

## 分担研究報告書

### ダイオキシシが大腸上皮細胞に与える影響

研究分担者 江崎 幹宏 九州大学大学院病態機能内科学 講師  
研究協力者 東 晃一 九州大学大学院病態機能内科学

**研究要旨** ダイオキシシが大腸上皮細胞に与える影響を研究するために、ヒト結腸癌由来細胞株 HCT-116 ならびに MUTYH 関連ポリポーシスモデルを用いて大腸癌に対する化学予防効果を有する celecoxib と 2,5-dimethyl-celecoxib (DMC) の腫瘍抑制効果を検討した。両薬剤は Wnt/ $\beta$  カテニン系を介した細胞増殖抑制とアポトーシス亢進により腫瘍抑制効果を発揮した。さらには MUTYH 関連ポリポーシスモデルにおいて腫瘍数ならびに腫瘍径が抑制されることを確認した。今後は大腸炎症から腫瘍発生の過程におけるダイオキシシの関与を検討したい。

#### A. 研究目的

ダイオキシシが大腸癌発生のリスクか否かは未だ不明である。CA-AhR 受容体に影響を及ぼし、gain of function による腫瘍化の可能性が推測される。一方で、Wnt/ $\beta$  カテニンシグナル系に対して抑制的に作用し抗腫瘍効果を有する可能性もある。そこで、ダイオキシシが大腸上皮細胞に与える影響を検討するために、celecoxib および 2,5-dimethyl-celecoxib (DMC) を用いて *in vitro* ならびに *in vivo* における抗腫瘍効果を検討した。なお、DMC は celecoxib の抗腫瘍活性を探る過程で生成された COX-2 阻害活性を有さず抗腫瘍活性を示す構造類似体である。

#### B. 研究方法

ヒト結腸癌由来細胞株 HCT-116 を用いて、celecoxib と DMC の影響を検討した。検討方法として、細胞増殖数、Wnt/ $\beta$  カテニンシグナル伝達経路の主要な転写因子である TCF7L2 の発現に及ぼす効果、および同シグナル伝達系の標的遺伝子である c-myc と cyclin D1 発現に及ぼす効果を検討した。さらに、caspase-3 活性、

survivin 発現についても検討した。Tcaspase-3 活性は比色法により、その他の蛋白発現は western blotting を用いて測定した。

#### C. 研究結果

Celecoxib、DMC はそれぞれ 30  $\mu$ M、50  $\mu$ M、100  $\mu$ M の濃度で投薬し、24 時間後の細胞数を評価した。DMC では 30  $\mu$ M から、celecoxib は 50  $\mu$ M からコントロールに比べて有意な細胞数の低下を認めた。

次に、Wnt/ $\beta$  カテニンシグナル伝達経路に対する両薬剤の影響を検討するために、TCF7L2 発現を検討した。その結果、いずれの薬剤においても、濃度依存的かつ時間依存的に TCF-7L2 の蛋白発現を抑制したが、DMC の方が celecoxib より低濃度での作用発現を認めた。Wnt/ $\beta$  カテニンシグナル伝達経路の標的蛋白である cyclin D1 および c-Myc の発現は、celecoxib (100  $\mu$ M)、DMC (50  $\mu$ M) で有意な発現抑制を認めた。

一方、アポトーシス作用に対する celecoxib と DMC の影響を検討するために、caspase-3 活性および survivin の発現を検討した。その結果、両薬剤ともに

caspase-3 活性は上昇し、survivin 発現は低下していた。

次に、4 週齢の *Mutyh*<sup>-/-</sup>マウスに対し 0.2%臭酸化カリウム水を 12 週間飲水させ酸化ストレスを負荷し、腸管の腫瘍発生を促進させた後、対象群、celecoxib 投与群、DMC 投与群に振り分け、腫瘍発生数を計測した。その結果、celecoxib 群、DMC 群のいずれにおいても、腫瘍数 (>1mm)、腫瘍径ともに有意に抑制されていた。

#### D. 考察

本研究では、最初に大腸癌由来の培養細胞を用いて、COX-2 選択的阻害剤である celecoxib と COX-2 阻害活性を有しない構造類似体である DMC の抗腫瘍効果を検討した。その結果、celecoxib と DMC はいずれも細胞増殖活性を抑制かつアポトーシス作用を増強させることにより、ヒト結腸癌由来細胞株 HCT-116 の増殖を抑制することが確認できた。すなわち、DMC は COX-2 阻害活性を有しないことから、非ステロイド性消炎鎮痛薬の抗腫瘍効果はプロスタグランジン非依存性に発現する可能性が示唆された。

次に、*Mutyh*<sup>-/-</sup>マウスを用いて celecoxib および DMC を 4 週間経口投与させたところ、いずれの薬剤においても腫瘍数、腫瘍径が対照群に比べて抑制されることが確認されたことから、培養系実験で確認された両薬剤の抗腫瘍効果は生体内でも認められることが確認できた。

以上のように、モデルマウスを用いた実験でも培養系実験と同様の結果を得られたことから、これら一連の実験系はダイオキシシンによる大腸上皮細胞への影響を検討し得る実験系であることが示唆された。

一方で、ダイオキシシンは大腸癌のみならず再燃・寛解を繰り返す原因不明の難治性炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎との関連についてもその関連が示唆されて

いる。さらに、潰瘍性大腸炎は長期経過例では高率に大腸癌合併頻度が増大することが知られている。今後は大腸炎から腫瘍発生過程において、ダイオキシシンを用いた検討を行っていきたい。

#### E. 結論

HCT-116 の細胞培養系ならびに *Mutyh*<sup>-/-</sup>マウスを用いることで、ダイオキシシンが腫瘍細胞に与える影響を検討することが可能と思われた。

#### F. 健康危険情報

現時点ではない。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

なし。

##### 2. 実用新案登録

なし。