

氏 名	うえの やま よし と 上 野 山 義 人
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2972 号
学位授与の日付	平 成 18 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Hypoxia induced by benign intestinal epithelial cells is associated with cyclooxygenase-2 expression in stromal cells through AP-1-dependent pathway (腸管上皮細胞の誘導する局所的低酸素状態は、AP-1 経路を介して間質細胞の COX-2 発現に関与する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 野 田 亮 教 授 淀 井 淳 司 教 授 武 藤 誠

論 文 内 容 の 要 旨

大腸腫瘍進展の初期過程において Cyclooxygenase-2 (COX-2) は、しばしば腫瘍の間質に腫瘍の大きさ依存性に発現し、血管新生等を介して腫瘍増大に寄与する。しかし、COX-2 が間質に発現誘導される機序には不明の点が多い。申請者らは今回、大腸腫瘍の進展過程における腸管上皮細胞と間質細胞の相互作用がもたらす COX-2 誘導の機構を、*in vitro* の共培養系を用いて検討した。

良性腸管腫瘍のモデルとして Intestine-407 細胞を、悪性腸管腫瘍のモデルとして DLD-1, Caco-2 細胞を使用し、間質細胞のモデルとして線維芽細胞 NIH3T3 を使用した。腫瘍の進展に伴い腸管上皮細胞の密度が増加すると仮定し、「疎」(腫瘍がごく小さい状態)あるいは「密」(腫瘍が大きい状態)な各腸管上皮細胞と線維芽細胞の共培養を試みた。すなわち「疎」では 5×10^3 個の、「密」では 2×10^6 個の腸管上皮細胞を、底面に透過性を有する膜を持つインサート内で24時間培養した後、 4×10^4 個の線維芽細胞と更に24時間共培養して線維芽細胞での COX-2 蛋白発現を検討した。また各腸管上皮細胞が産生する液性因子を網羅的遺伝子発現解析および ELISA 法によって測定した。さらに線維芽細胞直近の溶存酸素分圧 (pO_2) を種々の条件下で測定し、 pO_2 が線維芽細胞での COX-2 蛋白発現や各種転写因子に与える影響を検討した。

線維芽細胞における COX-2 蛋白の発現は、全ての「密」な腸管上皮細胞との共培養により増強した。網羅的遺伝子発現解析及び ELISA 法から、「密」な悪性腸管上皮細胞 DLD-1 からは多量の IGF-II, IFN- γ , TGF- β II, EGF, Amphiregulin の産生が認められ、それらの液性因子が線維芽細胞の COX-2 蛋白発現に影響した可能性が考えられた。しかし良性腸管上皮細胞 Intestine-407 細胞からは微量の IL-1 β と Amphiregulin の産生を認めたに過ぎず、液性因子以外の影響も考えられた。そこで共培養系での線維芽細胞直近の pO_2 を測定すると、Intestine-407 細胞との共培養では、 pO_2 は「疎」で 17.2% に対し、「密」では 12.8% と低下していた。同様に DLD-1 細胞でも pO_2 は「疎」で 16.2% に対し、「密」では 11.0% と低下していた。興味深いことに、「密」な共培養系を穏やかに振盪し、線維芽細胞直近の低酸素状態を「疎」と同等程度へ改善すると、「密」な良性上皮細胞 Intestine-407 との共培養系では、線維芽細胞の COX-2 蛋白発現が減弱した。一方「密」な悪性上皮細胞 DLD-1 との共培養系では、COX-2 蛋白発現の減弱はみられなかった。これらの結果から良性腸管上皮細胞と線維芽細胞の共培養では、主に低酸素状態が線維芽細胞の COX-2 発現誘導に関与し、悪性腸管上皮細胞と線維芽細胞の共培養では、上記の成長因子やサイトカイン等が溶存酸素分圧の影響を凌駕したものと考えられた。さらに種々の低酸素環境で線維芽細胞の COX-2 発現を誘導する転写因子を検討したところ、AP-1 の DNA 結合能が増強していた。AP-1 阻害剤である curcumin を「密」な良性腸管上皮細胞 Intestine-407 と線維芽細胞の共培養系に添加したところ、線維芽細胞の COX-2 蛋白発現が減弱することが確認された。

以上の実験により、腸管腫瘍進展の初期段階では、腸管上皮の細胞密度増加が線維芽細胞周囲に局所的低酸素状態を誘導し、転写因子 AP-1 を介して COX-2 蛋白の発現を増強させる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

大腸腫瘍の進展において Cyclooxygenase-2 (COX-2) は、腫瘍の間質に発現し、腫瘍増大に寄与するが、その発現誘導機序には不明の点が多い。本研究で申請者らは、腸管上皮と間質の相互作用による COX-2 誘導の機構を、*in vitro* の共培養系を用い検討した。

小腫瘍を擬し「疎」あるいは大腫瘍を擬し「密」な密度の良性あるいは悪性上皮細胞と線維芽細胞を共培養した。線維芽細胞での COX-2 蛋白の発現は、全ての「密」な条件で増強した。「密」な悪性上皮細胞は多量の成長因子やサイトカインを産生していたが、良性上皮細胞からは微量に過ぎず、これら液性因子以外の影響も考えられた。線維芽細胞直近の溶存酸素分圧 pO_2 は、いずれの共培養でも、「疎」に対し、「密」で有意に低下していた。興味深いことに、「密」における低酸素状態を「疎」と同等に改善すると、良性上皮細胞との共培養系でのみ、線維芽細胞の COX-2 発現が転写因子 AP-1 と関連して減弱した。良性上皮細胞との共培養では、主に低酸素状態が線維芽細胞の COX-2 発現誘導に関与し、悪性上皮細胞との共培養では、液性因子が溶存酸素分圧の影響を凌駕したものと考えられた。

以上の結果から、腸管腫瘍進展の初期段階では、腸管上皮の細胞密度増加が線維芽細胞周囲に局所的低酸素状態を誘導し、転写因子 AP-1 を介して COX-2 蛋白の発現を増強させる可能性が示唆された。

以上の研究は大腸における腫瘍進展機序の解明に貢献し、大腸腫瘍の予防及び治療に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成18年2月13日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。