

平成20年12月

永原天和 学位論文審査要旨

主 査 清 水 英 治
副主査 長谷川 純 一
同 村 脇 義 和

主論文

Mechanisms of anti-proliferative effect of JTE-522, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on human liver cancer cells

(選択的COX-2阻害薬JTE-522によるヒト肝癌細胞での増殖抑制効果とその作用機序)

(著者：永原天和、岡野淳一、村脇義和)

平成19年 Oncology Reports 18巻 1281頁～1290頁

学 位 論 文 要 旨

Mechanisms of anti-proliferative effect of JTE-522, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on human liver cancer cells

(選択的COX-2阻害薬JTE-522によるヒト肝癌細胞での増殖抑制効果とその作用機序)

肝細胞癌は主たる癌死因の一つであるが、進行癌症例の生命予後は不良であり、発癌機序の解明と効果的な化学療法確立が急務である。選択的cyclooxygenase-2 (COX-2) 阻害薬は、肝癌細胞を含めて増殖抑制や発癌抑制効果が報告されているが、これらの効果がCOX-2阻害作用に依存するか否かや、アポトーシスの関与の有無等、その作用機序には不明な点が多い。本研究では、ヒト肝癌細胞に対して選択的COX-2阻害薬であるJTE-522を添加し、肝癌細胞増殖抑制効果とその作用機序を中心に検討を行った。

方 法

ヒト肝癌細胞株 (HepG2、HLF、huH1、Huh7、PLC/PRF/5) に、選択的COX-2阻害薬JTE-522 (日本たばこ産業株式会社より供与) を10%仔牛血清下および無血清下に添加し (100 nM ~100 μ M)、24、48、72時間後の細胞増殖をMTT法と抗PCNA抗体によるWestern blot法で検討した。肝癌細胞株のCOX-2 mRNAと蛋白の発現はRT-PCR法とWestern blot法で検討した。培養上清のprostaglandin E2 (PGE2)濃度はELISA法で測定した。JTE-522の肝癌細胞増殖抑制機序の解析のため、細胞周期をフローサイトメトリー法、アポトーシス誘導や細胞内シグナル伝達分子の変化を核染色およびWestern blot法で検討した。

結 果

本研究で使用した肝癌細胞株では、培地内血清の有無に関わらずmRNAおよび蛋白レベルでのCOX-2発現を認めなかった。しかしながら、JTE-522添加により肝癌細胞増殖は有意に抑制され、特にPLC/PRF/5細胞の増殖はJTE-522添加により濃度および時間依存性に有意に抑制された。JTE-522添加前後の培養上清PGE2濃度には有意な変化を認めなかった。以上の結果から、COX-2阻害薬であるJTE-522による肝癌細胞増殖抑制効果はCOX-2非依存的であることが示唆された。次に、細胞周期に及ぼす影響をフローサイトメトリー法で検討した結果、huH1細胞においてG1/S期での細胞周期停止が誘導されたが、アポトーシスを示唆するsub-G1分画の出現は認めなかった。細胞周期調節分子に及ぼす影響を抗cyclin E、cyclin D、

p27抗体を用いたWestern blot法で検討したところ、JTE-522によるG1/S期の細胞周期停止に、cyclin Eの発現低下が関与していることが示唆された。核染色や抗caspase-3抗体を用いたWestern blot法の結果、アポトーシスを示唆する核凝集や断片化およびcaspase-3の活性化を認めなかったことから、JTE-522による肝癌細胞増殖抑制機序にはアポトーシスは関与していないと思われた。さらに、JTE-522添加が細胞内シグナル伝達分子へ及ぼす影響をWestern blot法で検討した結果、代表的なMAPKsであるp38MAPK、JNK、ERKの活性には有意な影響を与えなかったが、核内レセプターであるPPAR- γ の発現がHepG2とPLC/PRE/5細胞において、48～72時間後に有意に亢進しており、JTE-522による肝癌細胞増殖抑制機序にPPAR- γ が関与している可能性が示唆された。

考 察

本研究の検討結果からは、JTE-522はCOX-2非依存的に肝癌細胞増殖抑制効果を示すことが示された。COX-2阻害薬の作用機序としてMAPKs、ERK、AKT等の細胞内シグナル伝達分子を標的にすることが報告されているが、今回の検討ではこれらの分子の関与は否定的であった。一方、増殖抑制的な核内レセプターであるPPAR- γ がJTE-522により誘導され、肝癌細胞増殖抑制と関連することが示され、PPAR- γ とCOX-2とのシグナル伝達経路間には何らかのクロストークが存在することが示唆された。COX-2阻害薬による肝癌細胞増殖抑制機序は報告により異なっているが、COX-2阻害薬や肝癌細胞株の違いがその要因であると考えられた。

結 論

選択的COX-2阻害薬であるJTE-522は、COX-2非依存的に細胞増殖抑制効果を示し、その作用機序にはPPAR- γ の発現亢進が関与していることが示唆された。今後、臨床的に肝細胞癌治療薬として選択的COX-2阻害薬の有用性を検討する価値があるものと思われた。