

ヒト肺癌細胞株の抗癌薬耐性因子としてのシクロオキシゲナーゼ-2

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/2297/4578

ヒト肺癌細胞株の抗癌薬耐性因子としての シクロオキシゲナーゼ-2

金沢大学医学部医学科内科学第三講座 (主任: 中尾眞二教授)

明 さ お り

近年, 動物実験や臨床的観察から, アラキドン酸からのプロスタグランジン合成を司るシクロオキシゲナーゼ-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) が肺癌の増殖に関与していることが示されている。また, シクロオキシゲナーゼ阻害薬が一部の抗癌薬に対する肺癌の感受性を高めることから, COX-2は抗癌薬の感受性にも関与している可能性がある。そこで, ヒト肺癌細胞株の抗癌薬感受性におけるCOX-2の役割を明らかにするため, ヒト肺癌細胞株におけるCOX-2の発現と, COX-2の抗癌薬感受性に与える影響を検討した。細胞株はヒト肺扁平上皮癌細胞株EBC-1とヒト肺小細胞癌細胞株SBC-3を用いた。ウエスタンブロッティング法により細胞内のCOX-2蛋白を半定量したところ, 両細胞株ともに定常状態においてはCOX-2蛋白の発現は軽度であったが, アドリアマイシン (adriamycin, ADM) またはシスプラチン (cis-diamminedichloroplatinum (II), CDDP) の処理により, これらの抗癌薬の濃度依存性にCOX-2蛋白の発現が増強された。次にこのCOX-2に酵素活性があるかどうかを調べるために, 抗癌薬処理後の細胞株にアラキドン酸を添加し, COX-2の代謝産物であるプロスタグランジンE₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) とトロンボキサンB₂ (thromboxane B₂, TXB₂) の含量を測定した。COX-2によってアラキドン酸から合成されるトロンボキサンA₂ (thromboxane A₂, TXA₂) はその後速やかにTXB₂に変換されるため, TXA₂産生の指標としてTXB₂を測定した。両細胞株において, PGE₂含量はADMおよびCDDP曝露によりコントロールに比べてそれぞれ有意に増加した。次に, COX-2阻害薬のNS-398を加えた際の抗癌薬感受性の変化を検討した。薬剤感受性の指標として50%細胞増殖阻害濃度 (drug concentration inhibiting cell growth by 50%, IC₅₀) を用いた。10 μMのNS-398の添加によって, 両細胞株におけるADMおよびCDDPのIC₅₀は, コントロールに比べてそれぞれ有意に低下した。すなわち, COX-2阻害薬により肺癌細胞株の抗癌薬感受性は有意に増強された。アイソボログラムを用いた検討では, 両細胞株において各抗癌薬とNS-398は相加から相乗効果を示すと判定された。一方, アラキドン酸添加後の癌細胞培養上清中のTXB₂含量は, EBC-1では抗癌薬曝露による変化は認められなかったが, SBC-3ではADM曝露によって, コントロールに比べて有意に増加した。さらに, TXA₂受容体拮抗薬S-1452の投与により, SBC-3におけるADMのIC₅₀は50%へと減少し, ADMに対する感受性は2倍に増強された。以上より, 肺癌細胞株においては抗癌薬処理によりCOX-2が誘導され, 誘導されたCOX-2は抗癌薬抵抗性に作用することが示された。また, COX-2阻害薬のNS-398やTXA₂受容体拮抗薬のS-1452はADMとCDDPの抗腫瘍活性を増強させる可能性が示唆された。

Key words lung cancer, cyclooxygenase-2, cyclooxygenase-2 inhibitor, prostaglandin E₂, thromboxane A₂

シクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase, COX) はアラキドン酸からのプロスタグランジン生合成の律速酵素で, 1991年COXのアイソザイムの存在が明らかとなって以来¹⁾²⁾, COX-1およびCOX-2と呼ばれるようになった。COX-1は構成型酵素で, ほとんどすべての組織に常時発現しており, 各組織の定常的機能の調節に関与していると考えられている。COX-2は誘導型酵素で, 何らかの刺激によって必要時に誘導される。現在までのところ, 実験的にはエンドトキシンやサイトカインなどの刺激によって単球, 線維芽細胞, 関節滑膜細胞および血管内皮細胞などに発現することが報告され³⁾, 主に炎症に関与していると

考えられている。

近年, 疫学的調査によって, アスピリンの服薬を継続した女性に大腸癌の発生率の低下が認められることが報告された⁴⁾⁵⁾。さらに, 大腸癌の組織にCOX-2のmRNAが検出されるとともに, COX-2蛋白の増加が認められたことから⁶⁾, COX-2と癌との関係が注目されるようになった。

肺癌に関しては, Wolffら⁷⁾が外科的に切除された肺癌組織にCOX-2蛋白の過剰発現を検出し, 発現の程度は腺癌, 扁平上皮癌, 小細胞癌の順に強かったと報告した。彼らの報告では, COX-2 mRNAの発現は, 腺癌と高分化扁平上皮癌では認められ

平成12年11月28日受付, 平成13年1月16日受理

Abbreviations: ADM, adriamycin; CDDP, cis-diamminedichloroplatinum (II); COX, cyclooxygenase; IC, drug concentration inhibiting cell growth; MMC, mitomycin C; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PG, prostaglandin; PKC, protein kinase C; TBS-T, tris-buffered saline with Tween20; TX, thromboxane

たが、低分化扁平上皮癌と小細胞癌では認められなかった。Hidaら⁹⁾は、59人の肺癌組織についてCOX-2の免疫組織染色を行い、異型腺腫様過形成の33%、腺癌の70%にCOX-2の発現の増加を認めたが、扁平上皮癌では発現が低く、また小細胞癌での発現はさらに軽度であったと報告した。一方、動物実験では、Hidaら⁹⁾はマウスに非小細胞肺癌組織を移植し、アスピリンやインドメタシンの投与で腫瘍細胞の増大が抑制されることを明らかにした。またRiouxら¹⁰⁾は、アスピリンやCOX-2阻害薬であるNS-398を投与された肺癌形成モデルマウスでは、形成される癌細胞総量が抑制されることを示した。さらにAchiwaら¹¹⁾は、肺腺癌早期症例においてCOX-2過剰発現群では生存期間が有意に短いことを報告した。したがってCOX-2は、肺癌の増殖に関与している可能性が考えられる。

また、肺癌の抗癌薬に対する感受性とCOXとの関係については、COX阻害薬とリポキシゲナーゼ阻害薬の併用が肺癌のシスプラチン (cis-diamminedichloroplatinum (II), CDDP) 感受性を増強することや¹²⁾、COX阻害薬であるスリダグスルフィドが非小細胞肺癌細胞株および小細胞肺癌細胞株におけるCDDPとバクテリタキセルへの感受性を増強することが報告されている¹³⁾。したがって、COX阻害薬は一部の抗癌薬に対する肺癌の感受性を高めることが予想されるが、その機序は不明である。

これらの過去の知見から、COX-2は肺癌における抗癌薬の反応性に重要な役割を果たしていると考えられた。この仮説を証明するために、本研究ではヒト肺癌細胞株におけるCOX-2の発現を明らかにするとともに、COX-2阻害薬NS-398とトロンボキササン (thromboxane, TX) A₂受容体拮抗薬S-1452を用いて、COX-2の抗癌薬感受性に与える影響を検討した。

材料および方法

I. 試薬

RPMI1640, PBSおよび1%ペニシリン・ストレプトマイシン混合液はニッスイ薬品工業 (東京) より購入した。ウシ胎児血清 (fetal bovine serum) は三光純薬 (東京) より購入した。CDDPはブリistol・マイヤーズ スクイブ株式会社 (東京) より、アドリアマイシン (adriamycin, ADM) は協和発酵工業 (東京) より供与を受けた。ジメチルスルフォキシド (dimethylsulfoxide) は和光純薬 (大阪) より、3-(4,5ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) はSigma (St.Louis, USA) より購入した。NS-398 [N-(2-cyclohexyloxy-4-nitrophenyl)methanesulfonamide] はCayman Chemical (Ann Arbor, USA) より購入した。S-1452 [5(Z)-1R,2S,3S,4S-7-[3-phenylsulfonamylaminobicyclo[2.2.1]hept-2-yl]-5-heptanoate hydrate] は塩野義製薬 (東京) より供与を受けた。

II. 細胞株

ヒト肺扁平上皮癌細胞株EBC-1とヒト肺小細胞癌細胞株SBC-3を用いた。各細胞株は、理化学研究所細胞・遺伝子保存施設細胞銀行 (つくば) より購入した。細胞は10%FBSと1%ペニシリン・ストレプトマイシン混合液を加えたRPMI1640培養液を用いて、5%CO₂濃度、37℃の条件下に培養した。

III. 蛋白質濃度の定量

各検体の蛋白質濃度はBCA蛋白定量キット (Pierce, Rockford, USA) を用いて測定した。

IV. COX-1, COX-2 蛋白の発現

細胞内COX-1, COX-2蛋白の発現はウエスタンブロッティング法を用いて半定量した。EBC-1細胞とSBC-3細胞を0.01 μM, 0.1 μM, 1.0 μMのADM, EBC-1細胞を1.0 μM, 10 μM, 100 μMのCDDP, SBC-3細胞を0.1 μM, 1.0 μM, 10 μMのCDDPをそれぞれ含む培養液中または抗癌薬を含まない培養液中で48時間インキュベーションした。培養液をトリプシンEDTA溶液 (Gibco, Grand Island, USA) に置換し、5分間静置後、毎分1,500回転で5分間遠心し細胞を回収した。回収した細胞は、氷冷したPBSを用いて2回洗浄したのち細胞溶解液 [20 mM Tris (pH 7.6), 10 mM EDTA (pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 5 mg/ml Na₃VO₄, 2 mM ジチオトレイトール, 1 mg/ml NaF, 100 mg/ml β-グリセロフォスフェイト (Sigma, St.Louis, USA), 10 U/ml アプロチニン (Sigma, St.Louis, USA), 1 mM フェニールメチルスルフォニルフロライド (和光)] に浮遊させ、凍結と溶解を4回繰り返して細胞を破壊したのち、毎分15,000回転で15分間遠心した。細胞の蛋白が存在する上清とTris SDSセパラゾール (0.25 M Tris-HCl, 2% SDS, 30% グリセロール, 0.01% プロモフェニールブルー, 第一化学薬品, 東京) を等量混合し、95℃で5分間加熱することにより蛋白を変性させた。1レーン当たり50 μgとなるように蛋白量を調整し、10%SDSポリアクリルアミドゲル (第一化学薬品) を用いて、60mAにて電気泳動した。泳動後ゲル中の蛋白をModelAE6670 (ATTO, 東京) を用いて54mA, 60分間の条件でイモビロンPVDFメンブレン (第一化学薬品) に転写させた。このメンブレンを、5%スキムミルクを加えた1% Tween20 (和光) 入りTris-HCl緩衝液 (Tris-buffered saline-Tween20, TBS-T) (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 125 mM NaCl, 1% Tween20) にてブロッキングしたのち、1次抗体の抗COX-1抗体, 抗COX-2抗体 (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) と60分間インキュベーションした。十分量のTBS-Tで10分間ずつ3回洗浄後、5%スキムミルク加TBS-T溶液に溶解させた2次抗体のHRP標識抗マウスIgG抗体 (Sigma) またはHRP標識抗ウサギIgG抗体 (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) と60分間インキュベーションした。再度TBS-Tにて10分間ずつ3回洗浄し、ECLウエスタンブロッティング検出システム™ (アマシャムジャパン, 東京) によって抗原抗体複合体を検出した。

V. 細胞培養上清中のアラキドン酸代謝産物の測定

抗癌薬によって誘導されたCOX-2蛋白の酵素活性を定量するため、アラキドン酸代謝産物であるプロスタグランジン (prostaglandin, PG) E₂とTXA₂の安定代謝物であるTXB₂の濃度をELISA法にて測定した。PGE₂とTXA₂はともにアラキドン酸からCOX系の酵素群によって合成されるプロスタノイドであるが、TXA₂の半減期は約30秒と短く直ちにTXB₂に代謝されるため、TXA₂の産生量の指標として今回はTXB₂を測定した。各細胞株を6穴平底マルチプレート (Falcon No.3046, Becton Dickinson and Co., Lincoln Park, USA) にて培養し、48時間後に上清を交換した。その後、0.1 μMのADMまたは10 μMのCDDPを添加し、薬剤曝露時間を48時間とした。陽性コントロールとしてCOX-2の誘導に十分な¹⁴⁾¹⁵⁾10 μg/mlのリポポリサッカライド (lipopolysaccharide) (和光) を添加して同様に48時間培養した。その後、上清を除去し、30 μMのアラキドン酸 (Sigma, St.Louis, USA) を含むPBSを各ウェルに3mlずつ添加して15分後に上清を回収した。測定にはELISAキット

(Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) を用いた。

PGE₂の測定には、あらかじめヤギ抗マウスIgG抗体がコーティングされたマイクロプレートの各ウェルに、培養上清50 μl, PGE₂アセチルコリンエステラーゼ結合体50 μl, PGE₂モノクローナル抗体50 μlを加え、4℃にて18時間インキュベーションした。その後洗浄液にて5回洗浄し、200 μlのエルマン試薬を各ウェルに加え、暗所で90分間反応させたのち、自動吸光度計EAR 340AT (SLT, Vienna, Austria) を用いて波長405nmにおける吸光度を測定した。

TXB₂の測定には、あらかじめマウス抗ラビットIgG抗体がコーティングされたマイクロプレートの各ウェルに、培養上清50 μl, TXB₂アセチルコリンエステラーゼ結合体50 μl, TXB₂エンザイムイムノアッセイ抗血清50 μlを加え、4℃にて18時間インキュベーション後、PGE₂と同様の方法で吸光度を測定した。

吸光度の値から、標準曲線をもとにサンプル中のPGE₂, TXB₂の濃度を測定した。測定したPGE₂, TXB₂の量は、培養に用いた細胞の乾燥重量1g当たりのμgまたはng単位として表した。

VI. 薬剤感受性

薬剤感受性は細胞増殖阻害試験により測定した。増殖期にあるEBC-1およびSBC-3の各細胞を回収し、培養液に浮遊させたのち、細胞濃度をEBC-1は 1.2×10^5 個/ml, SBC-3は 1.0×10^5 個/mlとなるように調整した。この細胞浮遊液を96穴平底マルチプレート (Falcon No.3072, Becton Dickinson and Co., Lincoln Park, USA) に各穴100 μlずつ蒔いて一晚培養した。その後、単独では細胞増殖に影響を与えない3 μM, 10 μM, 30 μMまたは100 μMのNS-398を50 μl添加した。さらに、各抗腫瘍薬の最終濃度がADMは0.05 μM, 0.1 μM, 0.25 μM, 0.5 μM, 1.0 μMまたは2.5 μM, CDDPは1.0 μM, 2.5 μM, 5 μM, 10 μM, 25 μMまたは50 μMとなるように50 μlずつ添加し、48時間、5%CO₂濃度、37℃にて培養した。培養終了後、PBSにて溶解した5mg/mlのMTT溶液20 μlを加え、さらに4時間培養したのち、1,500回転にて5分間遠心して上清を除去した。各穴に200 μlずつDMSOを加えて、形成されたホルマザン結晶を溶解した。攪拌後、自動吸光度計EAR 340AT (SLT, Vienna, Austria) を用いて、波長550nmにおける吸光度を測定した。得られた吸光度から細胞生存曲線を描き、50%細胞増殖阻害濃度 (drug concentration inhibiting cell growth by 50%, IC₅₀) を求めて薬剤感受性の指標とした。試験は異なった日に3回以上行い、その平均値を求めて測定値とした。なお、NS-398は文献的¹⁶⁾¹⁷⁾に10 μM以上で十分にCOX-2の働きを阻害しうると考えられた。

VI. 細胞増殖阻害作用における薬剤併用効果の判定

細胞増殖阻害作用における薬剤併用効果を評価するため、Steelら¹⁸⁾の方法に従ってアイソボグラムを作成した。すなわち前述の細胞生存曲線より、NS-398, S-1452または各抗腫瘍薬単独の場合の、IC₅₀, IC₄₀, IC₃₀, IC₂₀およびIC₁₀を求め、これらをそれぞれのIC₅₀で除した値を算出した。この値を抗腫瘍薬の場合はAとし、NS-398またはS-1452の場合はBとした。1-Aと1-Bを求め、グラフ上にx軸にA, y軸に1-Bをプロットして曲線を描いた。また、同グラフ上に、1-Aをx軸に、Bをy軸にプロットした曲線を描いた。さらに、IC₄₀, IC₃₀, IC₂₀, IC₁₀を示す濃度の抗腫瘍薬を併用した場合に、両薬剤で50%の増殖阻害を

起こすのに必要なNS-398またはS-1452の濃度、すなわちIC_{16.7}, IC_{28.6}, IC_{37.5}, IC_{44.4}を単独の生存曲線より求め、これをIC₅₀で除した値をB'とした。先に求めたAをx軸に、B'をy軸にプロットして曲線を描いた。さらに薬剤未処理細胞をコントロールとし、NS-398 10 μM, 30 μM, 100 μMまたはS-1452 10 μM, 25 μM, 50 μMと併用した場合に両薬剤併用にて増殖阻害を起こすのに必要な抗腫瘍薬の濃度を求め、これを抗腫瘍薬単独のIC₅₀にて除した値を算出した。また、NS-398単独でのIC₅₀にて10 μM, 30 μM, 100 μMを除した値、またはS-1452単独でのIC₅₀にて10 μM, 25 μM, 50 μMを除した値を求め、それぞれを前述のグラフ上にプロットした。先の3本の曲線で囲まれる範囲内に、これらの点が存在する場合を相加効果、曲線下方に存在する場合を相乗効果、曲線上方に存在する場合を相反効果があると判定した。

VII. 統計学的分析

対応のないStudentのt検定を用いて2群間検定を行い、危険率5%未満を有意差ありと判定した。数値は $\bar{x} \pm SD$ で表した。

成 績

I. 肺癌細胞株におけるCOX-1, COX-2の発現と抗腫瘍薬曝露後の変化

COX-2蛋白を検出するため、抗腫瘍薬の存在下および非存在下で48時間培養した各肺癌細胞株についてウェスタンブロッティング法を行った。結果は図1に示すように、抗腫瘍薬の非存在下ではEBC-1, SBC-3ともにCOX-2の発現は軽度であり、細胞株間に明らかな差は認めなかった。ADM, CDDPそれぞれの曝露によって、COX-2の発現は濃度依存性に増加した。一方、COX-1では、ADM, CDDPそれぞれの曝露による明らかな変化は認められなかった。

II. アラキドン酸添加後のPGE₂, TXB₂産生量の測定

48時間の抗腫瘍薬曝露によって肺癌細胞株内にCOX-2蛋白の増加が認められたので、次にその酵素活性を調べるため、アラキドン酸添加後のPGE₂およびTXB₂量を測定した。図2にPGE₂含量の測定結果を示す。PGE₂含量は、EBC-1ではコントロール群の $0.13 \pm 0.028 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ 蛋白に比し、0.1 μMのADM曝露では $0.27 \pm 0.091 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ 蛋白 ($p < 0.05$), 10 μMのCDDP曝露

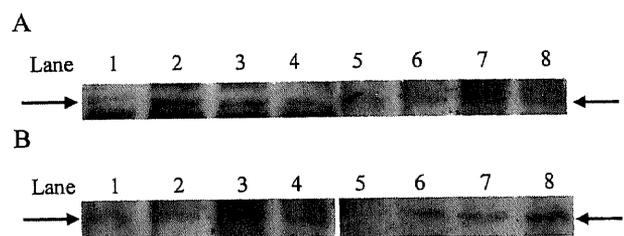


Fig. 1. Western blotting analysis of COX-2 in EBC-1 (A) and SBC-3 (B) cell lines with or without drug treatment. Fifty μg of cellular protein was loaded onto each lane. (A) Lanes 1 and 5, treated with vehicle; lane 2, treated with 0.01 μM ADM; lane 3, treated with 0.1 μM ADM; lane 4, treated with 1.0 μM ADM; lane 6 treated with 1.0 μM CDDP; lane 7, treated with 10 μM CDDP; lane 8 treated with 100 μM CDDP. (B) Lanes 1 and 5, treated with vehicle; lane 2, treated with 0.01 μM ADM; lane 3, treated with 0.1 μM ADM; lane 4, treated with 1.0 μM ADM; lane 6 treated with 0.1 μM CDDP; lane 7, treated with 1.0 μM CDDP; lane 8 treated with 10 μM CDDP. Arrows indicate COX-2 protein (72 kDa).

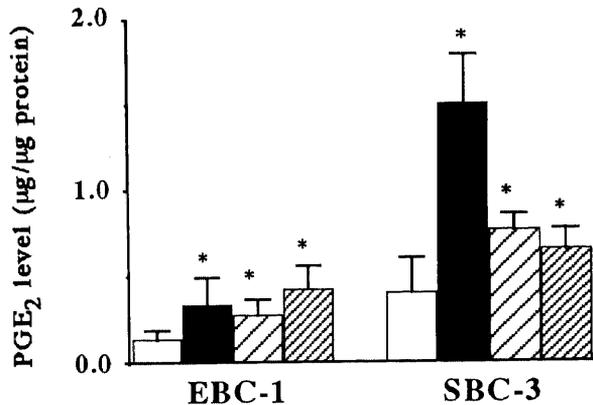


Fig. 2. PGE₂ levels in culture medium of lung cancer cell lines. Cells were treated with 10 µg/ml LPS, 0.1 µM ADM or 10 µM CDDP for 48 hr. □, vehicle; ■, 10 µg/ml LPS; ▨, 0.1 µM ADM; ▩, 10 µM CDDP. *p<0.05 compared with the value for the cells treated with vehicle.

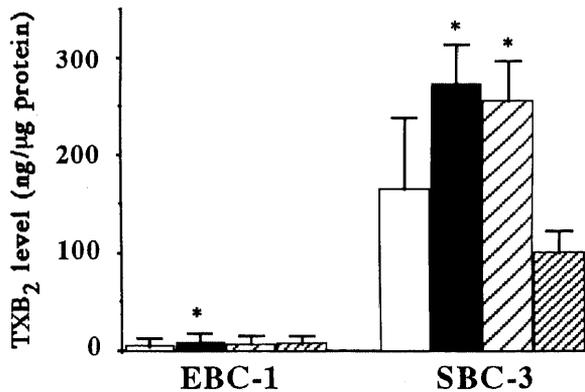


Fig. 3. TXB₂ levels in culture medium of lung cancer cell lines. Cells were treated with 10 µg/ml LPS, 0.1 µM ADM or 10 µM CDDP for 48 hr. □, vehicle; ■, 10 µg/ml LPS; ▨, 0.1 µM ADM; ▩, 10 µM CDDP. *p<0.05 compared with the value for the cells treated with vehicle.

では0.42±0.14 µg/µg蛋白 (p<0.05) と、抗癌薬曝露群において有意に増加していた。SBC-3でも、コントロール群の0.40±0.20 µg/µg蛋白に比し、0.1 µMのADM曝露では0.76±0.096 µg/µg蛋白 (p<0.05)、10 µMのCDDP曝露では0.65±0.12 µg/µg蛋白 (p<0.05) と、抗癌薬曝露群において有意に増加していた。

同じく、TXB₂含量の結果を図3に示す。EBC-1では、コントロール群と抗癌薬曝露群に有意な差は認められなかった。SBC-3では、コントロール群の164±73ng/µg蛋白に比し、0.1 µMのADM曝露群では255±42ng/µg蛋白 (p<0.05) と有意に増加していた。しかし、CDDP曝露では有意な増加は認められなかった。

以上の所見から、抗癌薬への曝露によって肺癌細胞株内に誘導されるCOX-2はアラキドン酸代謝に関わる機能的蛋白であることが示された。

Ⅲ. COX-2阻害薬NS-398の抗癌薬感受性におよぼす影響

そこでこのCOX-2が、抗癌薬に対する感受性に関与しているか否かを明らかにするため、COX-2の阻害薬であるNS-398の抗癌薬感受性におよぼす影響を検討した。抗癌薬感受性は細胞増殖阻害試験を用いて評価した。NS-398添加による抗癌薬感受性の変化を表1に示す。EBC-1においては、10 µM以上のNS-398の存在下でADMのIC₅₀は有意 (それぞれp<0.05) に減少した。また、CDDPのIC₅₀も同様に10 µM以上のNS-398の存在下で有意 (それぞれp<0.05) に低下した。

SBC-3においても、10 µM以上のNS-398の存在下で、ADMおよびCDDPのIC₅₀は有意 (それぞれp<0.05) に低下した。したがって、いずれの細胞株においても、COX-2はADMやCDDPに対する感受性を低下させるように作用していることが示唆された。

Ⅳ. NS-398による抗癌薬の細胞増殖阻害増強効果の解析

NS-398による抗癌薬の細胞増殖阻害の増強が相加効果によるものかあるいは相乗効果によるものかを明らかにするため、アインボログラムを作成した。EBC-1におけるアインボログラムを図4に示す。ADM、CDDPともに各ドットは3本の曲線の範囲内と左下方に位置することから、各抗癌薬とNS-398には相加および相乗効果の両者があると考えられた。SBC-3におけるアインボログラムを図5に示す。ADM、CDDPともに各ドットは3本の曲線の範囲内と左下方に位置し、各抗癌薬とNS-398には相加および相乗効果の両者があると考えられた。

Table 1. NS-398 modulation of sensitivities to anticancer agents of lung cancer cell lines

Cell lines	Agents	IC ₅₀ values (µM) ^{a)}				
		Vehicle	NS-398 (3 µM)	NS-398 (10 µM)	NS-398 (30 µM)	NS-398 (100 µM)
EBC-1	Adriamycin	0.22±0.047 ^{b)}	0.21±0.039	0.15±0.050*	0.16±0.038*	0.16±0.039*
	Cisplatin	28.8±8.4	25±7.0	18.7±2.8*	19.1±2.1*	19.2±3.0*
SBC-3	Adriamycin	0.64±0.34	0.73±0.15	0.30±0.27*	0.17±0.011*	0.19±0.036*
	Cisplatin	16.3±4.2	13.4±0.86	12.2±1.7*	11.7±3.4*	11.3±2.4*

a) Drug concentration that inhibits cell growth by 50% by continuous drug exposure for 48 hr.

b) Each value is $\bar{x} \pm SD$ of at least three independent experiments.

*p<0.05 compared with the value for the cells treated with vehicle.

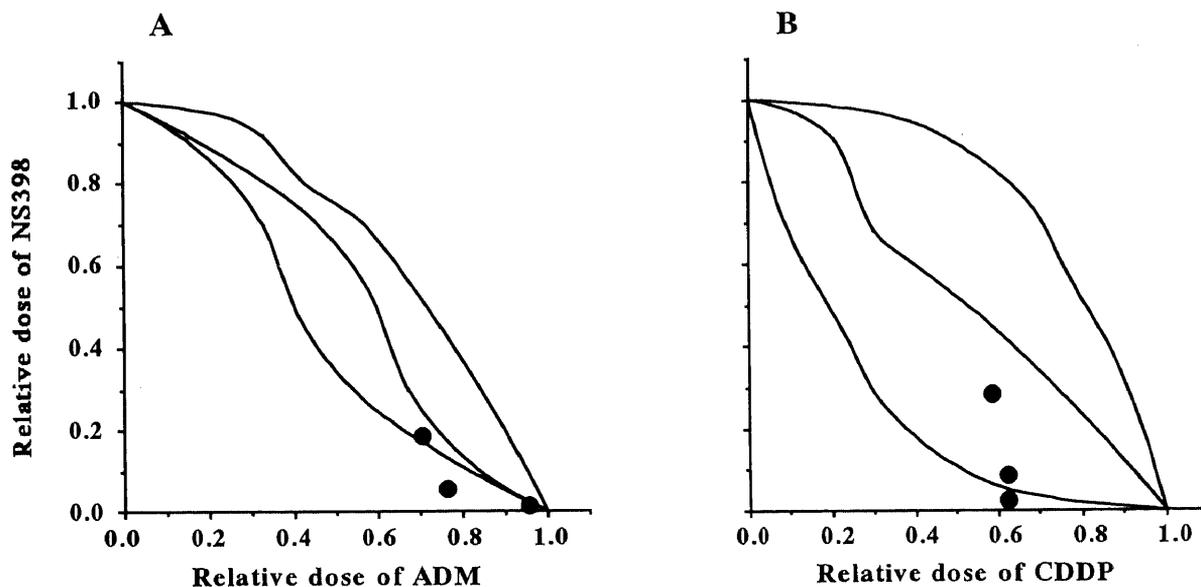


Fig. 4. IC₅₀ isobolograms of the use of NS-398 as an adjunct with ADM (A) or CDDP (B) in EBC-1 cell line. Synergistic or additive enhancement of chemosensitivity to ADM and CDDP was seen as a result of the adjunct use of NS-398.

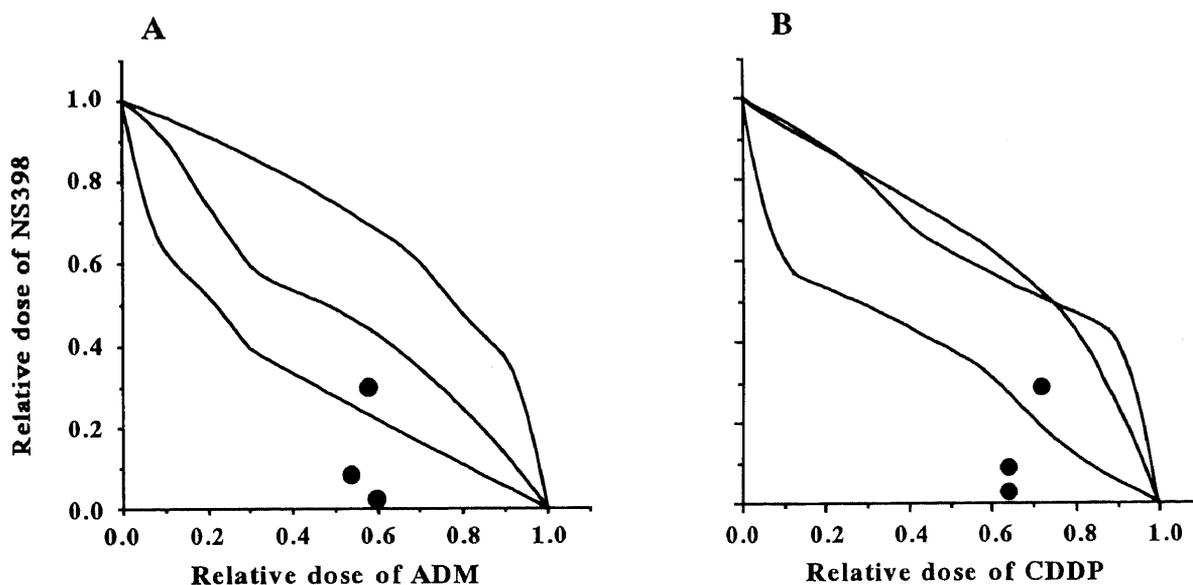


Fig. 5. IC₅₀ isobolograms of the use of NS-398 as an adjunct with ADM (A) or CDDP (B) in SBC-3 cell line. Synergistic or additive enhancement of chemosensitivity to ADM and CDDP was seen as a result of the adjunct use of NS-398.

Table 2. S-1452 modulation of sensitivities to anticancer agents of lung cancer cell lines

Cell lines	Agents	IC ₅₀ values (μM) ^{a)}	
		Vehicle	S-1452 (50 μM)
EBC-1	Adriamycin	0.18 ± 0.11 ^{b)}	0.18 ± 0.12
	Cisplatin	19.7 ± 7.6	15.1 ± 5.2
SBC-3	Adriamycin	0.10 ± 0.03	0.05 ± 0.03*
	Cisplatin	1.53 ± 0.65	1.46 ± 0.69

a) Drug concentration that inhibits cell growth by 50% by continuous drug exposure for 96 hr.
 b) Each value is $\bar{x} \pm SD$ of at least three independent experiments.
 *p < 0.05 compared with the value for the cells treated with vehicle.

V. TXA₂受容体拮抗薬S-1452の抗癌薬感受性におよぼす影響

COX-2の抗癌薬抵抗性作用に、COX-2によって合成され細胞外に放出されたTXA₂が関与しているか否かを明らかにするため、TXA₂受容体拮抗薬の抗癌薬感受性に及ぼす影響を細胞増殖阻害試験を用いて検討した。S-1452添加による抗癌薬感受性の変化を表2に示す。EBC-1では、S-1452添加によってADM、CDDPそれぞれのIC₅₀に有意な変化を認めなかった。一方SBC-3では、S-1452添加によってCDDPのIC₅₀は有意な変化を示さなかったが、ADMのIC₅₀は0.10 ± 0.03 μMから0.05 ± 0.03 μMへと50%減少した。したがって、SBC-3のADMに対する感受性をCOX-2が低下させる機序の一つに、細胞外へ放出された

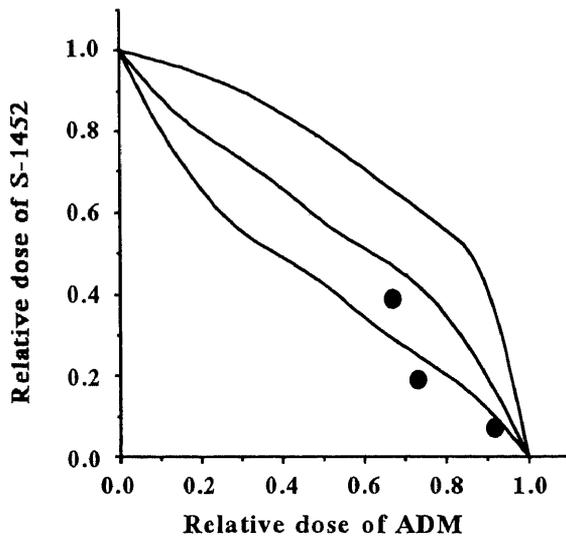


Fig. 6. IC_{50} isobologram of the use of S-1452 as an adjunct with ADM in SBC-3 cell line. Synergistic or additive enhancement of chemosensitivity to ADM was seen as a result of the adjunct use of S-1452.

TXA_2 が関与していることが示唆された。

VI. S-1452によるADMの作用増強効果の解析

S-1452によるADMの細胞増殖阻害作用増強効果を解析するために作成したアイソボログラムを図6に示す。各ドットは3本の曲線の範囲内と左下方に位置することから、両薬剤には相加および相乗効果があると考えられた。

考 察

プロスタグランジンや TXA_2 は、種々の組織において生合成される生理活性物質であり、これらのプロスタノイドはアラキドン酸を基質としてCOX系の酵素群により合成される。アラキドン酸は細胞膜の構成成分であるリン脂質に含まれているが、様々な刺激により活性化されたホスホリパーゼ A_2 によってリン脂質から遊離したのち、COXにより PGG_2 さらに PGH_2 へと変換される。生成された PGH_2 は、PGD合成酵素、PGE合成酵素、PGF合成酵素、プロスタサイクリン合成酵素およびトロンボキサン合成酵素の作用によりそれぞれ PGD_2 、 PGE_2 、 $PGF_2\alpha$ 、 PGI_2 および TXA_2 が合成される。これらの代謝産物は生成後、細胞内にはとどまらず細胞外へ放出されて、それぞれのレセプターに結合することにより作用を現す。これらプロスタノイドには炎症や免疫反応の制御作用以外にも様々な薬理作用がある。特に、血管新生や発癌など細胞の増殖・分化における役割が報告され、注目されている¹⁹⁾。その機序として、誘導型COX-2を介して産生され、オートクライン、パラクラインまたはフィードバック機構を利用して作用するプロスタノイドが重要と考えられている。

本研究では、肺癌におけるCOX-2の発現と抗腫瘍感受性におけるCOX-2の役割を解明する目的で、ヒト肺扁平上皮癌細胞株EBC-1とヒト肺小細胞癌細胞株SBC-3におけるCOX-2蛋白の発現と、抗腫瘍処理による変化、およびCOX-2阻害薬、 TXA_2 受容体拮抗薬の抗腫瘍感受性に及ぼす影響を検討した。ADMおよびCDDPの処理により、各細胞株においてCOX-2蛋白の発現

量の増加とともに、COX-2によるアラキドン酸の代謝産物である PGE_2 の増加を認めた。また、COX-2阻害薬であるNS-398は、肺癌細胞株のADMおよびCDDPに対する感受性を増強した。SBC-3では、ADM処理によって TXB_2 の産生量が増加し、 TXA_2 受容体拮抗薬であるS-1452はADMに対する薬剤感受性を増強した。これらのことから、抗腫瘍処理によって肺癌細胞内にCOX-2が誘導され、誘導されたCOX-2が癌細胞に抗腫瘍耐性を付与している可能性が示唆された。

COX-2は、炎症の他に癌化や腫瘍増殖に関与していると考えられており、その機序としては、血管新生²⁰⁾²¹⁾、アポトーシスの抑制²²⁾、サイトカインの産生²³⁾²⁴⁾などが挙げられている。Sawaokaら¹⁷⁾は、マウスの消化器癌細胞を、COX阻害薬およびCOX-2阻害薬で処理すると、癌細胞からの血管内皮細胞増殖因子の発現が抑制され、癌細胞の増殖が抑制されることを明らかにした。また、マウスの小腸上皮細胞にCOX-2を発現させると細胞のアポトーシスが抑制されることも報告されている²⁵⁾。

COX阻害薬の抗腫瘍感受性増強作用についてはいくつかの報告¹²⁾¹³⁾があるが、これらの報告では抗腫瘍感受性増強の機序は検討されていない。COX-2の選択的阻害薬による抗腫瘍増強作用については、定常状態でCOX-2を強く発現している非小細胞肺癌細胞株において、COX-2阻害薬のニメスライド(nimesulide)がCDDP、エトポシド(etoposide)、タキソテール(taxotere)およびSN-38に対する感受性を増強することをHidaら²⁶⁾が報告した。彼らはその機序として、ニメスライドによるアポトーシスの亢進が関与していると結論している。

本研究では、定常状態ではEBC-1、SBC-3ともにCOX-2の発現は軽度であったが、ADMまたはCDDPの処理により、COX-2の発現が誘導された。その結果、これらの癌細胞株では、アラキドン酸代謝産物である PGE_2 の産生が増加した。 PGE_2 には、宿主の抗腫瘍細胞を不活性化する作用²⁷⁾²⁸⁾や、アポトーシスを抑制する作用²⁹⁾、血管新生を促進する作用³⁰⁾、癌化を引き起こす作用³¹⁾、転移促進作用³²⁾などがあることが報告されている。COX-2阻害薬が抗腫瘍感受性を増強する機序として、これらの PGE_2 を介した作用が考えられた。この機序を明らかにするには、 PGE_2 阻害薬による抗腫瘍作用の変化を調べる必要がある。

抗腫瘍感受性における TXA_2 の関与については、ヒト非小細胞肺癌細胞株のS-1452処理によってCDDPに対する感受性が亢進することをKasaharaら³³⁾が見いだし、その機序としてCDDPの細胞内への能動輸送を司る Na^+ 、 K^+ ATPase活性の増加を明らかにした。またFujimuraら³⁴⁾は、 TXA_2 受容体拮抗薬が、CDDPによるヒト非小細胞肺癌細胞株のアポトーシスを増強すると報告している。今回の結果からヒト肺小細胞癌に対するADMの細胞増殖阻害においても、S-1452は同様の機序で感受性を亢進させている可能性がある。

本研究では、ADMおよびCDDPの投与によりEBC-1、SBC-3ともにCOX-2蛋白の発現が誘導されたが、アラキドン酸処理により細胞培養液中の TXB_2 が増加したのは、SBC-3をADMに曝露させた場合のみであった。これはS-1452の抗腫瘍感受性増強作用が認められたのが、SBC-3をADMに曝露させた場合のみであったことと一致していた。培養上清中の TXB_2 量が細胞株や抗腫瘍薬の種類によって異なっていたことは、小細胞肺癌と非小細胞肺癌とではアラキドン酸代謝が異なっていることを示している。したがって、抗腫瘍薬の感受性を増強するためには、アラキドン酸の代謝産物の拮抗薬よりもCOX-2阻害薬の方がより

有用であると思われる。

抗腫瘍への曝露によって腫瘍細胞内にCOX-2蛋白の発現が誘導されるメカニズムは不明である。同様の現象はヒトの胃癌細胞株においてマイトマイシンC (mitomycin C, MMC) を投与した際に認められている³⁶⁾。MMCを投与するとプロテインキナーゼC (protein kinase C, PKC) アルファ蛋白の発現が増加し、その後COX-2蛋白の発現が増加することから、この誘導過程にはPKCが関与していると推察されている。また、PKC阻害薬はMMCによるアポトーシスを増強することも報告されている³⁶⁾。他にも、各種抗腫瘍薬の作用機序としてアポトーシスの誘導を示唆する報告が散見されている³⁴⁾³⁷⁾³⁸⁾。一方、COX-2は細胞のアポトーシスに対して抵抗性に働くことが知られている²²⁾²⁵⁾。したがって、腫瘍細胞にアポトーシスをもたらす抗腫瘍薬の刺激に抵抗するために、腫瘍細胞内にCOX-2の発現が誘導される可能性が考えられる。これを明らかにするためには、アポトーシス誘導シグナルによるCOX-2の転写調節を明らかにする必要がある。

COX-2阻害薬に腫瘍増殖抑制効果や抗腫瘍感受性増強作用があることは従来から報告されてきた¹⁹⁾²¹⁾²²⁾²⁶⁾が、それらの大部分はCOX-2の発現が元々増加している腫瘍細胞に関する報告であった。本研究によって、定常状態ではCOX-2の発現がごく軽度の細胞株においても、抗腫瘍薬処理によってCOX-2発現が誘導され、その結果COX-2阻害薬による抗腫瘍感受性増強作用が認められることが明らかになった。この結果から、COX-2をあまり発現していない腫瘍においても、COX-2阻害薬の併用により、抗腫瘍増強効果が得られる可能性が示唆された。

放射線治療の併用³⁹⁾⁴⁰⁾や新規抗腫瘍薬の開発^{41)~43)}などにより、肺癌の化学療法の治療効果は改善されたものの未だ満足できるような成績ではない。また、近年切除不能の高齢者肺癌が増加したため、毒性の少ない治療方法の開発が急務である。抗腫瘍薬とCOX-2阻害薬の併用は、肺癌の新しい治療戦略として有用と思われる。

結 論

ヒト肺扁平上皮癌細胞株EBC-1とヒト肺小細胞癌細胞株SBC-3を用い、COX-2の発現とその発現の抗腫瘍薬処理による変化、およびCOX-2の抗腫瘍感受性に与える影響を検討し、以下の結論を得た。

1. 定常状態でのEBC-1およびSBC-3におけるCOX-2の発現は軽度であったが、ADMおよびCDDPへの曝露によりCOX-2の発現が誘導された。
2. ADMおよびCDDPへの曝露後、細胞株にアラキドン酸を添加すると、EBC-1およびSBC-3の細胞上清中のPGE₂の含量が増加した。したがって、抗腫瘍薬によって誘導されるCOX-2は機能的と考えられた。
3. COX-2阻害薬であるNS-398の添加は、EBC-1およびSBC-3のADMおよびCDDPに対する薬剤感受性を増強した。したがって、COX-2は抗腫瘍薬抵抗性に働くことが示された。
4. ADMの曝露後、細胞株にアラキドン酸を添加すると、SBC-3の細胞培養液中のTXB₂の含量が増加した。
5. TXA₂受容体拮抗薬であるS-1452の添加は、SBC-3のADMに対する薬剤感受性を増強した。したがって、COX-2によるSBC-3のADMに対する抵抗性作用増強には、細胞外に分泌されたTXA₂が関与している可能性が示唆された。

以上の成績から、抗腫瘍薬処理により誘導されたCOX-2は抗腫

瘍抵抗性に作用し、COX-2阻害薬はCOX-2活性を阻害し、またTXA₂受容体拮抗薬はTXA₂の情報伝達を阻害することによってADMおよびCDDPの抗腫瘍活性を増強させる可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師中尾眞二教授に深甚なる謝意を表します。終始、直接御指導いただきました金沢大学医学部内科学第三講座藤村政樹助教授、笠原寿郎講師に心より感謝の意を捧げます。また、御協力いただきました第三内科教室各位に厚く御礼申し上げます。

尚、本研究の要旨の一部は、第39回日本呼吸器学会総会(1999年3月)、第9回欧州呼吸器会議(スペイン、1999年10月)、第41回日本肺病学会総会(東京、2000年11月)において発表した。

文 献

- 1) Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 266: 12866-12872, 1991
- 2) Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2692-2696, 1991
- 3) 高橋吉孝, 山本尚三. シクロオキシゲナーゼ誘導の分子機構. *蛋白質核酸酵素* 37: 906-915, 1992
- 4) Marcus AJ. Aspirin as prophylaxis against colorectal cancer. *N Engl J Med* 333: 656-658, 1995
- 5) Giovannucci E, Egan KM, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE. Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N Engl J Med* 333: 609-614, 1995
- 6) Kargman SL, O'Neill GP, Vickers PJ, Evans JF, Mancini JA, Jothy S. Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Res* 55: 2556-2559, 1995
- 7) Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H, Ristimäki A. Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res* 58: 4997-5001, 1998
- 8) Hida T, Yatabe Y, Achiwa H, Muramatsu H, Kozaki K, Nakamura S, Ogawa M, Mitsudomi T, Sugiura T, Takahashi T. Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res* 58: 3761-3764, 1998
- 9) Hida T, Leyton J, Makheja AN, Ben-Av P, Hla T, Martinez A, Mulshine J, Malkani S, Chung P, Moody TW. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase activity and proliferation are inhibited by non-steroidal antiinflammatory drugs. *Anticancer Res* 18: 775-782, 1998
- 10) Rioux N, Castonguay A. Prevention of NNK-induced lung tumorigenesis in A/J mice by acetylsalicylic acid and NS-398. *Cancer Res* 58: 5354-5360, 1998
- 11) Achiwa H, Yatabe Y, Hida T, Kuroishi T, Kozaki K, Nakamura S, Ogawa M, Sugiura T, Mitsudomi T, Takahashi T. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase 2 expression in primary, resected lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 5: 1001-1005, 1999

- 12) Teicher BA, Korbut TT, Menon K, Holden SA, Ara G. Cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors as modulators of cancer therapies. *Cancer Chemother Pharmacol* 33: 515-522, 1994
- 13) Soriano AF, Helfrich B, Chan DC, Heasley LE, Bunn PA, Jr., Chou TC. Synergistic effects of new chemopreventive agents and conventional cytotoxic agents against human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 59: 6178-6184, 1999
- 14) Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Raz A, Needleman P. The induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem* 265: 16737-16740, 1990
- 15) Lee SH, Soyoola E, Chanmugam P, Hart S, Sun W, Zhong H, Liou S, Simmons D, Hwang D. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 267: 25934-25938, 1992
- 16) Futaki N, Takahashi S, Yokoyama M, Arai I, Higuchi S, Otomo S. NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro. *Prostaglandins* 47: 55-59, 1994
- 17) Sawaoka H, Tsuji S, Tsujii M, Gunawan ES, Sasaki Y, Kawano S, Hori M. Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo. *Lab Invest* 79: 1469-1477, 1999
- 18) Steel GG, Peckham MJ. Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: the concept of additivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 5: 85-91, 1979
- 19) Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, VanDePutte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 12: 1063-1073, 1998
- 20) Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 93: 705-716, 1998
- 21) Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res* 60: 1306-1311, 2000
- 22) Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, Levine AC. NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. *Cancer Res* 58: 4245-4249, 1998
- 23) Huang M, Stolina M, Sharma S, Mao JT, Zhu L, Miller PW, Wollman J, Herschman H, Dubinett SM. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Res* 58: 1208-1216, 1998
- 24) Stolina M, Sharma S, Lin Y, Dohadwala M, Gardner B, Luo J, Zhu L, Kronenberg M, Miller PW, Portanova J, Lee JC, Dubinett SM. Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. *J Immunol* 164: 361-370, 2000
- 25) Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 83: 493-501, 1995
- 26) Hida T, Kozaki K, Muramatsu H, Masuda A, Shimizu S, Mitsudomi T, Sugiura T, Ogawa M, Takahashi T. Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis and enhances cytotoxicity of various anticancer agents in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 6: 2006-2011, 2000
- 27) Parhar RS, Lala PK. Prostaglandin E₂-mediated inactivation of various killer lineage cells by tumor-bearing host macrophages. *J Leukoc Biol* 44: 474-484, 1988
- 28) Baxevasis CN, Reclus GJ, Gritzapis AD, Dedousis GV, Missitzis I, Papamichail M. Elevated prostaglandin E₂ production by monocytes is responsible for the depressed levels of natural killer and lymphokine-activated killer cell function in patients with breast cancer. *Cancer* 72: 491-501, 1993
- 29) Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E₂ in human colon cancer cells. *Cancer Res* 58: 362-366, 1998
- 30) Form DM, Auerbach R. PGE₂ and angiogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 172: 214-218, 1983
- 31) Watanabe K, Kawamori T, Nakatsugi S, Ohta T, Ohuchida S, Yamamoto H, Maruyama T, Kondo K, Ushikubi F, Narumiya S, Sugimura T, Wakabayashi K. Role of the prostaglandin E receptor subtype EP₁ in colon carcinogenesis. *Cancer Res* 59: 5093-5096, 1999
- 32) Fulton AM, Zhang SZ, Chong YC. Role of the prostaglandin E₂ receptor in mammary tumor metastasis. *Cancer Res* 51: 2047-2050, 1991
- 33) Kasahara K, Fujimura M, Bando T, Shibata K, Shirasaki H, Matsuda T. Modulation of sensitivity to cis-diamminedichloroplatinum (II) by thromboxane A₂ receptor antagonists in non-small-cell lung cancer cell lines. *Br J Cancer* 74: 1553-1558, 1996
- 34) Fujimura M, Kasahara K, Shirasaki H, Heki U, Iwasa K, Ueda A, Matsuda T. Up-regulation of ICH-1L protein by thromboxane A₂ antagonists enhances cisplatin-induced apoptosis in non-small-cell lung-cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 125: 389-394, 1999
- 35) Hsueh CT, Chiu CF, Kelsen DP, Schwartz GK. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 enhances mitomycin-C-induced apoptosis. *Cancer Chemother Pharmacol* 45: 389-396, 2000
- 36) Schwartz GK, Haimovitz-Friedman A, Dhupar SK, Ehleiter D, Maslak P, Lai L, Loganzo F, Jr., Kelsen DP, Fuks Z, Albino AP. Potentiation of apoptosis by treatment with the protein kinase C-specific inhibitor safinol in mitomycin C-treated gastric cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 87: 1394-1399, 1995
- 37) Di Bartolomeo S, Di Sano F, Piacentini M, Spinedi A. Apoptosis induced by doxorubicin in neurotumor cells is divorced from drug effects on ceramide accumulation and may involve cell cycle-dependent caspase activation. *J Neurochem* 75: 532-539, 2000
- 38) Shrivastava P, Sodhi A, Ranjan P. Anticancer drug-induced apoptosis in human monocytic leukemic cell line U937 requires activation of endonuclease(s). *Anticancer Drugs* 11: 39-48, 2000
- 39) Furuse K, Kubota K, Kawahara M, Kodama N, Ogawara M,

Akira M, Nakajima S, Takada M, Kusunoki Y, Negoro S, Matsui K, Masuda N, Takifuji N, Kudoh S, Nishioka M, Fukuoka M for the Southern Osaka Lung Cancer Study Group. Phase II study of concurrent radiotherapy and chemotherapy for unresectable stage III non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 13: 869-875, 1995

40) American Society of Clinical Oncology Group. Clinical practice guidelines for the treatment of unresectable non-small-

cell lung cancer. *J Clin Oncol* 15: 2996-3018, 1997

41) Saijo N. New chemotherapeutic agents for the treatment of non-small cell lung cancer: the Japanese experience. *Chest* 113: 17S-23S, 1998

42) Rigas JR. Do newer chemotherapeutic agents improve survival in non-small cell lung cancer? *Semin Oncol* 25: 5-9, 1998

43) Hoffman PC, Mauer AM, Vokes EE. Lung cancer. *Lancet* 355: 479-485, 2000

Role of Cyclooxygenase-2 in the Sensitivity to Anticancer Drugs in Human Lung Cancer Cell Lines. Saori Myo, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, 110, 87 — 95 (2001)

Key words lung cancer, cyclooxygenase-2, cyclooxygenase-2 inhibitor, prostaglandin E₂, thromboxane A₂

Abstract

To determine a role of cyclooxygenase-2 (COX-2) in the sensitivity of human lung cancer cell lines to anticancer drugs, expression of COX-2 by two cell lines, EBC-1 and SBC-3 and effect of COX-2 inhibitor on their sensitivities to adriamycin (ADM) and cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP) were investigated. Western blotting revealed COX-2 protein in the lysates of both cell lines at a low level. Exposure of these cell lines to ADM or CDDP augmented expression of COX-2 protein in a dose dependent manner. When these cell lines were incubated in the presence of arachidonic acid for 15 minutes after exposure to ADM or CDDP for 48 hours, they secreted significantly higher levels of prostaglandin E₂ (PGE₂) into culture medium than untreated cells, indicating that anticancer drug- inducible COX-2 has enzymatic activities. Treatment of these cell lines with 10 μ M of a COX-2 inhibitor NS-398 significantly enhanced vulnerability of the cells to ADM or CDDP as demonstrated by lowering of drug concentration inhibiting cell growth by 50%. The isobologram analysis showed that NS-398 had a synergic or additive effect on growth inhibition by ADM or CDDP in both cell lines. On the other hand, TXB₂, another metabolite of arachidonic acid by COX-2 and a surrogate for TXA₂, was more secreted from SBC-3 that had been exposed to 0.1 μ M of ADM than untreated SBC-3, but such enhanced secretion of TXB₂ was not observed either in SBC-3 exposed to CDDP or in EBC-1 exposed to ADM or CDDP. The vulnerability of SBC-3 to ADM was significantly enhanced by treatment with a TXA₂ receptor antagonist, S-1452, at a dose of 50 μ M as well. Isobologram analysis showed that S-1452 had a synergic or additive effect on growth inhibition of SBC-3 by ADM. These results indicate that treatments with anticancer agents induce COX-2 expression by lung cancer cells and that up-regulated COX-2 makes cancer cells resistant to growth inhibition by ADM and CDDP. Administration of COX-2 inhibitors or TXA₂ receptor antagonists may be useful in augmenting antitumor activities of ADM and CDDP.