

Orthotopic implantation of a colon cancer xenograft induces high expression of cyclooxygenase-2

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小路, 毅 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1215

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 362号	学位授与年月日	平成14年 3月26日
氏名	小路 毅		
論文題目	Orthotopic implantation of a colon cancer xenograft induces high expression of cyclooxygenase-2 (大腸癌組織の同所移植は cyclooxygenase-2 を高発現する)		

博士(医学) 小路 毅

論文題目

Orthotopic implantation of a colon cancer xenograft induces high expression of cyclooxygenase-2

(大腸癌組織の同所移植は cyclooxygenase-2 を高発現する)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

非ステロイド抗炎症剤が大腸癌発生を減少させ、その原因としてシクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)の抑制が指摘されている。COX-2は大腸癌などいくつかの癌において発現が確認されている。また癌の転移における VEGF、IL-8などの誘導に宿主-腫瘍間相互作用が、報告されている。そこで我々は大腸癌肝転移モデルを用いて COX-2と肝転移の関係について検討を行った。

〔方法〕

ヒト大腸癌 TK-4を BALB/c ノードマウスの皮下(SC群)、腹膜(PI群)、盲腸(CI群)に移植した3群を作成し、移植5週後に肝転移巣数と肝重量を計測し、原発腫瘍を摘出し、以下の評価を行った。1:腫瘍の COX-2、VEGFmRNA 発現を測定(ノザンプロット法)。2:アポトーシスインデックスの測定(TUNEL法)。3:微小血管密度を測定(MP-12染色)。4:COX-2蛋白の発現(抗 COX-2抗体を用いた免疫染色)。

〔結果〕

①SC群、PI群、CI群の肝転移個体数は各群19匹中、それぞれ0、2、14匹、各個体当たりの肝転移巣数は0、0.105、2.368と、いずれもCI群で他の2群に比し有意に多かった(個体数： $p < 0.001$ 、肝転移巣数： $p < 0.05$)。②VEGFmRNAは腫瘍で健常粘膜に比し高発現したが、各群間での発現量に差は無かった。COX-1mRNAは健常粘膜と腫瘍での発現に差は無かった。COX-2mRNA発現はSC群、PI群、CI群において β -actin比で0.892、1.164、1.454となり、CI群でSC群と比べ有意に高かった($p < 0.05$)。③COX-2蛋白は有意差は認めなかったがCI群で高発現する傾向にあり腫瘍に隣接した健常粘膜においても発現が観察された。④微小血管密度はSC群、PI群、CI群で18.0、23.7、16.6で、有意差は認めなかった。⑤COX-2mRNA発現量と微小血管密度との間には関連は認められなかった。⑥アポトーシスインデックスはCI群において有意に低く、またCOX-2mRNAとの間に負の相関が認められた($p < 0.01$)。また肝転移が発生した個体の移植腫瘍は非発生個体と比しアポトーシスインデックスが有意に低かった($p < 0.05$)。

〔考察〕

癌の転移の成立には、原発巣での増殖、癌細胞の遊走、浸潤、及び血管新生の誘導など多くの段階が必要である。多くの臨牀的、実験的検討結果から転移に関与している因子が同定されている。COX-2は大腸癌肝転移への関与が臨牀的検討により示されており、さらに実験的にCOX-2高発現大腸癌細胞が転移能を増加させた事が示されている。

Fidlerらは同所移植は転移研究に有用な実験モデルとして示し、同所移植モデルを用いた実験的検討に

において大腸癌肝転移に重要な役割を果たしている因子として bFGF、VEGF、IL-8 を挙げている。

今回、我々は同所移植群(CI群)において肝転移が高率に発生し COX-2発現が、SC群、PI群よりも有意に高いことを示した。また COX-2蛋白も CI群で高発現し、腫瘍近傍の健常粘膜でも発現していた事より、COX-2の大腸癌における宿主-腫瘍の相互作用に関連する因子として肝転移発生に関与している可能性が示唆される。

COX-2発現細胞株において VEGF、bFGF などの血管新生因子の誘導が報告されているが、今回の結果では、COX-2と血管新生との有意な関連は認めなかった。

COX-2高発現の癌組織におけるアポトーシスの抑制、COX-2選択的阻害剤投与による癌組織のアポトーシスの増加が報告されている。我々の結果も CI群においてアポトーシスは他の群と比較して有意に抑制され、また COX-2mRNA 発現量とアポトーシスインデックスには負の相関が見られた。

[結語]

大腸癌肝転移モデルにおいて、COX-2は宿主、腫瘍相互作用に関与する因子であり、アポトーシスを抑制することにより肝転移を促進しているものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

アスピリンなど非ステロイド抗炎症剤が大腸癌発生を減少させるという疫学的な証拠が示され、その原因としてシクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)の抑制が指摘され、大腸癌をはじめとした COX-2研究が盛んに行われるようになった。現在までに、COX-2は発がん、浸潤、血管新生、アポトーシス、転移などに関与していることが示されてきている。しかし、*in vitro* における転移の研究報告はあるが、*in vivo* における転移に関する研究はほとんどない。そこで申請者は、その点について明らかにするために大腸癌肝転移モデルを用いて COX-2と肝転移の関係について検討した。

第二外科学講座で樹立・継代しているヒト大腸癌 TK-4 を BALB/c ノドマウスの皮下(SC群)、腹膜(PI群)、盲腸(CI群)に移植した3群を作成し、肝転移巣数と肝重量を計測するとともに、原発腫瘍を摘出し、腫瘍の COX-2、VEGF mRNA 発現をノザンプロットティングにて定量、アポトーシスインデックス(TUNEL法)、微小血管密度(MP-12染色)、COX-2蛋白の発現(抗 COX-2抗体を用いた免疫染色)を調べた。肝転移の個体数、転移巣数は、CI群で他の2群に比し有意に多かった。COX-1 mRNA は健常粘膜と腫瘍での発現に差は無かったが、COX-2 mRNA 発現は3群共に健常粘膜に比し高値を示し、特にCI群ではSC群と比べ有意に高かった($p < 0.05$)。COX-2蛋白はCI群で高発現する傾向にあり、腫瘍に隣接した健常粘膜においても発現が観察された。この現象は、原因は定かではないが、宿主-腫瘍間相互作用に基づくものではないかと推察された。VEGF mRNA、微小血管密度は3群で有意差は認めなかった。また、COX-2 mRNA 発現量と微小血管密度との間には関連は認められなかった。アポトーシスインデックスはCI群で有意に低く、また COX-2 mRNA との間に負の相関が認められた($p < 0.01$)。また肝転移が発生した個体の移植腫瘍は非発生個体と比しアポトーシスインデックスが有意に低かった($p < 0.05$)。

申請者による大腸癌肝転移モデルを用いた *in vivo* における本研究により、COX-2は宿主、腫瘍相互作用に関与する因子であり、その発現亢進がアポトーシスを抑制することにより肝転移を促進しているであろうことが示された。申請者は、既に次のステップとして、COX-2選択的阻害剤を投与することによって、肝転移がどのように変化するかについても追跡中であり、また、大腸癌の臨床材料の COX-2を調べ、

肝転移、生命予後との関係についても検討を始めている。今後の展開につながる研究成果であると審査委員会は評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問がなされた。

1. TK-4の特徴、および COX-2 の発現程度
2. 原発巣、肝転移巣の COX-2、*ras* の変異、*p53* の変異は
3. COX-2 とマトリックスメタロプロテイナーゼ、浸潤、転移能について
4. COX-2 の発現が亢進するメカニズム
5. 移植方法の選択理由
6. Microvessel assessment 用の MP-12 のモノクローナル抗体のエピトープは
7. 血管を染める方法
8. ノーザンプロットの定量性は
9. 免疫染色で、正常大腸粘膜、腺腫、癌で染まり具合がどのように異なるか
10. いずれの細胞が染まっているか、またどの分画が染まっているか
11. 染色態度の生物学的意義(腫瘍の近傍の正常粘膜が染まる意義)
12. MVD に差がないことについての考察
13. 転移が無く、アポトーシスインドックス低値例の特徴はないか
14. SC、PI、CI 群でアポトーシスインドックスに違いはないか
15. 他のアポトーシス関連タンパクの動態は
16. COX-2 阻害剤投与により肝転移が減少するか

これらの質問に対して申請者の解答はほぼ適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査委員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 前川 真人

副査 筒井 祥博 副査 峯田 周幸