

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月24日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590079

研究課題名（和文）シクロオキシゲナーゼ阻害非依存的なインドメタシンの新たな作用機序の解明

研究課題名（英文）Exploring the novel cyclooxygenase-inhibition-independent effects of indomethacin

研究代表者

藤野 裕道（FUJINO HIROMICHI）

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：40401004

研究成果の概要（和文）：本研究はインドメタシンのシクロオキシゲナーゼ阻害非依存的な作用としてのアラキドン酸の細胞への取り込み抑制機構の解明を目的としてスタートした。本研究において、ヒト結腸癌細胞におけるアラキドン酸取り込み抑制機構メカニズム、ヒト EP2 受容体のアンタゴニスト様作用の存在を明らかとした。さらに、ヒト肺癌細胞株では上皮-間葉転換を誘発することを明らかとした。またマウス脂肪細胞株ではトリグリセリドの合成を抑える可能性を示唆した。さらにインドメタシン類似インドール新規化合物による癌細胞への作用の検討を開始したことから、本研究により得られた知見はさらに発展させて行けると考えている。

研究成果の概要（英文）：This project had started to elucidate the mechanisms of the inhibitory effects of indomethacin on arachidonic acid uptake. In this project, we have elucidated the detailed mechanisms of the uptake of arachidonic acid as well as the antagonistic effect on human EP2 receptors by indomethacin treatments in human colon cancer cells. Additionally, we have shown that indomethacin can induce epithelial-mesenchymal transition in human lung cancer cells. Moreover, we have indicated that indomethacin could reduce the newly synthesis of the triglyceride in mouse adipocyte. Since we have already started to investigate the effects of newly synthesized indole-compounds on cancer cells, we believe that the findings we have obtained through the project can be applied to the future project for finding novel drugs for cancer therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：薬理学・細胞情報伝達学

1. 研究開始当初の背景
結腸癌と直腸癌を含む大腸癌は、世界的に年間100万を超える新規患者が報告されており、悪性腫瘍の代表の一つと考えられている。この

大腸癌と脂質摂取量には密接な関係があることが強く示唆されている。つまり、肥満、野菜や果物の摂取不足などが、遺伝性以外の大腸癌の50%～80%を占める重要な要因と考えられ

ている。食生活の改善に加え、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) の使用により潰瘍性大腸炎が改善される事が報告されているため (N. Engl. J. Med. (1991) **325**:1593)、NSAID は大腸癌の予防薬として広く使用されている。

NSAID の主な作用機序として、シクロオキシゲナーゼ (COX) の活性抑制が考えられているが、我々は以前に、良く知られた NSAID であるインドメタシンには、COX の活性阻害による直接的な炎症メディエーターであるプロスタグランジン産生抑制作用の他に、その前駆体であるアラキドン酸の細胞内取り込み阻害作用が存在し、これにより間接的なプロスタグランジン類の産生抑制を通して、大腸癌の発生リスクの軽減、さらには癌罹患への抑制へと作用していることを示唆した。

肥満の子供の細胞膜には、アラキドン酸などの多価不飽和脂肪酸が過剰に存在している事が報告されており (Lipids (1996) **31**:305)、この過剰なアラキドン酸が、結腸癌罹患のリスクを高めるだけでなく、メタボリックシンドロームの病態悪化をも引き起こすと考えられている。またアラキドン酸を含む多価不飽和脂肪酸は、その不飽和結合のため活性酸素により酸化されやすく、その酸化ストレスにより炎症を促進することが知られている。肥満の組織細胞では、この酸化ストレスが亢進しているだけでなく、慢性的な炎症反応も亢進している事から、炎症や酸化ストレスが、癌やメタボリックシンドロームの病態形成に深く関与している事が提唱されている。そのため、インドメタシンによるアラキドン酸取り込み抑制機構の解明は、癌のみならず、COX 阻害を介した血栓形成阻害作用とは別の、肥満を始めとするメタボリックシンドロームの改善にも有益であると考え本研究をスタートさせた。

2. 研究の目的

NSAID などの COX 阻害薬は、大腸癌の予防・改善薬として広く使用されている。NSAID としてのインドメタシンは COX 阻害作用により抗炎症作用を示す一方、重大な副作用として出血を伴う大腸炎や穿孔なども報告されている (Ann. Pharmacother. (1994) **7-8**:883)。この副作用の発現機序として、大腸粘膜のプロスタグランジン合成抑制の可能性が考えられているが、その原因は不明である。アラキドン酸は細胞膜を構成しているリン脂質構造の一部であるため、アラキドン酸などの脂肪酸取り込み阻害作用による細胞膜の主要構成要素の減少といった物理的な細胞膜の脆弱化が、出血などの原因であることも考えられる。インドメタシンによるアラキドン酸取り込み抑制機構などを解明する事で、その重大な副作用を主作用へと変えうる新たなドラッグデザインのヒントになる事が期待出来る。すなわちアラキドン酸などの細胞内取り込み抑制機構の解明が進めば、癌予防のみならず、肥満、心疾患、脳梗塞などのメタボリックシンドロームの予防にも役立つことが予想され、高齢化する日本人の死因の2/3が関わる疾患の解明につながるかもしれないと我々は考えて本研究をスタートさせた。

3. 研究の方法

インドメタシンによる COX 阻害作用非依存的なアラキドン酸の取り込み抑制機構を解明するに

あたり、誘導型 COX である COX-2 の発現およびプロスタグランジン E₂ (PGE₂) 産生が極めて低いことが報告されているヒト結腸癌細胞株 LS174T を使用した。予備実験の結果から、この LS174T 細胞はインドメタシンによりアラキドン酸取り込みが抑制される事が見いだされた。そこで以下の3つの目標を立て、研究を進めた。

(1) アラキドン酸取り込み機構、およびインドメタシンによる抑制メカニズムの解明

ウエスタンブロット法による予備実験として、LS174T 細胞にインドメタシンを16時間処理したところ、核内受容体ペルオキシゾーム増殖剤活性化型受容体 (PPAR) γ の発現量は、インドメタシン濃度依存的に減少していることが示された。そのため、PPAR 自身や、PPAR により制御されている遺伝子が、本当にインドメタシン処置により影響を受けるかどうかなどを解析した。さらにアラキドン酸取り込みにおいて、PPAR γ により制御されている可能性の最も高い因子として、fatty acid translocase (FAT) などが考えられた。それらの分子のインドメタシン処置による発現量の変化、活性化の変化あるいは作用のカスケード、またそのタイミングなどについて、RT-PCR 法やウエスタンブロットなどを用いて解析した。

(2) アラキドン酸などの脂肪酸取り込み機構、および抑制メカニズムの特異性の解明

①細胞への取り込みが阻害されるのは、n-6 系のアラキドン酸に特有の現象なのか?

PGE₂ は、COX-2 によりアラキドン酸を基質として産生されるためアラキドン酸の細胞内取り込みが抑制されれば、基質の減少に伴い代謝産物である PGE₂ の産生も抑制されることが考えられた。そこでインドメタシンによる細胞内取り込み阻害が、アラキドン酸特異的であるかどうかを検討するため、ステアリン酸などの飽和脂肪酸、 α -リノレン酸などの n-3 系多価不飽和脂肪酸、アラキドン酸以外のリノール酸などの n-6 系多価不飽和脂肪酸の細胞内取り込みについて、アイソトープ標識されたアラキドン酸との競合実験などから解析した。

②この作用は、NSAID の中でインドメタシンに特異的なものか?

また結腸癌細胞のアラキドン酸取り込み抑制が、インドメタシンに特異的な作用かどうかを、アスピリンやスリダックなど、他の一般的な NSAID を用いて検討した。

③取り込み阻害される癌細胞は、結腸癌細胞に特有の現象なのか?

NSAID の症例対照研究によると、大腸癌や胃癌、食道癌の発癌リスクは減少するが、膀胱癌や乳癌、肺癌に対しては効果が見られず、膵臓癌や前立腺癌へのリスクはむしろ高まる事が報告されている (BMJ (2000) **320**:1642)。我々は少なくとも2つのヒト結腸癌細胞株、HCA-7 細胞、LS174T 細胞で、インドメタシンによるアラキドン酸取り込み阻害効果を確認している。しかしながら、その結腸癌細胞での効果が、他の癌細胞や癌細胞以外の細胞でも引き起こされるかどうかは明らかではなかった事から、ヒト肺癌細胞株 A549 細胞などにおいても、同様にインドメタシンによる COX 阻害非依存的効果が存在する

かどうかを解析した。

(3) メタボリックシンドロームとの関連性の解明

アラキドン酸を含む多価不飽和脂肪酸は、その不飽和結合のため活性酸素により酸化されやすく、その酸化ストレスにより炎症を促進することが知られている (Toxicology (2009) 262:199)。この酸化ストレスはアラキドン酸から8-イソプロスタグランジン $F_2\alpha$ などが合成され、それが動脈硬化や心疾患あるいは糖尿病の増悪に関与していることも報告されている (Cardiovasc. Res. (2000) 47:475)。メタボリックシンドロームは、これらの要因が重複することにより引き起こされると考えられているためインドメタシンによりアラキドン酸の取り込みを抑制できれば、酸化ストレスの発生を押さえるだけではなく、メタボリックシンドロームの軽減が期待出来ることが考えられる。そこで、マウス脂肪細胞株 3T3-L1 などを用いたアラキドン酸の取り込みが、癌細胞同様インドメタシンにより抑制されるかどうかを検討した。

以上の様に、インドメタシンなどの NSAID の新たな作用機序を解明する事で、それらをリードドラッグとする COX 阻害作用以外の作用を主作用としたドラッグデザインの開発に繋げて行きたいと考えた。

4. 研究成果

(1) アラキドン酸取り込み機構、およびインドメタシンによる抑制メカニズムの解明

我々は以前、ヒト結腸癌細胞株 HCA-7 細胞において、インドメタシン処理により、アラキドン酸の細胞内取り込みが、濃度依存的に減少することを見いだした (J. Pharmacol. Sci. (2008) 108:389)。また、ヒト結腸癌細胞株 LS174T 細胞において、インドメタシン処理により EP2 受容体が、濃度依存的に発現減少している事も明らかにした (Biochem. Biophys. Res. Commun. (2007) 359:568)。LS174T 細胞の COX-2 発現および PGE₂ 産生は極めて低い事から (J. Biol. Chem. (2000) 275:33952)、インドメタシンの作用は COX-2 阻害非依存的である可能性が考えられた。インドメタシンは NSAID としての作用の他に、PPAR γ へも作用することが知られている。そこでウエスタンブロット法による予備実験として、LS174T 細胞にインドメタシンを16時間処理し、PPAR γ 発現量を検出したところ、インドメタシンの濃度依存的に、その発現が減少していることが示された。PPAR γ は核内受容体転写因子であることから、PPAR γ により制御されている遺伝子が、インドメタシン処置により影響を受けるかどうかを次に解析した。その結果、インドメタシン (ind) 処理により、脂肪酸取り込みに関与する因子である FAT/CD36 発現が減少していることが明らかとなった (Figure 1) (Arch. Biochem. Biophys. (2010) 494:78)。この時、FAT/CD36 の発現を調節している PPAR γ の発現も減少していることも確認した (Figure 1)。興味深い事に、これら FAT/CD36 や PPAR γ の発現量は、アスピリン (asp) やジクロフェナク (dic)、あるいはスリダク (sul) 処理では変化は無かった (Figure 1)。

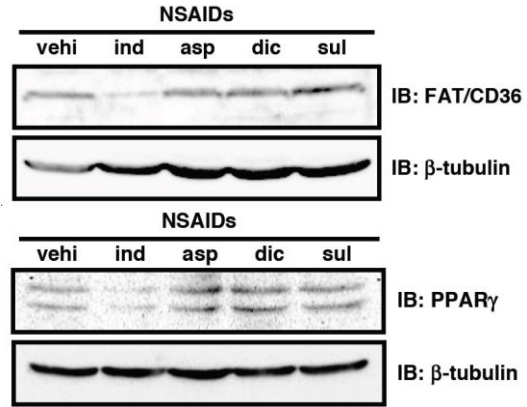


Figure 1. Effects of NSAIDs on FAT/CD36 or PPAR γ expressions

Arch Biochem Biophys (2010) 494:78.を改変

(2) アラキドン酸などの脂肪酸取り込み機構、および抑制メカニズムの特異性の解明

①細胞への取り込みが阻害されるのは、n-6 系のアラキドン酸に特有の現象なのか？

インドメタシンによる細胞内取り込みが阻害されるのは、アラキドン酸特異的であるかどうかを検討するため、ステアリン酸などの飽和脂肪酸、 α -リノレン酸などの n-3 系多価不飽和脂肪酸、アラキドン酸以外のリノール酸などの n-6 系多価不飽和脂肪酸の細胞内取り込みについて、アイソトープ標識されたアラキドン酸との競合実験などから解析した。その結果、LS174T 細胞におけるインドメタシンによる放射標識されたアラキドン酸の取り込みは、飽和長鎖脂肪酸であるステアリン酸を濃度依存的に処理しても変化しなかった (Figure 2)。

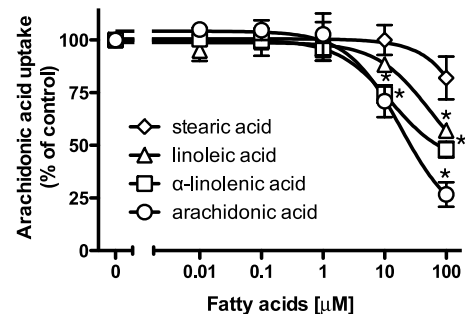


Figure 2. Effects of fatty acids on arachidonic acid uptake *p<0.05 ANOVA

Arch Biochem Biophys (2010) 494:78.を改変

また、2つの二重結合を持つ n-6 系長鎖不飽和脂肪酸であるリノール酸や、3つの二重結合を持つ n-3 系長鎖不飽和脂肪酸である α -リノレン酸では弱い取り込み競合作用が見られたこと、非標識アラキドン酸との取り込み競合作用が最も強かったことから (Figure 2)、ある程度アラキドン酸に選択的な取り込み機構が存在することが示唆された (Arch. Biochem. Biophys (2010) 494:78)。

②この作用は、NSAID の中でインドメタシンに特異的なのか？

LS174T 細胞のアラキドン酸取り込み抑制が、インドメタシンに特異的な作用かどうかを検討した。アラキドン酸の取り込みは、インドメタシンの濃度依存的に減少するが、興味深いことに、このアラキドン酸の取り込み抑制作用は、ジクロフェナク、アスピリン、あるいはスリンダクでは見られなかった (Figure 3)。またこのインドメタシンによるアラキドン酸取り込み抑制作用は、PGE₂ で処理しても変化しなかったことから、COX 阻害作用とは別の作用であることが示唆された (Arch Biochem Biophys (2010) 494:78)。

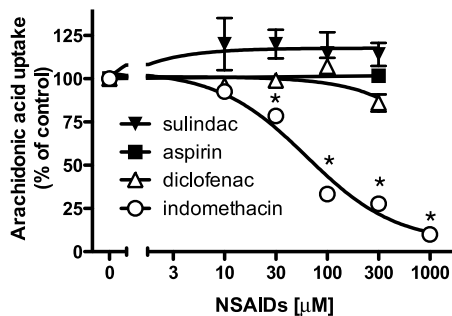


Figure 3. Effects of NSAIDs on arachidonic acid uptake *p<0.05 ANOVA

Arch Biochem Biophys (2010) 494:78.を改変

以上の結果から、アラキドン酸は、PGE₂ を含む炎症性メディエーターであるエイコサノイドの主要な基質であることから、COX 阻害作用に加えて、COX 阻害非依存的な作用機序による新たな抗炎症・抗癌作用を、ヒト結腸癌細胞においてインドメタシンは有している可能性が示唆された。

③取り込み阻害される癌/細胞は、結腸癌細胞に特有の現象なのか？

我々は少なくとも2つのヒト結腸癌細胞株、HCA-7 細胞、LS174T 細胞で、インドメタシンによる COX 阻害非依存的効果を確認している。しかしながら、その効果が、他の癌細胞などでも引き起こされるかどうかは明らかではなかった事から、ヒト肺癌細胞株 A549 細胞におけるインドメタシンによる COX 阻害非依存的な作用を探究・解析した。その結果、ヒト肺癌細胞株 A549 細胞においては、インドメタシンは、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ /matrix metalloproteinase-9 を介した上皮-間葉転換 (EMT) を誘発することを明らかにした (Figure 4)。興味深い事に A549 肺癌細胞は、EMT を介した癌の転移による悪性化を、インドメタシンが誘発する可能性を示唆する結果となった (Biochem. Pharmacol. (2011) 82:1781)。

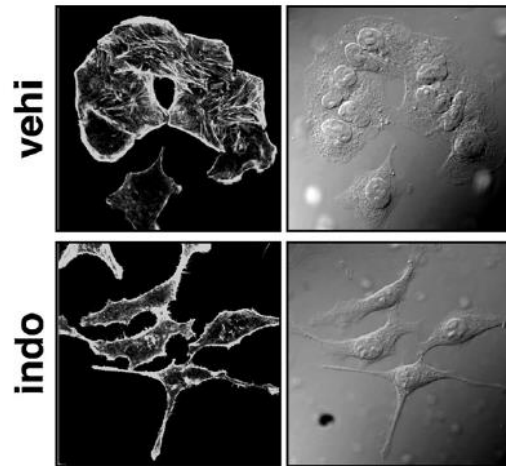


Figure 4. Effects of indomethacin on the formation of actin stress fibers and cellular morphology in A549 lung cancer cells

Biochem Pharmacol (2011) 82:1781.を改変

さらにインドメタシンの新たな COX 阻害非依存的な作用として PGE₂ 受容体サブタイプの一つであるヒト EP2 受容体のアンタゴニスト様の作用の存在も明らかとした (Eur. J. Pharmacol (2012) 680:16)。すなわち LS174T 細胞において、インドメタシンを PGE₂ と同時に作用させる事で、刺激後少なくとも5分以内から PGE₂ 刺激による cyclic AMP 抑制、および [³H]PGE₂ の LS174T 細胞上への競合的受容体結合抑制が引き起こされる事も明らかとした (Figure 5)。

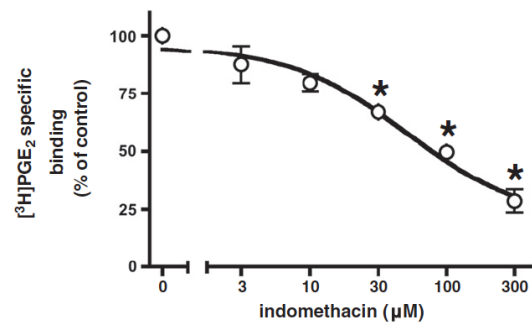


Figure 5. Effect of indomethacin on specific whole cell binding of [³H]PGE₂ *p<0.05 ANOVA

Eur J Pharmacol (2012) 680:16.を改変

(3) メタボリックシンドロームとの関連性の解明

アラキドン酸取り込み抑制とメタボリックシンドローム軽減との関連性について、マウス脂肪細胞株 3T3-L1 を用いて検討した。その結果、インドメタシン処理によるアラキドン酸などの取り込みは、分化前には抑制されたが、分化後には逆に促進される事が明らかとなった。インドメタシン刺激により 3T3-L1 細胞は形態を変化させ、インスリン処理同様の形態分化を見せたが、トリグリセリドを染色する Oil Red O を用いた結果より、その合成はインスリン処理に比

べ著しく低い可能性が示唆された (Figure 6)。

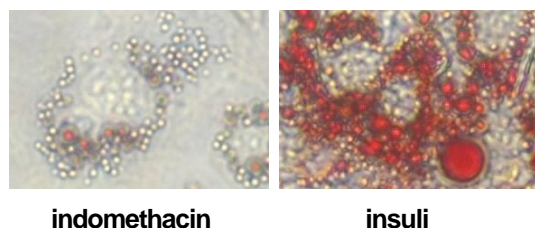


Figure 6. Effects of indomethacin or insulin on lipid droplets in 3T3-L1 cells

このことからインドメタシンにより分化した細胞が、トリグリセリドの前段階であるジアシルグリセロールが蓄積していることが考えられる。ジアシルグリセロールはインスリン感受性を亢進させる2-アラキドノイルグリセロール(2-AG)の前駆体であるため、インドメタシンによる分化後の細胞の脂肪酸取り込みが促進されている可能性が考えられる。すなわちインドメタシンにより分化した細胞で脂肪酸取り込みが促進されれば、血中の脂肪酸濃度が低下し、最終的にメタボリックシンドロームに対して抑制的に働く可能性が示された。

今後はインドメタシン処理により 2-AG によるインスリン感受性が亢進しているのかなどを検討して行きたいと考えている。さらにインドメタシン類似インドール新規化合物による癌細胞への作用の検討を開始したことから、本研究により得られた知見を、今後さらに発展させ、例えばインドメタシンをリードドラッグとする COX 阻害作用以外の作用を主作用としたドラッグデザインの開発に繋げて行けるのではないかと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計13件)

①Arachidonic acid metabolism via cytosolic phospholipase $A_2\alpha$ induces cytotoxicity in niemann-pick disease type C cells. Nakamura H, Yasufuku K, Makiyama T, Matsumoto I, Fujino H, Murayama T. *J Cell Physiol.* 査読有 **227** (2012) 2847-2855. DOI: 10.1002/jcp.23025.

②Indomethacin antagonizes EP2 prostanoid receptor activation in LS174T human colon cancer cells. Ikawa Y, Fujino H, Otake S, Murayama T. *Eur J Pharmacol.* 査読有 **680** (2012) 16-21. DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.01.033

③ Indomethacin induces cellular morphological change and migration via epithelial-mesenchymal transition in A549 human lung cancer cells: a novel cyclooxygenase-inhibition-independent effect. Kato T, Fujino H, Oyama S, Kawashima T, Murayama T. *Biochem Pharmacol.* 査読有 **82** (2011) 1781-1791. DOI:

10.1016/j.bcp.2011.07.096.

④インドメタシンの新たな抗がん機構の解明: シクロオキシゲナーゼ阻害非依存的作用の探求. 藤野 裕道, 村山俊彦. *日薬理誌.* 査読無 **137** (2011) 177-181. DOI: 10.1254/fpj.137.177.

⑤ Prostaglandin E_2 regulates cellular migration via induction of vascular endothelial growth factor receptor-1 in HCA-7 human colon cancer cells. Fujino H, Toyomura K, Chen XB, Regan JW, Murayama T. *Biochem Pharmacol.* 査読有 **81** (2011) 379-387. DOI: 10.1016/j.bcp.2010.11.001.

⑥Decrease in uptake of arachidonic acid by indomethacin in LS174T human colon cancer cells: a novel cyclooxygenase-2-inhibition-independent effect. Orido T, Fujino H, Kawashima T, Murayama T. *Arch Biochem Biophys.* 査読有 **494** (2010) 78-85. DOI: 10.1016/j.abb.2009.11.025.

[学会発表] (計24件)

①藤野裕道, 吉田憲司, 大竹翔, 清良尚史, Regan JW, 村山俊彦. ヒト結腸癌 HCA-7 細胞において EP4 受容体は $G\alpha_i$ タンパク質を介して cyclooxygenase-2 発現を亢進する. 日本薬学会第133年会 2013年3月27日~30日 パシフィコ横浜 (横浜).

②大竹翔, 藤野裕道, 吉田憲司, Regan JW, 村山俊彦. ヒト結腸癌 HCA-7 細胞における低酸素誘導因子-1 α の役割の検討. 第86回日本薬理学会年会 2013年3月21日~23日 福岡国際会議場 (福岡).

③大山聡美, 藤野裕道, 阿波田篤子, 荒井孝義, 村山俊彦. 新規インドール化合物 AWT-489 の DP プロスタノイド受容体アンタゴニスト作用. 第86回日本薬理学会年会 2013年3月21日~23日 福岡国際会議場 (福岡).

④藤野裕道, 加藤知子, 大山聡美, 川島辰男, 村山俊彦. ヒト肺癌 A549 細胞株においてインドメタシンは上皮間葉転換を誘導し細胞形態変化および細胞移動を引き起こす. 日本薬学会第132年会 2012年3月28日~31日 北海道大学 (札幌)

⑤井川裕太, 藤野裕道, 村山俊彦. インドメタシンによるシクロオキシゲナーゼ阻害非依存的なプロスタグランジン E_2 刺激由来 cAMP 産生抑制作用メカニズムの解明. 第85回日本薬理学会年会 2012年3月14日~16日 国立京都国際会館 (京都).

⑥藤野裕道, 豊村香織, Chen X, Regan JW, 村山俊彦. ヒト結腸癌 HCA-7 細胞においてプロスタグランジン E_2 は I 型血管内皮細胞増殖因子受容体発現を亢進することで細胞遊走を引き起こす. 日本薬学会第131年会 2011年3月28日~31日 ツインメッセ静岡 (静岡).

⑦藤野裕道, 織戸貴史, 中村浩之, 川島辰男, 村山俊彦. インドメタシンの新たな抗癌機構の解明: シクロオキシゲナーゼ阻害非依存的な作用

の探究. 第9回生命科学研究会 2010年6月25日～26日 オークラホテルフロンティアつくば (筑波).

〔図書〕 (計1件)

① Assessment of constitutive activity in E-type prostanoid receptors. Fujino H, Murayama T, Regan JW. Elsevier Inc. Methods Enzymol. Vol. **484** (2010) 95-107. DOI: 10.1016/B978-0-12-381298-8.00005-8.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤野 裕道 (FUJINO HIROMICHI)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：40401004

(2) 連携研究者

村山 俊彦 (MURAYAMA TOSHIHIKO)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：90174317