

審査の結果の要旨

氏名 谷澤健太郎

COX-2 は大腸癌では約 80-90%の症例に発現が認められており、選択的 COX-2 阻害薬が大腸癌の増殖や転移に対して抑制的効果を示すという報告が多く存在する。一方、癌細胞だけでなく、腫瘍新生血管の内皮細胞にも COX-2 が発現することが明らかになっており、選択的 COX-2 阻害薬が血管新生を抑制するという報告も存在する。本研究では、選択的 COX-2 阻害薬の抗腫瘍効果のメカニズムの解明を目的として、第一に COX-2 高発現と低発現の大腸癌細胞株を用いて選択的 COX-2 阻害薬の大腸癌細胞に対する作用を検討し、第二にヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を新生血管内皮細胞のモデルとして腫瘍血管新生に対する作用について検討したものであり、下記の結果を得ている。

1) 選択的 COX-2 阻害薬の大腸癌細胞株に対する影響

COX-2 を高発現する HT-29 大腸癌細胞株および COX-2 低発現の DLD-1 を用いて検討した。選択的 COX-2 阻害薬である JTE-522 は、癌細胞の COX-2 発現に相関して、濃度依存性到大腸癌細胞の増殖を抑制した。増殖抑制のメカニズムを検討したところ、アポトーシス誘導によるものではなく、細胞周期の G1 期から S 期への progression の阻害によるものであることが判明した。次に、大腸癌と細胞外基質の相互作用に注目し、基底膜および間質を構成する主な細胞外基質であるコラーゲン、フィブロネクチンおよびラミニンに対する接着能を検討したところ、JTE-522 は、癌細胞の COX-2 発現に相関して、濃度依存性到大腸癌のコラーゲンおよびラミニンに対する接着性を低下させた。これらの細胞外基質との接着に関係する接着因子であるβ1-インテグリン (β1, α2, α6) の細胞表面上の発現をフローサイトメトリーにより検討したところ、JTE-522 は HT-29 における各インテグリンの発現を低下させていた。他方、細胞内を含むインテグリンの発現総量は、JTE-522 処理によっても不変であった。以上より、JTE-522 による細胞表面上のインテグリンの発現低下は転写段階での阻害ではなく、細胞内から細胞表面への輸送の阻害機序またはインテグリンの endocytosis によるものと考えられた。また、prostaglandin (PG)-E2 の添加によって、JTE-522 の接着抑制効果およびβ-1 インテグリン発現減少効果はともに消失し、両効果とも COX-2 を介した作用であることが確認された。β1-インテグリンの発現低下とそれに伴う細胞外基質に対する接着性の低下という上記の実験結果を踏まえ、細胞外基質上での大腸癌細胞の遊走能 (migration) に及ぼす JTE-522 の作用についても、wound closure assay を用いて検討を加えた。その結果、JTE-522 が、癌細胞の COX-2 発現に相関して大腸癌の遊走能を抑制することが確認された。

2) 選択的 COX-2 阻害薬の血管新生に及ぼす影響

新生血管に及ぼす選択的 COX-2 阻害薬である JTE-522 および Etodolac の影響についての検討を行った結果、両者とも内皮細胞の増殖を濃度依存性に抑制した。いずれの内皮

細胞増殖抑制効果も、PGE2 の添加によって消失したことから、COX-2 を介する作用であると考えられた。JTE-522 に比べ Etodolac の抑制効果はより弱かったため、その後の検討には JTE-522 のみを用いた。内皮細胞増殖抑制効果はアポトーシス誘導によるものではなく、大腸癌細胞と同様に細胞周期の G1 期から S 期への progression の阻害に起因していた。G1→S 期への移行の重要な調節因子である Retinoblastoma-susceptibility (Rb) 蛋白について Western blot にて検討したところ、JTE-522 作用によるリン酸化 Rb の発現低下を確認した。次いで、細胞外基質に対する内皮細胞の接着性を検討した結果、JTE-522 の影響を認めず、マトリックスメタロプロテナーゼ (MMP) の産生も変化しなかった。さらに、内皮細胞によるマトリゲル上での管腔形成能に及ぼす影響について検討したところ、JTE-522 の濃度依存性に管腔形成が抑制されることが確認された。

以上、本論文では、HT-29 および DLD-1 細胞を用いることにより、選択的 COX-2 阻害薬が COX-2 を発現する大腸癌に対して、細胞外基質との相互作用の抑制効果を有するという新たな作用機序を見出した。この結果は、選択的 COX-2 阻害薬の抗腫瘍効果の重要なメカニズムを示唆するものと考えられた。さらには、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いることにより、細胞周期の G1 期 arrest 誘導による内皮細胞の細胞増殖抑制を見出し、COX-2 阻害薬が血管新生抑制効果を有する可能性を示唆することができた。

さらに一般化が必要ではあるが、これらの結果は、選択的 COX-2 阻害薬は大腸癌細胞のみならず、血管内皮細胞に対しても抑制的な作用を示すことを示唆しており、大腸癌患者に対する複合的治療戦略となり得ることを示すことができた。さらには、血管新生を標的とすることから、COX-2 を発現しない大腸癌に対しても抗腫瘍効果が得られる可能性をも示唆している。本研究はこれまで知られていなかった、選択的 COX-2 阻害薬の抗腫瘍効果の新たな作用機序を解明すると同時に、選択的 COX-2 阻害薬を用いた抗血管新生療法の可能性を明らかにしたものであり、学位の授与に値するものと考えられる。