

論文の内容の要旨

氏名：田村 大

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：イヌ乳腺腫瘍細胞におけるセレコキシブの抗腫瘍作用の解析

イヌ乳腺腫瘍は、未避妊の雌イヌで最も多く認められる腫瘍であり、全症例の約 50%が悪性と診断される。さらに悪性症例の約半数では、再発および転移の可能性が極めて高く、予後が不良なことが知られている。一般的に、従来の抗腫瘍薬を用いた化学療法の効果は限局的であり、有効な化学療法は未だに確立されていない。

シクロオキシゲナーゼ (COX) はアラキドン酸から PGE₂ などのプロスタグランジン類などの生成を触媒する酵素である。COX には、COX-1 と COX-2 の 2 つのアイソザイムが知られており、構成型酵素である COX-1 は生体の恒常性維持に深く関与している。一方、誘導型酵素である COX-2 は各種炎症刺激や発がんプロモーターなどによって発現が誘導される。そのため、多くの正常組織では COX-2 の発現量は極めて低く抑制されているが、がん組織などでは COX-2 の過剰発現が認められる。また、イヌにおいても同様の所見が認められ、乳腺腫瘍の悪性度が高いほど COX-2 発現量が増加することが知られている。このような理由により、COX-2 はイヌ乳腺腫瘍における治療標的分子と想定できると共に、セレコキシブなどのコキシブ系薬物に代表される COX-2 を選択的に阻害する非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) の抗腫瘍作用についても注目が集まっている。

本研究では、イヌ乳腺腫瘍におけるセレコキシブの有用性を検討することを目的とし、イヌ乳腺腫瘍細胞におけるセレコキシブの抗腫瘍作用およびそのメカニズムを検討した。

第 1 章 イヌ乳腺腫瘍細胞におけるセレコキシブの COX-2 非依存的な増殖抑制作用の検討

ヒト乳がんやイヌ乳腺腫瘍の多くの症例では、悪性度の高さに伴い COX-2 発現量が増加する傾向が認められるが、一部の症例ではこのような変化が認められないものが存在している。これまでに、ヒト由来のがん細胞を用いた研究結果から、セレコキシブは COX-2 活性阻害に基づく COX-2 依存的なメカニズムを介して抗腫瘍作用を示すのみならず、COX-2 非依存的な抗腫瘍作用メカニズムを有することも報告されている。そこで、本研究では、イヌ乳腺腫瘍においてセレコキシブが COX-2 非依存的な抗腫瘍作用を示すか否かについて検討した。

セレコキシブによるイヌ乳腺腫瘍細胞株である AZACB 細胞における細胞増殖抑制作用の有無を検討するために、最終濃度 0 ~ 100 μ M の濃度のセレコキシブを 24 時間作用させ、細胞増殖能へ及ぼす影響を WST-8 assay を用いて評価した。その結果、100 μ M のセレコキシブでのみ、有意な細胞増殖抑制作用が認められた。そこで、この細胞増殖抑制作用がセレコキシブによる COX-2 阻害作用に依存した作用であるか否かを検討するために、培養上清中の PGE₂ 濃度を測定した。その結果、セレコキシブは starvation medium および growth medium のいずれの培養条件下においても培養上清中の PGE₂ 産生量に著明な影響を与えなかった。より詳細にセレコキシブによる細胞増殖抑制作用を解明するため、各細胞周期の細胞数を解析した。その結果、セレコキシブ (100 μ M) は G0/G1 arrest および G2/M arrest を誘導し、S 期細胞数を減少させた。細胞周期の進行には、cyclin-dependent kinase (CDK) と細胞周期を負に制御する cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) の相互作用が重要であることが知られているので、CDKI として作用し、セレコキシブが COX-2 非依存的

な抗腫瘍作用を発現するための標的分子でもある p21 および p27 の発現量を解析した。その結果、セレコキシブには p21 および p27 の mRNA 量およびタンパク量を増加させる作用が認められた。さらに、セレコキシブによる AZACB 細胞の増殖抑制作用が COX-2 非依存的に発現するの否かを明らかにするために、COX-2 阻害活性を欠いたセレコキシブの構造異性体である 2, 5-dimethyl-celecoxib (DMC) の細胞増殖能への影響について検討した。その結果、DMC は 40 μ M 以上の濃度で、AZACB 細胞において有意な細胞増殖抑制作用を示した。さらに、別のイヌ乳腺腫瘍細胞株である CF33 細胞においても、同様の細胞増殖抑制作用が認められた。

以上の結果より、セレコキシブはイヌ乳腺腫瘍細胞において、COX-2 非依存的なメカニズムを介した細胞増殖抑制作用を示す可能性が示唆された。

第 2 章 イヌ乳腺腫瘍細胞におけるセレコキシブのアポトーシス誘導作用の検討

本研究では、セレコキシブが示した細胞増殖抑制作用にアポトーシスが関与しているか否かを検討するために、セレコキシブによるアポトーシス誘導作用について解析した。

アポトーシスでは DNA の断片化が認められるため、PI 染色を行い断片化した DNA をフローサイトメーターで解析することにより、セレコキシブによるアポトーシス誘導作用を評価した。その結果、セレコキシブ (100 μ M) は AZACB 細胞において著明なアポトーシス誘導作用を示し、このアポトーシス誘導作用は時間依存的に生じることが明らかとなった。

セレコキシブによる Bcl-2 ファミリー分子への影響を評価するため、アポトーシス促進分子である Bax および Bim、アポトーシス抑制分子である Bcl-2 への発現量をリアルタイム PCR 法および western blotting 法を用いて解析した。その結果、セレコキシブでは Bax および Bim 発現量の増加および Bcl-2 発現量の減少を引き起こした。さらに、セレコキシブがミトコンドリア外膜の透過性変化に及ぼす影響について、ミトコンドリアに特異的に取り込まれる蛍光色素である tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) を作用させた細胞をフローサイトメーターで解析した。その結果、100 μ M 濃度のセレコキシブは TMRE の蛍光強度を減少させ、ミトコンドリア外膜の透過性を著明に亢進させた。また、セレコキシブはアポトーシスの effector caspase である caspase-3/7 を活性化させることが明らかとなった。

以上の結果より、セレコキシブは AZACB 細胞において、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。

第 3 章 イヌ乳腺腫瘍細胞におけるセレコキシブのアポトーシス誘導メカニズムの解析

アポトーシスの誘導メカニズムは、ミトコンドリアを介した intrinsic pathway および death receptor を介した extrinsic pathway の 2 つに大別される。そこで本研究では、AZACB 細胞におけるセレコキシブのアポトーシス誘導メカニズムを明らかにすることを目的として解析を行った。

セレコキシブが AZACB 細胞において intrinsic pathway または extrinsic pathway のいずれを介してアポトーシスを誘導しているかについて評価するため、intrinsic pathway で活性化される caspase-9 および extrinsic pathway で活性化される caspase-8 の活性についてルミノメーターを用いて解析した。その結果、セレコキシブは caspase-9 および caspase-8 のいずれも活性化することが明らかとなった。そこで、caspase-9 の特異的阻害剤である Z-LEHD-FMK または caspase-8 の特異的阻害剤である Z-IETD-FMK をそれぞれ最終濃度 20 μ M で 1 時間前処理した AZACB 細胞に、セレコキシブを作用させ、アポトーシスへの影響を評価した。そ

の結果、セレコキシブによる caspase-9 または caspase-8 の活性化が各阻害剤により完全に阻害されているにも関わらず、セレコキシブのアポトーシス誘導作用は部分的にしか阻害されなかった。

次に、このアポトーシス誘導作用が部分的にのみ阻害された理由について解析を行った。近年、intrinsic pathway と extrinsic pathway をクロストークする分子として Bid が注目されている。Bid は活性化した caspase-8 により切断されて生じる truncated-Bid (t-Bid) がミトコンドリア膜の透過性を亢進させ、intrinsic pathway を活性化させることが明らかにされている。そこで、セレコキシブによるアポトーシス誘導作用に t-Bid が関与しているかどうかについて、セレコキシブによる Bid の切断と t-Bid の産生について western blotting 法で評価した。その結果、セレコキシブは Bid の切断の亢進と、それに伴う t-Bid の量的増加を引き起こすことが明らかとなった。

以上の結果より、セレコキシブによるアポトーシス誘導作用は intrinsic pathway および extrinsic pathway の両経路を介していることが示唆された。

結論

イヌ乳腺腫瘍細胞におけるセレコキシブの細胞増殖抑制作用は、COX-2 非依存的であり、p21 および p27 の発現誘導による細胞周期の停止と関係していることが示唆された。さらに、セレコキシブは intrinsic pathway および extrinsic pathway の両経路を介して、アポトーシスの effector caspase である caspase-3 および caspase-7 の活性化を引き起こし、アポトーシスを誘導することも示唆された。

本研究は、イヌ乳腺腫瘍におけるセレコキシブの抗腫瘍作用の一端を明らかにしたものである。本研究により、イヌ乳腺腫瘍においても、NSAIDs が抗腫瘍薬として有用である可能性が示唆された。