

## 論文の内容の要旨

論文題目

# Cyclooxygenase-2 (COX-2)阻害剤による 腫瘍リンパ管新生の抑制

指導教員 上西 紀夫 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻 岩田 要

### § 研究の背景

癌のリンパ行性転移は多くの癌で予後決定因子の一つであり、リンパ行性転移を制御できれば予後改善につながることを期待される。従来リンパ行性転移は、組織に存在する既存のリンパ管に対して癌細胞が一方向的に侵襲してゆく現象と理解されていたが、近年のリンパ管研究の発展により、癌組織中のリンパ管自体も密度や形状が変化して癌細胞を受け入れやすくなっていることが明らかにされてきた。そして、癌組織に新たにリンパ管が誘導される現象、すなわち腫瘍リンパ管新生がリンパ行性転移を促進することがヒトの病理標本の検討あるいは動物実験により明らかにされてきたことから、腫瘍リンパ管新生がリンパ行性転移を抑制する際の標的になることが示唆されてきた。

リンパ管新生の機序でこれまで中心的に解析されてきたのは、リンパ管誘導因子である Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C、VEGF-D と、その受容体として主にリンパ管内皮細胞に発現する VEGF receptor-3 (VEGFR-3) を介した経路である。多くの種類の癌組織において VEGF-C や VEGF-D が高発現していることが観察され

ている。そして、癌組織においては癌細胞のみならず癌間質へ動員されてくる炎症細胞とくにマクロファージも VEGF-C や VEGF-D を産生して腫瘍リンパ管新生を促進していることが明らかになってきた。このことは、腫瘍リンパ管新生を制御する手段の一つとして炎症の制御が有用であることを示唆している。

Cyclooxygenase-2 (COX-2)は炎症の局所に誘導され炎症性プロスタノイドを産生する酵素として当初同定されたが、さらに COX-2 が炎症に限らず多くの前癌病変や癌組織にも発現しており、発癌や癌の進行へ促進的に働くことが報告されてきた。そして COX-2 が癌の進行を促進する機序の一つは、COX-2 が癌血管新生を誘導することであるということが解明されてきた。ところが、このように COX-2 と血管新生の関係が注目されてきたこととは対照的に、COX-2 とリンパ管新生の関係を直接的に示した報告はこれまで存在しない。

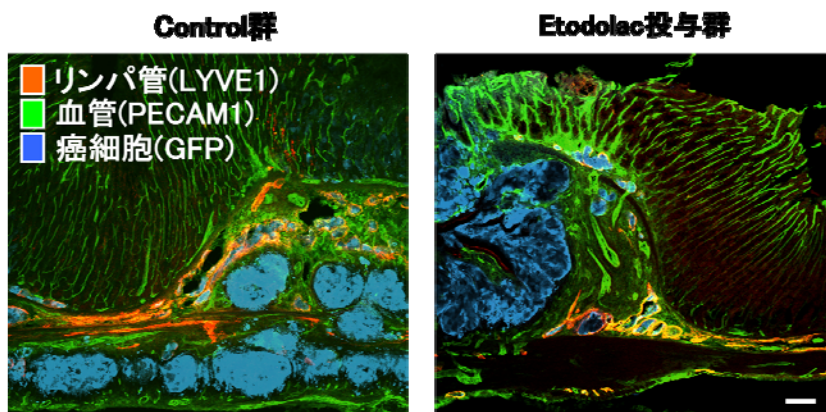
そこで本研究では、COX-2 とリンパ管新生の関係を調べるために、COX-2 選択的阻害剤 Etodolac (商品名:ハイペン)を複数の動物モデルに対して使用した際のリンパ管新生への影響を検討した。さらに、COX-2 がリンパ管新生へ関わる機序について *in vitro* での検討もあわせて行った。

## § 方法と結果

### 《*in vivo* による検討》

Etodolac のリンパ管新生への影響について、3 つの動物モデルを用いて検討した。

第 1 は「リンパ節転移モデル」である。ヌードマウスの胃壁にヒトスキルス胃癌細胞 OCUM-2MLN を同所移植すると、4 週間後には同所移植巣にリンパ管新生が著しく誘導されるとともに所属リンパ節に転移を認める。また同所移植巣には多数のマクロファージの集積を認める。このモデルを用い、Etodolac 投与群(移植直後から 4 週間にわたり、Etodolac を 500 ppm の濃度で混餌して経口投与)と Control 群とを比較した(図 1)。リンパ管新生の指標として同所移植巣の腫瘍リンパ管密度を定量化すると、Etodolac 投与群は Control 群と比較してリンパ管密度が抑制された。また、リンパ節転移の指標として転移リンパ節総重量を計測すると、Etodolac 投与群は Control 群と比



**図1** リンパ節転移モデルの胃壁同所移植巣における腫瘍リンパ管および腫瘍血管 GFP 陽性 OCUM-2MLN 細胞(青色)の周囲に腫瘍リンパ管(LYVE-1、橙色)と腫瘍血管(PECAM-1、緑色)が密集している。Etodolac 投与群では Control 群と比較し、腫瘍リンパ管の密度が低い。スケール:50  $\mu\text{m}$ 。

較して転移リンパ節総重量が減少した。

第 2 は「癌性腹膜炎モデル」(新規モデル)である。ヌードマウスにヒトスキルス胃癌細胞 OCUM-2MLN を腹腔注すると 2 週間後に癌性腹膜炎をきたし、横隔膜には著しいリンパ管新生が誘導される。このモデルを用い、Etodolac 投与群と Control 群を比較した。リンパ管新生の指標として横隔膜胸腔側のリンパ管の出芽 sprout の数を定量化すると、Etodolac 投与群は Control 群と比較して出芽数が抑制された。

第 3 は「慢性無菌性腹膜炎モデル」(新規モデル)である。正常の免疫能をもつ BALB/c マウスに対し、腹膜炎を惹起するためにチオグリコレート培地を反復的に腹腔投与すると(2 週間にわたり計 6 回)、2 週間後には横隔膜腹腔側に炎症性のプラークが形成され、このプラークに向かって横隔膜リンパ管からリンパ管の侵入を認める。また炎症性プラークにはマクロファージの集積を認める。このモデルを用い Etodolac 投与群と Control 群を比較した。リンパ管新生の指標として炎症性プラーク内に新生するリンパ管密度を定量化すると、Etodolac 投与群は Control 群と比較してリンパ管密度が抑制された。

以上 3 つのモデルの結果はいずれも、Etodolac が in vivo においてリンパ管新生を抑制することを示している。

## 《in vitro による検討》

Etodolac がリンパ管新生を抑制する機序を明らかにするために、リンパ管新生に関わる可能性のある細胞、すなわちマクロファージ、リンパ管内皮細胞、および OCUM-2MLN 細胞に対する Etodolac の影響を in vitro で検討した。

マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 を lipopolysaccharide (LPS) で刺激すると、24 時間後に COX-2 および VEGF-C が発現誘導される。このとき LPS 刺激とともに Etodolac を添加すると、VEGF-C の発現誘導が Etodolac の濃度依存的に抑制された (図 2)。この結果は、Etodolac がマクロファージからの VEGF-C 産生の抑制を介してリンパ管新生を抑制していることを示唆している。

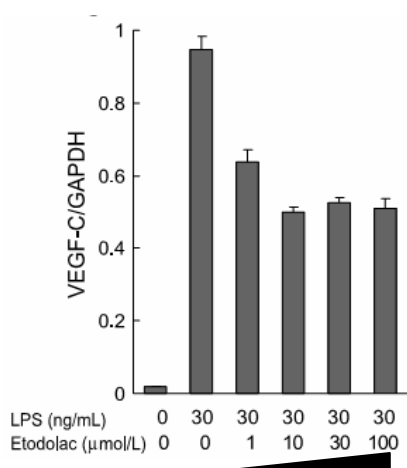


図 2 マクロファージの VEGF-C 発現 (定量的 PCR)

マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 を LPS 刺激すると、VEGF-C の発現が亢進する。このとき Etodolac を添加すると、Etodolac の濃度依存的に VEGF-C の発現亢進が抑制された。

ヒトリンパ管内皮初代培養細胞 Human dermal lymphatic microvascular cell (HDLEC) を LPS 刺激すると、24 時間後に COX-2 が発現誘導される。LPS 刺激とともに Etodolac を添加して VEGFR-3 の発現を検討したが、VEGFR-3 の発現レベルに変化は見られなかった。

また、HDLEC の増殖性を調べると HDLEC は LPS 刺激により増殖促進する。LPS 刺激とともに Etodolac を添加すると、LPS による HDLEC の増殖促進が抑制された。この結果は、Etodolac がリンパ管内皮細胞の増殖を抑制することによりリンパ管新生の抑制にはたらいていることを示唆している。

ヒトスキルス胃癌細胞 OCUM-2MLN 自身には VEGF-C および VEGF-D の発現を認めなかった。また、OCUM-2MLN の増殖性について検討したが、Etodolac は OCUM-2MLN の増殖に影響しなかった。

以上の in vitro による検討の結果は、in vivo で Etodolac がリンパ管新生を抑制する機序の少なくとも一部は、腫瘍内マクロファージからの VEGF-C 産生の抑制、および腫瘍リンパ管内皮細胞の増殖抑制であることを示唆している。

## § 本研究の意義

これまで COX-2 と血管新生の関係については詳細に調べられてきたが、COX-2 とリンパ管新生の関係を直接的に示した報告は存在しなかった。そこで本研究では、COX-2 選択的阻害剤 Etodolac のリンパ管新生への影響について検討した。その結果、Etodolac にはリンパ管新生を抑制し、リンパ節転移を抑制する効果があることが明らかとなった。

本研究では、リンパ管内皮特異的抗体を使用してリンパ管を同定するとともに、癌細胞に GFP を発現させて可視化することによって、腫瘍リンパ管新生およびリンパ行性転移を詳細に観察した。さらに、横隔膜リンパ管を横隔膜のホールマウント染色で評価する新規モデルを樹立してリンパ管新生を評価することにより、リンパ管新生の評価を組織切片で行う場合に潜在する再現性の問題を克服できたと考えられる。

また本研究は、消炎鎮痛剤として古くから臨床で使用されている Etodolac に腫瘍リンパ管新生およびリンパ節転移を抑制する効果のあることを動物実験で確認できたことから、実際にどのような対象患者に使用すべきかの検討は要するものの、この効果を臨床応用することが今後期待される。