

## 学位論文題名

Significance of COX-2 Expression  
in Human Renal Cell Carcinoma Cell Lines

(ヒト腎臓細胞癌株細胞における COX-2 発現の意義)

## 学位論文内容の要旨

シクロオキシゲナーゼ(COX)は、アラキドン酸からプロスタグランジンが合成される過程を制御する酵素で、炎症反応に関与することが知られている。COXには2つのIsoformが知られており、そのうちCOX-1は、多くの組織で発現しており消化管組織の粘膜保護作用や腎血流を維持するといった生体の恒常性に強く関わる酵素とされている。一方、COX-2は、正常組織ではほとんど発現していないにも関わらず、細胞の増殖、成長因子、サイトカイン、発癌物質の投与など種々のストレスにより誘導される酵素である。さらにCOX-2は、疼痛や発熱に際し、過剰のプロスタグランジン合成を引き起こすとされる。さらに、Cox-2は、近年の研究から、癌腫の発生・増殖・進展・転移において重要な役割を果たしていることも明らかになってきた。しかし、COX-2の発現と腎臓細胞癌(RCC)との関係については明らかではない。本研究ではヒト腎臓細胞癌株におけるCOX-2の発現を解析するとともに、ヒト腎臓細胞癌の増殖・アポトーシス・造腫瘍性・血管新生における役割を検討した。

本研究では、細胞株としてヒト腎臓細胞癌株(OS-RC-2, SMKT-R4, ACHN)、正常尿細管上皮細胞(RPTEC)、またCOX-2発現コントロール細胞株として、ヒト膀胱癌細胞株(BxPC-III)を用いた。

## [方法と結果]

1. ヒト腎臓細胞癌細胞株におけるCOX-2の発現：COX-2の発現はRT-PCRとWestern blotにより検討した。その結果、RT-PCRからCOX-2 mRNAはOS-RC-2で強く増幅していたが、他の腎臓細胞癌細胞株(SMKT-R4, ACHN)および正常尿細管上皮細胞RPTECでは、増幅を認めなかった。一方Western blot解析においても、COX-2蛋白質の発現増強はmRNAと同様、OS-RC-2のみで認めた。
2. ヒト腎臓細胞癌細胞株の増殖に対するCOX-2阻害剤の効果：COX-2の選択的阻害剤NS398を用い、ヒト腎臓細胞癌細胞株の増殖へのNS398の効果をMTT assayを用い解析した。細胞増殖曲線よりNS398は全ての腎臓細胞癌細胞株で濃度依存性に増殖抑制を引き起こしたが、COX-2発現の有無とは関係がみられなかった。一方、正常尿細管上皮細胞では、腎臓細胞癌細胞株より低濃度で増殖が抑制された。腎臓細胞癌細胞株におけるCOX-2阻害剤による細胞増殖抑制に関わる因子を検討するため、NS398投与によりリン酸化が抑制されるAktの発現を検討した。しかし、Akt, リン酸化Aktの発現には細胞間で差を認めなかった。
3. In vitroでの腎臓細胞癌細胞株の増殖におけるCOX-2発現の影響：腎臓細胞癌細胞株に対するCOX-2発現の細胞増殖に対する直接的な効果を検討するため、COX-2センス遺伝子とアンチセンス遺伝子を作成し、これらを組み込んだプラスミドベクターを用い、

腎細胞癌細胞株(OS-RC-2, SMKT-R4)に遺伝子導入した。その結果、COX-2アンチセンスの遺伝子導入によりin vitroの細胞増殖は、COX-2発現細胞株OS-RC-2で有意に抑制されたが、非発現株SMKT-R4ではほとんど抑制されなかった。一方、COX-2センスの遺伝子導入により、SMKT-R4では有意に増殖が促進されたのに対し、OS-RC-2における効果はわずかであった。これらの点から、腎細胞癌細胞株の増殖にCOX-2の発現が強く関わっていることが示された。

4. COX-2発現細胞腎細胞癌株におけるCOX-2センス、アンチセンスを定常的に発現するトランスフェクタントの作成:COX-2発現細胞腎細胞癌株におけるCOX-2の役割を明確にするために、COX-2センス、アンチセンスを定常的に発現するトランスフェクタントを作成した。作成したCOX-2センス・トランスフェクタント、COX-2アンチセンス・トランスフェクタントにおいて、COX-2センス、アンチセンスの発現はReal-time PCRとWestern blotを用いて確認した。さらにCOX-2の酵素活性を確認するために、PGE2の産生をこれらトランスフェクタントにおいて解析した。その結果、COX-2の発現とPGE2の産生は相関しており、これらトランスフェクタントではCOX-2センス、アンチセンスが、機能的にも安定していることが確認され以下の実験に用いることとした。
5. OS-RC-2細胞およびCOX-2センス・トランスフェクタント、COX-2アンチセンス・トランスフェクタントにおけるアポトーシスの検討:アンチセンストランスフェクタントでは、親細胞株とセンストランスフェクタントと比べ、酪酸塩によるアポトーシスの増加が認められた。この点からCOX-2アンチセンスによりアポトーシスが誘導されること、逆にいえばCOX-2はOS-RC-2のアポトーシス回避に関与していると考えられた。
6. OS-RC-2細胞およびCOX-2センス・トランスフェクタント、COX-2アンチセンス・トランスフェクタントにおけるヌードマウスでの造腫瘍性・血管新生・生存期間の解析:これら細胞をヌードマウス皮下に移植し、腫瘍のIn vivoにおける増殖動態を解析した。その結果、OS-RC-2アンチセンス・トランスフェクタントの増殖は、親株・COX-2センス・トランスフェクタントに比べ有意に抑制された。また、生存期間自体もアンチセンス・トランスフェクタントを移植されたヌードマウスは、他の細胞を移植されたものと同程度有意に長かった。ヌードマウスでの腫瘍形成には、細胞自体の増殖以外に血管新生も関与している可能性があるため、これらヌードマウス移植腫瘍を摘出し、microvessel densityを測定することで血管新生を解析した。その結果、アンチセンス・トランスフェクタントは、有意に血管新生が抑制されていた。

[まとめ]本研究から、いくつかの腎細胞癌ではCOX-2の発現が亢進していること、そしてCOX-2発現腎細胞癌細胞株では、COX-2の発現亢進がこれら細胞の増殖・アポトーシス回避機構・血管新生に大きく関わっていることが明らかにされた。しかし、COX-2選択的阻害剤では、これらを抑制するには不十分であり、COX-2アンチセンスの遺伝子導入によりCOX-2の発現自体を抑制することが必要であることが示された。これらの点からCOX-2の発現は腎細胞癌の癌腫形成において重要な役割を果たしていると考えられた。

今後、このCOX-2アンチセンス遺伝子を用いることで、COX-2発現亢進を有する腎細胞癌に対する新しい治療法が開発されることが期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 紘 之

副 査 教 授 守 内 哲 也

副 査 教 授 野々村 克 也

学 位 論 文 題 名

## Significance of COX-2 Expression in Human Renal Cell Carcinoma Cell Lines

(ヒト腎臓細胞癌株細胞における COX-2 発現の意義)

COX-2 は種々の癌において発現亢進を認め、癌化過程において重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。しかし、腎細胞癌における COX-2 の発現亢進の有無や癌化過程における意義はまだ明らかではない。本研究ではヒト腎細胞癌細胞株における COX-2 発現を解析、ヒト腎細胞癌の増殖・アポトーシス・造腫瘍性・血管新生における役割について検討を加えている。3 種類のヒト腎癌細胞株を用い、mRNA, 蛋白質レベルから COX-2 の発現を検討、COX-2 発現腎癌細胞株に COX-2 のセンス遺伝子、アンチセンス遺伝子を導入した細胞を用い、アポトーシス誘導の有無、ヌードマウスでの造腫瘍性、形成腫瘍における血管新生につき検討している。これらの検討から腎細胞癌の一部では COX-2 の発現が亢進していること、COX-2 の発現亢進がこれら細胞の増殖・アポトーシス回避機構・血管新生に大きく関わっており、COX-2 は腎癌治療における重要な分子標的となる可能性が示された。質疑応答では、副査の守内哲也教授からこれまで腎癌細胞株で COX-2 に関する研究が行われなかった理由、COX-2 阻害剤を用いた薬剤感受性研究が行われなかった理由、COX-2 アンチセンスを用いた遺伝子治療の臨床応用の可能性について質問がなされた。これらの質問に対し、申請者は過去の研究において腎の正常組織において COX-2 の発現亢進があると報告されていたので、COX-2 の発現と腎癌の癌化の関係には注目が集まっていなかった事を指摘し、本研究が腎癌細胞株での初めての論文になった理由を説明した。また、臨床的に使用されている COX-2 阻害剤として、セレコキシブやメロキシカムを用いた薬剤感受性試験も行ったが、NS398 と同様、それらの感受性と COX-2 発現との関連性はなかったという実験結果を述べ、本論文では代表的薬剤として NS398 のデータを示したと解答した。アンチセンスを用いた遺伝子治療の臨床応用の可能性については、臨床応用までにはかなり長い期間を要するが、将来にわたる研究が必要であると解答した。ついで、主査の加藤紘之教授より COX-2 発現腎癌細胞株と非発現細胞株における遺伝子発現の差について質問がなされた。これに対し、申請者は現在までの研究でこれら細胞株間で特

徴的な遺伝子異常の報告はみられていないが、今後検討が必要であると解答した。さらに COX-2 の発現亢進と予後の相関についての質問がなされた。これに対し、申請者は本論文では検討していないが、COX-2 の発現が腎癌の Grade, Stage、転移の有無と相関していたとの報告もあり、今後多くの臨床検体を用いた検討が必要であるが、COX-2 の発現亢進は腎癌の予後因子になる可能性があるかと解答した。これに付随して、その研究アプローチに関する質問がなされたが、申請者は COX-2 抗体を用いた免疫組織学的検討の有用性を述べ、今後この方法により研究を進めていく予定であると解答した。最後に副査の野々村克也教授から、COX-2 発現と腎癌の臨床像との関係に関する質問がなされた。これに対し申請者は、予後不良の Rapid growing type の腎癌では、熱発を伴うように炎症性サイトカインの分泌が増加しており、炎症反応に関わる COX-2 の発現がこれに関わっている可能性を指摘、実際本論文で用いた COX-2 発現腎癌細胞株では、増殖が早かったと解答した。さら良性腎病変での COX-2 の発現亢進、および腎癌との相違点に関する質問がなされた。これに対し、申請者は、COX-2 には、生理的な機能があり、逆流性腎症のような良性の腎病変では COX-2 の発現亢進により腎血流が保持され、正常腎細胞が保護されていると解答した。一方、腎癌では血管新生促進やアポトーシス回避といった機能が腎癌の悪性化につながっているのではないかと解答した。最後、主査の加藤教授から、きちんと順序良く実験を積み重ねた非常に優れた論文であり、今後臨床的にも非常に役に立つばかりでなく将来性も大きな研究であると評価された。また外国からの留学生として言葉の苦勞があったにもかかわらず、よくまとまった学位論文発表であったとのコメントをもって終了となった。

この論文は、腎細胞癌における COX-2 発現の意義を明らかにしたものとして高く評価され、今後 COX-2 を分子標的とした新規治療方法が樹立されることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。