

## 論文審査の結果の要旨

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

審査委員：（主 査） 教授 五 味 浩 司  
（副 査） 教授 杉 谷 博 士  
教授 渋 谷 久

イヌ乳腺腫瘍は、不妊化手術を施していない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。悪性症例の約半数は、再発および転移の可能性が極めて高く、予後不良である。一般的に、外科的切除が治療法の第一選択とされる場合が多いが、一方で、従来の抗腫瘍薬による化学療法の効果は十分ではなく、副作用が無く、完全寛解を得るような化学療法は未だ確立されておらず、イヌ乳腺腫瘍に対する化学療法や診断マーカーの確立は、臨床獣医学的に非常に重要な課題である。

シクロオキシゲナーゼ (COX) は、アラキドン酸からプロスタグランジン類やプロスタサイクリン類の生成を触媒する酵素であり、COX-1 と COX-2 のアイソザイムが知られている。構成型酵素である COX-1 は、恒常性維持に関わっている一方、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。一般に正常組織では、COX-2 発現量は極めて低いが、各種がん組織では、過剰発現が認められる。獣医学領域においても、イヌ乳腺腫瘍において同様の所見が認められ、悪性度の高さと COX-2 発現量には正の相関があり、腺腫の 24%、腺癌の 56%で発現量の増加が認められる。このような理由から、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の抗腫瘍作用が注目されている。コキシブ系薬物の代表的薬物の一つであるセレコキシブは、様々なヒトがん細胞における抗腫瘍作用が報告されており、抗腫瘍薬として臨床応用できる可能性が最も高い薬物である。一方、ヒト由来細胞を用いたセレコキシブの抗腫瘍作用に関する最近の報告では、抗腫瘍作用は COX-2 に依存した作用のみならず、COX-2 に依存しない作用も存在することが示されている。

このような学術的背景を踏まえ、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目的で、イヌ乳腺腫瘍細胞において、セレコキシブの抗腫瘍作用とそのメカニズムを追究した。本研究論文は、セレコキシブの COX-2 非依存的な抗腫瘍作用の検討（第 1 章）、セレコキシブの抗腫瘍作用におけるアポトーシス誘導作用の検討（第 2 章）、およびセレコキシブによるアポトーシス誘導メカニズムの解析（第 3 章）からなる。

### 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。セレコキシブの抗腫瘍作用は、COX-2 活性阻害に基づく COX-2 依存的なメカニズムによるものと、COX-2 非依存的なメカニズムによるものがこれまでに報告されている。COX-2 非依存的なメカニズムでは、COX-2 阻害作用とは無関係に、サイクリン依存性キナーゼインヒビター (CDKI) である p21 や p27 の発現誘導や、3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ 1 (PKK1) やプロテインキナーゼ B (PKB/Akt) の阻害作用により、ヒトがん細

胞の増殖抑制およびアポトーシス誘導を引き起こす作用があることが示されている。そこで、本研究では、イヌ乳腺腫瘍において、セレコキシブの COX-2 非依存的な抗腫瘍作用について検討した。

イヌ乳腺腫瘍細胞株である AZACB 細胞において、セレコキシブを 24 時間作用させたところ、100  $\mu\text{M}$  濃度で有意な増殖抑制作用を認めた。また、この作用は、培養上清中で検出したプロスタグランジン E<sub>2</sub> 産生量に影響を及ぼさなかったことから、COX-2 阻害作用に依存していなかった。次に、細胞周期との関係について検討したところ、G0/G1 期停止および G2/M 期停止が誘導され、S 期にある細胞数が減少していた。そこで、細胞周期を負に制御する分子である p21 と p27 の発現量を解析したところ、これらの mRNA 量やタンパク量が增加していた。この作用は、他の COX-2 選択的阻害薬にはない、セレコキシブ特異的なものであった。さらに、COX-2 阻害活性を欠くセレコキシブ構造異性体 2, 5-ジメチル-セレコキシブの細胞増殖能を調べたところ、濃度 40  $\mu\text{M}$  以上で、有意な増殖抑制作用が検出され、COX-2 非依存的な作用であった。また、別のイヌ乳腺腫瘍細胞株である CF33 細胞においても、同様の増殖抑制作用を認めた。以上の結果から、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ことが示唆された。

## 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

化学物質の作用により、細胞が顕著な増殖抑制を示すような場合には、一般に、アポトーシスが誘導されている場合が多い。そこで、本研究では、イヌ乳腺腫瘍細胞におけるセレコキシブの増殖抑制作用にアポトーシス誘導が関与しているのかどうかについて、検討した。

アポトーシスで観察される DNA の断片化を調べるため、AZACB 細胞の核染色を行い、フローサイトメーターで解析したところ、100  $\mu\text{M}$  濃度のセレコキシブの作用により、時間依存的に著明なアポトーシスが誘導された。次に、アポトーシス誘導シグナルがミトコンドリア外膜の透過性の亢進を引き起こす伝達様式と関わっているのかについて、Bcl-2 ファミリー分子の動態をリアルタイム PCR 法とウエスタンブロット法により解析したところ、アポトーシス促進分子である Bax と Bim の発現量の増加、およびアポトーシス抑制分子である Bcl-2 の発現量の減少が認められた。これらの作用は、アポトーシス誘導作用を示さないメロキシカムやエトドラクでは検出されない、セレコキシブに特異的なものであった。また、ミトコンドリア外膜の透過性変化について、ミトコンドリア親和性蛍光色素 (TMRE) でラベルした細胞をフローサイトメーターで解析したところ、100  $\mu\text{M}$  濃度で、TMRE の蛍光強度が減少し、ミトコンドリア外膜の透過性が著明に亢進していた。さらに、セレコキシブの作用により、アポトーシスのエフェクターカスパーゼであるカスパーゼ 3 およびカスパーゼ 7 の活性化が起きていた。以上の結果から、セレコキシブは、AZACB 細胞において、アポトーシス誘導作用を示す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

セレコキシブによるアポトーシス誘導メカニズムは、ヒト由来細胞を用いた研究において、細胞種により異なることが報告されているが、イヌ乳腺腫瘍細胞におけるアポトーシス誘導メカニズムの詳細は明らかにされていない。そこで、本研究では、AZACB 細胞におけるアポトーシス誘導メカニズムの解析を行った。

アポトーシス誘導経路は、ミトコンドリアを介した内因性経路とデスレセプターを介した外因性経路の二つに大別されるが、活性化されるカスパーゼが異なることが知られており、前者では、カスパーゼ 9、後者では、カスパーゼ 8 が活性化される。AZACB 細胞において、セレコキシブがいずれの経路を介してアポトーシスを誘導しているのかについて、カスパーゼ 9 とカスパーゼ 8 の活性を解析したところ、両経路を活性化することが明らかとなった。また、カスパーゼ 9 とカスパーゼ 8 のそれぞれの特異的阻害剤 (Z-LEHD-FMK または Z-IETD-FMK) で前処理を施した AZACB 細胞にセレコキシブを作用させて、アポトーシスへの影響を評価したところ、各々のカスパーゼの活性化が完全に阻害されているにも拘ら

ず、アポトーシス誘導作用は、部分的にしか阻害されないことが分かった。そこで、この理由について、二つの経路をクロストークする分子である Bid の作用に注目し、ウエスタンブロット法により解析したところ、活性化カスパーゼ 8 の作用により生ずる Bid の切断の亢進と、それによって生ずる truncated-Bid の増加が、セレコキシブの作用特異的に起きていることが明らかとなった。以上の結果から、セレコキシブによるアポトーシス誘導作用は、内因性経路と外因性経路の両方の経路を介していることが示唆された。

このように本論文は、セレコキシブによるイヌ乳腺腫瘍細胞における増殖抑制作用が、COX-2 非依存的な作用によるものであることを明らかにし、その機序として、p21 および p27 の発現誘導による細胞周期の停止が関与していることを示した。また、セレコキシブがイヌ乳腺腫瘍細胞において示す増殖抑制作用には、アポトーシスが関わっており、そのメカニズムとして、内因性経路と外因性経路の二つのアポトーシス経路を介したカスパーゼ 3 およびカスパーゼ 7 の活性化が起き、アポトーシスが誘導される可能性を示唆した。本論文で明らかにされた新たな知見は、イヌ乳腺腫瘍におけるセレコキシブの抗腫瘍作用の分子メカニズムの一端を明らかにしたものであり、ヒト大腸がんや乳がんと同様、イヌ乳腺腫瘍においても、セレコキシブが抗腫瘍薬として極めて有用である可能性を示唆するとともに、獣医臨床領域における治療戦略に大きく寄与するものと考えられる。

よって本論文は、博士（獣医学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成 29 年 2 月 21 日