

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860100

研究課題名(和文) 発がん性化学物質への感受性に及ぼすプロスタグランジン最終合成酵素発現の影響の検討

研究課題名(英文) Role of prostaglandin terminal synthases in chemical carcinogen-induced carcinogenesis

研究代表者

佐々木 由香 (Sasaki, Yuka)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：40635108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：環境化学物質による発がんへのプロスタグランジン最終合成酵素であるmPGES-1、PGISの関与について明らかとするために、mPGES-1およびPGIS遺伝子欠損(KO)マウスを用いて化学発がん剤への感受性について解析を行った。その結果、アゾキシメタンによる大腸化学発がんも、7,12-dimethylbenz(a)anthraceneおよび12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetateによる皮膚化学発がんもmPGES-1の欠損によって抑制され、PGIS KOの欠損によって促進されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Prostaglandin (PG) I2 synthase (PGIS) and Microsomal PGE synthase-1 (mPGES-1) are PG terminal synthases that function downstream of inducible COX-2 in the PGI2 and PGE2 biosynthetic pathway, respectively. In this study, we used mice deficient in PGIS and mPGES-1 to examine the importance of these PG terminal synthases in chemical carcinogen-induced carcinogenesis.

This study indicates that mPGES-1-derived PGE2 and PGIS-derived PGI2 have opposing effects on chemical-induced colon carcinogenesis. Namely, the former PGE2 promotes and exacerbates chemical carcinogenesis, while the latter PGI2 suppresses it.

研究分野：衛生薬学

キーワード：化学発がん プロスタグランジン mPGES-1 PGIS

1. 研究開始当初の背景

私たちの身の回りに存在する環境化学物質の中には、生体内で発がん性を示すものが少なくなく、ヒトにおけるがんの発生原因の80%~90%が化学的な要因であるという報告もある。このため、様々な環境化学物質が発がん性を有するか、有するとしたらどのような機構を介し発がんに関与するかを明らかにすることはがんを予防する上で非常に重要である。一方、シクロオキシゲナーゼ(COX)を阻害する非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)がプロスタグランジン(PG)産生を抑制することにより発がんやがんの進展を抑えることが報告されているが、化学発がんに関与するPG類がどのように関与するかについては不明な点が多い。そこで本研究では、COXの下流で働くPG最終合成酵素(PGS)に注目し、発がん性化学物質に対する感受性に及ぼすPGS発現の影響について検討することにした。

2. 研究の目的

様々な環境化学物質がどのような機構を介し発がんに関与するのか明らかとすることは、がんの予防に非常に重要である。

一方、シクロオキシゲナーゼ(COX)を阻害する非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)の長期服用が、大腸がんをはじめとするがんの発症や進展を抑制することが疫学的に示唆されている。NSAIDsの標的酵素であるCOXは、ホスホリパーゼA₂(PLA₂)の作用で生体膜リン脂質から遊離したアラキドン酸を、様々なプロスタグランジン(PG)類の共通中間体であるPGH₂に変換する反応を触媒する。このため、COXの下流で産生されるPG類の発がんへの関与が注目されてきたが、COXアイソザイムや各種PG受容体の遺伝子欠損(KO)マウスを用いた解析により、PG類の中でも誘導型酵素であるCOX-2によって産生されたPGE₂ががんの発症・進展に重要な役割を持つことが明らかとなっている。

これまでに、申請者の研究グループは、PGH₂からPGE₂を産生するPGE合成酵素(PGES)の1つ、膜結合型PGES-1(mPGES-1)が、COX-2と同様にがん組織に高発現し、COX-2と選択的に機能連関してPGE₂産生を担うことを明らかとしてきた。さらに申請者は、mPGES-1 KOマウスでは化学発がん剤であるアゾキシメタンによる大腸発がんが抑制されることを明らかにしてきた。そこで、本研究ではまず、mPGES-1の化学発がんにおける関与の普遍性を明確にするために、mPGES-1 KOマウスをアゾキシメタン以外の化学発がん物質に曝露し、その感受性にどのような影響がみられるか、検討を行った。さらに、野生型マウスにおいて種々の化学発がん物質がCOX-2やmPGES-1といったPG産生関連酵素の発現にどのような影響を及ぼすかについても検討した。

アゾキシメタンを投与した mPGES-1 KO

マウスの大腸腫瘍部位では、PGE₂の減少に加え、PGD₂ および PGI₂ 代謝物である6-ketoPGF_{1α}量が野生型マウスよりも顕著に増加していた。PGI合成酵素(PGIS)の過剰発現によってマウスの肺における化学発がんが抑制されることが報告されており、PGI₂が発がんを抑える可能性も考えられるが、PGI₂とがんとの関連については報告も少なくほとんどわかっていない。そこで、PGIS KOマウスならびに申請者が樹立したmPGES-1/PGIS二重欠損(DKO)マウスにアゾキシメタンを投与し、PGIS欠損が発がんに及ぼす影響についてより詳細に検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 化学発がん物質による発がん と PG 合成酵素群の関与の検討

以下の化学発がんモデルを用いて解析をおこなった。

アゾキシメタン誘導大腸発がんモデル: アゾキシメタン(10 mg/kg)を週1回、6週連続腹腔内投与し、7週目以降は通常飼育下で経過観察した。アゾキシメタン投与開始から25週後に大腸組織を摘出してポリープ数、大きさを測定し、発がんの評価を行った。

DMBA/TPA 誘導皮膚発がんモデル: 2 mM 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) (200 μl/mouse)をマウス背部皮膚に塗布し、1週間後から16 μM 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) (200 μl/mouse)を2週間に1回塗布した。DMBA塗布から20週間後に皮膚発がんを評価した。

まず、野生型マウスにおいてこれらの発がん物質によるPG産生関連酵素群の発現を定量的PCRによって、PG産生をLC/MSを用いて解析した。

mPGES-1 KOマウス、PGIS KOマウス、mPGES-1/PGIS DKOマウスを用いてそれぞれの発がん物質による発がんを評価し、これらのPG最終合成酵素の化学発がんへの関与を検討した。

(2) がん細胞の悪性化へのPGI₂の関与の解析

マウス大腸がん細胞株 Colon-26 または肺がん細胞株 LLC に PGI₂ アナログのカルバサイクリンを添加して培養し、細胞増殖への影響を検討した。

PGIS KOマウスおよび野生型マウスの皮下に Colon-26 (1×10⁶ cells) を移植し、3週間後に腫瘍サイズを測定して in vivo における細胞増殖を評価した。また、腫瘍組織中PG量をLC/MSを用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 化学発がん物質による発がん と PG 合成酵素群の関与の検討

野生型マウスでは、アゾキシメタンによる大腸腫瘍においても、DMBA/TPAによる皮膚腫瘍においてもPGE₂産生の増加が認められ、

COX-2、mPGES-1 の mRNA 発現の増加が認められた。

mPGES-1 KO マウスでは野生型マウスと比較して大腸ポリープの発生が抑制されており、組織標本の HE 染色像からも発がんが抑制されることが認められた。これに対し、PGIS KO マウスでは発がんの促進が認められ、mPGES-1/PGIS DKO マウスでは野生型マウスよりも発がんは抑制されたものの、mPGES-1 KO マウスよりは発がんが促進されていた。この結果より、mPGES-1 の欠損はアゾキシメタンによる発がんを抑制するのに対し、反対に PGIS の欠損が発がんを促進することが示唆された。このときの PGIS の発現を免疫組織染色によって検討したところ、大腸組織の血管に発現が認められた。また、PGIS KO マウスのポリープでは PGI₂ 代謝物の 6-keto PGF_{1α} は検出されず、mPGES-1/PGIS DKO マウスでは 6-keto PGF_{1α} の欠損と PGD₂ の増加が認められ、シャンティングが生じていた。また、アゾキシメタン投与から 11 週後に大腸を摘出しマイクロアレイ解析を行い発現上昇が認められた遺伝子の mRNA 発現を定量的 PCR にて解析した。その結果、PGIS 欠損マウスでは野生型マウスと比較して血管新生を担い、がんとの関連も報告されている Angiogenin の発現上昇が認められたことから、PGIS の欠損は Angiogenin の発現上昇を介して発がんを促進した可能性も考えられた。

次に、DMBA および TPA によって皮膚がんを惹起したところ、野生型マウスでは DMBA 塗布から 20 週後にはほとんどすべてのマウスの皮膚に腫瘍が形成されたことに対し、mPGES-1 KO マウスでは 12.5% にしか発がんが認められなかった。DMBA/TPA 塗布によって野生型マウスでは皮膚組織中の PGE₂ 量が増加したが、mPGES-1 KO マウスでは PGE₂ 量が野生型マウスよりも顕著に減少していた。また、PGIS KO マウスでは野生型マウスと同じく、ほとんどすべてのマウスに発がんが認められ、腫瘍数も同程度であった。一方、mPGES-1/PGIS 両欠損マウスでは野生型マウスよりは発がん率は低いものの、半分以上の個体に発がんが認められ、mPGES-1 KO マウスよりも促進されていた。

(2) がん細胞の悪性化への PGI₂ の関与の解析
マウス大腸がん細胞株 Colon-26 および肺がん細胞株 LLC に PGI₂ アナログのカルバサイクリンを添加して培養したところ、いずれの細胞株においても細胞増殖の抑制が認められた。これらの結果より、in vivo、in vitro とともに PGI₂ が、がんに対し抑制的に作用する可能性が示唆された。

次に、PGIS KO マウスの皮下に大腸がん細胞株 Colon-26 を移植したところ、移植腫瘍の増殖が促進される傾向が認められた。

これらの結果より、大腸においても皮膚に

おいても化学発がん物質による発がんにも PGES-1 は促進的に、PGIS は抑制的に関与していることが示唆された。しかし、PGI₂ 受容体である IP の欠損は化学発がんに影響しないことから、IP 以外の受容体に PGI₂ が作用している可能性も考えられる。PGIS によって産生された PGI₂ がどのようにして発がんを抑制するのかという点についてはさらなる検討が必要である。

本研究では環境化学物質による発がん機構を生理活性物質である PG 合成系に着目して行い、mPGES-1 の抑制が PGE₂ 産生の減少だけでなく PGI₂ など他の PG 産生を増加させることで化学発がんを抑制させたことが示唆された。この結果より既存の NSAIDs によってすべての PG 産生を抑制するよりも、mPGES-1 阻害薬によって発がんに伴って増加する PGE₂ 産生のみを抑制する方がより効果的に発がんを抑制できることが期待される。

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 Kuwata H, Yoshimura M, Sasaki Y, Yoda E, Nakatani Y, Kudo I, Hara S., Role of long-chain acyl-coenzyme A synthetases in the regulation of arachidonic acid metabolism in interleukin 1β-stimulated rat fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*, 査読有, 1841, 2014, 44-53.

DOI: 10.1016/j.bbali.2013.09.015.

[学会発表](計 7 件)

① Yuka Sasaki, Moe Akatsu, Yuri Yamakawa, Chieko Yokoyama, Shuntaro Hara, Effect of gene deletion of two prostaglandin terminal synthases, PGIS and mPGES-1 on adiposity in mice, 13th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases, 2013.11.3-6, Puerto Rico (USA)

② Shuntaro Hara, Yuka Sasaki, Genetic deletion of prostacyclin synthase, a cyclooxygenase 2 downstream enzyme, in mice promotes carcinogenesis in contrast to that of microsomal prostaglandin E synthase-1, 13th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases, 2013.11.3-6, Puerto Rico (USA)

③ 佐々木由香、赤津萌、山川友理、横山知永子、原俊太郎、プロスタグランジン最終合成酵素 PGIS および mPGES-1 の肥満への関与、第 86 回日本生化学会大会、2013.9.11-13、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

④ 佐々木由香、山川友理、赤津萌、横山知永

子、原俊太郎、脂肪蓄積におけるプロスタサイクリン合成酵素の機能の解析、日本薬学会第134年会、2014.3.28、熊本市総合体育館(熊本県熊本市)

⑤ Yuka Sasaki, Moe Akatsu, Yuri Yamakawa, Chieko Yokoyama, Shuntaro Hara, Prostacyclin synthase deficiency suppressed obesity in mice, 5th European Workshop on Lipid Mediators, 2014.10.23-24, Istanbul (Turkey)

⑥ Yuka Sasaki, Shuntaro Hara, Role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in chemical-induced carcinogenesis, 6th international conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators (PLM2015), 2015.2.10-12, 京王プラザホテル(東京都新宿区)

⑦ 会田衣利、佐々木由香、蛭田凌平、原俊太郎、膜結合型プロスタグランジンE合成酵素の皮膚発がんへの関与の解析、日本薬学会第135年会、2015.3.28、デザインクリエイティブセンター神戸(兵庫県神戸市)

〔図書〕(計 1件)

佐々木由香、原俊太郎、メディカル・ドゥ、遺伝子医学MOOK24号、2013、146-153

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 由香 (SASAKI, Yuka)

昭和大学・薬学部・社会健康薬学講座衛生薬学部門・助教

研究者番号：40635108

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：