

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700920

研究課題名（和文）エイコサノイド受容体シグナリングを標的とした新しい抗腫瘍戦略

研究課題名（英文）Novel antitumor strategies by targeting to eicosanoid receptor-mediated cellular signaling

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

研究成果の概要（和文）：ヒト子宮内膜癌細胞株、卵巣癌細胞株を用いた同所移植腫瘍モデルおよび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）は腫瘍サイズと血性腹水産生量の有意な抑制をもたらした。特に、子宮内膜癌細胞の増殖抑制にはプロスタグランジン E₂ 受容体シグナリングの活性化に伴い惹起される ERK1/2 リン酸化の抑制と、それに続く COX-2、VEGF、c-fos mRNA 発現誘導の抑制が関わっている事が明らかになった。また、ドキシサイクリンによるコンディショナル発現系を利用し、ヒト膵臓癌細胞株由来の 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) 安定発現株を得た。この細胞において、15-PGDH 発現が細胞増殖能の減少、血清除去時の生存細胞数の減少、インスリン、Epidermal growth factor による細胞増殖刺激に対する負の制御、TNF-related apoptosis inducing ligand によるアポトーシス誘導効果の増強をもたらす事が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The soluble prostaglandin E₂ receptor (FuEP2/Ex2) suppressed cancer cell growth and production of hemorrhagic ascites in an orthotopic xenograft model of endometrial cancer and intraperitoneal dissemination model of ovarian cancer. In endometrial cancer, we also revealed that this inhibition was associated with suppression of ERK1/2-phosphorylation and COX-2, VEGF, and c-fos mRNA induction, which are consequences of EP receptor-elicited cellular signaling. By using conditional expression system which can be controlled by doxycycline, we obtained stable transfectant of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) derived from human pancreas cancer cell line. We found that expression of 15-PGDH causes decrease of cell growth and survival rate, desensitization to insulin- and epidermal growth factor-induced cell growth, and sensitization to TNF-related apoptosis inducing ligand-induced apoptosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：臨床腫瘍学

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：エイコサノイド、エイコサノイド受容体

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を作製する事で、エイコサノイドを直接中和する新しいタイプの受容体シグナリング阻害物質の創成が可能ではないかと考え、検討を行ったところ、プロスタグランジン E₂ 受容体の部分断片 (FuEP2/Ex2) がリガンド結合能を有し、ヒト前立腺癌の溶骨性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いての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、この分子の機能が腫瘍増殖に与える影響を精査する事で、全く新しい癌治療戦略を築ける可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、申請者がこれまで明らかにしてきた可溶性プロスタグランジン E₂ 受容体 (FuEP2/Ex2) および可溶性ロイコトリエン B₄ 受容体 (FuBLT1/Ex2, FuBLT1/Ex3) の有するリガンド依存性腫瘍増殖阻害作用の更なる多角的検討を行い、可溶性エイコサノイド受容体の抗腫瘍療法における有効性を確立する事を目的とする。併せて、新しい分子標的としての 15-PGDH の有効性の精査も行う。

3. 研究の方法

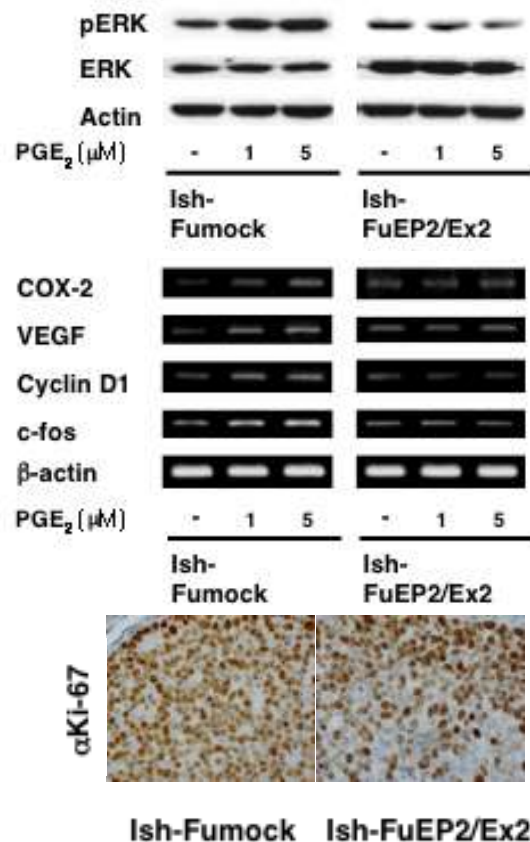
本研究では、レンチウイルスベクター発現系 *in vivo* での分泌性蛋白の全身投与系を確立した後、FuEP2、FuBLT1/Ex2、FuBLT1/Ex3 の全身投与が腫瘍増殖を阻害できるかを様々な腫瘍モデルマウスを用いて評価する。並行して、15-PGDH 発現系を構築し、得られた蛋白に関しての酵素活性、PGE₂ 誘導性細胞内細胞内シグナリング抑制効果を検討していく。

4. 研究成果

まず、IgG Fc および FuEP2/Ex2 cDNA を挿

入したレンチウイルスベクターを構築した。これらと GFP 遺伝子発現レンチウイルスベクターと混合したものからウイルス液を作製し、マウスへ投与したところ、骨格筋へ投与したマウスにおいて GFP の発現が投与部で認められ、投与後一週間で採取した血清でもそれぞれの蛋白を ELISA で検出する事ができた。ただ、その濃度は検出限界の下限に近いものだったので、投与するウイルス粒子数を増やす事で放出量を増やす事を試みた。その結果、10⁹ オーダーまでウイルス粒子数を増やして感染させても血中への放出量は改善されなかった。現在使用しているウイルスベクターは CMV プロモーターを利用したものであるが、これを骨格筋αアクチン (HSA) プロモーター等の骨格筋特異的なものに変換した発現系を再構築する等の措置を講じる事で、状況の改善に努めていく。

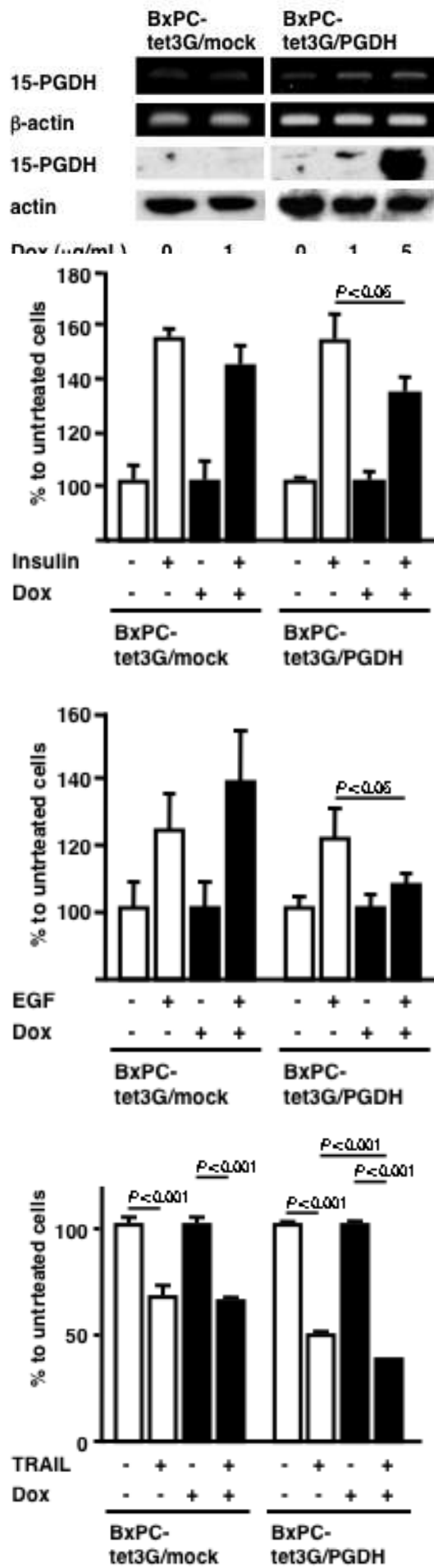
FuEP2/Ex2、FuBLT1/Ex2、FuBLT1/Ex3 の更なる抗腫瘍スペクトルを明らかにするために、ヒト子宮内膜癌細胞株 Ishikawa、ヒト卵巣癌細胞株 SKOV-3 を用いて FuEP2/Ex2 安定発現株を、ヒト膵臓癌細胞株 MiaPaCa-2 を用いて FuBLT1/Ex2、FuBLT1/Ex3 安定発現株をそれぞれ樹立した。得られた安定発現株を用いて、それぞれ同所移植腫瘍モデル



(Ishikawa、MiaPaCa-2) および腹膜播種モデル (SKOV-3) における FuEP2/Ex2、FuBLT1/Ex2、FuBLT1/Ex3 の抗腫瘍効果を評価

した。その結果、Ishikawa 細胞を用いた子宮内膜癌細胞の生体内増殖に対して FuEP2/Ex2 は有意な抑制効果を示し、その効果にプロスタグランジン E₂ 受容体シグナリングの活性化に伴い惹起される ERK1/2 リン酸化の抑制と、それに続く COX-2、VEGF、c-fos mRNA 発現誘導の抑制が関わっている事が明らかになった。MiaPaCa-2 細胞を用いた膵臓癌細胞の生体内増殖に対しては、FuBLT1/Ex2、FuBLT1/Ex3 共に有意な抑制効果は認められなかった。SKOV-3 細胞を用いた腹膜播種モデルにおいては、FuEP2/Ex2 は有意な腫瘍結節重量および血性腹水の減少が認められた。よって、この卵巣癌腹膜播種モデルにおける FuEP2/Ex2 の抑制効果の詳細なメカニズムの解析を今後行っていく予定である。

新しい分子標的としての 15-PGDH の有効性を精査する目的で、まず、15-PGDH 発現系の構築を試みた。はじめに、一般的な哺乳細胞発現ベクターにヒト 15-PGDH cDNA を挿入した発現ベクターを構築し、二種類のヒト膵臓癌細胞株 (MiaPaCa-2、BxPC-3) へ導入した。その結果、Cyclooxygenase 陽性かつ EP4 受容体陽性の BxPC-3 細胞では導入細胞の生存が著しく阻害され、安定発現株を得る事が出来なかった。対して、Cyclooxygenase および EP 受容体陰性の MiaPaCa-2 細胞では安定発現株が得られたが、15-PGDH 強制発現による細胞増殖への影響は認められなかった。これは、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癌細胞では、15-PGDH が細胞増殖や生存シグナリングの制御に関わっている可能性を示唆するものと考えられた。そこで、テトラサイクリン応答性プロモーターを利用したコンディショナル発現系を利用して、ドキシサイクリンを添加した条件でのみ 15-PGDH を発現する安定発現株を BxPC-3 細胞より樹立した。この細胞を用いた解析により、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た。更に、インスリン、Epidermal growth factor による細胞増殖刺激が負に制御され、TNF-related apoptosis inducing ligand によるアポトーシス誘導が増強される事が明らかとなった。これらの知見は、15-PGDH のプロスタノイド不活化機能が膵臓癌細胞にもたらす分子メカニズムに関する具体的な標的分子を示すものだと考えられるので、今後はこれらの刺激物質処理から端を発するシグナル伝達経路の関連分子の中から 15-PGDH 強制発現 (とそれに続く細胞内プロスタノイドレベルの減少) によって最も影響を受ける分子の同定を目標にして、更なる精査を行う予定である。



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, Hirohisa Ogawa, Keisuke Izumi, Hisanori Uehara. The soluble EP2 receptor FuEP2/Ex2 suppresses endometrial cancer cell growth in an orthotopic xenograft model in nude mice. *Cancer Letters*, 査読有, **306**, 2011, 67-75. DOI:10.1016/j.canlet.2011.02.033

[学会発表] (計1件)

(1) 高橋 徹行、15-PGDH influences cell growth and susceptibility to apoptotic induction in pancreas cancer cells. 第70回日本癌学会学術総会、2011.10.4.名古屋国際会議場 (名古屋市)

[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: