

## 学位論文の内容の要約

氏名	渡邊 健太
学位の種類	博士 (生命科学)
学府又は研究科・専攻	大学院工学府 共同先進健康科学専攻
指導を受けた大学	東京農工大学
学位論文題目	がんの転移におけるプロスタグランジン E2 の役割とその受容体を標的としたがん転移治療薬の研究

## 【論文の内容の要約】

プロスタグランジン E2 (PGE2) は強力な生理活性物質であり、炎症や発熱、骨代謝などに関与することが知られている。誘導性の PGE2 は、誘導型 PGE2 合成酵素である COX-2 と mPGES-1 によりアラキドン酸から合成される。細胞外に分泌された PGE2 は、PGE2 受容体である EP1-EP4 に結合することでそのシグナルを伝達する。

骨組織では、骨形成と骨吸収のバランスが保たれており、これを骨リモデリングと呼ぶ。骨吸収を担う破骨細胞は、単球・マクロファージが分化した細胞であり、その分化には骨芽細胞が発現する RANKL が必須である。悪性黒色腫や前立腺がん、乳がんなどは高率に骨転移して骨代謝異常を導く。がんの骨転移は、病的骨折や骨痛を引き起こし、患者の生活の質 (QOL) を著しく低下させる。

がんの腫瘍形成には血管新生が重要である。がん細胞は近傍の血管から拡散した酸素や栄養を利用することで増殖して腫瘍を形成するが、腫瘍の増大に伴い、低酸素・低栄養状態に陥る。そのような条件下において、がん細胞は血管新生誘導因子である VEGF-A や bFGF を産生することで血管新生を誘導し、腫瘍へ血管を引き入れて酸素や栄養を取り込むことでさらに増殖する。

当研究室では、骨転移巣におけるがん細胞と宿主の細胞間接触が、骨芽細胞の PGE2 産生を誘導し、骨破壊を惹起することを報告している。しかし、その詳細なメカニズムや PGE2 のがん転移への影響は未だ不明である。そこで本研究では、誘導型の PGE2 合成酵素である mPGES-1 のノックアウトマウスを用いて、PGE2 のがん転移における役割を検討し、PGE2 受容体である EP 受容体のアンタゴニストのがん治療薬としての可能性を検討した。

はじめに、マウス悪性黒色腫細胞 (B16) と mPGES-1 ノックアウトマウスを用い、宿主由来 PGE2 の転移・骨破壊への関与を検討した。はじめに、B16 細胞をマウス尾静脈に移入し、大腿骨、肺、腎臓、肝臓への転移を検討した。その結果、野生型マウスにおいて B16 細胞の転移が認められたが、mPGES-1 ノックアウトマウスにおいてその転移結節数は有意に減少していた。DXA 及び  $\mu$ CT を用いて骨組織の詳細な解析を行ったところ、B16 細胞が転移した野生型マウス的大腿骨において、骨破壊及び骨吸収の促進が認められたが、mPGES-1 ノックアウトマウス的大腿骨ではそれらの変化は認められなかった。そこで骨内の PGE2 濃度を測定したところ、野生型マウス的大腿骨では B16 細胞の転移により PGE2 産生が顕著に増加していたが、mPGES-1 ノックアウトマウス的大腿骨では PGE2 産生の誘導は認められなかった。次に *In vitro* の解析を行った。野生型マウス由来の骨髄細胞及び骨芽細胞を固定 B16 細胞と共培養し、破骨細胞形成実験を行ったところ、破骨細胞の形成が認められた。一方、mPGES-1 ノックアウトマウス由来の骨髄細胞及び骨芽細胞を用いて同様に検討したところ、破骨細胞の形成は認められなかった。同実験において、破骨細胞形成に必須の因子である RANKL と PGE2 合成酵素の mRNA 発現及び培養上清中の PGE2 濃度を測定したところ、野生型マウス由来の細胞では固定 B16 細胞との共培養により

RANKL と mPGES-1 の mRNA 発現および PGE2 産生が亢進していたが、mPGES-1 ノックアウトマウス由来の細胞ではいずれも変化しなかった。B16 細胞の転移・骨破壊に宿主由来の PGE2 の関与が示唆されたことから、B16 細胞の転移モデルマウスにおいて EP1-EP4 アンタゴニストの影響を検討した。その結果、EP4 アンタゴニストの投与により、B16 細胞の転移が顕著に抑制された。以上の結果より、B16 細胞の誘導する宿主細胞の PGE2 産生には mPGES-1 が必須であり、産生された PGE2 は EP4 を介して転移・骨破壊を促進することが示唆された。

次に、マウス悪性黒色腫細胞 (B16) と mPGES-1 ノックアウトマウスを用い、宿主由来 PGE2 の腫瘍形成への関与を検討した。B16 細胞をマウスの皮下に移入して腫瘍形成実験を行ったところ、mPGES-1 ノックアウトマウスにおいて、B16 細胞の腫瘍形成が有意に抑制されていた。がん細胞の腫瘍形成には血管新生が必須であり、血管新生への PGE2 の関与が示唆されていることから、血管新生に着目して検討を行った。血管を検出する蛍光プローブと In vivo imager を用いて、皮下腫瘍または転移先臓器の血管新生を検出したところ、野生型マウスの皮下腫瘍や転移先臓器で強い蛍光シグナルが認められた。一方、mPGES-1 ノックアウトマウスにおける皮下腫瘍や転移先臓器における蛍光シグナルは微弱であった。血管新生を誘導する宿主細胞として野生型または mPGES-1 ノックアウトマウスの皮膚より線維芽細胞を回収し、検討を行った。野生型マウス由来の線維芽細胞と固定 B16 細胞を共培養したところ、PGE2 産生の亢進が認められたが、mPGES-1 ノックアウトマウス由来の線維芽細胞においては、固定 B16 細胞との共培養による PGE2 産生誘導がほとんど認められなかった。次に、それぞれの細胞に PGE2 を添加し、血管新生に関連する VEGF-A と bFGF mRNA 発現及び培養上清中の濃度を測定した。その結果、どちらの細胞においても PGE2 添加により VEGF-A と bFGF の mRNA 発現及び産生が上昇したが、誘導後の発現強度及び濃度を比較すると、mPGES-1 ノックアウトマウス由来の細胞の方が低かった。VEGF-A 及び bFGF 産生に関与する PGE2 受容体を特定するために、野生型マウス由来の線維芽細胞に対して PGE2 と EP1-EP4 アンタゴニストの併用添加を行った。その結果、PGE2 による VEGF-A 産生誘導は、EP4 アンタゴニストにより有意に抑制された。最後に、野生型マウスにおける B16 細胞の皮下腫瘍形成に対して EP4 アンタゴニストを投与したところ、B16 細胞の腫瘍形成は顕著に抑制された。以上の結果より、B16 細胞の腫瘍形成には宿主細胞の mPGES-1 を介した PGE2 産生による血管新生が重要であることが示唆された。

最後に、ヒトの前立腺がん細胞 (PC3) を用いて EP4 アンタゴニストの効果を検討した。ルシフェラーゼ発現 PC3 細胞の転移モデルマウスに EP4 アンタゴニストを投与し、転移・骨破壊への影響を検討した。In vivo imager を用いた生体発光イメージングにより PC3 細胞の転移を検討したところ、EP4 アンタゴニストの投与により転移の抑制が認められた。さらに骨組織を組織切片と  $\mu$ CT により解析したところ、PC3 細胞の骨転移により破骨細胞数の増加と骨吸収の亢進が認められたが、これらは EP4 アンタゴニストの投与により抑制されていた。次に In vitro での解析を行ったところ、固定 PC3 細胞との共培養により骨芽細胞の PGE2 産生、PGE2 合成酵素及び RANKL mRNA 発現の誘導が認められた。PC3 細胞により誘導された RANKL mRNA 発現は、EP4 アンタゴニストにより有意に抑制された。PC3 細胞は EP2 及び EP4 を発現していたが、In vitro では細胞増殖に対する PGE2 及び EP4 アンタゴニストの影響は認められなかった。最後に、In vivo での PC3 細胞の皮下腫瘍形成実験に EP4 アンタゴニストを投与したところ、PC3 細胞の腫瘍形成が抑制された。以上の結果より、ヒトのがん細胞においても EP4 アンタゴニストが転移・骨破壊・腫瘍形成を抑制することが示唆された。

本研究により、がん細胞と宿主細胞の細胞間接触は、宿主細胞の mPGES-1 を介して PGE2 産生を亢進し、産生された PGE2 はオートクライン的に宿主細胞の EP4 に結合して、RANKL や VEGF-A、bFGF 発現を誘導することでがん細胞の転移・骨破壊や血管新生、腫瘍形成を誘導することが示唆された。よって、EP4 アンタゴニストのがん転移治療薬としての応用が期待される。