The role of cyclooxygenase-2 (COX-2) in two different morphological stages of intestinal polyps in APC△474 knockout mice

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: 砂山, 健一
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1216

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　３６３号	学位授与年月日	平成１４年　３月２６日
氏　　名	砂　山　健　一		
論文題目	The role of cyclooxygenase-2 (COX-2) in two different morphological stages of intestinal polyps in $APC^{\Delta 474}$ knockout mice ($APC^{\Delta 474}$ ノックアウトマウス腸管ポリープの形態学的に異なる二つのステージにおける Cyclooxygenase-2 の役割)		

博士(医学)　砂 山 健 一

論文題目

The role of cyclooxygenase-2 (COX-2) in two different morphological stages of intestinal polyps in $APC^{\Delta474}$ knockout mice

($APC^{\Delta474}$ノックアウトマウス腸管ポリープの形態学的に異なる二つのステージにおける Cyclooxygenase-2の役割)

論 文 の 内 容 の 要 旨

〔はじめに〕

Adenomatous polyposis coli (APC)遺伝子変異マウスにおける腺腫形成においてシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2)が重要な役割を持つことが報告されているが、COX-2が腺腫形成に関与するメカニズムはいまだ解明されていない。そこで我々は $APC^{\Delta474}$変異マウスを用いて腺腫形成過程における COX-2の役割について検討した。

〔方法〕

$APC^{\Delta474}$変異マウスに第4週齢から選択的 COX-2阻害剤(JTE-522)混餌飼料(T群、15匹)および標準飼料(C群、15匹)を投与した。第12週齢に小腸を摘出し近位10cm を組織学的実験に使用した。ポリープを形態的に小型腺腫(正常絨毛上皮内に存在し、直径300μm 以下)、大型腺腫(正常絨毛の構造が破綻し、直径が300μm より大)の二つのステージに分類し、発生数、増殖細胞核抗原標識 Index (PCNA I.)、apoptotic index (A.I.)を計測し、Bcl-2、Bcl-X、Bax、COX-2、血管内皮増殖因子(VEGF)の発現および血管内皮、マクロファージ(Mϕ)の分布を免疫染色により観測した。血管の発達を評価するために腺腫中の血管密度の計測と腺腫下粘膜下層の血管断面積総和を免疫染色標本より計測した。また、残りの遠位小腸より大型腺腫を回収し、ノザンブロッティング法にて Bcl-2、Bcl-xL、Bax、COX-2、VEGF mRNA 発現を測定した。

〔結果〕

T群の大型腺腫の発生数はC群に比して有意にに減少したが、小型腺腫の発生数は両群間に差を認めなかった。腺腫上皮細胞の PCNA I. は小型腺腫、大型腺腫ともに両群間に有意差を認めなかった。小型腺腫、大型腺腫ともにT群の A.I. はC群の約2倍であった。Bcl ファミリーについて免疫染色では腺腫上皮細胞に Bcl-2の発現はなく、Bcl-X は小型腺腫、大型腺腫ともに不均一に発現を認めた。Bcl-X を強発現している細胞の比率はC群に比してT群は有意に低いものであった。Bax は小型腺腫、大型腺腫ともに正常絨毛上皮細胞と同程度の均一な発現を認め、両群間に有意差は認めなかった。ノザンブロッティング法においてもT群の Bcl-xL mRNA の発現はC群に比して有意に少なかった。粘膜固有層の血管密度は小腺腫、大型腺腫ともに正常絨毛の血管密度に近似しており、両群間に有意差は認めなかった。しかし、大型腺腫の粘膜下層には正常絨毛および小型腺腫の粘膜下層には認められない大型の血管が分布しており、その血管の面積和はC群に比してT群は有意に減少していた。VEGF の発現は小型腺腫、大型腺腫ともに粘膜固有層と粘膜下層の間質細胞に認められた。また大型腺腫下の粘膜下層に著しい VEGF 陽性間質細胞の集族を認めた。この VEGF 陽性細胞の分布は Mϕ の分布に一致していた。大型腺腫下の粘膜下層における全間質細胞中の VEGF 陽性率はC群に比してT群は有意に低いものであり、VEGF mRNA

の発現においてもT群ではC群に比して有意に抑制されていた。COX-2の分布もまたMφの分布に一致していた。

〔考察〕

COX-2阻害により大型腺腫の発生数は抑制されたが小型腺腫の発生に影響はなかった。このことは諸家の報告に類似してCOX-2が腺腫形成のpromotion/progressionにより強く関わっていることが示唆された。COX-2阻害が細胞増殖の抑制とアポトーシス誘導を引き起こすことは報告されているが我々の実験ではアポトーシスの増強に関わらず細胞増殖に影響は認めなかった。我々の実験においてCOX-2阻害剤の投与量が細胞増殖を抑制するのに不十分だった可能性が考えられるが、いずれにしても、COX-2のアポトーシスに与える影響は細胞増殖よりも感受性が高いことになる。悪性腫瘍においてBcl-2がCOX活性に影響されると報告されているが、我々のモデルの腺腫細胞ではBcl-XがCOX-2阻害により発現が抑制された。我々はすべてのアポトーシス経路を検証したわけではないが、少なくともBcl-Xを介した調節経路がCOX-2により影響を受けていることが示唆された。

血管新生は前癌病変においても腫瘍の進展に重要な役割を持つことが報告されている。我々の実験においてVEGFおよびCOX-2の分布に一致して大型腺腫下の粘膜下層に血管の発達を認め、COX-2阻害により大型腺腫下の粘膜下層の血管の発達とVEGFの発現が有意に抑制された。これらの所見はCOX-2阻害による腺腫形成の抑制においては大型腺腫の粘膜下層における血管新生の抑制が重要であることを示唆している。

〔結論〕

選択的COX-2阻害剤の投与はAPC変異マウスの腺腫形成過程の比較的早期からアポトーシスを増強し、腺腫の発達に伴い粘膜下層の血管の発達を抑制した。

論文審査の結果の要旨

申請者らの研究はFAP(家族性大腸腺腫症)モデルマウス$APC^{\triangle 474}$(以下△474)を用いて、選択的COX-2抑制薬JTE-522の腫瘍抑制作用を検討した研究である。APCのマウスモデルを用いた、NSAIDS(非ステロイド性抗炎症剤)の効果をみた仕事はすでにいくつかあるが、△474にJTE-522を投与した研究は世界で2番目のものであり、以下のような実験を行い、腺腫増大抑制機構について、詳細かつ新規の知見を得て新しい提言をしている。

〔方法〕

申請者はまず、APC△474マウスに第4週齢から選択的COX-2阻害剤(JTE-522)混餌飼料(T群、15匹)および標準飼料(C群、15匹)を投与した。第12週齢に小腸を摘出し近位10cmを連続的に組織学的検索に使用した。ポリープを光学顕微鏡下で形態的に小型腺腫(正常絨毛上皮内に存在し、直径300μm以下)、大型腺腫(正常絨毛の構造が破綻し、直径が300μmより大)の二つのステージに分類し、発生数をつぶさに数え、さらに増殖細胞核抗原標識index(PCNA I.)、apoptotic index(A.I.)を算出し、Bcl-2、Bcl-X、Bax、COX-2、血管内皮増殖因子(VEGF)の発現および血管内皮、マクロファージ(Mφ)の分布を免疫染色により観測した。血管の発達を評価するために腺腫中の血管密度の計測と腺腫下粘膜下層の血管断面積総和

を免疫染色標本より計測した。また、残りの遠位小腸より大型腺腫を回収し、ノザンブロッティング法にて Bcl-2、Bcl-xL、Bax、VEGF mRNA 発現を測定した。

〔結果〕

T 群の大型腺腫の発生数は C 群に比して有意に減少したが、小型腺腫の発生数は両群間に差を認めなかった。腺腫上皮細胞の PCNA I. は小型腺腫、大型腺腫ともに両群間に有意差を認めなかった。小型腺腫、大型腺腫ともに T 群の A.I. は C 群の約 2 倍であった。Bcl ファミリーについて免疫染色では腺腫上皮細胞に Bcl-2の発現はなく、Bcl-X は小型腺腫、大型腺腫ともに不均一に発現を認めた。Bcl-X. を強発現している細胞の比率は C 群に比して T 群は有意に低いものであった。Bax は小型腺腫、大型腺腫ともに正常絨毛上皮細胞と同程度の均一な発現を認め、両群間に有意差は認めなかった。ノザンブロッティング法においても T 群の Bcl-xL mRNA の発現は C 群に比して有意に少なかった。粘膜固有層の血管密度は小腺腫、大型腺腫ともに正常絨毛の血管密度に近似しており、両群間に有意差を認めなかった。しかし、大型腺腫の粘膜下層には正常絨毛および小型腺腫の粘膜下層には認められない大型の血管が分布しており、その血管の面積和は C 群に比して T 群は有意に減少していた。VEGF の発現は小型腺腫、大型腺腫ともに粘膜固有層と粘膜下層の間質細胞に認められた。また大型腺腫下の粘膜下層に VEGF 陽性間質細胞の集簇を認めた。この VEGF 陽性細胞の分布は Mφ の分布に一致していた。大型腺腫下の粘膜下層における全間質細胞中の VEGF 陽性率は C 群に比して T 群は有意に低いものであり、VEGF mRNA の発現においても T 群では C 群に比して有意に抑制されていた。COX-2の分布もまた Mφ の分布に一致していた。

申請者はこれらの結果より以下のように解釈、考察している。

COX-2阻害剤により大型腺腫の発生数は抑制されたが小型腺腫の発生に影響はないという所見は Cox-2阻害剤が腺腫の発生よりも成長により強く抑制効果を持つことを示唆する。COX-2の阻害により細胞増殖抑制とアポトーシス誘導を来すことが報告されていて、申請者もそのような結果を期待したが、アポトーシスの増強にかかわらず細胞増殖への影響は検出できなかった。この実験における COX-2阻害剤の投与量がアポトーシス誘導には充分でも、細胞増殖抑制には不充分な投与量だったのかもしれない。申請者のモデルの腺腫細胞では Bcl-X が COX-2阻害により発現が抑制されたので、Bcl-X を介したアポトーシス調節経路が COX-2阻害により影響を受けていることは示された。

この実験において VEGF および COX-2の分布に一致して大型腺腫下の粘膜下層に血管の発達を認め、さらにマクロファージの集簇像とその COX-2産生を同定し得たことが、阻害剤によって大型腺腫下の粘膜下層の血管の発達や VEGF の発現が抑制されるという仮説を検証する上でもっとも重要である。これらの所見は COX-2の阻害による腺腫形成の抑制機構において大型腺腫の粘膜下層における血管新生の抑制の重要性をはじめて指摘したものである。

以上の申請者の研究内容について審査委員会では以下のような質問および議論があった。

1) JTE-522を投与したときに水、食餌の摂取量、体重の変化などは影響されなかったか
2) JTE-522の投与量を決めた根拠
3) マウスの genotype を決めた際、APC 遺伝子以外の多型などはなかったか
4) △474に発生する腫瘍の分布とくに小腸近位側と遠位側について

5) 観察した標本は1例あたり何枚くらいになったか
6) 小さい腺腫で、表層の正常上皮の破綻がみられたものはあったか
7) アポトーシス関連の指標について期待していた所見はなにか
8) Bcl-x の labelling index の腺腫の大小による差はあったか
9) 末梢部の血管数や面積の違いはなかったのか
10) このモデルで、腺腫が自然消失することはあるのか
11) 大型腺腫基部にみられたマクロファージの集族という所見は他の APC モデルマウスでもみられるのか
12) 血管をカウントする際、リンパ管とどう区別したか

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

論文審査担当者　主査　椙村春彦
副査　浦野哲盟　副査　峯田周幸