

論文要旨

Toyohide Hayashi, Kenryu Nisiyama and Tsutomu Shirahama

Inhibition of 5-lipoxygenase pathway suppresses the growth of bladder cancer cells

International Journal of Urology 2006 13, 1086-1091 掲載

(5-Lipoxygenase 経路の遮断は膀胱癌細胞の増殖を抑制する)

【序論および目的】

膀胱癌の高い致死率は、シスプラチン、メソトレキセート、ビンブラスチンの併用化学療法を含む治療努力をもってしても改善されずにいる。それ故に、膀胱癌の取り扱いのための新しい戦略が必要である。

発育因子やサイトカインは、活性型ホスホリパーゼ A2 によって、細胞膜からアラキドン酸を遊離させる。COX 経路、LOX 経路といった二つの重要な経路がアラキドン酸代謝経路にはあり、その代謝産物は癌細胞の増殖に関与している。

我々は、膀胱癌におけるアラキドン酸代謝経路の法則を確定するために、膀胱癌でのアラキドン酸代謝酵素の薬理的阻害剤の効果を調べた。

【材料および方法】

ヒト膀胱癌細胞株 (BOY、T24、HT1376、SCaBeR、RT4) は、LOX 経路、COX 経路の中の種々のアラキドン酸代謝酵素阻害剤 (インドメタシン、ASA、NS398、ETYA、NDGA、AA861、MK886、CDC) で処理され、発育抑制の効果が調べられた。

癌細胞の酵素の発現は、イムノブロット解析で調べられた。

論文要旨

【結果】

アラキドン酸代謝酵素阻害剤の中で、5-LOXの特異的阻害剤であるAA861が最も強い膀胱癌細胞株の発育抑制を持つことが示されたため、実験をAA861に絞った。AA861の発育抑制は、BOY, T24, HT1376, SCaBeRのような5-LOXを発現している細胞では顕著で、RT4のような5-LOXを発現していない細胞では劣っていた。

また、AA861は濃度依存的に膀胱癌の発育を抑制した。その発育抑制効果は5-LOX代謝産物である5-HETEで非常に強く阻害され、その他のLOX代謝産物では阻害されなかった。

これらの結果は、5-LOXを発現する4つの膀胱癌細胞では観察され、発現しない1つの膀胱癌細胞では観察されなかった。

【結論及び考察】

ヒト移行上皮癌の中で、膀胱癌は頻繁に5-LOXを発現する。5-LOXの特異的阻害剤であるAA861は、その他のLOX経路とCOX経路の阻害剤と比較して膀胱癌細胞に対し最も強い発育抑制を示した。その発育抑制効果は5-LOX代謝産物である5-HETEで非常に強く阻害され、その他のLOX代謝産物では阻害されなかった。これらのことは、AA861の発育抑制効果は酵素活性を阻害することで引き起こることを示唆した。

発育信号における5-LOX経路の重要性は、細胞の系によって現れる。

例としては、5-HETEは例えばガストリン放出ペプチドとインスリン様発育因子のようなセカンドメッセンジャーとして肺癌細胞の増殖を刺激する。膵臓癌における5-LOX mRNAの発現は腫瘍特異的で、5-LOX阻害剤あるいはその非感受性オリゴヌクレオチドによる5-LOX mRNAの酵素活性の阻害は、細胞増殖を著しく阻害する。また一方で、乳癌と結腸癌の増殖はmRNAレベルで5-LOXを発現しているにもかかわらず、5-LOX阻害剤では影響を受けない。

これらの研究は、5-LOX経路は、すべてではないがこの研究の中の膀胱癌を含め、かなりのタイプの腫瘍の規則正しい発育に重要であることを示唆している。

我々は、膀胱癌細胞における5-LOXの発育抑制効果は、その酵素発現の状況を条件として現れることを示唆した。

それ故に、5-LOXは膀胱癌の増殖と生存において、規則的な法則を持っているようで、膀胱癌の治療の標的になりうるだろう。

論文審査の要旨

報告番号	医論第 1438 号	氏名	林 豊秀
審査委員	主査	小澤 政之	
	副査	秋山 伸一	宮田 篤郎

Inhibition of 5-lipoxygenase pathway suppresses the growth of bladder cancer cells

(5-Lipoxygenase 経路の遮断は膀胱癌細胞の増殖を抑制する)

International Journal of Urology 2006, 13,1086-1091 掲載

【目的】 アラキドン酸代謝経路には COX 経路、LOX 経路といった二つの重要な経路があり、その代謝産物は癌細胞の増殖に関与している。本研究では、膀胱癌増殖におけるアラキドン酸代謝経路の役割を検討するために、膀胱癌細胞株でのアラキドン酸代謝酵素阻害剤の効果を調べた。

【材料および方法】 LOX 経路、COX 経路中の種々のアラキドン酸代謝酵素阻害剤（インドメタシン、ASA、NS398、ETYA、NDGA、AA861、MK886、CDC）を用いて、ヒト膀胱癌細胞株（BOY、T24、HT1376、SCaBeR、RT4）の増殖抑制効果を検討した。癌細胞を 96 穴プレートで 48 時間培養後、アラキドン酸代謝酵素阻害剤存在下にさらに 4 日間培養し、MTT アッセイにて増殖抑制効果を検討した。癌細胞における酵素発現は、イムノブロット解析で検討した。

【結果】

アラキドン酸代謝酵素阻害剤の中で、5-LOX の特異的阻害剤である AA861 が最も強い膀胱癌細胞株の増殖抑制効果を示した。この AA861 の増殖抑制効果は、BOY、T24、HT1376、SCaBeR のような 5-LOX を発現している細胞では顕著で、RT4 のような 5-LOX を発現していない細胞では低下していた。また、AA861 は濃度依存的に膀胱癌の発育を抑制した。

その増殖抑制効果は 5-LOX 代謝産物である 5-HETE で非常に強く阻害され、その他の LOX 代謝産物では阻害されなかった。5-HETE による増殖抑制効果の阻害は、5-LOX を発現する 4 種の膀胱移行上皮癌細胞では観察され、発現しない 1 種の膀胱扁平癌細胞では観察されなかった。

【結論及び考察】

膀胱移行上皮癌は頻繁に 5-LOX を発現する。5-LOX の特異的阻害剤である AA861 は、その他の LOX 経路と COX 経路の阻害剤と比較して膀胱移行上皮癌細胞に対し最も強い増殖抑制を示した。その増殖抑制効果は 5-LOX 代謝産物である 5-HETE で非常に強く阻害され、その他の LOX 代謝産物では阻害されなかった。これらのことは、AA861 の増殖抑制効果は酵素活性を阻害することで誘導されることを示唆した。このように膀胱移行上皮癌細胞における 5-LOX の増殖抑制効果はその酵素活性阻害により誘導され、5-LOX は膀胱移行上皮癌の増殖と生存において重要な役割を持っていることが示唆され、膀胱移行上皮癌治療の標的分子となる可能性が示された。

以上のように、本論文は、膀胱癌におけるアラキドン酸代謝酵素の薬理的阻害剤の効果を検討し、特に LOX 経路が膀胱癌の増殖や生存に関与していることを明らかにし、新しい膀胱癌の治療法になりうる可能性を示した。従って、本論文は学位論文として十分に価値があるものと判定した。

試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論第 1438 号	氏名	林 豊秀
審査委員	主査	小澤 政之	
	副査	秋山 伸一	宮田 篤郎

主査および副査の3名は、平成18年11月29日、学位請求者 林 豊秀 君に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) AA861 は5-LOX 特異的阻害剤であるか？

(回答) 5-LOX 特異的阻害剤は多くありませんが、AA861 は代表的な5-LOX 特異的阻害剤です。

質問2) AA861 の細胞増殖抑制はアポトーシスであるか？

(回答) AA861 により死滅した細胞を顕微鏡で観察すると細胞が丸く萎縮し、核が凝縮していたため、アポトーシスの結果と考えましたが、生化学的・生物学的には確認しておりません。

質問3) 5-HETE の細胞保護効果は、アポトーシスを抑制するのかわかるか？

(回答) 顕微鏡での観察では、萎縮した細胞数が減っていたため、そのように考えております。

質問4) 5-LOX 蛋白の発現は、BOY に比べ T24 が弱いのに、AA861 の細胞増殖抑制効果が変わらないのは何故か？

(回答) RT4 は5-LOX 蛋白は発現していないのに AA861 で増殖抑制が見られます。アラキドン酸経路には何らかの別ルートがあり、5-LOX 蛋白の発現にかかわらず AA861 で細胞増殖抑制をすることが可能であるのではないかと考えました。そのために、BOY と T24 での AA861 の細胞増殖抑制効果が変わらなかったのではないかと考えました。

質問5) 5-HETE はさらに代謝されないのか？

(回答) 5-HETE は酸化されて5-oxyETE になり、細胞増殖などに関係するという報告があります。

質問6) ロイコトリエンにはレセプターがあるが、5-HETE にはないのか？

(回答) 5-HETE にはレセプターはないようですが、5-HETE の酸化体である5-oxyETE には G protein-coupled receptor(OXE receptor)が存在することが近年報告されています。

質問7) 10%FBS (牛胎児血清) を1%の濃度に変えたのは何故か？

(回答) FBS の濃度を下げることで癌細胞に対する血清の細胞保護作用をできるだけ少なくし、実験に影響を及ぼさなくするためです。

質問8) 他のグループでは、NDGA が最も強い増殖抑制がある結果になっているが何故か？

(回答) そのグループは T24 のみで実験しています。アラキドン酸代謝経路から考えると、上流である NDGA も AA861 と同様に細胞抑制するはずですが、3回の実験すべてで AA861 が最も強い抑制効果があるという結果でありました。前立腺癌でも同様な結果でありました。

質問9) 5-HETE と EGF との関係は？

(回答) ロイコトリエン C4 は、膀胱癌細胞において EGF が引き起こす形態的、機能的変化に反応している可能性があります。5-HETE については、まだわかっておりません。

質問 1 0) FLAP 抗体については、実験したのか？

(回答) FLAP は 5-LOX 活性化蛋白であり、その特異的阻害剤は MK886 であります。実験では、AA861 に次いで、細胞増殖抑制が強かったが、MK886 については調べておりません。

質問 1 1) NDGA, AA861 は、どのような形態、構造なのか？膜の透過性の問題で高濃度でないと細胞抑制効果が出ない可能性はないのか？

(回答) NDGA は酸ですが、AA861 についてはわかりません。酸である NDGA については、膜の透過性の問題で高濃度でないと細胞抑制効果が出ない可能性も考えられると思います。

質問 1 2) 移行上皮癌、扁平上皮癌では、5-LOX の発現はどうなっているのか？

(回答) 膀胱癌では、移行上皮癌のみ発現していると思われます。

質問 1 3) 何故、実験では移行上皮癌細胞を使用したのか？

(回答) 膀胱上皮は移行上皮であり、膀胱癌は移行上皮癌がほとんどであります。扁平上皮癌は移行上皮癌の化生であるため、実験には一般的な移行上皮癌を使用しました。

質問 1 4) なぜ移行上皮と呼ぶのか？

(回答) 膀胱の上皮は 6 層構造であります。

表層の細胞核の大きさは $60-150 \mu\text{m}$ で一般的に細胞中の核は 2 核、3 核です。中-深層の細胞核の大きさは $10-60 \mu\text{m}$ で細胞中の核は 1 核です。一つの上皮の中で、表層と中-深層での細胞核の大きさや数の違いがあることから移行上皮と呼ばれているようです。蓄尿期には上皮が引っ張られ伸展し、排尿期には収縮します。移行上皮の特徴はよく伸びることです。

以上の結果から、3 名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。