

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	南 幸範
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Prostaglandin I₂ analog suppresses metastasis by improving intratumoral hypoxia (Prostaglandin I₂誘導体は腫瘍の低酸素を改善することで転移を抑制する)</p> <p>共 著 者 名</p> <p>佐々木 高明、暮地本 宙己、川辺 淳一、遠藤 哲史、平 義樹、 渡部 剛、長谷部 直幸、大崎 能伸</p> <p>未公表</p> <p>研 究 目 的</p> <p>癌の転移は癌患者の予後に大きく関わる要素のひとつである。そのため原発巣の縮小だけではなく、転移の予防・縮小もがん治療において重要な課題である。</p> <p>腫瘍血管形成は癌の転移・増殖の過程の中で重要な役割を持つことが知られている。一般的に、腫瘍血管の構造は正常組織と異なり、血管の安定化や成熟化に寄与する周細胞 (PCs) の被覆がほとんどなく、血管内皮細胞 (ECs) 同士の接着も弱いいため、栄養や腫瘍細胞自体が漏れ出やすい未成熟な構造をしている。</p> <p>我々は、ECs の前駆細胞である血管内皮前駆細胞 (EPCs) がプロスタサイクリン (PGI₂) に特異的な受容体である IP 受容体を発現していることを報告した。また EPCs において PGI₂ はオートクライン、パラクラインの経路で IP 受容体と結合し、それにより EPCs の機能 (血管の成熟化) が維持されることを報告した (引用文献 1)。ECs や PCs もまた IP 受容体を発現しており、PGI₂-IP 系の関与が示唆されている。ヒト肺癌の腫瘍組織内の PGI₂ 合成酵素の mRNA 量と蛋白発現量が低下していることが報告されており、PGI₂-IP 系と腫瘍の増殖・転移の関係が示唆されている。</p> <p>そこで本研究では、マウス肺癌肺転移モデルに PGI₂ の誘導体であるベラプロストナトリウム (BPS) を投与することで、腫瘍血管の PGI₂-IP 系を活性化させ、それにより腫瘍血管を成熟化させ、転移腫瘍内の低酸素を改善し、肺癌肺転移を抑制し得るかを検討した。</p> <p>材 料 ・ 方 法</p> <p>1. C57BL/6J マウス (雌性 8~10 週齢) に同マウス由来の肺腺癌細胞 (LLC; Luwis lung carcinoma) を尾静脈注射することで肺癌肺転移モデルを作成した。癌細胞の尾静脈注射の翌日から、BPS 群は BPS (東レ株式会社より供与) が入った浸透圧ポンプを留置し、対照群は</p>			

溶媒が入った浸透圧ポンプを留置した。各群 5 匹のマウスを作成した。癌細胞の尾静脈注射から 21 日後に各群のマウスの肺を摘出した。肺の摘出 1 時間前に pimonidazole を各マウスに経口投与した。摘出した肺を亜鉛固定液で固定し、24 時間後パラフィン包埋した。パラフィン包埋した肺組織を薄切し、HE 染色、免疫組織染色を行なった。また、同様に作成した各群のマウスの肺内の腫瘍血管を走査型電子顕微鏡で検討した。

- 1-1. HE 染色：1 匹につき 5 切片のスライドを作成し、40 倍で観察した。1 スライドにつき 5 視野中の転移腫瘍数と転移腫瘍の面積を各群で比較した。
 - 1-2. 免疫組織染色：ECs のマーカー (Endomucin) と PCs のマーカー (α -SMA あるいは NG2) で二重染色し、腫瘍血管の PCs による被覆の割合を各群で比較した。
 - 1-3. 走査型電子顕微鏡：PCs による被覆の状態、腫瘍血管の径と走行を各群で比較した。
 - 1-4. 低酸素領域の検討：転移腫瘍内の pimonidazole 付加生成物の分布を免疫組織染色により評価し、転移腫瘍内の低酸素領域を各群で比較した。
2. BPS の LLC への直接的な抗腫瘍効果の有無を以下の方法で確認した。
- 2-1. コロニー形成能試験：6 ウェル皿に 1 ウェルあたり 1.5×10^3 個の LLC を分注し、24 時間後 0 ~ 1000 nM の BPS を入れた培地に入れ替え 10 日間培養し、BPS 各濃度における LLC のコロニー数を比較した。
 - 2-2. 細胞増殖試験：96 ウェル皿に 1 ウェルあたり 3.0×10^3 個の LLC を分注し、24 時間後 0 ~ 1000 nM の BPS を入れた培地に入れ替え 3 日間培養し、BrdU 発色キットを用い、ELISA 法により BPS 各濃度における吸光度を比較した。
 - 2-3. 血管新生抗体アレイ：100 mm 皿に 2.5×10^3 個の LLC を分注し、24 時間後 0 nM もしくは 10 nM の BPS を入れた培地に入れ替え 4 日間培養し、培養上清を回収し、抗体アレイキットを用い、血管新生に関連する蛋白の発現を比較した。

成 績

- 1-1. マウス肺癌肺転移モデルにおいて、転移腫瘍数は BPS 群で有意に減少 (対照群 : BPS 群 = 21.0 : 13.8, $p < 0.05$) し、転移腫瘍面積も BPS 群で有意に減少 (対照群 : BPS 群 = 0.60×10^6 : 0.19×10^6 (mm^2), $p < 0.05$) した。
- 1-2. マウス肺癌肺転移モデルにおいて、 α -SMA と Endomucin の二重染色では α -SMA⁺細胞が近接する Endomucin⁺細胞が有意に BPS 群で増加 (対照群 : BPS 群 = 0.23 : 2.81 ($\times 10^7/\text{mm}^2$), $p < 0.05$) した。NG2 と Endomucin の二重染色では有意差はつかなかった (対照群 : BPS 群 = 1.87 : 2.68 ($\times 10^7/\text{mm}^2$), $p = 0.25$) が、NG2⁺細胞が近接する Endomucin⁺細胞が BPS 群で増加傾向を示した。つまり、転移腫瘍内において、PCs が支持する ECs 数が BPS 群で増加した。
- 1-3. 走査型電子顕微鏡による検討では、対照群では腫瘍血管を被覆する PCs は少なく、腫瘍血管は血管径が拡張し、走行も蛇行していた。一方、BPS 群では腫瘍血管を被覆する PCs の数は多く、腫瘍血管の血管径は比較的細くなり蛇行の度合いも軽減した。

1-4. マウス肺癌肺転移モデルにおける転移腫瘍内の低酸素領域の検討では、同程度の大きさの転移腫瘍を BPS 群と対照群で比較した。対照群では転移腫瘍内に pimonidazole 付加生成物が比較的広く分布しているのに対し、BPS 群ではその範囲は縮小していた。つまり、BPS 群で低酸素領域の改善がみられた。

2-1. LLC のコロニー形成能に対する BPS の直接的な影響をみるためコロニー形成試験を行なったところ、BPS 各濃度で LLC のコロニー形成数に有意差は認められなかった。

2-2. LLC の増殖能に対する BPS の直接的な影響をみるため細胞増殖試験を行なったところ、BPS 各濃度で LLC の増殖能に有意差は認められなかった。

2-3. LLC が産生する血管新生に関連する蛋白に対する BPS の直接的な影響をみるため血管新生抗体アレイで評価したところ、BPS 各濃度で LLC が産生する血管新生に関連する蛋白に有意な増減は認められなかった。

考 案

本研究は、BPS により腫瘍の肺転移が抑制されることを明らかにした。その作用機構として、BPS による腫瘍血管の PGI₂-IP 系の活性化を介した血管内皮細胞と周細胞の接着の増強、それによる腫瘍血管の成熟化が考えられた。実際に、免疫組織染色と走査型電子顕微鏡の検討では、BPS 群の腫瘍血管の成熟化と転移腫瘍内の低酸素領域の減少が認められた。

Cooke らは周細胞の欠損により転移が増加することを示し、それは周細胞の欠損により血管が不安定化し、低酸素が増加することが関わっていると報告している (引用文献 2)。本研究の結果から、BPS により腫瘍血管が成熟化し、腫瘍内の低酸素が減少し、肺転移が減少した。

本研究で用いたマウス由来の肺腺癌細胞 (LLC) に対する BPS の直接的な腫瘍増殖抑制効果が問題となってくる。実際に Tennis らは、プロスタサイクリンの誘導体であるイロprostがヒトのいくつかの非小細胞肺癌株に対して直接的な抗腫瘍効果を示すことを報告している (引用文献 3)。しかし、我々の検討では、LLC に対する BPS の直接的な腫瘍増殖抑制効果はないことを確認した。

結 論

本研究から、腫瘍血管の PGI₂-IP 系の活性化により腫瘍血管が成熟化し、転移腫瘍内の低酸素が改善され、肺癌肺転移が抑制されることを明らかにした。この結果から BPS の肺転移に対する治療薬としての可能性が示唆された。




引用文献

1. Kawabe J, et al. Prostaglandin I2 promotes recruitment of endothelial progenitor cells and limits vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(3): 464-470.
2. Vesselina G. Cooke, et al. Pericyte depletion results in hypoxia-associated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis mediated by Met signaling pathway. *Cancer Cell*, 2012, 21(1): 66-81.
3. Meredith A. Tennis, et al. Prostacyclin inhibits non-small cell lung cancer growth by a frizzled 9-dependent pathway that is blocked by secreted frizzled-related protein 1. *Neoplasia*, 2010, 12(3): 244-253.

参考文献

1. Yoshinori Minami, Takaaki Sasaki and Yoshinobu Ohsaki. *Research Directions in Tumor Angiogenesis, Accessory cells in tumor angiogenesis ~Tumor-associated pericytes~* 2012 ISBN 980-953-307-875-0.
2. Okumura S, Sasaki T, Minami Y, Ohsaki Y. Nicotinamide phosphoribosyltransferase: a potent therapeutic target in non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor-gene mutation. *Journal of thoracic oncology*: 2012; 7: 49-56.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	南 幸範
<p style="margin: 5px 0;">審査委員長 西川 祐司 </p> <p style="margin: 5px 0;">審査委員 高後 裕 </p> <p style="margin: 5px 0;">審査委員 大崎 能伸 </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Prostaglandin I₂ analog suppresses metastasis by improving intratumoral hypoxia (Prostaglandin I₂ 誘導体は腫瘍の低酸素を改善することで転移を抑制する)</p>			
<p>癌の転移を抑制することは、癌患者を治療する上できわめて重要であるが、いまだに有効な手段は確立されていない。本研究において、申請者らは、腫瘍血管の未熟性とそれによる低酸素が癌の転移を促進するとの仮説に基づき、血管を成熟することで肺癌の肺転移を抑制できるかを実験的に検討した。</p> <p>内皮細胞とそれらを包む周細胞の相互関係は血管の成熟化に重要な意義を持っており、腫瘍血管の多くは周細胞の被覆に乏しいことが明らかにされている。一方、内皮細胞と周皮細胞ではプロスタサイクリン(PGI₂)受容体である IP が発現しており、PGI₂-IP 系が両者の相互関係の調節に関与していることが示唆されている。申請者らはこれらに着目し、PGI₂ 誘導体 (IP アゴニスト) であるベラプロストナトリウム(BPS)を持続的に投与することで癌の転移を抑制できるかを検証するとともに、BPS が周細胞の局在や血管成熟化に与える影響を検討した。</p> <p>実験には、C57BL/6J マウスに同系マウス由来の肺腺癌細胞(LLC)を尾静脈から注射することで肺に転移を形成させるモデルを用いているが、これは血行性転移の研究に</p>			

において広く用いられているものである。注射直後の腫瘍細胞の接着・遊走に対する影響を除外するため、注射の翌日からBPSまたは溶媒の入った浸透圧ポンプをマウスに留置した。注射後21日で、肺を摘出し、転移、低酸素の程度および腫瘍血管の状態を免疫蛍光染色および走査電子顕微鏡で検討した。その結果、BPS投与群では腫瘍転移が有意に抑制されるとともに低酸素状態が改善されることが判明した。また、対照群の腫瘍血管は拡張・蛇行し、周皮細胞による被覆が乏しかったのに対し、BPS投与群では血管径が狭小化し、多数の周細胞が血管を被覆していた。なお、BPSは腫瘍細胞自体の増殖に影響を与えないこと、血管新生に関与するサイトカインの分泌を誘導しないことが確認された。

本研究は、腫瘍血管の成熟化をPGL₂-IP系の刺激で誘導し、低酸素状態を改善することで転移を抑制するという、独自のアイデアに基づく新たな治療法の可能性を示しており、今後の臨床応用が期待される。

申請者に対して、各審査委員から論文内容、関連領域について試問がなされ、これに対して適切な回答が寄せられた。

本審査委員会では慎重な意見交換を行い、本論文は申請者自身の努力の結果であり、腫瘍学分野において学術的にも十分に貢献したことを認め、学位を授与する価値があると結論した。