

氏名	しげおか やすし 重岡 靖
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	乙第203号
学位授与年月日	平成16年 9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Sulindac sulfide and caffeic acid phenethyl ester suppress the motility of lung adenocarcinoma cells promoted by transforming growth factor- $\beta$ through Akt inhibition (Sulindac sulfide と caffeic acid phenethyl ester は、Akt の阻害を介して transforming growth factor- $\beta$ により亢進した肺腺癌細胞の運動能を抑制する)
学位論文審査委員	(主査) 應儀成二 (副査) 岸本拓治 清水英治

## 学位論文の内容の要旨

肺癌は浸潤・転移する傾向の強い悪性腫瘍であるが、浸潤・転移において癌細胞が十分な運動能を有することが必須である。また、TGF- $\beta$  は癌細胞の運動能を高めて、浸潤・転移能を促進すると報告されている。従って、癌細胞の運動能を抑制することは、癌患者の予後を改善する可能性がある。癌の化学予防は最近注目されているが、sulindac sulfide、caffeic acid phenethyl ester (CAPE)、curcumin、(+)-catechin も期待される薬剤である。本研究では、TGF- $\beta$  処理による肺腺癌細胞の運動能増強に対する、これら化学予防薬の効果と作用機序についての検討を行った。

## 方法

Cytotoxicity assay: sulindac sulfide, CAPE, curcumin, (+)-catechin および phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) の特異的阻害剤である LY294002 で、肺腺癌細胞株 A549 を 3%FBS の条件下で 48 時間処理し、トリパンブルー法により細胞の生存率を決定した。Motility assay: 各種薬剤および TGF- $\beta$  (1 ng/ml) で A549 細胞を 48 時間処理し、運動能の変化を金コロイド法で評価した。Western blot analysis: TGF- $\beta$  による A549 細胞の Akt リン酸化亢進に対する、これら薬剤の効果 Western blot 法で検討した。

## 結 果

0.01-10 ng/ml、48時間のTGF- $\beta$ 処理によりA549細胞の運動能は亢進したが、TGF- $\beta$ の濃度が1 ng/mlで運動能増強効果は最大となり、無処理の場合と比較して3.5倍に達した。sulindac sulfide 50 $\mu$ M、CAPE 20 $\mu$ M、curcumin 10 $\mu$ M、(+)-catechin 1000 $\mu$ Mでは、A549細胞は95%以上生存した。TGF- $\beta$ によるA549細胞の運動能増強は、細胞障害を示さない濃度ではsulindac sulfide、CAPE、curcuminにおいて濃度依存的に抑制されたが、(+)-catechinでは抑制効果は観察されなかった。またA549細胞のAktリン酸化は、TGF- $\beta$ 処理後2~4時間で最も亢進したが、LY294002は細胞障害を示さない25 $\mu$ M以下で濃度依存的にA549細胞の運動能を抑制し、TGF- $\beta$ によるAktリン酸化は25 $\mu$ MのLY294002により抑制された。さらに、sulindac sulfideとCAPEは、細胞障害を示さない濃度で、TGF- $\beta$ によるA549細胞のAktリン酸化増強を濃度依存的に抑制した。

## 考 察

本研究において、化学予防薬がTGF- $\beta$ により増強された肺癌細胞の運動能を抑制すること、この抑制効果にPI3K/Akt経路が関与することが明らかとなった。即ち、sulindac sulfide、CAPE、curcuminは、肺癌細胞の運動能を抑制し、sulindac sulfideとCAPEはTGF- $\beta$ によるAktの活性化を、PI3K/Akt経路の特異的阻害剤であるLY294002と同程度に抑制した。

TGF- $\beta$ は生体における癌の浸潤・転移を促進させ、*in vitro*で癌細胞の運動能を亢進させると報告されているが、今回、A549細胞でも同様の効果が確認された。しかし、TGF- $\beta$ による運動能亢進の分子生物学的メカニズムは、まだ十分に解明されていない。Aktは細胞分化やアポトーシスに深く関与するシグナル伝達因子であるが、細胞の運動能への関与も報告されている。本研究において、A549細胞におけるAktの活性化がTGF- $\beta$ 処理後に観察され、TGF- $\beta$ によるAkt活性化と運動能亢進はLY294002により抑制された。すなわち、Aktの活性化はA549細胞の運動能を促進することが明らかとなった。

本研究で初めて得られた知見は、sulindac sulfideとCAPEがAktリン酸化の抑制を介して、肺癌細胞のTGF- $\beta$ による運動能亢進を抑制したことである。一方、curcuminでは運動能抑制効果を示したが、Aktリン酸化の抑制効果は観察されず、他の作用機序が運動能抑制に関与することが推測された。

## 結 論

TGF- $\beta$ 抑制や、LY294002を使用してPI3K/Akt経路を抑制することが、癌の遠隔転移を抑制すると考えられ、sulindac sulfideとCAPEを、癌の化学予防だけでなく、治療すなわち転移抑制に利用できる可能性が示された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は化学予防薬である sulindac sulfide と caffeic acid phenethyl ester が、TGF- $\beta$  によって増強された肺癌細胞の運動能に対して抑制効果を発揮すること、この効果が Akt のリン酸化抑制という形で PI3K/Akt 経路に関与することを証明した。本論文の内容は、これらの薬剤が癌の化学予防だけでなく、治療すなわち転移抑制に利用できる可能性を示唆するものであり、明らかに学術水準を高めたものと認める。