



E toodo lac, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor induces the up-regulation of E-cadherin and has an anti-tumoreffect on human bladder cancer cells in vitro and in vivo

岡本, 明子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2008-02-29

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4149

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004149>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名 岡本 明子
博士の専攻分野の名称 博士 (医学)
学 位 記 番 号 博い第 1893 号
学位授与の 要 件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付 平成 20 年 2 月 29 日

【 学位論文題目 】

Etodolac, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor induces the up-regulation of E-cadherin and has an anti-tumoreffect on human bladder cancer cells in vitro and in vivo(ヒト膀胱癌細胞における選択的 Cox-2 阻害剤、Etodolac の E-cadherin 発現増強 および抗腫瘍効果の検討)

審 査 委 員

主 査 教 授 南 康博
教 授 錦織 千佳子
教 授 丹生 健一

【緒言】

膀胱癌の90%が、尿路上皮（移行上皮 transitional cell carcinoma）癌とされる。初診療時、多くの場合で膀胱腫瘍は表在性で、經尿道的膀胱腫瘍切除術（TURBT）によって治療が可能である。しかしながら、初発後5年間で約60%の割合で膀胱内再発がおこり、10～30%が浸潤性腫瘍へと移行する。

ケモプレビエンション（Chemoprevention）とは、薬剤の服用により、癌の転移や再発のリスクを低減するものである。近年、定期的なNSAIDsの服用が、膀胱癌の進行リスクの低減に寄与する可能性があるとの報告がある。さらに、数種類のNSAIDsが動物モデルにおいて膀胱癌に対する抗腫瘍効果を示したとの報告がある。このようにNSAIDsは膀胱癌に対する新たな治療法となる可能性がある。

Cyclooxygenase(COX)は、アラキドン酸を基質としてプロstagランジン(PG)の生成を触媒する酵素である。COX-1は、ほとんどの組織や細胞で常時発現している。一方で、COX-2は通常細胞には存在せず、炎症性サイトカイン等によって誘導される。また、COX-2は、多くの癌細胞で発現しており、アポトーシス阻害、浸潤および血管新生に関連した腫瘍形成の一因としても認識されている。

NSAIDsは、COX-1およびCOX-2双方の酵素作用を遮断するが、胃腸障害等の副作用はCOX-1の阻害によるものである。EtodolacはCOX-2の選択性が高く、アメリカ合衆国や日本を含む数カ国で鎮痛剤として実際の臨床で使用されている。我々の先行研究でも、前立腺癌において、Etodolacの投与が抗腫瘍作用および、アポトーシス誘導との関連性が示唆された。

膀胱癌におけるCox-2の過剰発現や、E-cadherinの低発現は、腫瘍の増殖、浸潤、転移などと強く関連するとの報告がある。E-cadherinとは、膜貫通型の細胞接着分子であり、選択的な上皮細胞の接着に関与する。癌の最大の問題である浸潤および転移とは、癌細胞が原発巣から遊離し血流にのって体内の別の部位に到達し、そこで新たに増殖を始めることで、E-cadherinは、細胞接着を維持することによって、癌の浸潤を制御する働きがあると考えられている。選択的COX-2阻害薬が、E-cadherinの発現を促進することで、腫瘍の浸潤を低減する可能性が考えられる。

【方法】

本研究では、選択的Cox-2阻害薬であるEtodolacの膀胱癌における抗腫瘍効果をIn Vitro/Vivoで検討をおこなった。TCC Grade III～Iヒト膀胱癌細胞から樹立した細胞株であるT24、5637、およびKK47に対するEtodolacの細胞毒性を調べた。また、上記細胞株において、EtodolacのCOX-2およびE-cadherinのmRNAの発現増強効果について、定量的RT-PCR法にて検討した。T24細胞株の皮下組織への動物移植モデルにおいて、COX-2およびE-cadherin mRNAの発現を定量的RT-PCR法で検討した。さらに、免疫組織染色によって、アポトーシス誘導とE-cadherin蛋白の発現を検討した。

【結果】

EtodolacはT24細胞株に対して有意に細胞毒性を示した。3種類の細胞株のうち、最も悪性度の高いTCC、Grade III腫瘍から樹立されたT24細胞株は、他の細胞株と比較してCOX-2 mRNAが過剰に発現し、E-cadherin mRNAの発現は著しく低下していた。またEtodolacは、T24細胞においてE-cadherinの発現を有意に増強した。動物モデルにおいて、Etodolacはコントロール群と比較してT24皮下腫瘍の増殖を有意に抑制し、E-cadherin mRNAの発現を高めた。一方で、COX-2 mRNAの発現を抑制した。さらに、免疫組織染色によって、皮下腫瘍のE-cadherinの発現と癌細胞のアポトーシスが明らかとなった。

【考察】

COX-2の高発現およびE-cadherinの発現の消失は、膀胱癌の悪性度および浸潤度に相關する。膀胱癌の免疫組織染色に関する他者の研究では、COX-2の高発現がEcadherinの発現の低下と関連することが報告された。本研究では、悪性度の異なる3種の膀胱癌細胞株、T24、5637とKK47; Grade III, II, および Iについて調べたが、T24でCOX-2 mRNAの発現が最も高く、E-cadherinの発現が最も低下していることが明らかとなった。COX-2を高度に選択的に阻害するEtdolacは、T24でのみ 10^{-4} Mの濃度で細胞増殖を有意に阻害したが、他の細胞株では有意差はなかった。

選択的COX-2阻害薬は、In Vitro, Vivoの双方において、細胞移動、細胞接着、腫瘍浸潤を阻害することが示されている。COX-2阻害薬はE-cadherinの発現を促進するという報告が多数ある。野田らは、ヒト大腸癌細胞株Caco 2において 10^{-3} MのEtdolacが著しく細胞増殖を抑制し、E-cadherinタンパクの増加を促すことを示した。本研究でも同様に、 10^{-4} Mの濃度のEtdolacが、T24細胞株での細胞増殖を抑制し、E-cadherin mRNAの発現を促すことを示した。

本研究は、動物モデルにおけるT24細胞株の皮下組織への移植モデルでも、E-cadherin mRNAの発現を促進し、COX-2 mRNAの発現を抑制することを示した。免疫組織染色によって、Etdolacを投与したT24における細胞間結合部にE-cadherinの発現が認められた。我々の先行研究では、マウスのヒト前立腺癌皮下移植モデルにおいて、体重1kgにつき10mgのEtdolacを毎日投与することで、腫瘍の増殖を有意に抑制した。本研究では、同量のEtdolacの投与によって、T24細胞株を皮下移植したヌードマウスでの腫瘍の増殖を有意に抑制した。現在Etdolacは、鎮痛を目的として米国、ヨーロッパおよび日本の臨床で使用され、一日の投与量は400～600mgである。この投与量は、我々がおこなった動物実験での投与量とほぼ同量であり、有意に抗腫瘍作用がみとめられた。

本研究は、ssDNAの免疫組織染色法によって、Etdolacを投与したT24皮下腫瘍でのアポトーシスを確認した。COX-2阻害薬が、膀胱癌を含む様々な癌においてアポトーシスを誘導するという報告と同様の結果となった。

【結論】

本研究は、選択的COX-2阻害薬であるEtdolacが、In Vivo/Vitroの双方において、TCC grade IIIヒト膀胱癌細胞株から樹立されたT24細胞株における腫瘍増殖を有意に阻害し、E-cadherinの発現を増強することを確認した。これらの結果は、Etdolacが、浸潤や転移のリスクが高い悪性度の高い膀胱癌に対する治療あるいは再発予防に有効な薬剤である可能性を示唆するものであると結論づけた。

| 論文審査の結果の要旨 | | | |
|-------------------------------|--|----|-------|
| 受付番号 | 甲 第1897号 | 氏名 | 岡本 明子 |
| 論文題目 Title of Dissertation | <p>Etodolac, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces the up-regulation of E-cadherin and has an anti-tumor effect on human bladder cancer cells in vitro and in vivo</p> <p>ヒト膀胱癌細胞における選択的 Cox-2 阻害剤、Etodolac の E-cadherin 発現増強および抗腫瘍効果の検討</p> | | |
| 審査委員 Examiner | <p>主査 Chief Examiner</p> <p>角 康博</p> <p>副査 Vice-examiner</p> <p>錦織 千佳子</p> <p>副査 Vice-examiner</p> <p>丹生 一</p> | | |
| 審査終了日 | 平成 20 年 1 月 16 日 | | |

(要旨は1,000字～2,000字程度)

膀胱癌の90%が、尿路上皮（移行上皮transitional cell carcinoma）癌とされる。初診時、多くの場合で膀胱腫瘍は表在性で、経尿道的膀胱腫瘍切除術（TURBT）によって治療が可能である。しかしながら、初発後5年間で約60%の割合で膀胱内再発がおこり、10～30%が浸潤性腫瘍へと進行する。近年、定期的なNSAIDsの服用が、膀胱癌の進行リスクの低減に寄与する可能性があるとの報告がある。さらに、数種類のNSAIDsが動物モデルにおいて膀胱癌に対する抗腫瘍効果を示したとの報告がある。Cyclooxygenase(COX)は、プロスタグランジン(PG)の生成を触媒する酵素であり、COX-1は殆どの組織や細胞で常時発現しているが、COX-2は通常細胞には存在せず、炎症性サイトカイン等によって誘導される。また、COX-2は、多くの癌細胞で発現しており、アポトーシス阻害、浸潤および血管新生に関連した腫瘍形成の一因としても認識されている。EtodolacはCOX-2の選択性が高く、鎮痛剤として実際の臨床で使用されている。膀胱癌におけるCox-2の過剰発現や上皮細胞の接着に関与するE-cadherinの低発現は、腫瘍の増殖、浸潤、転移などと強く関連するとの報告がある。癌の最大の問題である浸潤・転移とは、癌細胞が原発巣から遊離し血流にのって体内的別の部位に到達し、そこで新たに増殖を始めることであり、E-cadherinは細胞接着を維持することにより、癌の浸潤を制御すると考えられており、選択的COX-2阻害薬がE-cadherinの発現を促進し、腫瘍の浸潤を低減する可能性が考えられる。

本研究では、選択的Cox-2阻害薬であるEtodolacの膀胱癌における抗腫瘍効果をin vitro/in vivoで検討した。TCC Grade III～Iヒト膀胱癌細胞から樹立した細胞株T24、5637、およびKK47に対するEtodolacの細胞毒性を調べた。また、上記細胞株におけるEtodolacのCOX-2及びE-cadherinのmRNAの発現増強効果について、定量的RT-PCR法にて検討した。T24細胞株の皮下組織への動物移植モデルにおいて、COX-2及びE-cadherin mRNAの発現を定量的RT-PCR法で検討した。さらに、免疫組織染色によりアポトーシス誘導とE-cadherin蛋白の発現を検討した。EtodolacはT24細胞株に対して有意に細胞毒性を示した。3種類の細胞株のうち、最も悪性度の高いTCC、Grade III腫瘍から樹立されたT24細胞株は、他の細胞株と比較してCOX-2 mRNAが過剰に発現し、E-cadherin mRNAの発現は著しく低下していた。またEtodolacは、T24細胞においてE-cadherinの発現を有意に増強した。動物モデルにおいて、Etodolacはコントロール群と比較し

てT24 皮下腫瘍の増殖を有意に抑制し、E-cadherin mRNA の発現を高める一方、COX-2 mRNA の発現を抑制した。さらに、免疫組織染色により、皮下腫瘍のE-cadherin の発現と癌細胞のアポトーシスが明らかとなった。

COX-2 の高発現及びE-cadherin の発現の消失は、膀胱癌の悪性度・浸潤度に相關する。本研究では、悪性度の異なる3種の膀胱癌細胞株、T24、5637 と KK47 ; Grade III, II 及び I について調べたが、T24 でCOX-2 mRNA の発現が最も高く、E-cadherin の発現が最も低下していることが明らかとなった。COX-2 を高度に選択的に阻害するEtodolac は、T24 でのみ10⁻⁶M の濃度で細胞増殖を有意に阻害したが、他の細胞株では有意差はなかった。選択的COX-2 阻害薬は、in vitro, in vivo の双方で細胞移動、細胞接着、腫瘍浸潤を阻害することが示されている。COX-2 阻害薬はE-cadherin の発現を促進すると報告されている。ヒト大腸癌細胞株Caco 2において10⁻⁶M のEtdolac が著しく細胞増殖を抑制し、E-cadherinタンパクの増加を促すことが示されている。本研究でも同様に、10⁻⁶M の濃度のEtdolac がT24 細胞株での細胞増殖を抑制し、E-cadherin mRNA の発現を促すことを示した。また、動物モデルでのT24 細胞株の皮下組織への移植実験でも、E-cadherin mRNA の発現を促進し、COX-2 mRNA の発現を抑制することを示した。免疫組織染色により、Etdolac を投与したT24 における細胞間結合部にE-cadherin の発現が認められた。本研究では、同量のEtdolac 投与により、T24 細胞株を皮下移植したヌードマウスでの腫瘍の増殖を有意に抑制した。Etdolac は、鎮痛を目的として使用され、一日の投与量は400~600mg である。この投与量は、我々がおこなった動物実験での投与量とほぼ同量であり、有意に抗腫瘍作用が認められた。

本研究は、COX-2阻害薬Etdolacの膀胱癌細胞株への作用をin vitro/in vivoで研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったEtdolacによるE-cadherin発現増強と腫瘍増殖抑制の関連について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。