



Etodolac inhibits EBER expression and induces Bcl-2-regulated apoptosis in Burkitt's lymphoma cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小林, 美希 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/296

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 466号	学位授与年月日	平成18年 3月15日
氏 名	小 林 美 希		
論文題目	<p>Etodolac inhibits EBER expression and induces Bcl-2-regulated apoptosis in Burkitt's lymphoma cells (エトドラクはバーキットリンパ腫細胞株において EBER の発現を抑制し、Bcl-2 で制御されたアポトーシスを誘導する)</p>		

博士(医学) 小 林 美 希

論文題目

Etodolac inhibits *EBER* expression and induces Bcl-2-regulated apoptosis in Burkitt's lymphoma cells

(エトドラクはバーキットリンパ腫細胞株において*EBER*の発現を抑制し、Bcl-2で制御されたアポトーシスを誘導する)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

シクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)は悪性腫瘍の治療において重要な細胞内標的であると報告されているが、COX-2阻害剤の悪性腫瘍に対する増殖抑制効果はCOX-2に依存する機序だけでなくCOX-2に依存しない機序も証明されている。今回我々はバーキットリンパ腫細胞株(DaudiとRajiの2種類)を用いてCOX-2阻害剤であるエトドラクがCOX-2に依存しない経路でアポトーシスを誘導することを示し、その作用機序について検討した。

〔材料ならびに方法〕

DaudiとRajiの2種類に対しCOX-2の発現の有無についてRT-PCR法で確認後、本邦において臨床使用可能なCOX-2阻害剤であるエトドラク、メロキシカム(10-100 μ M)存在下で培養した。72時間後に細胞増殖を3-(4,5-ジメチル-チアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド(MTT)アッセイにて、細胞周期とアポトーシスをフローサイトメトリーで測定した。アポトーシスの評価については、(1)16時間後にカスパーゼ3活性の測定と、(2)24時間後にアポトーシス抑制蛋白であるBcl-2、Bcl-X_L、アポトーシス実行因子であるカスパーゼ9、3、8、カスパーゼ阻害蛋白であるcIAP-1、Survivinの発現量の変化をウエスタンブロット法で測定した。また、エトドラクのバーキットリンパ腫への作用について、12時間後の*bcl-2*のmRNAと、8時間後のEB virus encoded RNA(*EBER*)-1、*EBER*-2の発現量をRT-PCR法で測定した。最後に、エトドラクの光学異性体であるR体、S体と、ラセミ体、R体とS体を混合したものそれぞれでバーキットリンパ腫細胞を処理し、細胞増殖をMTTアッセイで測定した。

〔結果〕

DaudiとRajiともにCOX-2の発現を認めなかった。増殖抑制効果はエトドラクで認められ、メロキシカムではほとんど認められなかった。エトドラクの効果は濃度依存性に認められ、100 μ Mでほとんどの細胞においてアポトーシスが誘導された。カスパーゼ3の活性は、エトドラクで処理するとコントロールに比して5-7倍となり、カスパーゼ阻害剤を加えることでほとんど抑制された。メロキシカムの投与では活性はほとんど増加しなかった。ウエスタンブロット法により、エトドラク処理24時間後にアポトーシス抑制蛋白であるBcl-2、Bcl-X_Lの発現低下、カスパーゼ9、3の活性化が認められ、カスパーゼ阻害蛋白であるIAPs(cIAP-1、Survivin)の発現低下も認められた。カスパーゼ8の変化はなかった。これらの変化はメロキシカムでは見られなかった。次に、DaudiとRajiともに*EBER*-1、-2を発現していることを確認した後、エトドラク処理8時間後に*EBER*-1、-2の発現量を測定したところ、濃度依存性に発現の低下が認められた。また、エトドラクの光学異性体であるR体、S体による抗腫瘍効果は、ラセミ体、および混合物による抗腫瘍効果に比して非常に弱く、単独では効果がほとんど認められなかった。

〔考察〕

一般的に、COX-2阻害剤の悪性腫瘍に対する増殖抑制効果はCOX-2を直接阻害することによってその効果を発揮するが、DaudiとRajiともにCOX-2の発現を認めないにもかかわらず、エトドラクは濃度依存性にアポトーシスを誘導した。このことは、エトドラクのアポトーシス誘導の機序として、COX-2非依存的経路が存在することを示す。つまり、エトドラクはアポトーシス抑制蛋白Bcl-2を減少させることで、カスパーゼ系を活性化させ、アポトーシスを誘導すると考えられた。一方、同じCOX-2阻害剤であるメロキシカムはアポトーシスを誘導しなかった。この効果の違いは、エトドラクは一般的にCOX-2阻害剤が有しているスルフォニル基がないことによると考えられた。また、バーキットリンパ腫では、転写因子である c-mycの活性化とEBウイルス感染が、腫瘍の発生、細胞増殖に関与していると考えられている。最近の報告において、バーキットリンパ腫細胞株においては、EBウイルスに感染するとEBERが核内蛋白に結合し、Bcl-2の発現を亢進させ、その結果アポトーシスが抑制されていることが判明した。今回、EBウイルス陽性であるDaudiとRajiでは、エトドラクで処理することによりEBER-1、EBER-2の発現が低下することが示され、その結果Bcl-2の発現低下が引き起こされると考えられた。

また、光学異性体、ラセミ体による生物学的、薬理学的な効果の違いは数多くの物質で認められているが、エトドラクに関しても効果の違いが認められた。レセプターに対する親和性の差などが考えられるが、エトドラクにおいてはレセプターが見つかっていないため、詳細についてはまだ分かっていない。

〔結論〕

エトドラクは、バーキットリンパ腫細胞株においてCOX-2非依存的経路でアポトーシスを誘導することが示唆された。その作用機序は、EBER-1、EBER-2の発現を低下させることで、アポトーシス抑制蛋白Bcl-2の発現低下を引き起こし、ミトコンドリア経路によってアポトーシスが誘導されると考えられた。エトドラクの光学異性体、ラセミ体、および混合物による抗腫瘍効果の差については今後の課題である。

論文審査の結果の要旨

シクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)は悪性腫瘍の治療において重要な細胞内標的であると報告されているが、COX-2阻害剤の悪性腫瘍に対する増殖抑制効果はCOX-2に依存する機序だけでなくCOX-2に依存しない機序も証明されている。申請者はバーキットリンパ腫細胞株(DaudiとRajiの2種類)を用いてCOX-2阻害剤であるエトドラクの効果と作用機序を検討した。

〔材料ならびに方法〕

DaudiとRajiの2種類に対しCOX-2の発現の有無についてRT-PCR法で確認後、本邦において臨床使用可能なCOX-2阻害剤であるエトドラク、メロキシカム(10-100 μ M)存在下で培養した。72時間後に細胞増殖を3-(4,5-ジメチル-チアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド(MTT)アッセイにて、細胞周期とアポトーシスをフローサイトメトリーで測定した。アポトーシスの評価については、(1)16時間後カスパーゼ3活性の測定と、(2)24時間後アポトーシス抑制蛋白であるBcl-2、Bcl-X_L、アポトーシス実行因子であるカスパーゼ9、3、8、カスパーゼ阻害蛋白であるcIAP-1、Survivinの発現量の変化をウエスタンブロット法で測定した。また、エトドラクのバーキットリンパ腫への作用について、12時間後のbcl-2のmRNAと、8時間後のEB virus encoded RNA (EBER)-1、EBER-2の発現量をRT-PCR法で測定した。

最後に、エトドラクの光学異性体であるR体、S体と、ラセミ体、R体とS体を混合したものそれぞれでバーキットリンパ腫細胞を処理し、細胞増殖をMTTアッセイで測定した。

〔結果〕

DaudiとRajiともにCOX-2の発現を認めなかったが、増殖抑制効果はエトドラクで認められ、メロキシカムではほとんど認められなかった。エトドラクの効果は濃度依存性に認められ、100 μ Mでほとんどの細胞においてアポトーシスが誘導された。カスパーゼ3の活性は、エトドラクで処理すると対照に比して5-7倍となり、カスパーゼ阻害剤を加えることでほとんど抑制された。メロキシカムの投与では活性はほとんど増加しなかった。ウエスタンブロット法により、エトドラク処理24時間後にアポトーシス抑制蛋白であるBcl-2、Bcl-X_Lの発現低下、カスパーゼ9、3の活性化が認められ、カスパーゼ阻害蛋白であるIAPs(cIAP-1、Survivin)の発現低下も認められた。カスパーゼ8の変化はなかった。これらの変化はメロキシカムでは見られなかった。次に、DaudiとRajiともに*EBER-1*、*-2*を発現していることを確認した後、エトドラク処理8時間後に*EBER-1*、*-2*の発現量を測定したところ、濃度依存性に発現の低下が認められた。光学異性体R体、S体による抗腫瘍効果は、ラセミ体、および混合物による抗腫瘍効果に比して非常に弱く、単独では効果がほとんど認められなかった。

〔考察〕

DaudiとRajiともにCOX-2の発現を認めないにもかかわらず、エトドラクは濃度依存性にアポトーシスを誘導した。一方、COX-2阻害活性を有するメロキシカムはアポトーシスを誘導しなかった。以上の結果より、エトドラクのアポトーシス誘導の機序にCOX-2非依存的経路が存在することが示唆された。その機序としてエトドラクはアポトーシス抑制蛋白Bcl-2を減少させることで、カスパーゼ系を活性化させ、アポトーシスを誘導すると考えられた。バーキットリンパ腫細胞株では、EBウイルス感染で*EBER*が核内蛋白に結合し、Bcl-2の発現を亢進させ、その結果アポトーシスが抑制されている病態であることを考えると、エトドラク処理による*EBER-1*、*EBER-2*の発現低下の結果Bcl-2の発現低下が引き起こされたと考えられた。ラセミ体による効果の違いはレセプターに対する親和性の差などが考えられるが、詳細についてはまだ分かっていない。

申請者は、エトドラクが、バーキットリンパ腫細胞株においてCOX-2非依存的経路でアポトーシスを誘導すると結論し、*EBER-1*、*EBER-2*の発現低下を介するものとした。エトドラクの光学異性体、ラセミ体、および混合物による抗腫瘍効果の差を見だし、その機序については今後の課題とした。

この研究に対し審査委員会では以下の質問を行った。

- 1) COX-1とCOX-2のregulatory sequenceの違いについて
- 2) 使用した細胞にCOX-2を誘導することはできるのか
- 3) 細胞のviabilityの判定のしかた
- 4) アポトーシスの判定法について
- 5) カスパーゼ3活性の評価のしかた
- 6) 蛋白のモニターは何時間後におこなっているか
- 7) 他のリンパ腫には効果があるか
- 8) anti PARPの意義

- 9) ラセミ体による効果の機構について
- 10) EBV陰性のバーキットリンパ腫には効果があるか

これらの質問の対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	梶	村	春	彦	
	副査	渡	邊	裕	司	副査 本 郷 輝 明