

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24701026

研究課題名(和文)新しい抗腫瘍性分子標的としてのアラキドン酸代謝関連分子の有用性

研究課題名(英文)Utility of arachidonic acid metabolism-related molecules as a novel target to anti-tumor strategy

研究代表者

高橋 徹行(Takahashi, Tetsuyuki)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：00403692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣癌細胞株を用いた腹膜播種モデルにおいて、可溶性プロスタグランジンE2受容体(FuEP2/Ex2)は腫瘍重量と血性腹水産生量の抑制をもたらし、腫瘍組織内でのCD31、CD163陽性細胞数が減少していた為、腫瘍血管新生と免疫抑制性マクロファージ集積の抑制が増殖抑制機序の一端を担っていると考えられた。マイクロアレイ解析により、FuEP2/Ex2発現細胞由来の腫瘍片で発現上昇が認められる遺伝子が6つ同定された。このうちTMPRSS4の阻害はFuEP2/Ex2発現細胞の腫瘍増殖を更に抑制した事から、TMPRSS4はFuEP2/Ex2による増殖抑制環境で生存因子として機能している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The soluble prostaglandin E2 receptor (FuEP2/Ex2) caused significant decrease of tumor growth and formation of hemorrhagic ascites in a model of intraperitoneal metastasis of ovarian cancer. In FuEP2/Ex2-expressing tumor, the number of CD31- and CD163-positive cells was significantly decreased. Secretion of VEGF, CXCL1, IL-6, and IL-8 was also suppressed in FuEP2/Ex2-expressing cells. These results suggest that suppression of angiogenesis and of immunosuppressive macrophages recruitment is taking part in the mechanism of tumor growth suppression by FuEP2/Ex2. Microarray analysis revealed that six genes were upregulated in FuEP2/Ex2-expressing-derived tumor and inhibition of TMPRSS4 activity further suppressed tumor growth. This result indicates that TMPRSS4 act as a survival factor in tumor interfered its growth by FuEP2/Ex2.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：アラキドン酸代謝経路 分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

プロスタグランジン、ロイコトリエン、トロンボキサン等のエイコサノイドは膜リン脂質由来のアラキドン酸から合成される脂質メディエーターで、多岐にわたる生理作用により生体の恒常性維持に大きく寄与し、様々な癌の増殖、進展、転移段階においても関与が認められる。この作用は、対応する七回膜貫通型受容体に結合する事で発揮するため、申請者はエイコサノイド受容体のリガンド結合領域を利用したデコイレセプター (FuEP2/Ex2) を作製し、ヒト前立腺癌の溶骨性増殖、子宮内膜癌細胞の子宮内増殖、卵巣癌腹膜播種モデルにおける腫瘍増殖を抑制する事を見いだした。このアプローチによる抗腫瘍療法の有用性を確固たるものにする為には、さらに様々な種類の癌に対する腫瘍増殖阻害作用の検討と様々な投与形態における有効性の評価が必須であると考えられる。

近年、15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) の発現消失が多くの癌組織で起こっている事が明らかになった。これは、プロスタグランジンの過剰産生が関与する癌に対しては15-PGDHが有用な分指標的となりうる可能性を強く示唆するものであり、申請者は15-PGDHがインスリン及びEGFによる増殖刺激を負に制御し、血清除去やTRAILによるアポトーシス誘発を促進する事を見いだした。

アラキドン酸はCYP450 monooxygenaseによっても代謝される事が明らかになっており、中でもCYP2J2により変換される14,15-EETは血管平滑筋弛緩作用、抗炎症作用をはじめとした様々な生理活性を有するが、腫瘍学領域での検討は殆どなされていない。

2. 研究の目的

本研究は、

(1) 申請者がこれまで明らかにしてきたFuEP2/Ex2の有するリガンド依存性腫瘍増殖阻害作用の作用スペクトルと抑制を更に検討していく。

(2) 15-PGDHの細胞増殖抑制作用に寄与する分子の同定とその臨床的重要性の証明を目指す。

(3) 14,15-EETをはじめとしたCYPによるアラキドン酸代謝物の癌細胞増殖に与える影響を検討する。
の三点を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、FuEP2/Ex2の抗腫瘍効果の評価および作用機序解析を卵巣癌細胞腹膜転移モデル、膵臓癌細胞同所移植モデルなどにおいて行う。併せて、コンディショナル発現系を用いた15-PGDH発現株を用いて、インスリン、EGF、TRAILへの感受性を規定する因子の同定を目指し、更に14,15-EETをはじめと

したCYPによるアラキドン酸代謝物などの癌細胞増殖に与える影響を検討していく。

4. 研究成果

ヒト卵巣癌細胞株 (SKOV-3) を用いた腹膜播種モデルにおけるFuEP2/Ex2による腫瘍増殖抑制機構の解析を行った。まず、腫瘍片の組織切片を用いた免疫染色により、腫瘍内のCD31陽性細胞数 (血管内皮細胞マーカー) とCD163陽性細胞数 (免疫抑制性マクロファージ/M2マクロファージマーカー) がFuEP2/Ex2発現細胞由来の腫瘍で有意な減少を認めた。培養上清を用いたELISAにより、FuEP2/Ex2発現細胞ではVEGF、CXCL1、IL-6およびIL-8の分泌が有意に低下しており、これらの結果から、FuEP2/Ex2によるEP受容体シグナリング阻害によって各種サイトカイン産生が抑制され、結果的に腫瘍内の血管新生やM2マクロファージの集積が阻害される為に腫瘍増殖が抑制される事が示された (図1)。腫瘍片から得たRNAを用い、マイク

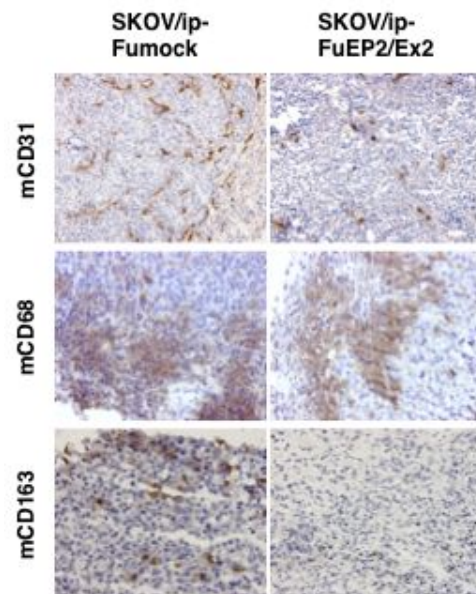


図1 卵巣癌腹膜播種モデルにおけるFuEP2/Ex2の腫瘍内血管新生 (CD31陽性細胞) とM2マクロファージ集積 (CD163陽性細胞) に対する抑制効果

ロアレイ解析を実施した。その結果、FuEP2/Ex2発現細胞由来の腫瘍で発現上昇 (>4.0-fold) している遺伝子を6つ同定した。これらの遺伝子および遺伝子産物に対するノックダウンと阻害剤処理を *in vitro* で行ったところ、TMPRSS4を標的とした処理がFuEP2/Ex2発現細胞にのみ更なる増殖抑制を引き起こした。同様に、TMPRSS4阻害剤を投与する事で腹膜播種モデルでの腫瘍増殖は更に抑制された (図2)。以上の点から、TMPRSS4はFuEP2/Ex2によって増殖が阻害された腫瘍で生存因子として機能している可能性が示唆され、抗腫瘍性分子標的として有望であると考えられた。

膵臓癌細胞の同所移植腫瘍モデルを用いて、FuEP2/Ex2の膵内腫瘍増殖に対する影響を検討した。BxPC-3 (COX-2陽性、EP2/4陽

性)を用い、FuEP2/Ex2 発現ベクターを導入後、薬剤選択を行い安定発現株を得た。この細胞をヌードマウス臍内に直接移植し、8 週後の腫瘍重量を比較したが、FuEP2/Ex2 の腫瘍増

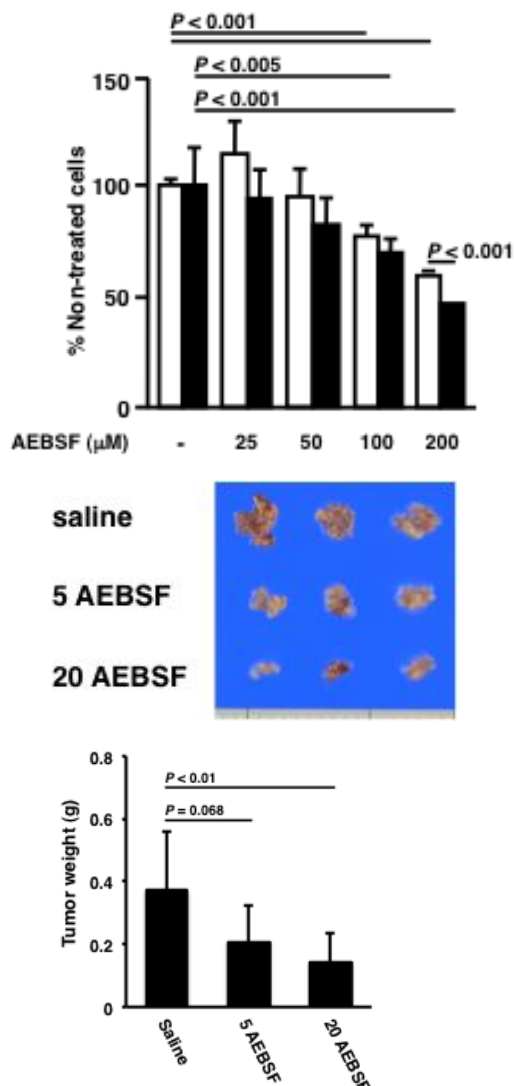


図2 TMRSS4阻害剤 (AEBSF)の卵巣癌細胞増殖抑制効果

殖抑制作用は見られなかった。この点より、FuEP2/Ex2によるEP受容体シグナリング阻害が奏効しない種類の癌がある事が示された。

これまでの検討により、EP受容体シグナリングとプロスタグランジン産生系が機能している膵癌細胞では15-PGDH発現により細胞増殖能の減少と血清除去時の生存細胞数の減少が認められ、インスリン、EGFによる細胞増殖刺激が負に制御され、TRAILによるアポトーシス誘導が増強される事を明らかにしてきた。そこで、この作用を規定する分子の同定に先立ち、膵臓癌臨床検体においての15-PGDH発現の頻度を明らかにしておき、上述の機構が実際の膵臓癌で起こりえているかを検討する事にした。現在、臨床検体のパラフィンブロックから薄切切片を作製し、免疫染色を行っているが、特異性の高い染色像が得られる抗体または処理条件の決定に至っていない。今後も条件検討を継続し、目的

の達成を目指していく。

14,15-EETをはじめとしたCYPによるアラキドン酸代謝物の癌細胞増殖に与える影響を検討した。まず、前立腺癌細胞株PC-3、DU145、LNCaP.FGCを用い、Ebastine (CYP2J2阻害剤)、AUDA (EPHX2阻害剤)、14,15-EEZE (EET拮抗剤)の影響を検討した。その結果、無血清条件下でのEbastine処理は全ての細胞株で顕著な生細胞数の減少をもたらした。そこで、ヌードマウス皮下にDU145を移植し、その後Ebastineを腹腔内投与して腫瘍増殖に与える影響を検討したが、有意な抑制効果は認められなかった。

同様に、膵臓癌細胞株MiaPaCa-2、BxPC-3、PANC-1を用いてEbastineとAUDAの影響を*in vitro*で検したところ、MiaPaCa-2、BxPC-3においてEbastineは有意な生細胞数の減少をもたらした。そこで、ヌードマウス膵臓にMiaPaCa-2を同所移植し、その後Ebastineを腹腔内投与して腫瘍増殖に与える影響を検討したところ、腫瘍重量の減少傾向は見られたが、有意な抑制効果は認められなかった。今後は、BxPC-3細胞を用いた同様の移植モデルでのEbastineの腫瘍増殖抑制効果を判定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1件)

(1) Tetsuyuki Takahashi, Hisanori Uehara, Keisuke Izumi. Inhibitory effect of soluble EP2 receptor on ovarian tumor growth in mice and utility of TMRSS4 as a combinatorial molecular target. *Int. J. Oncol.*, 査読有, **43**, 2013, 416-424. DOI:10.3892/ijo.2013.1957

〔学会発表〕(計4件)

(1) 高橋 徹行 他 Inhibition of EP-mediated signaling influences growth stimulation by HB-EGF and IGF in pancreas cancer cells. 日本癌学会第72回総会、2013.10.3-5.パシフィコ横浜(神奈川県)

(2) Tetsuyuki Takahashi et al. Inhibitory effect of soluble EP2 receptor on ovarian tumor growth in nude mice and usefulness of TMRSS4 as molecular target for synergistic efficacy. AACR 104st Annual Meeting 2013.4.6-10. Walter E. Washington Convention Center (Washington DC, USA)

(3) 高橋 徹行 他 Tumor suppressive effect of soluble EP2 receptor in the peritoneal dissemination model of ovarian

cancer. 日本癌学会第71回総会、
2012.9.19-21.ロイトン札幌(北海道)

(4) 高橋徹行 他 卵巣癌腹膜播種モデルにおける可溶性EP2受容体の腫瘍増殖抑制作用とそれに伴う発現変動遺伝子の解析 第21回日本がん転移学会学術集会・総会、
2012.7.12-13.オリエンタルホテル広島(広島県)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 徹行 (TAKAHASHI, Tetsuyuki)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教
研究者番号：00403692

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：