

Roles of cyclooxygenase for the expression on matrix metalloproteinase-9 in phorbol ester-treated human breast cancer Hs578T cells

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7641

ヒト乳癌細胞株Hs578Tのマトリックスメタロプロテアーゼ-9 発現誘導におけるシクロオキシゲナーゼの役割

金沢大学大学院医学系研究科がん局所制御学講座
(旧講座名：第二外科)
(主任代行：太田哲生助教授)

河 原 太

非ステロイド性消炎鎮痛薬が乳癌の進展や転移のリスクを軽減するという報告がある。シクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase, COX) はアラキドン酸からプロスタグランジンやトロンボキサンを合成する酵素であり、アスピリンやインドメサシンなどの非ステロイド性消炎鎮痛薬はこの反応を阻害する。この酵素には、COX-1とCOX-2の2つのアイソフォームが知られている。COX-1は胃や腎臓などにおいて常時発現している酵素であり、細胞の恒常性を維持している。一方、COX-2は炎症や腫瘍などの病的部位にて誘導される酵素で、これらの病態に関与している。今回の実験の目的は、乳癌の浸潤と転移におけるCOXの関与を解明することにある。ヒト乳癌細胞株MCF-7とHs578TはCOX活性を示さないが、Hs578T細胞を1 μ Mホルボルミリスレートアセテートで24時間処理したところCOXの誘導を認め、その活性は1.96 nmol/10 min/mg 蛋白まで増大した。ノーザンブロットングおよびウエスタンブロットングにて調べたところ、Hs578Tに誘導されたのはCOX-2であった。一方、MCF-7細胞ではCOXの誘導は認められなかった。癌の浸潤能や転移能の指標としてマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase, MMP) -9がある。ホルボルミリスレートアセテートで処理したHs578T細胞は、MMP-9の増強を示し、これはCOX阻害剤のインドメサシンによって濃度依存的に抑制された。この結果はHs578T細胞において、COX-2がMMP-9の発現において重要な役割をもつことを示唆するものである。

Key words cyclooxygenase, breast cancer cells, Hs578T, matrix metalloproteinase, indomethacin

シクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase, COX) はアラキドン酸からさまざまなプロスタグランジン (prostaglandin, PG) が合成される経路の律速酵素である。この酵素はアラキドン酸に2分子の酸素を添加してPGG₂を合成するとともに、PGG₂をPGH₂に変換するペルオキシダーゼ活性も持っている。この酵素には2つのアイソフォームが知られている。COX-1は、さまざまな組織で常時発現している酵素である。一方COX-2は、炎症部位にてサイトカイン、成長因子や腫瘍プロモーターにより誘導される酵素である^{1) 2)}。アスピリン常用者において大腸癌による死亡率が低下するとの報告³⁾以来、各臓器癌のCOX-2の発現や非ステロイド性消炎鎮痛剤 (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) による発癌予防との関連が注目されている。すなわち、大腸癌や肺癌などの腫瘍組織ではCOX-2の発現が増加している^{4) 11)}とする報告や、COX-1も同時に増加しているという報告もある^{12) 13)}。大腸癌とCOXとの関連については多くの報告があるが、他の悪性腫瘍とのかかわりについては十分に解明されていない^{14) 17)}。

高脂肪食が乳癌発症のリスクを増加させることが示されている^{18) 19)}。また、アラキドン酸などの不飽和脂肪酸を基質とするCOXの阻害剤であるNSAIDsが乳癌のリスクを低減させる^{20) 21)}

という報告は、乳癌の発症にCOXが関与することを示唆している。実際に、ヒト乳癌組織においてCOX-1²²⁾およびCOX-2²³⁾の活性が上昇しているという報告がある。さらには、高率で転移をきたす乳癌細胞には、転移をきたさないものに比べ、多くのPG生成物が観察されている^{22) 23)}。しかしながら、COXの2つのアイソフォームが乳癌の進展と転移にどのようにかかわっているのかはよく分かっていない。

乳癌をはじめ悪性腫瘍の特徴として、その異常な増殖能と浸潤転移能が挙げられる。不良な予後は、この浸潤転移能によりもたらされる事が多く、その評価は予後予測に有効なものと思われる。癌発生の母地となる上皮細胞は、カドヘリン等の接着因子によりシート状構造を保っている。細胞の癌化によって接着因子の発現が低下し、癌細胞はその腫瘍塊から離脱しやすくなる。離脱した癌細胞は、細胞外マトリックスを破壊し、周辺正常組織に浸潤する。さらに、血管やリンパ管を介して遠隔組織へ転移し、標的臓器の基底膜を破壊して侵入する。この基底膜を構成する主要骨格はIV型コラーゲンであり、このIV型コラーゲンを分解する酵素としてマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase, MMP) 2および9が知られている^{24) 25)}。近年、COXを過剰発現したヒト大腸癌細胞株などにおいて

平成17年11月1日受付, 平成17年11月28日受理

Abbreviations : COX, cyclooxygenase; IM, indomethacin; IMDM, Iscove's Modified Dulbecco's Medium; MMP, matrix metalloproteinase; NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs; PG, prostaglandin; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate

MMPが誘導されるとの報告がある^{26) 27)}. そこで本研究では、乳癌細胞においてCOXが転移能にどのように関わっているかを調べるために、ヒト乳癌細胞株をホルボールミリステートアセテート (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) 下に培養し、COXおよびMMPの活性の変化および阻害剤の効果について検討した.

材料および方法

I. 材料

ヒト乳癌細胞株MCF-7およびHs578Tは、金沢大学がん研究所佐々木琢磨教授より分与された. 抗COX-1モノクローナル抗体hPES01は徳島大学医学部山本尚三教授より供与されたものを使用した. COX-2ポリクローナル抗体とPGはCayman Chemical (Ann Arbor, USA) より, [1-¹⁴C]アラキドン酸 (2.1 GBq/mmol), [α-³²P]dCTP (111 TBq/mmol), メガプライムDNA標識キット, ハイボンドN+ナイロンメンブラン, ELCウエスタンプロット検出液はAmersham (Little Chalfont, UK) より, QuikHybハイブリダイゼーション液はStratagene社 (La Jolla, USA) より, βアクチンcDNAプローブは和光 (大阪) より, 制限酵素は東洋紡 (大阪) より, アイソゲンニッポンジーン (東京) より, ウエスタンプロットに用いたインモビロン-PメンブランはMillipore (Billerica, USA) より, シリカゲル薄層クロマトグラフィ (thin layer chromatography, TLC) に用いたプレートはMerk (Darmstadt, Germany) より, PMA, インドメサシンおよびジェネチシンはSigma (St. Louis, USA) より, イスコープダルベッコ改良培地 (Iscove's Modified

Dulbecco's Medium, IMDM) はGibco BRL (Grand Island, USA) より, 子仔胎児血清はJRH Bioscience (Lenexa, USA) より購入した.

II. COX活性の測定

ヒト乳癌細胞株MCF-7およびHs578Tは、5%非働化子仔血清と100単位/mlペニシリン, 100 μg/mlストレプトマイシンを含んだIMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) を用いて, 37℃, 5% CO₂の条件下, 100mmのシャーレにて培養した. 細胞を50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTAを用いて回収し, 氷上にて超音波破碎した (20 kHz, 5秒間3回). 細胞の超音波破碎液を, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 μMヘマチン, 5 mMトリプトファンおよび25 μM [1-¹⁴C]アラキドン酸 (0.05 μCi/5 nmol/5 μlエタノール溶液) を含む反応液 (全容量200 μl) で24℃で10分間反応させた. 氷冷したジエチルエーテル/メタノール/1 Mクエン酸 (30:4:1, v/v) を600 μl添加して反応を停止させ, エーテル層を回収した. アラキドン酸からの産物を含むエーテル層はTLCプレートに滴下し, 酢酸エチル/水/イソオクタン/酢酸 (110:100:50:20, v/v) の有機層にて室温で約60分間展開した. プレート上の放射活性をFujix bioimaging analyzer BAS 1000 (東京) を用いて, 視覚定量化した. タンパク定量はLowryら²⁸⁾の方法に従って行った.

III. ゼラチンザイモグラフィ

Hs578T細胞は35 mmシャーレに5 × 10⁴ cells / 500 μlになるよう調整し, IMDM培地中で培養した. 18-24時間後に培養液を回収した. 培養液10 μlを, 0.1%ゼラチンを含む8%ポリアクリルアミドゲルを用いて泳動した. ゲルを50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM CaCl₂, 2.5% Triton X-100, 0.02% NaN₃, 1 μM ZnCl₂を含む液で2回洗浄し, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.02% NaN₃を用いて37℃で12時間反応させた. 反応後, ゲルを染色液 [30%エタノール, 10%酢酸, 0.1%クマシーブリリアントブルー-R-250 (Fluka, Buchs, Switzerland)] で染色した. その後, 10%エタノール, 10%酢酸にて脱色してゼラチン分解能を観察した. 不活性型MMP-2およびMMP-9はそれぞれ68kDa, 92kDaのバンドとして認識された. ゲルはスキャナーにて取り込み, 解析ソフトウェアNIH image software

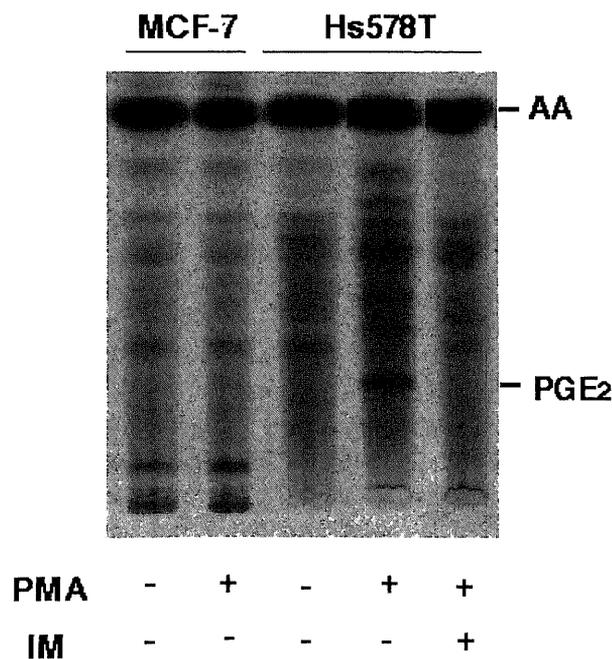


Fig. 1. Arachidonic acid metabolism by human breast cancer MCF-7 and Hs578T cells. The cells were treated with 1 μM PMA for 24 hr, and the sonicates were incubated with [1-¹⁴C]arachidonic acid in the presence or absence of 5 μM indomethacin (IM). The radioactive products separated by TLC were visualized by a BAS-1000 photoimaging system. Authentic compounds were indicated: AA, arachidonic acid.

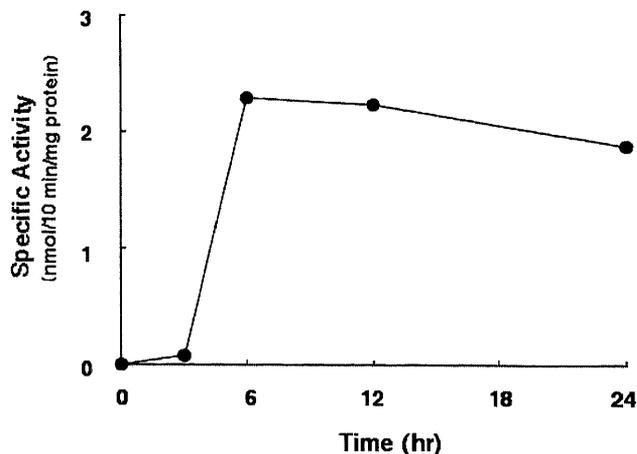


Fig. 2. Time-dependent induction of COX in Hs578T cells treated with PMA. The Hs578T cells were incubated with 1 μM PMA for indicated periods of time. The COX activity in the sonicated cells was determined as in Fig. 1 using [1-¹⁴C] arachidonic acid.

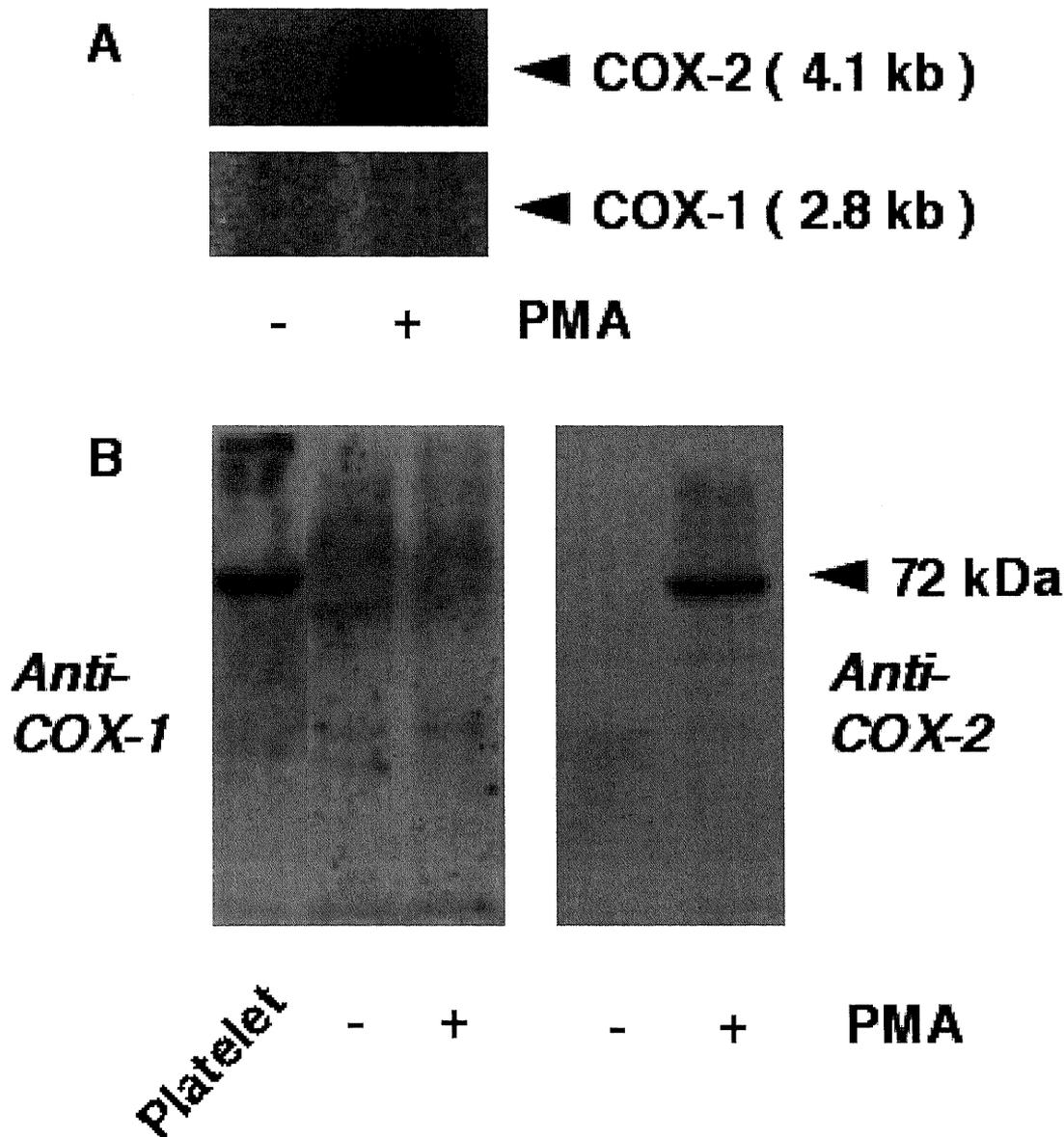


Fig. 3. Northern and Western blot analyses of COX isoforms in PMA-treated Hs578T cells. A, Total RNA was extracted from Hs578T cells incubated with (lane 2) or without (lane 1) 1 μ M PMA for 5 hr. Twenty μ g of total RNA was separated by 1% agarose gel containing formaldehyde, and transferred onto a Hybond N+ membrane. The membrane was hybridized with 32 P-labeled cDNA probe for human COX-1 (lower panel) or COX-2 (upper panel). B, The Hs578T cells were exposed to 1 μ M PMA (lanes 3 and 5) or vehicle (lanes 2 and 4) for 24 hr, and the cell extract (50 μ g protein) was separated with SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The proteins were transferred to an Immobilon-P membrane, and stained with the antibody against either COX-1 (left panel) or COX-2 (right panel). The cell extract of human platelets (50 μ g protein) was also run as a COX-1 control in lane 1.

Table 1. COX activity in two human breast cancer cell lines

	Control	+1 μ M PMA	+1 μ M PMA & 5 μ M IM
	nmol/10 min/mg protein		
MCF-7	<0.02	<0.02	ND
Hs578T	<0.02	1.96	0.06

MCF-7 and Hs578t cells were cultured to approximately 80% confluency, and then exposed to 1 μ M PMA and/or 5 μ M indomethacin (IM) for 24 hr. COX activity was determined by the standard assay condition as described in Materials and method. ND, not determined.

(Research Services Branch of National Institute of Mental Health, Bethesda, USA) を用い、それぞれのバンドの輝度をデンストメトリーで定量化した。ゲルの背景の輝度を0と設定した場合の各バンドの輝度をゼラチナーゼ活性の値とした。

IV. ノーザンブロットリング

培養細胞よりアイソゲンを用いて抽出した全RNA (20 μ g) を1%アガロースゲルにて電気泳動した。RNAはハイボンドN+ ナイロンメンブランに転写し、紫外線固定した。COX-1およびCOX-2のプロープ用cDNAは、メガプライムキットにて [α - 32 P]dCTPを用いて標識した。メンブランを標識したプロ-

ブを加えたQuikHybハイブリダイゼーション液中で、68℃で2時間反応させた。その後、メンブランを0.2倍濃度SSC-0.1% SDS溶液を用いて65℃で30分間洗浄し、Fujix bioimaging analyzer BAS 1000で得られたバンドの放射活性を測定した。

V. ウエスタンブロットリング

超音波破碎した細胞抽出液 (50 μ gタンパク) を、SDSポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した。分離したタンパクをインモビロン-Pメンブランに転写し、抗ヒトCOX-1モノクローナル抗体および抗ヒトCOX-2ポリクローナル抗体と反応させた後、2次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗マウス

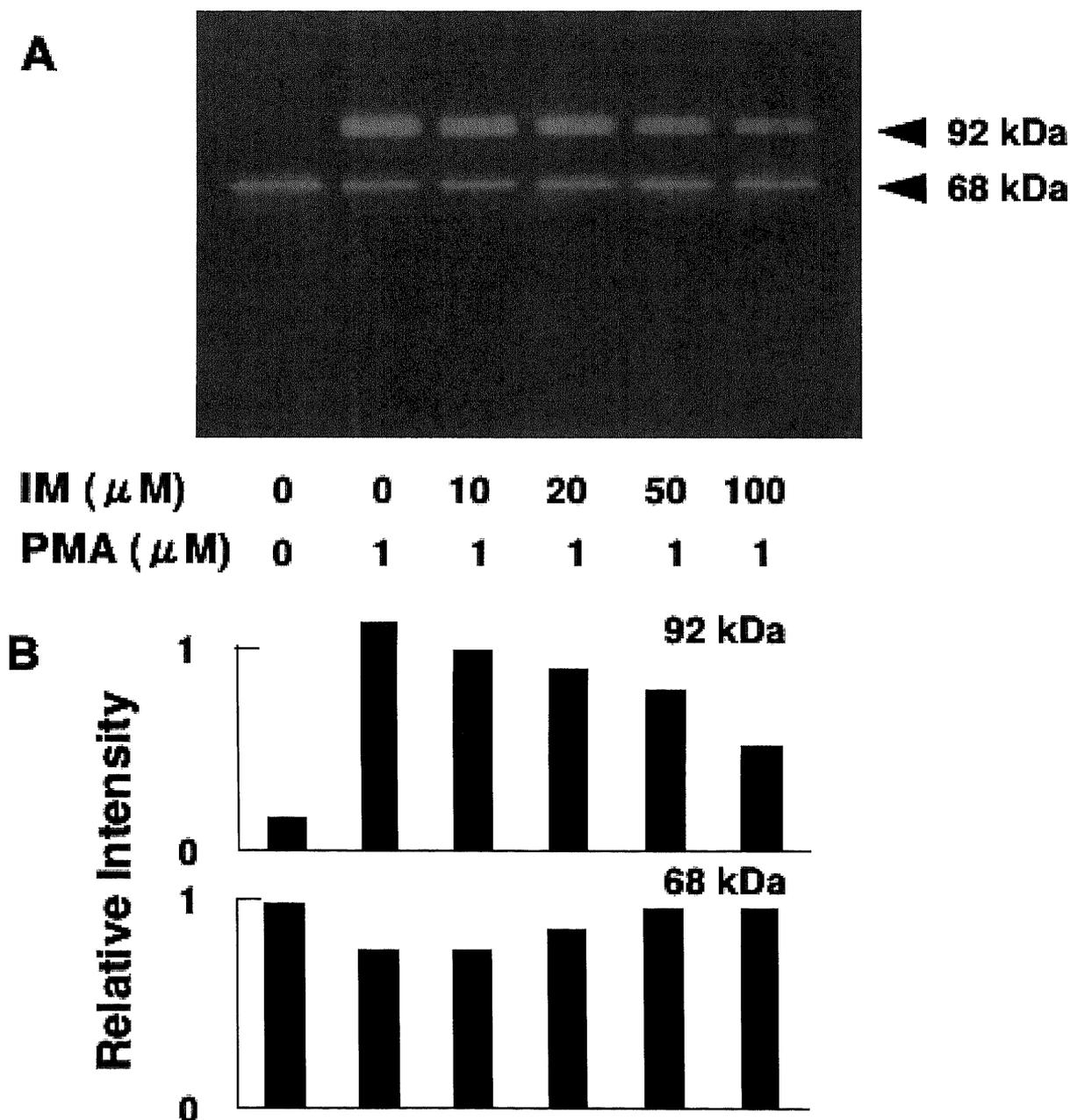


Fig. 4. A Gelatin-zymography of MMP-2 and MMP-9 secreted from PMA-stimulated Hs578T cells. A, Culture medium (10 μ l) was analyzed by gelatin-zymography as described in Materials and Methods. Five x 10⁴ cells were incubated with (lanes 2-6) or without (lane 1) 1 μ M PMA) in 500 μ l of serum-free medium for 18 hr. Indomethacin (IM) was added at the indicated concentrations. Molecular weight of MMP-2 (68 kDa) and MMP-9 (92 kDa) is shown.

B, The relative intensity of the bands of MMP-2 and MMP-9 was determined by NIH image software.

IgGを加えて反応させた。その後、ELCウエスタンブロッティング検出液を用いて反応させ、1分間のフィルム露光後に現像した。

成 績

I. ヒト乳癌細胞株におけるCOX-2の誘導

超音波破砕したヒト乳癌細胞株Hs578TとMCF-7を $[1-^{14}C]$ アラキドン酸と反応させ薄層クロマトグラフィ (thin layer chromatography, TLC) で調べたところ、アラキドン酸からの生成物は認められなかった (図1)。Hs578T細胞に $1 \mu M$ PMAを添加し24時間培養して、同様に反応させたところ、 PGE_2 を主とするアラキドン酸産物が観察された。この時のCOX活性は $1.96 \text{ nmol}/10 \text{ min}/\text{mg}$ 蛋白であった (表1)。PMAで上昇したHs578T細胞のCOX活性は $5 \mu M$ インドメサシン添加によって完全に阻害された。図2に示すように、COX活性はPMA添加3時間後より上昇し、6時間後に最高値に達し、その後は漸減した。一方、別の乳癌細胞株MCF-7にはPMAによる PGE_2 の産生亢進は認められなかった (図1)。

白血病細胞株や大腸癌細胞株を用いた実験で、PMAはCOX-1および-2の両方のアイソフォームを誘導することが知られている^{29) 30)}。今回の実験において、Hs578T細胞でどのCOXアイソフォームが誘導されたのかを調べた。5時間のPMA処理を施したものを、施さなかったものの両細胞株より全RNAを抽出し、ノーザンブロッティングを行った。図3Aに示すように、PMA処理したHs578T細胞では、4.1 kbの位置にCOX-2 mRNAのバンドが認められた。これに対して、PMA処理しなかった細胞ではこのバンドが認められなかった。一方、PMA処理の有無にかかわらず、COX-1 mRNAは観察されなかった。PMA処理によるCOX-2タンパクの発現を調べるために、ウエスタンブロッティングを行った。PMA処理したHs578T細胞では、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で72 kDaの位置にバンドが認められ、COX-2の発現がタンパクレベルで確認された (図3B)。

II. ヒト乳癌細胞株におけるMMPの発現

Hs578T細胞を無血清培養液中で、PMAの添加および無添加にて培養し、培養液を24時間後に回収した。PMA無添加の培養液では、ゼラチンザイモグラフィで68 kDaのバンドが認められ、その分子量より不活性型MMP-2と考えられた (図4A)。これはHs578T細胞にMMP-2が発現しているとするいくつかの報告に合致する^{31) 32)}。一方、同様の実験をPMAを添加して行ったところ、92 kDaのバンドが認められ、その分子量からMMP-9と思われた (図4A)。次に、このPMAによるMMP-9の発現誘導にCOX-2が関与しているかを調べるために、COXの一般的阻害剤であるインドメサシンを添加して実験を行った。その結果、インドメサシンは濃度依存的にMMP-9の発現を抑制し、 $100 \mu M$ では非添加時に比べ65%の発現抑制が認められた (図4B)。一方、MCF-7細胞ではPMAの添加によってMMP-9の誘導は認められなかった (データ未掲載)。

考 察

MMPは細胞外マトリックスを分解する亜鉛結合型タンパク分解酵素で、その構造と基質特異性より、コラーゲナーゼ、ゼラチナーゼ、ストロムライシン、それ以外の4つのサブグループに分類されている^{33) 34)}。そのなかで、組織の基底膜の重要な構成成分であるIV型とV型のコラーゲンおよびゼラチンを分解す

るMMP-2およびMMP-9は、腫瘍の浸潤や転移に重要な役割を果たすと考えられている^{24) 25) 33)}。さまざまな悪性腫瘍において、このMMP-2およびMMP-9の過剰発現が報告されている^{35) 36)}。特にヒト大腸癌では、癌の原発巣および転移巣で高いIV型コラーゲン分解活性や、MMP-9の免疫組織染色で陽性が認められている³⁷⁾。本研究で、Hs578T細胞をPMA処理するとCOXが発現誘導され、アラキドン酸から主に PGE_2 を生成することが分かった。また、ノーザンブロッティングおよびウエスタンブロッティングにより、誘導される酵素はCOX-2であることが明らかになった。この結果は、他の乳癌細胞株MDA-MB-231において、PMA処理によってCOX-2が誘導されたとする報告に一致している²⁹⁾。MCF-7細胞のCOXの発現がPMA処理後5時間をピークとして一過性に誘導されるという報告²⁹⁾がある。今回の実験では、PMA処理24時間後に調べた結果COXの発現は認められず、先の報告と矛盾しない。腫瘍の浸潤や転移に重要な役割を果たすMMP-9が、Hs578T細胞株でPMAによって誘導され、COX阻害剤のインドメサシンは、このPMAによるMMP-9の誘導を抑制した (図4)。この結果は、Hs578TにおいてはPMAによって誘導されるCOX-2がMMP-9の発現に関係することを示唆している。このことは、PMAによってCOXが誘導されなかった別の細胞株MCF-7では、MMP-9が検出されなかった結果と合致する。COX-2を導入したヒト大腸癌細胞株Caco-2に認められるMMP-2の活性化がCOX阻害剤であるスリンドグスルフィドによって抑制されたとする報告がある²⁶⁾。また、COX-2を導入したヒト乳癌細胞株では、1型膜型MMP (MT1-MMP) 誘導を介して、MMP-2が活性化される²⁷⁾。これらの結果は、COXがMMPの発現に深く関わっていることを示唆している。今回の実験では、Hs578T細胞においてMMP-9の発現誘導がインドメサシンによって抑制されたが、完全には阻害されなかった。MMP-9遺伝子のプロモーター領域にはAP-1、NF κ B、SP-1転写因子の結合部位があり、これらが転写活性に不可欠であることが示されている³⁸⁾。癌細胞では、これらに加えEts結合部位³⁹⁾やretinoblastoma control element (RCE) 制御配列⁴⁰⁾が関与していることも知られている。さらに、PMAによるAP-1結合部位の活性化には、MAPKs ERK1/2経路⁴¹⁾やJNK経路⁴²⁾の関与が報告されている。このように、MMP-9の転写調節は複数の因子によって制御されている。COX阻害剤によるMMP-9発現の抑制が部分的なものであったという今回の実験結果は、この複雑な転写制御機構を反映したものであると思われる。さらに、このCOX阻害剤によるMMP-9発現の部分的抑制は、ゼラチンザイモグラフィのデンシトメトリーによって得られた結果であり、この解析方法の検出能や定量化の精度の限界によるものである可能性も否定できないので、より高感度で定量性に優れた方法による検討が望まれた。データには示さなかったが、 PGE_2 、 $PGF_{2\alpha}$ 、 PGD_2 それぞれ単独の添加では、MMP-9の発現は認められなかった。また、COX-1を過剰発現させた不死化ECV上皮細胞にみられる増殖能の亢進がインドメサシンでは抑制されなかったとする報告もある⁴³⁾。これはCOXがPGを生成する酵素としてだけでなく、細胞タンパクとして別の機序によってその病態生理学的役割を果たしている可能性を示唆するものである。この観点からすると、COX-1あるいはCOX-2と特異的に相互作用するタンパク因子があるという報告⁴⁴⁾は興味深い。インドメサシンは脂肪細胞への分化を抑制する核内受容体であるPPAR (peroxisome proliferators-

activated receptor) α および PPAR γ のリガンドとして結合する⁴⁵⁾。また、インドメサシンはヒト肺癌細胞株において ERK/Sp1 を介する転写を直接的に抑制し MMP-2 発現を阻害するという報告があり、COX 阻害以外の作用を持つことが示されている⁴⁶⁾。以上より、COX-2 が MMP-9 の発現に深く関わっているものと考察されたが、その詳細な機序についてはさらなる研究が必要と思われる。

結 論

ヒト乳癌細胞株 Hs578T を用いて、COX および MMP に関する実験を行い、以下の結果を得た。

1. Hs578T 細胞を $1 \mu\text{M}$ PMA で 24 時間処理すると、アラキドン酸から主として PGE₂ が生成した。COX 活性は、PMA 添加 3 時間後より上昇し、6 時間後に最高に達した後に漸減した。
2. Hs578T 細胞の PMA 処理によって誘導される酵素は COX-2 であることが、ノーザンブロットングおよびウエスタンブロットングで確認された。
3. Hs578T 細胞を PMA で処理すると、MMP-9 が発現することがゼラチンザイモグラフィで分かった。この MMP-9 の発現は、COX 阻害剤であるインドメサシンによって抑制された。以上の結果から、COX が MMP-9 の発現を介して、乳癌の浸潤・転移能に深く関与している可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、在任中には多くの御指導を賜りました恩師三輪晃一先生および、多大なる御助言をいただきました金沢大学大学院医学研究科がん局所制御学教室の太田哲生助教授、金沢大学医学部附属病院手術部の野口昌邦先生に深甚なる謝意を捧げます。また、終始直接の御指導を賜りました金沢大学大学院医学研究科分子情報薬理学教室の高橋吉孝助手ならびに吉本谷博教授に深く感謝いたします。

なお、本論文の要旨の一部は、第 6 回日本乳癌学会総会 (1998 年 5 月、東京) において発表した。

文 献

- 1) Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases) -1 and -2. *J Biol Chem* 33:157-160, 1996
- 2) Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:97-120, 1998
- 3) Giovannucci E, Egan KM, Hunter DL. Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N Eng J Med* 333:609-614, 1995
- 4) Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 107:1183-1188, 1994
- 5) Parrett ML, Harris RE, Joarder FS, Ross MS, Clausen KP, Robertson FM. Cyclooxygenases-2 gene expression in human breast cancer. *Int J Oncol* 10:503-507, 1997
- 6) Ristimaki A, Honkanen N, Jankala H, Sipponen P, Harkonen M. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res* 57:1276-1280, 1997
- 7) Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE, Schror K. Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res* 59:198-204, 1999
- 8) Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H, Ristimaki A. Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res* 58:4997-5001, 1998
- 9) Chan G, Boyle JO, Yang EK, Zhang F, Sacks PG, Shah JP, Edelstein D, Soslow RA, Koki AT, Woerner BM, Masferrer JL, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 59:991-994, 1999
- 10) Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, Zhang F, Teng L, Daly JM, Soslow RA, Masferrer JL, Woerner BM, Koki AT, Fahey TJ 3rd. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 59:987-990, 1999
- 11) Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sasatomi K, Harada M, Kusaba T, Tanaka M, Kimura R, Nakashima Y, Nakashima O, Kojiro M, Kurohiji T, Sata M. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation. *Hepatology* 29:688-696, 1999
- 12) Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 90:455-460, 1998
- 13) Dore M, Cote LC, Mitchell A, Sirois J. Expression of prostaglandin G/H synthase type 1, but not type 2, in human ovarian adenocarcinomas. *J Histochem Cytochem* 46:77-84, 1998
- 14) Marnett LJ. Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer. *Cancer Res* 52:5575-5589, 1992
- 15) Elder DJ, Paraskeva C. NSAIDs to prevent colorectal cancer: a question of sensitivity. *Gastroenterology* 113:1999-2003, 1997
- 16) Williams CS, Smalley W, DuBois RN. Aspirin use and potential mechanisms for colorectal cancer prevention. *J Clin Invest* 100:1325-1329, 1997
- 17) Taketo MM. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (Part II). *J Natl Cancer Inst* 90:1609-1620, 1998
- 18) Rose DP, Hatala MA. Dietary fatty acids and breast cancer invasion and metastasis. *Nutr Cancer* 21:103-111, 1994
- 19) Rose DP. Dietary fatty acids and cancer. *Am J Clin Nutr* 66:998-1003, 1997
- 20) Harris RE, Namboodiri KK, Farrar WB. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and breast cancer. *Epidemiology* 7:203-205, 1996
- 21) Thompson HJ, Jiang C, Lu J, Mehta RG, Piazza GA, Paranka NS, Pamukcu R, Ahnen DJ. Sulfone metabolite of sulindac inhibits mammary carcinogenesis. *Cancer Res* 57:267-271, 1997
- 22) Chapkin RS, Hubbard NE, Buckman DK, Erickson KL. Linoleic acid metabolism in metastatic and nonmetastatic murine mammary tumor cells. *Cancer Res* 49:4724-4728, 1989
- 23) Liu XH, Rose DP. Differential expression and regulation of cyclooxygenase-1 and -2 in two human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 56:5125-5127, 1996
- 24) Sato H, Kida Y, Mai M, Endo Y, Sasaki T, Tanaka J, Seiki M. Expression of genes encoding type IV collagen-degrading metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in various human tumor cells. *Oncogene* 7:77-83, 1992

- 25) Liotta LA, Rao CN, Wewer UM. Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane. *Annu Rev Biochem* 55:1037-1057, 1986
- 26) Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3336-3340, 1997
- 27) Takahashi Y, Kawahara F, Noguchi M, Miwa K, Yoshimoto T. Activation of matrix metalloproteinase-2 in human breast cancer cells overexpressing cyclooxygenase-1 or -2. *FEBS Lett* 460:145-148, 1999
- 28) Lowry OH, Rosenberg NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275, 1951
- 29) Smith CJ, Morrow JD, Roberts LJ 2nd, Marnett LJ. Differentiation of monocytoid THP-1 cells with phorbol ester induces expression of prostaglandin endoperoxide synthase-1 (COX-1). *Biochem Biophys Res Commun* 30:192:787-793, 1993
- 30) Kinoshita T, Takahashi Y, Sakashita T, Inoue H, Tanabe T, Yoshimoto T. Growth stimulation and induction of epidermal growth factor receptor by overexpression of cyclooxygenases 1 and 2 in human colon carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1438:120-130, 1999
- 31) Pulyaeva H, Bueno J, Polette M, Birembaut P, Sato H, Seiki M, Thompson EW. MT1-MMP correlates with MMP-2 activation potential seen after epithelial to mesenchymal transition in human breast carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* 15:111-120, 1997
- 32) Azzam HS, Arand G, Lippman ME, Thompson EW. Association of MMP-2 activation potential with metastatic progression in human breast cancer cell lines independent of MMP-2 production. *J Natl Cancer Inst* 85:1758-1764, 1993
- 33) Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 5:2145-2154, 1991
- 34) Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 9:541-73, 1993
- 35) Brown PD, Bloxidge RE, Anderson E, Howell A. Expression of activated gelatinase in human invasive breast carcinoma. *Clin Exp Metastasis* 11:183-189, 1993
- 36) Yamagata S, Yoshii Y, Suh JG, Tanaka R, Shimizu S. Occurrence of an active form of gelatinase in human gastric and colorectal carcinoma tissues. *Cancer Lett* 59:51-55, 1991
- 37) Takeha S, Fujiyama Y, Bamba T, Sorsa T, Nagura H, Ohtani H. Stromal expression of MMP-9 and urokinase receptor is inversely associated with liver metastasis and with infiltrating growth in human colorectal cancer: a novel approach from immune/inflammatory aspect. *Jpn J Cancer Res* 88:72-81, 1997
- 38) Sato H, Kita M, Seiki M. v-Src activates the expression of 92-kDa type IV collagenase gene through the AP-1 site and the GT box homologous to retinoblastoma control elements. A mechanism regulating gene expression independent of that by inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 268:23460-23468, 1993
- 39) Higashino F, Yoshida K, Noumi T, Seiki M, Fujinaga K. Ets-related protein E1A-F can activate three different matrix metalloproteinase gene promoters. *Oncogene* 10:1461-1463, 1995
- 40) Himelstein BP, Lee EJ, Sato H, Seiki M, Muschel RJ. Transcriptional activation of the matrix metalloproteinase-9 gene in an H-ras and v-myc transformed rat embryo cell line. *Oncogene* 14:1995-1998, 1997
- 41) Liu JF, Crepin M, Liu JM, Barritault D, Ledoux D. FGF-2 and TPA induce matrix metalloproteinase-9 secretion in MCF-7 cells through PKC activation of the Ras/ERK pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 293:1174-1182, 2002
- 42) Woo JH, Lim JH, Kim YH, Suh SI, Min do S, Chang JS, Lee YH, Park JW, Kwon TK. Resveratrol inhibits phorbol myristate acetate-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting JNK and PKC delta signal transduction. *Oncogene* 23:1845-1853, 2004
- 43) Narko K, Ristimaki A, MacPhee M, Smith E, Haudenschild CC, Hla T. Tumorigenic transformation of immortalized ECV endothelial cells by cyclooxygenase-1 overexpression. *J Biol Chem* 272:21455-21460, 1997
- 44) Ballif BA, Mincek NV, Barratt JT, Wilson ML, Simmons DL. Interaction of cyclooxygenases with an apoptosis- and autoimmunity-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5544-5549, 1996
- 45) Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 272:3406-3410, 1997
- 46) Pan MR, Hung WC. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit matrix metalloproteinase-2 via suppression of the ERK/Sp1-mediated transcription. *J Biol Chem* 277:32775-32780, 2002

Roles of cyclooxygenase for the expression of matrix metalloproteinase-9 in phorbol ester-treated human breast cancer Hs578T cells Futoshi Kawahara Department of Gastroenterologic Surgery, Division of Cancer Medicine, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640—J. Juzen Med Soc., **114**, 95 – 102 (2005)

Key words cyclooxygenase, breast cancer cells, Hs578T, matrix metalloproteinase, indomethacin

Abstract

It has been reported that the risk of development and metastasis of breast cancer is reduced by non-steroidal anti-inflammatory drugs such as aspirin and indomethacin which inhibit the reaction of cyclooxygenase (COX). COX catalyzes the initial reaction in the synthesis of bioactive prostaglandins and thromboxanes produced from arachidonic acid. There are two isoforms, COX-1 and COX-2. COX-1 is constitutively expressed in tissues such as stomach and kidney and involved in homeostasis of these tissues, while COX-2 is an inducible enzyme and related solely to production of prostaglandins in pathological conditions including inflammation and tumorigenesis. The aim of the present study is to elucidate pathophysiological functions of COX isoforms in invasion and metastasis of breast cancer. We utilized human breast cancer cell lines, Hs578T and MCF-7, which do not show any intrinsic COX activity. When Hs578T cells were treated with 1 μ M phorbol ester for 24 hr, the COX activity was markedly increased as examined by the incubation with arachidonic acid as a substrate. The phorbol ester-treated Hs578T cells showed the enzyme activity of 1.96 nmol/10 min/mg of protein. Northern and Western blot analyses revealed the induced enzyme in the Hs578T cells was COX-2, but not COX-1. In contrast, the phorbol ester treatment did not cause the induction of COX in MCF-7 cells. We then examined matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by gelatin zymography, which is shown to be one of the indicators of invasion and metastatic potential in cancer cells. The phorbol ester treatment significantly increased MMP-9 in Hs578T cells. The induction of MMP-9 was significantly suppressed by indomethacin as a COX inhibitor. These results suggest a pivotal role of COX-2 in the induction of MMP-9 in human breast cancer Hs578T cells.