

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
吉中 亮二	主査 教授 大 槻 勝 紀 主査 教授 谷 川 允 彦 副査 教授 勝 健 一 副査 教授 森 浩 志 副査 教授 宮 崎 瑞 夫
主論文題名 COX-2 Inhibitor Celecoxib Suppresses Tumor Growth and Lung Metastasis of a Murine Mammary Cancer (高転移性マウス乳癌モデルを用いた COX-2 選択的阻害薬 celecoxib の抗腫瘍効果および抗転移作用)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》</p> <p>非ステロイド抗炎症薬(NSAIDs)の長期間投与により、大腸癌が縮小するという疫学的知見から、NSAIDs の抗腫瘍効果が注目されるようになった。NSAIDs は、動物実験において、サイクロオキシゲナーゼ(COX)活性の抑制に起因して、抗腫瘍効果やアポトーシス誘導能を発揮することが報告されている。例えば、NSAIDs のインドメタシンでは種々の腫瘍モデルに対して抗腫瘍効果が報告されているが、COX-1 ならびに COX-2 の両者の阻害作用を有することから、消化管潰瘍などの強い副作用が惹起され、臨床応用が極めて困難であった。そこで最近では、副作用の少ない COX-2 選択的阻害薬が脚光を浴び、幾つかの臓器でその抗腫瘍効果が実験的に示されている。</p> <p>そこで、本研究では乳癌に焦点を当て、高率に肺やリンパ節に転移を示すマウス乳癌モデルを用いて、COX-2 選択的阻害薬の celecoxib を投与して、その抗腫瘍効果ならびに抗転移作用について検討した。また、マウス乳癌細胞を用いた <i>in vitro</i> の実験で、celecoxib の作用機序についても詳細に検討した。</p> <p>《方法》</p> <p>A) <i>in vivo</i> study (動物実験)</p> <p>BALB/c 系雌マウスから樹立したマウス乳癌細胞の BJMC3879 を同系のマウスに移植し、7.5 および 15mg/kg/day で celecoxib を腹腔内投与し、経時的に腫瘍体積を計測した。その際、肺およびリンパ節の転移を病理組織学的に検索するとともに、腫瘍細胞のアポトーシスおよび DNA 合成、腫瘍組織内における微小血管密度を免疫組織学的に、また COX-2 および VEGF-A の mRNA 量については real-time RT-PCR を用いて解析した。</p> <p>B) <i>in vitro</i> study</p> <p>乳癌細胞(BJMC3879)に celecoxib を処置の後、パラメーターとして細胞周期(laser scanning cytometer)、アポトーシス(TUNEL 染色)や DNA 合成(BrdU 免疫組織学的染色)を検討し、さらに caspase 活性(蛍光吸光度法)、COX-2 および VEGF-A の mRNA 量(real-time RT-PCR)、PGE2 濃度(RIA 法)について解析した。</p>	

《結果》

A) *in vivo* study

- 1) celecoxib 投与群の体重推移は、対照群との間に有意な差異は認められなかったが、腫瘍体積は 7.5 および 15mg/kg の両群で有意な増加抑制が示された($p < 0.01$)。
- 2) BJMC3879 細胞による乳癌は、中分化型腺癌を呈しており、p53 に変異を認めた。
- 3) 肺転移の発生率は対照群との間に差異は示されなかった。しかし、肺転移巣の大きさは celecoxib 投与群において小さい傾向を示し、さらにマウス1匹当たりの肺転移巣の数では、7.5 および 15mg/kg の celecoxib 投与群で著明に減少した($p < 0.05$)。
- 4) マウス1匹当たりのリンパ節転移個数は、15mg/kg の celecoxib 投与群において減少傾向を認めたが、統計学的な有意差は示されなかった。
- 5) BrdU 陽性率は、7.5 および 15mg/kg の celecoxib 投与群において有意に減少した($p < 0.01$)。
- 6) TUNEL 陽性率を指標とした細胞死の数は、15mg/kg の celecoxib 投与群において著明に増加した($p < 0.05$)。
- 7) 腫瘍内の微小血管密度は、7.5 および 15mg/kg の celecoxib 投与群で有意な減少を示した($p < 0.05$)。また、VEGF-A の mRNA 量においても 7.5 および 15mg/kg の celecoxib 投与群で著明な減少をみた($p < 0.05$)。なお、COX-2 mRNA 量は有意差は示されなかったものの、celecoxib 投与群で低下傾向をみた。

B) *in vitro* study

- 1) 細胞増殖は 10~40 μ M celecoxib の 24 時間処置で有意に抑制された($p < 0.01$)。また、細胞周期に対する影響として、 $G_{0/1}$ 期の細胞の増加と S 期および G_2/M 期の細胞の減少が示された。
- 2) TUNEL 陽性細胞は、celecoxib 処置群で著明な増加を示した($p < 0.01$)。また、celecoxib 処置群において、活性型 caspase-3 および-9 活性の上昇とミトコンドリア膜電位の低下が観察された。
- 3) VEGF-A mRNA 量は celecoxib 処置することにより、有意に低下した。なお、celecoxib 処置群で COX-2 mRNA 量および PGE2 産生量の低下も示された。

《考察および結論》

乳癌は、日本のみならず世界的に死因の上位を占める疾患である。外科的に切除可能な症例は予後が比較的良好であるが、リンパ節、肺、骨、肝などへの転移を伴う症例に関しては、生存期間が短く、化学療法の奏効率が 50%以下であるのが現状である。したがって、乳癌の治療には、外科治療、放射線療法、化学療法の三位一体の治療法の確立が重要である。

celecoxib 投与群では TUNEL 陽性細胞の増加がもたらされ、その細胞死はアポトーシスである可能性が示唆された。哺乳類のアポトーシスの経路には、death receptor 経路 (caspase-8) とミトコンドリア経路 (caspase-9) の 2 つが提唱されている。本研究では celecoxib 投与群において caspase-9 および-3 の活性化を認めたが caspase-8 の活性化は認めず、さらにミトコンドリア膜電位の低下を認めたため、ミトコンドリア経路を介したアポトーシスであると考えられた。さらに本研究で用いた乳癌細胞株に p53 変異が生じていることから、celecoxib は p53 非依存的にアポトーシスを誘導した。すなわちヒト癌の約半数では p53 の変異が生じているため、celecoxib は p53 変異をきたす多くの癌において有効となる可能性を示した。

celecoxib の細胞周期に対する効果では、 G_1 期停止と S 期および G_2/M 期への移行を阻害することが本実験で明らかとなった。また、celecoxib は BrdU 標識率を指標とした DNA 合成の有意な減少も示し、S 期の低下とよく一致する。

現在まで、血管新生の程度は腫瘍の増大と予後に強い相関があるとの報告が見られる。本研究では celecoxib 投与により腫瘍内の微小血管密度が低下するとともに、COX-2 や PGE2 産生の低下が見られた。乳癌を含む種々の腫瘍において、PGE2 に代表されるプロスタグランジン濃度の上昇が報告されている。また、プロスタグランジン産生酵素である COX-2 は、腫瘍において過剰発現しており、血管新

生に強い関わりを持つことが示唆されている。例えば、ヌードマウスへの移植ヒト大腸癌に対する celecoxib の投与は血管新生と増殖の両者を抑制したという報告がなされている。乳癌モデルにおいても、celecoxib が腫瘍内の微小血管新生を抑制したという報告がある。本実験では、さらに血管新生因子の VEGF-A mRNA の低下が示された。これらの事実を考え合わせると、本研究では celecoxib が COX-2 の選択的阻害作用による PGE2 の低下と VEGF-A の減少により腫瘍内の血管新生を抑制し、また加えてアポトーシスや細胞増殖抑制作用も示すことから、この両者の複合効果により抗腫瘍効果を発揮するものと考えられた。

我々の研究において、celecoxib の 7.5 および 15mg/kg 投与群はともに、統計学的に有意な肺転移の抑制、DNA 合成の抑制、腫瘍内微小血管密度の低下、VEGF-A mRNA の減少を観察したが、いずれも用量依存性に乏しく、両群の薬剤投与効果は類似していた。celecoxib の 7.5mg/kg 投与群において腫瘍内の COX-2 濃度が著しく抑制されており、7.5mg/kg 用量が最大限の薬効を示す用量であり、15mg/kg の用量においては体重減少は伴わないものの、薬理学的な毒性作用があった可能性がある。

結論として、本研究で観察された celecoxib の抗腫瘍効果は、少なくとも血管新生の抑制やアポトーシスが関与していると考えられた。血管新生の抑制は、celecoxib による VEGF-A や PGE2 産生の抑制が関与しており、またアポトーシスはミトコンドリア経路を介した機序で惹起されるものと考えられた。乳癌が 4cm 以上になると、再発や転移を起こす危険性が高まるという報告がある。したがって、選択的 COX-2 阻害薬である celecoxib の臨床応用は、乳癌において癌の進展や転移を抑制あるいは遅延させる効果のあることを示唆しており、臨床的意義は極めて高いと考えられる。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	吉中 亮二
論文審査担当者		主 査 教授 大 槻 勝 紀 主 査 教授 谷 川 允 彦 副 査 教授 勝 健 一 副 査 教授 森 浩 志 副 査 教授 宮 崎 瑞 夫	
主論文題名 COX-2 Inhibitor Celecoxib Suppresses Tumor Growth and Lung Metastasis of a Murine Mammary Cancer (高転移性マウス乳癌モデルを用いた COX-2 選択的阻害薬 celecoxib の抗腫瘍効果および抗転移作用)			
論文審査結果の要旨			
<p>本研究は、COX-2 選択的阻害薬である celecoxib のマウス乳癌モデルに対する抗腫瘍効果および抗転移作用を検討したものである。非ステロイド抗炎症薬(NSAIDs)は、動物実験において、サイクロオキシゲナーゼ(COX)活性の抑制に起因して、抗腫瘍効果やアポトーシス誘導能を発揮することが報告されている。COX-1 ならびに COX-2 の両者の阻害作用を有する従来の NSAIDs では、消化管潰瘍などの強い副作用が惹起され、臨床応用が極めて困難であった。そこで本研究では副作用が少なく、幾つかの臓器でその抗腫瘍効果が実験的に示されている COX-2 選択的阻害薬の celecoxib を高率に肺やリンパ節に転移を示すマウス乳癌モデルに投与して、その抗腫瘍効果ならびに抗転移作用について検討している。</p> <p>本研究において、celecoxib 投与群で誘導された細胞死は、caspase-9 および-3 の活性化とミトコンドリア膜電位の低下が示されたことより、ミトコンドリア経路を介したアポトーシスであった。さらに本研究で用いた乳癌細胞株に p53 変異が生じていることから、celecoxib は p53 非依存的にアポトーシスを誘導した。すなわちヒト癌の約半数では p53 の変異が生じているため、celecoxib は p53 変異をきたす多くの癌において有効となる可能性を示している。</p> <p>血管新生の程度は腫瘍の増大と予後に強い相関があるとの報告が見られる。本研究では celecoxib が COX-2 の選択的阻害作用による PGE2 の低下と VEGF-A の減少により腫瘍内の血管新生を抑制している。また加えてアポトーシスや細胞増殖抑制作用も示すことから、これらの複合効果により抗腫瘍効果を発揮するとしている。</p> <p>以上のことから、celecoxib の臨床応用は、乳癌において癌の進展や転移を抑制あるいは遅延させる効果のあることを示唆しており、臨床的意義は極めて高い。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第9条に定める所の博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) Anticancer Research 6B(26): 4245-4254, 2006</p>			