

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

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻
博士課程

田村 大

2016

目次

緒論.....	1
第一章 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.....	6
1.1. 背景.....	7
1.2. 材料および方法.....	10
1.2.1. 使用細胞および培養方法	
1.2.2. 選択的 COX-2 阻害薬	
1.2.3. タンパク抽出および Western blotting	
1.2.4. WST-8 assay	
1.2.5. 培養上清中の PGE ₂ 濃度の測定	
1.2.6. 細胞周期の解析	
1.2.7. RNA の抽出および real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (real-time RT-PCR)	
1.2.8. 統計学的解析	
1.3. 結果.....	16
1.3.1. イヌ乳腺腫瘍細胞における COX-2 発現量の比較	

1.3.2. セレコキシブが細胞増殖能に及ぼす影響の評価	
1.3.3. セレコキシブが PGE ₂ 産生量に及ぼす影響の評価	
1.3.4. セレコキシブが細胞周期に及ぼす影響の評価	
1.3.5. セレコキシブがサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 (CDKI) に及ぼす影響の評価	
1.3.6. 2,5-Dimethyl-celecoxib (DMC) が細胞増殖能に及ぼす影響の評価	
1.4. 考察	33
1.5. 要約	37

第二章 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	39
2.1. 背景	40
2.2. 材料および方法	42
2.2.1. 使用細胞および培養方法、被験物質	
2.2.2. アポトーシス細胞 (sub-G0/G1 期細胞) の検出	
2.2.3. アポトーシス細胞のステージ分類	
2.2.4. Western blotting	
2.2.5. Real-time RT-PCR	

2.2.6. ミトコンドリア外膜透過性の検出	
2.2.7. カスパーゼ3およびカスパーゼ7の活性測定	
2.2.8. 統計学的解析	
2.3. 結果.....	47
2.3.1. セレコキシブによるアポトーシス誘導作用の検討	
2.3.2. DMCによるアポトーシス誘導作用の検討	
2.3.3. セレコキシブがアポトーシス関連分子の発現量に及ぼす影響の評価	
2.3.4. セレコキシブが及ぼすミトコンドリア外膜透過性への影響の評価	
2.3.5. セレコキシブによるカスパーゼ3およびカスパーゼ7の活性の比較	
2.4. 考察.....	63
2.5. 要約.....	65
第三章 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 ムについての解析.....	67
3.1. 背景.....	68
3.2. 材料および方法.....	71
3.2.1. 使用細胞および培養方法、被験物質	
3.2.2. カスパーゼ8またはカスパーゼ9の活性阻害	

3.2.3. カスパーゼ 8 またはカスパーゼ 9 の活性測定	
3.2.4. タンパク抽出および Western blotting	
3.2.5. アポトーシス細胞 (sub-G0/G1 期細胞) の検出	
3.2.6. 統計学的解析	
3.3. 結果.....	73
3.3.1. セレコキシブがカスパーゼ 8 およびカスパーゼ 9 の活性に及ぼす 影響の評価	
3.3.2. カスパーゼ 8 またはカスパーゼ 9 の特異的阻害剤がセレコキシブ のアポトーシス誘導作用に及ぼす影響の評価	
3.3.3. セレコキシブが Bid に及ぼす影響の評価	
3.4. 考察.....	83
3.5. 要約.....	85
結語.....	88
謝辞.....	91
引用文献.....	92

緒論

イヌの乳腺腫瘍は未避妊の雌イヌにおいて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 (Goldschmidt *et al.*, 2011)。さらに悪性と診断された症例の約半数においては、腫瘍組織を切除しても遠隔転移や再発を繰り返す可能性が高く、予後不良となることが知られている。また、全症例の約 45.5%において、間葉系由来細胞や上皮系由来細胞成分が混在する complex 型の病理組織像を示すため、細胞診では良性または悪性の鑑別が難しく、術前の病理診断に基づく予後判定などが困難とされている (Goldschmidt *et al.*, 2011)。したがって、良性または悪性の確定診断は、乳腺腫瘍組織の切除生検または切開生検でのみ可能なため、良性・悪性に関わらず腫瘍組織を外科的に切除することが治療法の第一選択とされている。その一方で、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、化学療法のみでは完全寛解を得られないのが現状である。このような背景から、イヌ乳腺腫瘍に対する有効な診断マーカーおよび副作用の少ない化学療法の確立が急務である。また、イヌ乳腺腫瘍では、ヒトのがんの発生や悪性進展に関与することが報告されている p53、breast cancer susceptibility genes (BRCA1 および BRCA2)、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) /Akt 経路、phosphatase and tensin homolog (PTEN)、Wnt/ β catenin 経路、mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路、cyclooxygenase-2 (COX-2) など

の分子の発現パターンがヒト乳癌の場合と非常に酷似しており、イヌ乳腺腫瘍はヒト乳癌研究のモデルとしても注目されている (Klopfleisch *et al.*, 2011; Pinho *et al.*, 2012; Rivera *et al.*, 2011)。したがって、イヌ乳腺腫瘍に対する治療法の確立を目指す研究は獣医学のみならず、医学へも研究成果を還元できるといった点で非常に価値があると考えられる。

COX はアラキドン酸からプロスタグランジン類 (PGs) やトロンボキサン A₂ (TXA₂) などのプロスタノイド生成を触媒する酵素である。COX には主に 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 は全身の組織に広く発現が認められ、胃粘膜の保護、血小板凝集の抑制、腎血流量の維持など生体の恒常性維持に重要な役割を担っている (Hawkey, 1999)。一方、COX-2 は誘導型酵素であり、炎症性サイトカインや発がんプロモーター、がん遺伝子の活性化などによって発現が誘導される。特に、がん細胞では、COX-2 が細胞増殖や血管新生の促進、浸潤および転移の促進、アポトーシスの抑制、腫瘍免疫の抑制などに関与していることが指摘されており、COX-2 により生成されたプロスタノイドが発がんや悪性進展に対して多彩な作用を引き起こすことが知られている (Liu *et al.*, 2009; Rolle *et al.*, 2012; Sheng *et al.*, 1998; Saikawa *et al.*, 2004; Tsujii *et al.*, 1995; 1997; 1998)。

ヒトの大腸がんや乳がん、肺がん、食道がん、膵臓がんの患者から得られた

病理組織では COX-2 の過剰発現が認められている (Hida *et al.*, 1998; Hwang *et al.*, 1998; Tucker *et al.*, 1999; Tomozawa *et al.*, 2000; Zimmermann *et al.*, 1999)。特に、ヒト浸潤性乳がんの 40% の患者の組織では COX-2 の過剰発現が認められており、それらの患者では病理組織学的な悪性度が高く、予後不良となることが報告されている (Chen *et al.*, 2014; Howe, 2007; Ristimaki *et al.*, 2002; Wulfing *et al.*, 2003)。また、ヒト乳がんにおける報告と同様に、イヌ乳腺腫瘍においても COX-2 発現量と悪性度には相関関係が認められることが報告されている (Doré *et al.*, 2003; Lavalle *et al.*, 2009; Mohammed *et al.*, 2004; Queiroga *et al.*, 2007)。さらに、イヌ乳腺腫瘍が肺やリンパ節へと転移した症例では、転移巣のがん細胞における COX-2 発現量が原発巣と同程度もしくはそれ以上に増加していることも知られており、イヌ乳腺腫瘍の浸潤および転移に COX-2 が重要な役割を担っていることも示唆されている (Dias Pereira *et al.*, 2009)。これらの報告から、イヌ乳腺腫瘍における診断マーカーおよび治療標的分子としての COX-2 の有用性に注目が集まっており、様々な視点からの研究が広く展開されている。

非ステロイド性抗炎症薬 (non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs) は COX 活性を阻害するため、抗炎症作用や鎮痛作用、解熱作用、抗血小板作用などを期待して、関節リウマチや変形性関節症などの様々な疾患に使用されている。以前より、アスピリンなどの NSAIDs を常用している慢性関節リウマチ患

者では、大腸がんなどの消化器がんの罹患率や死亡率が低くなることが知られていた (Isomaki *et al.*, 1978; Koehne *et al.*, 2004)。現在、ヒトでは大腸がんのみならず、乳がんや非小細胞肺癌などの様々ながんにおいても、NSAIDs の抗腫瘍効果が認められており、NSAIDs の抗腫瘍薬および癌の化学的予防薬としての臨床応用の可能性に注目が集まっている (Altorki *et al.*, 2003; Rothwell *et al.*, 2012; Sharpe *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2005)。しかし、アスピリンなどの従来の NSAIDs には COX-1 活性阻害に起因する消化管粘膜障害の副作用が生じやすく、長期間の服用は制限される場合が多い。そのため、消化器系への副作用を軽減できるセレコキシブに代表されるコキシブ系薬物やエトドラク、メロキシカムなどの COX-2 への選択性が極めて高い NSAIDs が開発され、市販されている (Kato *et al.*, 2001)。現在、これらセレコキシブなどの選択的 COX-2 阻害薬は、炎症性疾患や運動器疾患などの幅広い疾患の治療に使用され、その臨床的な有効性が証明されている。様々な選択的 COX-2 阻害薬の中においても、特にセレコキシブは大腸がんや乳がんなどの様々ながん細胞に対して抗腫瘍作用を示すことが数多く報告されており、その抗腫瘍活性の高さに注目が集まっている (Bertagnolli *et al.*, 2006; Catalano *et al.*, 2004; Harris *et al.*, 2012; Jendrossek *et al.*, 2003; Kulp *et al.*, 2004)。また、NSAIDs は COX-2 活性阻害作用に基づく 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 阻害活性とは関係なく抗腫

瘍作用を示す COX-2 非依存的なメカニズムを介しても抗腫瘍作用を示す可能性が、以前より指摘されている。特にセレコキシブは、多彩な COX-2 非依存的な抗腫瘍作用メカニズムを有していると共に、その詳細なメカニズムが明らかにされつつある (Grosch *et al.*, 2006)。そのため、セレコキシブはがん組織における COX-2 発現量に関係なく抗腫瘍作用を示す可能性が示唆されており、より多くの悪性腫瘍の治療へと臨床応用が可能と考えられている。したがって、セレコキシブは抗腫瘍薬またはがんの化学的予防薬としての臨床応用化の可能性が極めて高い薬物と考えられる。

イヌにおいて、セレコキシブなどの選択的 COX-2 阻害薬の抗腫瘍効果を検討した研究は非常に少なく、その抗腫瘍活性や抗腫瘍作用メカニズムの詳細については、ほとんど明らかになっていないのが現状である。そのため、本研究ではイヌ乳腺腫瘍細胞 (AZACB 細胞) を用いてセレコキシブの COX-2 非依存的な抗腫瘍作用およびそのメカニズムについての解析を行なうことを目的とし、研究を行なった。

第一章

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

1.1. 背景

COX には COX-1 および COX-2 の 2 つのアイソザイムが存在しており、膜リン脂質から遊離したアラキドン酸を PGE₂ や PGI₂、TXA₂ などのプロスタノイドへと合成する過程に深く関与している。各種臓器に恒常的な発現が認められる構成型酵素の COX-1 によって産生されたプロスタノイドは、胃粘膜保護や腎血管拡張、血小板凝集などの生体のホメオスタシスを維持するために重要とされている (Williams *et al.*, 1999)。一方、COX-2 は炎症性サイトカインや発がんプロモーター、がん遺伝子の活性化などによって発現が誘導される誘導型酵素であり、悪性腫瘍や炎症性疾患の病態形成に深く関与していると考えられている。そのため、COX 活性を阻害するアスピリンなどの NSAIDs には、抗炎症作用のみならず、抗腫瘍作用も存在することが以前より知られていた。特に、ヒトの乳がんや大腸がんなどの様々ながん組織では、正常組織に比べ COX-2 の過剰発現が認められ、発がんやがんの悪性進展における COX-2 の役割について様々な観点から明らかにされつつある (Hida *et al.*, 1998; Hwang *et al.*, 1998; Tomozawa *et al.*, 2000; Tucker *et al.*, 1999; Zimmermann *et al.*, 1999)。しかし、従来の NSAIDs には、COX-1 活性阻害作用に基づく消化管粘膜障害の副作用が生じやすく、NSAIDs をがんの予防や治療を目的として長期にわたり投与することは難しいとされている。したがって、セレコキシブなどの選択的 COX-2 阻害薬を抗腫瘍

薬として臨床応用化する研究に注目が集まっている。

大腸がんおよび大腸腺腫症患者の大腸粘膜では、正常組織と比較して COX-2 の発現亢進に起因した PGE₂ 産生量の増加が認められている (Pugh *et al.*, 1994)。PGE₂ のがん細胞における機能的役割は、増殖能や運動能の促進、血管新生の促進、腫瘍免疫の抑制やアポトーシス抵抗性の付与など多彩である (Chang *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 1998; Krysan *et al.*, 2005; Sheng *et al.*, 1998; Sheng *et al.*, 2001; Tsujii *et al.*, 1995; Tsujii *et al.*, 1998; Yau *et al.*, 2003)。特に、細胞増殖能へと影響を及ぼすメカニズムとしては、PGE₂ 受容体 (EP 受容体) を介して、Ras-MAPK 経路の活性化を引き起こすメカニズムなどが知られている (Wang *et al.*, 2006)。したがって、NSAIDs が示す抗腫瘍作用は、COX-2 活性阻害作用による PGE₂ などのプロスタノイド産生抑制作用に起因する COX-2 依存的な作用メカニズムを介していることが知られている (Greenhough *et al.*, 2009)。

しかし、COX 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) がバーキットリンパ腫に対して抗腫瘍作用を示す (Kardosh *et al.*, 2005) など、NSAIDs の COX-2 阻害活性と抗腫瘍活性とが相関しないことが報告されている。そのため、NSAIDs が示す抗腫瘍作用には COX-2 依存的な作用のみならず、COX-2 非依存的な作用も存在すると考えられている (Grosh *et al.*, 2006)。特に、セレコキシブは他の NSAIDs に比べて、細胞

障害作用が著しく高いことが知られており、COX-2 非依存的な抗腫瘍作用メカニズムも多く報告されている。具体的には、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 (CDKI) である p21 や p27 の発現を直接促進し、細胞周期を負に制御するメカニズム (Grosch *et al.*, 2001) や、細胞生存を促進するシグナルの PDK1 や AKT (PKB) の活性を直接阻害するメカニズムなどが報告されている (Arico *et al.*, 2002)。また、 β -catenin や nuclear factor-kappa B (NF- κ B) などの転写因子を直接抑制することによって、がん細胞の増殖や転移、血管新生を抑制する作用も知られている (Kim *et al.*, 2004; Maier *et al.*, 2005)。

正常なイヌ乳腺組織においては COX-2 の発現量は極めて低く抑制されているが、乳腺腫の 24%および乳腺がんの 56%の症例においては COX-2 の過剰発現が認められており、悪性度の上昇に伴い COX-2 発現量が増加する傾向にある (Doré *et al.*, 2003)。しかし、イヌの乳腺がんの全症例において COX-2 の過剰発現が認められる訳ではなく、一部の症例ではそのような変化が観察されないのも事実である (Doré *et al.*, 2003; Howe, 2007)。そのため、様々な COX-2 非依存的な抗腫瘍作用メカニズムを示すセレコキシブは、COX-2 が過剰発現している症例のみならず、発現亢進が認められない症例に対しても有効な可能性が高い。したがって、NSAIDs による COX-2 非依存的な抗腫瘍作用の有無について解析することは、NSAIDs の抗腫瘍薬としての臨床応用化を目指す過程で、非常に重要な

意味合いを持つものと考えられる。しかし、セレコキシブなどの NSAIDs が有する COX-2 非依存的な抗腫瘍作用がイヌ乳腺腫瘍においても認められるか否かについて検討した研究は存在せず、その詳細については明らかになっていない。そのため、イヌ乳腺腫瘍細胞において、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を行なうことを本研究の目的とした。

1.2. 材料および方法

1.2.1. 使用細胞および培養方法

本研究では、イヌ乳腺腫瘍細胞株として AZACB 細胞（株式会社プライマリーセル, Hokkaido, Japan）と CF33 細胞（American Type Culture Collection, VA, USA）、CF41.Mg 細胞（American Type Culture Collection, VA, USA）を用いた。細胞の継代には、ダルベッコ変法イーグル培地②（日水製薬株式会社, Tokyo, Japan）に 10% ウシ胎児血清（FBS）と、ペニシリンーストレプトマイシン溶液（和光純薬工業株式会社, Osaka, Japan）および 200 mmol/l L-グルタミン溶液（和光純薬工業株式会社, Osaka, Japan）、7.5% NaHCO₃ を加えたものを増殖培地として使用した。

1.2.2. 選択的 COX-2 阻害薬

選択的 COX-2 阻害薬として、メロキシカム（和光純薬工業株式会社, Osaka, Japan）、エトドラク（Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan）、セレコキシブ（Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan）をジメチルスルホキシド（DMSO）（和光純薬工業株式会社, Osaka, Japan）に溶解し、0~100 mM に調製した。また、セレコキシブの構造異性体である 2,5-Dimethyl-celecoxib（DMC）（Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan）に関しても DMSO に溶解し、0~100 mM に調製した。選択的 COX-2 阻害薬を作用させる場合には、全培養液における DMSO の最終濃度が 0.1% となるように添加した。なお、コントロールの細胞には、溶媒である DMSO が最終濃度 0.1% となるように添加し、parent の細胞は無処置とした。

1.2.3. タンパク質の抽出および Western blotting

タンパク質の抽出

細胞を 4°C に冷却した PBS で洗浄後、1 µg/ml Leupeptin、1 µg/ml Pepstain、1 µg/ml Aprotinin、1.0 mM DTT、1.0 mM NaVO₄、0.5 mM PMSF を添加した RIPA（radio-immunoprecipitation assay）buffer を用いて細胞を溶解し、氷上で 30 分間静置する。その後、遠心（4°C、15,000×g、30 分間）して得られた上清を使用した。

タンパク質の濃度定量

BCA Protein Assay Reagent kit (Pierce Biotechnology, IL, USA) を使用し、Benchmark Plus (Bio-Rad, Tokyo, Japan) で 562 nm の吸光度を測定して、タンパク質濃度を定量した。

Western blotting で使用するサンプルの調整

20 μ g のサンプルに対して 2 \times Laemmli's sample loading buffer [100 mM Tris-HCl (pH6.8) , 200 mM DTT, 4% SDS, 0.2% BPB, 20% Glycerol] を等量加えて、100°C で 5 分間煮沸した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

10%および 12%のポリアクリルアミドゲルを作成し、PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, IL, USA) およびサンプルを 200 V の条件で電気泳動した。

Trans-blotting

100%メタノールおよび転写用バッファーに事前に浸しておいた PVDF メンブレン (Bio-Rad, Tokyo, Japan) を使用し、電気泳動したゲルと濾紙および PVDF メンブレンを転写槽に積層し、4°C、0.09 A、30 V の条件で転写する。

Immunoblotting および化学発光の検出

Tris-buffered saline (TBS) に Tween-20 を最終濃度が 0.05%となるように加えた TBS-T を用いて、スキムミルクを 5% に希釈した溶液を用いて PVDF メン

ブレンのブロッキングを行う。使用した一次抗体は、anti-p27 rabbit monoclonal antibody (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) または anti-COX-2 rabbit polyclonal antibody (Abcam, Cambridge, UK) であり、それぞれ 1,000 倍に希釈して使用した。二次抗体には、5,000 倍に希釈した HRP 標識二次抗体を使用した。化学発光は WesternBright Sirius Western blotting kit (Advansta, CA, USA) を用い、ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Tokyo, Japan) で検出した。また、サンプルのローディング量を比較するための内部標準として 5,000 倍に希釈した anti- β -actin mouse monoclonal antibody (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) を使用した。

1. 2. 4. WST-8 assay

対数増殖期の細胞を 96-well マイクロプレート (BD Falcon, Tokyo, Japan) に 2,500 cells/well で播種した。24 時間培養後に被験物質を 24 時間作用させた細胞を使用した。WST-8 assay には、Cell Counting Kit-8 (株式会社同仁化学研究所, Kumamoto, Japan) を用い、450 nm の吸光度について Benchmark Plus (Bio-Rad, Tokyo, Japan) を用いて測定した。

1. 2. 5. 培養上清中の PGE₂ 濃度の測定

AZACB 細胞を 100 mm の組織培養ディッシュに 9×10^5 cells の条件で播種し、

24 時間培養した。その後、starvation medium (2% FBS 含有) と growth medium (10% FBS 含有) を用いてさらに 24 時間培養した後、セレコキシブの最終濃度が 100 μM となるように加えて 24 時間作用させた。セレコキシブの作用が終了した後、培養上清を遠心 (4°C、500×g、5 分間) し、その際に得られた上清のみを測定に使用した。培養上清中の PGE₂ の測定には PGE₂ enzyme immunoassay kit – Monoclonal (Cayman Chemical, MI, USA) を用い、取り扱い説明書に準じて Benchmark Plus (Bio-Rad, Tokyo, Japan) にて 405 nm の吸光度を測定し比較した。

1. 2. 6. 細胞周期の解析

洗浄および固定

PBS で洗浄した細胞に氷冷した 70%エタノールで、-30°Cにて一晩固定する。

その後、3,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を除去する。

染色

Promidium iodide (PI) / RNase staining buffer (BD Pharmingen, CA, USA) を用いて、4°Cで 15 分間染色する。

測定および解析

FACS Canto (Becton Dickinson, NJ, USA) を用いて、各細胞の DNA 量を測定した。また、各細胞の DNA 量から Flow Jo7 (Tree Star, OR, USA) を用いて、各細胞の細胞周期を解析した。

1. 2. 7. RNA の抽出および real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (real-time RT-PCR)

RNA の抽出および cDNA の合成

Total RNA の抽出には TRIzol reagent (Life Technologies, CA, USA)、cDNA の合成には PrimeScript™ RT reagent kit (タカラバイオ株式会社, Shiga, Japan) をそれぞれ用い、各社の取扱説明書に従い実施した。

real-time PCR

SYBR Premix Ex Taq™ II (タカラバイオ株式会社, Shiga, Japan)、ABI Prism 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA) を用いて遺伝子増幅および解析を行なった。初期変性を 95°C・30 秒、PCR 反応 (95°C-5 秒、60°C-34 秒) を 40 サイクルの条件で遺伝子を増幅した。使用したプライマーの配列は、*p21* (forward, 5'-CCTAATCTGCTCACCGGAAG-3'; reverse, 5'-GGTGGCAAGCAGGGTATGTA-3')、*p27* (forward, 5'-CTCAGGCCAACTCAGAGGAC-3'; reverse, 5'-TCTTAGGCGTCTGCTCCACT-3') である。また、比較のために内部標準として glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) (forward, 5'-ATTCTATCCACGGCAAATCC-3'; reverse, 5'-CGACTCCACAACATACTCAG-3') を用いた。いずれのプライマーもオペロンバイオテクノロジー株式会社 (Tokyo, Japan) より購入

した。

1.2.8. 統計学的解析

本研究で得られたデータは、平均値 ± 標準偏差で示した。統計学的解析には、Bonferroni 法および Mann-Whitney 検定を用いた。P 値 < 0.05 の場合を統計学的有意と判断した。

1.3. 結果

1.3.1. イヌ乳腺腫瘍細胞における COX-2 発現量の比較

イヌ乳腺腫瘍細胞におけるセレコキシブの COX-2 非依存的な抗腫瘍作用を評価するためには、COX-2 発現量が少なく、セレコキシブによる COX-2 活性阻害作用の影響が極めて低減された細胞を使用する必要がある。そのため、CF33 細胞および CF41.MG 細胞、AZACB 細胞の 3 種類のイヌ乳腺腫瘍細胞における COX-2 のタンパク発現量を比較した。AZACB 細胞では、CF33 細胞と比べて COX-2 発現量が著しく少なく、その発現量は CF33 細胞の 3.63%であることが明らかとなった (図 1. 1.)。そのため、今後の研究では AZACB 細胞を使用し、選択的 COX-2 阻害薬の抗腫瘍作用を評価することとした。

1.3.2. セレコキシブが細胞増殖能に及ぼす影響の評価

イヌ乳腺腫瘍細胞におけるセレコキシブの細胞増殖能への影響を明らかにするために、セレコキシブを24時間作用させた場合のAZACB細胞の細胞増殖能について評価した。また、セレコキシブの細胞増殖抑制能を比較する対照としてCOX-2に対する選択性が高く、臨床的に使用されている選択的COX-2阻害薬のメロキシカムまたはエトドラクが示す細胞増殖能への影響も評価した。その結果、メロキシカムまたはエトドラクを作用させたAZACB細胞では、細胞増殖能に著明な変化は認められなかった(図1.2.および図1.3.)。しかし、セレコキシブを作用させたAZACB細胞では、100 μMの濃度でのみ有意な細胞増殖抑制作用が認められた(図1.4.)。これらの結果より、COX-2の発現が亢進していないイヌ乳腺腫瘍細胞に対しても、セレコキシブが細胞増殖抑制作用を示す可能性が示唆された。

1.3.3. セレコキシブがPGE₂産生量に及ぼす影響の評価

図1.1.および図1.4.の結果より、COX-2発現量が少ないAZACB細胞に対して、セレコキシブが細胞増殖抑制作用を示すことが明らかとなった。しかし、AZACB細胞においてCOX-2の発現が全く認められない訳では無いため、セレコキシブが示す抗腫瘍作用がCOX-2活性阻害に基づいて生じている可能性を排除できない。そのため、セレコキシブによるCOX-2活性阻害作用を評価する目的で、培

養上清中の PGE₂ 産生量を比較した。なお、PGE₂ は血清中にも含まれているため、starvation medium および growth medium の両条件下でそれぞれ測定した。しかし、セレコキシブ 100 μM を AZACB 細胞に 24 時間作用させた場合における PGE₂ 産生量は、starvation medium および growth medium の両方において有意な差は認められなかった (図 1. 5.)。これらの結果により、セレコキシブが AZACB 細胞に PGE₂ 産生量とは関係なく、COX-2 非依存的な細胞増殖抑制作用を示す可能性が示唆された。

1. 3. 4. セレコキシブが細胞周期に及ぼす影響の評価

セレコキシブは AZACB 細胞において細胞増殖抑制作用を示すため、より詳細な細胞周期への影響を評価するため、PI 染色した細胞の DNA 量をフローサイトメトリーにて解析した。本実験の陰性対照として、AZACB 細胞に対して細胞増殖抑制作用を示さないメロキシカムおよびエトドラクによる細胞周期への影響を評価した。その結果、メロキシカムおよびエトドラクのいずれにおいても、AZACB 細胞における各細胞周期を示す細胞の分布に大きな影響を与えなかった (図 1. 6. および図 1. 7.)。一方、セレコキシブ 100 μM を作用させた AZACB 細胞では、G2/M arrest および S 期細胞数の減少が認められた (図 1. 8.)。また、セレコキシブ 100 μM を 0~24 時間作用させた AZACB 細胞の細胞周期への影響

を4時間ごとに解析した結果、時間依存的に G2/M arrest および S 期細胞数の減少が認められると共に、僅かに G0/G1 arrest も誘導されることが明らかとなった (図 1.9.)。本研究結果から、セレコキシブが S 期細胞数を減少させることによって、細胞増殖抑制作用を示す可能性が示唆された。

1.3.5. セレコキシブがサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 (CDKI) に及ぼす影響の評価

セレコキシブによる細胞周期への影響をより詳細に解析するために、細胞周期の S 期への進行を阻害すると共に、セレコキシブの COX-2 非依存的な抗腫瘍作用メカニズムに関連する CDKI でもある p21 および p27 の発現量の変化を評価した。セレコキシブは AZACB 細胞における p21 の mRNA 発現量を増加させ、p27 の mRNA 量およびタンパク量のいずれも増加させた (図 1.10.、図 1.11.A.、図 1.11.B.)。一方、細胞増殖や細胞周期には影響を及ぼさないメロキシカムおよびエトドラクでは p21 および p27 の発現量に変化は認められなかった (図 1.10.、図 1.11.A.、図 1.11.B.)。これらの結果から、セレコキシブが p21 および p27 の発現に影響を及ぼし、COX-2 非依存的なメカニズムで細胞周期の進行を停止させる可能性が示唆された。

1.3.6. 2,5-Dimethyl-celecoxib (DMC) が細胞増殖能に及ぼす影響の評価

セレコキシブに認められた AZACB 細胞の増殖抑制作用が、COX-2 非依存的なメカニズムを介して引き起こしているのかについて、COX-2 活性阻害能を完全に欠いたセレコキシブの構造異性体である DMC を作用させ、細胞増殖能への影響を WST-8 assay にて評価した。40 μ M 以上の濃度の DMC は AZACB 細胞において、著明な細胞増殖抑制作用が認められた (図 1. 12. A)。さらに、本結果が AZACB 細胞に特異的な現象では無いことを確認するために、COX-2 発現量が多い CF33 細胞を用いて同様の実験を行なった。その結果、CF33 細胞においても、同様の結果が認められた (図 1. 12. B)。これらの研究結果から、セレコキシブは COX-2 非依存的なメカニズムを介して、イヌ乳腺腫瘍細胞の増殖を抑制する作用を有していることが示唆された。

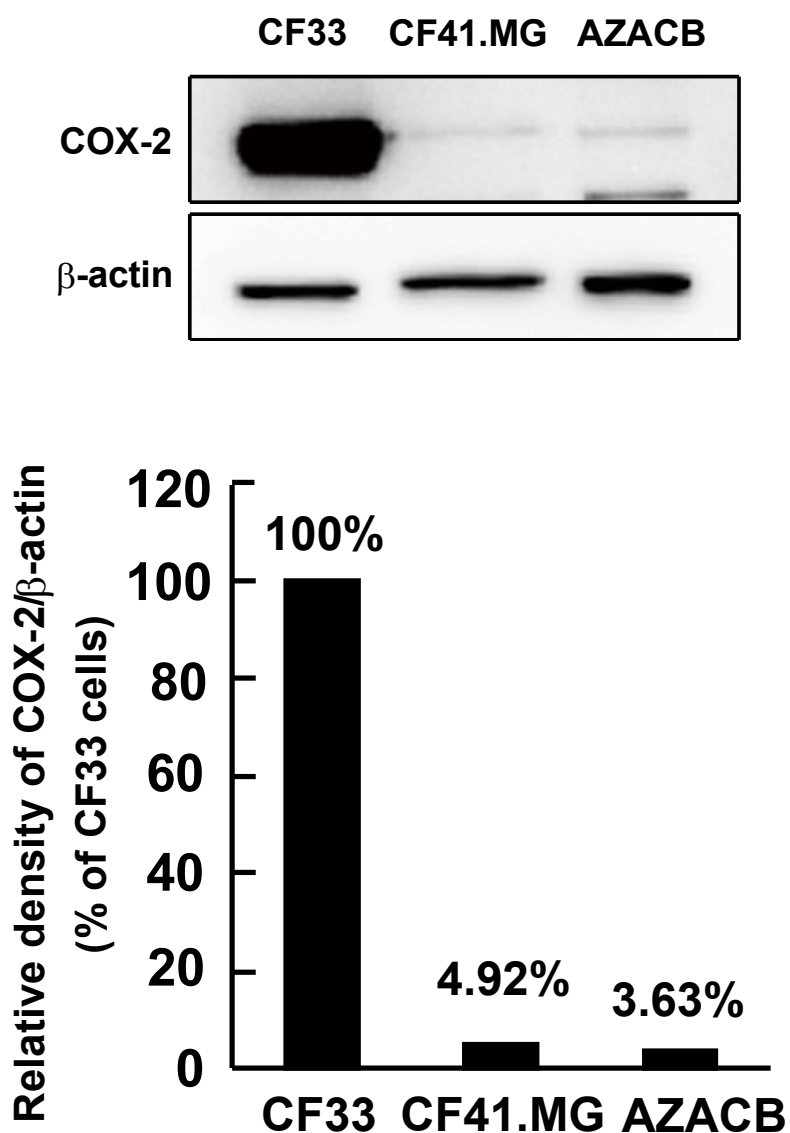


図 1.1. イヌ乳腺腫瘍細胞における COX-2 発現量の比較

CF33 細胞、CF41.MG 細胞、AZACB 細胞の COX-2 タンパク発現量を Western blotting により比較した。内部標準としてβ-actin を使用した。下図は COX-2 およびβ-actin の特異的バンドの density を比較したグラフである。

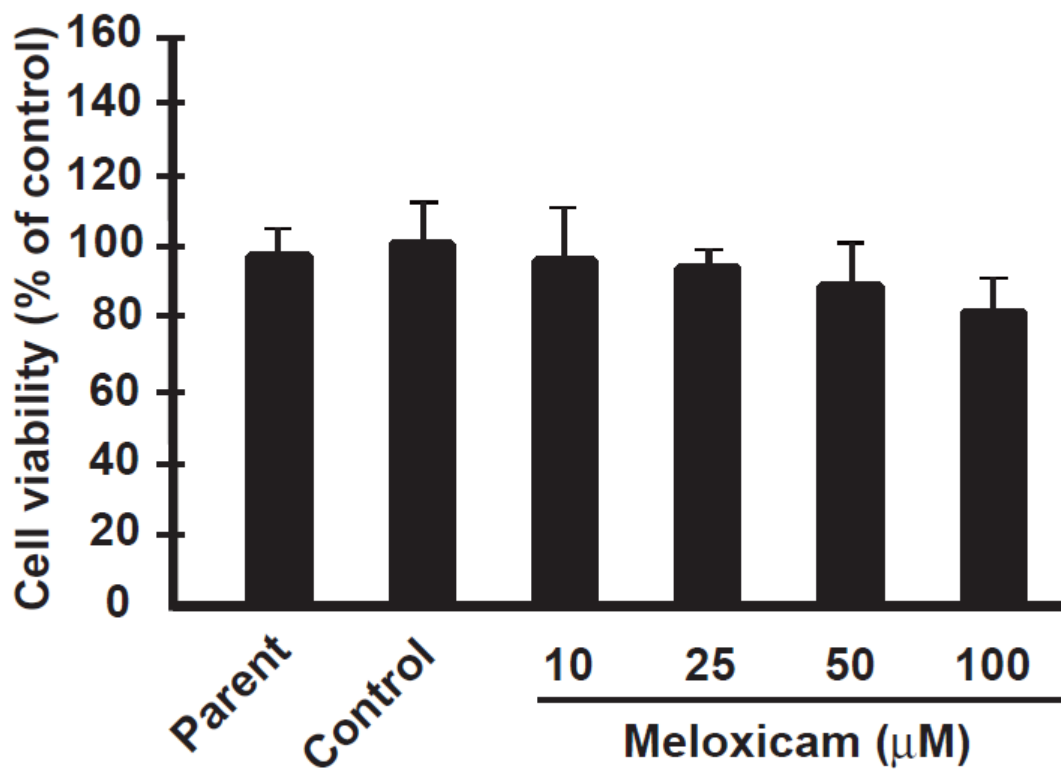


図 1.2. メロキシカムの細胞増殖能に及ぼす影響

メロキシカムを 10 μM、25 μM、50 μM、100 μM の濃度で 24 時間作用させた AZACB 細胞における細胞増殖能について、WST-8 assay を用いて比較した。Parent は無処理の細胞、control は溶媒である DMSO を最終濃度 0.1% で作用させた細胞である。n = 5 とし、平均 ± 標準偏差を示した。

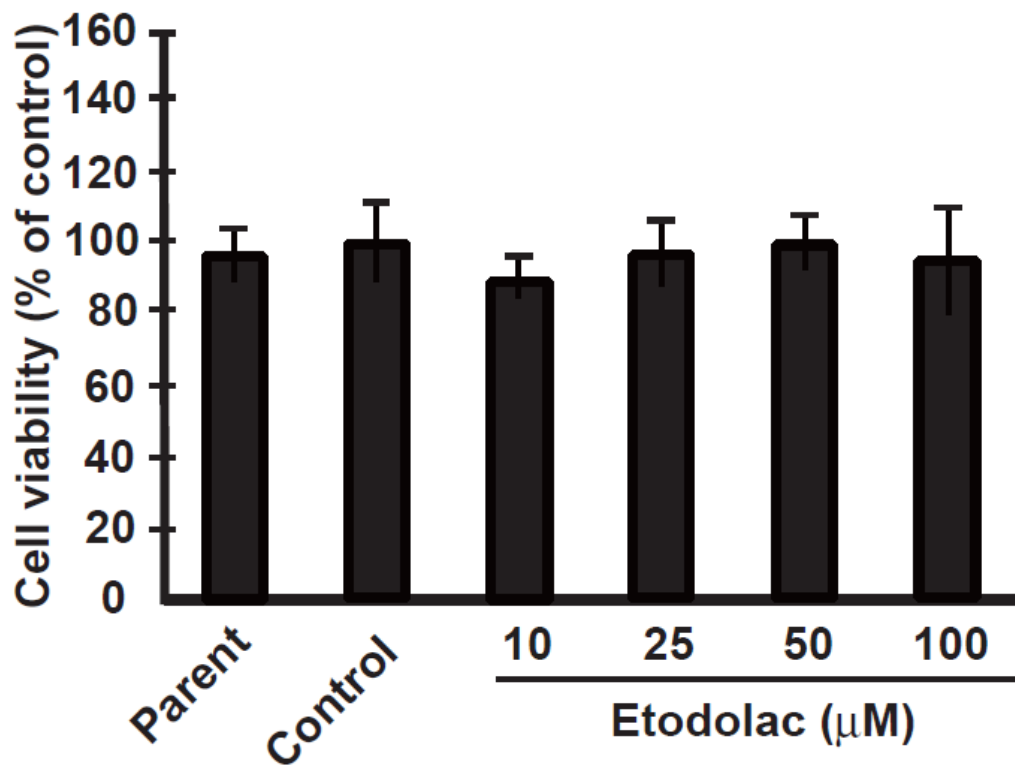


図 1.3. エトドラクの細胞増殖能に及ぼす影響

エトドラクを 10 μM、25 μM、50 μM、100 μM の濃度で 24 時間作用させた AZACB 細胞における細胞増殖能について、WST-8 assay を用いて比較した。Parent は無処理の細胞、control は溶媒である DMSO を最終濃度 0.1% で作用させた細胞である。n = 5 とし、平均 ± 標準偏差を示した。

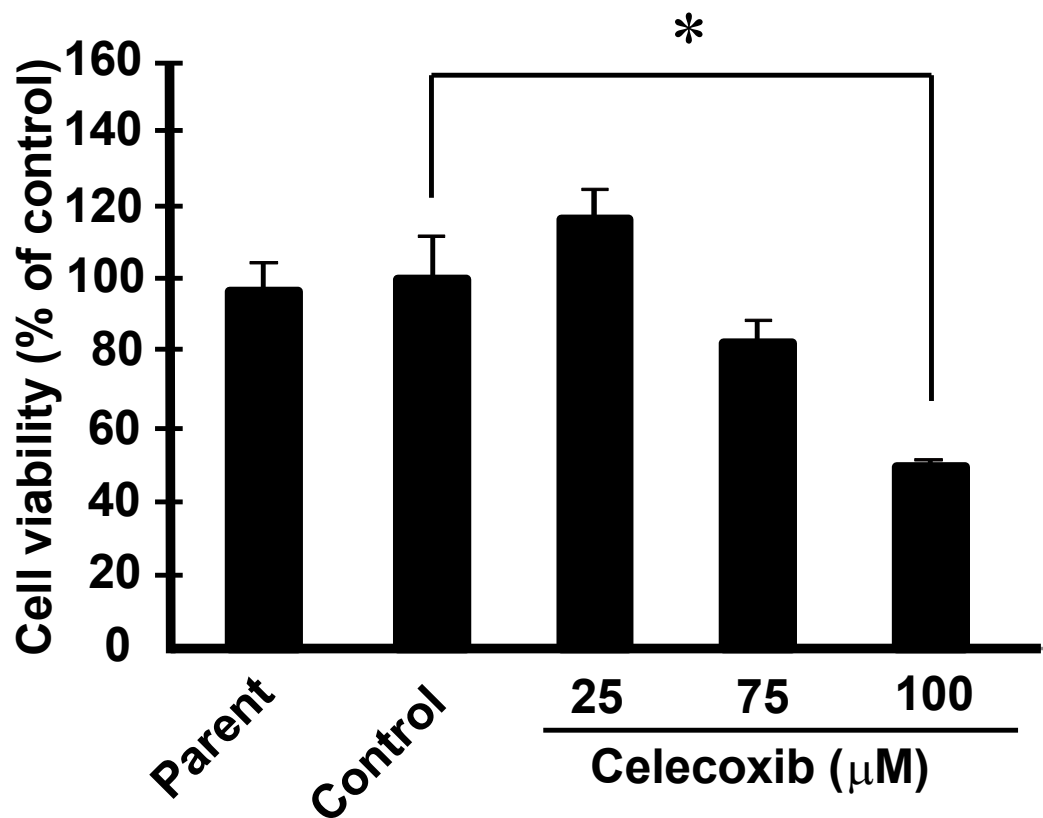


図 1.4. セレコキシブの細胞増殖能に及ぼす影響

セレコキシブを 25 μM 、75 μM 、100 μM の濃度で 24 時間作用させた AZACB 細胞における細胞増殖能について、WST-8 assay を用いて比較した。Parent は無処理の細胞、Control は溶媒である DMSO を最終濃度 0.1% で作用させた細胞である。n = 5 とし、平均 \pm 標準偏差を示した。 * $P < 0.05$

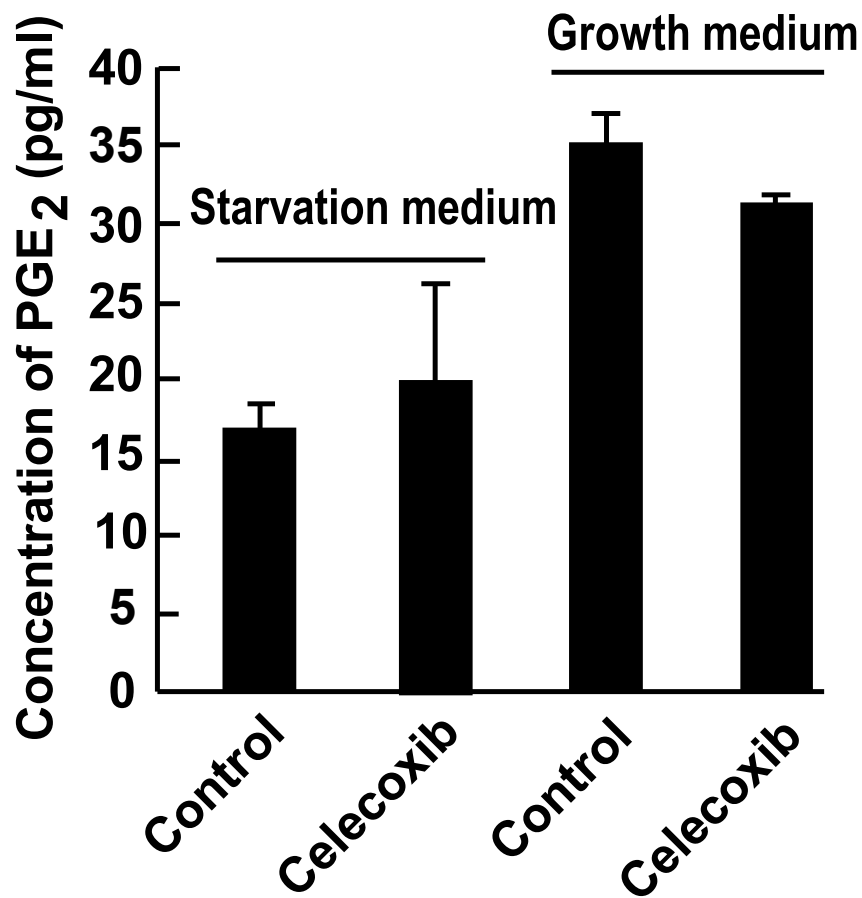


図 1.5. セレコキシブの PGE₂ 産生量に及ぼす影響

セレコキシブ (100 μM) を 24 時間作用させた AZACB 細胞における培養上清中の PGE₂ 産生量を比較した。Control は DMSO を最終濃度 0.1% で作用させた細胞である。n = 3 とし、各データは平均 ± 標準偏差を示した。

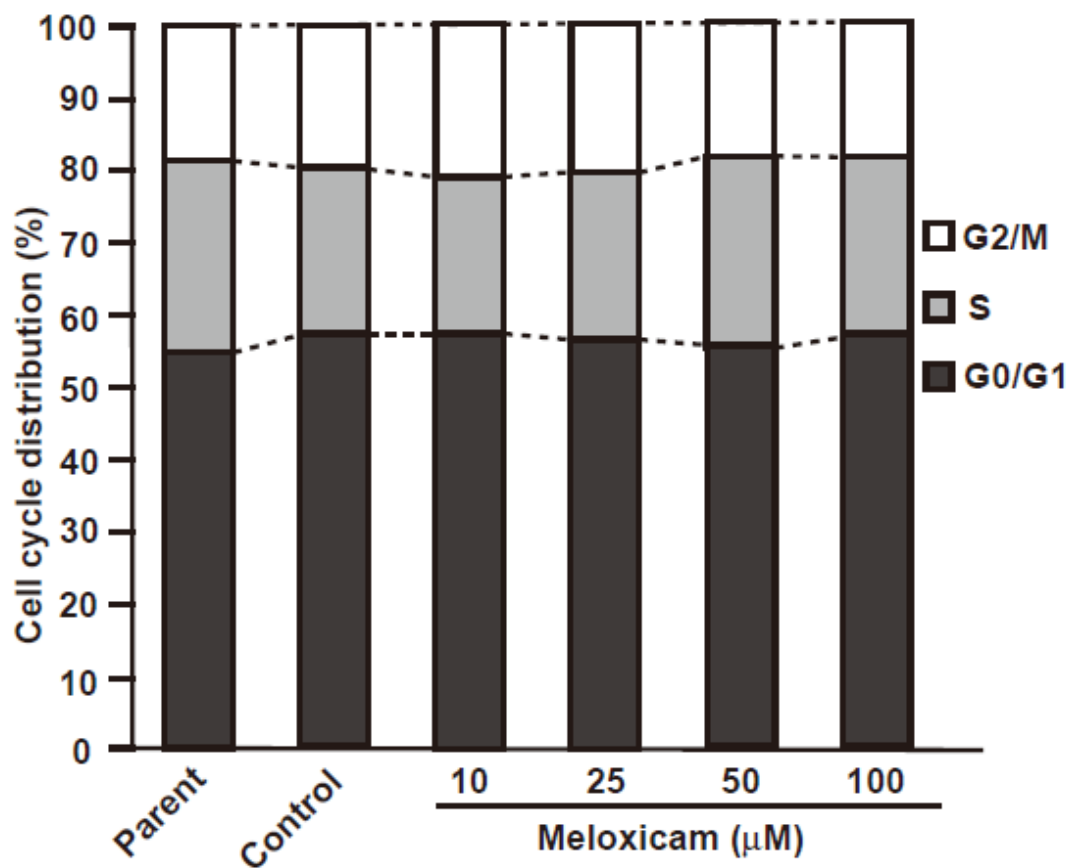


図 1.6. メロキシカムの細胞周期に及ぼす影響

メロキシカムを 10 μM、25 μM、50 μM、100 μM の濃度で 24 時間作用させた AZACB 細胞における各細胞周期の分布について、PI 染色した細胞をフローサイトメトリーにて解析した。各データはそれぞれ 20,000 cells 当たりの各細胞周期の割合を示している。独立した 2 回の実験結果を示した。

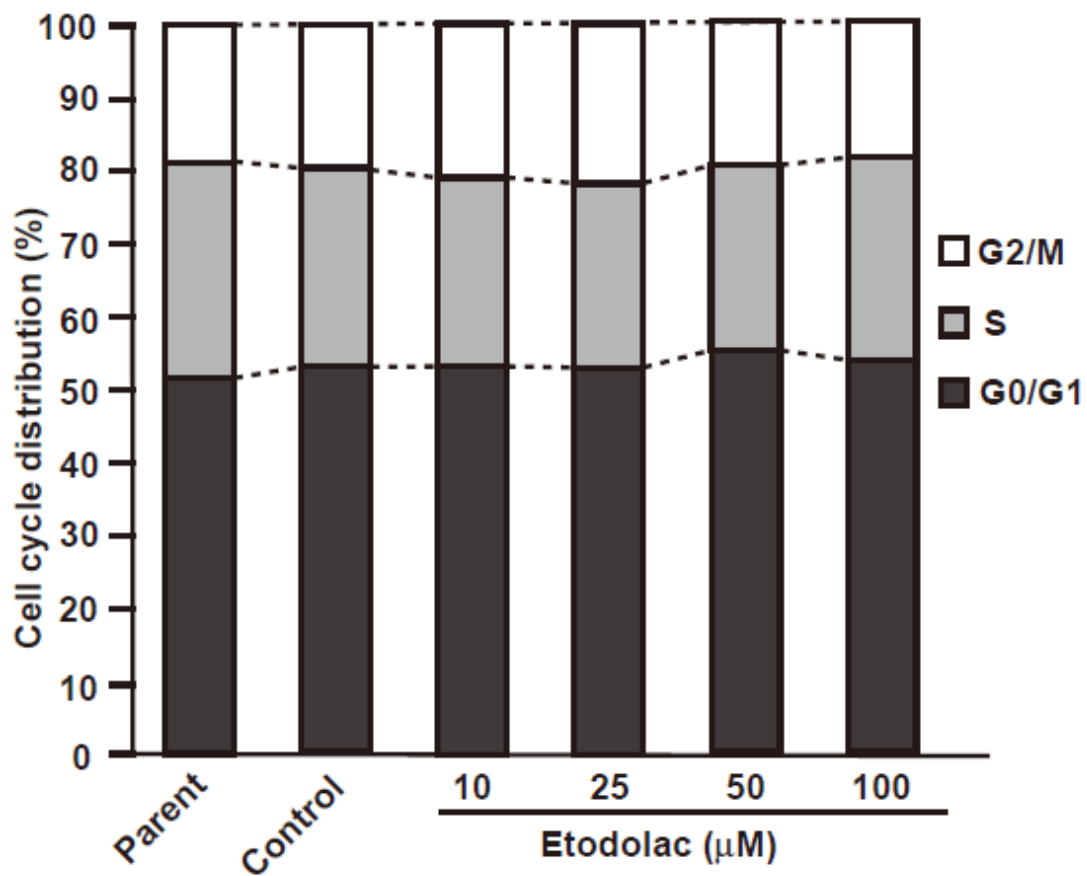


図 1.7. エトドラクの影響による細胞周期の分布

エトドラクを 10 μM、25 μM、50 μM、100 μM の濃度で 24 時間作用させた AZACB 細胞における各細胞周期の分布について、PI 染色した細胞をフローサイトメトリーにて解析した。各データはそれぞれ 20,000 cells 当たりの各細胞周期の割合を示している。独立した 2 回の実験結果を示した。

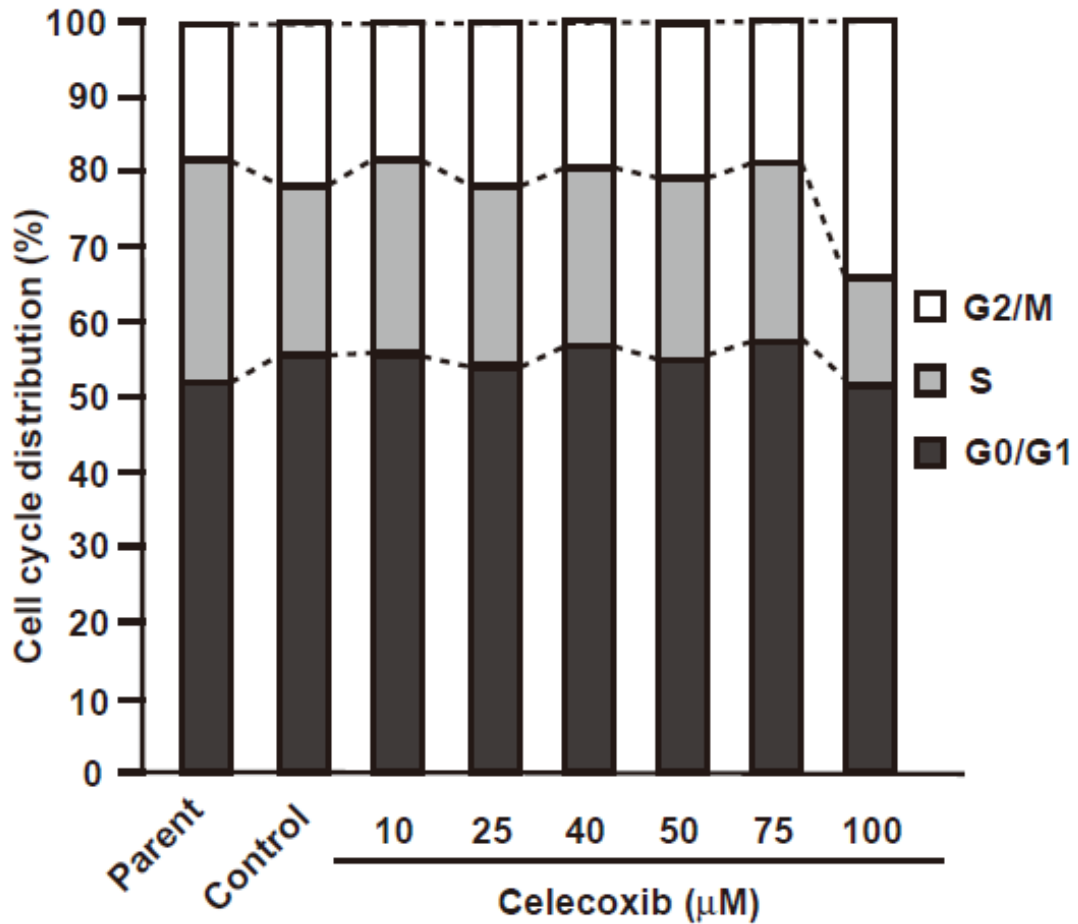


図 1.8. セレコキシブの細胞周期に及ぼす影響

セレコキシブを 10 μ M、25 μ M、40 μ M、50 μ M、75 μ M、100 μ M の濃度で 24 時間作用させた AZACB 細胞における各細胞周期の分布について、PI 染色した細胞をフローサイトメトリーにて解析した。各データはそれぞれ 20,000 cells 当たりの各細胞周期の割合を示している。独立した 2 回の実験結果を示した。

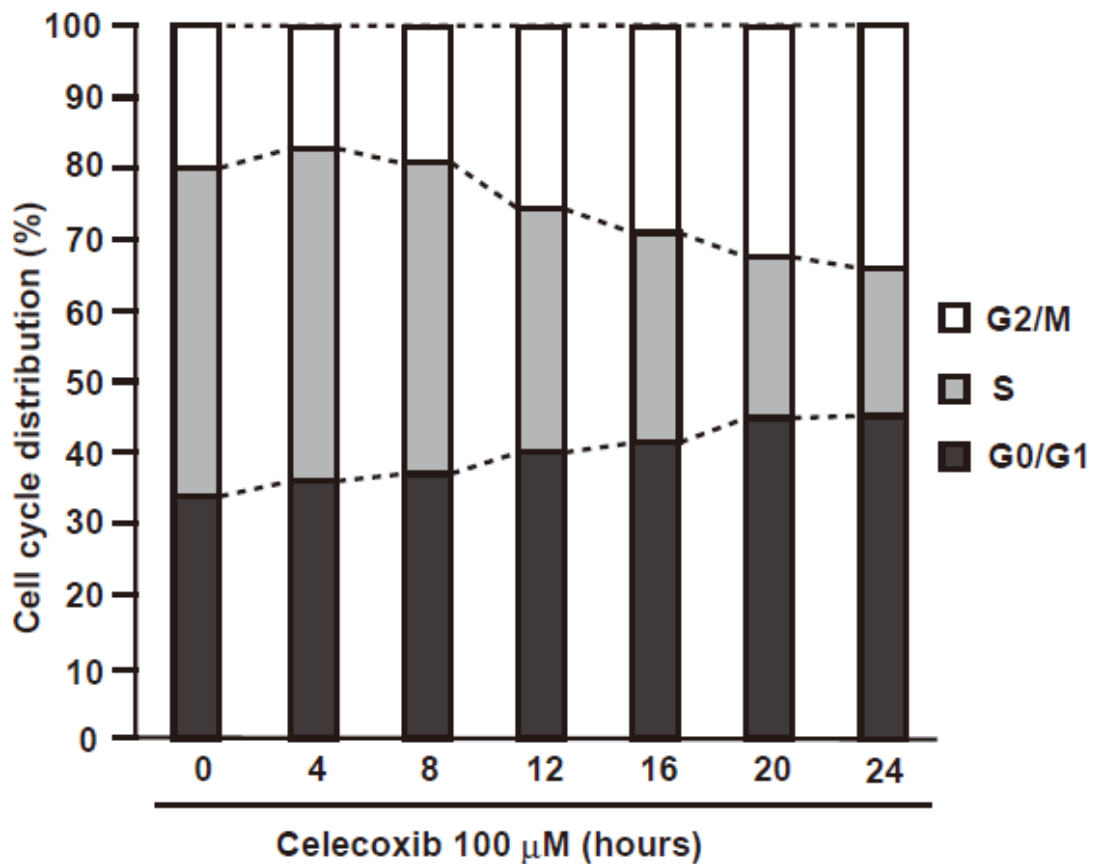


図 1.9. セレコキシブの細胞周期に及ぼす時間依存的な影響

セレコキシブを 100 μ M の濃度で 0-24 時間作用させた AZACB 細胞における各細胞周期の分布について、4 時間ごとに PI 染色した細胞をフローサイトメトリーにて解析した。各データはそれぞれ 20,000 cells 当たりの各細胞周期の割合を示している。独立した 2 回の実験結果を示した。

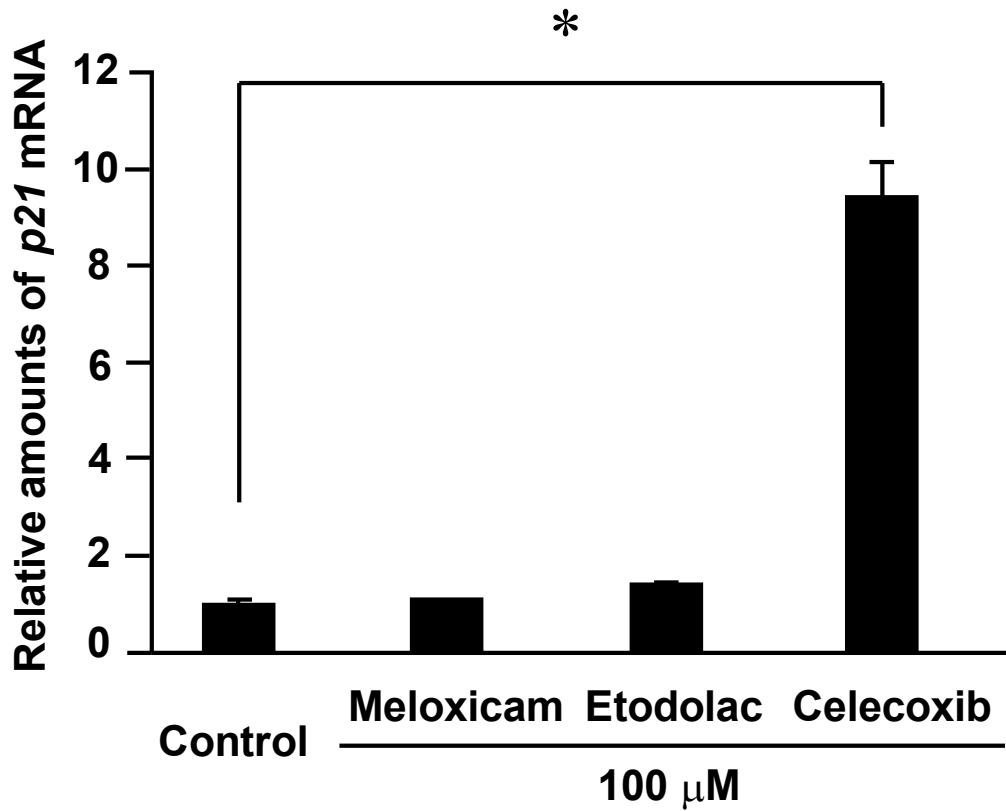


図 1. 10. セレコキシブの p21 mRNA 発現量に及ぼす影響

選択的 COX-2 阻害薬（メロキシカム、エトドラク、セレコキシブ）をそれぞれ 100 μM の濃度で 24 時間作用させた場合の AZACB 細胞における p21 mRNA 量を real-time RT-PCR によって比較した。n=3 とし、平均±標準偏差で示した。

* $P < 0.01$

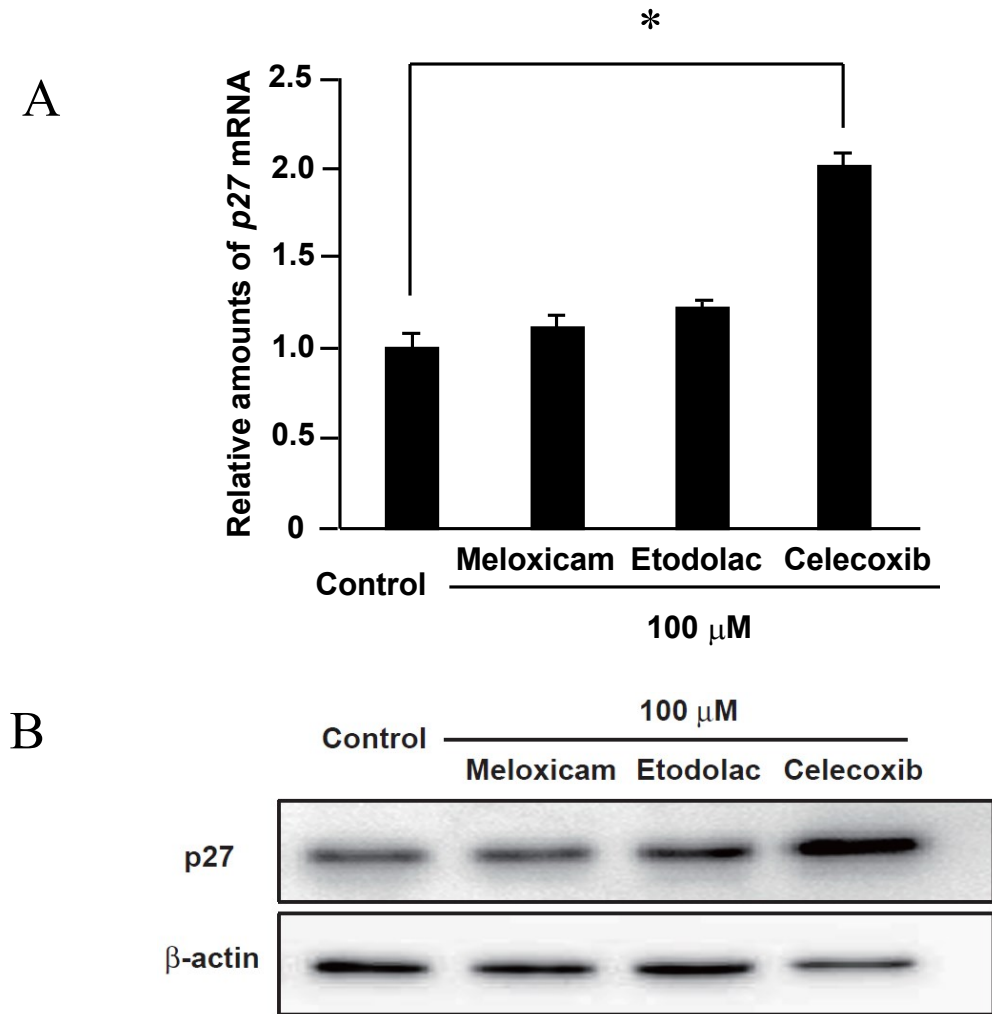
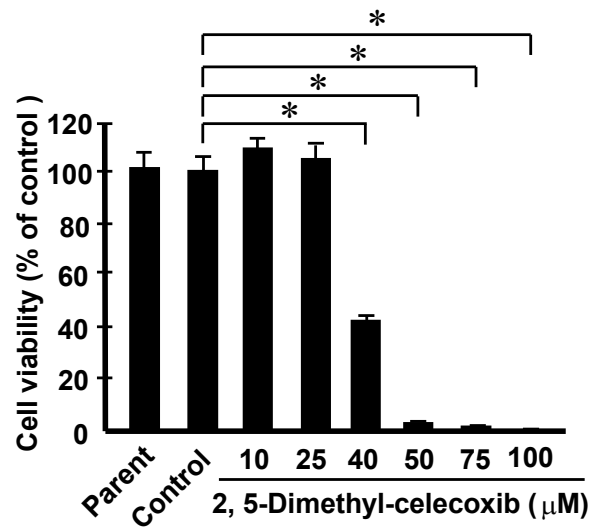


図 1. 11. セレコキシブの p27 発現量に及ぼす影響

選択的 COX-2 阻害薬（メロキシカム、エトドラク、セレコキシブ）をそれぞれ 100 μM の濃度で 24 時間作用させた AZACB 細胞における p27 の発現量を比較した。(A) p27 mRNA 発現量への影響について real-time RT-PCR を用いて比較した。n=3 とし、平均±標準偏差で示した。* $P < 0.01$ (B) p27 タンパク発現量について Western blotting を用いて比較した。

A



B

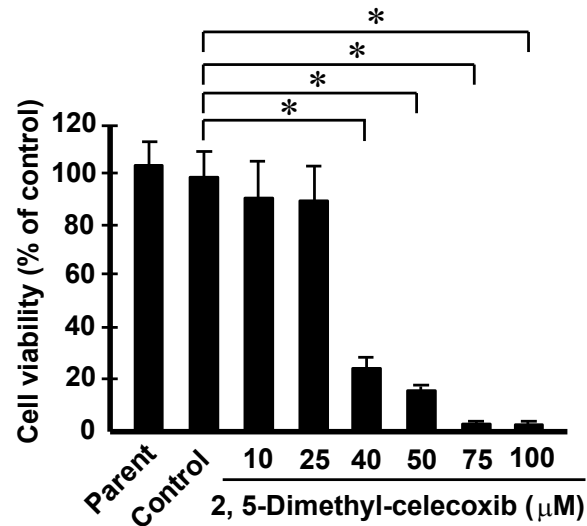


図 1. 12. 2,5-Dimethyl-celecoxib の AZACB 細胞および CS33 細胞の細胞増殖能に及ぼす影響

2,5-Dimethyl-celecoxib を 10 μM、25 μM、40 μM、50 μM、75 μM、100 μM の濃度で 24 時間作用させた AZACB 細胞 (A) または CS33 細胞 (B) の細胞増殖能への影響について、WST-8 assay を用いて比較した。 n=5 とし、平均±標準偏差で示した。 * $P < 0.01$

1.4. 考察

本研究結果から、セレコキシブは AZACB 細胞において PGE₂ 産生量に影響を及ぼすことなく、p21 および p27 を発現誘導することによって、S 期の細胞数を減少させ、細胞増殖を抑制する作用を示すことが明らかとなった。また、COX-2 阻害活性能を欠いたセレコキシブの構造異性体においても、イヌ乳腺腫瘍細胞の増殖能を同様に抑制することが明らかとなった。したがって、セレコキシブは COX-2 非依存的なメカニズムを介して、イヌ乳腺腫瘍細胞の増殖を抑制する作用を示すことが明らかとなった。

イヌ乳腺腫瘍は、遺伝子変異などの点においてヒト乳癌と非常に類似しており、モデル疾患として注目されているが、ヒト乳癌で認められる病理組織型の分布とは大きく異なることが報告されている (Goldschmidt *et al.*, 2011)。特に、イヌ乳腺腫瘍では、悪性の上皮由来細胞と良性の筋上皮由来細胞とが混在する complex type の乳腺腺癌の占める割合が多いことが知られている (Goldschmidt *et al.*, 2011)。本研究で使用した AZACB 細胞は、complex type のイヌ乳腺腺癌から樹立された株化細胞であり、ヌードマウスを用いた担癌実験においても complex type の乳腺腺癌の再現が可能とされている細胞である。そのため、セレコキシブが COX-2 非依存的なメカニズムを介して細胞増殖抑制作用を示すとの本研究結果は、セレコキシブがイヌ乳腺腫瘍の多くの症例において、有効な治療薬で

ある可能性を示唆している。

セレコキシブなどのコキシブ系薬物は、COX-2への選択性が高いために、消化器障害への副作用が軽減されており、長期投与が可能とされている。そのため、コキシブ系薬物であるセレコキシブやロフェコキシブの長期投与によるヒトの大腸腺腫の再発予防効果を検討するためのAPC (adenoma prevention with celecoxib) 試験やAPPROVe (adenomatous polyp prevention on vioxx) 試験といった大規模な臨床試験が実施された。しかし、ロフェコキシブやバルデコキシブなどのコキシブ系薬物を長期投与した場合に、心筋梗塞や脳卒中などを含む心血管系障害の副作用を引き起こすリスクが増大することから、臨床試験が中止されると共に、これら薬物は市場からの撤退を余儀なくされた (Bresalier *et al.*, 2005; Fitzgerald, 2004; Nussmeier *et al.*, 2005; Solomon *et al.*, 2005)。これは、血管内皮細胞において、COX-2を介したPGI₂合成が阻害されたことが原因と考えられているが、その詳細なメカニズムは未だに明らかとなっていない。しかし、セレコキシブにおけるその発症リスクは、アスピリンなどのCOX-2選択性に乏しいNSAIDsと同程度であることが、その後の研究で示されている (Graham *et al.*, 2005; White *et al.*, 2007)。したがって、セレコキシブを抗腫瘍薬や癌の化学療法薬として長期投与することは可能と考えられており、ヒトでの臨床応用化を目指した様々な研究が実施されている。しかし、イヌなどの動物におけるコキシ

ブ系薬物の心血管系への影響については、詳細が明らかとなっていない。今後、イヌにおいてコキシブ系薬物を長期投与した場合の安全性の確立が待たれる。

以前より、COX-2 選択性の乏しいアスピリンが、大腸がんや乳がんなどの様々な悪性腫瘍に対して、抗腫瘍作用を示すことが知られている。特に、PIK3 (phosphoinositide 3-kinase) CA の変異が認められる大腸がん患者が、アスピリンを常用している場合には、予後の改善が認められることが報告されている (Liao *et al.*, 2013)。また、このように各 NSAIDs の抗腫瘍活性の強さが、COX-2 阻害活性や COX-2 選択性とは相関しない現象が広く知られており、COX-2 非依存的な抗腫瘍作用メカニズムの解明を目指した研究が様々な観点から実施されている。イヌ乳腺腫瘍では、COX-2 選択性の高い NS-398 が、COX-2 の過剰発現している CMT12 細胞において、PGE₂ 産生阻害を介した COX-2 依存的な細胞増殖抑制作用を示すことが報告されている (Brunelle *et al.*, 2006)。しかし、NSAIDs が COX-2 非依存的な抗腫瘍作用をイヌ乳腺腫瘍において示すか否かについてはいずれの薬剤においても報告されていない。本研究は、セレコキシブがイヌ乳腺腫瘍に対して COX-2 非依存的な抗腫瘍作用を示す可能性を指摘した最初の研究であり、臨床応用を目指す上で非常に価値があると考えられる。

ヒトの様々ながん細胞を使用した研究から、セレコキシブは様々な COX-2 非依存的なメカニズムを介して抗腫瘍作用を示すことが明らかとなっている

(Grosch *et al.*, 2006)。特に、セレコキシブが COX-2 発現量に関係なく p21 および p27 発現量の増加を引き起こし、細胞増殖抑制作用やアポトーシス誘導作用を示すことが様々な細胞種において認められている (Grosch *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2004)。CDKI である p21 や p27 は、細胞周期の S 期への進入を妨げる G1 チェックポイント機構を構成する中心的な分子である。したがって、本研究においても p21 および p27 発現量の増加に伴う G1 arrest が誘導され、S 期細胞数が減少したと考えられる。しかし、本研究ではセレコキシブによる p27 mRNA の発現誘導作用が軽度である一方、タンパク発現量は著明に増加した。先行研究では、p27 のタンパク発現量の増加を評価している研究が殆どであり、セレコキシブが p27 の転写活性に及ぼす影響を評価した研究は認められない。また、p27 はプロテアソームによる分解が発現量の調節に重要であることが知られている (Pagano *et al.*, 1995; Tomoda *et al.*, 1999)。本研究結果で認められた p27 の mRNA とタンパク発現量の変化の相違は、セレコキシブがプロテアソームによる p27 の分解を抑制している可能性が考えられる。また、神経膠芽腫細胞におけるセレコキシブの作用を検討した研究において、サイクリン B の転写を抑制することが報告されている (Kardosh *et al.*, 2004)。セレコキシブが G2/M arrest を引き起こす可能性も本研究では示唆されたが、この現象は M 期の進行に参与するサイクリン B の発現抑制に起因している可能性が考えられる。

本研究結果から、セレコキシブがイヌ乳腺腫瘍細胞において COX-2 非依存的な細胞増殖抑制作用を示すことが明らかとなった。したがって、イヌ乳腺腫瘍の COX-2 発現量に関係なく、セレコキシブが抗腫瘍作用を示す可能性が示唆され、広範なイヌ乳腺腫瘍の症例への臨床適応が可能であると考えられた。

1.5. 要約

これまでに、ヒト由来のがん細胞を用いた研究結果から、選択的 COX-2 阻害薬であるセレコキシブは 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。

イヌ乳腺腫瘍細胞におけるセレコキシブの COX-2 非依存的な抗腫瘍作用を評価するためには、COX-2 依存的な抗腫瘍作用の影響を出来る限り低減する必要がある。そのために、他のイヌ乳腺腫瘍細胞株（CF33 細胞および CF41.MG 細胞）に比べて COX-2 タンパク発現量が著しく少ない AZACB 細胞を用いて、以後の研究を実施した。最終濃度 0 ~ 100 μ M の濃度の選択的 COX-2 阻害薬であるセレコキシブ、メロキシカムおよびエトドラクを 24 時間作用させ、細胞増殖能へ及ぼす影響を評価した。その結果、100 μ M のセレコキシブを作用させた場合

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、セレコキシブを作用させた場合のみ G0/G1 arrest および G2/M arrest を誘導し、S 期細胞数が減少した。細胞周期を負に制御する 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 の発現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 の細胞増殖能への影響について検討したところ、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、COX-2 が過剰発現している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。

本研究結果より、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。

第二章

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

2.1. 背景

多細胞生物には、遺伝的なエラーが生じた細胞の排除や過剰な細胞増殖を抑制するために細胞死の機構が備わっている。細胞死は形態学的特徴からアポトーシスとネクローシスに大別されている。アポトーシスは、クロマチンの核膜周囲への凝縮や核の断片化を特徴とする細胞死であり、抗腫瘍薬による細胞毒性や放射線照射などによって細胞がストレスを受けた場合などに誘導される。また、多くのがん細胞では、アポトーシスに対して抵抗性を獲得していることが知られており (Hanahan *et al.*, 2011)、がん細胞の増殖を抑制するためにはアポトーシスを誘導する必要があると考えられている。

アポトーシスでは、システインプロテアーゼの一種であるカスパーゼの活性化を介して CAD (caspase-activated DNase) が DNA の断片化を引き起こす (Enari *et al.*, 1998)。一部例外を除いて、多くのアポトーシス誘導刺激はミトコンドリアに集約されることが知られており、ミトコンドリア外膜の透過性 (mitochondrial outer membrane permeabilization; MOMP) の亢進によって、シトクロム *c* が放出されることが、カスパーゼ活性化の引き金となっている (Chipuk *et al.*, 2008; Tsujimoto, 2003; Zheng *et al.*, 2016)。MOMP を調節している分子としては、Bcl-2 ファミリータンパク質が知られており、その構造や機能の類似性から 3 つのサブファミリーに分類されている。Bcl-2 ファミリータンパク質には、

アポトーシスを抑制する Bcl-2 サブファミリー (Bcl-2 や Bcl-xL など)、アポトーシスを促進する Bax サブファミリー (Bax や Bak など) および BH3-only タンパク質 (Bim や Bid) がある。アポトーシス促進分子とアポトーシス抑制分子は、互いに heterodimer を形成し、相互の機能を干渉し合っているが、アポトーシス促進分子がアポトーシス抑制分子の働きを凌駕した場合に MOMP が亢進し、シトクロム *c* が放出される (Chipuk *et al.*, 2008; Ola *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2016)。細胞質へと放出されたシトクロム *c* は Apaf-1 と結合し、カスパーゼ 9 との複合体 (apoptosome) を形成し、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 を活性化させて、アポトーシスが実行される (Brenner *et al.*, 2009; Rong *et al.*, 2008)。

前章の研究結果から、セレコキシブは AZACB 細胞において著名な細胞増殖抑制作用を示すことが明らかとなった。このように薬物を作用させた場合に、著しい細胞増殖抑制が生じた場合には、アポトーシスが誘導されている可能性が高いと考えられる。また、セレコキシブにはアポトーシス誘導作用が存在することが、様々ながん細胞を用いた研究から報告されている (Arico *et al.*, 2002; Catalano *et al.*, 2004; Grosch *et al.*, 2001; Hsu *et al.*, 2000; Nam *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004)。しかし、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については詳細な研究は実施されておらず、依然として不明な点が多い。

したがって、本研究では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有無について検討することを目的とした。

2.2. 材料および方法

2.2.1. 使用細胞および培養方法、被験物質

本研究では、第一章と同様の手法および被験物質等を用いて実験を行った。

2.2.2. アポトーシス細胞（sub-G0/G1 期細胞）の検出

AZACB 細胞を 100 mm 細胞培養ディッシュに 3×10^5 cells の条件で播種し、24 時間の培養後、被験物質を 24 時間作用させものを以下の手順で測定および解析した。

洗浄および固定

PBS で洗浄した細胞を攪拌しながら、氷冷した 70%エタノール 1 ml を加え、 -30°C で一晩固定する。その後、3,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を除去する。

染色

Promidium iodide (PI) / RNase staining buffer (BD Pharmingen, CA, USA) を 500 μl 加え、十分にピペッティングしたのちにセルストレーナーキャップ付き 5 ml ラウンドチューブ (Becton Dickinson, NJ, USA) へと全サンプルを移し、 4°C で 15

分間染色する。

測定および解析

FACS Canto (Becton Dickinson, NJ, USA) を用いて、各細胞の DNA 量を測定した。また、各細胞の DNA 量から sub-G0/G1 期を示す細胞の割合を Flow Jo7 (Tree Star, OR, USA) を用いて解析した。

2.2.3. アポトーシス細胞のステージ分類

100 mm 細胞培養ディッシュに 3×10^5 cells の条件で AZACB 細胞を播種し 24 時間の培養後、被験物質を 24 時間作用させたものを以下の手順で測定および解析した。

洗浄

0.25% トリプシン溶液 (和光純薬工業株式会社, Osaka, Japan) を用いて細胞を剥離し、その後 1,200 rpm で 5 分間遠心した細胞に、PBS を用いた洗浄と遠心を 2 回繰り返した。

染色

ApoAlert[®] Annexin V-FITC Apoptosis kit (Clontech Laboratories, CA, USA) を使用し、付属の Binding buffer に細胞を懸濁させ、十分にピペッティングしたのちにセルストレーナーキャップ付き 5 ml ラウンドチューブ (Becton Dickinson, NJ, USA) に全サンプルを移し、Annexin V-FITC と PI を用いて室温で 15 分間染色

した。

測定および解析

FACS Canto (Becton Dickinson, NJ, USA) を用いて、各細胞が示す蛍光波長を測定した。アポトーシスのステージとして、Annexin V-FITC (+) / PI (-) を初期アポトーシス細胞、Annexin V-FITC (+) / PI (+) を後期アポトーシス細胞とし、Flow Jo7 (Tree Star, OR, USA) を用いて、各細胞の示すアポトーシスのステージ分類を実施した。

2. 2. 4. Western blotting

第一章と同様の手順でタンパク質の抽出およびタンパク質の濃度定量を行い、SDS-PAGE および trans-blotting を実施した。

一次抗体

一次抗体としては anti-Bax rabbit polyclonal antibody (Millipore, MA, USA)、anti-Bim rabbit monoclonal antibody (Cell Signalling, MA, USA) をそれぞれ 1,000 倍に希釈し、使用した。また、サンプルのローディング量を比較するための内部標準として、anti- β -actin mouse monoclonal antibody (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) を使用した。

2. 2. 5. Real-time RT-PCR

Total RNA の抽出には TRIzol reagent (Life Technologies, CA, USA)、cDNA の合成には PrimeScript RT Master Mix (タカラバイオ株式会社, Shiga, Japan)、Real-time RT-PCR 法には SYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ株式会社, Shiga, Japan) をそれぞれ使用し、第一章と同様の条件下で実験を実施した。使用したプライマーの配列は、*Bcl-2* (forward, 5'-TGAACCGGCATCTGCACAC-3'; reverse, 5'-GAGCAGCGCCTTCAGAGACA-3') であり、各プライマーはタカラバイオ株式会社 (Shiga, Japan) より購入した。

2. 2. 6. ミトコンドリア外膜透過性の検出

100 mm 細胞培養ディッシュに 3×10^5 cells の条件下で AZACB 細胞を播種し、24 時間の培養後、被験物質を 24 時間作用させたものを以下の手順で測定および解析を行った。

洗浄

浮遊細胞は培養液ごと回収し、接着細胞は PBS で洗浄した後に 0.25% トリプシン-EDTA 溶液 (和光純薬工業株式会社, Osaka, Japan) を用いて細胞を剥離し、1,200 rpm で 5 分間遠心した。上清を除去した後、DMEM を 1 ml 加えて再懸濁したものを使用した。

染色

MitoPT tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) assay kit (ImmunoChemistry Technologies, MN, USA) を使用し、取扱説明書に従って実験を行った。付属の working solution を最終濃度 1 nM となるように DMEM に加え、37°C および 5% CO₂ 条件下において 5 分間染色した。1,200 rpm で遠心し、上清を除去した後に 1 ml の Assay buffer を用いて細胞を懸濁し、セルストレーナーキャップ付き 5 ml ラウンドチューブ (Becton Dickinson, NJ, USA) に全量を移し、直ちに測定を行った。

測定および解析

FACS Canto (Becton Dickinson, NJ, USA) を用いて、各細胞の蛍光波長を測定し、Flow Jo7 (Tree Star, OR, USA) を用いてミトコンドリア外膜の透過性の変化を解析した。

2.2.7. カスパーゼ 3 およびカスパーゼ 7 の活性測定

カスパーゼ 3 およびカスパーゼ 7 の活性への影響は、Caspase-Glo 3/7 assay (Promega, WI, USA) を用い、取扱説明書に従って測定した。AZACB 細胞を 2.5×10^3 cells/well の条件で 96-well の white opaque tissue culture plates (BD Falcon, Tokyo, Japan) に播種し 24 時間培養した。その後、被験物質を 24 時間作用させたものを LB 960 Microplate Luminometer Centro (Berthold, Tokyo, Japan) を用いて、

カスパーゼ 3 およびカスパーゼ 7 の活性を測定した。30 分ごとに測定し、発光シグナルの減弱が認められる 3 時間まで発光の変化をモニタリングした。

2.2.8. 統計学的解析

本研究で得られたデータは、平均値 ± 標準偏差で示した。統計学的解析には、Bonferroni 法および Mann-Whitney 検定を用いた。P 値 < 0.05 の場合に統計学的に有意と判断した。

2.3. 結果

2.3.1. セレコキシブによるアポトーシス誘導作用の検討

前章の結果より、100 μ M のセレコキシブが AZACB 細胞において増殖抑制作用を示すことが明らかとなった。そのため、本章ではセレコキシブによる著明な増殖抑制作用が、アポトーシス誘導作用に起因するか否かについての検討を行なった。DNA を含む核の変性が認められないネクローシスとは異なり、アポトーシスでは DNA の断片化が認められる (Cryns *et al.*, 1998)。そのため、PI を用いて断片化した DNA を染色しフローサイトメトリーにより検出する方法でアポトーシス誘導能の有無を評価した。前章の結果を裏付けるように、細胞増殖抑制作用を示さないメロキシカムまたはエトドラクには、アポトーシス誘導作

用は認められなかった (図 2. 1.および 図 2. 2.)。一方で、セレコキシブ 100 μM を 24 時間作用させた AZACB 細胞においては、アポトーシスが誘導された (図 2. 3.)。さらに、セレコキシブのアポトーシス誘導作用は 0–24 時間において、時間依存的に誘導されることも観察された (図 2. 4.)。また、セレコキシブによるアポトーシス誘導作用について、より詳細に解析するために、annexin-V および PI の二重染色を実施して、初期アポトーシス細胞および後期アポトーシス細胞の割合を測定した。その結果、セレコキシブ 100 μM を作用させた AZACB 細胞でのみ初期アポトーシスおよび後期アポトーシスを示す細胞数の増加が認められた (図 2. 5.および図 2. 6.)。本研究結果より、セレコキシブに認められる著明な細胞増殖抑制作用は、アポトーシスの誘導に基づく現象であることが示唆された。

2. 3. 2. DMC によるアポトーシス誘導作用の検討

前章の結果より、セレコキシブが COX-2 非依存的に細胞増殖を抑制することが示唆されたことから、COX-2 非依存的にセレコキシブがアポトーシスを誘導しているか否かを検討するために、DMC を作用させた場合のアポトーシス細胞数の変化についてフローサイトメトリーを用いて計測した。その結果、40 μM 以上の DMC を作用させた AZACB 細胞では、コントロール細胞と比較して著明に

アポトーシスが誘導されることが明らかとなった (図 2.7.)。したがって、セレコキシブによるアポトーシス誘導作用は、COX-2 非依存的なメカニズムを介している可能性が示唆された。

2.3.3. セレコキシブがアポトーシス関連分子の発現量に及ぼす影響の評価

アポトーシスの誘導には、Bcl-2 ファミリータンパク質の発現量の変化が生じ、ミトコンドリアへとアポトーシスシグナルを伝達することが重要な意味を持つ。そこで、セレコキシブによるアポトーシス誘導メカニズムについて、より詳細な解析をするために、いずれも Bcl-2 ファミリータンパク質に分類されるアポトーシス促進分子の Bax および Bim、アポトーシス抑制分子の Bcl-2 の発現量の変化をそれぞれ評価した。アポトーシス誘導作用を示さないメロキシカムまたはエトドラクを 100 μ M で作用させた AZACB 細胞では、コントロールと比べ Bim および Bax、Bcl-2 の発現量に大きな変化は認められなかった (図 2.8.および図 2.9.)。しかし、セレコキシブ 100 μ M を作用させた AZACB 細胞においては、Bax およびスプライシングアイソフォーム (Bim_{EL}、Bim_L、Bim_S) を含む Bim のタンパク発現量が増加すると共に、Bcl-2 の mRNA 発現量の減少が認められた (図 2.8.および図 2.9.)。これらの結果より、セレコキシブはアポトーシス抑制分子の発現量を減少させると共に、アポトーシス促進分子の発現量を増加させ

て、ミトコンドリアへとアポトーシスシグナルを伝達している可能性が示唆された。

2.3.4. セレコキシブが及ぼすミトコンドリア外膜透過性への影響の評価

Bcl-2 ファミリータンパク質は、MOMP に影響を及ぼすことによってアポトーシスを制御していることが知られている。そこで、セレコキシブによる MOMP への影響を評価するために、ミトコンドリア外膜に親和性の強い蛍光色素 tetramethylrhod-amine ethyl ester (TMRE) がミトコンドリア中に保持されている量から MOMP の変化を測定する実験を行なった。メロキシカムおよびエトドラクを作用させた AZACB 細胞では、TMRE の蛍光強度に変化は認められなかったが、セレコキシブ 100 μM では著しい蛍光強度の減弱が観察された (図 2. 10.)。本結果より、セレコキシブが引き起こした Bcl-2 ファミリータンパク質の発現パターンの変化はミトコンドリアへと影響を及ぼし、MOMP を亢進している可能性が示唆された。

2.3.5. セレコキシブによるカスパーゼ 3 およびカスパーゼ 7 の活性の比較

セレコキシブ 100 μM はアポトーシスを誘導するか否かについて、より客観的な指標を用いて検討するために、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 の活性に及ぼす影響について評価した。

アポトーシス誘導作用を示さないメロキシカムまたはエトドラクでは、カスパーゼ 3 およびカスパーゼ 7 の活性に大きな変化は認められなかった。しかし、アポトーシス誘導作用が認められるセレコキシブ 100 μM を作用させた AZACB 細胞では、コントロールに比べてカスパーゼ 3 およびカスパーゼ 7 が著しく活性化していることが明らかとなった (図 2. 11.)。本研究結果より、セレコキシブはカスパーゼ 3 およびカスパーゼ 7 を活性化させ、アポトーシスを誘導していることが示唆された。

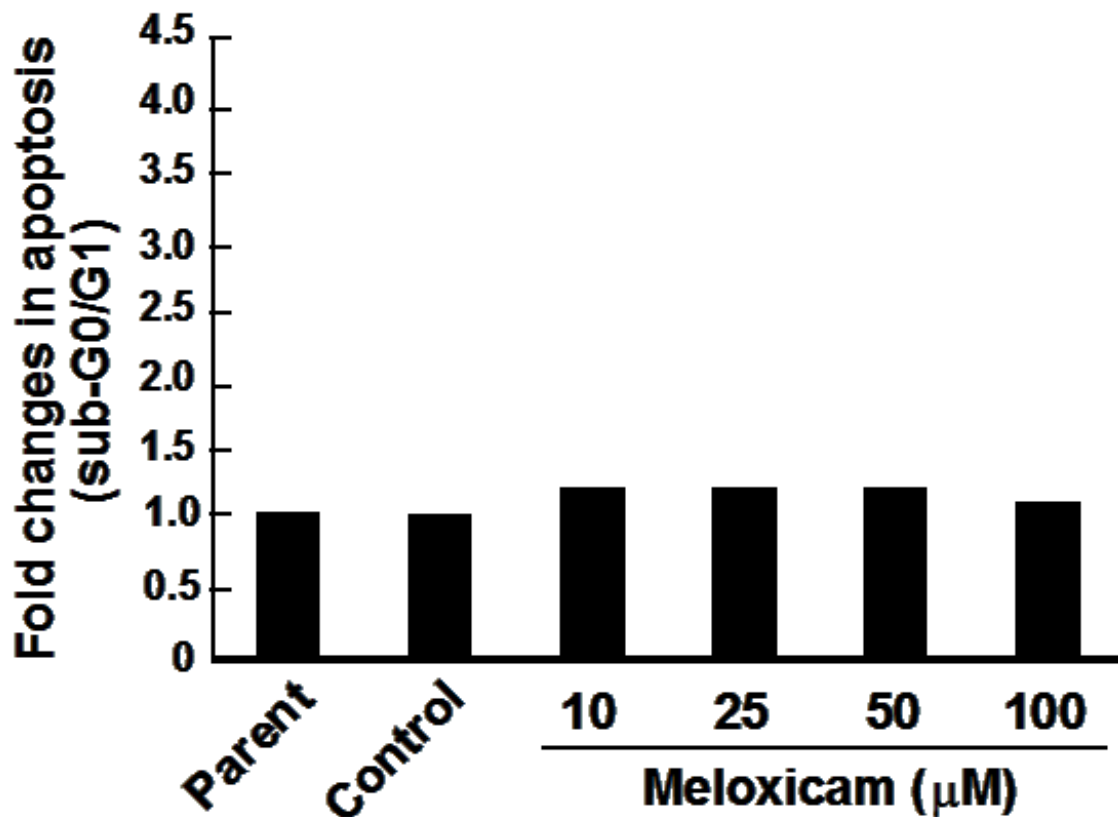


図 2.1. メロキシカムによるアポトーシス誘導作用の検討

メロキシカムを 10 μM 、25 μM 、50 μM 、100 μM の濃度で 24 時間作用させた AZACB 細胞におけるアポトーシス細胞数について、フローサイトメトリーを用いて比較した。Parent は無処理の細胞、Control は溶媒である DMSO を最終濃度 0.1% で作用させた細胞である。各データは、それぞれ 20,000 cells 当たりのアポトーシス細胞数の割合について、control を 1 として示している。独立した 2 回の実験結果を示した。

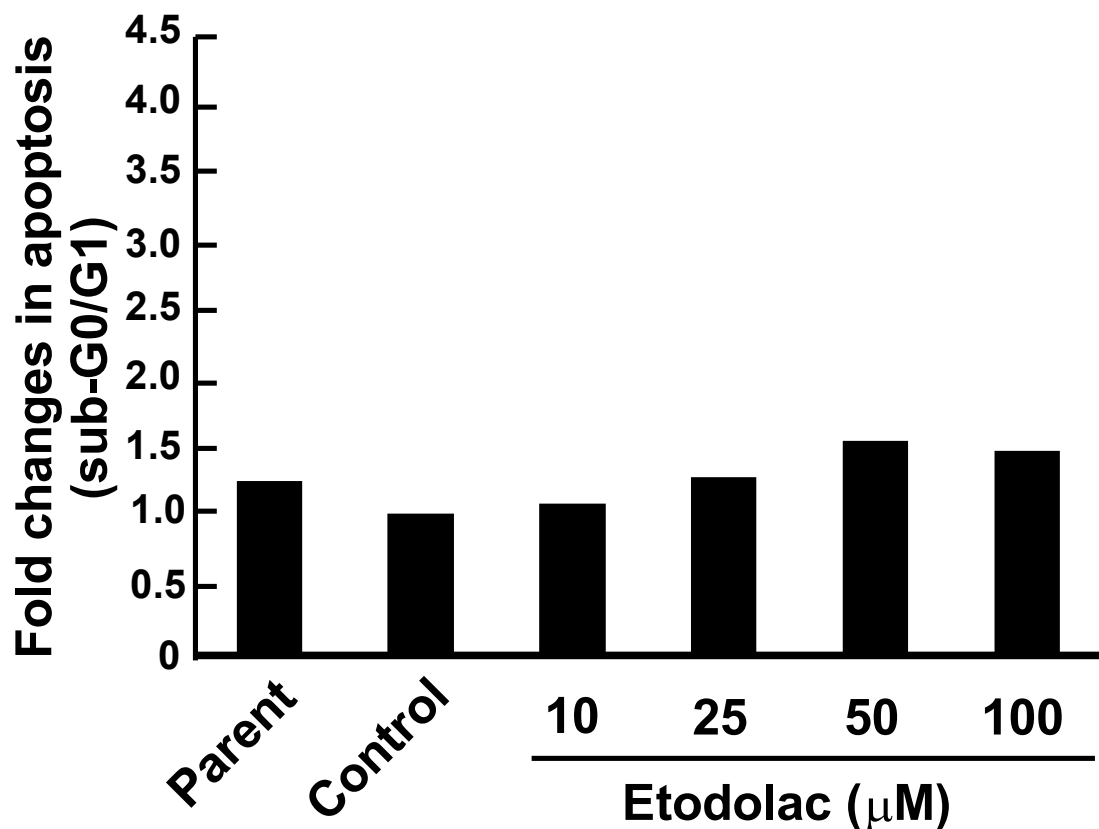


図 2.2. エトドラクによるアポトーシス誘導作用の検討

エトドラクを 10 μM、25 μM、50 μM、100 μM の濃度で 24 時間作用させた AZACB 細胞におけるアポトーシス細胞数について、フローサイトメトリーを用いて比較した。Parent は無処理の細胞、Control は溶媒である DMSO を最終濃度 0.1% で作用させた細胞である。各データは、それぞれ 20,000 cells 当たりのアポトーシス細胞数の割合について、control を 1 として示している。独立した 2 回の実験結果を示した。

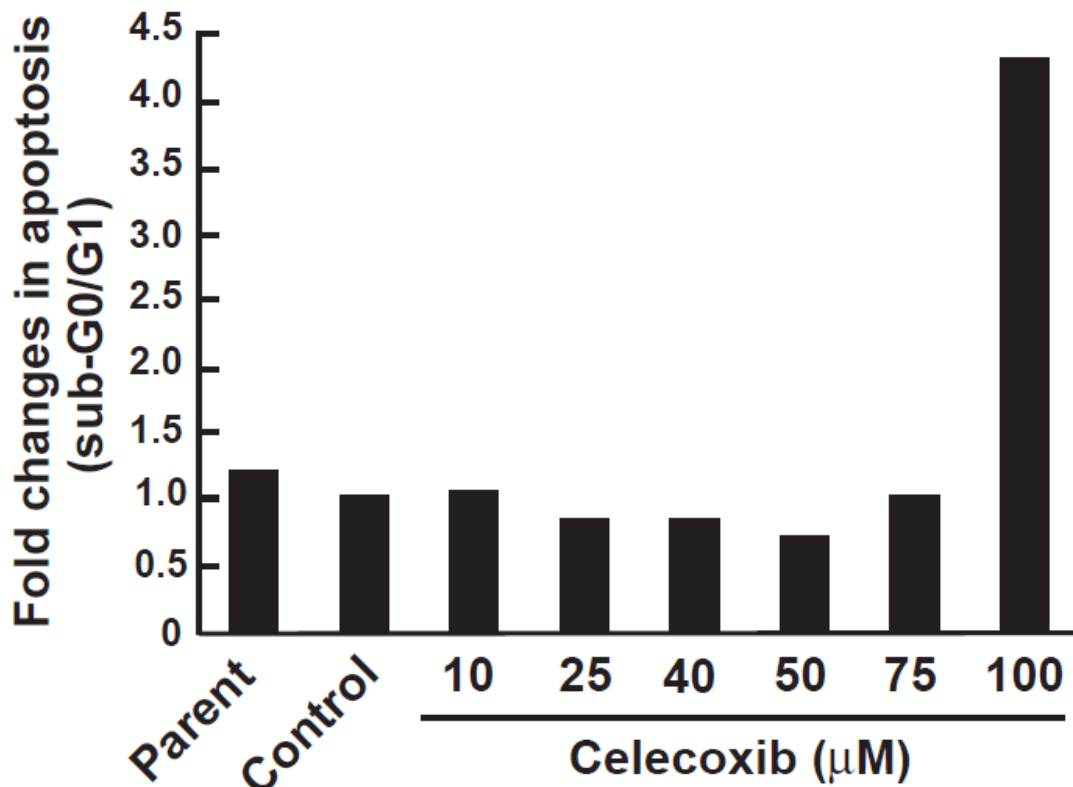


図 2.3. セレコキシブによるアポトーシス誘導作用の検討

セレコキシブを 10 μM 、25 μM 、40 μM 、50 μM 、75 μM 、100 μM の濃度で 24 時間作用させた AZACB 細胞におけるアポトーシス細胞数について、フローサイトメトリーを用いて比較した。Parent は無処理の細胞、Control は溶媒である DMSO を最終濃度 0.1% で作用させた細胞である。各データは、それぞれ 20,000 cells 当たりのアポトーシス細胞数の割合について、control を 1 として示している。独立した 2 回の実験結果を示した。

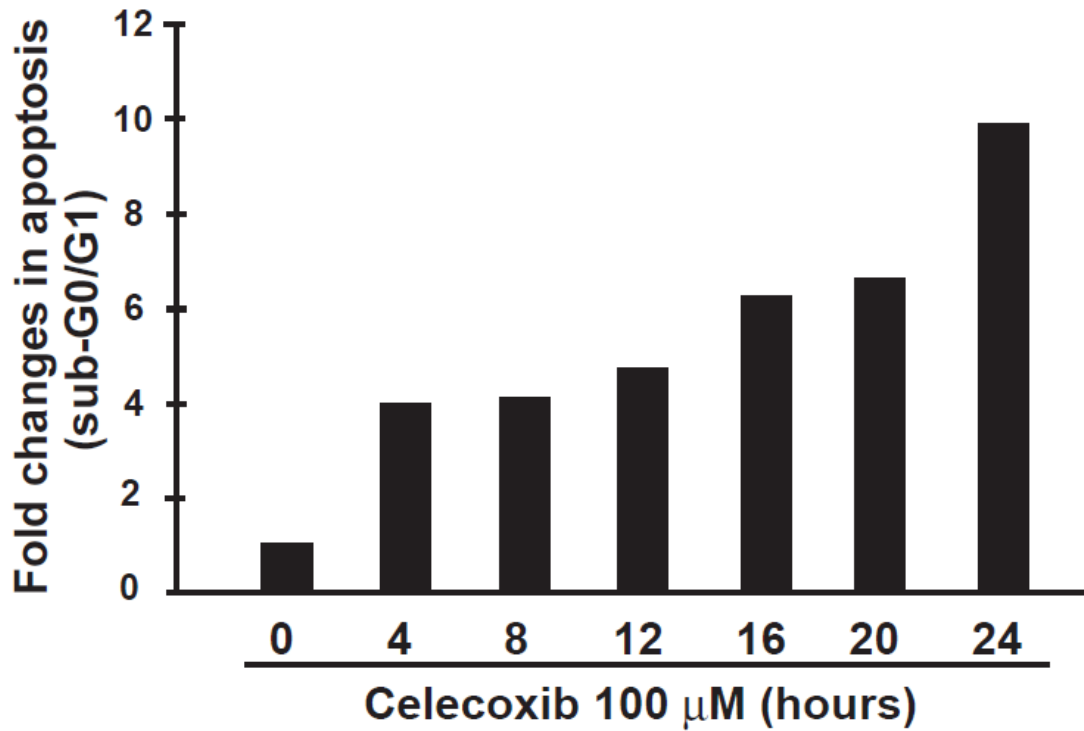


図 2.4. セレコキシブによる時間依存的なアポトーシス誘導作用

セレコキシブを 100 μ M の濃度で 0–24 時間作用させた AZACB 細胞におけるアポトーシス細胞数の変化について、フローサイトメトリーを用いて比較した。各データは、それぞれ 20,000 cells 当たりのアポトーシス細胞数の割合について、セレコキシブの作用が 0 時間の細胞を 1 として示している。独立した 2 回の実験結果を示した。

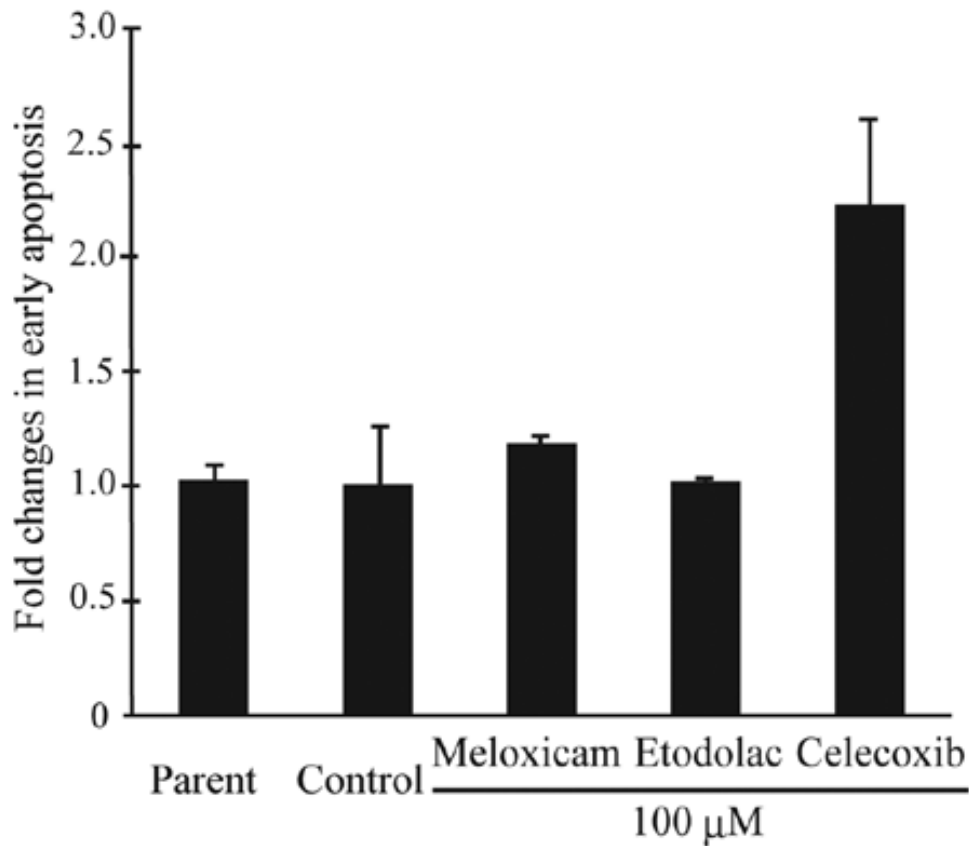


図 2.5. 選択的 COX-2 阻害薬の初期アポトーシス細胞数に及ぼす影響

選択的 COX-2 阻害薬（メロキシカム、エトドラク、セレコキシブ）を 24 時間作用させた AZACB 細胞における初期アポトーシス細胞（Annexin-V⁺, PI⁻）の割合をフローサイトメトリーにより評価した。Parent は無処理の細胞、Control は溶媒である DMSO を最終濃度 0.1% で作用させた細胞である。各データはそれぞれ 20,000 cells の細胞において初期アポトーシスを示す細胞数を測定する実験を独立して 2 回実施し、アポトーシスが誘導された細胞の割合を平均±標準偏差で示している。なお、Control の初期アポトーシスを 1 として表している。

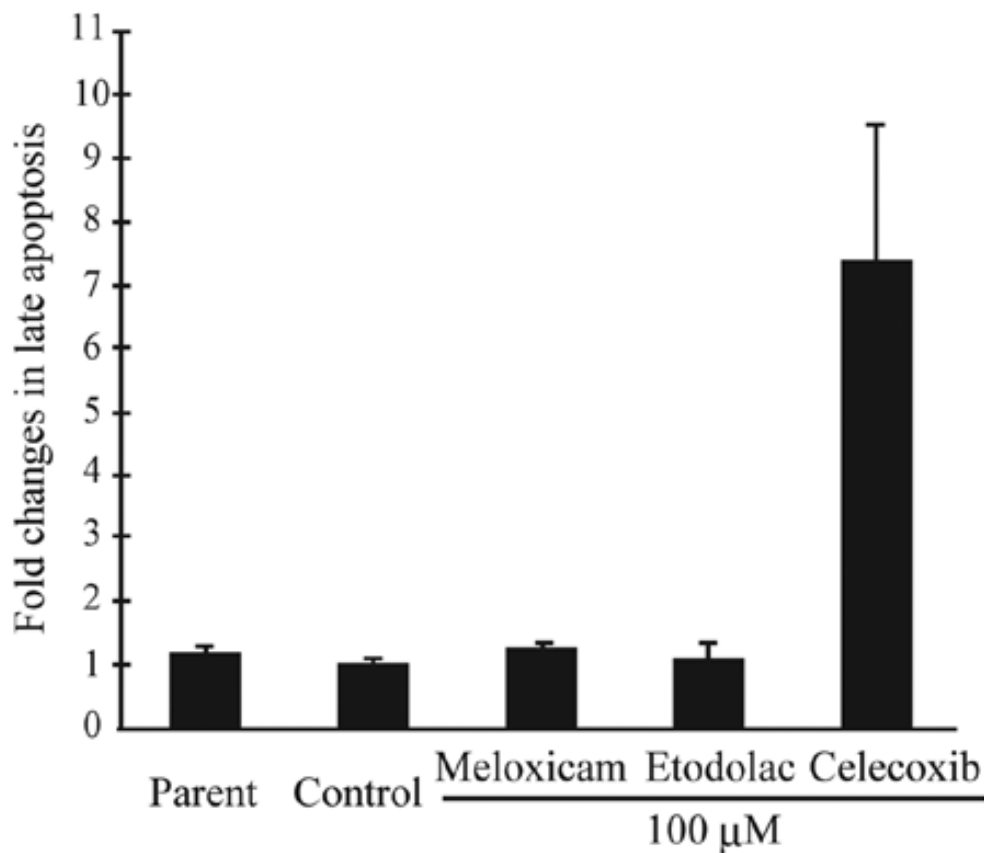


図 2. 6. 選択的 COX-2 阻害薬の後期アポトーシス細胞数に及ぼす影響

選択的 COX-2 阻害薬（メロキシカム、エトドラク、セレコキシブ）を 24 時間作用させた AZACB 細胞における後期アポトーシス細胞（Annexin-V⁺, PI⁺）の割合をフローサイトメトリーにより評価した。Parent は無処理の細胞、Control は溶媒である DMSO を最終濃度 0.1% で作用させた細胞である。各データはそれぞれ 20,000 cells の細胞において後期アポトーシスを示す細胞数を測定する実験を独立して 2 回実施し、アポトーシスが誘導された細胞の割合を平均±標準偏差で示している。なお、Control の初期アポトーシスを 1 として表している。

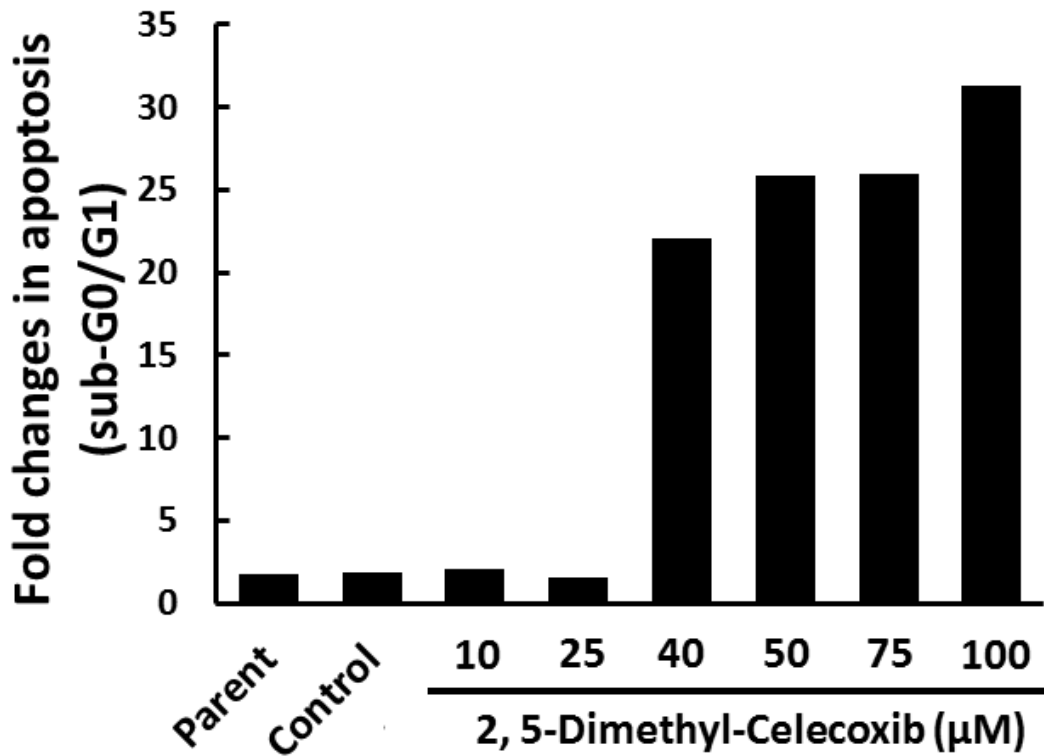


図 2.7. DMC によるアポトーシス誘導作用

DMC を 10 μM、25 μM、40 μM、50 μM、75 μM、100 μM の濃度で 24 時間作用させた AZACB 細胞におけるアポトーシス細胞数について、フローサイトメトリーにより比較した Parent は無処理の細胞、Control は溶媒である DMSO を最終濃度 0.1% で作用させた細胞である。各データは、それぞれ 20,000 cells 当たりのアポトーシス細胞数の割合について、control の細胞を 1 として示している。この実験は独立して 2 回実施した。

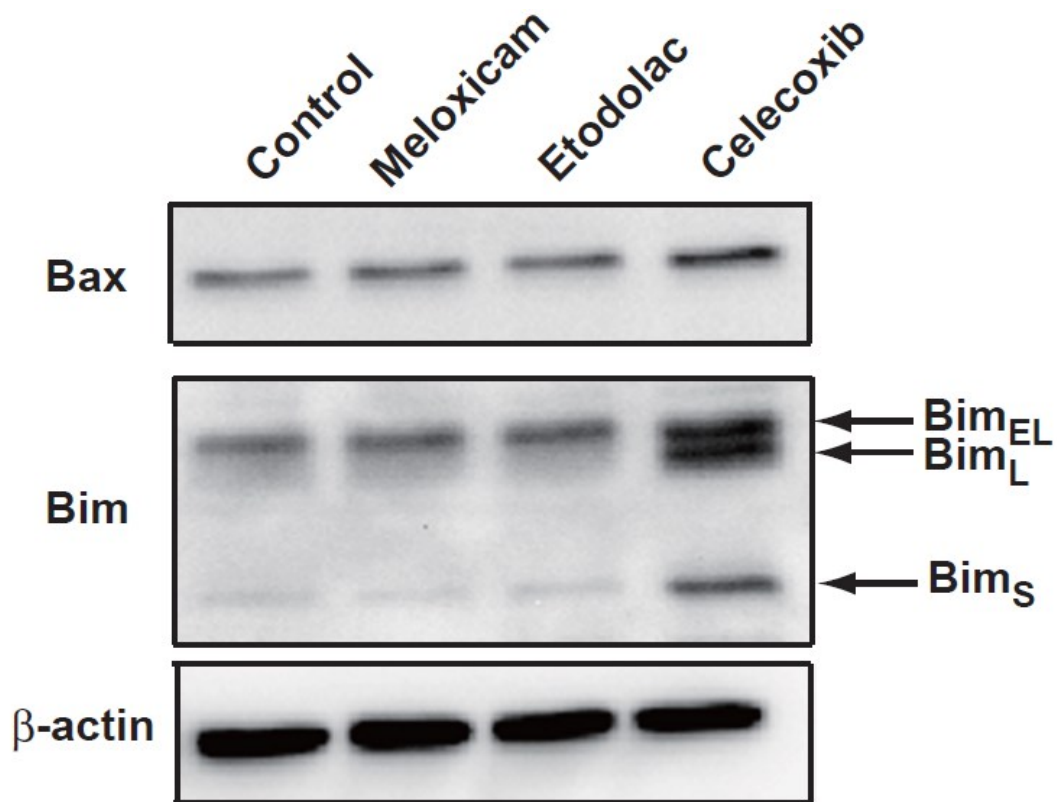


図 2. 8. 選択的 COX-2 阻害薬のアポトーシス促進分子に及ぼす影響の評価

選択的 COX-2 阻害薬（メロキシカム、エトドラク、セレコキシブ）を 100 μ M の濃度で作用させた AZACB 細胞におけるアポトーシス促進分子（Bax および Bim）のタンパク発現量について、Western blotting を用いて比較した。

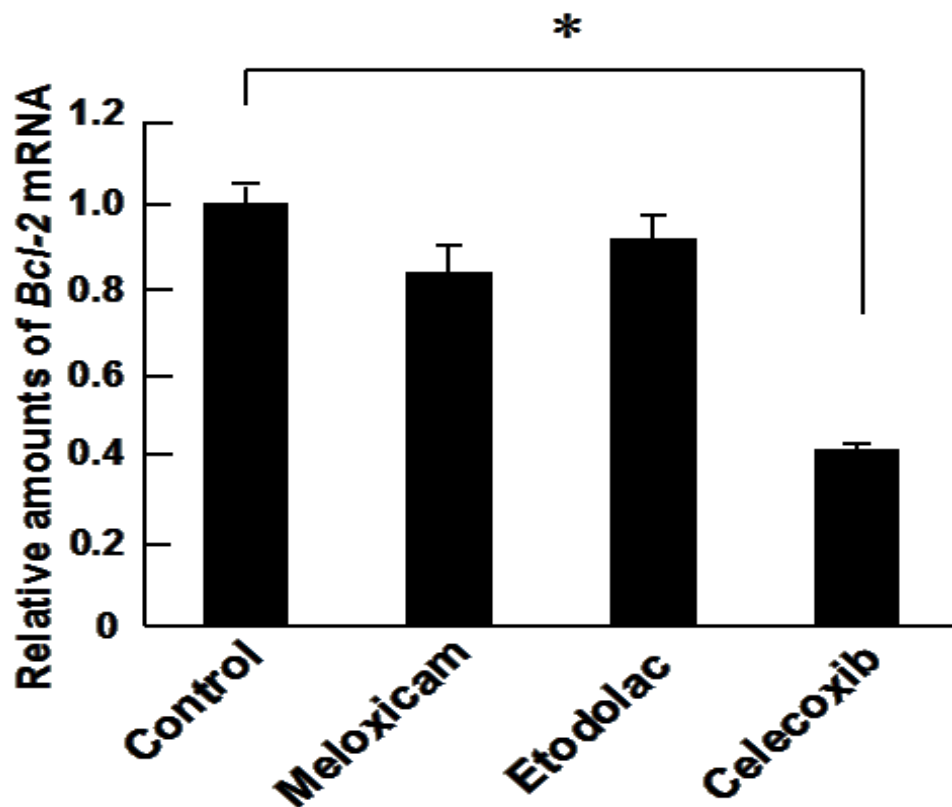


図 2.9. 選択的 COX-2 阻害薬がアポトーシス抑制分子に及ぼす影響

選択的 COX-2 阻害薬（メロキシカム、エトドラク、セレコキシブ）を 100 μ M の濃度で 24 時間作用させた AZACB 細胞におけるアポトーシス抑制分子（Bcl-2）の mRNA 発現量について、real-time RT-PCR を用いて比較した。n=3 とし、平均 \pm 標準偏差で示した。* $P < 0.01$

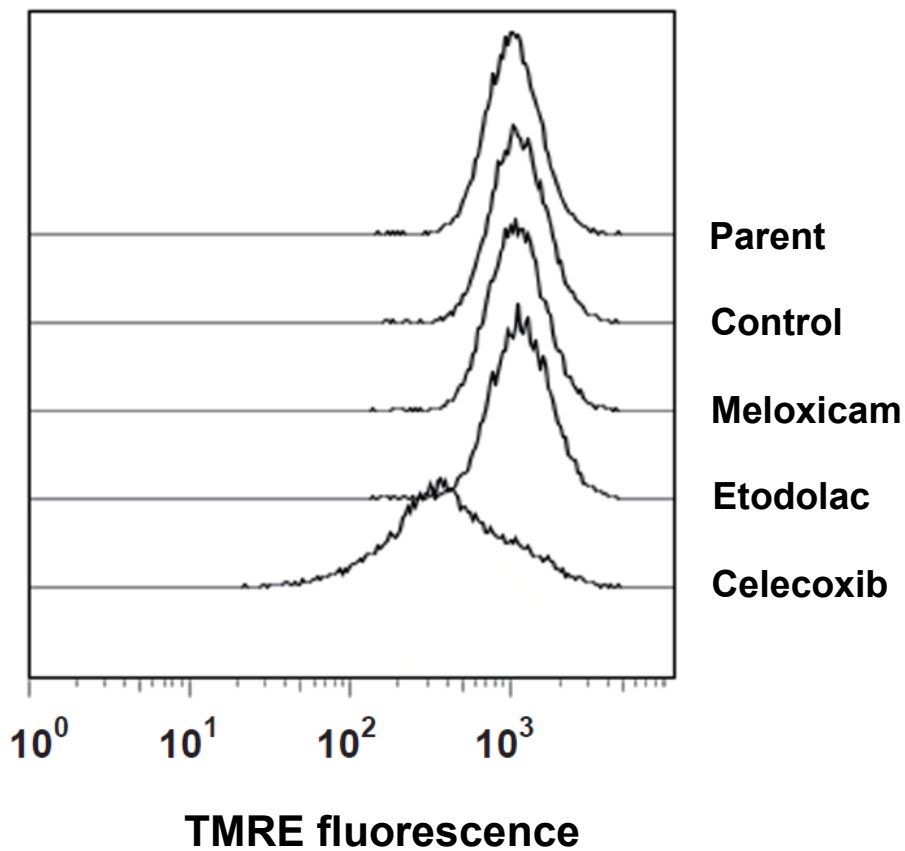


図 2. 10. 選択的 COX-2 阻害薬のミトコンドリア膜の透過性に与える影響の評価

選択的 COX-2 阻害薬（メロキシカム、エトドラク、セレコキシブ）を $100 \mu\text{M}$ の濃度で 24 時間作用させた AZACB 細胞のミトコンドリア膜の透過性に与える影響について、色素であるテトラメチルローダミンエチルエステル（TMRE）の蛍光強度をフローサイトメトリーにより評価した。各データはそれぞれ 20,000 cells を測定し、TMRE の蛍光強度をヒストグラムで表している。

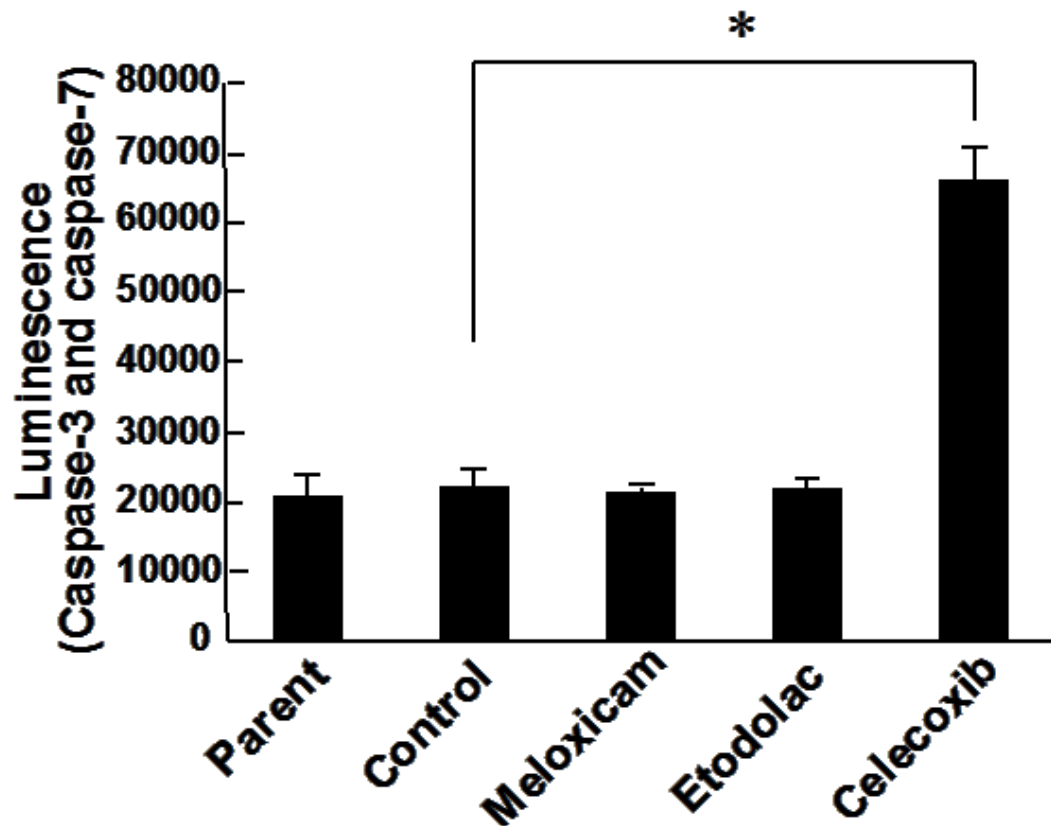


図 2. 11. 選択的 COX-2 阻害薬のカスパーゼ 3 および 7 の活性に及ぼす影響

選択的 COX-2 阻害薬（メロキシカム、エトドラク、セレコキシブ）を 100 μ M の濃度で 24 時間作用させた AZACB 細胞におけるカスパーゼ 3 およびカスパーゼ 7 の活性についてルミノメーターを用いて評価した。n=3 とし、各データは平均 \pm 標準偏差で示した。* $P < 0.01$

2.4. 考察

セレコキシブはイヌ乳腺腫瘍細胞において、アポトーシス抑制分子である Bcl-2 発現量の減少、およびアポトーシス促進分子である Bim や Bax 発現量の増加を引き起こし、MOMP を亢進することが明らかとなった。その結果、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 の活性化を引き起こし、アポトーシスが誘導された。また、COX-2 阻害活性を欠いたセレコキシブの構造異性体 (DMC) も、同様にアポトーシスを誘導したことから、セレコキシブによるアポトーシス誘導作用は COX-2 非依存的である可能性も示唆された。

ヒトがん細胞などを用いた研究から、セレコキシブの COX-2 非依存的なアポトーシス誘導メカニズムの一つとして、PDK1 やその下流に位置する AKT (PKB) をセレコキシブが直接抑制し、生存シグナルである AKT シグナルを阻害するメカニズムの存在が複数指摘されている (Arico *et al.*, 2002; Kulp *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2004)。活性化した AKT はアポトーシス促進分子である Bax や Bad などリン酸化し不活性化することによって、抗アポトーシス作用を発現することが知られている (Nicholson *et al.*, 2002)。また、AKT の阻害は、Bcl-2 に対して拮抗的に作用する Bad の発現量を増加させ、Bcl-2 を抑制することも報告されている (Nicholson *et al.*, 2002)。本研究では、セレコキシブが Bax 発現量

の増加や Bcl-2 mRNA 発現量の減少作用を示したが、この作用はセレコキシブが COX-2 活性阻害に関係なくイヌ乳腺腫瘍細胞の AKT シグナルを阻害している可能性が考えられる。さらに、AKT は転写因子である FOXO 3a の核内移行を阻害することによって Bim の発現を抑制していることも明らかにされており (Sunters *et al.*, 2003)、本研究結果における Bim 発現量の増加も AKT シグナルの阻害に起因している可能性が考えられる。

Bim はアノイキスに深く関与する鍵分子として知られている (Akiyama *et al.*, 2009; Reginato *et al.*, 2003)。アノイキスとは、Frisch と Francis によって提唱された現象であり、接着細胞が細胞外基質 (extracellular matrix; ECM) との接着から遊離して足場を失った場合、Bim の発現誘導に伴い細胞死が生じる現象のことを指す (Akiyama *et al.*, 2009; Frisch *et al.*, 1994; Reginato *et al.*, 2003)。また、多くのがん細胞は遠隔臓器へと転移する能力を有しているが、これはがん細胞がアノイキスに対して抵抗性を獲得し、足場非依存的な増殖が可能であることが原因と考えられている (Paolo *et al.*, 2013)。本研究では、セレコキシブが AZACB 細胞において Bim タンパク発現量の増加を引き起こす共にアポトーシスを誘導する作用も認められた。したがって、セレコキシブによるアポトーシス誘導作用の一部は、アノイキスの誘導によるものも含まれている可能性が示唆される。もし、セレコキシブがアノイキス誘導作用を有している場合には、がん細胞の

転移を抑制できる可能性も期待できる。

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* とデスレセプターを介した *extrinsic pathway* の二つに大別されている (Tait *et al.*, 2010)。本研究結果では、セレコキシブがイヌ乳腺腫瘍細胞の MOMP 亢進作用を示すと共に、Bcl-2 ファミリータンパク質の発現量に影響を及ぼしたことから、*intrinsic pathway* を介したアポトーシスの誘導が強く示唆される。しかし、セレコキシブは death receptor 5 (DR5) へと直接作用して、COX-2 非依存的に *extrinsic pathway* を介したアポトーシスを誘導する可能性も指摘されており (Liu *et al.*, 2004)、どちらのメカニズムを介してアポトーシスが誘導されているのかは判然としていない。したがって、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が、*intrinsic pathway* と *extrinsic pathway* のどちらの経路を介しているのか否かに関して、次章にて解析を行うこととした。

2.5. 要約

本研究では、第一章の研究において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。

断片化したDNAをフローサイトメーターで検出してアポトーシス誘導作用を

評価したところ、AZACB 細胞において細胞増殖抑制作用を示さないメロキシカムやエトドラクを作用させた場合には、アポトーシス誘導作用は認められなかったが、セレコキシブ (100 μ M) を作用させた AZACB 細胞においては、著明なアポトーシス誘導作用が認められ、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。さらに、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 DMC もアポトーシス誘導作用を示した。

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エフェクターカスパーゼであるカスパーゼ 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。また、この作用は COX-2 非依存的なメカニズムを介している可能性も示唆された。

第三章

イヌ乳腺腫瘍細胞における
セレキシブのアポトーシス誘導メカニズムの解析

3.1. 背景

アポトーシスの実行には、種々のカスパーゼと呼ばれるタンパク質分解酵素の活性化を介したカスパーゼカスケードが重要な役割を担っている。カスパーゼは活性中心にシステイン残基を有するシステインプロテアーゼであり、アスパラギン酸の C 末端側を切断する酵素として知られている (Thornberry *et al.*, 1998; Villa *et al.*, 1997)。現在までに哺乳類では 14 種類のカスパーゼが同定されているが、アポトーシスにおける役割に応じて、アポトーシス誘導の初期の過程に関与するイニシエーターカスパーゼ (カスパーゼ 2、8、9、10、11、12 等) および最終的にアポトーシスを実行するエフェクターカスパーゼ (カスパーゼ 3、6、7 等) に分類されている。各種アポトーシス刺激によって、イニシエーターカスパーゼの活性化を介して、下流のエフェクターカスパーゼが活性化し、アポトーシスが誘導される (Salvesen *et al.*, 2008)。また、エフェクターカスパーゼの基質タンパク質としては、Lamin A、PARP [Poly (ADP – ribose) polymerase]、SREBP (sterol regulatory element binding protein) -1、SREBP-2 などが知られており、これら分子が分解されることによって、最終的にアポトーシスが引き起こされると考えられている (Cohen, 1997)。

現在、アポトーシス誘導メカニズムは、デスレセプターの活性化を介する extrinsic pathway (death receptor-mediated pathway) とミトコンドリアを介する

intrinsic pathway (mitochondrial pathway) の2つに大別されている。また、これらの経路では活性化されるイニシエーターカスパーゼが異なっていることが知られており、extrinsic pathway ではカスパーゼ 8 が、intrinsic pathway ではカスパーゼ 9 がそれぞれ活性化される。いずれの経路においても最終的に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 が活性化され、アポトーシスが実行される (Chalah *et al.*, 2008; Green *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2002)。

アポトーシスが extrinsic pathway を介して誘導されるためには、細胞膜上のデスレセプターを活性化する必要がある。デスレセプターとは、生理的なりガンド (Fas リガンド、TNF- α 、TRAIL) の作用を細胞内へと伝達し、細胞の自殺を誘導するレセプター分子であり、tumor necrosis factor (TNF) receptor type 1

[TNFR1; death receptor 1 (DR1)]、Fas (DR2)、DR3、TNF-related apoptosis inducing ligand receptor (TRAIL receptor 1; DR4, TRAIL receptor 2; DR5)、DR6 の6種が知られている。Fas リガンドや TNF といったリガンド刺激を受けたデスレセプター分子は、細胞膜上で3量体を形成し、レセプターの自己会合によって、レセプターの細胞内領域に存在する death domain (DD) および細胞内アダプター分子 Fas-associated death domain (FADD) とが直接、あるいは他の分子を介して間接的に会合する (Ashkenazi *et al.*, 1998)。その後、デスレセプターと会合した FADD は、death effector domain (DED) を介してアポトーシスの誘導に重要

なイニシエーターカスパーゼであるカスパーゼ 8 の前駆体と会合し、death-inducing signaling complex (DISC) を形成し、カスパーゼ 8 を活性化させ、下流のエフェクターカスパーゼおよびアポトーシス誘導分子の活性化を引き起こし、アポトーシスを誘導する (Lavrik *et al.*, 2012)。

アポトーシスが *intrinsic pathway* を介して誘導されるためには、ミトコンドリアから細胞質へと放出されたシトクロム *c* が Apaf-1 や dATP とともに apoptosome を形成し、カスパーゼ 9 が活性化される必要がある (Pop *et al.*, 2006)。この活性化したカスパーゼ 9 は下流のエフェクターカスパーゼを活性化し、アポトーシスを誘導する。

これまで *intrinsic pathway* と *extrinsic pathway* はそれぞれ別の経路として考えられていたが、近年これらの経路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 Bcl-2 ファミリー分子であり、アポトーシス促進性の BH-3-only タンパク質に分類されている (Pradelli *et al.*, 2010)。Extrinsic pathway において活性化したカスパーゼ 8 は、細胞質中の Bid を分子量約 15 kDa の truncated Bid (t-Bid) へと切断する。その後、t-Bid はミトコンドリア外膜へと移動して、Bax または Bak と相互作用を介してシトクロム *c* の放出を促し、MOMP を亢進させて *intrinsic pathway* を活性化させる (Pradelli *et al.*, 2010)。

セレコキシブによるアポトーシス誘導メカニズムについては、*extrinsic*

pathway もしくは intrinsic pathway のいずれかの経路を介していることが別々の研究グループより複数報告されてきた。しかし、セレコキシブによるアポトーシス誘導メカニズムが、extrinsic pathway と intrinsic pathway の両方またはいずれか一方を介したものであるかは判然としていないのが現状である。また、イヌ乳腺腫瘍細胞では、セレコキシブによるアポトーシス誘導メカニズムについても明らかとなっていない。そのため、本章ではセレコキシブが extrinsic pathway または intrinsic pathway の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を明らかにすることを目的に実験を行った。

3.2. 材料および方法

3.2.1. 使用細胞および培養方法、被験物質

第一章および第二章と同様の手法および被験物質を用いて実験を行った。

3.2.2. カスパーゼ 8 またはカスパーゼ 9 の活性阻害

カスパーゼ 8 の特異的阻害剤として Z-IETD-FMK (R&D Systems, MN, USA)、カスパーゼ 9 の特異的阻害剤として Z-LEHD-FMK (R&D Systems, MN, USA) をそれぞれ使用した。両阻害剤は DMSO に 20 mM の濃度で溶解させ、被験物質を作用させる 1 時間前から最終濃度が 20 μ M となるように処理した。コントロー

ルの細胞には、溶媒である DMSO の最終濃度が 0.1%となるように加えた。

3.2.3. カスパーゼ 8 またはカスパーゼ 9 の活性測定

カスパーゼ 8 またはカスパーゼ 9 の酵素活性は、Caspase-Glo 8 assay (Promega, WI, USA)、Caspase-Glo 9 assay (Promega, WI, USA) をそれぞれ使用し、取扱説明書に従って使用し測定した。AZACB 細胞を 2.5×10^3 cells/well の条件で、96-well の white opaque tissue culture plates (BD Falcon, Tokyo, Japan) に播種し、24 時間培養した。その後、被験物質を 24 時間作用させたものを LB 960 Microplate Luminometer Centro (Berthold, Tokyo, Japan) を用いてカスパーゼ 8 またはカスパーゼ 9 の活性をそれぞれ測定した。30 分ごとに測定し、発光シグナルの減弱が認められる 3 時間まで発光の変化をモニタリングした。

3.2.4. タンパク抽出と Western blotting

第一章および第二章と同様の手順でタンパク質の抽出およびタンパク質の濃度定量を行い、SDS-PAGE および trans-blotting を実施した。

一次抗体

Bid および truncated-Bid の両タンパク質を検出するための一次抗体として、anti-Bid rabbit polyclonal antibody (Novus Biologicals, CO, USA) を 1,000 倍に希釈し使用した。また、サンプルのローディング量を比較するための内部標準とし

て、anti- β -actin mouse monoclonal antibody (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) を使用した。

3.2.5. アポトーシス細胞 (sub-G0/G1 期細胞) の検出

第二章と同様の手順でアポトーシス細胞を検出した。FACS Canto (Becton Dickinson, NJ, USA) を用いて各細胞の DNA 量を測定し、sub-G0/G1 期を示す細胞の割合を Flow Jo7 (Tree Star, OR, USA) を用いて解析した。

3.2.6. 統計学的解析

本研究で得られたデータは、平均値 \pm 標準偏差で示した。統計学的解析は、Mann-Whitney 検定を用いた。 P 値 <0.05 の場合に、統計学的に有意と判断した。

3.3. 結果

3.3.1. セレコキシブがカスパーゼ 8 およびカスパーゼ 9 の活性に及ぼす影響の評価

セレコキシブによるアポトーシス誘導作用は、extrinsic pathway または intrinsic pathway のいずれの経路を介して発現しているのかについて明らかにするために、それぞれの経路で特異的に活性化されるカスパーゼ 8 およびカスパーゼ 9

の活性を比較検討した。その結果、セレコキシブ 100 μM を作用させた場合においてのみ、**extrinsic pathway** の活性化に重要なカスパーゼ 8 の有意な活性化を引き起こした (図 3. 1.)。さらに、セレコキシブは **intrinsic pathway** の活性化に重要であるカスパーゼ 9 の活性化も引き起こすことが明らかとなった (図 3. 2.)。これらの結果から、セレコキシブによるアポトーシス誘導作用は **extrinsic pathway** および **intrinsic pathway** の両経路を介する可能性が示唆された。

3. 3. 2. カスパーゼ 8 またはカスパーゼ 9 の特異的阻害剤がセレコキシブのアポトーシス誘導作用に及ぼす影響の評価

セレコキシブによるアポトーシス誘導作用が **extrinsic pathway** または **intrinsic pathway** のいずれを介しているのかについて、より詳細に解析する目的で、カスパーゼ 8 またはカスパーゼ 9 の特異的阻害剤をそれぞれ用いて、セレコキシブによるアポトーシス誘導作用に及ぼす影響を評価した。カスパーゼ 8 の特異的阻害剤である Z-IETD-FMK を作用させた場合、セレコキシブによるカスパーゼ 8 の活性化は、ほぼ完全に阻害された (図 3. 3.)。しかし、Z-IETD-FMK はセレコキシブによるアポトーシス誘導作用を部分的にしか阻害することができなかった (図 3. 4.)。同様に、カスパーゼ 9 を特異的に阻害する Z-LEHD-FMK を作用させた場合においても、セレコキシブによるカスパーゼ 9 の活性化は完全に

阻害されたにも関わらず、セレコキシブによるアポトーシス誘導作用を部分的にしか阻害できなかった (図 3.5.および図 3.6.)。これらの結果から、カスパーゼ 8 またはカスパーゼ 9 のいずれかの活性化を阻害した場合においても、セレコキシブによるアポトーシス誘導を完全には阻害できなかった。したがって、セレコキシブは extrinsic pathway および intrinsic pathway の両経路を活性化させ、アポトーシスを誘導する可能性が強く示唆された。

3.3.3. セレコキシブが Bid に及ぼす影響の評価

Bid は extrinsic pathway において活性化されたカスパーゼ 8 により切断されて t-Bid となり、intrinsic pathway を活性化させることが知られている (Pradelli LA *et al.*, 2010)。今までの研究結果から、セレコキシブが extrinsic pathway と intrinsic pathway の両経路の活性化を介してアポトーシスを誘導している可能性が示唆されたため、これらの経路をクロストークする Bid へのセレコキシブの影響を評価した。その結果、セレコキシブ 100 μ M を作用させた AZACB 細胞でのみ、Bid タンパクの発現量は減少が認められると共に、t-Bid のタンパク発現量は増加していることが明らかとなった (図 3.7.)。セレコキシブではカスパーゼ 8 を活性化させる作用があることから、t-Bid の産生を誘導し、extrinsic pathway と intrinsic pathway の両経路をクロストークさせている可能性が示唆された。

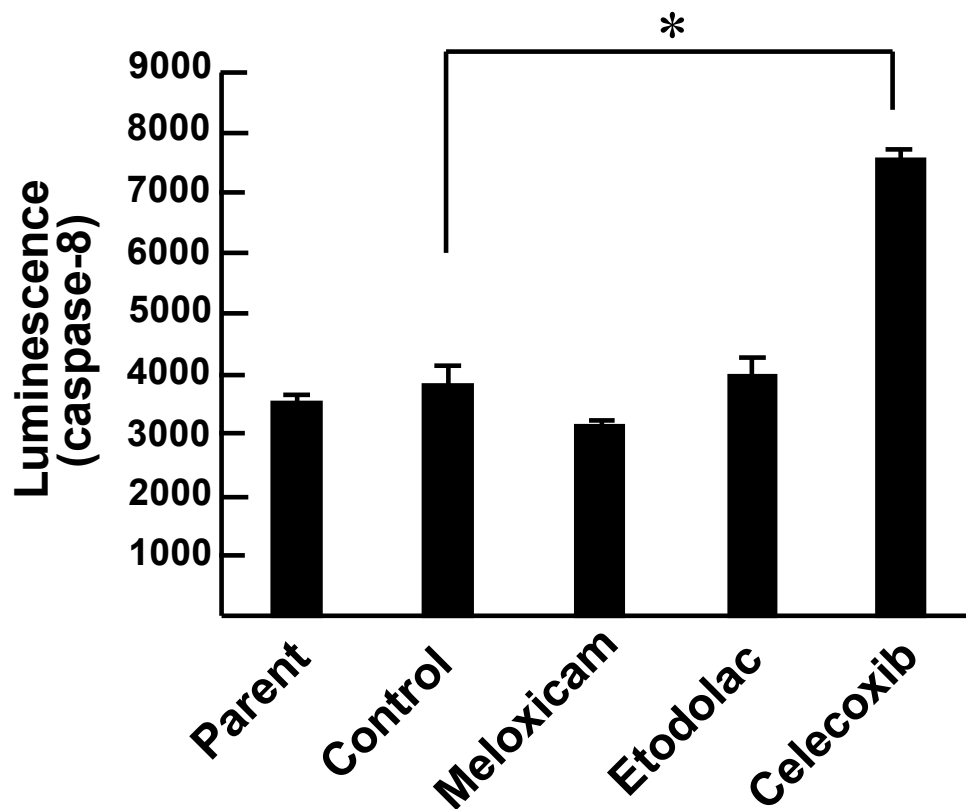


図 3. 1. 選択的 COX-2 阻害薬のカスパーゼ 8 の活性に及ぼす影響

選択的 COX-2 阻害薬（メロキシカム、エトドラク、セレコキシブ）を 100 μ M の濃度で作用させた AZACB 細胞におけるカスパーゼ 8 活性についてルミノメーターを用いて比較した。n=3 とし、平均±標準偏差で示した。 * $P < 0.01$

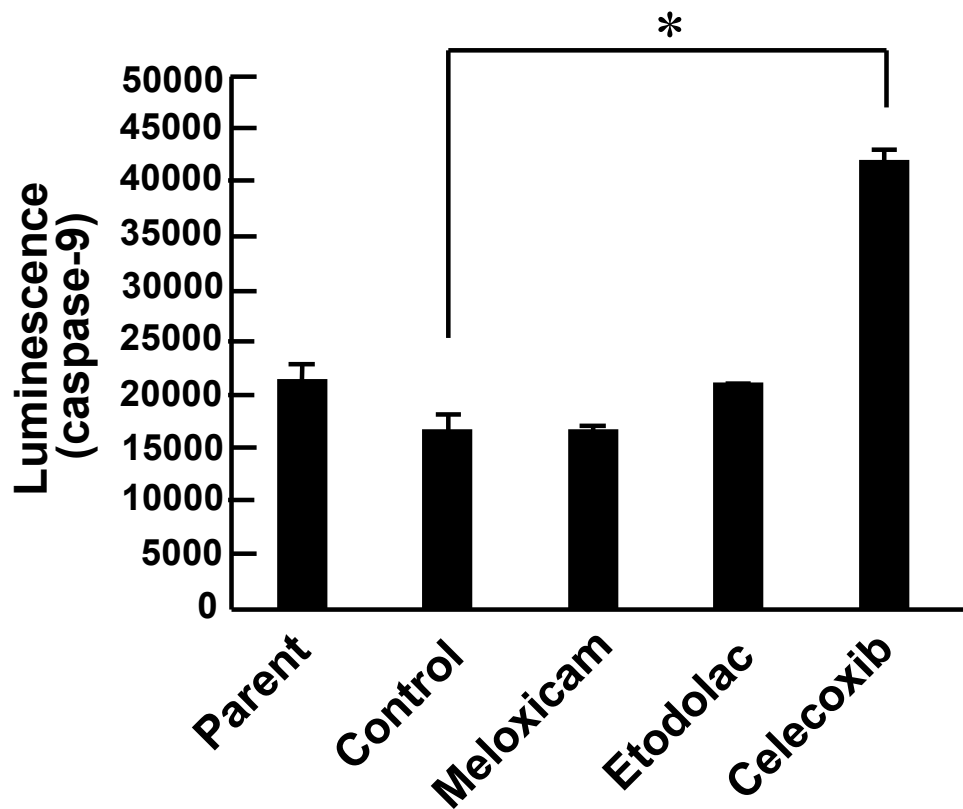


図 3. 2. 選択的 COX-2 阻害薬のカスパーゼ 9 の活性に及ぼす影響

選択的 COX-2 阻害薬（メロキシカム、エトドラク、セレコキシブ）を 100 μ M の濃度で作用させた AZACB 細胞におけるカスパーゼ 9 活性についてルミノメーターを用いて比較した。n=3 とし、平均±標準偏差で示した。 * $P < 0.01$

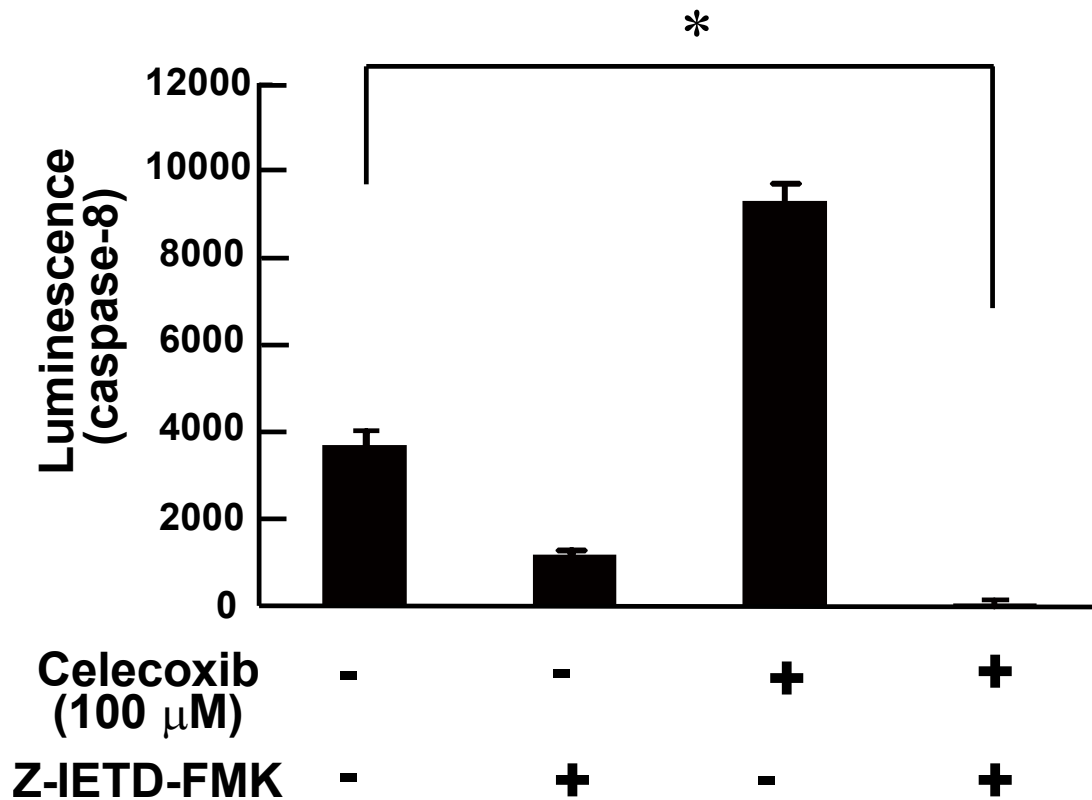


図 3.3. セレコキシブによるカスパーゼ 8 の活性化に対するカスパーゼ 8 阻害剤の影響

カスパーゼ 8 の特異的阻害剤 (Z-IETD-FMK) およびセレコキシブの両方、またはいずれか一方を作用させた AZACB 細胞におけるカスパーゼ 8 活性について評価した。n=3 とし、平均±標準偏差で示した。 * $P < 0.01$

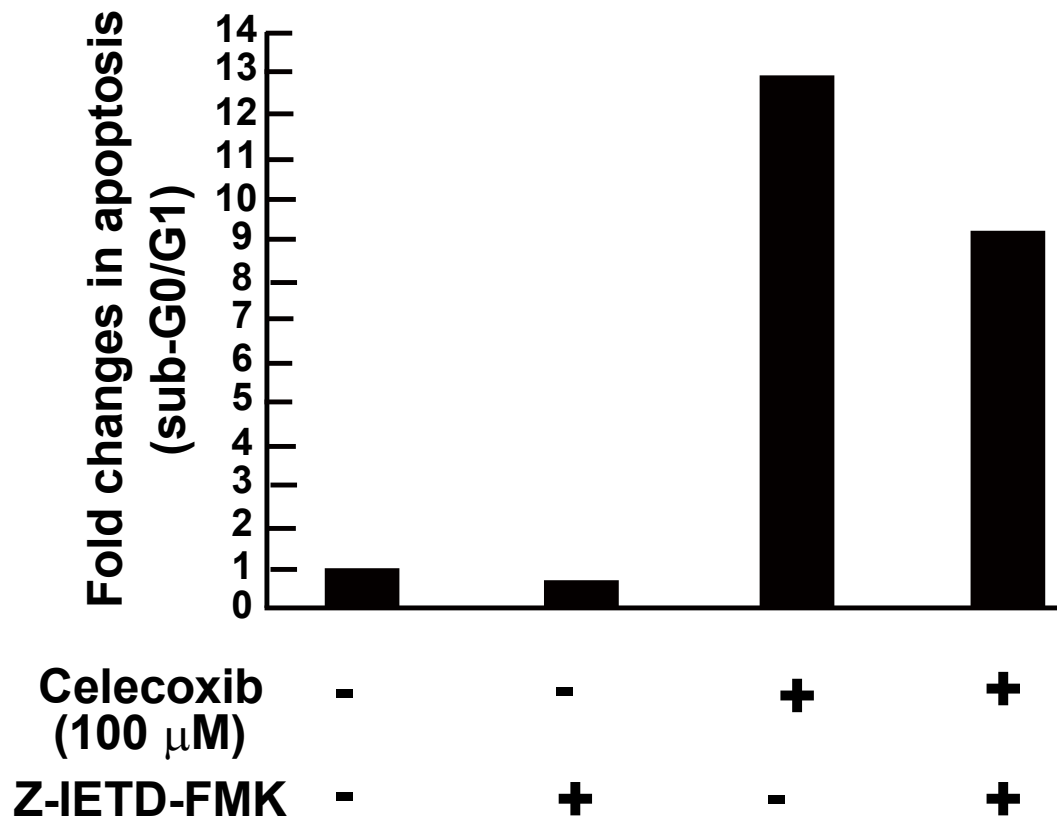


図 3.4. セレコキシブによるアポトーシス誘導作用に対するカスパーゼ 8 阻害剤の影響

カスパーゼ 8 の特異的阻害剤 (Z-IETD-FMK) およびセレコキシブの両方、またはいずれか一方を作用させた AZACB 細胞におけるアポトーシス細胞数について、フローサイトメトリーを用いて評価した。各データは、それぞれ 20,000 cells 当たりのアポトーシス細胞数の割合について、セレコキシブおよび Z-IETD-FMK の両薬剤を作用させていない細胞を 1 として示している。

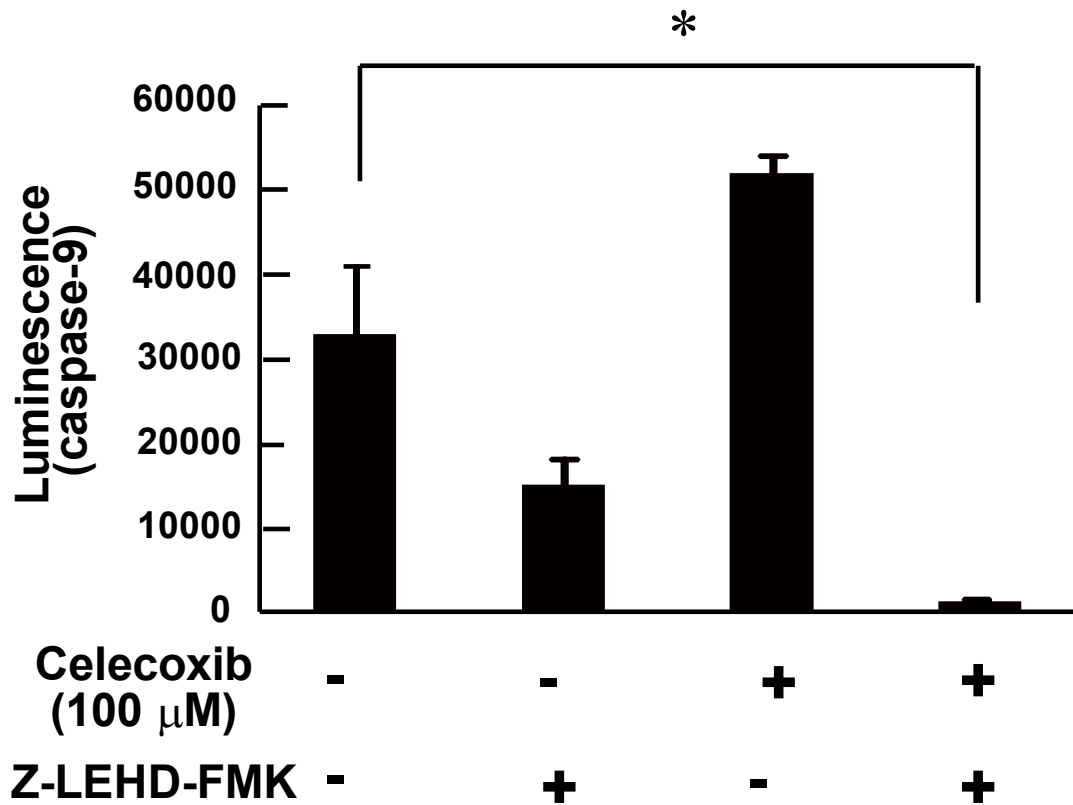


図 3.5. セレコキシブによるカスパーゼ 9 の活性化に対するカスパーゼ 9 阻害剤の影響

カスパーゼ 9 の特異的阻害剤 (Z-LEHD-FMK) およびセレコキシブの両方、またはいずれか一方を作用させた AZACB 細胞におけるカスパーゼ 9 活性について評価した。n = 3 とし、平均 ± 標準偏差で示した。* $P < 0.01$

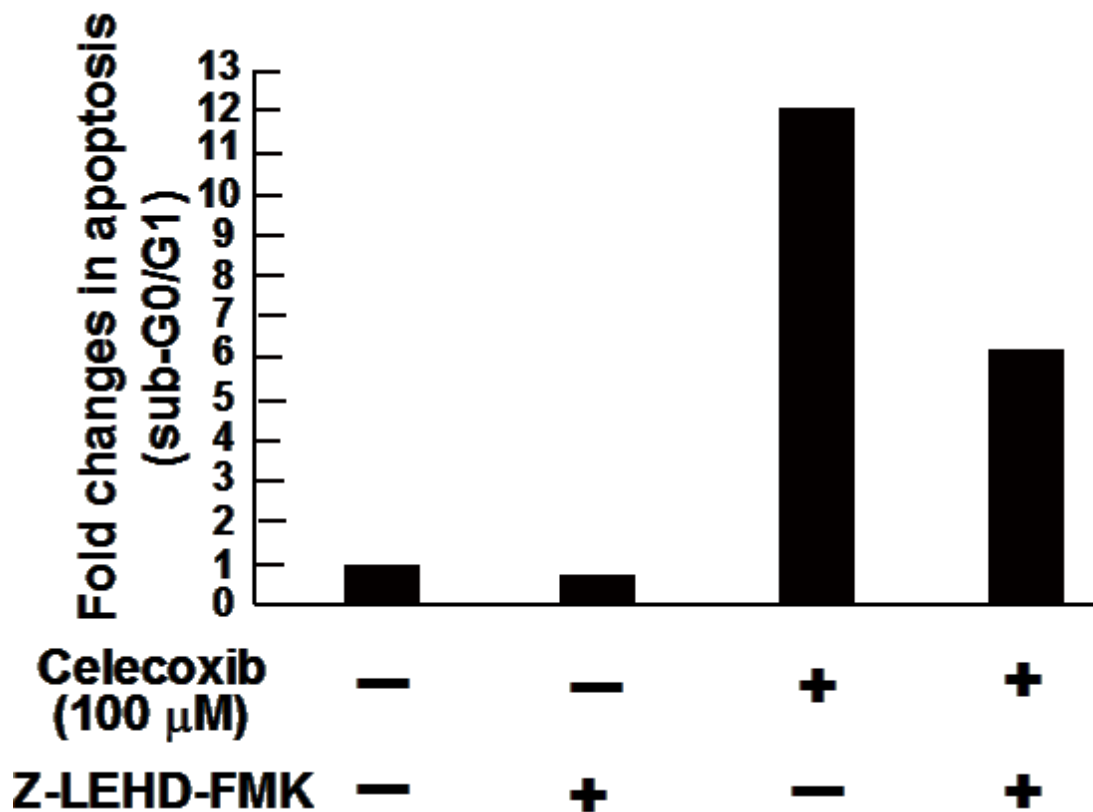


図 3. 6. セレコキシブによるアポトーシス誘導作用に対するカスパーゼ 9 阻害剤の影響

カスパーゼ-9 の特異的阻害剤 (Z-LEHD-FMK) およびセレコキシブの両方、またはいずれか一方を作用させた AZACB 細胞におけるアポトーシス細胞数について、フローサイトメトリーを用いて評価した。各データは、それぞれ 20,000 cells 当たりのアポトーシス細胞数の割合について、セレコキシブおよび Z-LEHD-FMK の両薬剤を作用させていない細胞を 1 として示している。

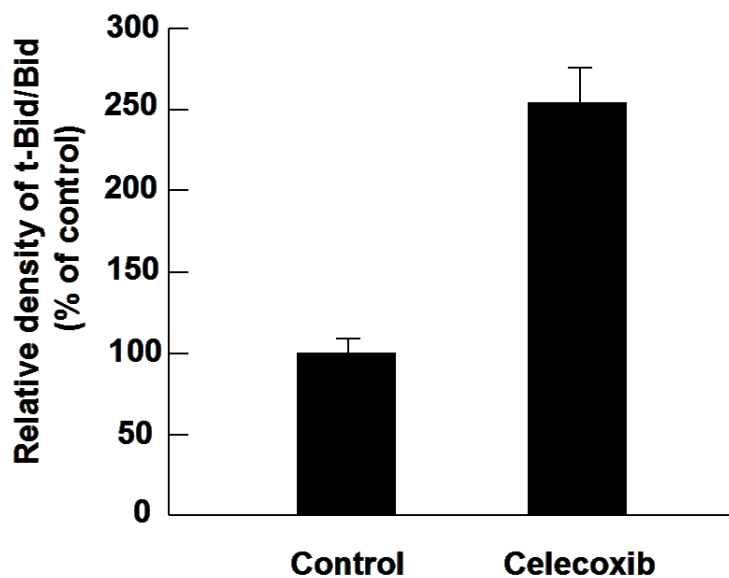
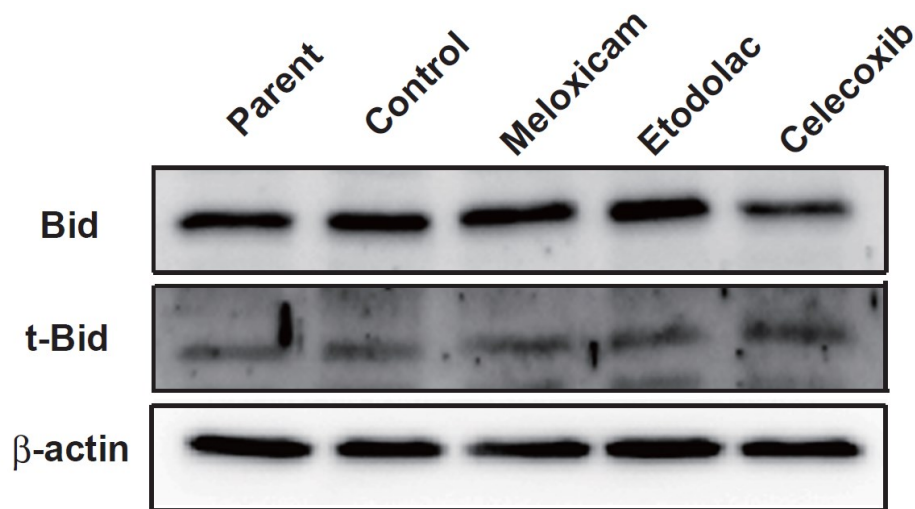


図 3. 7. セレコキシブの Bid および t-Bid 発現量に及ぼす影響

選択的 COX-2 阻害薬（メロキシカム、エトドラク、セレコキシブ）を 100 μ M の濃度で作用させた AZACB 細胞における Bid および truncated-Bid (t-Bid) の相対的発現量について、Western blotting を用いて評価した。下図は、Western blotting で得られた Bid および t-Bid のバンドの 3 箇所 density について、t-Bid/Bid を算出し、平均±標準偏差で示した。

3.4. 考察

本研究結果から、セレコキシブが *extrinsic pathway* の活性化に重要なカスパーゼ 8 および *intrinsic pathway* の活性化に重要なカスパーゼ 9 の両方を活性化させることによって、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。また、セレコキシブはカスパーゼ 8 の活性化を介して Bid の切断を亢進し、t-Bid 量を増加させることによって、*extrinsic pathway* と *intrinsic pathway* をクロストークさせている可能性も示唆された。

ヒト T 細胞性リンパ腫細胞においては、セレコキシブが *intrinsic pathway* を介してアポトーシスを誘導することが報告されている (Jendrossek *et al.*, 2003)。また、ヒト前立腺癌細胞では、セレコキシブが Bcl-XL 発現量の減少や Bad 発現量の増加を引き起こし、カスパーゼ 9 およびカスパーゼ 3 を活性化させることも明らかとなっている (Dandekar *et al.*, 2005)。同様にマウスの肝腫瘍細胞や乳腺腫瘍細胞においても、セレコキシブが *intrinsic pathway* を介したアポトーシス誘導作用を示す (Shao *et al.*, 2014 ; Yoshinaga *et al.*, 2006)。一方、ヒト非小細胞肺癌細胞を用いた研究では、セレコキシブが DR5 の発現量を直接増加させ、カスパーゼ 8 の活性化を引き起こし、*extrinsic pathway* を介したアポトーシス誘導作用を示すことが報告されている (Grosch *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2004)。また、複数のヒト子宮頸がん細胞を用いた研究では、一部の細胞においてセレコキシブが

FAS-FADD の活性化に基づく extrinsic pathway を介したアポトーシス誘導作用を示すことも報告されている (Kim *et al.*, 2004)。このように過去に報告されているいずれか一方の pathway を介したアポトーシス誘導作用とは異なり、イヌ乳腺腫瘍細胞では intrinsic pathway および extrinsic pathway の両経路を活性化させ、アポトーシスを誘導することが本研究では示された。そのため、他の腫瘍に比べてイヌ乳腺腫瘍では、アポトーシス誘導作用がセレコキシブによって生じやすい可能性が考えられ、イヌ乳腺腫瘍の治療にセレコキシブが有用である可能性が示唆される。

セレコキシブは、ヒト非小細胞肺癌細胞において DR5 発現量の増加作用に基づく extrinsic pathway を介したアポトーシス誘導作用を示すが、この作用は COX-2 阻害活性とは非依存的なメカニズムで生じることが指摘されている (Liu *et al.*, 2004)。本研究では、セレコキシブが extrinsic pathway の活性化を介してもアポトーシスを誘導することが明らかとなったが、本結果は COX-2 非依存的なメカニズムによってアポトーシスが誘導されるといった第二章の結果を裏付けている可能性が示唆される。しかし、本研究では、カスパーゼ 8 の上流に位置するデスレセプターなどにセレコキシブが及ぼす影響については評価していない。そのため、セレコキシブが DR5 を含むデスレセプターに及ぼす影響などについて、今後検討を進める必要がある。また、デスレセプターの活性化に依ら

ないカスパーゼ 8 の活性化メカニズムとして、カスパーゼ-3 を介したメカニズム (mitochondrial amplification loop) の存在が提唱されている (Chen *et al.*, 2000; von Haefen *et al.*, 2003)。したがって、セレコキシブが及ぼすカスパーゼカスケードへの影響に関しても、今後検討を進めていく必要があると考えている。

セレコキシブがイヌ乳腺腫瘍細胞において、カスパーゼ 8 およびカスパーゼ 9 のいずれも活性化させることが明らかとなった。しかし、カスパーゼ 8 およびカスパーゼ 9 の活性化の程度を相対的に比較し、intrinsic pathway または extrinsic pathway のいずれの経路が、セレコキシブによるアポトーシス誘導に重要な役割を担っているのかについて評価することは出来なかった。また、カスパーゼ 8 阻害剤 (Z-IETD-FMK) およびカスパーゼ 9 阻害剤 (Z-LEHD-FMK) を併用し、セレコキシブによるアポトーシス誘導作用が完全に阻害されるかについても評価を試みたが、両薬剤を併用した場合の細胞への毒性が強く、評価出来なかった。今後は、カスパーゼに対する dominant negative mutant を使用するなどして、セレコキシブが有するより詳細なアポトーシス誘導メカニズムについての検討を進めていきたい。

3.5. 要約

セレコキシブが AZACB 細胞において extrinsic pathway または intrinsic 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、*extrinsic pathway* で活性化されるカスパーゼ 8 および *intrinsic pathway* で活性化されるカスパーゼ 9 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、セレコキシブはカスパーゼ 8 およびカスパーゼ 9 のいずれも活性化することが明らかとなった。そこで、カスパーゼ 8 の特異的阻害剤である Z-IETD-FMK またはカスパーゼ 9 の特異的阻害剤である Z-LEHD-FMK をそれぞれ前処理した 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カスパーゼ 8 またはカスパーゼ 9 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、*extrinsic pathway* と *intrinsic 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 は活性化したカスパーゼ 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 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 **extrinsic pathway** および **intrinsic pathway** の両経路を介していることが示唆された。

結語

選択的 COX-2 阻害薬であるセレコキシブは、COX-2 発現が亢進していないイヌ乳腺腫瘍細胞において、細胞周期の S 期への進入を抑制する CDKI である p21 および p27 の発現量を増加させ、細胞周期を停止させることによって、著明な細胞増殖抑制作用を示すことが明らかとなった。さらに、セレコキシブが COX-2 発現量の極めて少ないイヌ乳腺腫瘍に対して増殖抑制作用を示したことに加え、AZACB 細胞の PGE₂ 産生量に影響を及ぼさないこと、COX-2 阻害活性能を欠くセレコキシブの構造異性体 (DMC) においても増殖抑制作用が認められたこと、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と想定されている p21 および p27 の発現量を増加させたことから、本研究で認められたイヌ乳腺腫瘍細胞に対するセレコキシブの増殖抑制作用は COX-2 非依存的なメカニズムを介している可能性が示唆された。

セレコキシブは Bcl-2 発現量の減少を引き起こすと共に、Bim および Bax 発現量を増加させることによって、アポトーシスシグナルをミトコンドリアへと伝えて MOMP を亢進し、最終的に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 を活性化させることが明らかとなった。また、DMC を作用させた場合においてもアポトーシスの誘導が認められたことから、セレコキシブによるアポトーシス誘導作用も COX-2 非依存的なメカニズムを介

している可能性が示唆された。このセレコキシブによるアポトーシス誘導作用は、アポトーシスシグナルが伝達される経路である *extrinsic pathway* および *intrinsic pathway* をそれぞれ構成するカスパーゼ 8 およびカスパーゼ 9 の活性化を介していることが明らかとなった。さらに、セレコキシブは *extrinsic pathway* および *intrinsic pathway* をクロストークする t-Bid の産生量を増加させることも明らかとなった。したがって、セレコキシブはイヌ乳腺腫瘍細胞において、COX-2 非依存的に *extrinsic pathway* および *intrinsic pathway* の両経路を介したアポトーシス誘導作用を示す可能性が示唆された。

過去に報告されているイヌ乳腺腫瘍細胞における選択的 COX-2 阻害薬の抗腫瘍作用を評価した研究は、デラコキシブやメロキシカムなどを用いた報告が散見されるのみであり、詳細な抗腫瘍メカニズムについては、不明な点が多いのが現状である。本研究では、セレコキシブが COX-2 非依存的な細胞増殖抑制作用やアポトーシス誘導作用をイヌ乳腺腫瘍に対して示すことを世界で初めて明らかにすることができた。また、セレコキシブが示すアポトーシス誘導メカニズムは *extrinsic pathway* もしくは *intrinsic pathway* のいずれを介しているのかについては、様々な研究結果から議論されてきたが、本研究結果ではセレコキシブがイヌ乳腺腫瘍細胞において両経路を介してアポトーシスを誘導している可能性も明らかにすることができた。本研究結果から、セレコキシブはイヌ乳

腺腫瘍に対する抗腫瘍薬として有用であるのみならず、その抗腫瘍作用はイヌ
乳腺腫瘍組織の COX-2 発現量に依存せずに発現する可能性が示唆された。

謝辞

本研究を完遂するに至るまで、ご指導、ご鞭撻を賜りました日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻獣医薬理学研究室 浅野隆司先生に心より感謝申し上げます。また、多くのご助言ならびに本研究の構成に多大なるご助言をいただいた日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻獣医解剖学研究室 五味浩司先生に深謝致します。本論文の審査にあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻獣医分子病理学研究室 渋谷久先生ならびに日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻獣医生化学研究室 杉谷博士先生に心よりお礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、多岐に亘る実験の技術指導並びに終始温かい激励とご助言を賜りました日本大学生物資源科学部獣医学科獣医薬理学研究室 齋藤光芳先生に厚くお礼申し上げます。

最後に、本研究を完遂するにあたり、心身の支えとなってくれた妻 彩加に心から感謝致します。

引用文献

Akiyama T, Dass CR, Choong PF. (2009) Bim-targeted cancer therapy: a link between drug action and underlying molecular changes. *Mol Cancer Ther*, 8: 3173–3180.

Altorki NK, Keresztes RS, Port JL, Libby DM, Korst RJ, Flieder DB, Ferrara CA, Yankelevitz DF, Subbaramaiah K, Pasmantier MW, Dannenberg AJ. (2003) Celecoxib, a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor, enhances the response to preoperative paclitaxel and carboplatin in early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 21: 2645–2650.

Arico S, Patingre S, Bauvy C, Gane P, Barbat A, Codogno P, Ogier-Denis E. (2002) Celecoxib induces apoptosis by inhibiting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activity in the human colon cancer HT-29 cell line. *J Biol Chem*, 277: 27613–27621.

Ashkenazi A, Dixit VM. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281: 1305–1308.

Bertagnolli MM, Eagle CJ, Zauber AG, Redston M, Solomon SD, Kim K, Tang J, Rosenstein RB, Wittes J, Corle D, Hess TM, Woloj GM, Boisserie F, Anderson WF, Viner JL, Bagheri D, Burn J, Chung DC, Dewar T, Foley TR, Hoffman N, Macrae F, Pruitt RE, Saltzman JR, Salzberg B, Sylwestrowicz T, Gordon GB, Hawk ET; APC Study Investigators. (2006) Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas. *N Engl J Med*, 355: 873–884.

Brenner D, Mak TW. (2009) Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol*, 21: 871–877.

Brunelle M, Sartin EA, Wolfe LG, Sirois J, Doré M. (2006) Cyclooxygenase-2 expression in normal and neoplastic canine mammary cell lines. *Vet Pathol*, 43: 656–666.

Catalano A, Graciotti L, Rinaldi L, Raffaelli G, Rodilossi S, Betta P, Gianni W, Amoroso S, Procopio A. (2004) Preclinical evaluation of the nonsteroidal anti-inflammatory agent celecoxib on malignant mesothelioma chemoprevention. *Int J*

Cancer, 109: 322–328.

Chalah A, Khosravi-Far R. (2008) The mitochondrial death pathway. *Adv Exp Med Biol*, 615: 25–45.

Chang SH, Ai Y, Breyer RM, Lane TF, Hla T. (2005) The prostaglandin E₂ receptor EP2 is required for cyclooxygenase 2-mediated mammary hyperplasia. *Cancer Res*, 65: 4496–4499.

Chen JY, Li CF, Kuo CC, Tsai KK, Hou MF, Hung WC. (2014) Cancer/stroma interplay via cyclooxygenase-2 and indoleamine 2,3-dioxygenase promotes breast cancer progression. *Breast Cancer Res*, 16: 410.

Chen Q, Gong B, Almasan A. (2000) Distinct stages of cytochrome c release from mitochondria: evidence for a feedback amplification loop linking caspase activation to mitochondrial dysfunction in genotoxic stress induced apoptosis. *Cell Death Differ*, 7: 227–233.

Chipuk JE, Green DR. (2008) How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol*, 18: 157–164.

Cohen MG. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, 326: 1–16.

Cryns V, Yuan J. (1998) Protease to die for. *Genes Dev*, 12: 1551–1570.

Dandekar DS, Lopez M, Carey RI, Lokeshwar BL. (2005) Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib augments chemotherapeutic drug-induced apoptosis by enhancing activation of caspase-3 and -9 in prostate cancer cells. *Int J Cancer*, 115: 484–492.

Dias Pereira P, Lopes CC, Matos AJF, Santos M, Gartner F, Medeiros R, Lopes C. (2009) COX-2 expression in canine normal and neoplastic mammary gland. *J Comp Pathol*, 140: 247–253.

Doré M, Lanthier I, Sirois J. (2003) Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumor. *Vet Pathol*, 40: 207–212.

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391: 43–50.

Fitzgerald GA. (2004) Coxibs and cardiovascular disease. *N Engl J Med*, 351: 1709–1711.

Frisch SM, Francis H. (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol*, 124: 619–626.

Goldschmidt M, Pena L, Rasotto R, Zappulli V. (2011) Classification and grading of canine mammary tumor. *Vet Pathol*, 48: 117–131.

Graham DJ, Campen D, Hui R, Spence M, Cheetham C, Levy G, Shoor S, Ray WA. (2005) Risk of acute myocardial infarction and sudden cardiac death in patients treated with cyclo-oxygenase 2 selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs: nested case-control study. *Lancet*, 365: 475–481.

Green DR, Evan GI. (2002) A matter of life and death. *Cancer Cell*, 1: 19–30.

Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, Kaidi A. (2009) The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*, 30: 377–386.

Grosch S, Maier TJ, Schiffmann S, Geisslinger G. (2006) Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *J Natl Cancer Inst*, 98: 736–747.

Grosch S, Tegeder I, Niederberger E, Brautigam L, Geisslinger G. (2001) COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB J*, 15: 2742–2745.

Han C, Leng J, Demetris AJ, Wu T. (2004) Cyclooxygenase-2 promotes human cholangiocarcinoma growth: evidence for cyclooxygenase-2-independent mechanism in celecoxib-mediated induction of p21waf1/cip1 and p27kip1 and cell cycle arrest. *Cancer Res*, 64: 1369–1376.

Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646–674.

Harris RE, Beebe J, Alshafie GA. (2012) Reduction in cancer risk by selective and nonselective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. *J Exp Pharmacol*, 4: 91–96.

Hawkey CJ. (1999) COX-2 inhibitors. *Lancet*, 353: 307–314

Hida T, Yatabe Y, Achiwa H, Muramatsu H, Kozaki K, Nakamura S, Ogawa M, Mitsudomi T, Sugiura T, Takahashi T. (1998) Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res*, 58: 3761–3764.

Howe LR. (2007) Inflammation and breast cancer. Cyclooxygenase/prostaglandin signaling and breast cancer. *Breast Cancer Res*, 9: 210.

Hsu AL, Ching TT, Wang DS, Song X, Rangnekar VM, Chen CS. (2000) The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. *J Biol Chem*, 275: 11397–11403.

Huang M, Stolina M, Sharma S, Mao JT, Zhu L, Miller PW, Wollman J, Herschman H, Dubinett SM. (1998) Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Res*, 58: 1208–1216.

Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E. (1998) Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 90: 455–460.

Isomaki HA, Hakulinen T, Joutsenlahti U. (1978) Excess risk of lymphoma, leukemia and myeloma in patients with rheumatoid arthritis. *J Chronic Dis*, 31: 691–696.

Jendrossek V, Handrick R, Belka C. (2003) Celecoxib activates a novel mitochondrial apoptosis signaling pathway. *FASEB J*, 17: 1547–1549.

Kardosh A, Blumenthal M, Wang WJ, Chen TC, Schönthal AH. (2004) Differential effects of selective COX-2 inhibitors on cell cycle regulation and proliferation of glioblastoma cell lines. *Cancer Biol Ther*, 3: 55–62.

Kardosh A, Wang W, Uddin J, Petasis NA, Hofman FM, Chen TC, Schönthal AH. (2005) Dimethyl-celecoxib (DMC), a derivative of celecoxib that lacks cyclooxygenase-2-inhibitory function, potently mimics the anti-tumor effects of celecoxib on Burkitt's lymphoma in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther*, 4: 571–582.

Kato M, Nishida S, Kitasato H, Sakata N, Kawai S. (2001) Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: investigation using human peripheral monocytes. *J Pharm Pharmacol*, 53: 1679–1685.

Kim SH, Song SH, Kim SG, Chun KS, Lim SY, Na HK, Kim JW, Surh YJ, Bang YJ, Song YS. (2004) Celecoxib induces apoptosis in cervical cancer cells independent of cyclooxygenase using NF-kappaB as a possible target. *J Cancer Res Clin Oncol*, 130: 551–560.

Klopfleisch R, von Euler H, Sarli G, Pinho SS, Gärtner F, Gruber AD. (2011) Molecular carcinogenesis of canine mammary tumors: news from an old disease. *Vet Pathol*, 48: 98–116.

Koehne CH, Dubois RN. (2004) COX-2 inhibition and colorectal cancer. *Semin Oncol*, 31: 12–21.

Krysan K, Reckamp KL, Dalwadi H, Sharma S, Rozengurt E, Dohadwala M, Dubinett SM. (2005) Prostaglandin E2 activates mitogen-activated protein kinase/Erk pathway signaling and cell proliferation in non-small cell lung cancer cells in an epidermal growth factor receptor-independent manner. *Cancer Res*, 65: 6275–6281.

Kulp SK, Yang YT, Hung CC, Chen KF, Lai JP, Tseng PH, Fowble JW, Ward PJ, Chen CS. (2004) 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1/Akt signaling represents a major cyclooxygenase-2-independent target for celecoxib in prostate cancer cells. *Cancer Res*, 64: 1444–1451.

Lavalle GE, Bertagnolli AC, Tavares LF, Cassali GD. (2009) Cox-2 expression in

canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. *Vet Pathol*, 46: 1275–1280.

Lavrik IN, Krammer PH. (2012) Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death Differ*, 19: 36–41.

Liao X, Lochhead P, Nishihara R, Morikawa T, Kuchiba A, Yamauchi M, Imamura Y, Qian ZR, Baba Y, Shima K, Sun R, Nosho K, Meyerhardt JA, Giovannucci E, Fuchs CS., Chan AT., Ogino S. (2013) Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival. *N Engl J Med*, 367: 1596–1606.

Lim ML, Lum MG, Hansen TM, Roucou X, Nagley P. (2002) On the release of cytochrome c from mitochondria during cell death signaling. *J Biomed Sci*, 9: 488–506.

Lindsay J, Esposti MD, Gilmore AP. (2011) Bcl-2 proteins and mitochondria--specificity in membrane targeting for death. *Biochim Biophys Acta*, 1813: 532–539.

Liu B, Qu L, Tao H. (2009) Cyclo-oxygenase 2 up-regulates the effect of multidrug resistance. *Cell Biol Int*, 34: 21–25.

Liu X, Yue P, Zhou Z, Khuri FR, Sun SY. (2004) Death receptor regulation and celecoxib-induced apoptosis in human lung cancer cells. *J Natl Cancer Inst*, 96: 1769–1780.

Maier TJ, Janssen A, Schmidt R, Geisslinger G, Grösch S. (2005) Targeting the beta-catenin/APC pathway: a novel mechanism to explain the cyclooxygenase-2-independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *FASEB J*, 19: 1353–1355.

Mohammed SI, Khan KNM, Sellers RS, Hayek MG, DeNicola DB, Wu L, Bonney PL, Knapp DW. (2004) Expression of cyclooxygenase-1 and 2 in naturally-occurring canine cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 70: 479–483.

Nam DH, Park K, Park C, Im YH, Kim MH, Lee S, Hong SC, Shin HJ, Kim JH, Eoh W, McDonnell TJ. (2004) Intracranial inhibition of glioma cell growth by

cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib. *Oncol Rep*, 11: 263–268.

Nicholson KM, Anderson NG. (2002) The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal*, 14: 381–395.

Nussmeier NA, Whelton AA, Brown MT, Langford RM, Hoelt A, Parlow JL, Boyce SW, Verburg KM. (2005) Complications of the COX-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after cardiac surgery. *N Engl J Med*, 352: 1081–1091.

Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. (2011) Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem*, 351: 41–58.

Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M. (1995) Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science*, 269: 682–685.

Pinho SS, Carvalho S, Cabral J, Reis CA, Gärtner F. (2012) Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. *Transl Res*, 159:165–172.

Pop C, Timmer J, Sperandio S, Salvesen GS. (2006) The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Mol Cell*, 22: 269–275.

Pradelli LA, Bénétteau M, Ricci JE. (2010) Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cell Mol Life Sci*, 67: 1589–1597.

Pugh S, Thomas GA. (1994) Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E₂. *Gut*, 35: 675–678.

Queiroga FL, Alves A, Pires I, Lopes C. (2007) Expression of Cox-1 and Cox-2 in canine mammary tumors. *J Comp Pathol*, 136: 177–185.

Reginato MJ, Mills KR, Paulus JK, Lynch DK, Sgroi DC, Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS. (2003) Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat Cell Biol*, 5: 733–740.

Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, Joensuu H, Isola J.

(2002) Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res*, 62: 632–635.

Rivera P, von Euler H. (2011) Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors. *Vet Pathol*, 48: 132–146.

Rolle CE, Sengupta S, Lesniak MS. (2012) Mechanisms of immune evasion by gliomas. *Adv Exp Med Biol*, 746: 53–76.

Rong Y, Distelhorst CW. (2008) Bcl-2 protein family members: versatile regulators of calcium signaling in cell survival and apoptosis. *Annu Rev Physiol*, 70: 73–91.

Rothwell PM, Wilson M, Price JF, Belch JF, Meade TW, Mehta Z. (2012) Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomised controlled trials. *Lancet*, 379: 1591–1601.

Saikawa Y, Sugiura T, Toriumi F, Kubota T, Suganuma K, Isshiki S, Otani Y, Kumai K, Kitajima M. (2004) Cyclooxygenase-2 gene induction causes CDDP resistance in colon cancer cell line, HCT-15. *Anticancer Res*, 24: 2723–2728.

Salvesen GS, Riedl SJ. (2008) Caspase mechanisms. *Adv Exp Med Biol*, 615: 13–23.

Shao D, Kan M, Qiao P, Pan Y, Wang Z, Xiao X, Li J, Chen L. (2014) Celecoxib induces apoptosis via a mitochondria-dependent pathway in the H22 mouse hepatoma cell line. *Mol Med Rep*, 10: 2093–2098.

Sharpe CR, Collet JP, McNutt M, Belzile E, Boivin JF, Hanley JA. (2000) Nested case-control study of the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on breast cancer risk and stage. *Br J Cancer*, 83: 112–120.

Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. (1998) Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E₂ in human colon cancer cells. *Cancer Res*, 58: 362–366.

Sheng H, Shao J, Washington MK, DuBois RN. (2001) Prostaglandin E₂ increases growth and motility of colorectal carcinoma cells. *J Biol Chem*, 276: 18075–18081.

Solomon SD, McMurray JJ, Pfeffer MA, Wittes J, Fowler R, Finn P, Anderson WF, Zauber A, Hawk E, Bertagnolli M. (2005) Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. *N Engl J Med*, 352: 1071–1080.

Sunters A, Fernández de Mattos S, Stahl M, Brosens JJ, Zoumpoulidou G, Saunders CA, Coffey PJ, Medema RH, Coombes RC, Lam EW. (2003) FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines. *J Biol Chem*, 278: 49795–49805.

Tait SW, Green DR. (2010) Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11: 621–632.

Thornberry NA, Lazebnik Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science*, 281: 1312–1316.

Tomoda K, Kubota Y, Kato J. (1999) Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature*, 398: 160–165.

Tomozawa S, Tsuno NH, Sunami E, Hatano K, Kitayama J, Osada T, Saito S, Tsuruno T, Shibata Y, Nagawa H. (2000) Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with tumour recurrence, especially haematogenous metastasis, of colorectal cancer. *Br J Cancer*, 83: 324–328.

Tsujii M, DuBois RN. (1995) Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endo peroxide synthase 2. *Cell*, 83: 493–501.

Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. (1997) Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 3336–3340.

Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. (1998) Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cell. *Cell*, 93: 705–716.

Tsujimoto Y. (2003) Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J Cell Physiol*, 195: 158–167.

Villa P, Scott HK, William CE. (1997) Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci*, 22: 388–393.

von Haefen C, Wieder T, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Dörken B, Daniel PT. (2003) Paclitaxel-induced apoptosis in BJAB cells proceeds via a death receptor-independent, caspases-3/-8-driven mitochondrial amplification loop. *Oncogene*, 22: 2236–2247.

Wan D, DuBois RN. (2006) Prostaglandins and cancer. *Gut*, 55: 115–122.

Williams CS, Mann M, DuBois RN. (1999) The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene*, 18: 7908–7916.

Wulfing P, Diallo R, Muller C, Wulfing C, Poremba C, Heinecke A, Rody A, Greb RR, Bocker W, Kiesel L. (2003) Analysis of cyclooxygenase-2 expression in human breast cancer: high throughput tissue microarray analysis. *J Cancer Res Clin Oncol*, 129: 375–382.

Yau L, Zahradka P. (2003) PGE₂ stimulates vascular smooth muscle cell proliferation via the EP2 receptor. *Mol Cell Endocrinol*, 203: 77–90.

Zhang Y, Coogan PF, Palmer JR, Strom BL, Rosenberg L. (2005) Use of nonsteroidal antiinflammatory drugs and risk of breast cancer: the Case-Control Surveillance Study revisited. *Am J Epidemiol*, 162: 165–170.

Zhang Z, Lai GH, Sirica AE. (2004) Celecoxib-induced apoptosis in rat cholangiocarcinoma cells mediated by Akt inactivation and Bax translocation. *Hepatology*, 39: 1028–1037.

Zheng JH, Viacava Follis A, Kriwacki RW, Moldoveanu T. (2016) Discoveries and controversies in BCL-2 protein-mediated apoptosis. *FEBS J*, 283: 2690–2700.

Zhu J, Huang JW, Tseng PH, Yang YT, Fowble J, Shiau CW, Shaw YJ, Kulp SK, Chen CS. (2004) From the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib to a novel class of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 inhibitors. *Cancer Res*, 64: 4309–4318.

Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE, Schror K. (1999)

Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res*, 59: 198–204.