

Cyclooxygenase-2 inhibitor は腫瘍血管新生を抑制する

学位論文内容の要旨

血管新生は個体の発生や発育にとって不可欠の現象であるが、癌の増殖や浸潤、転移にも密接な関連があることから、がん治療において腫瘍の血管新生を制御することは極めて重要である。

腫瘍内微小環境は低酸素におちいっており、種々のサイトカイン、VEGFのような増殖因子が豊富に存在する。血管内皮細胞もまたこのような異常な環境によって影響を受けている可能性がある。例えば、低酸素は HIF-1 α の発現を誘導し、これによって cyclooxygenase (COX)-2 の発現が亢進されることが知られている。COX-2 はプロスタグランジン (PG) の合成酵素であり、PG は腫瘍ならびに間質細胞の VEGF 発現を引き起こし、血管内皮細胞に対してはアポトーシスの抑制や細胞遊走を刺激することが報告されている。このことから近年、COX-2 阻害剤の血管新生阻害剤としての使用も提唱され始めてきた。

しかしながら、COX-2 阻害剤の正常血管内皮細胞に対する作用についての報告はあるが、腫瘍内の血管内皮細胞に対する作用に関しては現在まで報告がなく、COX-2 阻害剤の抗血管新生作用の機序はいまだ解明されていない点が多い。腫瘍血管内皮細胞はその分離が困難であるために、これまでの血管新生の研究は比較的分離のやさしい正常血管内皮細胞をもちいた報告がほとんどである。しかし近年、腫瘍血管内皮細胞は正常血管内皮細胞と比較して、tumor endothelial marker (TEM) などの特異的なマーカーの発現、細胞増殖が早い、basic FGF に対する感受性が高い、EGF レセプターの発現亢進、さらには染色体異常をも持つことなどが報告され、多くの異なる点を持つことが明らかとなってきた。

そこで本研究では、腫瘍血管内皮細胞における COX-2 の阻害が腫瘍血管新生にどのような影響を及ぼすかを明らかにするため、正常血管内皮細胞に対する効果との比較を交えて検討することを目的に研究を行った。

はじめにマウス腫瘍モデルでの COX-2 阻害効果を検討した。腫瘍モデルには、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株である HSC-3 ならびにヒト高転移性悪性黒色腫細胞株である A375-SM を用いた。また COX-2 の選択的な阻害剤として NS398 を用いた。腫瘍細胞を移植したマウスに NS398 を投与し、腫瘍体積の経時的変化を解析すると、口腔がんならびに悪性黒色腫のどちらの系においても、対照群と比較して NS398 投与群では抗腫瘍効果が認められ、口腔がん移植モデルでは腫瘍の成長が有意に抑制された。NS398 投与群における腫瘍の成長抑制は、一般的には腫瘍細胞の死滅または腫瘍細胞の増殖が抑制されたことによると考えられる。そこで MTS アッセイによって NS398 の口腔がんならびに悪性黒色腫の増殖能への影響を *in vitro* で解析したところ、腫瘍細胞に対する増殖抑制効果はごく軽度であった。このことから、本実験で腫瘍の成長抑制をもたらしたのは、COX-2 阻害剤の腫瘍細胞に対する直接的な抑制作用ではなく、血管新生が抑制されたことによると推測された。これを検証するため、腫瘍モデルから作成した組織切片の血管を血管内皮マーカーである抗 CD31 抗体で染色したところ、

未治療群と比較して NS398 治療群で CD31 陽性細胞の数が劇的に減少していた。さらに CD31 陽性で示される血管内皮の領域から微小血管密度を定量的に算出すると、対照群と比較して NS398 投与群の微小血管密度は約 50%まで抑制されていた。これらの結果から、腫瘍の血管新生が抑制されたことが腫瘍の成長抑制をもたらしたことが示唆された。この血管新生の抑制は、腫瘍血管内皮細胞に対する COX-2 阻害剤の直接的な抑制作用による場合と、血管新生因子を産生する腫瘍細胞が減少したことによる場合が考えられるが、本研究では COX-2 阻害剤が腫瘍細胞の増殖に抑制的に作用しなかったことから、腫瘍血管内皮細胞に対して COX-2 阻害剤が直接、抑制的に作用したと考えられた。

腫瘍血管内皮細胞に対する COX-2 阻害剤の作用を解析するためには、腫瘍からの血管内皮細胞の分離が必要不可欠である。腫瘍血管内皮細胞はヒト口腔扁平上皮がん細胞ならびにヒト悪性黒色腫細胞をマウスに移植し、成長した腫瘍から Hida らの方法を参考に磁気細胞分離法 (MACS) を用いて分離した。また正常血管内皮細胞としてマウスの正常皮膚細胞から血管内皮細胞を分離した。分離された血管内皮細胞は、マウスの血管内皮に特異的なマーカーである BS1-B4 レクチンを用いたフローサイトメトリーによって 96%以上の純度であることを確認し、以下の実験に使用した。

腫瘍血管内皮細胞と正常血管内皮細胞の比較としてまずそれぞれの COX-2 mRNA の発現を解析した。RT-PCR 法ならびに real time PCR 法により、正常血管内皮細胞に比べて腫瘍血管内皮細胞で COX-2 mRNA の高い発現が示された。

血管内皮細胞の増殖能に対する COX-2 阻害剤の効果を MTS アッセイで解析した。正常血管内皮細胞や腫瘍細胞と比較して腫瘍血管内皮細胞は NS398 に対する感受性が高く、その増殖が有意に阻害された。

血管内皮細胞の遊走能に対する COX-2 阻害剤の効果を Boyden chamber とビトロネクチンでコートされたポリカーボネート膜を用い、マイグレーションアッセイで解析した。

50 μ M の NS398 は正常血管内皮細胞の遊走を軽度には抑制しなかったのに対し、腫瘍血管内皮細胞の遊走は有意に抑制された。さらに血管内皮細胞の遊走に関与していることが知られているシグナル分子 Akt のリン酸化に対する COX-2 阻害剤の効果を Western blotting で解析した結果、50 μ M の NS398 の添加により、VEGF で誘導された Akt のリン酸化に対する影響は正常血管内皮細胞で認められなかったが、腫瘍血管内皮細胞では Akt のリン酸化が阻害された。

本研究によって、COX-2 の選択的阻害剤である NS398 が血管新生を抑制することで腫瘍の成長抑制をもたらすことがわかった。また腫瘍血管内皮は、正常血管内皮細胞と比較して COX-2 mRNA の発現が高く、より低濃度の NS398 によって細胞増殖・遊走・Akt のリン酸化が抑制され、腫瘍細胞や正常血管内皮細胞と比較して COX-2 阻害剤に感受性が高いことがわかった。

以上の結果から、より低濃度の COX-2 阻害剤が腫瘍血管を直接標的とできることから、心筋梗塞などの有害な副作用を引き起こす確率を減少させ、血管新生阻害を目的とした抗腫瘍療法に COX-2 阻害剤が有用である可能性が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則

副 査 教 授 進 藤 正 信

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

Cyclooxygenase-2 inhibitor は腫瘍血管新生を抑制する

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。審査論文の概要は、以下の通りである。

Cyclooxygenase-2 (COX-2)はプロスタグランジンの合成酵素で、炎症局所や腫瘍内で高発現しており、腫瘍の進展と転移に深く関与している。非ステロイド性抗炎症剤によるCOX-2の阻害は腫瘍の増殖を抑制し、また正常な血管内皮細胞の spreading と migration を抑制することが知られているが、腫瘍内の血管内皮細胞に対する作用は明らかではない。本研究は、腫瘍血管内皮細胞における COX-2 阻害が腫瘍の血管新生にどのような影響を及ぼすかを明らかにするため、正常血管内皮細胞における COX-2 阻害の効果と比較、検討したものである。

始めにマウス腫瘍モデルでの COX-2 阻害効果を検討した。腫瘍モデルには、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3 ならびにヒト高転移性悪性黒色腫細胞株 A375-SM を用いた。腫瘍細胞を移植したマウスに COX-2 選択的阻害剤 NS398 を投与し、腫瘍体積の経時的変化を検討したところ、口腔がん移植モデルでは NS398 投与群で腫瘍の成長が有意に抑制され、悪性黒色腫移植モデルでも NS398 投与群で抗腫瘍効果が認められた。しかし、*in vitro* の検索で、NS398 の両腫瘍細胞に対する増殖抑制効果はごく軽度すぎなかった。血管内皮マーカーである抗 CD31 抗体を用いた免疫組織学的検索では、NS398 非投与群と比較して NS398 投与群で CD31 陽性細胞の数が劇的に減少しており、NS398 投与群の微小血管密度は対照群に比べて約 50%まで抑制されていた。これらの結果は、本実験における腫瘍の成長抑制は腫瘍細胞に対する COX-2 阻害剤の直接的な抑制作用ではなく、腫瘍の血管新生が抑制されたことによるものであることを示している。さらに、NS398 の腫瘍の増殖抑制効果は軽微であったことから、この血管新生の抑制は COX-2 阻害剤の直接的な抑制作用によるものと考えられる。

次に、腫瘍の血管内皮細胞に対する COX-2 阻害剤の直接的な抑制作用について検討した。口腔がん移植モデルおよび悪性黒色腫移植モデルから磁気細胞分離法 (MACS) を用いて腫瘍血管内皮細胞を分離した。対象にはマウス正常皮膚から分離した血管内皮細胞を用い

た。なお、マウスの血管内皮に特異的なマーカーである BS1-B4 レクチンを用いたフローサイトメトリーにより、分離した血管内皮細胞の純度は96%以上であることが確認された。RT-PCR 法を用いた COX-2 mRNA の発現量の検討では、正常血管内皮細胞に比べて、腫瘍血管内皮細胞で高い発現が示され、real time PCR 法による定量的な解析で、腫瘍血管内皮細胞でその発現が有意に亢進していることが確認された。血管内皮細胞の増殖能に対する COX-2 阻害剤の効果を MTS アッセイでみると、NS398 の添加により腫瘍血管内皮細胞の増殖が有意に阻害された。また、Boyden chamber を用いた migration assay では、正常血管内皮細胞の遊走は NS398 添加で抑制しなかったのに対し、腫瘍血管内皮細胞の遊走は有意に抑制された。血管新生作用をもつ VEGF/VEGF レセプターの下流で Akt のリン酸化が生じていることが明らかになっている。Akt のリン酸化に対する COX-2 阻害剤の効果を Western blotting で解析したところ、NS398 は正常血管内皮細胞の Akt リン酸化に影響は認められなかったが、腫瘍血管内皮細胞では VEGF によって活性化した Akt のリン酸化が阻害された。これらの結果は、腫瘍血管内皮細胞では、正常血管内皮細胞に比べて、COX-2 の恒常的な発現がみられ、COX-2 阻害剤に対して感受性が高いことを示唆している。

このことは、COX-2 阻害剤は低濃度で腫瘍血管を直接標的として作用することから、心筋梗塞などの有害な副作用を引き起こす確率の少ない、血管新生阻害を目的とした抗腫瘍療法に COX-2 阻害剤が有用であることを示している。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。

主な質問事項は、

- 1) COX には2つの異なった産物があるが、COX-1 の発現は関係しないのか
- 2) HIF-1 α はどのような細胞により産生されるのか
- 3) 腫瘍での HIF-1 産生・COX-2 誘導と、炎症におけるプロスタグランジン産生のメカニズムに違いはあるのか。
- 4) マウスゼノグラフトモデルから腫瘍血管内皮細胞を分離する際、ジフテリアトキシンを用いる意味について
- 5) COX-2 阻害剤である NS398 が腫瘍細胞と血管内皮細胞におよぼす細胞増殖抑制効果の差、とくに濃度との関連性について
- 6) Akt のリン酸化機構の意義について 等であった。

いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、COX-2 阻害剤は腫瘍血管内皮細胞の血管新生能を特異的に抑制する作用を持つことを明らかにし、腫瘍に対する血管新生阻害剤として有用であることを示したことが高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。