料と方法

### 1. 肝癌細胞株の増殖と足場非依存性増殖能の検討

B6C3F1 マウスに 3Gy の  $\gamma$  線照射を行い, 肝癌を誘発した。この肝癌組織を, 10% FBS, ヒドロコルチゾン (320 ng/ml), インスリン (8  $\mu$ g/ml), EGF (10 ng/ml) を添加した William 培地を用いて培養し, ペニシリンカップ法を用いてクローニングを行い, 肝癌細胞株を樹立した。細胞増殖速度を計測する際には, 1000個ずつの細胞を24ウェルプレートにまき, FBS 濃度を2.5%とした William 培地で培養した。細胞数は, 1, 3, 5, 7日目にヘモサイトメーターを用いて計測した。

癌細胞がより悪性度が強くなると, 付着するための足場がなくても増殖する能力つまり足場非依存性増殖能が強くなる。そこで軟寒天培地におけるコロニーの形成を観察することにより足場非依存性増殖能を評価

し, 細胞の悪性度の指標とした。30 mm ディッシュ 1枚あたり  $5 \times 10^3$ 個ずつの細胞を2.5% FBS を含む 0.33%軟寒天培地で7日間培養し, 形成されたコロニーの数とサイズを光学顕微鏡下で計測した。形成されたコロニーのサイズが 60  $\mu$ m 以上なら (++) , 60  $\mu$ m 未満なら (+) , コロニーを形成しない細胞株は (-) と定義した。

### 2. ノーザンブロット解析

前述した肝癌細胞株, B6C3F1 マウスの正常肝組織, および放射線誘発肝癌組織から AGPC 法により total RNA を抽出した。それぞれ 10  $\mu$ g ずつの total RNA を, 20 mM MOPS バッファーを用いて18%ホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲルにて電気泳動後, ナイロンメンブレン (Hybond N, Amersham Pharmacia, Biotech, UK) へトランスファーし, Stratalinker1800 (Stratagene, CA) によりメンブレンへのクロスリンクを行った。*IGFBP-rP1* cDNA を Megaprime DNA labeling system (Amersham Pharmacia, Biotech, UK) により [<sup>32</sup>P]dCTP で標識したプローブを用いて, トランスファーされた RNA に 42°C で16時間ハイブリダイズさせ, X線フィルム (X-Omat AR5, Kodak, NY) に-80°C で30ないし48時間感光させた。発現量の定量は BAS2000 を用いて行った。

### 3. *IGFBP-rP1* 発現ベクターの作製

マウス正常肝組織より作製した cDNA ライブラリーから *IGFBP-rP1* 遺伝子をクローニングし, これを Ligation High (Toyobo, Tokyo) を用いて発現ベクター IRESneo2 (Clontech, CA) の Nhe I サイトに組み込んだ。この ligation 産物を TOP10F<sup>+</sup> (Invitrogen, CA) に導入し, アンピシリン耐性のクローンを選択した。それぞれのクローンからプラスミドを精製し, 制限酵素を用いてインサートチェックを行って *IGFBP-rP1* 発現ベクターを選択した。

### 4. *IGFBP-rP1* 強制発現細胞の作製

放射線誘発した肝癌から樹立した肝癌細胞株のうち, 足場非依存性増殖能が強く, 内因性の *IGFBP-rP1* の発現が弱い細胞株を選択した。遺伝子導入は,  $1.5 \times 10^6$ 個の細胞に対し *IGFBP-rP1* 発現ベクターが 0.4  $\mu$ g になる様に調整し Effectene transfection reagent (Qiagen, CA) を用いたリポフェクション法により行った。この細胞を遺伝子導入後48時間目から G418 (500  $\mu$ g/ml) を添加した培地内で培養し, 生き残った細胞が形成したコロニーをペニシリンカップ法

により単離した。また対照として、IRESneo2 のみを同様の方法で導入した細胞を作製した。これらの細胞について抗 IGFBP-rP1 抗体 (SantaCruz, CA) を用いたウェスタンブロット法により IGFBP-rP1 蛋白の発現レベルを検討した。

5. ウェスタンブロット法

30×10<sup>4</sup>個の細胞を 20 μl のサンプルバッファー (100 mM Tris HCl (pH 6.8), 200 mM dithiothreitol, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol) に懸濁し、100℃で5分間インキュベートした後 12,000 rpm で10分間遠心分離して得られた上清を泳動用のサンプルとした。サンプルを12%ポリアクリルアミドゲルに泳動し、PVDF メンブレン (Hybond P, Amersham Pharmacia Biotech, UK) にブロッティングした。メンブレンを、ブロッキングバッファー (0.05% Tween20 を含む Tris buffered saline (TBST) に5%脱脂粉乳を溶解) の中で4℃で一晩インキュベートした後、まず TBST で300倍に希釈した抗ヤギ IGFBP-rP1 抗体 (Santacruz, CA), 次に TBST で20,000倍に希釈した HRP 結合抗ヤギ IgG 抗体 (Santacruz, CA) にそれぞれ室温で1時間ずつ反応させた。HRP のシグナルを ECL detection system (Amersham Pharmacia Biotech, UK) で検出した。

6. 腫瘍形成能の検討

30×10<sup>4</sup>個ずつの細胞を B6C3F1 マウスの背部皮下に移植し、形成された腫瘍の大きさを7日毎に計測した。

結 果

1. マウス肝癌、肝癌細胞株における IGFBP-rP1 の発現

正常肝と、放射線で誘発した肝癌についてのノーザンブロット解析では、正常肝組織に比べ肝癌組織で IGFBP-rP1 の発現低下を認めた (Fig. 1a)。計44組の肝癌組織と正常肝組織についてノーザンブロット解析を行い IGFBP-rP1 の発現を比較したところ、44組中39組で肝癌において IGFBP-rP1 の発現低下がみられ、その発現量は正常肝と比べて64.5±29.7% (p<0.001) であった (Fig. 1b)。肝癌細胞株では、足場非依存性増殖能が認められない細胞株 (-) に比べて、足場非依存性増殖能が弱い細胞株 (+), 強い足場非依存性増殖能を有する細胞株 (++) では IGFBP-rP1 の発現低下がみられ、特に細胞株 (++) において著明であった (Fig. 2a)。IGFBP-rP1 の発現量を β-

アクチンの発現量で補正した値により比較したところ、細胞株 (-) では1.103±0.627であったのに対し、細胞株 (+) では0.516±0.420 (p=0.0085), 細胞株 (++) では0.188±0.314 (p<0.001) と、IGFBP-rP1 の発現低下と足場非依存性増殖能の強さとの間に有意な相関がみられた (Fig. 2b)。

2. 肝癌細胞株への IGFBP-rP1 の導入

IGFBP-rP1 の発現回復による増殖能への影響について検討する目的で、IGFBP-rP1 の発現が弱い細胞株に IGFBP-rP1cDNA を組み込んだ IRESneo2 発現ベクターを導入し、IGFBP-rP1 を強制発現させた。ウェスタンブロット法により IGFBP-rP1 の発現レベルを確認して3つの IGFBP-rP1 強制発現細胞株を選択し、それぞれ rP1a, rP1b, rP1c と命名した。コントロールとして、IRESneo2 のみを同一細胞に導入した細胞株を作製し、Vector と命名した (Fig. 3)。

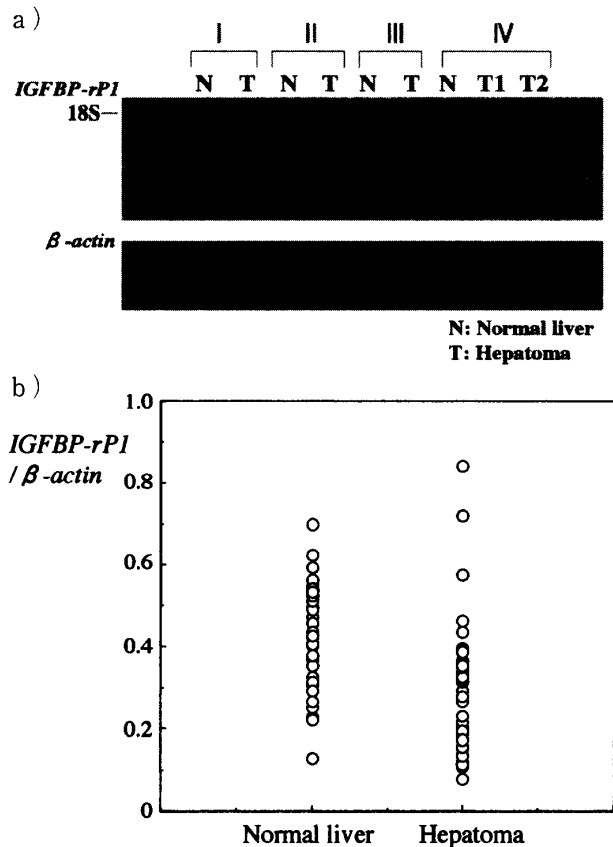
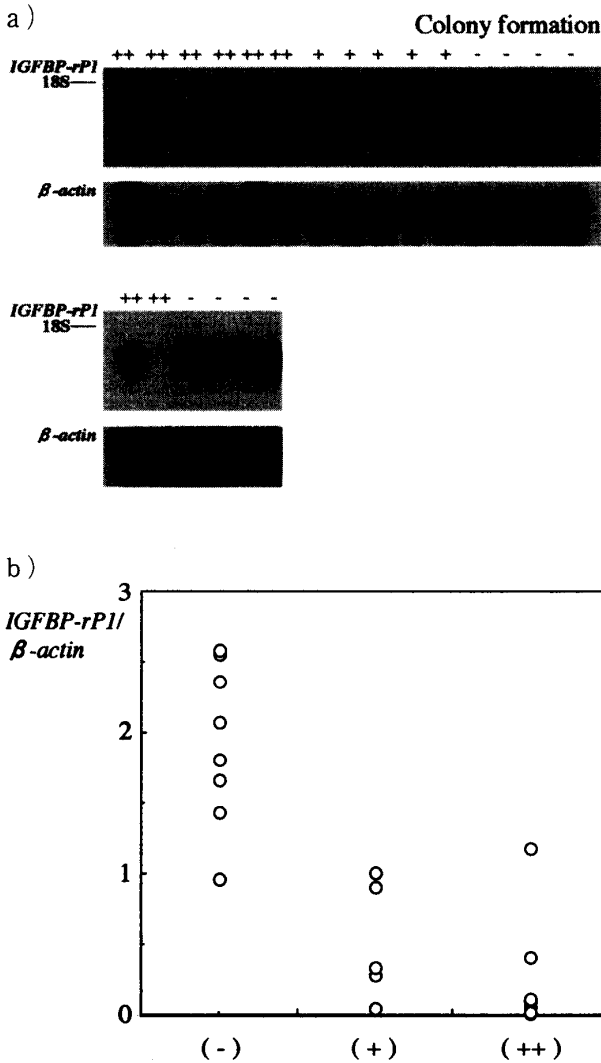


Fig. 1. a) Northern blot analysis of IGFBP-rP1 mRNA in radiation-induced hepatomas (T) and normal liver tissues (N) in mice. Decreased expression of IGFBP-rP1 mRNA was shown in hepatoma tissues compared with normal liver tissues. b) Expression level of IGFBP-rP1 mRNA.



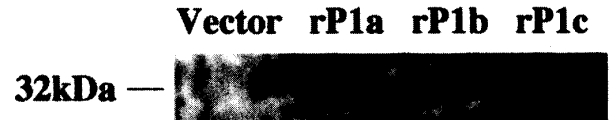
**Fig. 2.** a) Northern blot analysis of *IGFBP-rP1* mRNA in hepatoma cell line in mice. (++) , (+), and (-) represent the capacity of anchorage-independent growth of each cell lines. (++) cell lines can form colonies in soft agar greater than 60  $\mu$  m in diameter. (+) cell lines form colonies in soft agar smaller than 60  $\mu$  m in diameter. (-) cell lines cannot form colonies in soft agar. *IGFBP-rP1* mRNA expression was negatively correlated with the capacity of anchorage-independent growth.

b) Expression level of *IGFBP-rP1* mRNA.

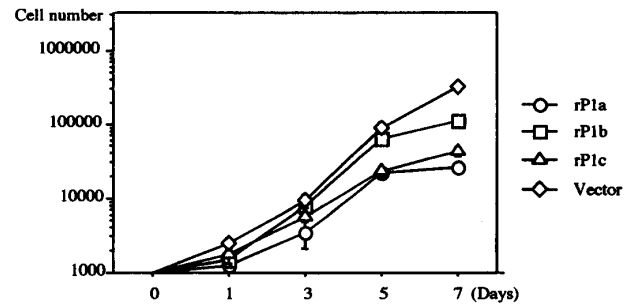
3. IGFBP-rP1 発現回復による細胞増殖速度への影響

rP1a, rP1b, rP1c, 及び Vector について,  $1 \times 10^3$  個ずつの細胞を24穴プレート内で培養し2日ごとに細胞数を計測した。その結果, rP1a, rP1b 及び rP1c のいずれの細胞株でも Vector に比べ各測定日において細胞数の低下が認められた (Fig. 4)。

各クローンの細胞倍加時間 (Tc) は, 次の公式で計算した。



**Fig. 3.** Western immunoblot of cell lysate from IGFBP-rP1 overexpressing clones (rP1a, rP1b, and rP1c), and IRESneo2 control cells (Vector). The 32kDa IGFBP-rP1 protein was demonstrated by an anti-IGFBP-rP1 antibody.



**Fig. 4.** Population growth kinetics of IGFBP-rP1 overexpressing clones and control cells. Time curves indicated that cell number declined at each points in rP1a, rP1b, and rP1c compared with vector-transfected clone.

**Table 1.** Population doubling times of each clones. IGFBP-rP1 overexpressing clones had a tendency to increase in population doubling time.

Cell line	Doubling time (h) $\pm$ SE
Vector	20.2 $\pm$ 0.64
rP1a	35.8 $\pm$ 0.3
rP1b	24.6 $\pm$ 0.76
rP1c	31.2 $\pm$ 1.06

$Tc = 0.3T / \log A/A_0$  (A: 時点 T における細胞数, A<sub>0</sub>: 最初の時点における細胞数)

rP1a, rP1b, rP1c では Vector に比べ, 有意差はみられないものの, 細胞倍加時間が延長している傾向がみられた (Table 1)。

4. IGFBP-rP1 発現回復による足場非依存性増殖能への影響

rP1a, rP1b, rP1c, 及び Vector の軟寒天培地を用いた足場非依存性増殖能を検討した。軟寒天培地におけるコロニー形成数は, Vector では  $405.0 \pm 34.6$  個で

あったのに対し、rP1a では $99.0 \pm 9.8$ 個、rP1b では $50.3 \pm 14.6$ 個、rP1c では $80.70 \pm 11.2$ 個と、IGFBP-rP1 強制発現細胞のいずれにおいても Vector に比べ著明に減少していた( $p < 0.001$ ) (Fig. 5)。さらに IGFBP-rP1 強制発現細胞株の形成するコロニーは、Vector の形成するコロニーに比べて小さい傾向がみられた (Fig. 6)。これらの結果より、IGFBP-rP1 の発現回復により足場非依存性増殖能が抑制されることが示された。

5. IGFBP-rP1 発現回復による腫瘍形成能への影響

rP1a 又は rP1b と Vector とを B6C3F1 マウスの皮下に移植し、1週間毎に形成される腫瘍の大きさを測定、比較した。その結果、各測定日において、rP1a

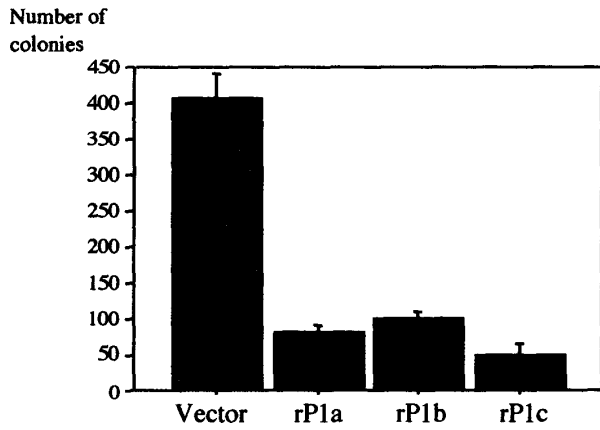


Fig. 5. The number of colony formation in soft agar. Decreased colony formation was shown by overexpressing IGFBP-rP1.

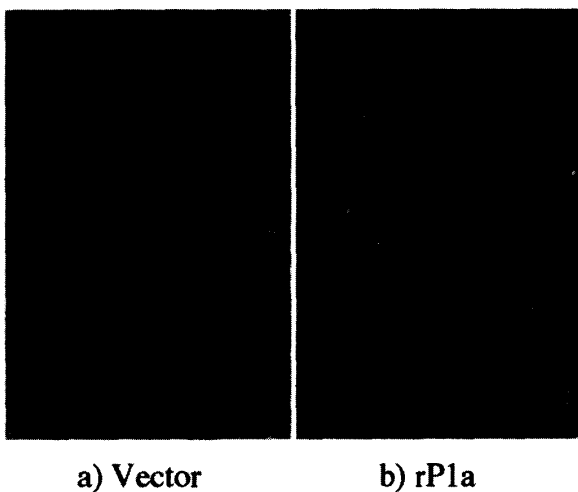


Fig. 6. A pictorial representation of colony formation in soft agar. Colonies formed by rP1a clone were smaller than those formed by control cells.

及び rP1b が形成する腫瘍のサイズは Vector の形成する腫瘍のサイズに比べて小さかった。細胞を移植してから6週間後の腫瘍の大きさは、Vector と比較して

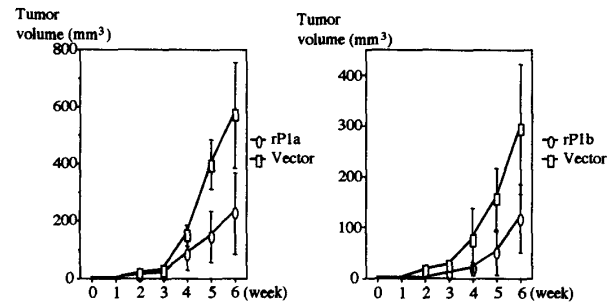


Fig. 7. Vector control cells and IGFBP-rP1 over-expressing clones were injected subcutaneously into the back of B6C3F1 mice. Size of tumor formation was decreased by overexpressing IGFBP-rP1.

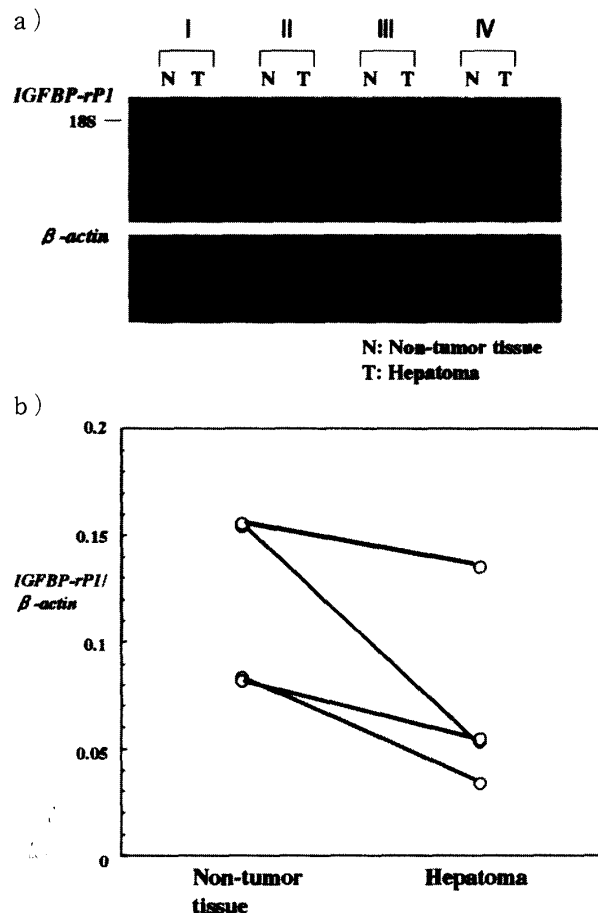


Fig. 8. a) Northern blot analysis of IGFBP-rP1 expression in human hepatomas. Decreased expression of IGFBP-rP1 was shown in all of 4 hepatoma tissues compared with non-tumor tissues. b) Expression level of IGFBP-rP1 mRNA.

rP1aでは $46.1 \pm 32.0\%$  ( $p=0.0067$ ), rP1bでは $42.5 \pm 28.9\%$  ( $p=0.0046$ )であった (Fig. 7)。以上の結果より, IGFBP-rP1の発現は, 肝癌細胞株の腫瘍形成を抑制しうることが示された。

## 6. ヒト肝癌における IGFBP-rP1 の発現

4検体のヒトの肝癌組織と非癌肝組織についてノーザンブロット解析を行い, IGFBP-rP1の発現を比較した。肝癌組織では4検体すべてにおいて非癌肝組織に比べてIGFBP-rP1の発現低下がみられ, その発現レベルは非癌肝組織に比べて平均 $57.2 \pm 24.2\%$  ( $p=0.0725$ )であった (Fig. 8)。

## 考 察

IGFBP-rPファミリーはIGFBP-1~6と比較して, N末端側の相同性は高いものの, IGFBP-1~6のC末端側に高度に保存されている領域が欠如している<sup>12)</sup>。このIGFBP-rPファミリーのうち, IGFBP-rP1はIGF-I, IGF-IIとの親和性がIGFBP-3に比べてそれぞれ $1/5 \sim 1/6$ および $1/20 \sim 1/25$ と低く, IGFBP-rP2はIGF-I, IGF-IIとの親和性がIGFBP-1~6に比べて $1/100$ と, 極めて低いことが報告されている<sup>12,21,32)</sup>。IGFBP-rP3および4についてのIGFとの親和性についての報告はまだなされていないが, IGFとの結合にはN末端側のIGF結合ドメインだけでなくIGFBP-1~6のC末端側に高度に保存されている領域が重要な役割を担っていると推定されており<sup>32)</sup>, IGFBP-rPファミリーは「低IGF親和性のIGFBPスーパーファミリー」と考えられる。

IGFBP-rP1は髄膜細胞, 乳腺上皮細胞及び線維芽細胞など異なる細胞からそれぞれクローニングされ, IGFBP-7, mac25及びprostacyclin stimulating factorと命名されてきた<sup>17,21,31)</sup>。その生理的な役割については, 月経周期の卵胞期から黄体期初期における卵胞の顆粒膜細胞の分化促進<sup>31)</sup>, IGFの刺激による線維芽細胞の増殖<sup>33)</sup>と骨格筋細胞の分化と増殖の誘導<sup>5)</sup>などが報告されている。IGFBP-rP1は, 広汎な正常組織において発現の分布がみられるが<sup>7)</sup>, いくつかの悪性腫瘍においては正常組織と比較して発現の低下がみられている。Burgerらは, 乳癌では乳腺の上皮内癌や過形成ではIGFBP-rP1の発現が低下しており, 悪性度の高い浸潤型腫瘍では発現が消失していたと報告している<sup>3)</sup>。前立腺癌においても正常前立腺組織に比べてIGFBP-rP1の発現低下が報告されており, Sprengerらは, SV40T抗原により不死化した前立腺上皮細胞にIGFBP-rP1を導入することにより増殖抑制効果や

アポトーシス誘導効果を認めている<sup>26)</sup>。またKatoらはマウスの骨肉腫細胞にIGFBP-rP1を導入し, その増殖抑制効果について報告している<sup>11)</sup>。以上より, IGFBP-rP1はtumor suppressor geneであることが示唆される。肝癌においては, KomatsuらがSV40T抗原のトランスジェニックマウスに発生した肝癌についてそのゲノムDNAのメチル化の変化を解析した結果, IGFBP-rP1のプロモーター領域にメチル化の亢進を認め, IGFBP-rP1の発現が抑制されていることを報告している<sup>13)</sup>。また, ヒト染色体上でIGFBP-rP1の位置する4qでは, 肝癌をはじめ, 様々な悪性腫瘍においてLOHが認められている<sup>2,8,24,25)</sup>。

これらの知見より, 著者は肝癌の発生, 増殖においてIGFBP-rP1の発現の低下が関与している可能性があると考え, 放射線誘発したマウス肝癌および肝癌から樹立した細胞株を用いてIGFBP-rP1の発現を検討した。その結果, 肝癌では, 正常肝に比べてIGFBP-rP1の発現が低下していることを認めた (Fig. 1)。またこの肝癌から培養系で樹立した肝癌細胞株では軟寒天培地でのコロニー形成能に相関してIGFBP-rP1の発現低下が著明であった (Fig. 2)。本研究においてはこのIGFBP-rP1の発現低下の機序についての解析は行っていないが, IGFBP-rP1の発現制御の機構については前述したプロモーター領域のメチル化亢進による発現抑制の他にもいくつかの報告がある。Pereiraらは糖質コルチコイドもしくは副甲状腺ホルモンによりマウスの骨芽細胞を処理することでIGFBP-rP1の発現が誘導されることを示している<sup>22,23)</sup>。またSwisshelmらは, ヒト乳腺上皮細胞においてはレチノイン酸によりIGFBP-rP1の発現が誘導されるが, いくつかの乳癌細胞株ではレチノイン酸によるIGFBP-rP1の発現誘導が認められなくなっていることを報告している<sup>27)</sup>。

次に著者はIGFBP-rP1を肝癌細胞株に強制発現させることにより, IGFBP-rP1発現回復による細胞増殖能への影響を検討した。その結果, *in vitro*での細胞増殖速度 (Fig. 4, Table 1)と足場非依存性増殖能 (Fig. 5, 6)の低下を認めるのと同時に, *in vivo*においても腫瘍形成能の低下を認めた (Fig. 7)。そしてヒト肝癌についてもノーザンブロット解析でIGFBP-rP1の発現低下を認めた (Fig. 8)。これらの所見より, IGFBP-rP1の発現低下が肝癌の発生や増殖に関与しうることが示唆された。しかしIGFBP-rP1の作用機構の確立された知見は得られていない。IGFBP-rPファミリーの作用機構については, IGFに結合しIGFの作用に影響を与えることによる, いわゆるIGF依存性

の作用機構と、IGF を介さず別の経路を用いる IGF 非依存性の作用機構の存在が推定される<sup>19,20)</sup>。肝癌では IGF-II の高発現がみられ、IGF-II が肝癌の発生や増殖に対し促進的に作用するといわれている<sup>4)</sup>。IGFBP-rP1 はその N 末端側に存在する IGF 結合ドメインを介して IGF-II に結合し、IGF-II の IGF レセプターへの結合を阻害するので、IGFBP-rP1 の発現低下は結果として IGF-II の作用の増強を引き起こし、肝癌の発生や増殖にかかわると考えられる。一方、IGFBP-rP1 は IGFBP ファミリーに比べて IGF との親和性が低いことなどから、主要な作用機構は IGF 非依存性である可能性も考えられる<sup>20)</sup>。TGF- $\beta$  スーパーファミリーのアクチビンは、フォリスタチンと複合体を形成することにより不活性化されるが<sup>18)</sup>、IGFBP-rP1 はこのフォリスタチンと相同性が高い。そのためアクチビン・フォリスタチンの複合体形成を阻害しアクチビンを活性化することが IGFBP-rP1 の IGF 非依存性の作用機構ではないかと推定されている<sup>10,11)</sup>。TGF- $\beta$  スーパーファミリーのシグナル伝達経路は p15, p27 などのサイクリン依存性キナーゼインヒビターへの正の調節に関与している<sup>8,30)</sup>。また Kato らは、IGFBP-rP1 とアクチビンとの結合活性を示した上でマウス骨肉腫細胞株を IGFBP-rP1 で処理することにより G1 期での細胞周期停止を誘導しうることを示している<sup>10)</sup>。これらの知見から考えると、IGFBP-rP1 は TGF- $\beta$  スーパーファミリーによる細胞周期調節経路の一つを担っているのかもしれない。また、IGFBP-rP1 の C 末端側には fibroblast growth factor receptor (FGFR) との相同性が認められている<sup>10)</sup>。このように IGFBP-rP1 は、その構造から IGF との結合による IGF 依存性の作用、TGF- $\beta$  スーパーファミリーとの相互作用、FGFR を介した作用など、多岐にわたる作用経路を有している可能性がある。

本研究では肝癌の発生、増殖における IGFBP-rP1 の関与について検討し、肝癌細胞株において IGFBP-rP1 の発現回復による増殖抑制について示した。これまで前立腺癌、乳癌、骨肉腫など他の悪性腫瘍においても我々の研究結果と一致する知見が得られてきたことから、IGFBP-rP1 の発現の消失ないしは低下が悪性腫瘍の発生や増殖に深く関わっている可能性が示唆される。IGFBP-rP1 の作用機構については確立された見解に乏しいものの、いくつかのドメイン構造の存在や、その発現誘導についてのこれまでの報告からは多彩なシグナル伝達経路に関与していることが推察される。今後そのレセプターの解明やプロモーター領域の解析も含め、さらなる研究が必要である。

## 謝 辞

稿を終えるに際し、御指導、御校閲を賜りました恩師、神谷研二教授、泌尿器科学教室 碓井亞教授に謹んで感謝の意を表します。また本研究にあたり終始ご協力をいただいた広島大学原爆放射能医学研究所分子生体制御研究分野の諸先生方ならびに教室員の方々、泌尿器科学教室 安本博晃先生に心より御礼申し上げます。

## 参 考 文 献

1. Bradham, D. M., Igarashi, A., Potter, R. L. and Grotendorst, G. R. 1991. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J. Cell Biol.* 114 : 1285-1294.
2. Buetow, K. H., Murray, J. C., Israel, J. L., London, W. T., Smith, M., Kew, M., Blanquet, V., Brechot, C., Redeker, A. and Govindarajah, S. 1989. Loss of heterozygosity suggests tumor suppressor gene responsible for primary hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86 : 8852-8856.
3. Burger, A. M., Zhang, X., Li, H., Ostrowski, J. L., Beatty, B., Venanzoni, M., Papas, T. and Seth, A. 1998. Down-regulation of T1A12/mac25, a novel insulin-like growth factor binding protein related gene, is associated with disease progression in breast carcinomas. *Oncogene* 16 : 2459-2467.
4. Cariani, E., Lasserre, C., Seurin, D., Hamelin, B., Kemeny, F., Franco, D., Czech, M. P., Ullrich, A. and Brechot, C. 1988. Differential expression of insulin-like growth factor II mRNA in human primary liver cancers, benign liver tumors, and liver cirrhosis. *Cancer Res.* 48 : 6844-6849.
5. Damon, S. E., Haugk, K. L., Swisshelm, K. and Quinn, L. S. 1997. Developmental regulation of Mac25/insulin-like growth factor-binding protein-7 expression in skeletal myogenesis. *Exp. Cell Res.* 237 : 192-195.
6. Degeorges, A., Wang, F., Frierson, H. F., Jr., Seth, A., Chung, L. W. and Sikes, R. A. 1999. Human prostate cancer expresses the low affinity insulin-like growth factor binding protein IGFBP-rP1. *Cancer Res.* 59 : 2787-2790.
7. Degeorges, A., Wang, F., Frierson, H. F., Jr., Seth, A. and Sikes, R. A. 2000. Distribution of IGFBP-rP1 in normal human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 48 : 747-754.
8. Hannon, G. J. and Beach, D. 1994. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle

- arrest [see comments]. *Nature* 371 : 257-261.
9. **Hwa, V., Tomasini-Sprenger, C., Bermejo, A. L., Rosenfeld, R. G. and Plymate, S. R.** 1998. Characterization of insulin-like growth factor-binding protein-related protein-1 in prostate cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 : 4355-4362.
  10. **Kato, M. V.** 2000. A secreted tumor-suppressor, mac25, with activin-binding activity. *Mol. Med.* 6 : 126-135.
  11. **Kato, M. V., Sato, H., Tsukada, T., Ikawa, Y., Aizawa, S. and Nagayoshi, M.** 1996. A follistatin-like gene, mac25, may act as a growth suppressor of osteosarcoma cells. *Oncogene* 12 : 1361-1364.
  12. **Kim, H. S., Nagalla, S. R., Oh, Y., Wilson, E., Roberts, C. T., Jr. and Rosenfeld, R. G.** 1997. Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 : 12981-12986.
  13. **Komatsu, S., Okazaki, Y., Tateno, M., Kawai, J., Konno, H., Kusakabe, M., Yoshiki, A., Muramatsu, M., Held, W. A. and Hayashizaki, Y.** 2000. Methylation and downregulated expression of mac25/insulin-like growth factor binding protein-7 is associated with liver tumorigenesis in SV40T/t antigen transgenic mice, screened by restriction landmark genomic scanning for methylation (RLGS-M). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267 : 109-117.
  14. **Martin, D. C., Fowlkes, J. L., Basic, B. and Khokha, R.** 1999. Insulin-like growth factor II signaling in neoplastic proliferation is blocked by transgenic expression of the metalloproteinase inhibitor TIMP-1. *J. Cell Biol.* 146 : 881-892.
  15. **Martinerie, C., Viegas-Pequignot, E., Guenard, I., Dutrillaux, B., Nguyen, V. C., Bernheim, A. and Perbal, B.** 1992. Physical mapping of human loci homologous to the chicken nov proto-oncogene. *Oncogene* 7 : 2529-2534.
  16. **Mullochandov, M. R., Kholodilov, N. G., Atkin, N. B., Burk, R. D., Johnson, A. B. and Klinger, H. P.** 1996. Genomic alterations in cervical carcinoma: losses of chromosome heterozygosity and human papilloma virus tumor status. *Cancer Res.* 56 : 197-205.
  17. **Murphy, M., Pykett, M. J., Harnish, P., Zang, K. D. and George, D. L.** 1993. Identification and characterization of genes differentially expressed in meningiomas. *Cell Growth Differ.* 4 : 715-722.
  18. **Nakamura, T., Takio, K., Eto, Y., Shibai, H., Titani, K. and Sugino, H.** 1990. Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science* 247 : 836-838.
  19. **Oh, Y.** 1997. IGFBPs and neoplastic models. New concepts for roles of IGFBPs in regulation of cancer cell growth. *Endocrine* 7 : 111-113.
  20. **Oh, Y.** 1998. IGF-independent regulation of breast cancer growth by IGF binding proteins. *Breast Cancer Res. Treat.* 47 : 283-293.
  21. **Oh, Y., Nagalla, S. R., Yamanaka, Y., Kim, H. S., Wilson, E. and Rosenfeld, R. G.** 1996. Synthesis and characterization of insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-7. Recombinant human mac25 protein specifically binds IGF- I and - II. *J. Biol. Chem.* 271 : 30322-30325.
  22. **Pereira, R. C., Blanquaert, F. and Canalis, E.** 1999. Cortisol enhances the expression of mac25/insulin-like growth factor-binding protein-related protein-1 in cultured osteoblasts. *Endocrinology* 140 : 228-232.
  23. **Pereira, R. C. and Canalis, E.** 1999. Parathyroid hormone increases mac25/insulin-like growth factor-binding protein-related protein-1 expression in cultured osteoblasts. *Endocrinology* 140 : 1998-2003.
  24. **Rosin, M. P., Cairns, P., Epstein, J. I., Schoenberg, M. P. and Sidransky, D.** 1995. Partial allelotype of carcinoma in situ of the human bladder. *Cancer Res.* 55 : 5213-5216.
  25. **Sato, S., Nakamura, Y. and Tsuchiya, E.** 1994. Difference of allelotype between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung. *Cancer Res.* 54 : 5652-5655.
  26. **Sprenger, C. C., Damon, S. E., Hwa, V., Rosenfeld, R. G. and Plymate, S. R.** 1999. Insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 (IGFBP-rP1) is a potential tumor suppressor protein for prostate cancer. *Cancer Res.* 59 : 2370-2375.
  27. **Swisshelm, K., Ryan, K., Tsuchiya, K. and Sager, R.** 1995. Enhanced expression of an insulin growth factor-like binding protein (mac25) in senescent human mammary epithelial cells and induced expression with retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 4472-4476.
  28. **Tennant, M. K., Thrasher, J. B., Twomey, P. A., Birnbaum, R. S. and Plymate, S. R.** 1996. Insulin-like growth factor-binding protein-2 and -3 expression in benign human prostate epithelium, prostate intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma of the prostate. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81 : 411-420.
  29. **Tennant, M. K., Thrasher, J. B., Twomey, P. A., Drivdahl, R. H., Birnbaum, R. S. and Plymate, S. R.** 1996. Protein and messenger ribonucleic acid (mRNA) for the type 1 insulin-like



- growth factor (IGF) receptor is decreased and IGF-II mRNA is increased in human prostate carcinoma compared to benign prostate epithelium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81** : 3774-3782.
30. **Toyoshima, H. and Hunter, T.** 1994. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* **78** : 67-74.
31. **Wandji, S. A., Gadsby, J. E., Barber, J. A. and Hammond, J. M.** 2000. Messenger ribonucleic acids for MAC25 and connective tissue growth factor (CTGF) are inversely regulated during folliculogenesis and early luteogenesis. *Endocrinology* **141** : 2648-2657.
32. **Yamanaka, Y., Wilson, E. M., Rosenfeld, R. G. and Oh, Y.** 1997. Inhibition of insulin receptor activation by insulin-like growth factor binding proteins. *J. Biol. Chem.* **272** : 30729-30734.
33. **Yamauchi, T., Umeda, F., Masakado, M., Isaji, M., Mizushima, S. and Nawata, H.** 1994. Purification and molecular cloning of prostacyclin-stimulating factor from serum-free conditioned medium of human diploid fibroblast cells. *Biochem. J.* **303** : 591-598.

## Decreased Expression of Insulin-like Growth Factor Binding Protein-related Protein-1 (IGFBP-rP1) in Radiation-induced Mouse Hepatocellular Carcinoma

Jun TEISHIMA

Department of Developmental Biology and Oncology, Division of Molecular Biology, Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University

(Director: Prof. Kenji KAMIYA)

Insulin-like growth factor binding protein-related protein-1 (IGFBP-rP1) is a member of the IGFBP family, which was called IGFBP-7 or mac25 previously. Decreased expression of IGFBP-rP1 has been shown in breast cancer and prostatic cancer, and tumor suppressive effects of IGFBP-rP1 have been reported in prostatic cancer and osteosarcoma cell lines. In the present study, we investigated whether expression levels of IGFBP-rP1 were related to the development and the growth of radiation-induced hepatomas of B6C3F1 mice. In northern blot analysis, decreased expressions of *IGFBP-rP1* gene were shown in radiation-induced mouse hepatomas compared to normal livers. In hepatoma cell lines established from these hepatomas, decreased expressions of *IGFBP-rP1* were strongly related to the grade of anchorage-independent growth. In cell lines which were transfected with *IGFBP-rP1*cDNA, the doubling time of cell growth was increased, and the number and the size of colony formation in soft agar culture were decreased. In tumor formation assay by injecting these cells to B6C3F1 mice subcutaneously, the volume of tumors were decreased. Furthermore, the decreased expression of *IGFBP-rP1* gene was observed in human hepatomas by northern blot analysis. These results may suggest that the suppression of IGFBP-rP1 is related to development and progression of mouse and human hepatomas.