

学 位 論 文 題 名

ヒト腫瘍におけるCOX-2発現の分子病理学的解析

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

腫瘍における COX-2 過剰発現は多くの組織で報告されている。腫瘍細胞は COX-2 過剰発現により造腫瘍能の獲得、細胞増殖能の上昇、抗アポトーシス、リンパ管や毛細血管など脈管新生を促進することが知られている。COX-2 阻害薬を用いた検討では、長期間のアスピリン投与は大腸癌発生リスクを減少させ、COX-2 阻害薬による大腸癌に対する予防的効果が認められている。しかしながら、大腸癌患者に対し COX-2 阻害薬を用いた臨床試験では有効性に対し意見が分かれる結果であり、癌に対して COX-2 阻害薬による治療の有効性に関して一致した見解は得られていない。腫瘍細胞組織中での COX-2 発現の意義を明確にするために、本研究では、大腸癌および髄膜腫、転移性脳腫瘍に対し免疫組織化学的検討を行い、大腸癌に対して分子生物学的検討を行った。

第 1 章 ヒト腫瘍における COX-2 発現の免疫組織化学的解析

【対象と方法】大腸癌、髄膜腫および転移性脳腫瘍に対し抗 COX-2 抗体(Polyclonal antibody, Cayman Chemical, Michigan, USA)を用いて免疫組織化学染色を施行し、腫瘍細胞の COX-2 発現の評価は染色強度と陽性率を判定した。

①大腸癌：北海道大学病院消化器外科 I にて 2002 年 1 月から 2004 年 12 月まで施行された大腸癌切除検体 91 例を用いた。腫瘍細胞とともに周囲間質細胞の COX-2 発現も評価した。COX-2 発現と病理学的進展因子および全生存期間、無増悪生存期間との相関を統計学的に検討した。また、腫瘍細胞に加えて浸潤部および非浸潤部の周囲間質細胞の COX-2 発現の相関も同様に検討した。

②髄膜腫：北海道大学医学研究科腫瘍病理学分野にて 2005 年から 2012 年の間に髄膜腫と病理診断された 76 例を用いた。COX-2 発現と WHO Grade および MIB-1 index との相関を統計学的に検討した。

③転移性脳腫瘍：北海道大学医学研究科腫瘍病理学講座にて 2003 年から 2012 年の間に髄膜腫と病理診断された 166 例を用いた。また 166 例のうち再発した症例 13 例に対しても免疫組織化学染色を施行し COX-2 の発現を確認した。

【結果】①大腸癌：74.7 %の症例に COX-2 発現がみられた。大腸癌細胞および周囲間質細胞における COX-2 発現と病理学的進展因子との相関あるいは全生存、無増悪生存期間との間に統計学的有意相関は見られなかったが($p = 0.550$, $p = 0.124$)、大腸癌細胞と周囲間質細胞との間には非浸潤部では統計学的有意相関は見られなかったが($p = 0.15$)、浸潤部では統計学的有意相関を認めた($p = 0.0015$)。

②髄膜腫：75.0 %の症例に COX-2 発現が認められた。髄膜腫細胞の COX-2 発現と全生存期間および無増悪生存期間との間に統計学的有意相関は見られなかった($p = 0.822$, $p = 0.970$)。WHO Grade および MIB-1 index との間には統計学的有意相関が見られた($p = 0.0153$, $p = 0.0075$)。

③転移性脳腫瘍：15.0 %の症例に COX-2 発現が見られた。再発した 13 例中 1 例(7.7 %)

に COX-2 発現の陽性化を認めた。

第 2 章 ヒト腫瘍における COX-2 発現の分子生物学的解析

【対象と方法】大腸癌細胞株(WiDr、HCA7)およびヒト培養胎児腎細胞(293FT)に対し、COX-2 発現レトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターを作成し、一過性導入およびウイルス感染を行った。また、COX-2 の 5'-UTR 側に 132、120、90、60、30 塩基対および Kozak 配列のみ付加した COX-2 発現レトロウイルスベクターも作成し同様の検討を行った。COX-2 発現確認はウェスタンブロット法にて確認し、COX-2 発現が見られた 293FT 細胞の培養液中の PGE₂ 濃度を ELISA 法にて測定し、得られた順化培地と大腸癌の培地を交換し BrdU アッセイを行い増殖能の変化を確認した。

【結果】いずれの発現ベクターにおいてもウイルス感染による COX-2 過剰発現は認められなかった。一過性導入においても COX-2 の 5'-UTR 側に付加のない発現ベクターでは発現は不安定であり、5'-UTR 側に 132 塩基対および Kozak 配列を付加した発現ベクターでは安定した COX-2 発現が見られ、PGE₂ 濃度の上昇が確認された。また、ELISA により PGE₂ 濃度の上昇が確認された順化培地に培養液を置換した大腸癌細胞株では、元々培養液中の PGE₂ 濃度が低い WiDr のみで COX-2 発現誘導が見られ、BrdU 取り込みが統計学的に有意に上昇していた。培養液中の PGE₂ 濃度の高い HCA7 では COX-2 発現誘導は見られず、BrdU 取り込みの統計学的有意差は見られなかった。

【考察】

- 1) 第 1 章の免疫組織化学的検討では大腸癌の浸潤部において大腸癌細胞と周囲間質細胞の COX-2 発現は統計学的有意相関を示し、髄膜腫では COX-2 発現と WHO Grade および MIB-1 index が統計学的に有意相関を示すことを明らかにした。いずれも COX-2 発現と予後については有意な相関は認められなかったが、髄膜腫において WHO Grade と MIB-1 index に相関があることは髄膜腫細胞において COX-2 発現が悪性化に寄与することが示唆され、大腸癌において浸潤部にて腫瘍細胞と周囲間質細胞の COX-2 発現には相関が見られた。腫瘍における COX-2 の主要なメディエーターは PGE₂ であることから腫瘍細胞と周囲間質細胞の COX-2 発現との間には PGE₂ が介在する可能性がある。PGE₂ の介在する COX-2 相互発現の悪性化への寄与を明らかにするために分子生物学的検討を加える必要があると考えられた。
- 2) 第 2 章の分子生物学的検討では、COX-2 の 5'-UTR 側の付加領域が COX-2 安定発現のために重要であることを示し、大腸癌細胞では培養液中の PGE₂ 濃度上昇により COX-2 が誘導され、増殖能が統計学的に有意に上昇することを示した。これは免疫組織化学的検討において大腸癌浸潤部における腫瘍細胞と周囲間質細胞の COX-2 発現が相関することと合わせ、大腸癌浸潤部では PGE₂ を介する COX-2 発現の正のフィードバック回路が存在し、悪性化に寄与することが示された。

【結論】

ヒト腫瘍における COX-2 発現は腫瘍悪性化および増殖能上昇をもたらす。特に腫瘍浸潤部では PGE₂ を介する COX-2 相互誘導による正のフィードバック回路が存在する。COX-2 阻害薬により浸潤部での正のフィードバック回路を遮断することにより腫瘍の悪性化を低下させることで、COX-2 は腫瘍の治療標的として有用である可能性がある。

【結語】

本研究により腫瘍における PGE₂ を介する COX-2 相互誘導の正のフィードバック回路が存在し悪性化に寄与していることが示されたが、COX-2 発現と予後との相関あるいは非浸潤部での COX-2 の検討や、浸潤部においても腫瘍細胞や線維芽細胞、免疫細胞など多くの細胞が存在し、多細胞系での *in vitro* の検討および *in vivo* での検討が今後の課題である。

学位論文審査の要旨

主 査	准教授	神 山 俊 哉
副 査	教 授	平 野 聡
副 査	教 授	大 場 雄 介
副 査	教 授	田 中 伸 哉

学 位 論 文 題 名

ヒト腫瘍におけるCOX-2発現の分子病理学的解析

腫瘍における COX-2 過剰発現は多くの組織で報告されており、COX-2 過剰発現は正常上皮における腫瘍形成に関与し、癌組織では腫瘍細胞の増殖能の上昇、抗アポトーシス、リンパ管や毛細血管など脈管新生を促進することが知られている。COX-2 遺伝子のノックアウトや COX-2 阻害薬により腫瘍形成が阻害されることが証明されているが、進行大腸癌患者に対する COX-2 阻害薬を用いた臨床試験では薬理学的有効性は証明されていない。本検討では、ヒト腫瘍細胞組織中での COX-2 発現の意義および COX-2 阻害薬の有効性を明確にするために、大腸癌および髄膜腫、転移性脳腫瘍に対し免疫組織化学的検討を行い、大腸癌に対して分子生物学的検討を行った。申請者は免疫組織化学的検討により転移性脳腫瘍および髄膜腫、大腸癌において COX-2 が高発現しており悪性形質へ寄与している可能性を示した。特に大腸癌では腫瘍浸潤先進部と腫瘍中心部に分けて検討し、浸潤先進部においてのみ腫瘍細胞と周囲間質細胞との COX-2 発現が正の相関を示すことを示した。さらに、大腸癌に対して分子生物学的検討を行い、COX-2 過剰発現させた 293FT 細胞の順化培地を添加することにより大腸癌細胞株の増殖能が上昇することを示した。これらのことから癌浸潤先進部における癌細胞と間質細胞との COX-2 発現の正のフィードバック回路の存在が想定され悪性形質に関与する可能性を示した。

発表後、副査の平野聡教授から、免疫染色の評価について、特に染色強度の判定基準の有無について質問があった。申請者は、評価は主観的な基準ではあるが免疫染色と同時に同一検体について作製した HE 染色標本と対照し標本の厚みや細胞密度を考慮し評価したと回答した。続いて、大腸癌の免疫組織化学的検討における間質の定義について質問があった。申請者は、間質は癌細胞に隣接しており線維芽細胞および炎症細胞からなる周囲組織であり、正常組織の間質と比較し炎症細胞浸潤や線維芽細胞の比率や性質が異なり明確に区別しようと回答した。また、COX-2 とは通常どのような癌組織中にも存在する分子であるが、免疫組織学的検討において腫瘍細胞にも間質細胞にも COX-2 が陰性であった症例が存在し、陰性症例の評価について質問があった。申請者は、免疫染色標本中の正常組織内に存在するマクロファージを陽性対照として用いて染色性の評価し免疫染色の妥当性を確認した上で陰性と判定したが、COX-2 陰性であることの意義については報告がなく不明であるが、癌細胞の免疫寛容などが考えられると回答した。副査の大場雄介教授からは、病理学的評価は 3 人の病理医が行ったと記載があるが評価が分かれた場合の対処について質問があった。申請者は、評価が分かれた場合には 3 人同時に検鏡し協議を行い決定したと回答した。続いて、EP レセプター分子について質問があった。申請者は、EP レセプターは 7 回膜貫通型 G 蛋白共役型受容体であると回答した。さらに、大腸癌の免疫組織化学

的検討では COX-2 低発現群の予後が最も悪いように見えるが、どのように解釈するかという質問があった。申請者は、COX-2 高発現が予後不良因子であるという報告はあるが COX-2 低発現が予後不良であることを示した報告はなく、本検討では症例数も少ないことから、今後分子生物学的検討を行う必要があると回答した。副査の田中伸哉教授からは COX-2 染色の病理診断への応用可能性について質問があった。申請者は、特に髄膜腫では境界悪性髄膜腫の悪性度の評価が困難な症例では COX-2 染色が有用である可能性があるかと回答した。主査の神山俊哉准教授からは、髄膜腫における COX-2 発現と全生存率の有意差が見られないことへの考察について質問があった。申請者は、検討した症例数が少数であることや、死亡例がそもそも少なくフォロー期間が短いことが統計学的有意差を示さないことの原因として挙げられると回答した。続いて、腫瘍浸潤先進部における COX-2 発現と腫瘍の Stemness との関連性について質問があった。申請者は浸潤先進部における COX-2 発現と Stemness についての報告はないが、大腸癌の浸潤先進部では Tumor budding が見られ上皮間葉移行に関連しているという報告があり、浸潤先進部に着目して COX-2 発現と Stemness の関連性を検討することは大変意義深く、今後の検討すべき課題であると回答した。

申請者はいずれの質問に対しても、検討を行った際の具体的評価法や既報の論文等を引用し適切に回答した。

この論文は癌に対する COX-2 阻害薬の有効性を解明し、COX-2 発現の腫瘍に対する悪性形質への寄与を証明する上で重要な知見を提示しており、腫瘍生物学のさらなる発展に寄与するものと期待される。審査員一同はこれらの成果を高く評価し大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。