

12) 低酸素環境下に置かれるがん細胞の再酸素化による増殖能・浸潤能の変化

研究代表者 笹島 順平

【研究背景と目的】

近年、癌治療の分野において急激な発展を見せている血管新生阻害薬は、腫瘍血管を破壊することにより酸素・栄養供給を断ち、癌を死滅させるというコンセプトのもと考えられた。その一方で、低酸素環境は癌細胞の浸潤・転移能や薬剤耐性を誘導し、悪性化に関与するといわれており、血管新生阻害による低酸素化が、癌の悪性度を助長する可能性も以前から指摘されていた。

我々は代表的な難治がんである膵癌に培養骨髄単核球を移植することにより、がん微小環境のリモデリングを誘導することができることを報告した⁽¹⁾。膵癌の微小環境は著明な線維化と異常血管網に由来する低酸素環境が特徴的であり、培養骨髄単核球移植により、線維化と低酸素環境の解除が誘導される。また驚いたことに膵癌の増殖についても一時的な抑制が認められた。低酸素環境が癌の悪性化に関与することは報告されているが、低酸素環境の解除によって癌の悪性度を規定する要素にどのような影響が及ぶのかは明らかにはされていない。そこで本研究では低酸素環境下に順

化したがん細胞が再び通常酸素環境に暴露されることによっておこる増殖能・浸潤能・薬剤耐性能の変化を検討することを目的とした。

【研究方法】

(1) 長期低酸素培養

低酸素ワークステーション (INVIVO₂400) を用いて継代および培地交換を含む全ての培養行程を 1-5% O₂ 下で培養した。培養にはヒト膀胱癌細胞株 KP1N と膀胱がん自然発症マウス (Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D};p53^{lox/+}) より樹立した膀胱癌細胞株 NB490 および NB508 を使用した。14 日以上培養したのち、以下の検討を行った。

(2) 増殖能の評価

96 穴プレートに低酸素環境に順化させたがん細胞を播種。そのまま低酸素環境においたものと通常酸素環境に戻したものを培養し、WST8 Assay にて増殖能の変化を評価する。

(3) 浸潤能の評価

低酸素環境に順化した細胞と、低酸素環境から通常酸素環境に戻した後 3 日培養した細胞について、8 μ

m ポアサイズのトランスウェルを用いて既報⁽²⁾の通り、Invasion Assay を行い、浸潤能の評価を行う。

(4) 薬剤耐性関連遺伝子発現解析

RT-PCR により、薬剤耐性関連遺伝子として MDR1/ABCG2 の発現の解析を行う。

【研究結果】

(1) Reoxygenation による増殖能の変化

Figure 1 に 5%O₂、Figure 2 に 1%O₂ 環境下に順化させた後に施行した WST8 Assay の結果を示す。5%、1% のいずれにおいても Reoxygenation によってその増殖能は抑制された。

(2) Reoxygenation による浸潤能の変化

Figure 3 に 1%O₂ 環境下に順化させた後、20%O₂ 環境下に戻して 3 日経過した後に行った Invasion Assay の結果を示す。浸潤能については Reoxygenation による変化は認められなかった。

(3) RT-PCR による薬剤耐性関連遺伝子発現解析結果

Figure 4 に薬剤耐性関連遺伝子発現の解析結果を示す。MDR1 および ABCG2 の発現は Reoxygenation によ

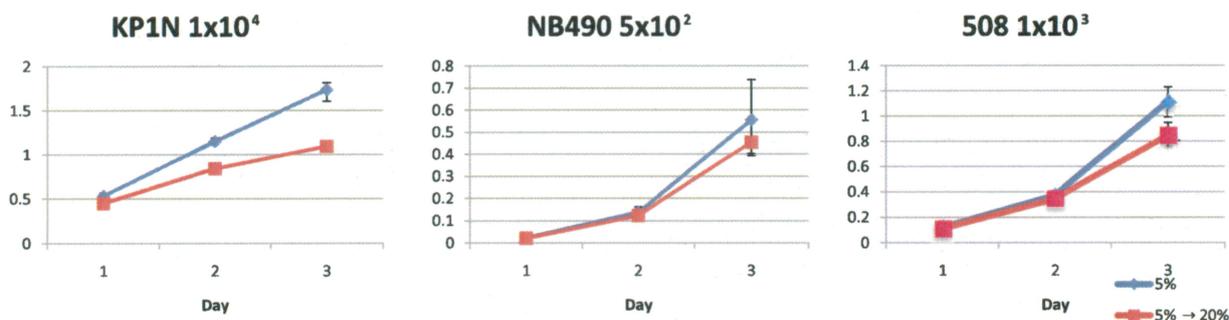


Figure1 5%O₂ 順化細胞の Reoxygenation による増殖能の変化 (WST8 Assay)

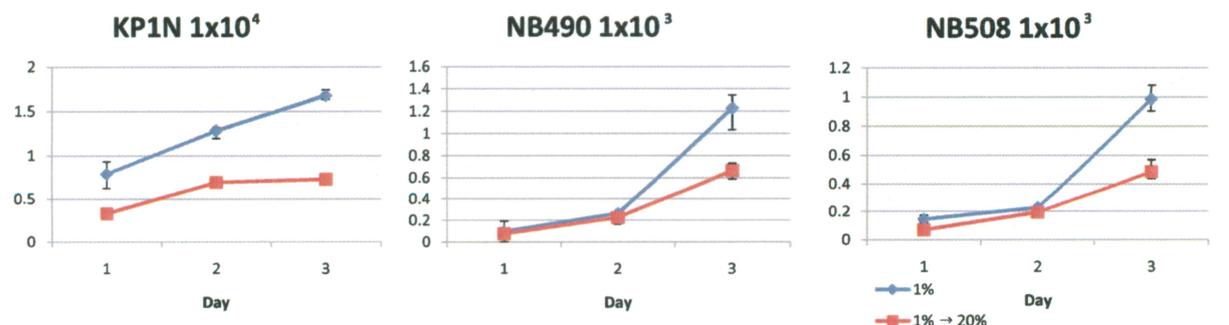


Figure2 1%O₂ 順化細胞の Reoxygenation による増殖能の変化 (WST8 Assay)

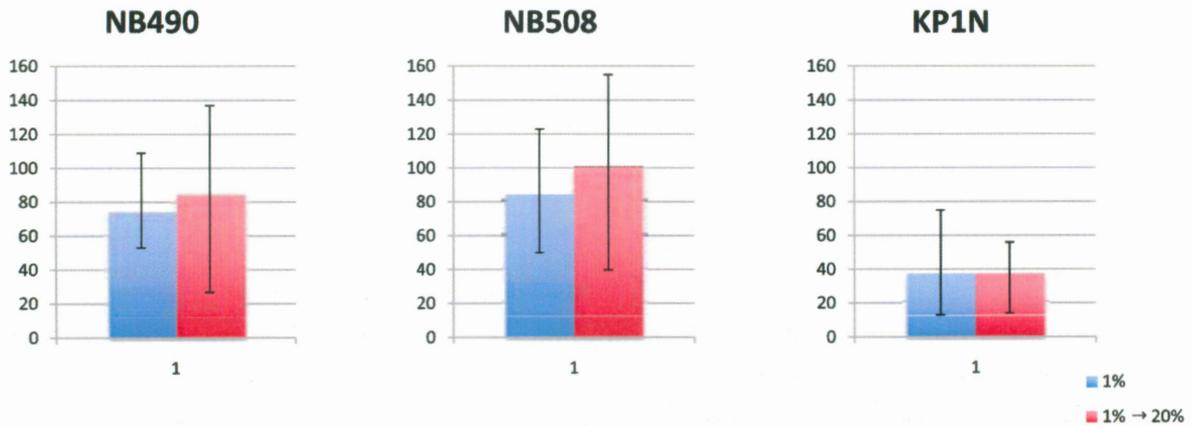


Figure3 1%O₂ 順化細胞の Reoxygenation による浸潤能の変化 (Invasion Assay)

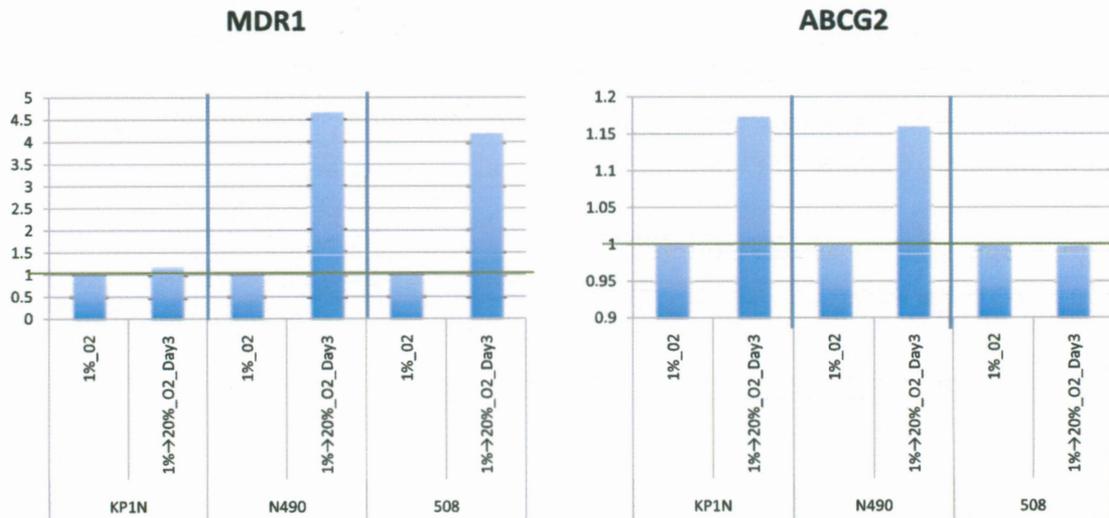


Figure4 1%O₂ 順化細胞の Reoxygenation による薬剤耐性関連遺伝子発現の変化 (RT-PCR)

り逆に亢進する結果を認めた。

【考 察】

Reoxygenation による癌の悪性度を規定する因子に対する影響は増殖能については抑制、浸潤能については変化なく、薬剤耐性については亢進する結果となった。これは in vitro での検討であり、体内の酸素環境を考えると、20%O₂ は通常酸素というよりむしろ高酸素環境下にあると考えられ、in vivo では異なる結果となる可能性があり、さらなる検討が必要と考えられる。本研究成果の一部は Cancer Research 誌に報告した⁽¹⁾。

【文 献】

- (1) Sasajima J, Mizukami Y, Sugiyama Y, et al. Transplanting normal vascular proangiogenic cells to tumor-bearing mice triggers vascular remodeling and reduces hypoxia in tumors. *Cancer Res* 70: 6283-92 (2010)
- (2) Knutson JR, Iida J, Fields GB, et al. CD44-related chondroitin sulfate proteoglycan, a cell surface receptor implicated with tumor cell invasion, mediates endothelial cell migration on fibrinogen and invasion into a fibrin matrix. *Mol Biol Cell* 7(3):383-96 (1996).