

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593022

研究課題名(和文) 口腔癌周囲環境のアラキドン酸カスケード経路をターゲットとした治療法の開発

研究課題名(英文) Development of the treatment that targeted an arachidonate cascade of the oral cancer neighborhood environment

研究代表者

小堀 善則 (KOBORI, YOSHINORI)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：70374551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍血管内皮において、COX-2/プロスタグランジンE2(PGE2)、プロスタサイクリン(PGI2)が高発現し、積極的に生存に使用していることがわかった。今後の血管新生阻害療法の治療戦略として、高価な分子標的薬を用いる他にも、安価で、莫大な数があるCOX-2/プロスタグランジンE2(PGE2)阻害剤を癌治療に用いることができる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that COX-2/ prostaglandin E2 (PGE2) and prostacyclin (PGI2) was expressed highly in a tumor endothelial cells. In others to use expensive molecular target medicine for as a treatment strategy of the vascularization inhibition therapy, the COX-2/ prostaglandin E2 (PGE2) inhibitor could used cancer treatment. Targeting tumor angiogenesis is an established strategy for cancer therapy.

研究分野：腫瘍

キーワード：腫瘍血管内皮

## 1. 研究開始当初の背景

口腔内組織は、歯周疾患や喫煙、熱刺激、香辛料刺激、義歯・補綴物による機械的刺激などで慢性炎症が発生しやすい環境下である。さまざまな環境要因による慢性炎症が、癌の発症や進展に関与していると最近考えられている(Coussens LM 2002 Nature)。

腫瘍微少環境を担う腫瘍間質細胞は、プロスタグランジンやさまざまなケモカインなどメディエーターを放出し、癌の悪性化の進展の実行役と考えられてきている。口腔癌においても、慢性炎症が発癌に関与する可能性がある。慢性炎症下では、マクロファージを初めとして、さまざまな炎症性細胞が漏出して、腫瘍の転移に積極的に関連しているとする報告も多数見られるようになった。

われわれはこれまで腫瘍血管内皮細胞(Tumor Endothelial Cells: TEC)が正常血管内皮細胞(Normal Endothelial Cells: NEC)と比較して、①増殖能、運動能などの生物学的活性が高い②薬剤抵抗性を有する③特異的な遺伝子が発現する④染色体の不安定性があるなどさまざまな点で異なることを報告してきた。

癌細胞におけるCOX-2の発現を中心としたアラキドン酸カスケードの亢進が、癌の進展に影響を及ぼすことは知られている。がん周囲環境の間質を構成する腫瘍血管内皮細胞、腫瘍関連線維芽細胞、マクロファージを初めとする炎症性細胞におけるアラキドン酸カスケード経路の亢進と癌の進展の関連について検討した報告は少ない。

## 2. 研究の目的

本研究では、腫瘍間質を構成する腫瘍血管内皮細胞での、アラキドン酸経路をはじめとして炎症性経路を構成するさまざまな分子の活性化・働きについて解析・検討した。

## 3. 研究の方法

ヒト舌癌細胞(HSC-3細胞)、ヒト高転移性腫瘍細胞、低転移性腫瘍細胞をヌードマウスに皮下移植し、腫瘍塊からの血管内皮マーカであるCD31抗体と磁気ビーズを用いて、舌癌由

来腫瘍血管内皮細胞とヒト高転移性腫瘍細胞由来腫瘍血管内皮細胞を分離・培養し、実験に用いた。正常コントロールとして、正常皮膚から血管内皮を分離・培養し、実験に用いた。また、ヒト腎癌から腫瘍血管内皮細胞を、非担癌部から正常な血管内皮細胞を分離・培養した。

## 4. 研究成果

まず、分離・培養した細胞が、実験に用いることができる血管内皮細胞であるかどうかを確かめるため、PCR法とフローサイトメーター解析で特性解析を行った。分離したTECとNECにおいて血管内皮マーカー(CD31、54、105、144、146)の発現があることや管腔形成能など血管としての特性があることを確認した。また、得られた細胞は $\alpha$ SMA、FAPなど線維芽細胞で高発現するマーカーは発現していなかった。一回の血管内皮の分離・採取に関して、腫瘍組織中に血管内皮細胞は2~5%しかおらず、分離できた腫瘍血管内皮細胞はきわめて希少である。このように分離できた腫瘍血管内皮細胞が、血管内皮マーカーを発現し、線維芽細胞などの混入がないことを確認した後、実験に用いた。

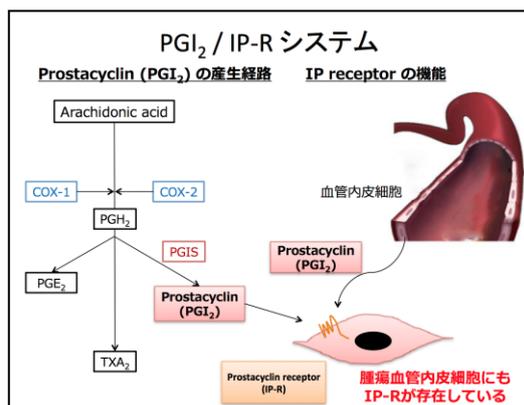
我々は、アラキドン酸カスケードを構成し、生理活性の上で重要な分子であるCOX-2ならびにその下流で制御されており、最近発がん、がんの悪性度に関与していることがわかっているPGE<sub>2</sub>の発現について解析を行った。正常血管内皮細胞(NEC: Normal Endothelial cell)に比べ、腫瘍血管内皮(TEC: Tumor Endothelial cell)において、アラキドン酸カスケードの代謝産物のシクロオキシゲナーゼ(COX-2)の発現が高く、COX-2が腫瘍血管内皮の生存に重要な役割を果たしていることを示した。また、ELIZA法を用いて、COX-2の代謝産物である、PGE<sub>2</sub>とPGI<sub>2</sub>が腫瘍血管内皮細胞で発現が高いことがわかった。

また、ヒト検体を用いて、咽頭癌4症例、悪性黒色腫2症例、正常の皮膚の2症例においてCOX-2の免疫組織染色を行った。咽頭癌、悪性黒色腫のいくつかの腫瘍血管でCOX-2が強発現していることがわかった。さらにCOX-2

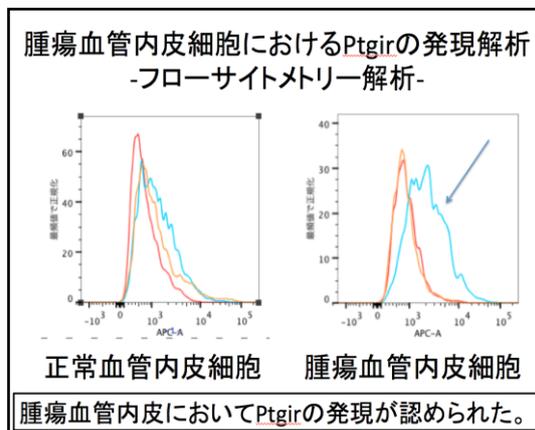
の阻害剤の一種であるNS-398をヌードマウスの腫瘍皮下移植モデル(口腔癌、悪性メラノーマ)を用いると、血管新生を阻害して抗腫瘍効果を示すことがわかった。

COXの下流で作用するプロスタサイクリン(PGI<sub>2</sub>)は血管内皮細胞内で産生される生理活性物質である。細胞内のcAMPを増加させ、血管拡張作用も示すことが知られている。プロスタサイクリンは、そのレセプターであるIP receptor (Ptgir)を介してアデニレートシクラーゼを活性化し、細胞内cAMP産生を促す。細胞内cAMPはセカンドメッセンジャーとして働き、血管拡張作用などの生理活性を示し、血管内皮細胞においてさまざまな遺伝子発現、活性化を調節している。細胞内cAMPは血管内皮細胞において、hepatocyte growth facto(HGF)などの血管新生因子などの発現を促進し血管新生作用を示すことがわかっている。そこで本研究において、腫瘍血管におけるIP receptor (Ptgir)の発現・機能について注目して研究を行った。IP receptor (Ptgir)は、細胞膜を7回貫通するG蛋白共役型の受容体であり、主にProstacyclin (PGI<sub>2</sub>)をリガンドとする。PGI<sub>2</sub>は血管内皮から放出され、血小板や血管平滑筋細胞に存在するIP receptorに作用し、血小板凝集抑制効果や血管平滑筋弛緩作用を持つ。実際に腫瘍血管新生研究で、この系が腫瘍血管の生存に用いられているかどうかは知られていない。がん細胞ではCOX-2によって誘導されるTXA<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>およびPGI<sub>2</sub>によって多段階の発がんに必要な血管形成が誘導されることから、PGI<sub>2</sub>/IP receptorシステムも同様に腫瘍血管新生に関与する可能性があるのではないかと考え、PGI<sub>2</sub>とIP receptorの系について解析を進めた。

我々が分離・培養した高転移性のメラノーマと腎がん由来の腫瘍血管内皮細胞では、real time PCRにおいて、PGI<sub>2</sub>とIPreceptorの発現が高いことがわかった。



IP-receptor (Ptgir) の阻害剤であるR01138452を用いて、バイオリジカルアッセイを行ったところ、正常血管内皮細胞ではほとんど阻害剤の影響を受けないのに対し、腫瘍血管内皮細胞に比べ、遊走、管腔形成が抑制された。これらからある種の腫瘍血管内皮細胞では、PGI<sub>2</sub>/IP receptorをオートクラインで、生体活性に利用していることが示唆された。また、実際に分離培養したヒトの正常腎血管内皮細胞(hNEC)と腎がん血管内皮細胞(hTEC)において、Ptgirの発現をフローサイトメトリーで解析したところ、あるlotのヒト腎がん血管内皮細胞でPtgir発現陽性細胞が存在することがわかった。



今回の研究で、腫瘍血管内皮において、COX-2/プロスタグランジンE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)、プロスタサイクリン(PGI<sub>2</sub>)が高発現し、積極的に生存に使用していることがわかった。今後の血管新生阻害療法の治療戦略として、高価な分子標的薬を用いる他にも、安価で、莫大な数があるCOX-2/プロスタグランジンE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 阻害剤を癌治療に用いることができる可能性が示唆さ

れた。今後、既存の抗炎症剤をがんの治療に用いる可能性を追求したい。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小堀 善則 (KOBORI YOSHINORI)  
北海道大学・北海道大学病院・助教  
研究者番号：70374551

### (2) 研究分担者

大賀 則孝 (OGA NORITAKA)  
北海道大学・歯学研究科・助教  
研究者番号：40548202