

**Celecoxib enhances the radiosensitivity of
hypoxic glioblastoma cells
through endoplasmic reticulum stress**

(セレコキシブは、小胞体ストレスを負荷して低酸素下の膠芽腫細胞の放射線感受性を上げる)

2013

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

鈴木 健之

目 次

第1章	本研究の背景と目的	
1.1	背景	6
1.1.1	多形神経膠芽腫とは	6
1.1.2	多形性膠芽腫の治療の可能性とセレコキシブ	8
1.1.3	先行研究から推定されるセレコキシブの作用	9
1.1.4	低酸素下培養のがん細胞に対する治療の可能性	11
1.2	本研究の目的	13
第2章	セレコキシブの放射線感受性増強効果	14
2.1	背景と目的	14
2.2	材料と方法	15
2.2.1	細胞の提供元と細胞の特徴	15
2.2.2	細胞の培養と培養状態	15
2.2.3	細胞の照射	17

2.2.4 化学薬品と細胞毒性試験	17
2.2.5 コロニーサバイバル分析	18
2.2.6 細胞増殖分析	19
2.2.7 統計解析	19
2.3 結果	20
2.3.1 細胞の特徴	20
2.3.2 セレコキシブによって誘導される細胞毒性	21
2.3.3 コロニーサバイバル分析	22
2.3.4 細胞増殖分析	24
2.4 考察	26
2.4.1 膠芽腫細胞の感受性と低酸素環境	26
2.5 小括・結論	26
第3章 セレコキシブの放射線感受性増強効果の解析	27
3.1 背景と目的	27
3.1.1 背景	27
3.1.2 目的	27

3.2 方法	28
3.2.1 細胞周期分析	28
3.2.2 アポトーシス分析	28
3.2.3 オートファジー分析	30
3.2.4 ウェスタンブロッティング法	32
3.2.5 統計解析	32
3.3 結果	33
3.3.1 COX-2 阻害作用の確認	33
3.3.2 小胞体ストレス応答の確認	34
3.3.3 細胞周期分析	36
3.3.4 アポトーシスの検出	38
3.3.5 オートファジーの検出	41
3.4 考察	45
3.4.1 セレコキシブの本来の薬理作用	45
3.4.2 小胞体ストレスとセレコキシブ	45
3.4.3 小胞体ストレスと細胞死	47

3.4.4 セレキシブの放射線増感作用	47
3.4.5 セレキシブ研究の将来の展望	49
3.5 小括・結論	50
第4章 総括	51
参考文献	52
謝辞	58

第1章 本研究の背景と目的

1.1 背景

1.1.1 多形神経膠芽腫とは

多形神経膠芽腫（以下、膠芽腫）は、中枢神経系において最も多く発生する悪性腫瘍である[1]。現在標準治療として、最大限の外科的切除、60 Gyのエックス線療法、抗癌剤テモゾロマイド（TMZ）化学療法の併用が行われているが、膠芽腫患者の治療開始からの生存期間中央値はおよそ1年と短期である[2]（参考図1）。今までに明らかにされている膠芽腫の発生と進行に関する分子機序は以下の2つのカテゴリーに分類することができる。1つは上皮増殖因子受容体（EGFR）の増幅と phosphatase and tensin homolog（PTEN）の突然変異により生じる原発性膠芽腫であり、もう1つは星細胞腫が p53 と網膜芽細胞腫（Rb）遺伝子の突然変異を起こし、悪性化した続発性膠芽腫である（参考図2）。これらの遺伝子の変異は膠芽腫の治療抵抗性や予後と深く関係していることが知られている[1]。遺伝子変異の多くは癌の悪性化に繋がるが、逆に予後が向上する変異がある事が最近までに明らかになってきた。例えば O6-methylguanine-DNA methyltransferase（MGMT）のメチル化が起きていると TMZ のようなアルキル化剤の感受性が上がり、予後は向上する[3]。また、isocitrate dehydrogenase 1（IDH1）の突然変異も予後の向上と相関する事も明らかになってきた[4]。MGMT や IDH1 等の所見に基づくと、このような特異的分子をターゲットとする治療を開発する事は、膠芽腫患者の治療予後改善を目指す上では理論的かつ有望なアプローチであると考えられる。

多形神経膠芽腫とは

(表) 脳腫瘍全国統計による各種脳腫瘍の5年生存率(1991～1996年登録症例)

グリオーマ	症例数	1年	2年	3年	4年	5年
星細胞腫	1,573	89.6	79.7	73.8	70.9	66.5
退形成性星細胞腫	1,066	67.6	43.0	32.2	26.4	23.4
膠芽腫	2,125	55.2	19.6	11.4	8.8	7.0
乏突起膠腫	152	95.3	91.8	87.1	83.8	82.0
退形成性乏突起膠腫	43	87.5	84.7	75.0	71.7	68.2
髄膜腫	6,367	97.9	96.6	95.7	94.8	93.7
全グリオーマ	5,757	73.3	51.9	44.4	40.9	38.1

The committee of Brain Tumor registry of Japan (2003). Neurol med-chirur (suppl)

標準的治療

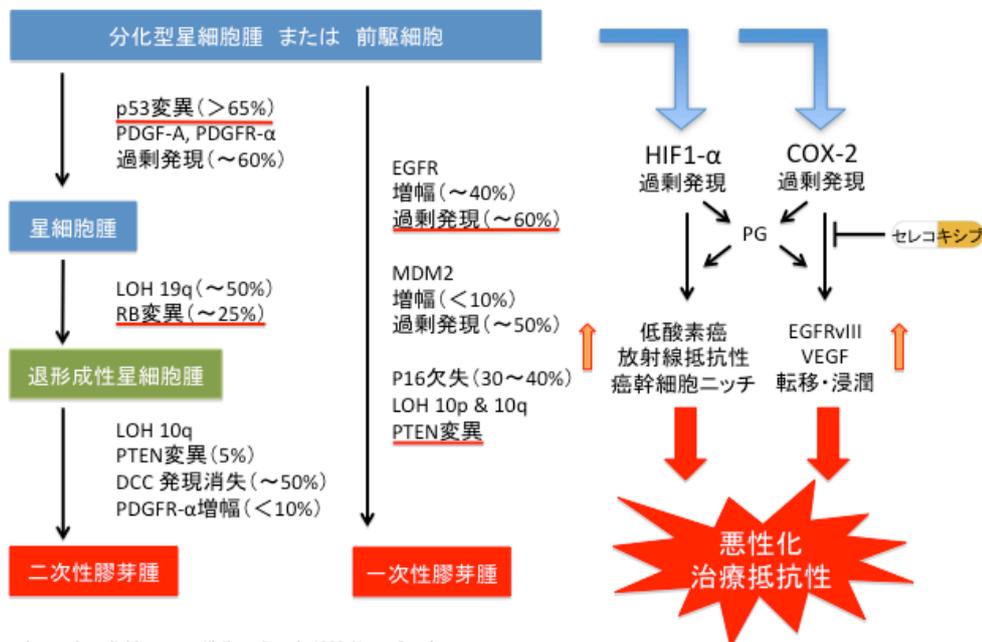
現在、標準治療として、最大限の外科的切除、60 Gyのエックス線療法、テモゾロマイド(TMZ)化学療法の併用が行われている。

Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*.
N Engl J Med, 2005. 352(10): p. 987-96.

(参考図1) 多形神経膠芽腫とは

標準治療として、外科的切除、エックス線療法、テモゾロマイドなどの化学療法との併用が行われているが、膠芽腫患者の治療開始からの生存期間中央値はおよそ1年である。

多形神経膠芽腫とは



(参考図 2) 多形神経膠芽腫とは

膠芽腫の発生と進行に関する分子機序は上に示すような 2 つのカテゴリーに分けられる。COX-2 や HIF-1 α は膠芽腫で高発現しており、予後不良に関係していると考えられる。セレコキシブの COX-2 阻害作用が癌の抑制作用に繋がると考えられている。

1.1.2 多形性膠芽腫の治療可能性とセレコキシブ

ヒトの悪性脳腫瘍で発現が増加することが報告されている cyclooxygenase-2 (COX-2) もまた、膠芽腫患者の治療予後改善を目指す上では有望なターゲット分子の 1 つであると考えられる [5, 6]。COX-2 の高発現は膠芽腫腫瘍内において EGFR/EGFRvIII の発現上昇に繋がりに [7]、下流の signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) を活性化する事で抗アポトーシスに働いていると考えられた。また、アラキドン酸カスケードにおいて COX-2 はプロ

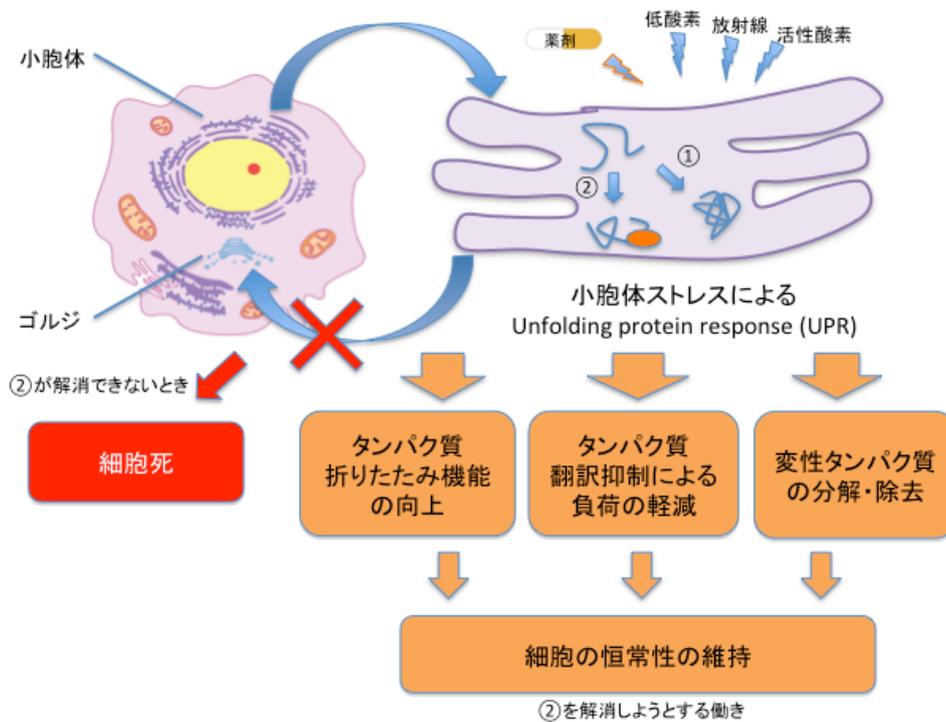
スタグランジン合成のための酵素として働き、発癌に関わるサイトカイン、腫瘍成長因子など、様々な因子を調整することが報告されている[8-10]。

セレコキシブ (Celecoxib) は非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) のうちの 1 つであり、選択的に COX-2 を阻害することが出来る薬剤である[11]。現在、関節リウマチ患者の骨関節炎と疼痛緩和を目的として使用されているが、家族性腺腫性ポリポージスに対する化学療法の補助剤としても使用されている[12]。また、セレコキシブと放射線との併用処理は、正常細胞よりも腫瘍細胞で高い増感効果を示すという報告もある[13]。これらの背景から、セレコキシブは膠芽腫の放射線治療においても放射線増感剤となり得ると考えられた。

1.1.3 先行研究から推定されるセレコキシブの作用

我々も、以前の研究でセレコキシブと抗癌剤 CPT-11 の併用投与で神経芽細胞腫異種移植の増殖を抑制することを確認している[14]。しかしながら、用いた神経芽細胞腫細胞株の COX-2 は低発現で、セレコキシブによる COX-2 阻害作用が、腫瘍の増殖を抑制したという明白な証拠はなかった[14]。そのため、COX-2 阻害作用とは別の薬理作用がセレコキシブにはあるのではないかと推察した。Kardosh らは、セレコキシブは、その抗炎症および鎮痛効果の他に、小胞体 (ER) からサイトゾルにカルシウムの漏出を経て小胞体ストレス (参考図 3) を引き起こすことを報告した[15, 16]。さらに彼らは、セレコキシブが小胞体ストレスを負荷することで膠芽腫細胞の増殖を抑制することも報告した[15]。これらの報告は、セレコキシブが COX-2 抑制だけでなく、小胞体ストレス誘導機能も有することを示唆している。Kesar i ら[17]は膠芽腫患者に対するテモゾロマイド、セレコキシブ、放射線による併用療法の第 2 相試験の結果を報告しており、安全な治療であることを確認している。だがその併用における臨床的効果は明らかになっておらず、今後の詳細な検討が期待される。

小胞体ストレスとは



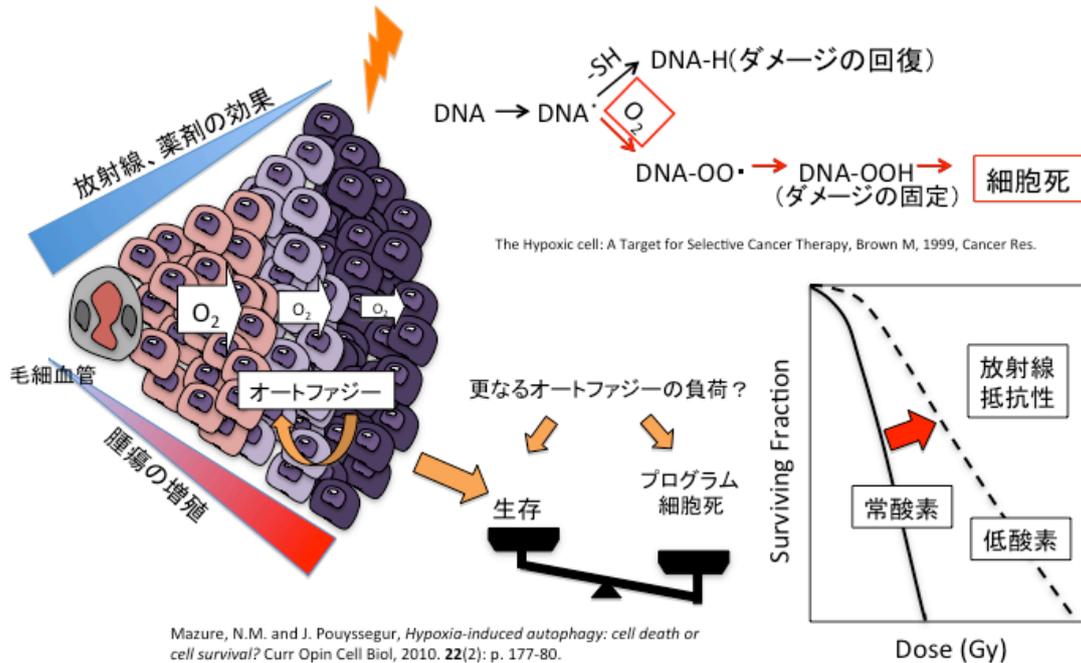
(参考図 3) 小胞体ストレスとは

タンパク質は正しく折り畳まれる事でその機能を果たすが、小胞体はそのタンパクの折りたたみを担う。①タンパク質が正しく折り畳まれた場合、ゴルジに輸送され、さらに修飾を受ける。しかし、②正しく折り畳まれないタンパクはシャペロンと結合し、小胞体内に一時的に留まる。この反応を UPR という。このような反応は薬剤の接触や低酸素によっても引き起こされる。小胞体は UPR を解消しようとして働くが、どうしても解消出来ない場合、細胞は自らの死をもって解消しようとする。

1.1.4 低酸素下培養のがん細胞に対する治療の可能性

膠芽腫の放射線治療における治療抵抗性の原因の1つは、腫瘍組織中の低酸素領域の存在である。低酸素状態では放射線の効果は低くなり、再発の主要な要因の一つであることが知られている[18]（参考図4）。一方、低酸素状態そのものが、小胞体反応におけるシグナル伝達経路である、Unfolding Protein Response（UPR）を誘発する小胞体ストレスでもあることが知られている[19]。そして、小胞体ストレスを過剰に負荷することで、腫瘍の細胞死を誘導することが可能である[20]。従って、腫瘍組織の低酸素領域に対し、セレコシブで小胞体ストレスを過剰に負荷することで腫瘍細胞の細胞死を誘導し、放射線療法の効果改善できる可能性がある（参考図5）。我々はセレコシブとガンマ線という2つの小胞体ストレス負荷トリガーの組合せにより、低酸素状態であっても膠芽腫の細胞死を促進できるかどうかを検討することにした。

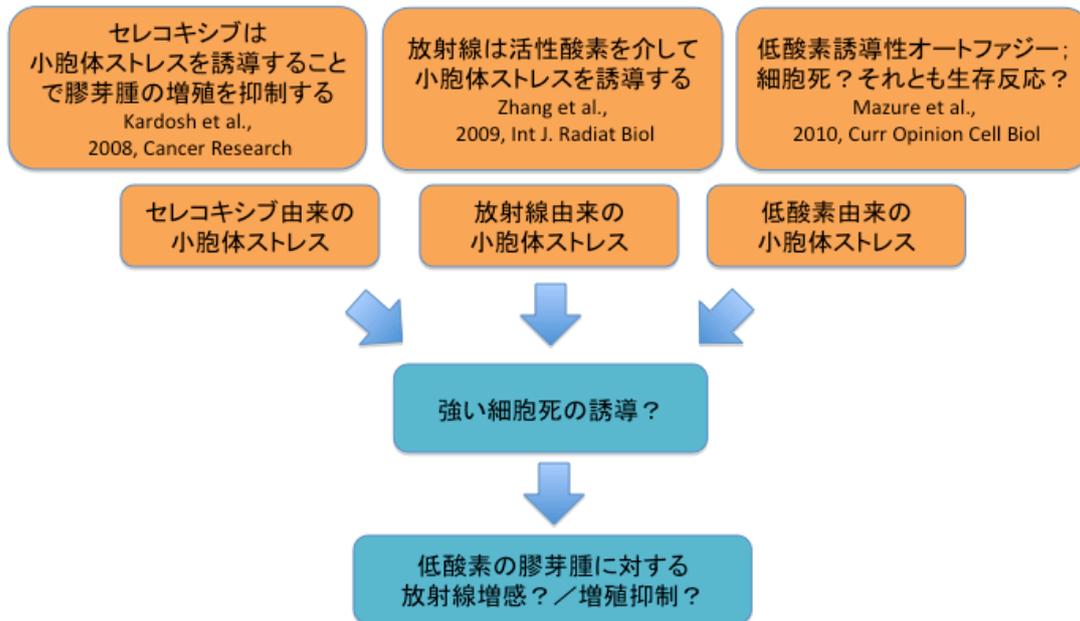
低酸素癌細胞の放射線治療抵抗性



(参考図 4) 低酸素細胞の放射線治療抵抗性

腫瘍の増殖が進むほど、酸素を供給する血管から腫瘍の外縁が離れ、低酸素状態となる。放射線治療において酸素の存在は非常に重要で、酸素はそのラジカル反応により放射線によるダメージを固定する働きがあるといわれている。酸素の有無で生存率を比べると、低酸素では明らかな放射線抵抗性を示すことがわかる。つまり腫瘍再発の要因となりうることが示唆される。癌が低酸素という過酷な環境にも関わらず増殖を続けることができるのは、1つの可能性として、オートファジーの亢進による適度な腫瘍環境改善が随時起きているからである。しかし、過剰なオートファジーは細胞死を引き起こす要因ともなりうる。腫瘍内のこの生存反応を利用して、逆に細胞死を誘導することができるかもしれない。

本研究の予測



(参考図5) 本研究の予測

我々の予測は、ここに示す3つの論文を土台にして成り立っている。セレコキシブだけでなく、放射線も、そして低酸素環境そのものも小胞体ストレスを誘導する作用があるということが分かってきた。つまり、これらが、上手く組み合わせられれば有効に腫瘍細胞に対して細胞死を誘導できる可能性がある。

1.2 本研究の目的

本研究では、常酸素状態、低酸素状態の膠芽腫細胞の放射線感受性に関与するセレコキシブの効果を明らかにする事を目的とした。特に、セレコキシブの小胞体ストレス誘導作用に注目して、低酸素状態の膠芽腫細胞に対する増殖抑制効果と細胞死誘導作用を明らかにすることを目的とした。

第2章 セレコキシブの放射線増感効果

2.1 背景と目的

先行研究において、我々は選択的 COX-2 阻害薬セレコキシブを抗がん剤 CPT-11 と併用し、神経芽腫移植腫瘍に対して有意な腫瘍増殖抑制作用を確認した[14]。本章では、セレコキシブの膠芽腫に対する放射線増感作用を確認することを目的として、以下の *in vitro* における実験を行った。

低酸素状態では放射線の細胞傷害作用は低下する[18]。そこで、低酸素の膠芽腫細胞に対するセレコキシブの放射線増感作用と増殖抑制作用を明らかにする事を目的として以下の実験を行った。

2.2 材料と方法

2.2.1 細胞の提供元と細胞の特徴

ヒト膠芽腫細胞株 U87MG[21]、U251MG[22] ならびにマウス膠芽腫細胞株 GL261[23]は RIKEN Cell Bank (茨城県つくば市) から入手した。

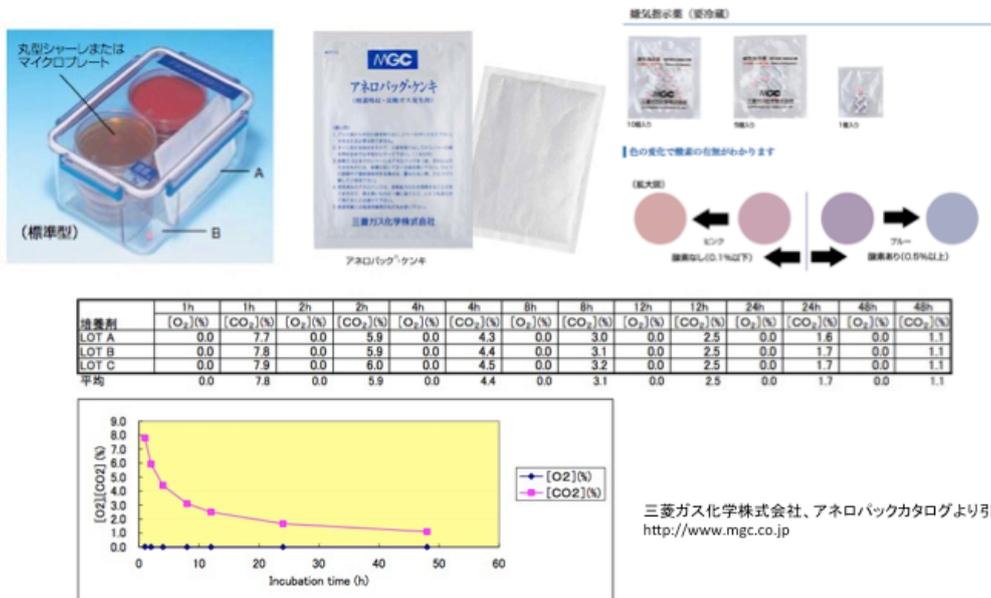
U87MG は野生型 p53[24]、U251MG と GL261 は変異型 p53 を示すことが知られている[24-26]。また、これらの細胞株における COX-2 発現強度は、ウェスタンブロットティングによって解析した (方法の詳細は第 3 章にまとめて示す)。COX-2 の発現は、各細胞の p53 の発現と並べて図 1 に示す。

2.2.2 細胞の培養と培養状態

すべての腫瘍細胞は、100 mg/ml のストレプトマイシン、100 U/ml のペニシリン (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) と 10 % のウシ胎児血清 (FBS; Sigma-Aldrich) を添加した培地 (MEM; Sigma-Aldrich) で培養した。細胞を回収する操作においては、Ca²⁺と Mg を含まないリン酸緩衝食塩水 (PBS (-); Sigma-Aldrich) で洗浄した後、0.5 mM のエチレンジアミン四酢酸塩 (EDTA; Sigma-Aldrich) を含む 0.25 % のトリプシン溶液で剥がし、細胞懸濁液とした。

インキュベーター内の空気の組成である、5 % CO₂、20 % O₂、37 °C の状態を常酸素下での培養条件と定義した。また低酸素状態は、アネロパック (Mitsubishi Gas Chemical Company, Tokyo, Japan) をチャンバーの中に置き、37°C で維持することで作製した (参考図 6)。低酸素状態での培養は、特に通常の処理以外の外因的ストレス (例えば、栄養欠乏状態やコンフルエント状態) が起きない様に慎重に行った。酸素状態に関わらず、セレコキシブ処理とガンマ線照射の前後で一回ずつ培地を交換した。すべての実験は、細胞がコンフルエント状態の 70-80 % になる前に終了した。

低酸素環境の構築



(参考図 6) 低酸素環境の構築

左上のようなチャンバーにアネロパックと一緒に培養することで低酸素環境を作り出した。0.1%以下の低酸素の維持は右上の指示薬で確認した。

<http://www.mgc.co.jp/seihin/a/anaeropack/pdf/pamphlet.pdf>

2.2.3 細胞の照射

すべての培養細胞の照射は、 ^{137}Cs の減衰曲線から算出した 0.78 Gy/min の線量率で、 ^{137}Cs γ -線 (gamma cell 40; Atomic Energy of Canada, Ontario, Canada) で行った。細胞は、室温 (約 25°C) で常酸素または低酸素下で照射した。選択した線量値は、以下の通りである;コロニー生存分析には 2、4、6、8 Gy を、細胞増殖分析、細胞周期分析、アポトーシス検出、オートファジー検出とウェスタンブロッティング解析については 6 Gy を選択した。

2.2.4 化学薬品と細胞毒性試験

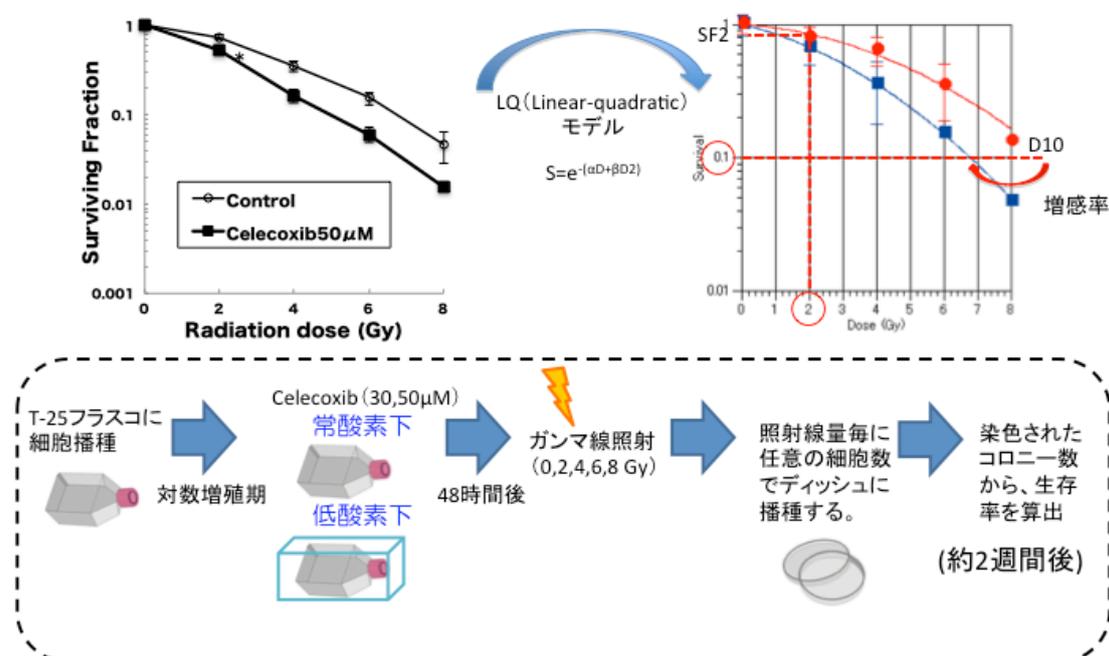
セレコキシブ, 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide はファイザー社 (Groton, CT, USA) より提供を受けた。10 mM の濃度で DMSO に溶解して凍結保存し、各実験の前に適当な濃度に希釈して用いた。

セレコキシブの毒性は、Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Dojindo Laboratories, Kamimasikigun, Kumamoto, Japan) の製品添付のマニュアルに沿って評価した。<http://www.dojindo.com/store/p/456-Cell-Counting-Kit-8.aspx>. すべての細胞株を常酸素または低酸素の下で 48 時間、10~70 μM 濃度のセレコキシブで処理した。その後、細胞生存率を解析するためにこの CCK-8 キットの反応後生成物であるホルマザンの形成率を分光高度計で測定した。ホルマザンの生成量は、生細胞数と正比例する。溶媒として用いた DMSO の影響はコントロールのサンプルとして、セレコキシブと同濃度の DMSO を加えることで検討した。実験は 3 回繰り返して、結果を平均値 \pm SD として示した。さらに、その結果を、コントロール細胞の値を“1”として標準化した。

2.2.5 コロニー生存分析

0~8 Gy の γ 線照射後、直ちにトリプシン処理を行い、細胞を回収した。線量毎に適当な細胞数で 60 mm の培養ディッシュ (Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) に播種した。播種から約 14 日のインキュベーション後にディッシュをメチレンブルーで染色し、50 以上の細胞数を含んでいるコロニーを生存群と見なして記録した[27]。解析の指標として、10 %生存に相当する線量 (D10) や、2 Gy での生存率である (SF2) を用いた(参考図 7)。いずれも、DeltaGraph5.4 版ソフトウェア (RedRock Software 社、ソルトレーク、UT、USA) を用いて線形二次式 (LQ) モデルに適合させた上で算出した。実験は独立して 3 回繰り返し、結果は平均値 \pm SD として示した。

コロニー生存分析法と増感率の評価



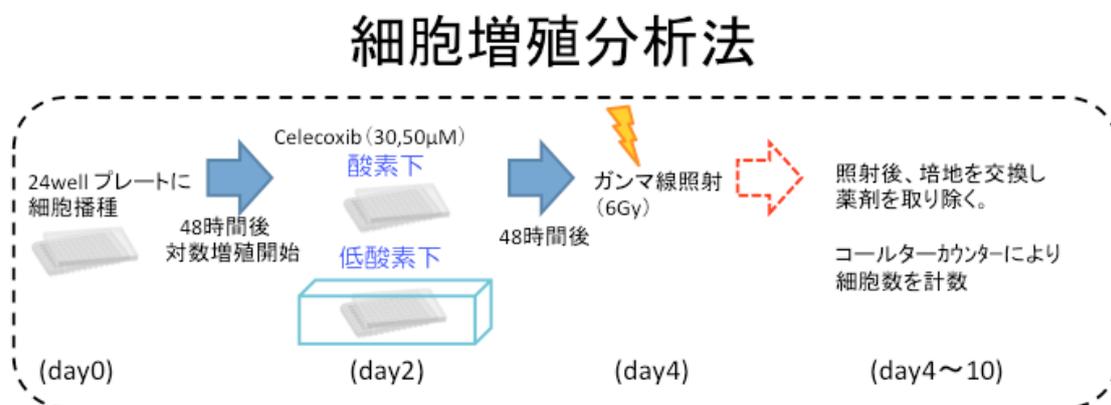
(参考図 7) コロニー生存分析法と増感率の評価

2.2.7 細胞増殖分析

腫瘍細胞の増殖能に対するセレコキシブ処理、ならびにガンマ線照射の作用を評価した。毒性試験とコロニー生存分析法（参考図 8）によって決定されたセレコキシブの濃度とガンマ線の線量を用いて実験を行った。

24 穴プレートに 1.0×10^4 個の細胞を播種した時点を Day 0 として、48 時間後（Day2）の対数増殖期に入ったとき、培地にセレコキシブ（U87MG と U251MG は $50 \mu\text{M}$ で、GL261 は $30 \mu\text{M}$ で）を添加した。そこから 48 時間のセレコキシブ処理後、6 Gy の γ 線照射を行った。照射後すぐに培地を交換し、セレコキシブを取り除いた。

細胞数は、照射後 10 日間、2 日毎にコールター・カウンター（Beckman Coulter, Tsukuba, Ibaraki, Japan）で測定した。



(参考図 8) 細胞増殖分析法

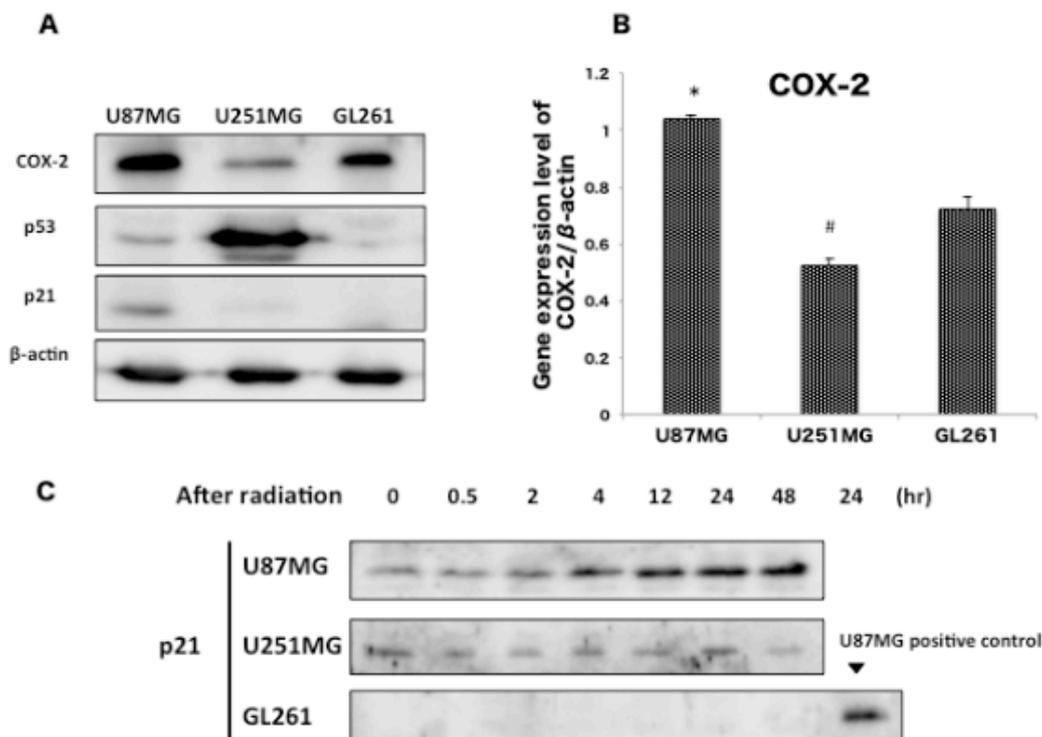
2.2.8 統計解析

複数の実験から算出した標準偏差（SD）を示すエラー・バーと平均値によって実験値を示した。データ間の有意差は、スチューデントの t 検定によって評価した。P 値が 0.05 未満のときに差は有意であるとみなした。

2.3 結果

2.3.1 細胞の特徴

COX-2 の発現を含む細胞の特徴を図 1 に示す。潜在的な COX-2 の発現量は、これら 3 細胞株の比較では、U87MG で最も高く、U251MG で最も低かった。

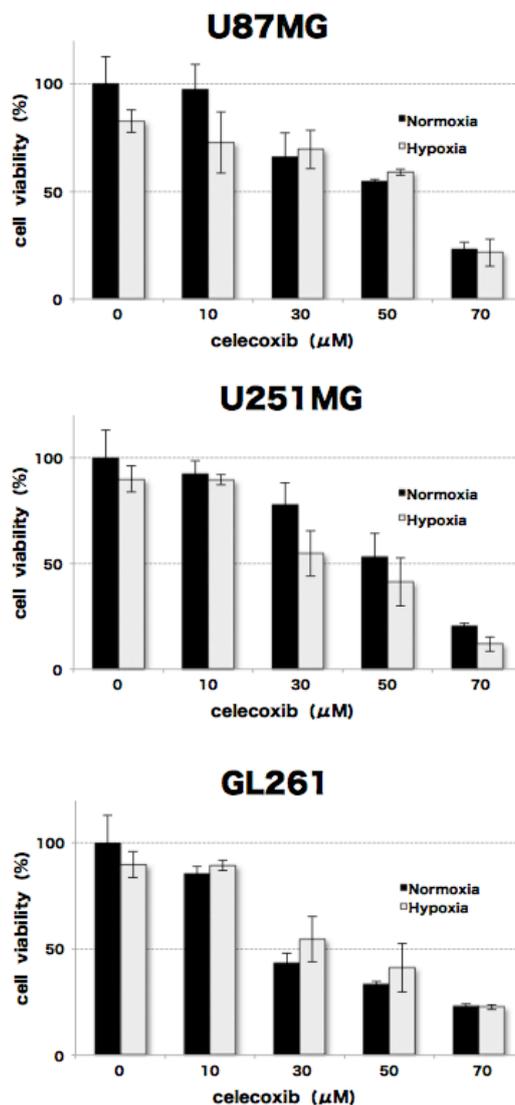


(図 1) 細胞の特徴。

(A) COX-2、p53 と p21 の発現。 β -アクチンは当量のタンパク質積載を証明する。(B) COX-2 の発現レベル。 β -アクチンで標準化された COX-2 の発現レベルを示す。平均 \pm SD として示す。*、#は他の 2 細胞との比較、 $p < 0.05$ を示す。(C) 6Gy の γ 線照射後の p21^{Waf1} の発現の変化。GL261 は p21 の発現が確認出来なかったため、陽性コントロールとして照射後 24 時間の U87 細胞を用いた。

2.3.2 セレコキシブによって誘導される細胞毒性

Cell Counting Kit-8 で測定した常酸素下、ならびに低酸素下のセレコキシブの細胞毒性の結果を図2に示す。



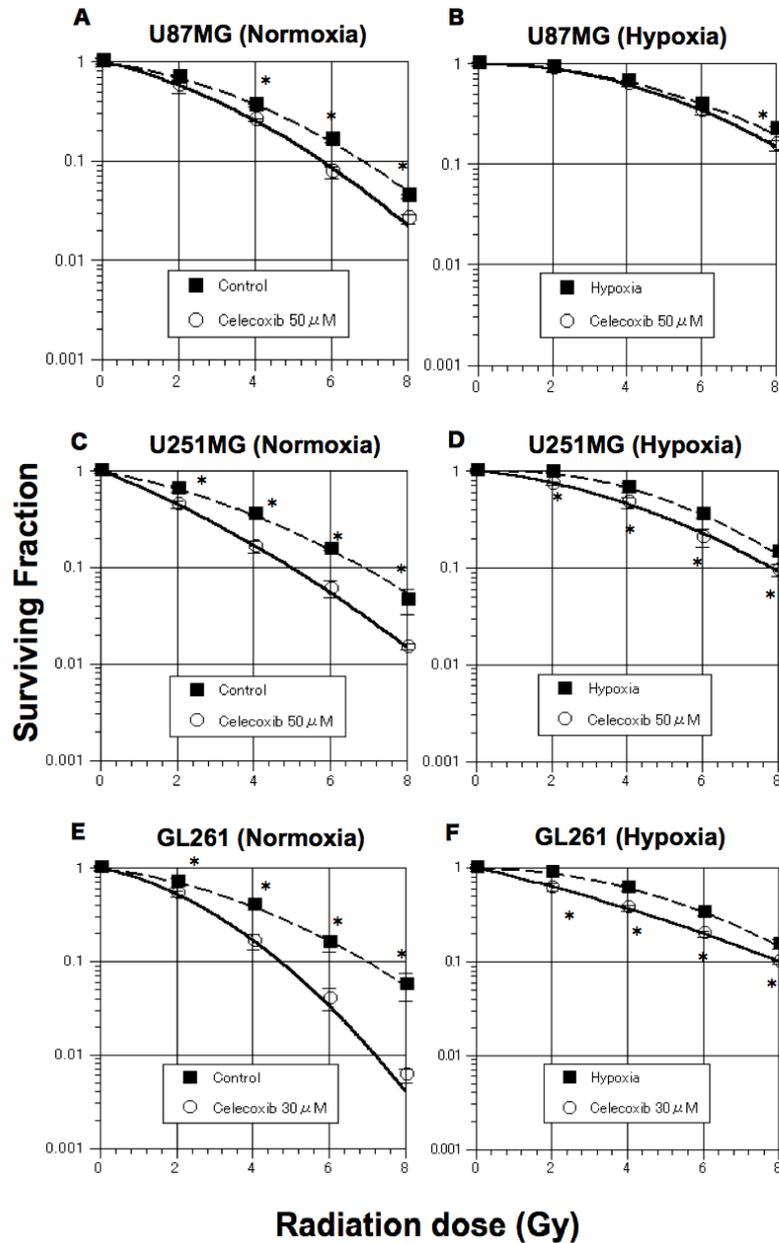
(図2) Cell Counting Kit-8によるセレコキシブの細胞毒性試験。

U87MG、U251MG と GL261 の結果を示す。48 時間のセレコキシブ処理後の細胞生存度を示す。黒いバーは常酸素細胞を示し、白いバーは低酸素細胞を示す。エラー・バーは、3 件の独立した実験から算出される標準偏差を示す。

48時間のセレコキシブ処理後、細胞毒性を調べた。酸素の有無に依らず、用量依存的に細胞毒性が増加する事が示された。30 μ Mと50 μ Mの濃度での、常酸素下のGL261の細胞生存度は、他の細胞株より有意に低かった。今回の結果から、LD50(50%致死濃度)に対応しているセレコキシブ濃度は、U87MGとU251MGで50 μ M、GL261で30 μ Mであることが示された。併用濃度の選択はKardoshらの報告[15]を参考にした上で、抑制効果を明瞭化する為にこれらの濃度を、以下に続く実験に適用することに決定した。

2.3.3 コロニー生存分析

コロニー生存分析の結果を図3に示す。すべての細胞株の放射線感受性は、常酸素状態と比較して低酸素状態で有意に減弱することが確認された。そして、セレコキシブ(U87MGとU251MGに対しては50 μ M、GL261に対しては30 μ M)を併用すると、すべての細胞株で常酸素状態のみならず、低酸素状態でも有意な放射線感受性の増強が示唆された。増感効果はSF2とD10を算出する事で評価した(表1)。SF2(+95%信頼区間:CI)は、2Gy照射の後の生存率を示す。また、D10(+95%信頼区間:CI)は10%の生存率を生じる線量を示す。加えて、D10を基準としてcontrol/celecoxib比を算出し、放射線増感率とした。値が大きいほど、セレコキシブの放射線増感作用は高い。酸素の有無に依らずセレコキシブはすべての細胞株の放射線感受性を上昇させた。特に常酸素下培養のGL261細胞は高い増感率を示した。



(図 3) 常酸素と低酸素状態の下でのセレコキシブによる放射線増感作用。

常酸素と低酸素の U87MG のコロニー生存曲線を (A) と (B) で示す。同様に、U251MG を (C) と (D) で、GL261 を (E) と (F) で示す。常酸素と低酸素状態の下で、48 時間セレコキシブで処理した後 (U87MG と U251 は 50 μ M で GL261 は 30 μ M で処理)、0~8 Gy の線量で照射を行った。黒い正方形はセレコキシブの生存データを示す、そして、空の円はセレコキシブを示す。エラー・バーは、3 件の独立した実験から算出される標準偏差を示す。* は各線量点での $p < 0.05$ を示す。

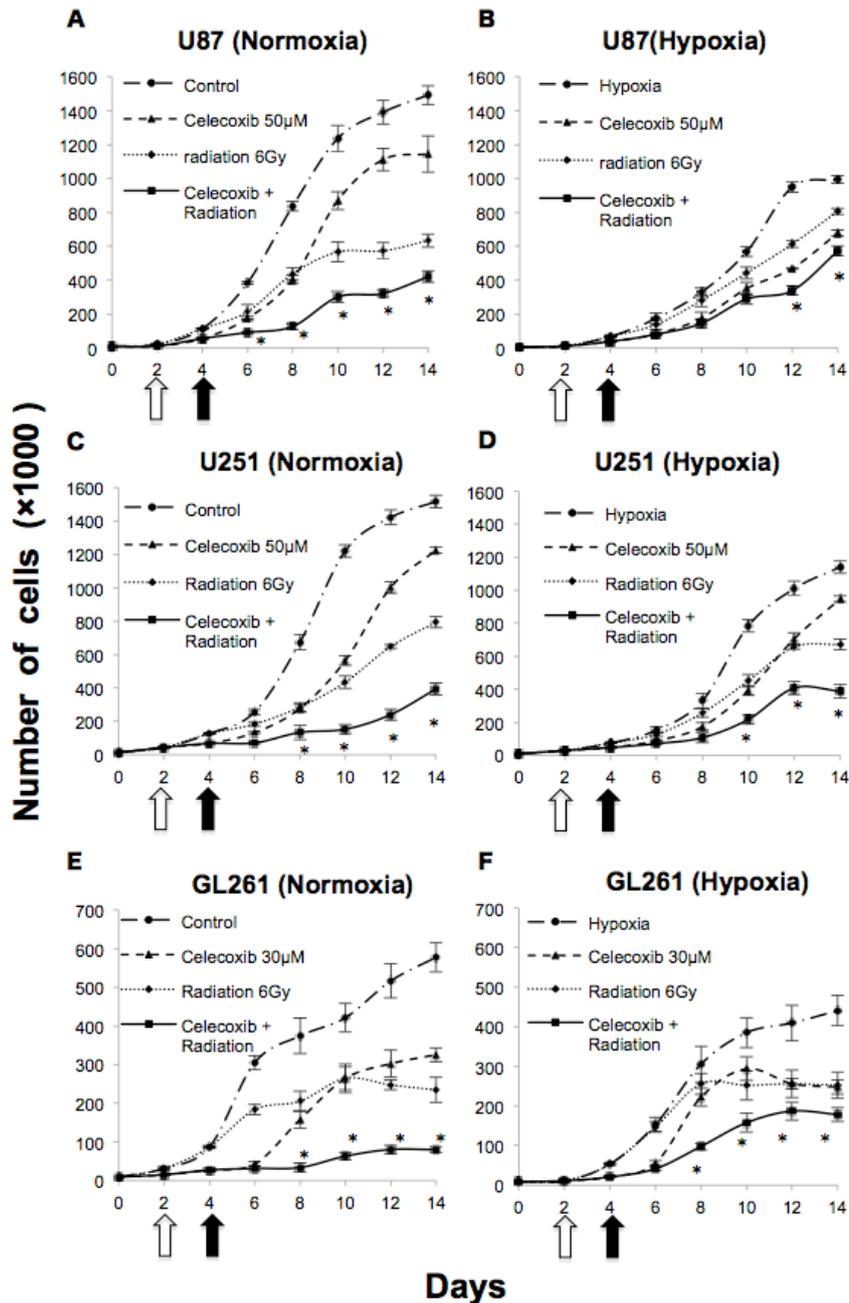
Table 1. Surviving fraction at 2 Gy (SF 2) and 10% survival dose (D10)						
Cell line	SF2			D10 (Gy)		
	control	celecoxib	<i>P</i> -value	control	celecoxib	Dose enhancement rate
U87MG						
Normoxia	0.67 ± 0.06	0.60 ± 0.01	<i>P</i> = 0.01	6.88 ± 0.14	5.77 ± 0.06	1.19 ± 0.01
Hypoxoia	0.89 ± 0.02	0.88 ± 0.001	<i>P</i> = 0.11	9.70 ± 0.28	8.81 ± 0.07	1.10 ± 0.03
U251MG						
Normoxia	0.66 ± 0.002	0.46 ± 0.03	<i>P</i> < 0.01	6.86 ± 0.04	4.90 ± 0.26	1.40 ± 0.08
Hypoxoia	0.96 ± 0.04	0.77 ± 0.04	<i>P</i> < 0.01	8.50 ± 0.17	7.56 ± 0.33	1.13 ± 0.03
GL261						
Normoxia	0.71 ± 0.02	0.51 ± 0.02	<i>P</i> < 0.01	6.94 ± 0.47	4.66 ± 0.21	1.49 ± 0.17
Hypoxoia	0.88 ± 0.002	0.63 ± 0.004	<i>P</i> < 0.01	8.80 ± 0.07	8.09 ± 0.07	1.10 ± 0.01

(表 1) 2Gy での生存率 (SF2) と 10%生存率を生じる線量 (D10) の分析。

※算出法は材料と方法を参照。

2.3.4 細胞増殖分析

図 4 は、常酸素と低酸素状態の下でのセレコキシブ単独治療、ガンマ線照射単独と併用療法後のそれぞれの細胞数変化を表す。常酸素下だけでなく低酸素下でも、すべての細胞株においてガンマ線とセレコキシブの併用は有意な細胞増殖抑制効果を示した。特に GL261 細胞に対する併用効果は常酸素状態で有意に高く、細胞増殖は Day14 には完全に停止した。



(図 4: 次頁) 常酸素と低酸素の下での細胞数変化。

常酸素と低酸素下で処理後の U87MG の細胞成長遅滞曲線を (A) と (B) に示す。同様に、U251MG を (E) と (F) に、そして、GL261 を (C) と (D) で示す。下部矢印は、セレコキシブ (白の矢印) とガンマ線照射 (黒の矢印) のタイミングを示す。各点は平均値を表す、そして、エラー・バーは 3 件の独立した実験から算出される標準偏差を示す。*は併用治療対ガンマ線単独照射の間の比較から算出した $P < 0.05$ を示す。

2.4 考察

2.4.1 膠芽腫細胞の放射線感受性と低酸素環境

膠芽腫は放射線抵抗性であり、極めて難治性な脳腫瘍である。電離性放射線の細胞傷害作用は強く酸素濃度に依存していることから[18]、膠芽腫の放射線抵抗性の原因には、腫瘍組織中の低酸素性領域の存在が関与している可能性が示唆される[28]。低酸素領域の存在は、多くの膠芽腫組織中で低酸素誘導性因子(HIF-1 α)が高発現しているという報告[29]からも確かである。加えて、低酸素性環境は、膠芽腫の癌幹様細胞のニッチであることが知られている[30]。従って、低酸素腫瘍細胞の放射線感受性を増加させる事は、膠芽腫に対する放射線治療の効果を改善する上で重要な問題の1つであると考えられる。今回の検証により、セレコキシブが常酸素だけでなく低酸素下培養の膠芽腫細胞に対しても有意な放射線増感作用を示したことは非常に重要な事実であると考えられる。

2.5 小括・結論

本章では、セレコキシブとガンマ線照射の併用で、膠芽腫細胞に対する有意な放射線増感作用と、増殖抑制作用を確認する事が出来た。更に、これらの腫瘍細胞増殖抑制作用は、低酸素下培養の細胞に対しても確認することが出来た。このことは、放射線治療抵抗性と考えられている腫瘍組織中の低酸素領域に対しても治療効果が期待できる事を示しており、今後、本薬剤を臨床応用していく上で極めて重要な結果であると考えられる。

第3章 セレコキシブの放射線感受性増強効果の解析

3.1 背景と目的

3.1.1 背景

前章では、セレコキシブが酸素の有無に依らず膠芽腫細胞の放射線感受性を増強し、そして腫瘍細胞の増殖を抑制することを示した。

最近、Gilbert らは、テモゾロマイドとセレコキシブを用いた化学放射線療法により、膠芽腫患者の予後を向上できたと報告したが[31]、今回我々は、*in vitro* でセレコキシブが膠芽腫細胞の放射線感受性を強化する作用を改めて明らかにした。Gilbert らの報告は、セレコキシブが膠芽腫細胞の放射線感受性を増強する可能性があることを示唆しつつも、その抗腫瘍メカニズムは明らかにされていない[31]。前章では低酸素培養下の細胞に対してもセレコキシブの放射線増感作用が示されたわけが、臨床応用に向けて、セレコキシブ本来の作用機序である COX-2 の抑制作用を含め、放射線増感作用のメカニズムを明らかにする必要がある。

3.1.2 目的

本章では、前章で得られた膠芽腫細胞に対するセレコキシブの放射線増感作用、ならびにガンマ線照射との併用処理で確認された増殖抑制作用の機序を明らかにし、臨床応用実現の為に寄与することを目的とする。

3.2 方法

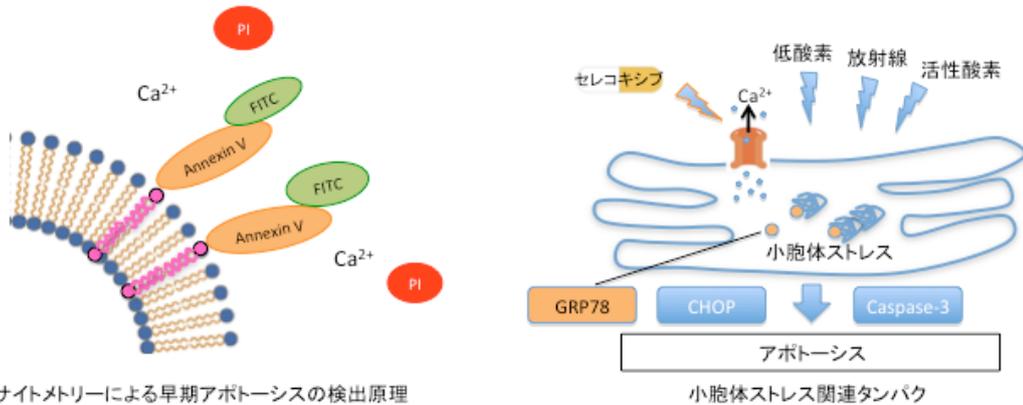
3.2.1 細胞周期分析

セレコキシブ処理 (U87MG と U251MG には 50 μ M、GL261 には 30 μ M)、単独照射 (6 Gy)、併用処理のそれぞれの処理から 24 時間後の細胞を、細胞周期分析に用いた。細胞はトリプシン処理して回収した後、PBS で洗浄し、70% (v/v) のエタノールで固定し、-20 $^{\circ}$ C で保存して解析に備えた。解析においては、まず固定した細胞を PBS で洗浄した後、40 μ g/ml プロピジウム・ヨウ素 (Sigma-Aldrich) と 200 μ g/ml RNaseA (Sigma-Aldrich) を含む PBS に混和させ、15 分間暗所室温で反応させた。染色した細胞は、フローサイトメトリー (BD FACS Calibur; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を使用して分析した。また、ModFit LT ソフトウェア (Verity Software House Inc., Topsham, ME, USA) を用いて DNA ヒストグラムの解析を行った。

3.2.2 アポトーシス分析

アポトーシスの検出 (参考図 9) のために、Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) アポトーシス検出キット (Sigma-Aldrich) を用いて、製品添付のプロトコルに従いフローサイトメトリーを使用して分析した。細胞を 48 時間 50 μ M セレコキシブ (U87MG と U251MG)、30 μ M セレコキシブ (GL261) で処理した後に、6 Gy の線量でガンマ線を照射した。そして、照射後の任意の時間 (0、6、48、72 と 96 時間) に、細胞を回収した。回収した細胞を 2 回 PBS で洗浄し、冷却した結合バッファで再懸濁した。その後、Annexin V-FITC 溶液 5 μ l とヨウ化プロピジウム (PI) 10 μ l を、細胞懸濁液に加え、室温暗所で 10 分間インキュベートした。少なくとも 10,000 個の細胞を、フローサイトメトリーによって解析した。

アポトーシスの検出



フローサイトメトリーによる早期アポトーシスの検出原理

小胞体ストレス関連タンパク

フローサイトメトリー解析

試薬	検出のタイミング(時間)	測定方法
Annexin V- fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sigma-Aldrich、東京)	(処理から) 0,6,12,24,48,96	BD FACS Calibur (BD Biosciences, USA)
ヨウ化プロピジウム (PI) (Sigma-Aldrich、東京)	(処理から) 0,6,12,24,48,96	—

ウェスタンブロット法

抗体	抗原	検出のタイミング
抗GRP78/BiP (Santa Cruz Biotechnology, USA)	GRP78 小胞体ストレスの指標	処理から6時間
抗CHOP/GADD153 (Santa Cruz Biotechnology, USA)	CHOP 小胞体ストレスの指標	処理から6時間
抗Caspase-3 (Cell Signaling Technology, USA)	Caspase-3 アポトーシスの指標	処理から6時間

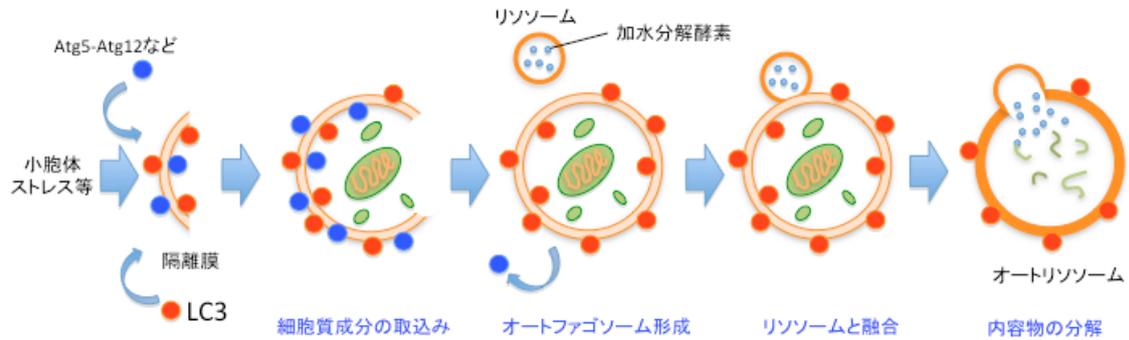
(参考図 9) アポトーシスの検出

Annexin V- (FITC) と PI の二重染色で、細胞膜に出現してきたホスファチジルセリンとアネキシンのみが特異的に結合することを利用して 早期アポトーシスを検出した。検出には FACS Calibur を用いた。ウェスタンブロットでもアポトーシスの検出を行った。小胞体ストレス反応において GRP78 というシャペロンが遊離してくることが知られている。そして過剰な小胞体ストレスはアポトーシスに繋がること知られており、CHOP そして Caspase-3 の発現を伴うことが知られている。

3.2.3 オートファジー分析

細胞のオートファゴソームの検出（参考図 10）の為に、Premo™ オートファジーセンサー（LC3B-FP）（Life Technologies, Tokyo, Japan）を使用した。栄養欠乏状態やコンフルエント状態等のストレス状態を避ける為に細胞は低密度に播種した。LC3B 試薬を直接培地に加え、穏やかに混合した後、一晚培養した。検鏡の直前に細胞核を、8 $\mu\text{g/ml}$ の終濃度のヘキスト 33342 (Dojindo, Kumamoto, Japan) で染色した。蛍光イメージは、Z-重層像を得るために付属のソフトウェアを用いて蛍光顕微鏡 (Biozero BZ-8000; KEYENCE; Tokyo, Japan) で検討した。しかし、Premo™ 試薬の細胞への誘導効率は細胞株によって異なり、GL261 細胞ではオートファゴソームの検出に利用できなかった。そのため、GL261 細胞は、Cyto-ID™ オートファジー検出キット (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) で、その添付のプロトコルに従って解析した。また、フローサイトメトリーによるオートファジーの定量解析として、アクリジンオレンジ染色を行った。Kanzawa らの報告にある様に [32]、アクリジンオレンジで細胞を染色する事によって自食作用の目印である酸性小囊のオルガネラ (AVOs) を定量化することが出来る。トリプシン処理後収集した細胞を、PBS で一度洗浄し、1 mg/ml のアクリジンオレンジ (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を含む PBS で再懸濁した後、室温暗所で 10 分間インキュベートすることで染色した。バックグラウンドがこの蛍光染料により緑に染色される一方で、AVO の酸性の区画は赤で染色される。少なくとも 10,000 個の細胞を、フローサイトメトリーによって解析した。

オートファジーの検出



ウェスタンブロット法

抗体	抗原	検出のタイミング
抗LC3 (コスモバイオ, 東京)	LC3 オートファジーの指標	処理から6時間
抗GRP78/BiP (Santa Cruz Biotechnology, USA)	GRP78 小胞体ストレスの指標	処理から6時間
抗CHOP/GADD153 (Santa Cruz Biotechnology, USA)	CHOP 小胞体ストレスの指標	処理から6時間

フローサイトメトリー解析

試薬	検出のタイミング(時間)	測定方法
アクリジンオレンジ (Sigma-Aldrich, 東京)	(処理から) 0,6,12,24,48,96	BD FACS Calibur (BD Biosciences, USA)

オートファゴソームの検出

商品名	標識	検出のタイミング	検出方法
Premo™ autophagy sensor (Life Technologies, 東京)	LC3B-RFP	処理から6時間	Biozero BZ-8000 (KEYENCE, 東京)
Cyto ID™ autophagy detection (Enzo Life Sciences, USA)	LC3B-GFP	処理から6時間	Biozero BZ-8000 (KEYENCE, 東京)

(参考図 10) オートファジーの検出

小胞体ストレスはアポトーシスのみならず、オートファジーも誘導する。ストレスを受けた細胞内部に隔離膜が出現する。オートファジーの過程を経て小胞内の内容物は分解される。とくにミトコンドリアの自食作用はアポトーシスの阻害に繋がるとも考えられる。

3.2.4 ウェスタンブロット

ガンマ線照射とセレコキシブ処理後の細胞を RIPA 溶解抽出バッファ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて室温で溶解した。バッファの組成は、25 mM のトリス-HCl (pH 7.6)、150 mM の NaCl、1 % の NP-40、1 % のデオキシコール酸ナトリウム、0.1 % の SDS である。そして、タンパクの分解を防ぐ為に溶解液にタンパク質分解酵素阻害薬 (Halt Protease Inhibitor Cocktail; Thermo Fisher Scientific) を加えた。タンパク質の濃度は、イオン性清浄剤互換性試薬 (IDCR; Thermo Fisher Scientific) を予め添加した 660 nm タンパク分析試薬 (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。抽出サンプルは、12.5~15 % SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜 (Millipore, Bedford, MA, USA) にブロッティング後、抗体と共にインキュベートした。用いた一次抗体は COX-2、p21^{Waf1}、glucose regulated 78 (GRP78/BiP)、growth arrest and DNA damage-inducible transcription factor (GADD) 153/C/EBP-homologous protein (CHOP) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、microtubule-associated protein 1 light chain (LC) 3 (Cosmo Bio, Tokyo, Japan)、p53 clone DO-1 (Calbiochem, Darmstadt, Germany)、cleaved caspase-3 (Asp175) clone 5A1、そして、 β -actin (Cell Signaling Technology) である。二次抗体には、Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) もしくは anti-rabbit antibody (Enzo) を用いた。そして、enhanced chemiluminescence system (Millipore, Billerica, MA, USA) を検出試薬として用いた。

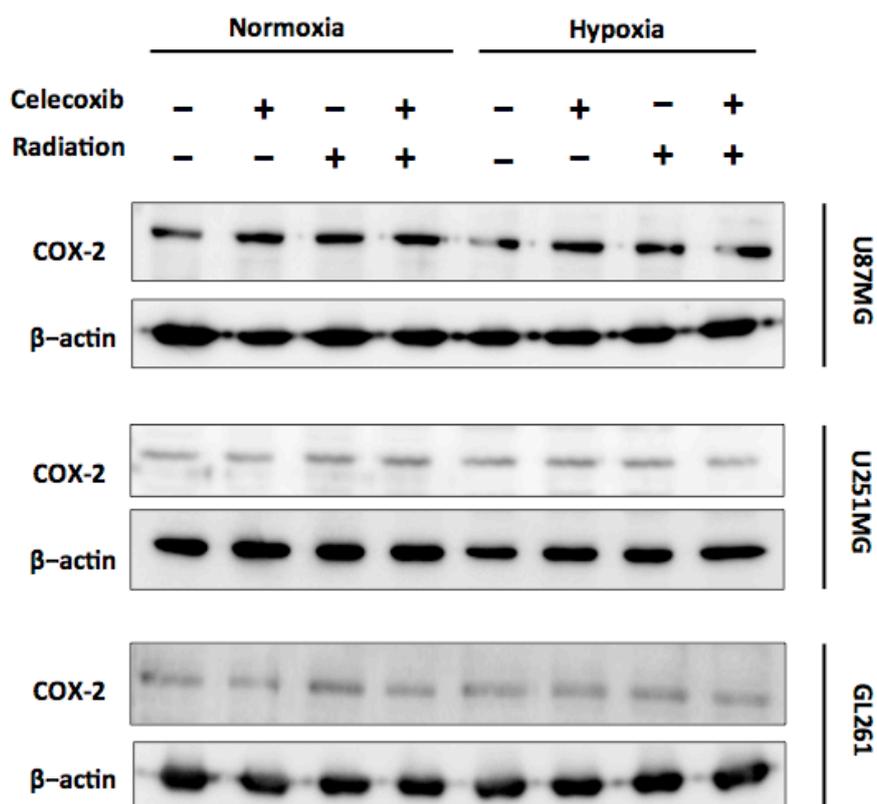
3.2.5 統計解析

フローサイトメトリーでは、3 回の実験から得られた平均値と標準偏差 (SD) により結果を示した。データ間の有意差は、スチューデントの t 検定によって評価した。P 値が 0.05 未満のときに結果の差は有意であるとした。

3.3 結果

3.3.1 COX-2 阻害作用の確認

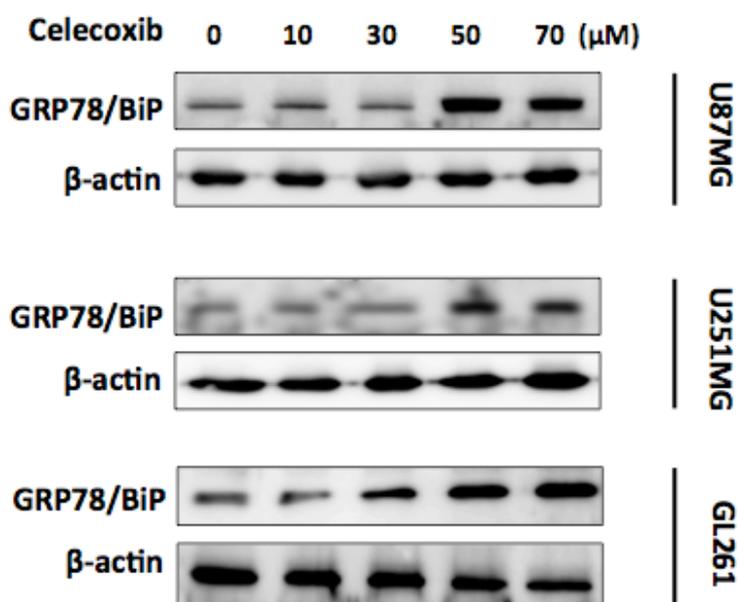
各膠芽腫細胞を 48 時間 50 μ M セレコキシブ (U87MG と U251MG)、30 μ M セレコキシブ (GL261) で処理した後に、6 Gy のガンマ線照射を行った。照射から 6 時間後に、細胞からタンパクを抽出し、ウェスタンブロッティングにより各々の処理後の COX-2 の発現を確認した。結果を図 5 に示す。しかし、いずれの細胞においてもセレコキシブ処理による COX-2 阻害作用は確認することが出来なかった。



(図 5) 膠芽腫細胞株の COX-2 の発現

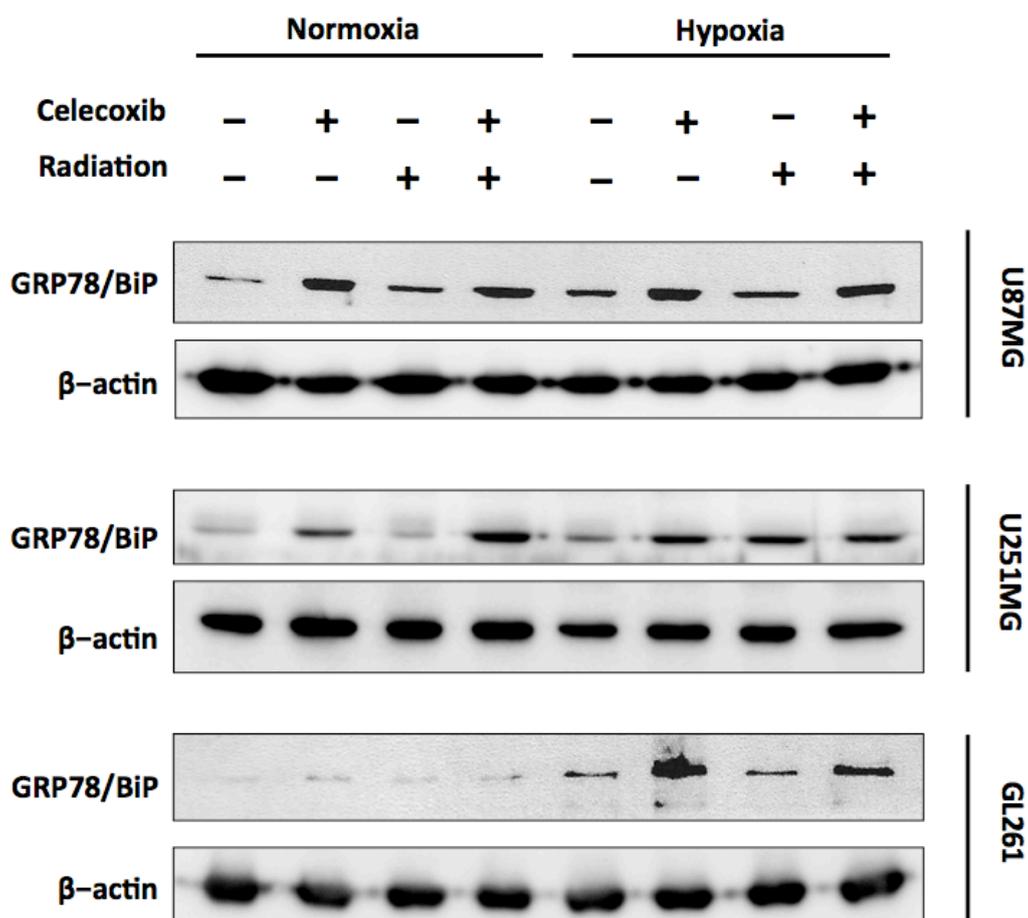
3.3.2 小胞体ストレス応答の確認

第2章の図1に示す濃度で小胞体ストレスの指標であるGRP78/BiPの発現を検討した(図6)。その結果、小胞体ストレスの発現レベルは、セレコキシブの濃度が増加するにつれて増強した。図1で示した細胞毒性とGRP78/BiP発現レベルは相関していると推定される。第2章の実験では、十分に小胞体ストレスが誘導される濃度(U87MGとU251MGは50 μ M、GL261は30 μ M)で検討されていた。



(図6) セレコキシブ濃度依存的な GRP78/BiP の発現

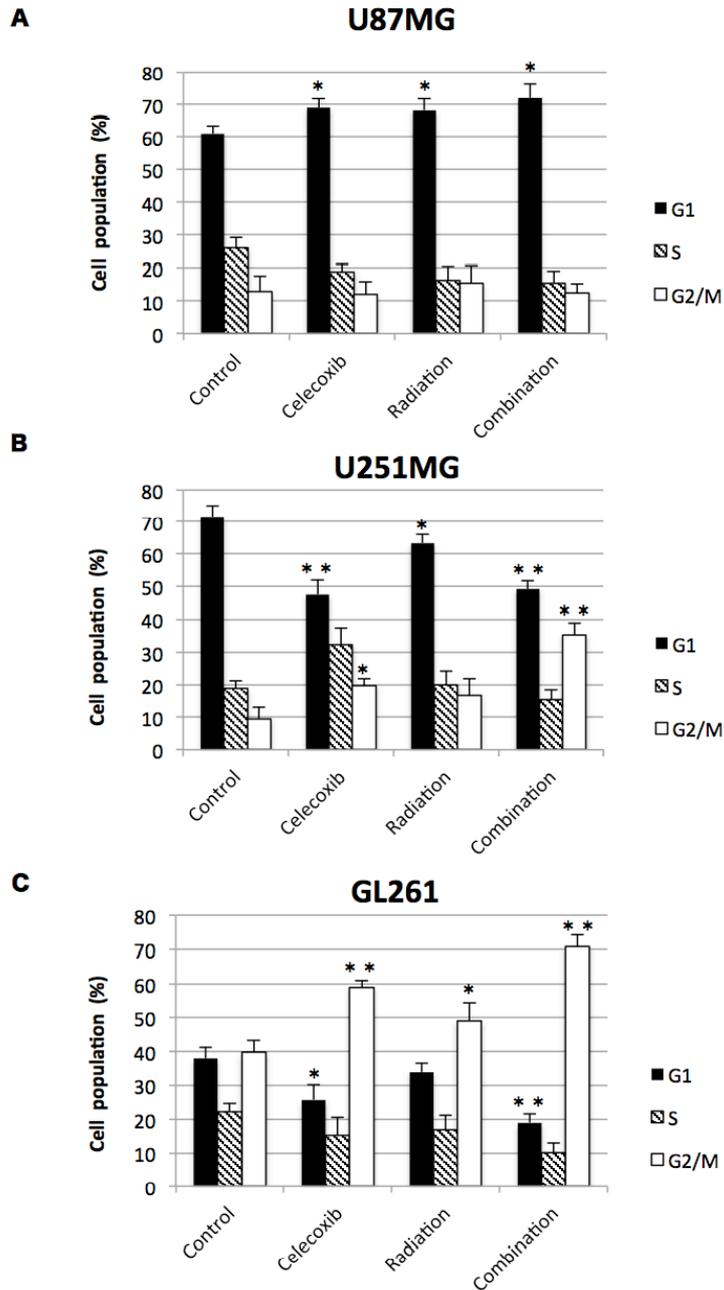
また、前述の 3.2.1 で回収したタンパクから、小胞体ストレスのマーカーである GRP78/BiP の発現を確認した(図 7)。GRP78/BiP の発現レベルはセレコキシブ単独あるいはガンマ線との併用により増強された。特に GL261 においては、GRP78/BiP の発現レベルは常酸素下培養細胞に比べ低酸素下培養細胞で非常に高くなった。



(図 7) 膠芽腫細胞株の GRP78/BiP の発現

3.3.3 細胞周期分析

p53 野生型の U87MG は、セレコキシブ単独治療後、軽度な G1 期停止を示した。一方、p53 変異型の U251MG と GL261 は、セレコキシブ単独治療後、G1 期ではなく G2/M 停止を起こすことが示唆された。特に、ガンマ線単独またはセレコキシブとの併用療法では、GL261 は強い G2/M 停止を示した。そして GL261 細胞の G2/M 停止は、併用処理から 10 日後でも持続していた。細胞周期解析を代表するデータとして、常酸素下でのセレコキシブ処理 (U87MG と U251MG には 50 μ M、GL261 には 30 μ M)、単独照射 (6 Gy)、併用処理のそれぞれの処理から 24 時間後の DNA ヒストグラムを数値化したものを図 8 に示す。



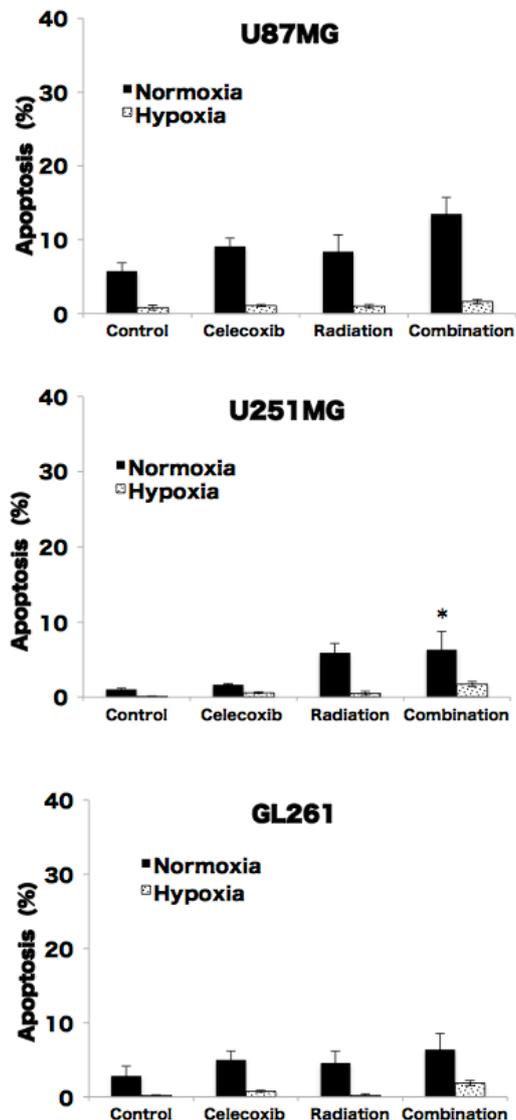
(図 8) フローサイトメトリーによる細胞周期分析。

グラフはセレコキシブ処理 (U87MG と U251MG には 50 μ M、GL261 には 30 μ M)、単独照射 (6 Gy)、併用処理のそれぞれの処理から 24 時間後の DNA ヒストグラムを数値化したものを示す。黒いバーは G1 期、斜線のバーは S 期、白いバーは G2/M 期を示す。エラー・バーは、3 件の独立実験から算出される標準偏差を示す。* と**はそれぞれ、コントロールと各処理郡群との比較から算出した $P < 0.05$ と $P < 0.01$ を示す。

3.3.4 アポトーシス検出

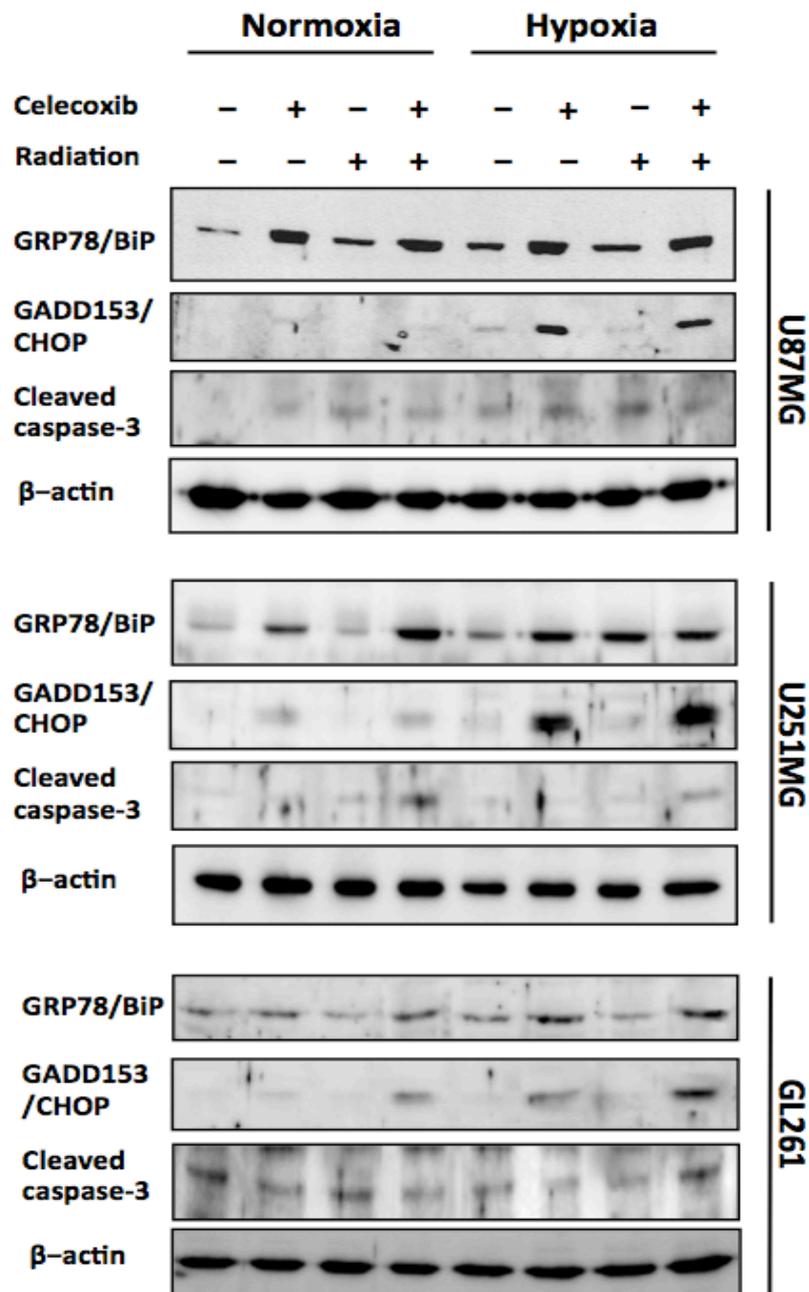
種々の膠芽腫細胞株に対するセレコキシブ単独処理、ガンマ線照射単独、そして併用処理後のフローサイトメトリーによるアポトーシスの分析結果を図9に示す。常酸素培養細胞のアポトーシスの割合は、低酸素培養細胞よりも高くなることが示された。ガンマ線単独照射に比べ、併用処理のアポトーシスの割合が高くなるという結果が全ての細胞において見られるわけではなかった。しかし、U251MG細胞株については、セレコキシブ単独処理と比較した時、併用処理で、より有意なアポトーシスの増加が認められた。

併用処理から6時間後の細胞について、ウェスタンブロッティングによるアポトーシス関連タンパク質の発現解析も行った(図10)。全ての細胞において、セレコキシブ単独処理と併用処理で、GRP78/BiPタンパク質の発現レベルが高くなることが示された。特にGL261については、低酸素状態のGRP78/BiPの発現レベルは、常酸素状態と比べて、より高くなることが示された。また、CHOPの発現は、U87MGとU251MGではGRP78と連動して増強されることが示唆された。そして、低酸素下のGADD153/CHOPの発現は、これらの2つの細胞株で、常酸素状態の発現より高くなった。GL261細胞ではGADD153/CHOPの発現は、セレコキシブ単独処理に比較し、併用処理でより高くなる事が示された。また、低酸素下で全ての細胞でGADD153/CHOPの発現が増強されたにもかかわらず、Cleaved caspase-3の発現は上昇しなかった。



(図 9) フローサイトメトリーによるアポトーシスの分析。

(前頁より続き) 早期アポトーシスを Annexin V アポトーシス検出キットを用いて検出し、フローサイトメトリーで測定した。細胞は、ガンマ線照射 (6 Gy) またはセレコキシブ (30-50 μ M) 単独処理、および両者併用処理後、常酸素下または低酸素下で培養した。この図は、各処理後 96 時間経過したときの、アポトーシス細胞の全細胞数に対する割合を示した。黒いバーは常酸素下、白いバーは低酸素下での結果を示す。*、 $p < 0.05$ 、セレコキシブ単独処理対併用処理。データは、3 回の個別実験を行って解析した。

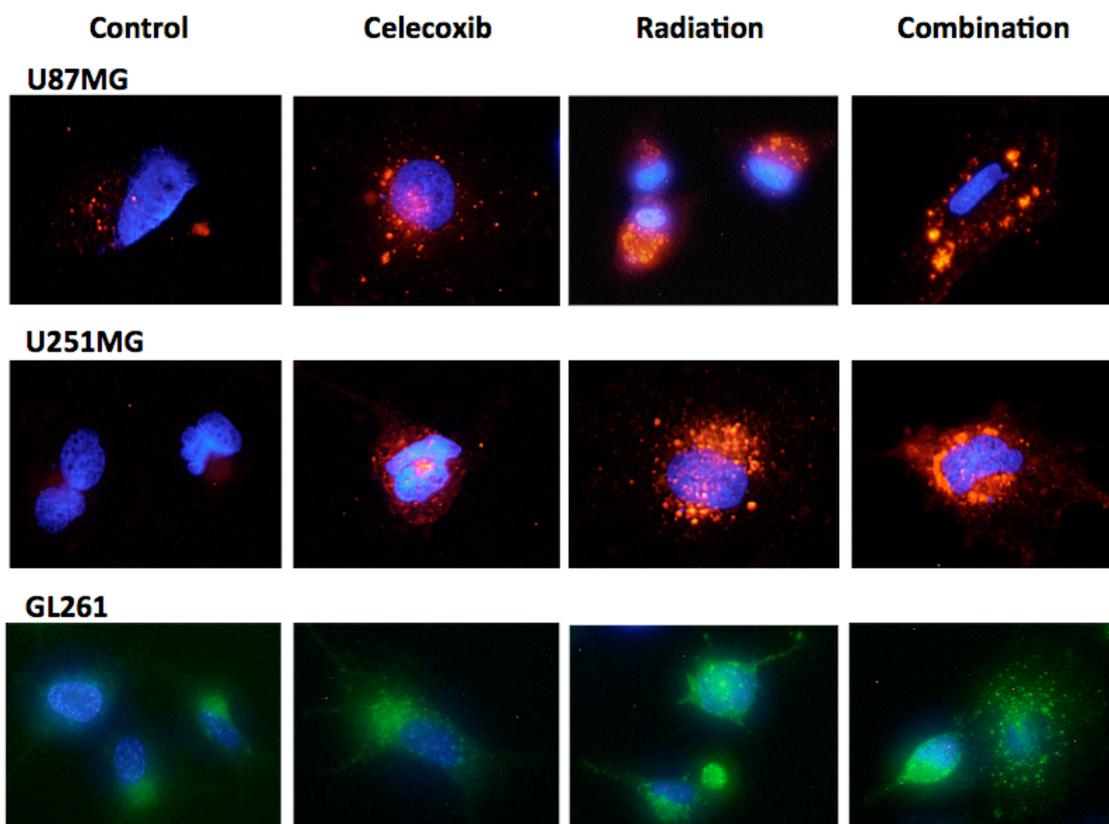


(図 10) 小胞体ストレスとアポトーシス関連タンパクの発現増強。

小胞体ストレスとアポトーシス関連タンパク質をウェスタンブロッティングによって検出した。各処理後 6 時間の値を示す。GRP78/BiP と GADD153/CHOP は、小胞体ストレスの指標である。Cleaved caspase-3 は、アポトーシスの指標である Caspase-3 の活性型であり、アポトーシス細胞でその発現の増加が見られる。また β -actin をコントロールとして用いた。

3.3.5 オートファジーの検出

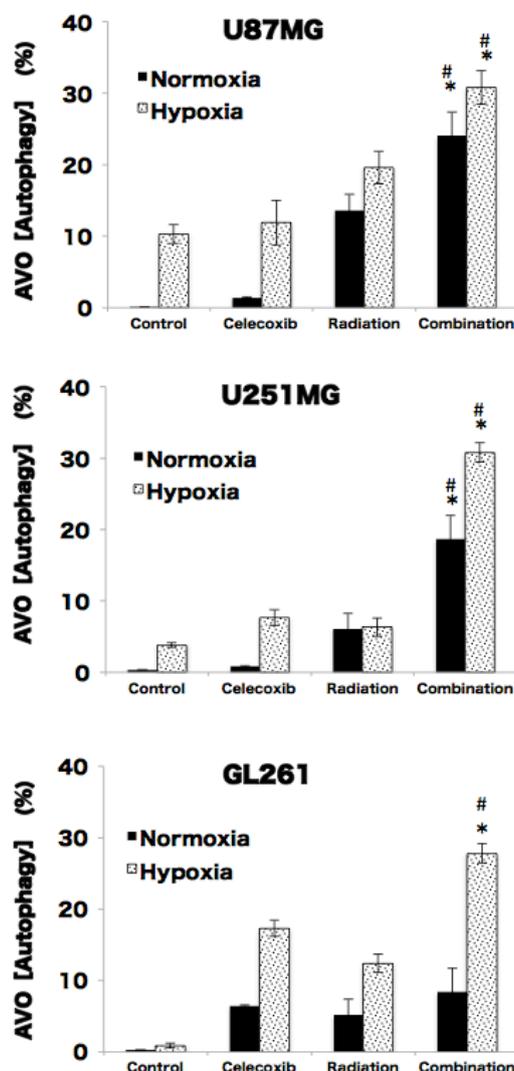
全ての細胞株で、セレコキシブ単独処理、ガンマ線照射単独、それらの併用処理後にオートファジーの中間生成物であるオートファゴソームの数が増加した（図 11）。



（図 11） オートファゴソームのイメージ

U87MG と U251MG のオートファゴソームの検出は、Premo™ 試薬を用いて行った。一方、GL261 については、Cyto ID™ で検出した。写真は、低酸素下での各処理後 6 時間の細胞の像である。赤と緑の点は、オートファゴソームを示す。核は、ヘキスト 33342 で染色した。細胞画像は、蛍光顕微鏡（Biozero BZ-8000）で撮影した。

また、オートファジーを定量化するためにフローサイトメトリーを用いて AV0s の解析を行った (図 12)。

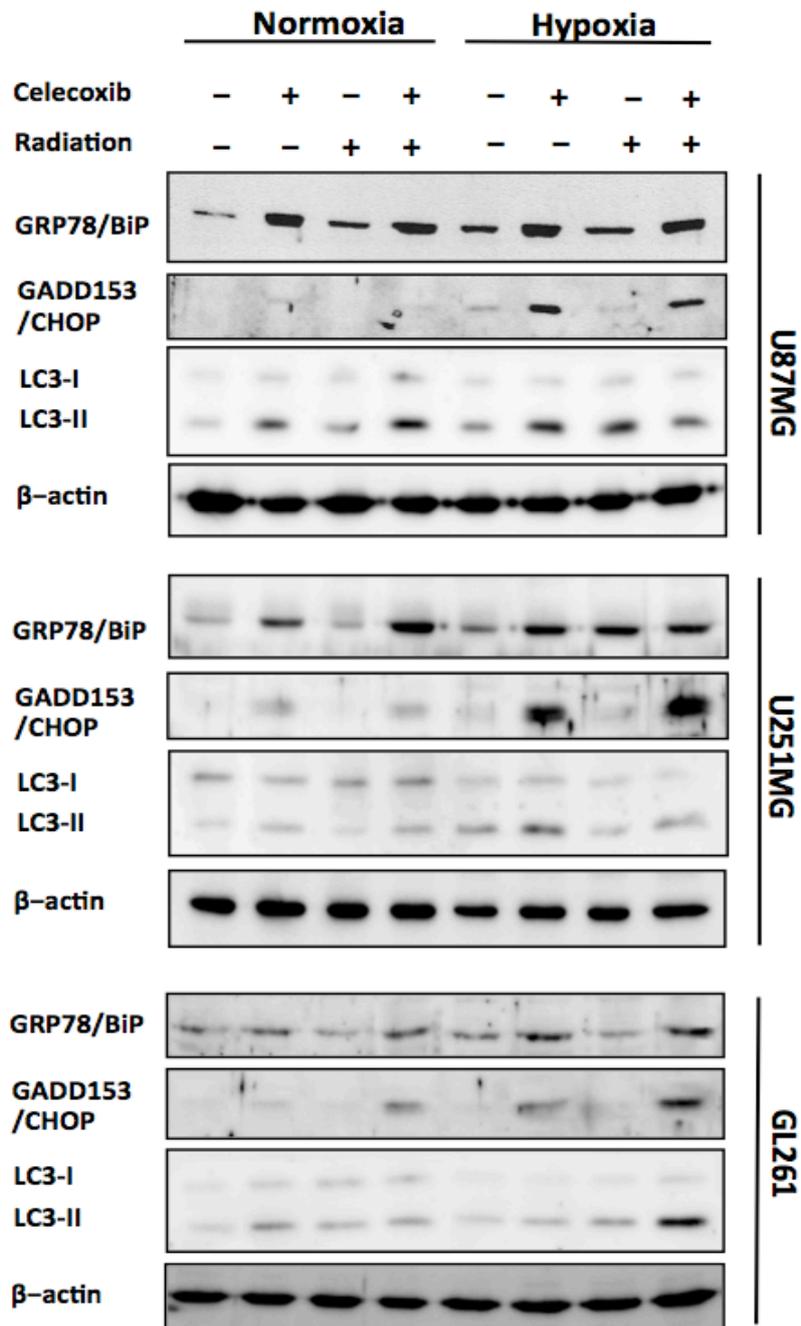


(図 12) フローサイトメトリーによるオートファジーの定量

オートファジーはアクリジンオレンジ染色によって検出し、フローサイトメトリーを使用して測定した。各細胞株をガンマ線 (6 Gy) またはセレコキシブ (30-50 μ M) 単独処理および併用処理し、常酸素下と低酸素下で 96 時間培養したときオートファジーによる酸性小囊のオルガネラ (AV0) の割合を示す。黒いバーは常酸素下培養のを、白いバーは低酸素下培養の結果を示す。#、p, 0.05、 γ 線照射対併用処理。*、p, 0.05、Celecoxib 対併用処理。データは、3 回の独立した実験を行い解析した。

特に U87MG と U251MG 細胞については、低酸素細胞の AV0 の形成率は常酸素細胞に比べて高かった。そして、セレコキシブとガンマ線照射の併用による AV0 形成率の増加は、すべての細胞で、常酸素細胞に比べて低酸素細胞で有意に高くなる事が示された。

次に、オートファジー関連タンパク質である LC3 の発現を図 13 に示す。LC3-I から LC3-II へのシフトは、特に U87MG 細胞株で観察された。常酸素のコントロールと比較した時、セレコキシブ単独処理、ガンマ線単独照射および併用処理のいずれの場合も、LC3-II の発現がより高くなる事が示された。加えて、すべての細胞で、低酸素下培養のみで LC3-II の発現が高くなる事が示唆された。また、U87MG と U251MG においてガンマ線照射の有無にかかわらずセレコキシブ処理後の GRP78/BiP、GADD153/CHOP と LC3-II の発現レベルの変化は互いにリンクしていることが推定された。



(図 13) 小胞体ストレスとオートファジー関連タンパクの上方調節。

小胞体ストレスと自食作用関連のタンパク質を、ウェスタンブロッティングにより検出した。この図は、各処理の後 6 時間の値を表す。CHOP と GRP78 と β -アクチンは、図 10 の同じデータである。LC3 は、自食作用の指標である。 β -アクチンをコントロールとして用いた。

3.4 考察

3.4.1 セレコキシブの本来の薬理作用

セレコキシブの主な薬理作用は、COX-2 阻害作用である[11]。COX-2 はアラキドン酸カスケードにおいてプロスタグランジンの合成の律速酵素として働き、発癌のサイトカイン、成長因子などの調整に関与する[8-10]。プロスタグランジン E2 (PGE2) は COX-2 の主産物であり、細胞遊走能、腫瘍増殖、浸潤と血管新生を加速することが知られている[8]。加えて PGE2 は、アポトーシスや免疫監視機構を阻害すること[5, 33]、そして PGE2 の発現そのものは低酸素環境で更に上昇する事も知られている[10]。このように、腫瘍の増殖に加担してしまうと考えられる PGE2 を調整する COX-2 はヒトの悪性脳腫瘍細胞で高発現していることが報告されており[5]、その発現レベルが予後不良と関連があることが示唆されている[5]。そして、実際にセレコキシブは、膠芽腫以外の腫瘍に対する検討ではあるものの、血管新生の抑制によって増殖抑制作用を示すという報告があった[34]。セレコキシブの COX-2 の阻害作用を生かしつつ、さらに Kesari ら[17]の報告にあるような安全が確認されたセレコキシブの併用治療において放射線増感作用が確認出来るならば、膠芽腫の治療の併用に用いる薬剤として非常に有用であると考えられた。

3.4.2 小胞体ストレスとセレコキシブ

これまでに出されたいくつかの報告では、セレコキシブをおよそ 50~100 μ M の濃度で用いる時、大腸癌[35]と前立腺癌細胞[36]でアポトーシスを誘発した事が述べられている。セレコキシブは通常、血中濃度のおよそ 10 μ M 以下で用いられることで、数種類存在する COX のうち COX-2 のみを阻害する事を可能にした薬剤であるが、これらの報告による腫瘍抑制効果は、むしろ選択的に COX-2 を阻害出来る濃度以上でしか確認されなかったため、COX-2 抑制とは異なるメカ

ニズムであると考えられた[36]。そして後に、セレコキシブによるアポトーシス誘導のメカニズムが、細胞への小胞体ストレスの過剰な負荷が原因の1つであることがわかった[37]。小胞体は生合成で重要な役割を果たす細胞内小器官であるが、低酸素[20]、Ca²⁺減少[38]や活性酸素種[39]などにより、そのシグナル伝達機能や検知機能が影響を受ける、言わば“ストレス”を受けることが知られている[40]。最近の報告に基づくと、小胞体ストレスが放射線またはセレコキシブによっても誘導されることが示されている[15, 37, 39, 41, 42]。Johnsonらは[43]セレコキシブが小胞体からサイトゾルへのカルシウムの漏出を促すことによって小胞体ストレスを誘導することを報告した。この現象の主要なメカニズムは、COX-2抑制効果[44]とは独立のメカニズムである、小胞体カルシウムATPase (SERCA)の抑制であるためと考えられた[42, 43, 45]。Kardosh[15]やChuang[16]らはセレコキシブのCOX-2阻害機能を欠損させた“2,5-dimethyl-celecoxib (DMC)を作成し、この薬剤がセレコキシブと同様に小胞体ストレスを誘導することを報告した。また、Du[46]らはCOX-2欠乏性の結腸直腸癌細胞HCT116に対してもセレコキシブは小胞体ストレスを惹起し、それに伴う細胞死を誘発することを報告した。いずれも小胞体ストレスがCOX-2阻害作用とは独立のメカニズムである見解を支える報告である。我々も今回、膠芽腫細胞に対してガンマ線とセレコキシブを併用することで有意な細胞増殖抑制を確認したが、放射線の増感が確認されたセレコキシブの濃度ではCOX-2阻害作用は確認出来なかった。むしろセレコキシブのCOX-2阻害作用の検証はそのタンパク発現レベルを見るだけでは十分ではなく、下流のPGE2レベルを確認することが必要かもしれない。しかし、今回の小胞体ストレスの誘導作用に限っては、これまでの小胞体ストレス誘導の報告を勘案すると、COX-2非依存的な作用であることが想像される。以前、我々は抗癌剤CPT-11とセレコキシブの組合せが有意に、マウス移植神経芽細胞腫の成長を抑制することを報告した[14]。この時、アポトーシスの増加がGADD153/CHOPのアップレギュレーションと密接に結びつけられたことから、この併用療法の増殖抑制作用が強い小胞体ストレスの誘導に起因した為であると結論づけた[47]。そして我々は今回の実

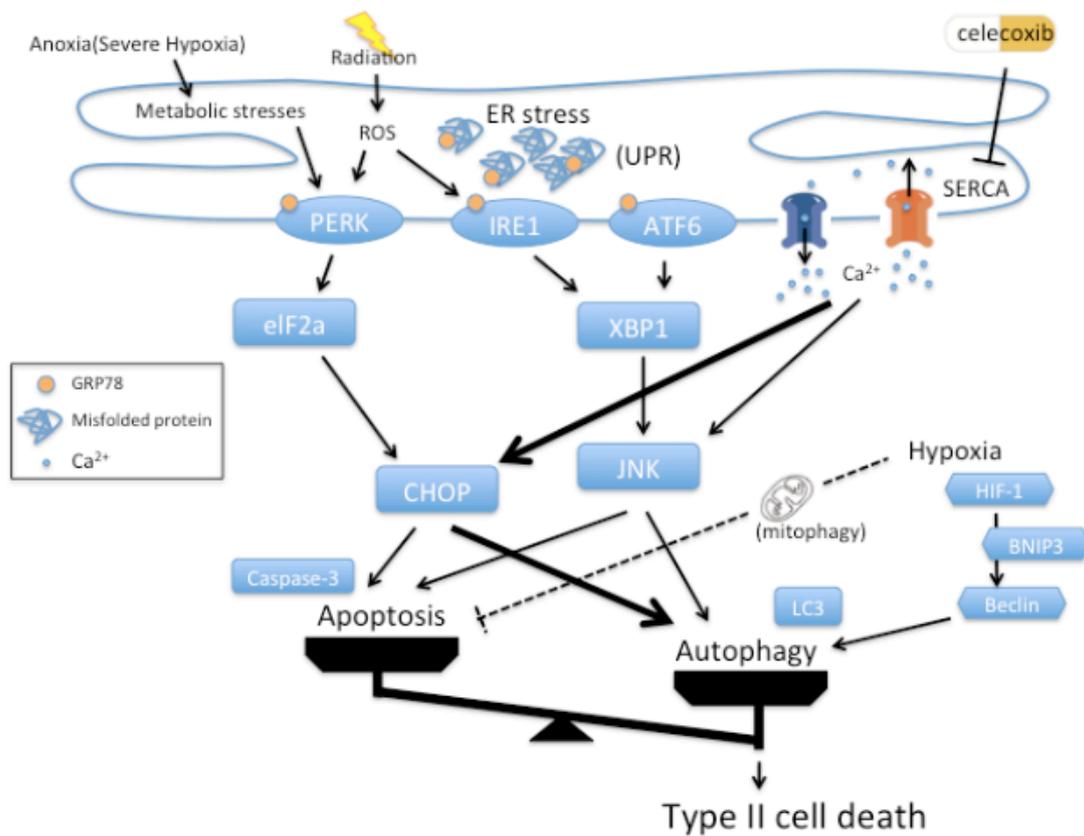
験結果が、小胞体ストレスの誘導という点で、以前の報告[47]と互換性を持つと考えた。

3.4.3 小胞体ストレスと細胞死

小胞体ストレスが過剰に負荷された時、細胞はアポトーシスに至ることが知られている[19]。過剰な小胞体ストレスが負荷されると、アポトーシス関連タンパクである CHOP と caspase-3 の発現が上方制御される[15]。しかしながら、今回の結果では、セレコキシブと放射線によって CHOP が上方制御される事が認められたにもかかわらず、カスパーゼ-3 の上方制御とアポトーシス細胞 (図 9, 10) の有意の増加は確認出来なかった。だが最近の報告をまとめると、小胞体ストレスはアポトーシスだけでなくオートファジーも誘発することがわかってきた[48-50]。そして CHOP の上方制御も、小胞体ストレス応答において、アポトーシス誘導の他にオートファジーの誘導に繋がる機能を持つことがわかってきた[51]。今回の実験は、セレコキシブとガンマ線の併用により、低酸素下培養膠芽腫細胞に主にオートファジーが誘発されることを示した。そして、それはセレコキシブがアポトーシスよりもむしろオートファジーを誘発すると報告した Kang らの報告[52]と互換性を持ち、本研究の主要な発見であると考えている。

3.4.4 セレコキシブの放射線増感作用

セレコキシブの放射線増感のメカニズムは未だ不明な点が多い。だが最近の報告の中で、放射線によって受けた DNA 損傷が小胞体ストレスを誘導する一因になり得る事が述べられている[41]。そして、放射線障害性小胞体ストレスのシグナリング経路として、ある二つの経路が細胞死に結びつく可能性が示唆された。その一つは PERK/eIF2a/CHOP 経路であり、そしてもう一つは IRE1/XBP1/JNK 経路である[53] (参考図 11)。



(参考図 11) 小胞体ストレスの概略。

セレコキシブ誘導の小胞体ストレスは、CHOP または JNK のアップレギュレーションを通して、アポトーシスと自食作用につながる事ができる。放射線障害性小胞体ストレスは、PERK/eIF2 または IRE1/XBP1 経路を通してアポトーシスと自食作用につながる事ができる。低酸素誘導性のオートファジー（マイトファジーを含む）はその自食作用でミトコンドリアを分解することによってアポトーシスを阻害する可能性がある。そして、重篤な低酸素は単独で小胞体ストレスを誘導して、PERK 経路によってアポトーシスまたは自食作用に接続することができる。図の下部で小胞体ストレスによって誘発されるアポトーシスと自食作用の間の「バランス」仮説を示した。

この放射線障害性小胞体ストレスに基づく経路は、細胞をアポトーシスとオートファジーに導くことができるが、同様に低酸素とセレコキシブによって誘導される小胞体ストレスもまた、この2通りの経路を介して細胞死に接続していることが報告されている[38, 54]。つまり、放射線、低酸素、そしてセレコキシブから誘導される複合的な小胞体ストレスは腫瘍細胞に深刻な細胞毒性を引き起こすことが考えられた。

セレコキシブの放射線増感作用の解釈としては、直接的な細胞死誘導の他に細胞周期依存的な効果も考えられた。フローサイトメトリーによる分析から、セレコキシブは単剤で細胞周期に変調を及ぼすことが示唆されたからである。予てよりセレコキシブの効果と細胞周期の関連性が示唆されてきたが、特にGroshらの報告では、[55]、セレコキシブがCOX-2阻害作用とは独立したメカニズムでP21^{Waf1}とP27^{Kip1}の上方調整を通して細胞周期の変調を引き起こす事が示され、また、Chenらは[56]、長い小胞体ストレスがP27^{Kip1}の発現レベルを増加させる事を報告した。これはセレコキシブ単剤での処理で小胞体ストレスが誘導されたこと、そして薬剤処理後にp53が野生型であるU87MGでわずかなG1期停止を誘発する一方、p53が変異型であるU251MGとGL261(図8)はG2/M停止を引き起こすことを示した我々の結果と互換性を持つ。このように、小胞体ストレスは、細胞周期を調整する因子のうちの1つである可能性がある。G1またはG2/M期の細胞が放射線高感受性であることが知られている。つまり、小胞体ストレスを通しての細胞同調効果は、セレコキシブの放射線増感効果のための、また別のメカニズムであるかもしれない。今後は更なる精密な検査が必要であると考えられる。

3.4.5 セレコキシブ研究の将来の展望

セレコキシブはNSAIDsとして臨床ですでに用いられており、放射線療法との併用治療を考える時、膠芽腫患者への適用のハードルはそれほど高くはない[12]。しかし、本研究の現時点での限界は、その濃度設定にある。一般に臨床

に用いられる場合の血中濃度は 10 μ 以下という報告 [57] があるが、今回の実験での使用濃度はそれよりも高い 30~50 μ M である。しかし、ファイザーの薬物動態資料の中には、ヒトに対し 10 日間 2400mg セレコキシブ投与（通常使用の 6 倍量＝血中濃度換算、約 25 μ M）を行った場合にも重篤な副作用が確認されなかったというデータがあり、30 μ M の血中濃度であれば達成出来る可能性があるかもしれない。<http://labeling.pfizer.com/ShowLabeling.aspx?id=793>。また投与濃度の問題を克服する方法としては、我々が以前に報告した様に [47]、セレコキシブを他剤と併用する事によってその効果を維持しつつ使用濃度を下げることが考えられる [14, 17, 31, 47]。今後は、そのような併用治療の有効性を試験するためにも、今回の研究で用いた GL261 細胞を頭蓋内移植した B56BL6 マウス脳腫瘍モデルが有用であると考えられる。また、Chen ら [58] が、セレコキシブが膠芽腫幹細胞様細胞に対する放射線感受性を強化することを報告したように、膠芽腫幹細胞に対する効果も非常に興味深いテーマである。低酸素環境が膠芽腫幹細胞のニッチとして知られているように [59]、セレコキシブと放射線の組合せは放射線療法後の局所再発の主たる原因である腫瘍幹細胞に対しても有効である可能性がある。

3.5 小括・結論

本章では、セレコキシブが本来の機序である COX-2 阻害作用とは独立のメカニズムで小胞体ストレスを惹起し、膠芽腫細胞に細胞周期停止と細胞死を誘導することが示唆された。そして、セレコキシブと放射線の併用は小胞体ストレスに更に負荷をかける事で、細胞死が引き起こされることが示唆された。この細胞死の形態は、アポトーシスよりもオートファジーが主で、特に低酸素下培養した膠芽腫細胞で強く誘導された。

第4章 総括

本研究では、セレコキシブとガンマ線の併用が、常酸素下のみならず低酸素下の膠芽腫細胞に対し、有意な増殖抑制効果を示し、オートファジーを引き起こすことが示唆された。また、そのメカニズムは膠芽腫細胞に対する強い小胞体ストレス負荷である事が示唆された。

今後は、有意な抑制が認められた GL261 マウス膠芽腫細胞を用いた頭蓋内移植モデルに移行し、生体内における小胞体ストレス反応を検証して行く予定である。そして、今回の効果の限界でもあったセレコキシブの濃度であるが、小胞体ストレスを誘導する可能性のある他の薬剤と組み合わせることにより、現実的な投与用量を確立したいと考えている。今回の結果は、腫瘍細胞そのものに対する小胞体ストレス誘導効果に焦点を絞った検討ではあったが、続く *in vivo* の結果次第では、今後の臨床応用として膠芽腫患者の治療予後の改善に貢献できる可能性が高い。

参考文献

1. Kleihues, P. and H. Ohgaki, *Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis*. Neuro Oncol, 1999. **1**(1): p. 44-51.
2. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 987-96.
3. Hegi, M.E., et al., *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 997-1003.
4. Parsons, D.W., et al., *An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme*. Science, 2008. **321**(5897): p. 1807-12.
5. Shono, T., et al., *Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations*. Cancer Res, 2001. **61**(11): p. 4375-81.
6. Paoletti, P., et al., *Prostaglandins in human brain tumors*. J Neurosurg Sci, 1989. **33**(1): p. 65-9.
7. Lo, H.W., et al., *Cyclooxygenase-2 is a novel transcriptional target of the nuclear EGFR-STAT3 and EGFRvIII-STAT3 signaling axes*. Mol Cancer Res, 2010. **8**(2): p. 232-45.
8. Herschman, H.R., *Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters*. Annu Rev Biochem, 1991. **60**: p. 281-319.
9. Williams, C.S., M. Mann, and R.N. DuBois, *The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development*. Oncogene, 1999. **18**(55): p. 7908-16.
10. Taketo, M.M., *Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I)*. J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(20): p. 1529-36.
11. Shi, S. and U. Klotz, *Clinical use and pharmacological properties of selective COX-2 inhibitors*. Eur J Clin Pharmacol, 2008. **64**(3): p. 233-52.
12. Steinbach, G., et al., *The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis*. N Engl J Med, 2000.

- 342(26): p. 1946-52.
13. Milas, L., *Cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme inhibitors as potential enhancers of tumor radioresponse*. Semin Radiat Oncol, 2001. **11**(4): p. 290-9.
 14. Kaneko, M., S. Kaneko, and K. Suzuki, *Prolonged low-dose administration of the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib enhances the antitumor activity of irinotecan against neuroblastoma xenografts*. Cancer Sci, 2009. **100**(11): p. 2193-201.
 15. Kardosh, A., et al., *Aggravated endoplasmic reticulum stress as a basis for enhanced glioblastoma cell killing by bortezomib in combination with celecoxib or its non-coxib analogue, 2,5-dimethyl-celecoxib*. Cancer Res, 2008. **68**(3): p. 843-51.
 16. Chuang, H.C., et al., *COX-2 inhibition is neither necessary nor sufficient for celecoxib to suppress tumor cell proliferation and focus formation in vitro*. Mol Cancer, 2008. **7**: p. 38.
 17. Kesari, S., et al., *Phase II study of temozolomide, thalidomide, and celecoxib for newly diagnosed glioblastoma in adults*. Neuro Oncol, 2008. **10**(3): p. 300-8.
 18. Brown, J.M., *The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy--eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award lecture*. Cancer Res, 1999. **59**(23): p. 5863-70.
 19. Schroder, M. and R.J. Kaufman, *The mammalian unfolded protein response*. Annu Rev Biochem, 2005. **74**: p. 739-89.
 20. Fels, D.R., et al., *Preferential cytotoxicity of bortezomib toward hypoxic tumor cells via overactivation of endoplasmic reticulum stress pathways*. Cancer Res, 2008. **68**(22): p. 9323-30.
 21. Eshleman, J.S., et al., *Inhibition of the mammalian target of rapamycin sensitizes U87 xenografts to fractionated radiation therapy*. Cancer Res, 2002. **62**(24): p. 7291-7.
 22. Petersen, C., et al., *Enhancement of intrinsic tumor cell radiosensitivity induced by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(6): p. 2513-20.
 23. Newcomb, E.W., et al., *The combination of ionizing radiation and*

- peripheral vaccination produces long-term survival of mice bearing established invasive GL261 gliomas.* Clin Cancer Res, 2006. **12**(15): p. 4730-7.
24. Van Meir, E.G., et al., *Analysis of the p53 gene and its expression in human glioblastoma cells.* Cancer Res, 1994. **54**(3): p. 649-52.
 25. Zhang, Z., et al., *Radiosensitization by antisense anti-MDM2 mixed-backbone oligonucleotide in in vitro and in vivo human cancer models.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(4): p. 1263-73.
 26. Blaszczyk-Thurin, M., I.O. Ertl, and H.C. Ertl, *An experimental vaccine expressing wild-type p53 induces protective immunity against glioblastoma cells with high levels of endogenous p53.* Scand J Immunol, 2002. **56**(4): p. 361-75.
 27. Franken, N.A., et al., *Clonogenic assay of cells in vitro.* Nat Protoc, 2006. **1**(5): p. 2315-9.
 28. Jensen, R.L., *Hypoxia in the tumorigenesis of gliomas and as a potential target for therapeutic measures.* Neurosurg Focus, 2006. **20**(4): p. E24.
 29. Sondergaard, K.L., et al., *Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in tumours of patients with glioblastoma.* Neuropathol Appl Neurobiol, 2002. **28**(3): p. 210-7.
 30. Rich, J.N., *Cancer stem cells in radiation resistance.* Cancer Res, 2007. **67**(19): p. 8980-4.
 31. Gilbert, M.R., et al., *A phase I factorial design study of dose-dense temozolomide alone and in combination with thalidomide, isotretinoin, and/or celecoxib as postchemoradiation adjuvant therapy for newly diagnosed glioblastoma.* Neuro Oncol, 2010. **12**(11): p. 1167-72.
 32. Kanzawa, T., et al., *Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide.* Cancer Res, 2003. **63**(9): p. 2103-8.
 33. Lee, J.J., et al., *Hypoxia activates the cyclooxygenase-2-prostaglandin E synthase axis.* Carcinogenesis, 2010. **31**(3): p. 427-34.
 34. Masferrer, J.L., et al., *Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors.* Cancer Res, 2000. **60**(5): p. 1306-11.
 35. Leahy, K.M., et al., *Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces*

- proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo*. Cancer Res, 2002. **62**(3): p. 625-31.
36. Kulp, S.K., et al., *3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1/Akt signaling represents a major cyclooxygenase-2-independent target for celecoxib in prostate cancer cells*. Cancer Res, 2004. **64**(4): p. 1444-51.
37. Tsutsumi, S., et al., *Endoplasmic reticulum stress response is involved in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis*. Cell Death Differ, 2004. **11**(9): p. 1009-16.
38. Hoyer-Hansen, M. and M. Jaattela, *Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium*. Cell Death Differ, 2007. **14**(9): p. 1576-82.
39. Zhang, B., et al., *ER stress induced by ionising radiation in IEC-6 cells*. Int J Radiat Biol, 2010. **86**(6): p. 429-35.
40. Berridge, M.J., *The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle*. Cell Calcium, 2002. **32**(5-6): p. 235-49.
41. He, L., et al., *ATM blocks tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress*. FEBS Lett, 2009. **583**(5): p. 903-8.
42. Pyrko, P., et al., *Calcium-activated endoplasmic reticulum stress as a major component of tumor cell death induced by 2,5-dimethyl-celecoxib, a non-coxib analogue of celecoxib*. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(4): p. 1262-75.
43. Johnson, A.J., et al., *The cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib perturbs intracellular calcium by inhibiting endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases: a plausible link with its anti-tumour effect and cardiovascular risks*. Biochem J, 2002. **366**(Pt 3): p. 831-7.
44. Penning, T.D., et al., *Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide (SC-58635, celecoxib)*. J Med Chem, 1997. **40**(9): p. 1347-65.
45. Tanaka, K., et al., *Involvement of intracellular Ca²⁺ levels in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis*. J Biol Chem, 2005. **280**(35): p. 31059-67.

46. Du, J., et al., *Role of Rac1-dependent NADPH oxidase in the growth of pancreatic cancer*. *Cancer Gene Ther*, 2011. **18**(2): p. 135-43.
47. Kaneko, S., M. Kaneko, and T. Fukushima, *Enhanced antitumor effect of lower-dose and longer-term CPT-11 treatment in combination with low-dose celecoxib against neuroblastoma xenografts*. *Int J Clin Oncol*, 2011.
48. Feng, Z., et al., *The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(23): p. 8204-9.
49. Crichton, D., et al., *DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis*. *Cell*, 2006. **126**(1): p. 121-34.
50. Chiu, H.W., et al., *Combination treatment with arsenic trioxide and irradiation enhances autophagic effects in U118-MG cells through increased mitotic arrest and regulation of PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways*. *Autophagy*, 2009. **5**(4): p. 472-83.
51. Emdad, L., et al., *Is there a common upstream link for autophagic and apoptotic cell death in human high-grade gliomas?* *Neuro Oncol*, 2011. **13**(7): p. 725-35.
52. Kang, K.B., et al., *Enhanced sensitivity of celecoxib in human glioblastoma cells: Induction of DNA damage leading to p53-dependent G1 cell cycle arrest and autophagy*. *Mol Cancer*, 2009. **8**: p. 66.
53. Moretti, L., et al., *Switch between apoptosis and autophagy: radiation-induced endoplasmic reticulum stress?* *Cell Cycle*, 2007. **6**(7): p. 793-8.
54. Mazure, N.M. and J. Pouyssegur, *Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival?* *Curr Opin Cell Biol*, 2010. **22**(2): p. 177-80.
55. Grosch, S., et al., *COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib*. *FASEB J*, 2001. **15**(14): p. 2742-4.
56. Chen, M., G.J. Gutierrez, and Z.A. Ronai, *Ubiquitin-recognition protein Ufd1 couples the endoplasmic reticulum (ER) stress response to cell cycle control*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(22): p. 9119-24.

57. McAdam, B.F., et al., *Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(1): p. 272-7.
58. Chen, K.H., et al., *Celecoxib enhances radiosensitivity in medulloblastoma-derived CD133-positive cells*. Childs Nerv Syst, 2010. **26**(11): p. 1605-12.
59. Blazek, E.R., J.L. Foutch, and G. Maki, *Daoy medulloblastoma cells that express CD133 are radioresistant relative to CD133- cells, and the CD133+ sector is enlarged by hypoxia*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007. **67**(1): p. 1-5.

謝辞

本研究を行うにあたり、御指導、御協力いただきました皆様に深く御礼を申し上げます。

人間総合科学研究科生命システム医学専攻 坪井康次教授

人間総合科学研究科疾患制御医学専攻 盛武敬先生

人間総合科学研究科疾患制御医学専攻（元） 金子節子先生

放射線生物学研究室の皆様

陽子線医学利用研究センターの皆様

家族の皆様