

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790302

研究課題名（和文） 腫瘍リンパ管新生を増強するプロスタグランジン受容体の解明とがん転移治療への応用

研究課題名（英文） Role of prostaglandin receptor signaling in enhancement of lymphangiogenesis and application to metastasis treatment

研究代表者

細野 加奈子 (HOSONO KANAKO)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：80532556

研究成果の概要（和文）：

腫瘍間質のリンパ新生をミミックするマトリゲルモデルを用い炎症性肉芽組織でのリンパ管新生における COX-2 および PGE₂ 受容体シグナリングの役割について解析を行った結果、内因性 PGE₂ は肉芽組織を形成する線維芽細胞やマクロファージに作用し、4 種の受容体サブタイプのうち EP3 および EP4 シグナリングを介してリンパ管新生誘導因子である VEGF-C および VEGF-D 発現量を制御することが明らかとなった。さらに LLC 皮下接種モデルにおける腫瘍リンパ管新生にも PGE₂ 受容体シグナリングが関与していることが確認された。今後はリンパ節転移を焦点とし、検討を継続していく予定である。

研究成果の概要（英文）：

Lymphangiogenesis, the formation of lymphatic vessels from pre-existing lymphatic vessels, plays an important role in homeostasis, metabolism and immunity. Recent evidence indicates that lymphangiogenesis, similar to angiogenesis, also occurs during certain inflammatory and autoimmune conditions. I examined the effects of COX-2 and endogenous PGE₂ on lymphangiogenesis during chronic inflammation. Lymphangiogenesis was upregulated during the development of granulation tissues, which were formed around Matrigel plugs in response to inductions of COX-2 and mPGES-1. Administration of a COX-2 inhibitor (celecoxib) significantly reduced lymphatic vessel formation in granulation tissues, whereas topical PGE₂ administration enhanced lymphangiogenesis. Lymphangiogenesis was suppressed in the granulation tissues of mice lacking either EP3 or EP4, suggesting that these molecules are receptors for PGE₂. An EP3-selective agonist (ONO-AE-248) increased the expression of VEGF-C and VEGF-D in cultured macrophages, while an EP4-selective agonist (ONO-AE1-329) increased VEGF-C expression in cultured macrophages and increased VEGF-D expression in cultured fibroblasts. Thus, our findings demonstrate that EP3 and EP4 signaling contributes to inflammation-associated lymphangiogenesis by upregulating VEGF-C and VEGF-D in fibroblasts and macrophages. In addition, prostaglandin receptor signaling appears critical for tumor-associated lymphangiogenesis and tumor growth. From now on, I would like to continue an examination based on these findings about the metastasis in lymph node.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：リンパ管新生、プロスタグランジン、慢性炎症、ノックアウトマウス、がん、リンパ節転移

1. 研究開始当初の背景

がんは、周囲の正常組織、血管系やリンパ管系、間葉系細胞などと密接な相互作用をしながら増殖する。なかでも、血管、リンパ管は遠隔転移に密接に関与し、臨床的な悪性度を決定する重要な因子となり、がんリンパ管新生がリンパ節転移とリンパ行性転移の拡大において重要な役割を果たし、患者予後にもかかわることが明らかになってきている。一方、多くの腫瘍微小環境には炎症細胞浸潤を認め、炎症反応ががんの発生および増殖と深く関わっていることは古くから知られている。こうした背景から炎症性メディエーターを介したがんリンパ管新生の制御に着目し、がんリンパ管新生およびリンパ行性転移に関わるPG受容体を解明するという発想に至った。

2. 研究の目的

がんのリンパ行性転移は血管と同様に間質ストローマさらには腫瘍にリンパ管が新生し、それへ腫瘍細胞が移行するとの見方が重要視されてきており、VEGF-C/D-VEGFR-3を基盤とするシグナル伝達経路が腫瘍に随伴するリンパ管新生においても極めて重要であることが示唆されている。我々のグループではこれまでにがん依存性の血管新生において炎症性メディエーターのプロスタグランジン(PG)が重要な役割を果たすことを報告してきたが、リンパ管新生に対する炎症性メディエーターの役割については知見が乏しく、今回申請者はPGを介したがんリンパ管新生の制御に焦点を当てがんリンパ管新生およびリンパ行性転移に関わるPG受容体について検討を行った。

3. 研究の方法

○炎症反応に重要な役割を演ずるPG受容体(8種：EP1~4, IP, TP, DP, FP)ノックアウトマウスを用いて、腫瘍依存的に構成されてくるストローマ組織での炎症シグナリングを途絶・遮断することにより、がん増殖、腫瘍周囲でみられるリンパ管新生を抑制し得るかどうか検討する。

○腫瘍リンパ管新生をミミックするマトリゲルモデル等を用い炎症性肉芽組織におけるリンパ管新生における詳細なメカニズムを解析する。

○リンパ行性転移が炎症シグナリングの途絶・遮断により抑制し得るかどうか腫瘍接種モデルで検討する。

4. 研究成果

腫瘍間質のリンパ管新生をミミックするマトリゲルモデルでの検討

腫瘍間質のリンパ管新生をミミックするマトリゲルモデルを用い、炎症性肉芽組織でのリンパ管新生におけるシクロオキシゲナーゼ2(COX-2)およびPGE₂受容体シグナリングの役割について解析を行った。

その結果、FGF-2含有マトリゲル周囲の肉芽組織ではリンパ管新生が認められ、このリンパ管新生はCOX-2阻害薬celecoxibの投与により用量依存的に抑制されることが明らかとなった。さらに、FGF-2含有マトリゲル接種群ではCOX-2発現量と膜結合型プロスタグランジンE合成酵素(mPGES-1)発現量の有意な増加も確認され、FGF-2の刺激によって誘導されるリンパ管新生はCOX-2依存性であることが明らかとなるとともに、COX-2-mPGES-1を介して生成されるPGE₂がリンパ管新生に役割をもつことが示唆された。実際、PGE₂をマトリゲル

に局所投与しリンパ管新生を評価すると、PGE₂投与群でリンパ管新生の増強が確認されるとともにリンパ管新生増強因子 VEGF-C/VEGF-Dの発現量が増加することが分かった。また、PGE₂の受容体 (EP1-EP4) を欠損させたノックアウト (KO) マウスではEP3およびEP4KOマウスでリンパ管新生の有意な抑制が認められ、さらに、肉芽組織の主要構成細胞である線維芽細胞とマクロファージの培養実験からは、PGE₂がEP3およびEP4シグナリングを介してVEGF-CおよびVEGF-D発現を増加させることが明らかとなった。以上の結果から、増殖性炎症巣におけるリンパ管新生は、COX-2・mPGES-1を介した内因性PGE₂が肉芽組織を形成する線維芽細胞やマクロファージに作用し、EP3およびEP4シグナリングを介してVEGF-CおよびVEGF-D発現増加によりリンパ管新生を増強させることが推察され、細胞種と受容体を詳細に使い分けた複雑なメカニズムが働いていることが明らかとなった。加えて創傷治癒モデルや腹膜炎モデルといったより生理的なモデルでも検討を行い同様の機構が作用していることを確かめた結果、創傷治癒過程で形成された肉芽組織や炎症を起こした横隔膜においてもリンパ管新生の誘導にはCOX-2およびmPGES-1を介して産生されるPGE₂の関与が推察されている。

腫瘍リンパ管新生における PG の作用の検討

Lewis lung carcinoma 皮下接種モデルを作成しリンパ管新生を評価した結果、腫瘍およびストローマ組織に多くリンパ管が新生してくることが確認された。さらにこの新生リンパ管は COX-2 阻害薬 celecoxib の投与により有意に抑制された。また、EP3 ノックアウトマウスに接種した腫瘍リンパ管染色像を野生型と比較した結果明らかな減少が観察され、腫瘍リンパ管新生にも PGE₂ 受容体シグナリングが関与していることが明らかとなった。今後はリンパ節転移に着目し検討を継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Kashiwagi S, Hosono K, Suzuki T, Takeda A, Uchinuma E, Majima M. Role of COX-2 in lymphangiogenesis and restoration of lymphatic flow in secondary lymphedema. *Lab Invest.* 2011 Sep;91(9):1314-25. doi: 10.1038/labinvest.2011.84. 査読 有
- ② Hosono K, Suzuki T, Tamaki H, Sakagami H, Hayashi I, Narumiya S, Alitalo K, Majima M. Roles of prostaglandin E2-EP3/EP4 receptor signaling in the enhancement of lymphangiogenesis during fibroblast growth factor-2-induced granulation formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 May;31(5):1049-58. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.222356. 査読 有

[学会発表] (計4件)

- ① 松田弘美、細野加奈子、蔵重千絵、馬嶋正隆 Role of COX-2 in enhancement of lymphangiogenesis in diaphragm after the peritoneal application of endotoxin. 第 86 回日本薬理学会年会 (2013 年 3 月 21 日~23 日) 福岡
- ② 細野加奈子、鈴木立紀、成宮周、馬嶋正隆 創傷治癒時のリンパ管新生におけるプロスタグランジン E2 およびその受容体シグナリングの役割 第 126 回日本薬理学会関東部会 (2012 年 7 月 14 日) 東京
- ③ 細野加奈子、馬嶋正隆 Roles of prostaglandin E2-EP3/EP4 receptor signalings in enhancement of lymphangiogenesis during inflammation. 第 36 回リンパ学会 (2012 年 6 月 30 日~7 月 1 日) 東京
- ④ 細野加奈子、鈴木立紀、成宮周、馬嶋正隆 Role of cyclooxygenase-2 in enhancement of lymphangiogenesis during wound healing. 第 86 回日本薬理学会年会 (2012 年 3 月 14 日~16 日) 京都

〔その他〕

ホームページ等

北里大学医学部薬理学 大学院医療系研究科

分子薬理学

<http://www.med.kitasato-u.ac.jp/pharm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細野 加奈子 (HOSONO KANAKO)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：80532556