

内因性カンナビノイド 2-arachidonoylglycerol による
新規抗結腸がんメカニズムの解明

2024

三竿 顕也

目次

1. 略語	2
2. 緒言	4
3. 実験方法	7
4. 結果	15
5. 考察	40
6. 総括	45
7. 参考文献	46
8. 謝辞	49
9. 補足資料	50

1. 略語

2-AG: 2-arachidonoylglycerol

AA: arachidonic acid

AEA: arachidonoyl ethanolamide (anandamide)

ANOVA: analysis of variance

BSA: bovine serum albumin

cAMP: cyclic adenosine monophosphate

CB: cannabinoid

COX: cyclooxygenase

CST: Cell Signaling Technology

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DCP1a: mRNA decapping enzyme 1A

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO: dimethyl sulfoxide

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

EP: E-type prostanoid

ERK: extracellular signal-regulated kinase

FBS: fetal bovine serum

FDA: Food and Drug Administration

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GEO: Gene Expression Omnibus

GPCR: G-protein coupled receptor

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HRP: horse radish peroxidase

IF: immunofluorescence

MAPK: mitogen-activated protein kinase

NSAIDs: non-steroidal anti-inflammatory drugs

Opti-MEM: optimum minimal essential medium

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis

P-body: processing body

PBS: phosphate buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

PGE₂: prostaglandin E₂

PGE₂-EA: prostaglandin E₂ ethanolamide

PGE₂-GE: prostaglandin E₂ glycerol ester

PLA₂: phospholipase A₂
PLB: passive lysis buffer
PVDF: polyvinylidene difluoride
qPCR: quantitative PCR
RIPA: radio-immunoprecipitation assay
RNA-seq: RNA-sequence
RT: reverse transcription
SDS: sodium dodecyl sulfate
TBS-T: 0.1% Tween 20 in tris-buffered saline
TPM: transcripts per million
TRPV1: transient receptor potential vanilloid 1
TTP: tristetraprolin
Tcf: T-cell factor

2. 緒言

近年、日本において大腸がんは部位別がん罹患率において第 1 位、死亡者数において第 2 位に位置している¹⁻³⁾。さらに、大腸がんを結腸がんと直腸がんに分けると、結腸がんは部位別がん罹患率では第 3 位、死亡者数では第 4 位に位置しており、日本人が罹患するがんにおいて多くの割合を占めている¹⁻³⁾。今後、高齢者数の増加に伴い、罹患率はさらに増加すると考えられ、新たな治療法・治療薬の開発が望まれる。

大腸がんの発症と悪性化には様々な要因が関与しているが、その一つは炎症が長期化することであると考えられている⁴⁾。これには炎症反応において重要な酵素である cyclooxygenase-2 (COX-2) が関与していることが報告されている^{5,6)}。したがって、COX-2 は大腸がんのバイオマーカーであると考えられる^{5,6)}。

COX-2 は炎症性の刺激によって誘導され、phospholipase A₂ (PLA₂) によって細胞膜より遊離する脂肪酸である arachidonic acid (AA) を基質として prostaglandin (PG) を産生する酵素である。当研究室ではこれまでに、ヒト初期結腸がん細胞である HCA-7 細胞を用いて、

- 1). PGE₂ が PGE₂ 受容体サブタイプの一つである、E-type prostanoid receptor 4 (EP4) 受容体を介して COX-2 発現を誘導すること
- 2). これにより PGE₂ の産生が亢進し、さらに COX-2 発現を誘導するポジティブフィードバックループが形成され、結腸上皮のホメオスタシスが崩壊すること
- 3). これらのメカニズムが結腸がんの発生に寄与している可能性を示してきた⁷⁾ (Figure 1)。

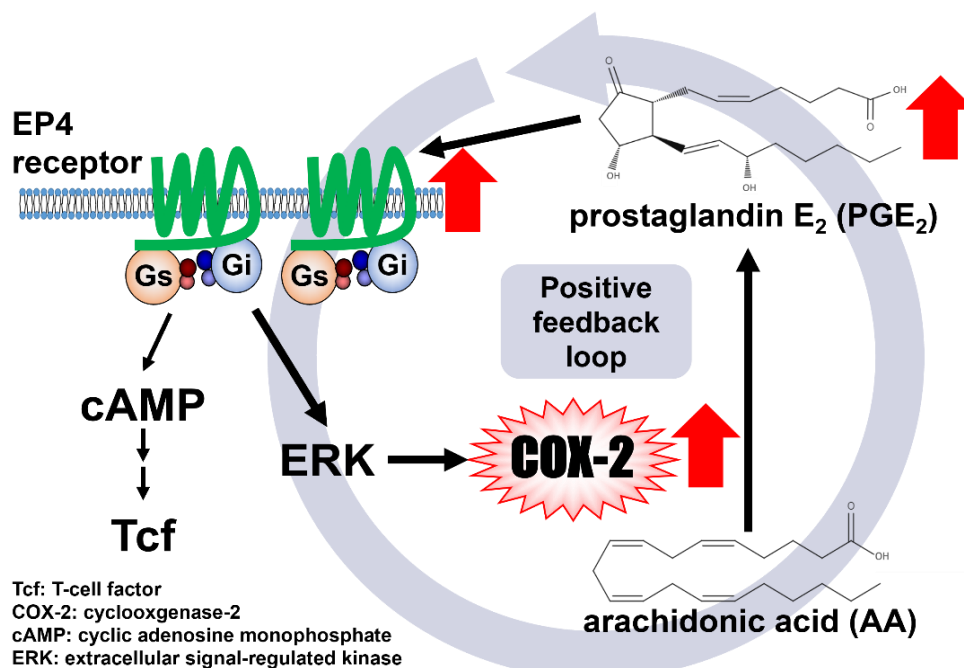


Figure 1. A schematic diagram of EP4-COX-2-PGE₂ positive feedback loop.

したがって、COX-2 の機能または発現を阻害することは大腸がんの予防・治療に有効であると考えられている。大腸がんにおける COX-2 阻害の重要性は、これまでも報告されており、例えば、COX-2 の機能を阻害する薬物である、非ステロイド性抗炎症薬 (non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs)は大腸がんの死亡率や罹患率を低下させることが報告されている^{8,9)}。

しかし、アメリカの Food and Drug Administration (FDA)によると、NSAIDs の長期服用は心血管リスクを上昇させる危険性があると報告されている¹⁰⁾。すなわち、従来の NSAIDs とは異なる機序を持つ COX-2 阻害薬は、心血管リスクを伴わない大腸がんの予防・治療により有用である可能性が考えられる。

また近年は、脂肪酸やその誘導体が COX-2 の発現を抑制することなどが報告されている¹¹⁾。我々のグループもこれまでに、腸内細菌である酪酸菌によって産生される短鎖脂肪酸である酪酸が、HCA-7 細胞において EP4 受容体の発現を低下させることで、COX-2 の発現を抑制することを報告している¹²⁾。したがって、これら脂肪酸やその誘導体は従来の NSAIDs とは異なる機序で COX-2 を抑制すると考えられ、新たな作用機序を持った抗炎症薬や大腸がん予防薬、治療薬の開発につながると考えられる。アスピリンやインドメタシン、イブプロフェンなどの従来の NSAIDs の作用は、主に COX-2 の機能を抑制することであり、COX-2 の発現そのものを抑制するものではない。しかし、COX-2 の発現を抑制することができれば、その機能も抑制されることから、大腸がんの予防・治療により有効であると考えられる。

そこで、本研究では脂肪酸の誘導体であり、内因性カンナビノイドである 2-arachidonoylglycerol (2-AG)および anandamide (AEA)と、それらの代謝物による COX-2 発現への影響を検討した。

2-AG は、脂肪酸である AA 誘導体であり、AA のカルボキシ基にグリセロールがエステル結合した内因性カンナビノイドの一種である。AEA も 2-AG と同様に AA の誘導体であり、AA のカルボキシ基にエタノールアミンがアミド結合した内因性カンナビノイドである。2-AG および AEA はカンナビノイド受容体 (CB 受容体)の内因性アゴニストであり、生体内では末梢組織と比較して中枢神経系において高いレベルで存在していることが知られているが、消化管にも分布し、その恒常性の維持に関与していることが報告されている^{13,14)}。2-AG および AEA は大腸がんや前立腺がんを始めとする種々のがんに対して *in vivo* および *in vitro* で抗がん作用を示すことも報告されている^{15,16)}。しかしながら、その詳細なメカニズムについては明らかになっていない。

本研究では、内因性カンナビノイドである 2-AG および AEA とその代謝物の大腸がんへの作用について、HCA-7 細胞を用いて、COX-2 の発現量を指標として検討し、その作用メカニズムを解明することを目標とした (Figure 2)。

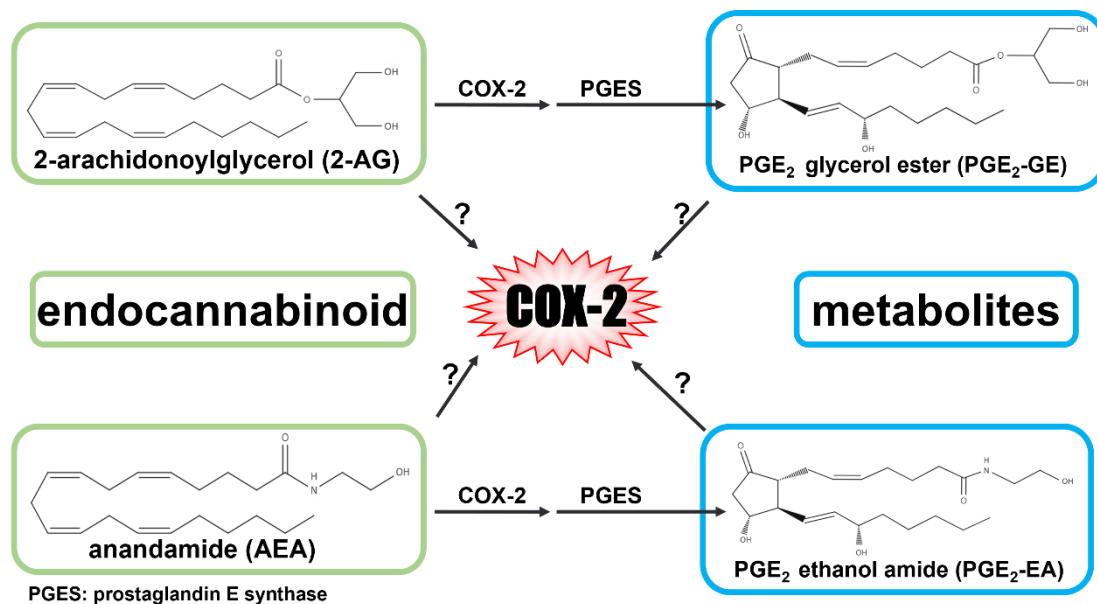


Figure 2. Structures of endocannabinoids and their metabolites.

3. 実験方法

3.1. Cell culture and reagents

ヒト初期大腸がん細胞株 HCA-7 細胞を 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) および 100 µg/mL streptomycin (Meiji Sika, Tokyo, Japan), 100 IU/mL penicillin (Meiji Sika)を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; nacalai tesque, Kyoto, Japan) を用いて、95% air, 5% CO₂, 37°C で培養した。2-AG (#62160), PGE₂-glycerol ester (PGE₂-GE; #10140), AEA (#90050), AA (#90010), PGE₂ (#14010), AM251 (#71670), AM630 (#10006974), BCTC (#10006309)は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)より購入した。PGE₂-ethanolamide (PGE₂-EA)は Santa Cruz Biotechnology (sc-222196, Santa Cruz, CA, USA)より購入した。TAK-715 は TargetMol (T6150, Boston, MA, USA)より購入した。

3.2. Western blotting

2.0 × 10⁵ 個の HCA-7 細胞を 6 well plate に播種し、37°Cでインキュベートした。48 時間後、100 µg/mL streptomycin, 100 IU/mL penicillin を含む optimum minimal essential medium (Opti-MEM; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)へと培地を交換し、さらに 16 時間インキュベートした。その後、2-AG およびその他の薬物を処置後、100-200 µL/well の protease inhibitor を含む radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA (pH 8.0), 1% Igepal CA-630, 0.5% sodium deoxycholate, 10 mM sodium fluoride, 10 mM disodium pyrophosphate, 0.1% SDS, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin)中でセルスクレーパーを用いて回収した。4°Cで 15 分間インキュベートした後、21100×g, 4°Cで 20 分間遠心分離し、上清を回収しサンプルとした。Bradford 法によりタンパク質濃度を測定し、15-25 µg/sample に調整後、5× laemmli buffer を加え、95°C で 5 分間加熱し、サンプルを sodium dodecyl sulfate (SDS)化した。これを SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (4% stacking gel, 10% running gel or 13% running gel) に供した。80 V および 120 V の定電圧条件で泳動後、0.1 A, 1 時間の条件で polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane に転写した。転写後 5% skim milk in Tris buffered saline (TBS-T)で室温にて 1 時間振盪することにより blocking した。その後下記に示す希釈条件で一次抗体を 4°C で一晩反応させた。その後 0.1% Tween 20 in TBS-T を用いて 10 分間の wash を 3 回行った後、二次抗体を同様に下記に示す条件で室温にて 1 時間反応させた。再び 10 分間の wash を 3 回行った後、membrane を Super Signal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific)反応液と 2-3 min 反応させ、ImageQuant LAS-4000 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA)によってバンドを検出した。p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)については、phospho-p38 MAPK を検出後、Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Fisher Scientific)によって stripping を行い、上記の方法の通り p38 MAPK の一次抗体および二次抗体を同様に反応させ total p38 MAPK を検出した。ローディングコントロールには β-tubulin を用いた。各バンドの

intensity を FijiI (U.S. National Institutes of Health; NIH)によって定量し、 β -tubulin の intensity で除することで標準化した。p38 MAPK リン酸化状態の定量には phospho-p38 MAPK のバンドの intensity を p38 MAPK の intensity で除することで算出した。mRNA decapping enzyme 1A (DCP1a)のリン酸化については、phospho-DCP1a の intensity を total DCP1a で除することにより算出した。使用した抗体は以下のとおりである。

antibodies

- anti-COX-2

Primary antibody: anti-COX-2 (#sc-19999, Santa Cruz Biotechnology)

1:500 in Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 (NKB-201, TOYOBO, Osaka, Japan)

Secondary antibody: goat anti-mouse horse radish peroxidase (HRP) conjugate (#1705047, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 1:5000 in 5% Bovine Serum Albumin (BSA) in TBS-T

- anti- β -tubulin

Primary antibody: anti- β -tubulin (#014-25041, FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan)

1:2000 in 5% BSA in TBS-T

Secondary antibody: goat anti-mouse HRP conjugate (#1705047, Bio-Rad Laboratories)
1:10000 in 5% BSA in TBS-T

- anti-DCP1a

Primary antibody: anti-DCP1a (#sc-100706, Santa Cruz Biotechnology)

1:500 in 5% BSA in TBS-T

Secondary antibody: goat anti-mouse HRP conjugate (#1705047, Bio-Rad Laboratories)
1:10000 in 5% BSA in TBS-T

- anti-phospho-p38 MAPK

Primary antibody: anti-phospho-p38 MAPK (#9210, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) 1:2000 in 5% BSA in TBA-T

Secondary antibody: goat anti-rabbit HRP conjugate (#1705046, Bio-Rad Laboratories)
1:10000 in 5% BSA in TBS-T

- anti-p38 MAPK

Primary antibody: anti-p38 MAPK (#9210, New England Biolabs)

1:2000 in 5% BSA in TBS-T

Secondary antibody: goat anti-rabbit HRP conjugate (#1705046, Bio-Rad Laboratories)

1:10000 in 5% BSA in TBS-T

3.3. Luciferase reporter gene assay (COX-2 promoter activity assay)

2.0×10^5 個の HCA-7 細胞を 6-well plate に播種し、10% FBS を含む DMEM を用いて、95% air, 5% CO₂, 37°C でインキュベーションした。48 時間後、抗生物質を含まない Opti-MEM へと培地を交換した。一過性トランスフェクションは、1.5 mL tube に分注した Opti-MEM に、トランスフェクション試薬である HilyMax (H375, Dojindo, Kumamoto, Japan) と、plasmid を下記の条件で加え、15 分間インキュベートし複合体を形成させた後、100 μ L を各 well に添加することにより行った。4 時間インキュベート後、100 μ g/mL streptomycin, 100 IU/mL penicillin を含む Opti-MEM に培地を交換し 2-AG, PGE₂ などの薬物を処置し 6 時間インキュベートした。その後、培地を除去し、150 μ L/well の 1 \times passive lysis buffer (PLB) を加えた。セルスクレーパーを用いて回収した後、14800 rpm, 4°C で 2 分間遠心分離し、上清をサンプルとした。Bradford 法によりタンパク質定量を行い、タンパク質 10-20 μ g を含むサンプルを 96-well white plate に分注した。その後、Dual-Luciferase Reporter Assay System (E1910, Promega, Madison, WI, USA) の Luciferase assay reagent II を各 well に 20 μ L 加え、firefly 由来の luciferase 活性 (COX-2 promoter activity) を測定した。続いて Stop&Glo Reagent 20 μ L を同様に加え、renilla 由来の luciferase 活性を測定した。発光はマイクロプレートリーダー (TECAN, Männedorf, Switzerland) を用いて測定した。得られた firefly luciferase 由来の値を renilla luciferase 由来の値で除することで標準化した。トランスフェクションのコンディションは以下のとおりである。

transfection conditions

COX-2 promoter containing plasmid (firefly luciferase, phPES2 (-1432/+59)¹⁷): 1000 ng/well

pRL-CMV control plasmid (renilla luciferase; E2261, Promega, Madison, WI, USA): 8 ng/well

HilyMax: 1.5 μ L/1000 ng DNA

Opti-MEM: 100 μ L/well

3.4. Immunofluorescence staining

UV照射により滅菌したカバーガラスを各 well に設置した 6-well plate に、 2.0×10^5 個の HCA-7 細胞を播種し、10% FBS を含む DMEM を用いて、95% air, 5% CO₂, 37°C でインキュベーションした。48 時間後、100 µg/mL streptomycin, 100 IU/mL penicillin を含む Opti-MEM へと培地を交換し、さらに 16 時間インキュベートした。その後 2-AG および PGE₂ を 6 時間処置した。培地を吸引後、Phosphate buffered saline (PBS) による wash を行い、-20°C にて冷却した 100% methanol を各 well に加えることで細胞の固定および透過処理を行った。固定後、PBS を用いて 5 分間の wash を 2 回行い、1% BSA in PBS を加え室温で 1 時間振盪することにより blocking を行った。続いて、下記の条件で一次抗体を加え、室温で 1 時間反応させたのち、PBS で 5 分間の wash を 2 回行った。次に、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 11034-14, nacalai tesque) と Alexa Flour 488 標識二次抗体 (#4408, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を加え、遮光して室温で 1 時間反応させた。その後、PBS で 5 分間の wash を 2 回行った後、カバーガラスを取り出し、封入剤として PermaFluor Aqueous Mounting Medium (TA-030-FM, Eprexia, Portsmouth, NH, USA) を用いてスライドガラスに固定し、プレパラートを作製した。このプレパラートを共焦点レーザー顕微鏡 LSM700 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) で観察した。対物レンズには倍率 40 倍の油浸レンズを用いた。免疫染色画像中の緑色蛍光について、閾値以上の大きさのものを processing body (P-body) とし、FijiJ (NIH) およびプログラミング言語である Python 3.9.18 を用いてその数を測定し、核の数で除することで細胞あたりの P-body 数を算出した。使用した抗体および DAPI の条件は以下のとおりである。

antibodies and DAPI

- Primary antibody: anti-DCP1a (#sc-100706, Santa Cruz Biotechnology)
1:500 in 1% BSA in PBS
Secondary antibody: anti-mouse IgG Alexa Flour 488 conjugated (#4408, Cell Signaling Technology) 1:1000 in 1% BSA in PBS
- Nuclear staining: DAPI 1:500 in 1% BSA in PBS

3.5. RNA extraction

2.0×10^5 個の HCA-7 細胞を 6-well plate に播種し、10% FBS を含む DMEM を用いて、95% air, 5% CO₂, 37°C でインキュベートした。48 時間後、100 µg/mL streptomycin, 100 IU/mL penicillin を含む Opti-MEM へと培地を交換し、さらに 16 時間インキュベートした。その後、2-AG およびその他の薬物を処置し、trypsin 処理によって細胞を回収したのち、500×g, 5 分間遠心分離し、上清を除去し cell pellet を得た。その後、FavorPrep Tissue Total RNA Mini Kit (Favorgen, Ping Tung, Taiwan) を用いて total RNA を抽出した。抽出プロトコールは付属のものに従った。

3.6. RT-PCR

抽出した total RNA 1200 ng/sample を Oligo dT primer (FSK-201, TOYOBO) および ReverTra Ace (TRT-101, TOYOBO) を用いた逆転写反応に供し、cDNA を合成した。合成した cDNA を template として、COX-2 および glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 遺伝子を 2-step polymerase chain reaction (PCR) によって増幅した。逆転写反応および 2-step PCR の条件、使用した primer (Fasmac Co., Ltd., Kanagawa, Japan) は以下のとおりである。逆転写反応および 2-step PCR は Thermal Cycler Dice (TaKaRa, Shiga, Japan) を用いて行った。増幅産物を 2% アガロースゲル電気泳動によって分離し、GelDoc XR (Bio-Rad Laboratories) を用いて検出した。各バンドの intensity を FijiJ (NIH) によって定量し、COX-2 の値を GAPDH の値で除することで標準化した。

reverse transcription (RT) conditions

5×RT buffer (TRT-101, TOYOBO): 4 μL/sample
Revertra Ace (TRT-101, TOYOBO): 0.25 μL/sample
Oligo(dT)20 Primer (FSK-201, TOYOBO): 1 μL/sample
RNase Inhibitor, Recombinant (SIN-201, TOYOBO): 0.5 μL/sample
2.5 mM each dNTPs (02-002, Bio Academia, Osaka Japan): 4 μL/sample
Template (total RNA sample): 1200 ng/sample
Nuclease free water: up to 20 μL

primer sequences

COX-2 forward: 5'-ATGAGATTGTGGAAAAATTGCT-3'
COX-2 reverse: 5'-GATCATCTCTGCCTGAGTATC-3'
GAPDH forward: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA-3'
GAPDH reverse: 5'-TTCACACCCATGACGAACAT-3'

2-step PCR reagents

10 × robust buffer (02-002, Bio Academia): 1 μL/sample
Taq DNA polymerase (02-002, Bio Academia): 0.05 μL/sample
2.5 mM each dNTPs (02-002, Bio Academia): 0.8 μL/sample
Forward Primer (10 μM stock; final 200 nM): 0.2 μL/sample
Reverse Primer (10 μM stock; final 200 nM): 0.2 μL/sample
Template (cDNA sample): 1 μL/sample
Sterile distilled water: up to 10 μL (6.75 μL)

2-step PCR conditions

initial denaturation: 94°C, 1 min
[denaturation: 95°C, 10 sec
annealing and elongation: 65°C, 20 sec] × 25 cycles
final elongation: 72°C, 5 min
final hold: 4°C, keep

3.7. Real-Time PCR (RT-qPCR)

抽出した total RNA を nuclease free water を用いて 20 ng/sample に調整した。調整したサンプルを GoTaq 1-Step RT-qPCR Kit (A6020, Promega)を用いて RT- q PCR 反応に供した。PCR 反応は、ABI 7500 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)または CFX connect (Bio-Rad Laboratories)を用いて行った。閾値 (Ct)はシステムソフトウェアによって自動的に決定され、相対的 mRNA 発現レベルは、 $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて解析した。データは GAPDH を用いて標準化した。使用した primer (Fasmac)および PCR 条件は下記のとおりである。

primer sequences

COX-2 forward: 5'-ATGAGATTGTGGAAAAATTGCT-3'
COX-2 reverse: 5'-GATCATCTCTGCCTGAGTATC-3'
GAPDH forward: 5'-ATGGGGAAGGTGAAGGTCG-3'
GAPDH reverse: 5'-GGGGTCATTGATGGCAACAATA-3'

RT-qPCR conditions

reverse transcription: 40°C, 15 min
reverse transcriptase inactivation and GoTaq DNA Polymerase activation: 95°C, 10 min
[denaturation: 95°C, 30 sec
annealing and data collection: 58°C, 30 sec] × 45 cycles
[elongation: 72°C, 30 sec]

3.8. MTT assay

1.5 × 10⁵ 個の HCA-7 細胞を 12-well plate に播種し、37°C でインキュベートした。48 時間後、100 µg/mL streptomycin, 100 IU/mL penicillin を含む Opti-MEM へと培地を交換し、さらに 16 時間インキュベーションした。その後、2-AG, AA, AEA を処置し、6 時間後に培地を 0.5 mg/mL 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, 23547-76, nacalai tesque) を含む Opti-MEM に置換した。4 時間後、MTT 含有 Opti-MEM を除去したのち、500 µL/well の dimethyl sulfoxide (DMSO) を各 well に加えることで溶出し、540 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (TECAN) を用いて測定した。

3.9. 公共 RNA-seq データを用いたトランスクリプトーム解析

Gene Expression Omnibus (GEO) database に公開されている HCA-7 細胞の公共 RNA-seq データ¹⁸⁾ から SRR 番号を取得し、ikra pipeline (v2.0.1)¹⁹⁾ を用いて処理を行うことで、scaled transcripts per million (TPM) を取得した。取得した scaled TPM より、各遺伝子の mRNA レベルにおける発現量を解析した。以下に使用した公共 RNA-seq データの詳細を記述する。

details of the public RNA-seq data

GEO accession number: GSE199859

reference article: P-Cadherin regulates intestinal epithelial cell migration and mucosal repair, but is dispensable for colitis associated colon cancer.¹⁸⁾

analyzed samples: HCA-7 cells control replicate 1-4

analyzed sample GSM numbers: GSM5989674, GSM5989675, GSM5989676, GSM5989677

3.10. Ca²⁺ assay

1.0 × 10⁵ 個の HCA-7 細胞を 24-well plate に播種し、10% FBS を含む DMEM を用いて、95% air、5% CO₂、37°C の条件下で 48 時間インキュベーションした。その後、5 µM Fura-2 AM (F105, Dojindo) を含む Opti-MEM 300 µL に培地を交換し、さらに 2 時間インキュベーションした。その後、4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) buffer (20 mM HEPES, 115 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgCl₂, 13.8 mM glucose; pH 7.4) に培地を交換し、ベースの蛍光を測定後、2-AG などの薬物を添加し、蛍光を測定した (励起波長: 340 nm/380 nm、蛍光波長: 510 nm)。TRPV1 アンタゴニストである BCTC (#10006309, Cayman Chemical) は 10 µM で、Ca²⁺ キレート試薬である ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 15130-95, nacalai tesque) は 2.5 mM で、それぞれ 30 分前処置したのち、2-AG を処置した。蛍光の測定にはマイクロプレートリーダー (TECAN) を用いた。340 nm 励起時の測定値を 380 nm 励起時の測定値で除したものを解析に用いた。

3.11. 統計解析

各 Figure のグラフは means \pm S.D. または means \pm S.E.M. を表しており、それぞれのグラフがどちらを用いているかは legend に記載している。統計解析は GraphPad Prism 8 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用いて行った。3 群以上の比較は、一元配置分散分析 (One-way analysis of variance: One-way ANOVA) とそれに続く多重比較検定により行った。用いた多重比較は Tukey's test および Dunnett's test である。各検定において p 値が 0.05 未満である場合に、有意な差があると判断した。

4. 結果

我々は以前、HCA-7細胞において、1 μM の PGE_2 を 6 時間処置すると、EP4 受容体を介して COX-2 の発現が誘導されることを報告している²⁰⁾。そこで、HCA-7 細胞における COX-2 発現に対する 2-AG および 2-AG とは別の内因性カンナビノイドである AEA、あるいは 2-AG の代謝物である PGE_2 -glycerol ester (PGE_2 -GE) および AEA の代謝物である PGE_2 ethanolamide (PGE_2 -EA) の影響を明らかにするために western blotting による検討を行った。また、2-AG と AEA の前駆体である AA も同様に用いて実験を行った。

4.1. 2-AG のみが PGE_2 によって誘導される COX-2 の発現を抑制する

2-AG や AEA およびこれらの代謝物と、その前駆体である AA を PGE_2 処置の 30 分前にそれぞれ 30 μM で前処置した。その結果、Figure 3 に示すように、2-AG は 1 μM PGE_2 の 6 時間処置によって誘導される COX-2 の発現を有意に抑制した。一方で、 PGE_2 -GE, AEA および PGE_2 -EA は COX-2 発現を抑制しなかった。AA は COX-2 発現をわずかに抑制したが、有意ではなかった。また、30 μM AA の 6 時間処置では Ctrl と比較して細胞生存率が約 40%、30 μM AEA の 6 時間処置では約 30%程度まで有意に減少していた (Figure 4)。これは AA および AEA によって細胞死が誘導されたことを示唆している。AA および AEA 処置群では細胞死が認められたことや、代謝物では COX-2 発現抑制作用がみられなかったことから、その後の検討では対象を 2-AG に絞り、その抑制作用のメカニズムを検討することとした。

4.2. 2-AG は PGE_2 によって誘導される COX-2 の発現を濃度依存的に抑制する

続いて、2-AG の COX-2 発現抑制作用における濃度依存性を検討した。その結果、1 μM の PGE_2 を 6 時間処置する前に 0-30 μM の 2-AG で 30 分間前処置すると、COX-2 の発現は濃度依存的に抑制された (Figure 5)。特に、10 μM と 30 μM の 2-AG 前処置群では Ctrl レベルまで抑制され、有意な作用が認められた (Figure 5)。

4.3. 公共 RNA-seq データ解析による、CB1 および CB2 受容体、TRPV1 の発現解析

2-AG は内因性カンナビノイドであり、CB 受容体である CB1 および CB2 の内因性アゴニストであることが知られている¹⁴⁾。また、 Ca^{2+} を透過させるチャネルであり、トウガラシに含まれる capsaicin の受容体である、transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) に対しても、アゴニストとして作用することが報告されている^{14,21,22)}。そこで、HCA-7 細胞にお

ける 2-AG の COX-2 発現抑制作用がこれらの受容体やチャネルを介しているかについて検討することとした。

まず、GEO database 上に公開されている HCA-7 細胞を用いた公共 RNA-seq データ (GEO accession number: GSE199859) を ikra pipeline (v2.0.1) を用いて解析することにより^{18,19)}、HCA-7 細胞にこれらの受容体およびチャネルが mRNA レベルにおいて発現しているかについての検討を行った。その結果、HCA-7 細胞には CB1 および CB2 は mRNA レベルにおいてほとんど発現していないことが明らかとなった (Figure 6)。一方で、TRPV1 については mRNA レベルにおいて、HCA-7 細胞に発現していることが知られている EP4 受容体と同程度に発現していることが明らかとなった (Figure 6)^{12,20)}。

4.4. 2-AG の作用は受容体である CB1 および CB2 を介さない

公共 RNA-seq データ解析の結果から、2-AG による COX-2 発現抑制作用は受容体である CB1 および CB2 を介さない可能性が考えられた。このことを確認するために、CB1 のアンタゴニストである AM251 および CB2 のアンタゴニストである AM630 を 10 μ M で 30 分前処置することで検討を行った。その結果、これらのアンタゴニストを前処置しても、2-AG よって抑制された COX-2 発現は回復しなかった (Figure 7)。

4.5. 2-AG は TRPV1 を介して細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を上昇させる

公共 RNA-seq データの解析の結果から、2-AG の作用点であると考えられる TRPV1 が HCA-7 細胞に mRNA レベルで発現していることが明らかとなった (Figure 6)。そこで、TRPV1 は Ca^{2+} を透過する Ca^{2+} チャネルであることから²¹⁾、Fura-2 AM を用いた Ca^{2+} assay を行うことにより、2-AG が TRPV1 を活性化するかについての検討を行った。その結果、30 μ M 2-AG 単独刺激によって刺激後数秒のうちに $[Ca^{2+}]_i$ の上昇がみられた (Figure 8A)。この 2-AG による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は、TRPV1 のアンタゴニストである BCTC を 10 μ M で 30 分前処置することにより完全に抑制された (Figure 8B)。すなわち、HCA-7 細胞において、2-AG は TRPV1 に作用して $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させていることが明らかとなった。

また、 PGE_2 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の変化がみられなかったことから、HCA-7 細胞において、 PGE_2 は $[Ca^{2+}]_i$ を変化させないことも明らかとなった (Figure 8A)。

さらに、ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を 2.5 mM で 30 分前処置することにより buffer 中の Ca^{2+} をキレートし測定を行ったところ、2-AG 添加直後の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇はみられたものの、その後の持続的な $[Ca^{2+}]_i$ の増加はみられなくなった (Figure 8C)。

4.6. 2-AG による COX-2 発現抑制作用は TRPV1 を介したのではない

HCA-7 細胞において、2-AG が TRPV1 に作用し、 $[Ca^{2+}]_i$ を変化させていることが明らかとなった。そこで、COX-2 発現抑制作用における TRPV1 の関与を検討するために、10 μ M の BCTC を 30 分前処置し、western blotting を行った。その結果、2-AG による COX-2 発現抑制作用は BCTC の前処置によってキャンセルされなかった (Figure 9)。このことより、2-AG による COX-2 発現抑制作用は TRPV1 を介したのではないことが示唆された。

4.7. 2-AG は COX-2 promoter 転写活性を抑制しない

続いて、2-AG による COX-2 発現抑制作用が COX-2 遺伝子の mRNA への転写の抑制に起因するかどうかについて、COX-2 遺伝子のプロモーター領域を firefly luciferase の上流に組み込んだプラスミドを用いて luciferase reporter gene assay を行うことにより検討した¹⁷⁾。その結果、COX-2 のタンパク質発現レベルにおいて有意な抑制作用がみられた 10 および 30 μ M の 2-AG を 30 分前処置しても、1 μ M PGE₂ 6 時間処置により有意に上昇した COX-2 プロモーター活性は、抑制されなかった (Figure 10)。このことから、2-AG による COX-2 発現抑制作用は COX-2 の転写を抑制することによるものではないことが示唆された。

4.8. 2-AG は COX-2 mRNA の発現を抑制する

続いて、luciferase reporter gene assay の結果の確認および COX-2 mRNA の発現量を検討するために RT-PCR による検討を行った。30 μ M の 2-AG または 1 μ M の PGE₂ またはその両方を 0-6 時間処置し、total RNA を抽出後、RT-PCR を行った。その結果、PGE₂ 単独処置群では 0.5 時間および 1 時間で増加した COX-2 mRNA 発現量が 6 時間後まで維持されていた (Figure 11)。それに対し、2-AG と PGE₂ の共処置群では、COX-2 mRNA 量は 0.5 時間および 1 時間で PGE₂ 単独処置群と同程度まで増加したが、6 時間後には Ctrl とほぼ同レベルまで減少していた (Figure 11)。これらの luciferase reporter gene assay および RT-PCR の結果は、2-AG が COX-2 の転写には影響を与えず、COX-2 の mRNA 分解を誘導することで、COX-2 の発現を抑制している可能性が示唆された。

4.9. 2-AG は processing body (P-body) の形成を促進する

RT-PCR によって、2-AG が COX-2 mRNA の分解を促進している可能性が示唆された。そこで、RNA の分解の場である processing body (P-body) の形成に対して、2-AG が与える影響について蛍光免疫 (immunofluorescence; IF) 染色法によって検討を行った²³⁾。COX-2 の mRNA は P-body に集積することが報告されている²⁴⁾。また、COX-2 mRNA は P-body で分解されることなども報告されている²⁵⁾。Figure 12A の IF 染色法画像中の緑色蛍光は P-body

のマーカーである DCP1a を、青色は DAPI によって染色された核を示している。DCP1a は P-body に特異的に集積することから^{23,26)}、緑色の斑点状の部分が P-body であると考えられる。Figure 12B に示すように、1 μM PGE₂ 6 時間処置では P-body 数の変化はみられなかったが、30 μM 2-AG を 6 時間処置することにより細胞あたりの P-body 数の有意な増加が認められた。また、AA および AEA でも同様に P-body に形成に与える影響を検討した。その結果、30 μM AA および 30 μM AEA の 6 時間処置では P-body 数の増加は認められなかった (Figure 13A, B)。これらのことから、2-AG は P-body の形成を促進することにより mRNA の分解を誘導している可能性が考えられ、その作用は 2-AG 特異的であることが考えられた。

4.10. 2-AG は 30 分以内に DCP1a のリン酸化と P-body 形成を促進する

続いて、2-AG の P-body 形成促進作用の時間依存性について検討した。Figure 14A, B に示すように 30 μM 2-AG は処置後 30 分以内に P-body の形成を有意に促進させた。ここで、P-body の形成にはその構成要素である DCP1a のリン酸化が関与することが報告されている²⁷⁾。しかし、残念ながらリン酸化 DCP1a に対する特異的な抗体は現在市販されていない。その一方で、western blotting によって観察される複数の DCP1a のバンドのうち、より高分子量側に存在するものはリン酸化 DCP1a であると報告されている^{27,28)}。そこで、2-AG が DCP1a のリン酸化に与える影響について、高分子量側に検出されるバンドをリン酸化 DCP1a (phospho-DCP1a; p-DCP1a) であると考え、DCP1a のリン酸化状態について western blotting による検討を行った。その結果、30 μM 2-AG を 0-6 時間処置すると、いずれの時間においても DCP1a のバンドは高分子量側へとシフトしており、定量的結果 DCP1a のリン酸化が有意に誘導されたことが明らかとなった (Figure 15)。これらのことから、2-AG は DCP1a のリン酸化を介して P-body の形成を促進している可能性が示唆された。

4.11. 2-AG は p38 MAPK を活性化する

DCP1a のリン酸化は p38 MAPK によって誘導されることや²⁷⁾、2-AG が p38 MAPK を活性化することが報告されている²⁹⁾。そこで、2-AG による DCP1a のリン酸化の誘導メカニズムを明らかとするために、2-AG が p38 MAPK を活性化するかどうかについて検討を行った。その結果、Figure 16 に示すように、30 μM 2-AG は処置後 30 分以内に、有意に p38 MAPK のリン酸化を誘導した。

4.12. 2-AG は p38 MAPK の活性化を介して DCP1a をリン酸化する

続いて、p38 MAPK の活性化が DCP1a のリン酸化亢進の要因であるかについて、p38 MAPK 特異的阻害薬である TAK-715 を用いることで検討を行った。その結果、2-AG によって有意に促進された DCP1a のリン酸化は、10 μ M の TAK-715 を 30 分前処置することにより Ctrl レベルまで有意に抑制された (Figure 17)。これらの結果から、2-AG は、p38 MAPK の活性化を介して DCP1a のリン酸化を誘導していることが示唆された。

4.13. 2-AG は p38 MAPK の活性化を介して P-body の形成を促進する

p38 MAPK 阻害によって DCP1a のリン酸化が抑制されたことから、P-body の形成に与える p38 MAPK の影響について、IF 染色法を用いて検討した。その結果、10 μ M TAK-715 を 30 分前処置することにより、30 μ M 2-AG の 6 時間処置によって増加した P-body 数は、Ctrl レベルまで有意に抑制された (Figure 18A, B)。これらのことから、2-AG は p38 MAPK の活性化を介して P-body の形成を促進している可能性が示唆された。

4.14. 2-AG は p38 MAPK の活性化を介して COX-2 の mRNA およびタンパク質発現を抑制する

次に、TAK-715 による p38 MAPK の阻害が、2-AG による、PGE₂ により誘導される COX-2 mRNA 発現の抑制作用に与える影響について検討した。その結果、10 μ M TAK-715 を 30 分前処置することによって、30 μ M 2-AG による、PGE₂ により誘導される COX-2 mRNA 発現の抑制作用はキャンセルされ、TAK-715 無処置時と比較して有意な上昇が認められた (Figure 19A)。このことから、2-AG は p38 MAPK を活性化することで COX-2 の mRNA 分解を誘導していることが示唆された。

続いて、TAK-715 による p38 MAPK の阻害が、2-AG による COX-2 タンパク質発現抑制作用に与える影響について検討した。その結果、10 μ M TAK-715 を 30 分前処置することによって、30 μ M 2-AG による、PGE₂ により誘導される COX-2 タンパク質発現の抑制作用はキャンセルされ、TAK-715 無処置時と比較して有意な上昇が認められた (Figure 19B)。このことから、2-AG は p38 MAPK を活性化することで COX-2 のタンパク質発現を抑制していることが示唆された。

4.15. 2-AG による COX-2 発現抑制作用は HCA-7 細胞特異的ではない

2-AG による、PGE₂ により誘導される COX-2 の発現の抑制作用が、HCA-7 細胞以外の大腸がん細胞でも認められるのかについて、後期大腸がん細胞である、HCT-15 細胞および DLD-1 細胞を用いて検討を行った。HCT-15 細胞および DLD-1 細胞における内因性の

COX-2 発現量は、HCA-7 細胞と比較して極端に低い (Figure 20A, B)。しかしながらこれらの細胞に対し、HCA-7 細胞と同様に 1 μ M の PGE₂ を 6 時間処置すると、HCT-15 細胞および DLD-1 細胞のどちらの細胞においても COX-2 の発現誘導が認められた (Figure 20A, B)。この PGE₂ による COX-2 の誘導作用は、30 μ M の 2-AG を 30 分前処置することによって抑制された (Figure 20A, B)。このことから、2-AG の COX-2 発現抑制作用は HCA-7 細胞に限定されるものではないことが考えられた。

以上の結果から、2-AG は p38 MAPK の活性化を通じて P-body 形成を促進し、COX-2 の mRNA の分解を誘導することで COX-2 のタンパク質発現を抑制している可能性が示唆された。

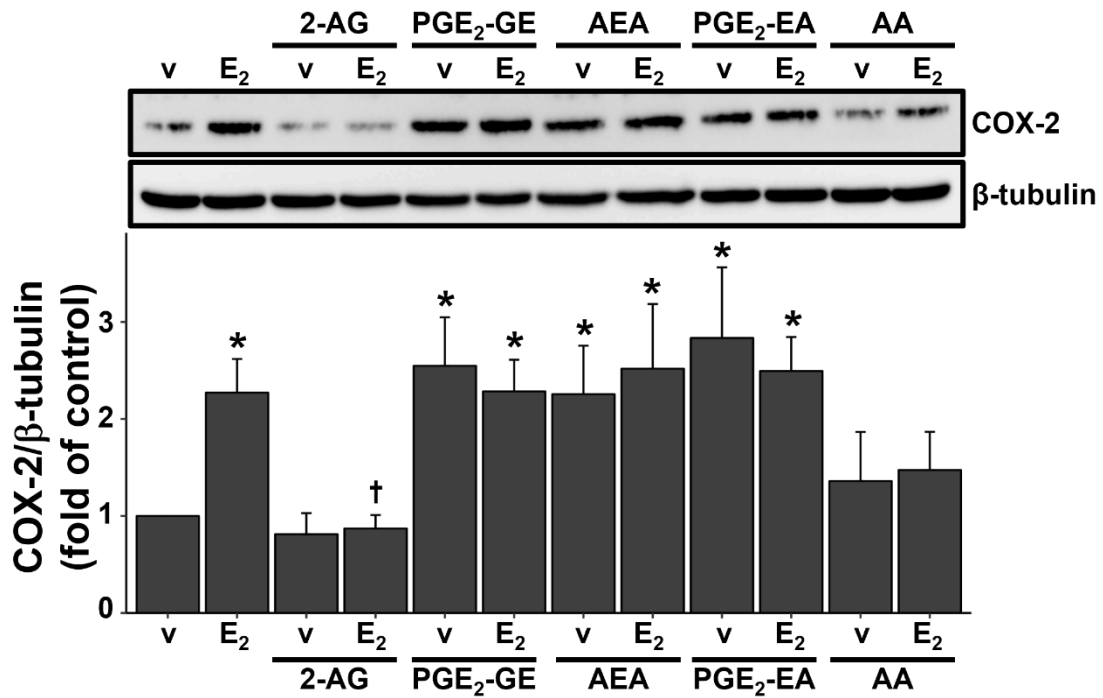


Figure 3. The inhibitory effects of endocannabinoids and their metabolites on COX-2 expression induced by PGE₂ in HCA-7 cells.

Cells were pretreated with 30 μM endocannabinoids or metabolites for 30 min followed by treatment with 1 μM PGE₂ for 6 h. Data are means ± S.D. of three independent experiments. **p* < 0.05 versus vehicle treatment, †*p* < 0.05 versus PGE₂ treatment, One-way ANOVA followed by Tukey's test. v: vehicle, E₂: PGE₂.

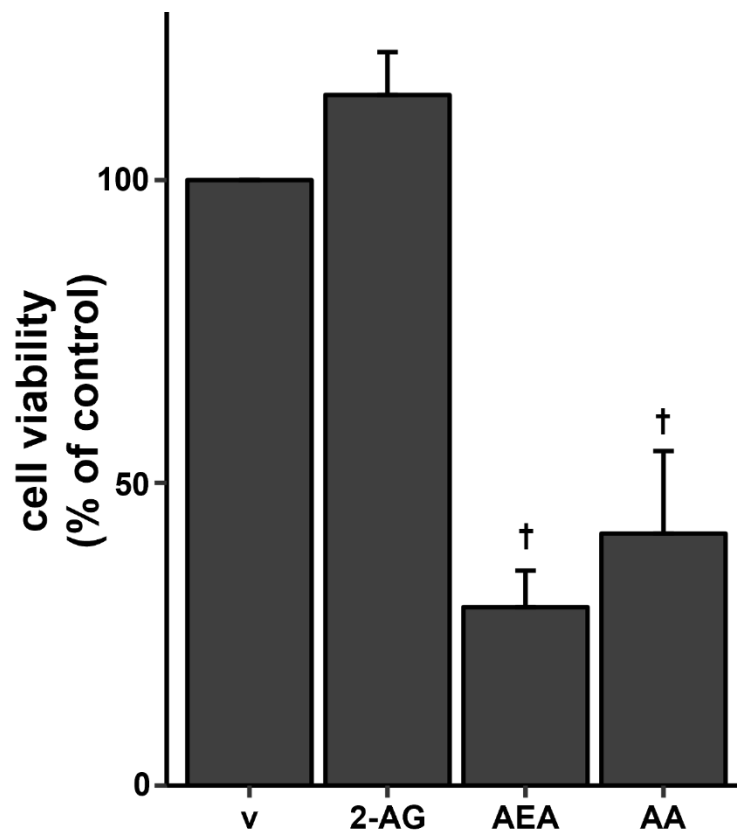


Figure 4. Treatment with AEA and AA, but not 2-AG, induced cell death in HCA-7 cells.

Cells were treated with 30 μ M 2-AG, AEA and AA for 6 h. After incubation, the medium was replaced to fresh Opti-MEM containing 0.5 mg/mL MTT. After 4 h incubation, the medium was removed and 500 μ L of DMSO was added to each well for the elution. Absorbance at 540 nm was detected. Data are means \pm S.E.M. of three independent experiments. † $p < 0.05$ versus vehicle, One-way ANOVA followed by Dunnett's test. v: vehicle.

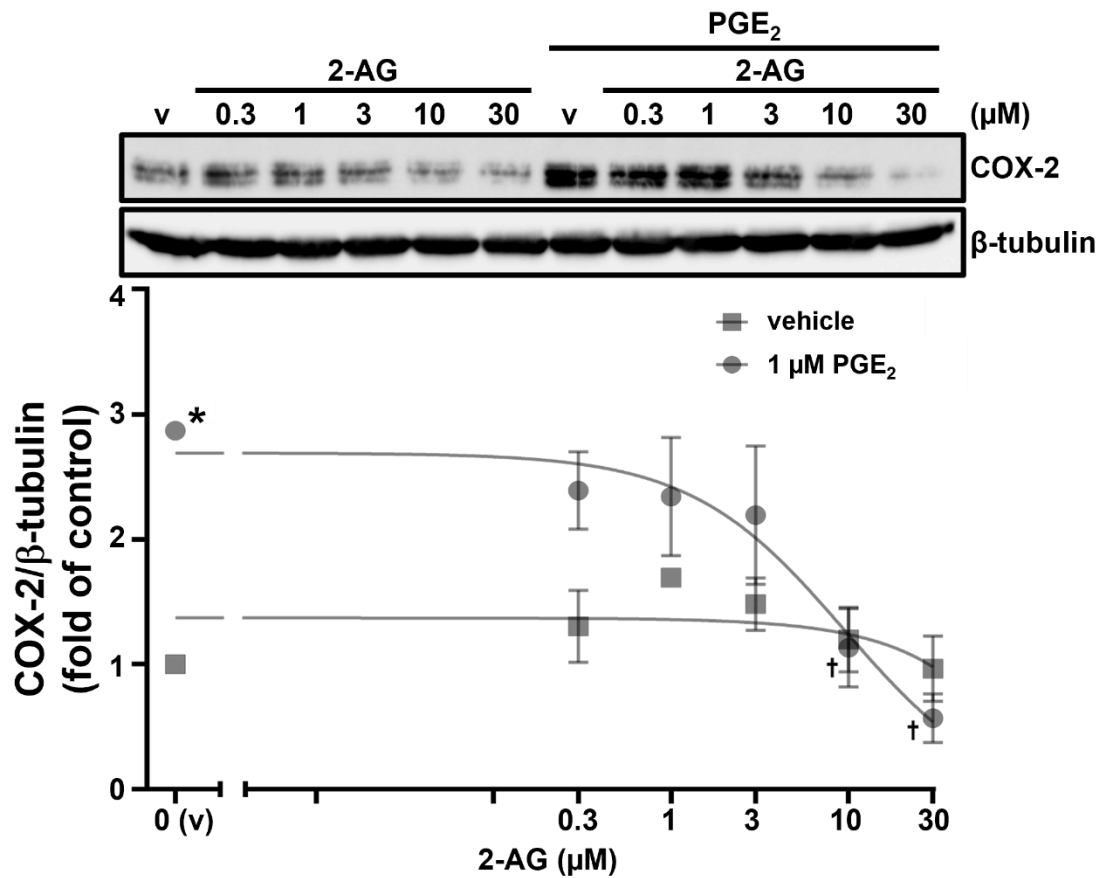


Figure 5. Treatment with 2-AG suppressed PGE₂-induced COX-2 in HCA-7 cells in a concentration dependent manner.

Cells were pretreated with indicated concentrations of 2-AG for 30 min followed by treatment with 1 μM PGE₂ for 6 h. Data are mean ± S.D. of three independent experiments. **p* < 0.05 versus vehicle treatment, †*p* < 0.05 versus PGE₂ treatment, One-way ANOVA followed by Tukey's test. v: vehicle.

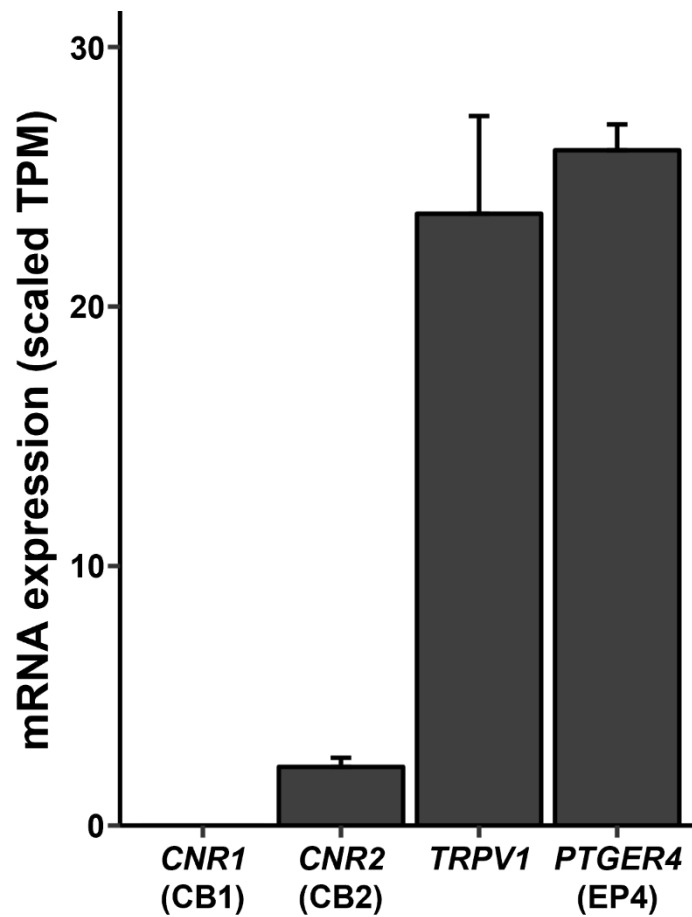


Figure 6. Cannabinoid receptors (CNR1, CNR2) and transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) mRNA expression levels in HCA-7 cells.

The public RNA-seq datasets obtained from GEO database (accession number: GSE199859) and analyzed by ikra pipeline (v2.0.1). CNR1, CNR2, and PTGER4 are the gene names of CB1, CB2, EP4 receptors, respectively. TPM: transcripts per million. Data are means \pm S.E.M.

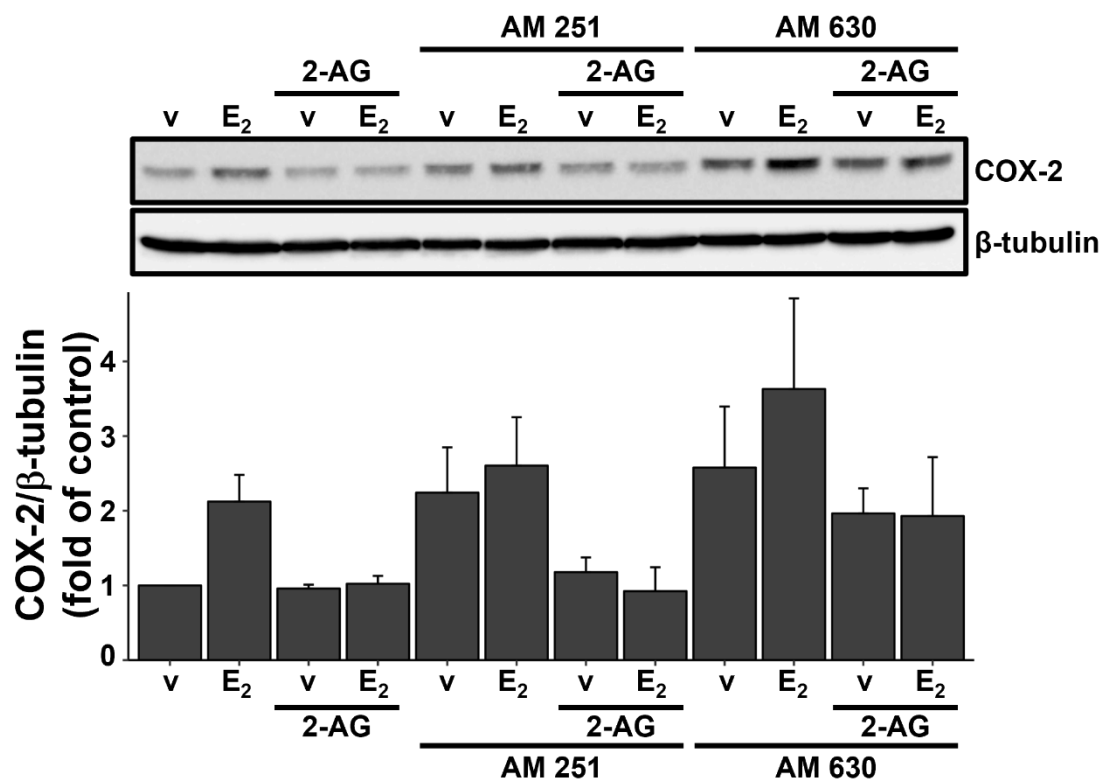


Figure 7. CB receptor antagonists (AM251, AM630) did not inhibit the effect of 2-AG on COX-2 expression.

Cells were pretreated with vehicle (v) or 10 μ M AM251 (CB1 antagonist) or AM630 (CB2 antagonist) for 30 min followed by treatment with 30 μ M 2-AG for 30 min, and then, further treatment with 1 μ M PGE₂ for 6 h. Data are mean \pm S.D. of three independent experiments. v: vehicle, E₂: PGE₂.

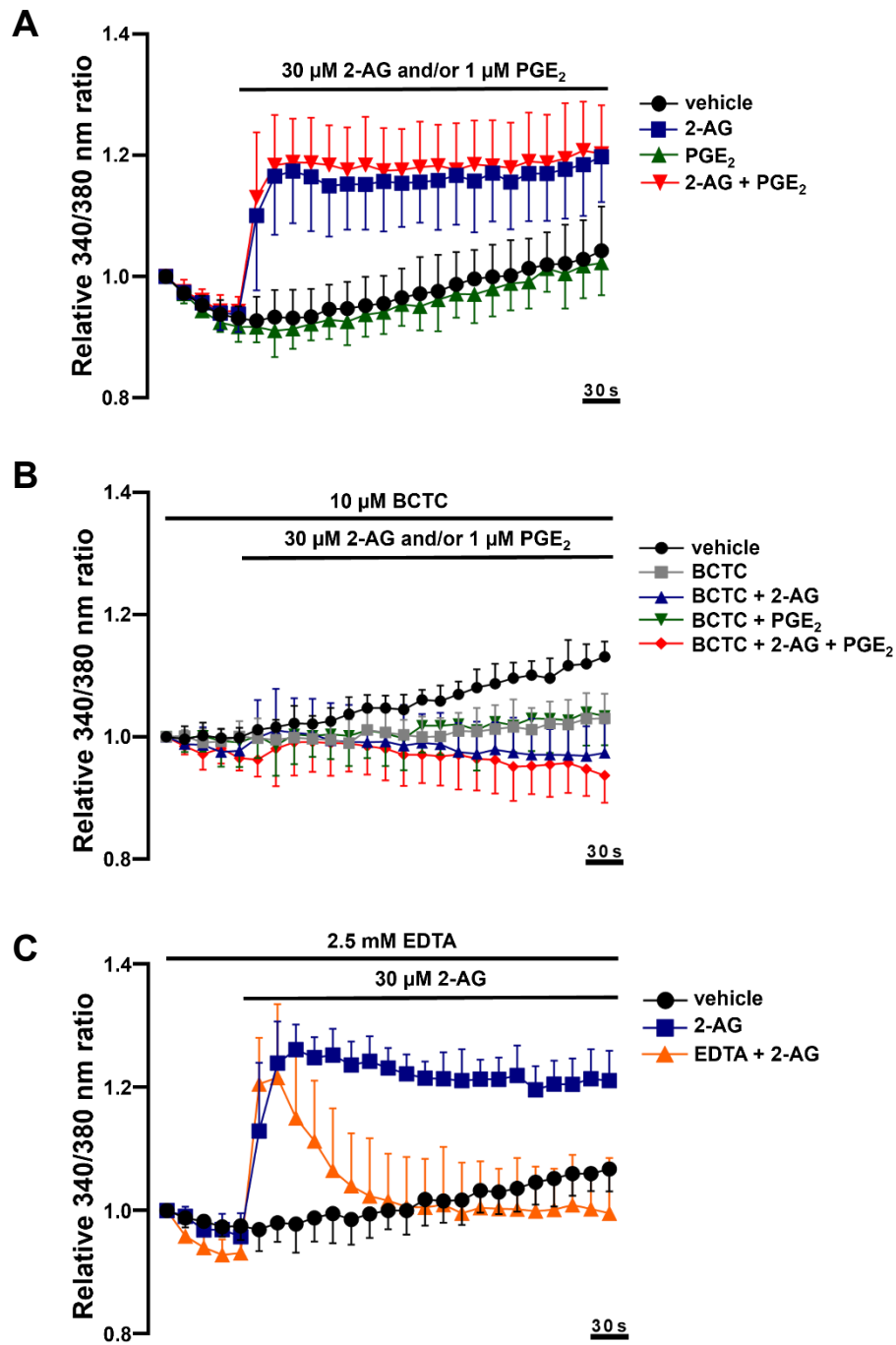


Figure 8. 2-AG increased intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) via TRPV1 (A, B); effects of EDTA $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in HCA-7 cells (C).

Cells were pretreated with 5 μM Fura-2 AM for 2 h followed by treatment with 30 μM 2-AG and/or 1 μM PGE₂ between cycle 5 and 6 (A), cells were pretreated with 10 μM BCTC (B) or 2.5 mM EDTA (C) for 30 min before measurement. Data are mean \pm S.D. of three independent experiments. Scale bar indicates 30 sec.

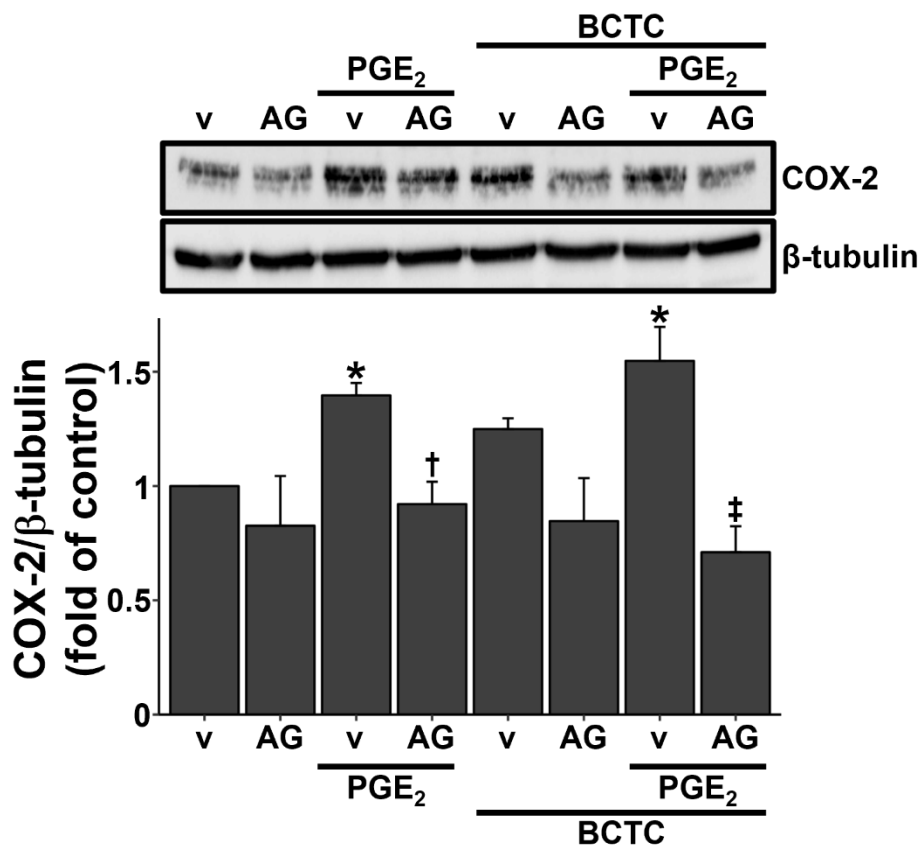


Figure 9. TRPV1 antagonist did not inhibit the effect of 2-AG on COX-2 expression.

Cells were pretreated with 10 μ M BCTC (TRPV1 antagonist) followed by treatment with 30 μ M 2-AG for 30 min, and then, further treatment with 1 μ M PGE₂ for 6 h. Data are means \pm S.D. of three independent experiments. * p < 0.05 versus vehicle treatment, † p < 0.05 versus PGE₂ treatment, ‡ p < 0.05 versus BCTC + PGE₂ treatment, One-way ANOVA followed by Tukey's test. v: vehicle, AG: 2-AG.

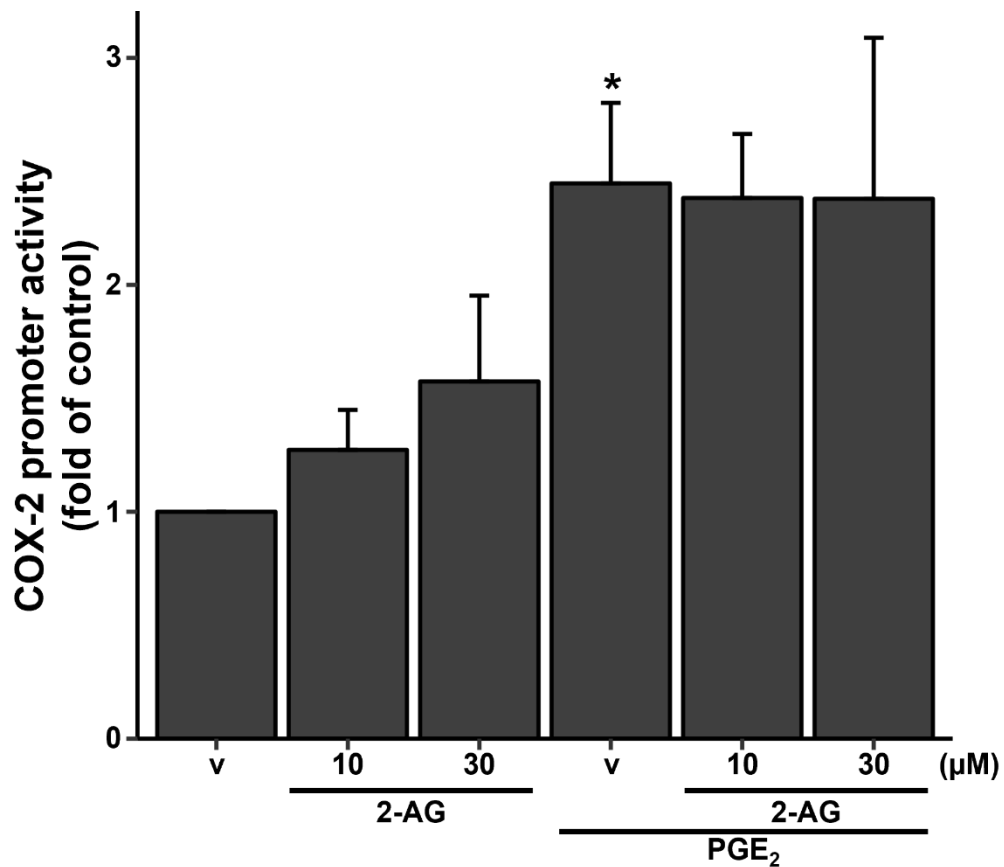


Figure 10. Treatment with 2-AG had little effect on COX-2 promoter activity.

Cells were transiently transfected with a plasmid containing the COX-2 promoter with pRL-CMV control plasmid for 4 h, and then cells were pretreated with 10 or 30 μM 2-AG for 30 min followed by treatment with 1 μM PGE₂ for 6 h. Data shows means ± S.D. of four independent experiments. **p* < 0.05 versus vehicle treatment, One-way ANOVA followed by Tukey's test. v: vehicle.

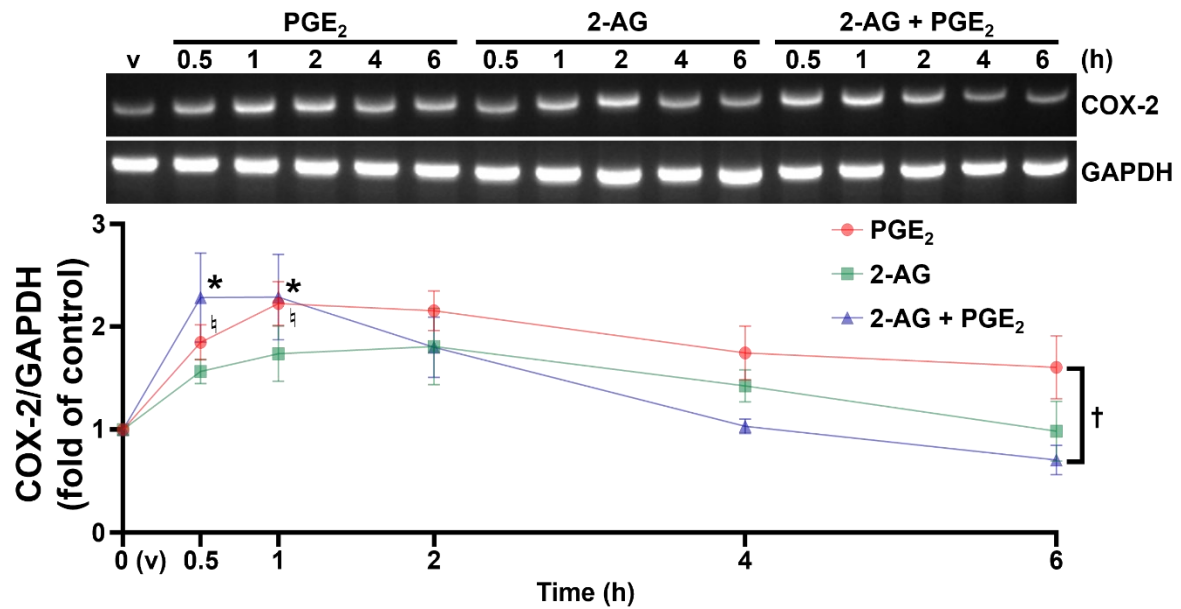


Figure 11. Treatment with 2-AG suppressed COX-2 mRNA expression.

Cells were pretreated with vehicle (v) or 30 μ M 2-AG for 30 min followed by treatment with 1 μ M PGE₂ for the indicated times and the levels of COX-2 mRNA expression were examined. Data are means \pm S.D. of three independent experiments. *, $\dagger p < 0.05$ versus vehicle treatment, $\ddagger p < 0.05$, One-way ANOVA followed by Tukey's test. v: vehicle.

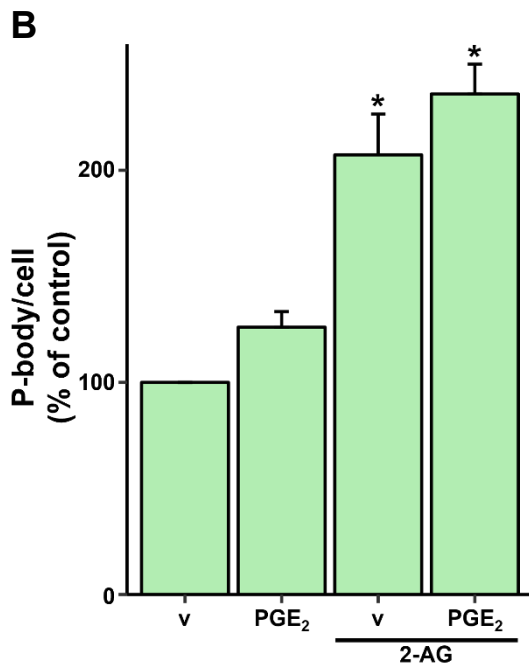
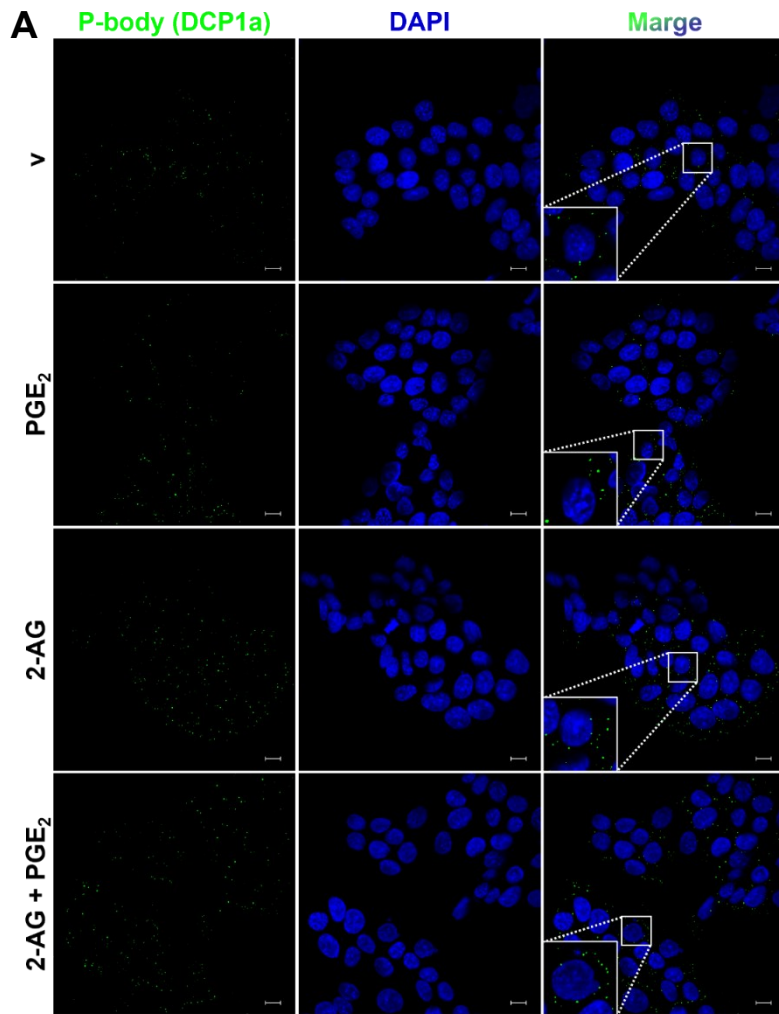


Figure 12. Treatment with 2-AG accelerated P-body formation.

(A) Cells were pretreated with vehicle (v) or 30 μ M 2-AG for 30 min followed by treatment with 1 μ M PGE₂ for 6 h and immunofluorescence staining was performed. Green indicates DCP1a, a P-body marker, and blue indicates nuclear staining (DAPI). Scale bar; 10 μ m. (B) Graph shows the number of P-bodies per cell of panel A. Data are means \pm S.E.M. of three independent experiments. * p < 0.05 versus vehicle treatment, One-way ANOVA followed by Dunnett's test. v: vehicle.

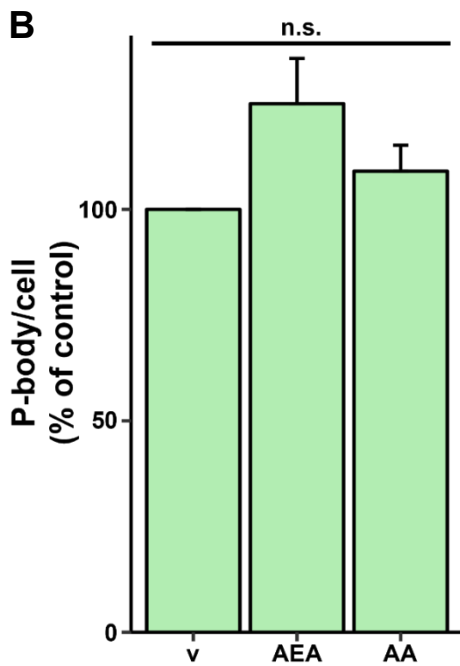
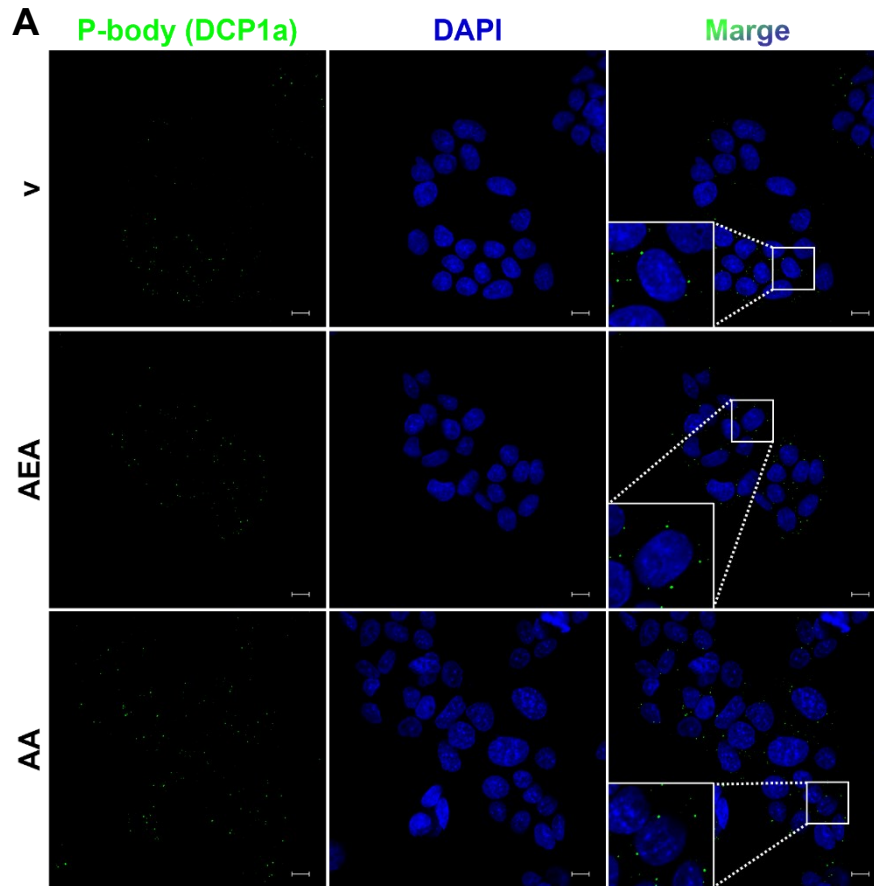
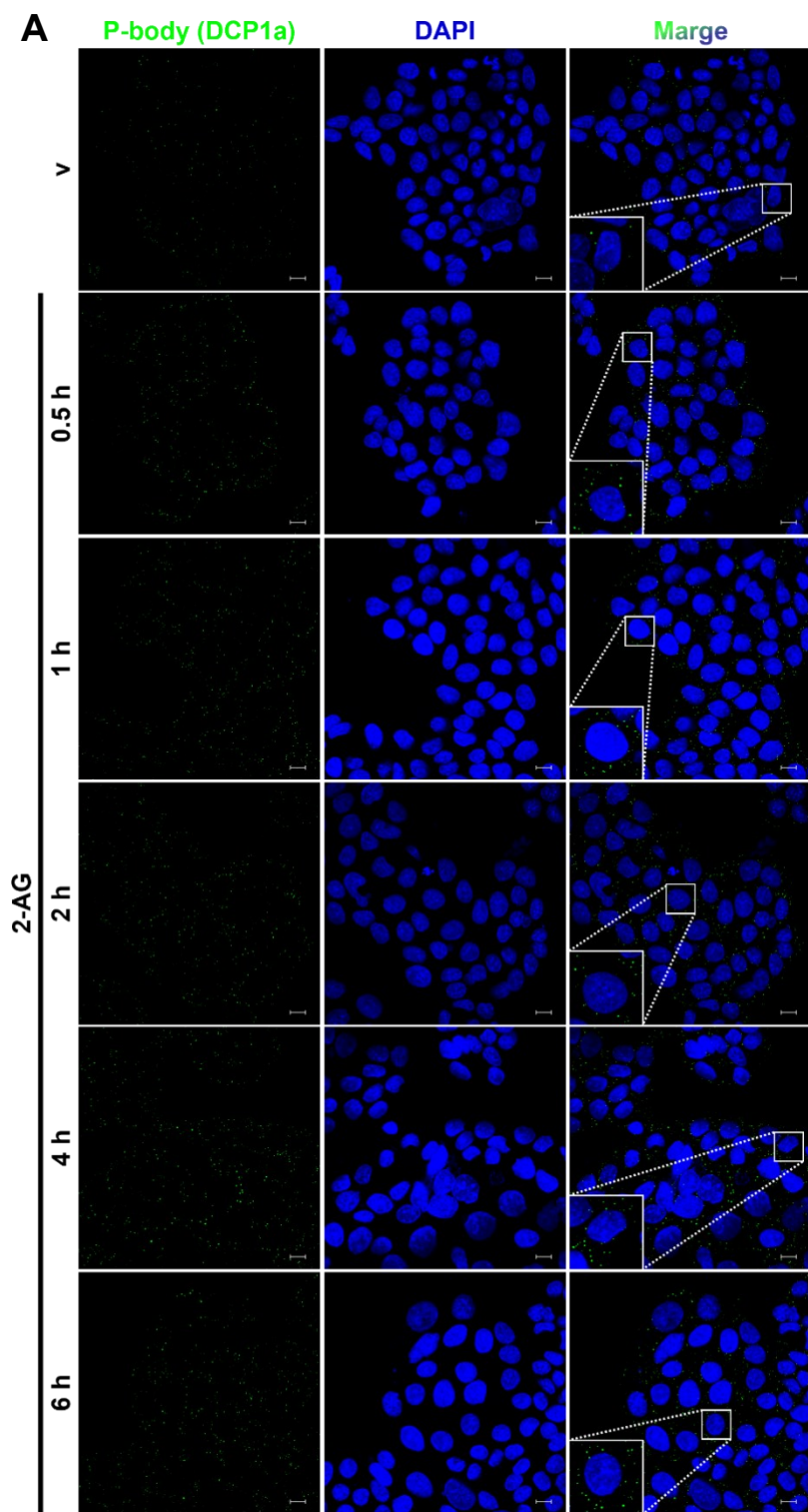


Figure 13. Treatment with AEA and AA did not accelerate P-body formation.

(A) Cells were treated with 30 μ M AEA or AA for 6 h and immunofluorescence staining was performed. Green indicates DCP1a, a P-body marker, and blue indicates nuclear staining (DAPI). Scale bar; 10 μ m. (B) Graph shows the number of P-bodies per cell of panel A. Data are means \pm S.E.M. of three independent experiments. n.s.: not significant, One-way ANOVA followed by Dunnett's test. v: vehicle.



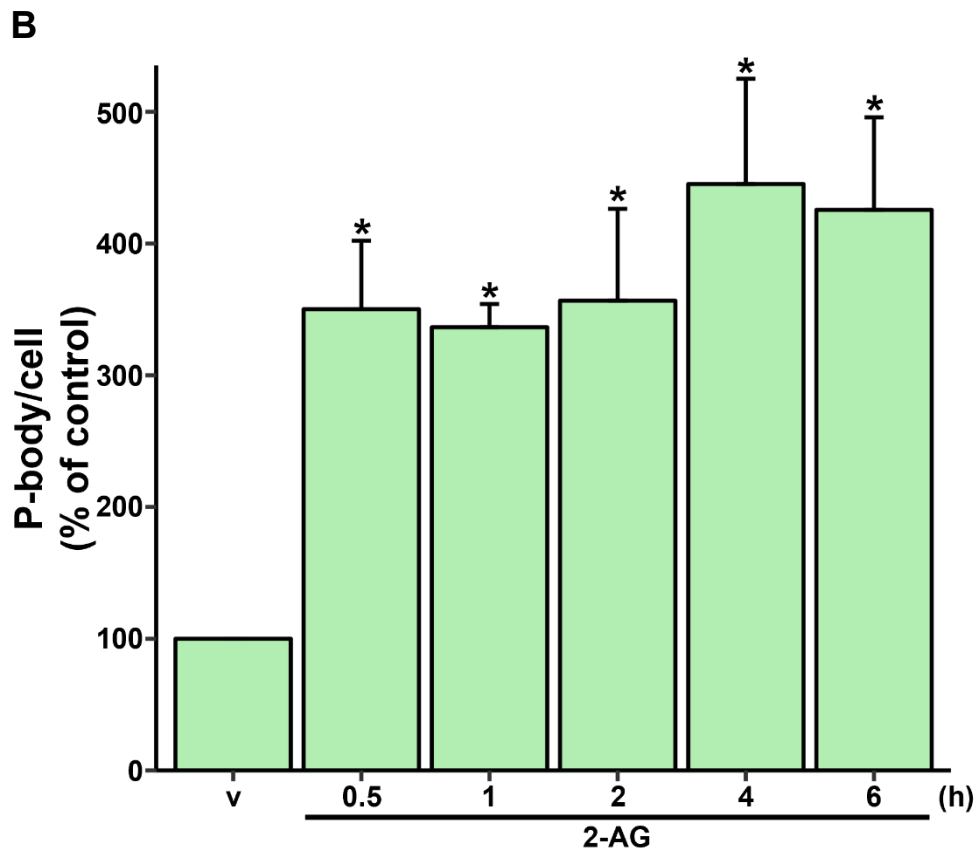


Figure 14. Treatment with 2-AG accelerated P-body formation within 30 min.

(A) Cells were treated with vehicle (v) or 30 μ M 2-AG for the indicated times and immunofluorescence was performed. Green indicates DCP1a, a P-body marker, and blue indicates nuclear staining (DAPI). Scale bar; 10 μ m. (B) Graph shows the number of P-bodies per cell of panel A. Data are means \pm S.E.M. of three independent experiments. * p < 0.05 versus vehicle treatment, One-way ANOVA followed by Dunnett's test. v: vehicle.

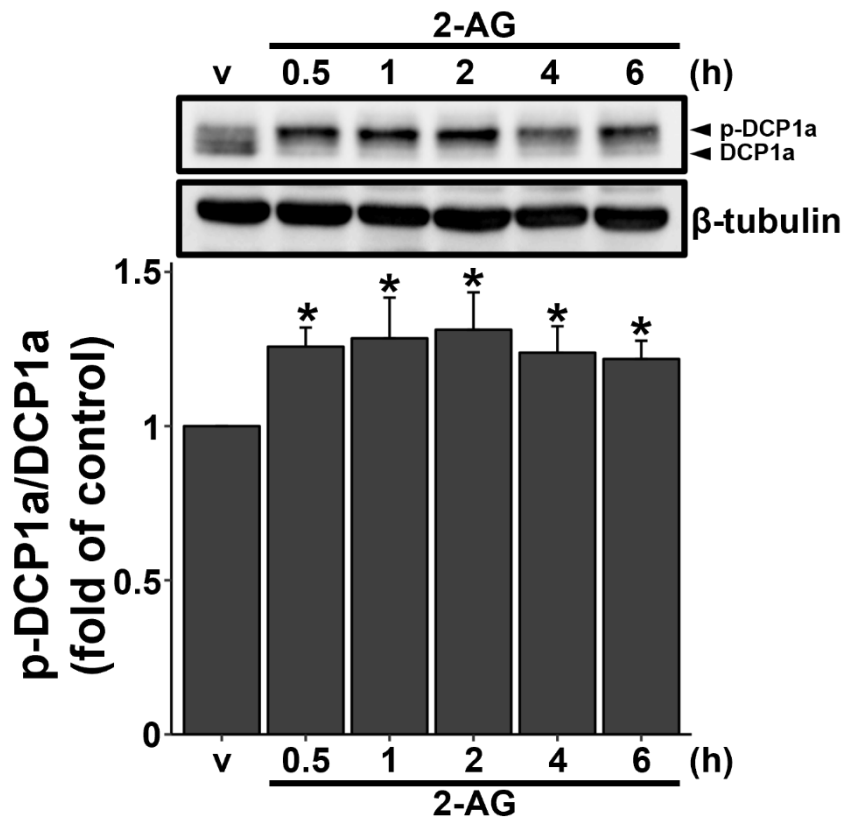


Figure 15. Treatment with 2-AG induced DCP1a phosphorylation in HCA-7 cells.

Cells were treated with vehicle (v) or 30 μ M 2-AG for the indicated times and phosphorylation of DCP1a was examined. The upper band on the top panel observed in western blotting images indicates the phosphorylated DCP1a (p-DCP1a) and lower band indicates the unphosphorylated DCP1a (DCP1a). Data are means \pm S.D. of three independent experiments. * p < 0.05 versus vehicle treatment, One-way ANOVA followed by Dunnett's test. v: vehicle.

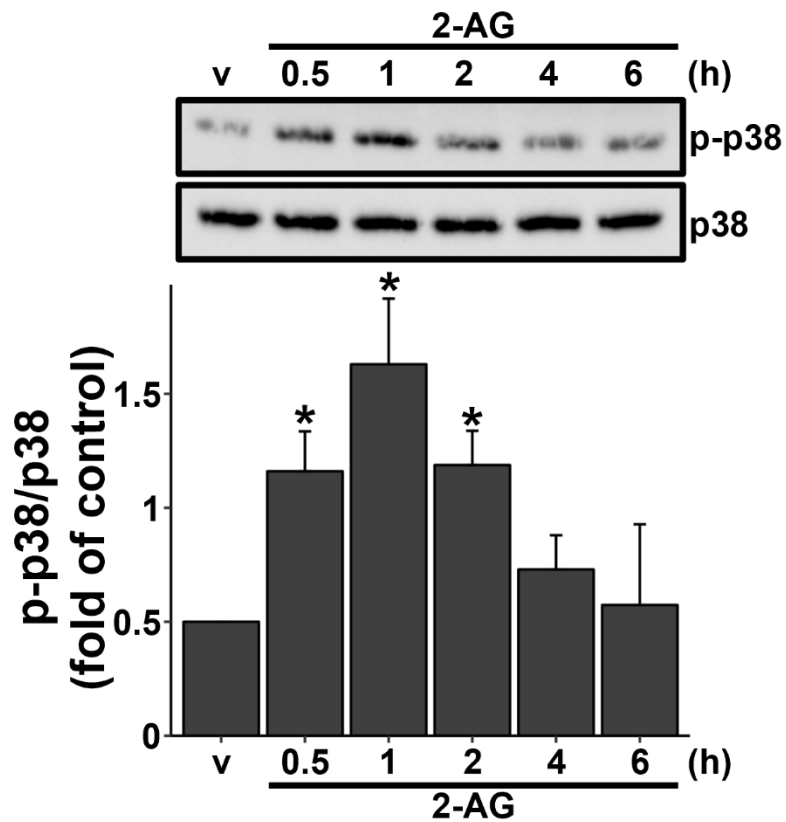


Figure 16. Treatment with 2-AG activated p38 MAPK in HCA-7 cells.

Cells were treated with vehicle (v) or 30 μ M 2-AG for the indicated times and phosphorylation of p38 MAPK was examined. Data are means \pm S.D. of three independent experiments. * $p < 0.05$ versus vehicle treatment, One-way ANOVA followed by Dunnett's test. v: vehicle.

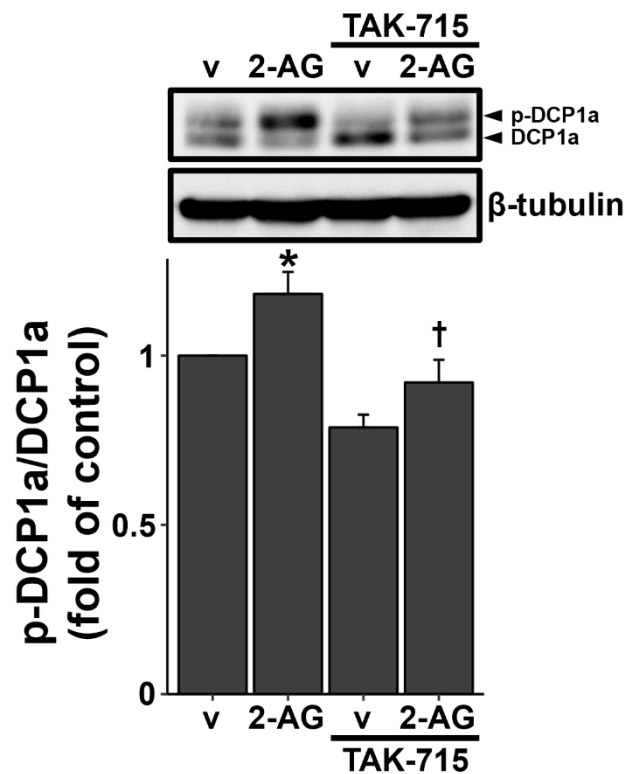


Figure 17. Treatment with 2-AG induced DCP1a phosphorylation via activation of p38 MAPK.

Cells were pretreated with vehicle (v) or 10 μ M TAK-715, a specific inhibitor of p38 MAPK, for 30 min followed by treatment with 30 μ M 2-AG for 30 min and phosphorylation of DCP1a was examined. Data are means \pm S.D. of three independent experiments. * p < 0.05 versus vehicle treatment, † p < 0.05 versus 2-AG treatment, One-way ANOVA followed by Tukey's test. v: vehicle.

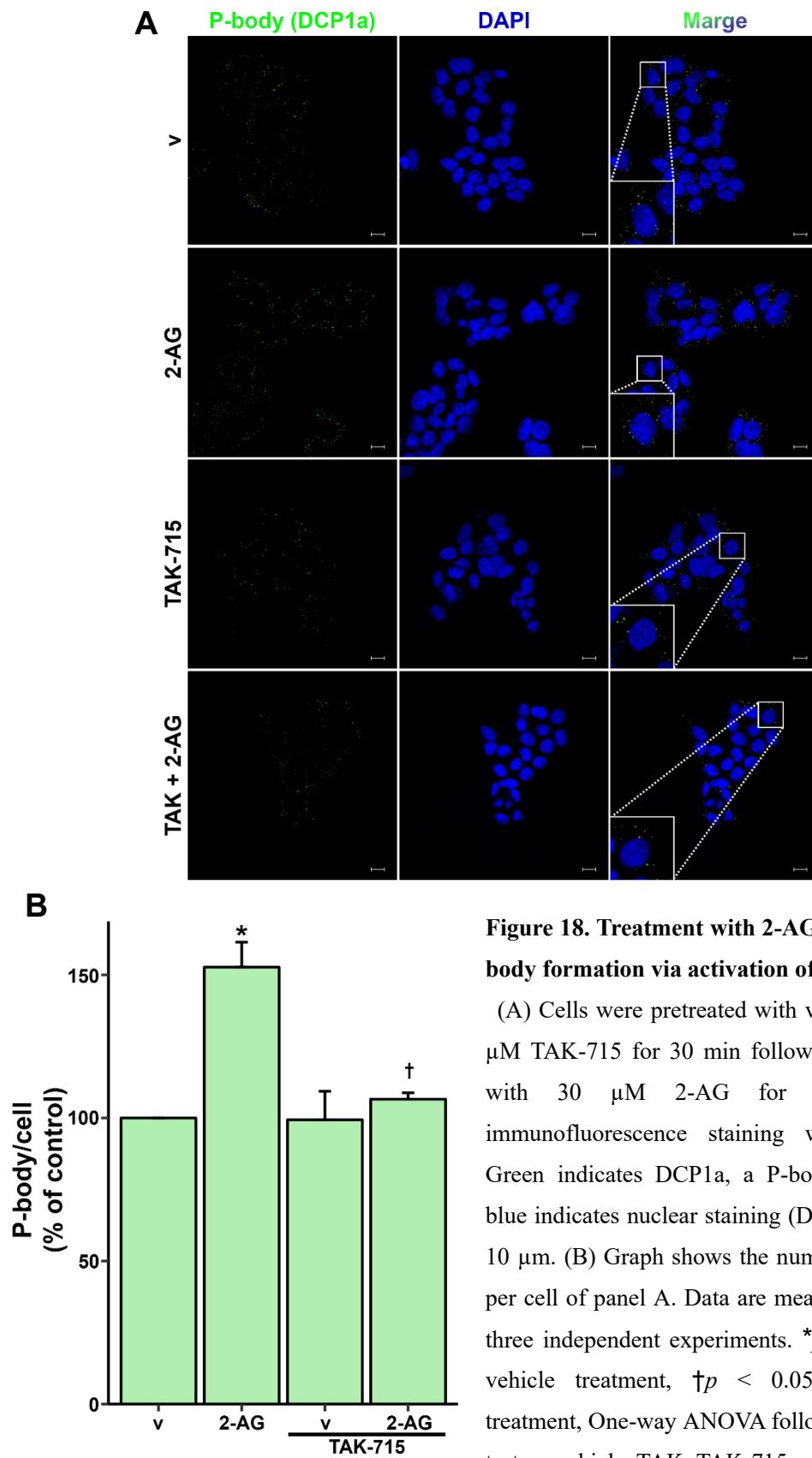


Figure 18. Treatment with 2-AG accelerated P-body formation via activation of p38 MAPK.

(A) Cells were pretreated with vehicle (v) or 10 μ M TAK-715 for 30 min followed by treatment with 30 μ M 2-AG for 30 min and immunofluorescence staining was performed. Green indicates DCP1a, a P-body marker, and blue indicates nuclear staining (DAPI). Scale bar; 10 μ m. (B) Graph shows the number of P-bodies per cell of panel A. Data are means \pm S.E.M. of three independent experiments. * p < 0.05 versus vehicle treatment, † p < 0.05 versus 2-AG treatment, One-way ANOVA followed by Tukey's test. v: vehicle, TAK: TAK-715.

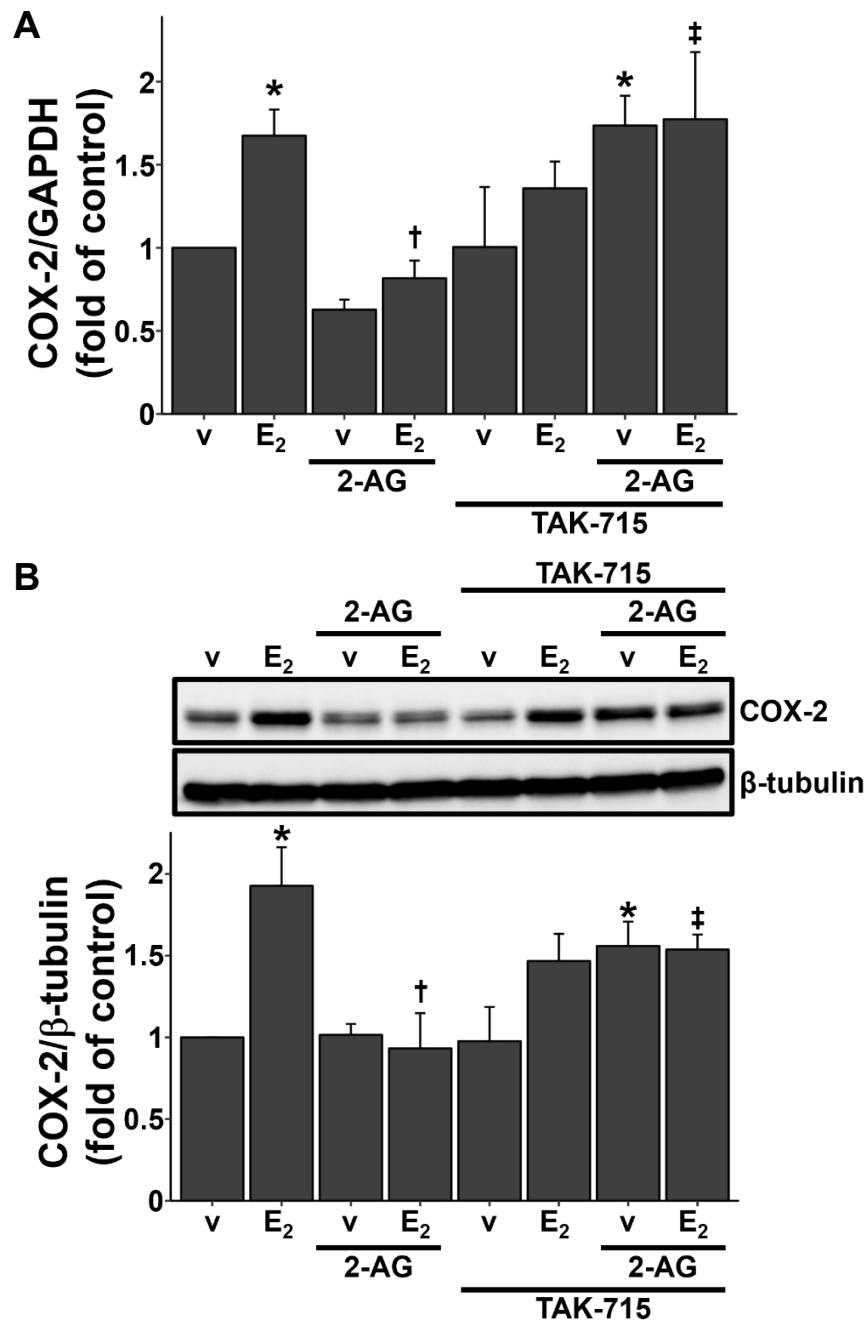


Figure 19. Treatment with 2-AG suppressed COX-2 mRNA expression (A) and protein expression (B) via p38 MAPK.

Cells were pretreated with vehicle (v) or 10 μM TAK-715 for 30 min followed by treatment with 30 μM 2-AG for 30 min, and then, further treatment with 1 μM PGE₂ for 6 h and examined mRNA expression level by RT-qPCR (A) and protein expression level by western blotting (B). Data are means \pm S.D. of three independent experiments. ^{*} $p < 0.05$ versus vehicle treatment, [†] $p < 0.05$ versus PGE₂ treatment, [‡] $p < 0.05$ versus 2-AG + PGE₂ treatment, One-way ANOVA followed by Tukey's test. v: vehicle, E₂: PGE₂.

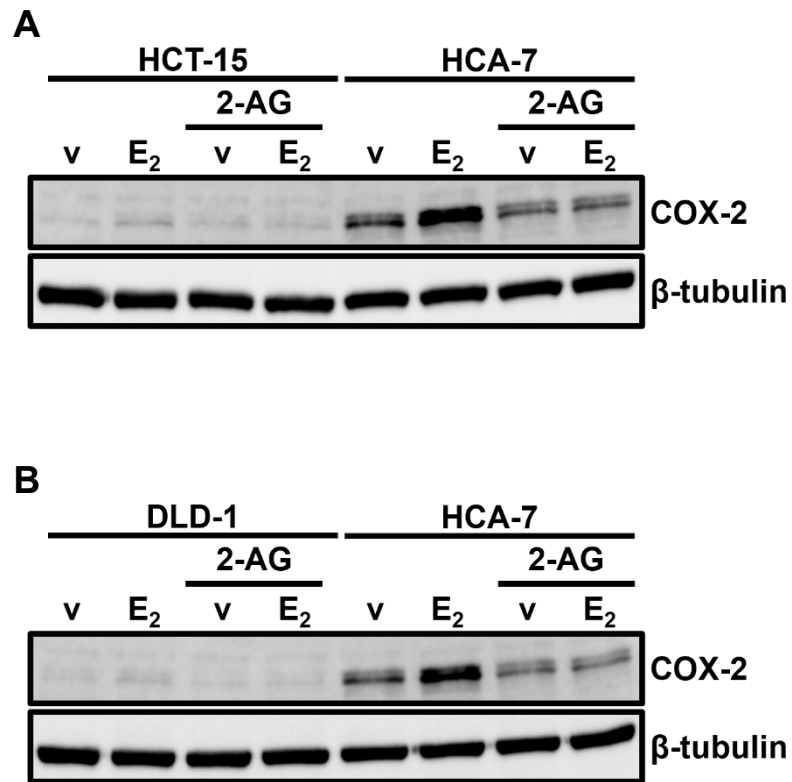


Figure 20. The inhibitory effects of 2-AG on COX-2 expression induced by PGE₂ in both human colon cancer HCT-15 cells (A) and DLD-1 cells (B).

Cells were pretreated with vehicle (v) or 30 μM 2-AG for 30 min, and then, treatment with 1 μM PGE₂ for 6 h and examined COX-2 protein expression level by western blotting in HCT-15 cells (A), DLD-1 cells (B). v: vehicle, E₂: PGE₂.

5. 考察

2 種類の内因性カンナビノイド 2-AG および AEA と、それらの代謝物である PGE₂-GE, PGE₂-EA と 2-AG, AEA の前駆体である AA の計 5 種類の化合物のうち、2-AG のみが HCA-7 細胞において 1 μM の PGE₂ 6 時間刺激によって誘導される COX-2 発現を有意に抑制した。この 2-AG による COX-2 発現抑制作用は 2-AG の濃度依存的に認められ、10, 30 μM において有意な抑制効果がみられた。

我々のグループはこれまでに、HCA-7 細胞における PGE₂ による COX-2 の発現誘導は、EP4 受容体を介して引き起こされていることを報告してきた²⁰⁾。2-AG の代謝物である PGE₂-GE は PGE₂ 誘導體であることから、2-AG の作用は、代謝物である PGE₂-GE が EP4 受容体上で PGE₂ と競合することに起因する可能性が考えられる。しかし、PGE₂-GE で前処置しても COX-2 の発現は抑制されなかったこと、PGE₂-GE 単独処置でも COX-2 の発現の増加が認められたことなどから (Figure 3)、2-AG の作用は代謝物である PGE₂-GE が EP4 受容体上で PGE₂ と競合するためではないと考えられる。一方で、PGE₂-GE は PGE₂ 誘導體であり、構造的にも PGE₂ に類似していることから、PGE₂-GE 単独処置による COX-2 発現の増加は EP4 受容体を介した作用であると考えられる (Figure 3)。また、COX-2 の発現増加は AEA の代謝物である PGE₂-EA によっても引き起こされるが、これも PGE₂-EA が PGE₂ 類似体であることから、PGE₂-GE 同様に EP4 受容体を介した作用であると考えられる (Figure 3)。

2-AG は内因性カンナビノイドであるため、CB 受容体のアゴニストとして作用することが知られている。しかし、CB 受容体アンタゴニストである、AM251 (CB1 アンタゴニスト) および AM630 (CB2 アンタゴニスト) の前処置では 2-AG の作用は抑制されなかった (Figure 7)。このことは、2-AG の作用は CB 受容体を介していない可能性を示唆している。これは 2-AG と同様の内因性カンナビノイドであり、CB 受容体のアゴニストとして作用することが知られている AEA 処置群において COX-2 発現抑制作用が認められなかったことや (Figure 3)、公共 RNA-seq データの解析により、HCA-7 細胞には CB1 および CB2 が mRNA レベルでほとんど発現していないことから裏付けられる (Figure 6)。すなわち、HCA-7 細胞における 2-AG による COX-2 発現抑制作用は、CB 受容体を介した従来の作用機序によるものではない可能性が極めて高いことが考えられる。

2-AG のもう一つの作用点であると報告されている TRPV1 は、公共 RNA-seq データ解析の結果から、mRNA レベルにおいて HCA-7 細胞に発現している可能性が考えられた (Figure 6)。また、Ca²⁺ assay の結果から、2-AG は TRPV1 を介して [Ca²⁺]_i を上昇させることが示されたが (Figure 8B)、TRPV1 のアンタゴニストである BCTC を前処置しても、2-AG

による COX-2 発現抑制作用は打ち消されなかった (Figure 9)。このことから、2-AG による COX-2 発現抑制作用は TRPV1 を介していないと考えられる。また、EDTA により細胞外の Ca^{2+} をキレートして測定を行ったところ、2-AG の添加直後の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇は認められたが、その後のプラトー相が認められなくなり、ピークに達した後は速やかな $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の低下が認められた (Figure 8C)。このことから、2-AG 添加直後の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇は細胞外の Ca^{2+} 由来ではなく小胞体などの細胞小器官由来であり、その後のプラトー相は細胞外からの Ca^{2+} の流入によるものである可能性が考えられる。

これらの公共 RNA-seq データ解析および CB1, CB2, TRPV1 に対するアンタゴニストを用いた実験から、2-AG の作用は CB 受容体や TRPV1 を介した従来の作用機序とは異なっている可能性が考えられた。すなわち、HCA-7 細胞における 2-AG の COX-2 発現抑制作用のメカニズムは、2-AG のこれまで知られている作用機序とは異なることが示唆された。

ところで、COX-2 promoter を firefly luciferase の上流に組み込んだレポーター plasmid¹⁷⁾ を用いた luciferase reporter gene assay より、 PGE_2 によって上昇した COX-2 promoter 活性は、10, 30 μM の 2-AG の前処置では抑制されないことが明らかとなった (Figure 10)。このことから、2-AG による COX-2 発現抑制作用は、COX-2 遺伝子の mRNA への転写抑制によるものではないことが示唆された。また、RT-PCR による COX-2 の mRNA の発現量の検討では、2-AG は短時間の処置では、単独でも COX-2 mRNA の発現を誘導したが、6 時間後には Ctrl レベルまで減少していた (Figure 11)。 PGE_2 処置群では COX-2 mRNA は処置後 0.5 時間および 1 時間のうちに誘導されており、2-AG と PGE_2 の共処置群でも同様に短時間のうちに誘導されていた (Figure 11)。しかし、 PGE_2 単独処置群では mRNA の発現が 6 時間後まで維持されていたのに対し、2-AG と PGE_2 との共処置群では 6 時間後には Ctrl レベルまで減少していた (Figure 11)。以上の結果より、2-AG は、COX-2 mRNA の分解を誘導している可能性が示唆された。すなわち、これらのことから、2-AG の COX-2 発現抑制作用は COX-2 遺伝子の mRNA への転写の抑制を介したのではなく、COX-2 mRNA の分解を誘導することに起因することが考えられる。

次に、mRNA の分解に重要である、P-body の形成に 2-AG が与える影響について検討した結果、2-AG によって P-body の形成が促進されることが明らかとなった (Figure 12)。これは、2-AG によって COX-2 の mRNA が P-body によって分解されることで COX-2 の発現が抑制されている可能性を示している。一方で、2-AG の前駆体である AA および 2-AG と同じ内因性カンナビノイドである AEA では P-body 数の増加は認められなかった (Figure 13)。これらのことから、2-AG は P-body の形成を促進することにより COX-2 mRNA の分解を誘導している可能性が考えられ、その作用は 2-AG 特異的である可能性が考えられた。また、2-AG による P-body の形成は 30 分以内に有意な増加がみられたが (Figure 14)、処置

6時間後においても、P-body数は30分の段階と同程度であったことから (Figure 14)、2-AGによるP-body形成促進作用は30分以内に完結し、その後少なくとも6時間後まで維持されることが考えられる。

さらに、2-AGのP-body形成促進メカニズムを解明するために、P-bodyの形成において重要な役割を果たすDCP1aのリン酸化について検討した。その結果、2-AG処置によってDCP1aの有意なリン酸化が誘導された (Figure 15)。DCP1aのリン酸化は2-AGの処置後30分以内に生じているが、これはP-bodyの形成促進作用が処置後30分以内であることも一致している。続いて、DCP1aのリン酸化のメカニズムを解明するために、2-AGによるp38 MAPKの活性化について検討した。p38 MAPKはDCP1aのリン酸化に関与することが報告されている²⁷⁾。検討の結果、2-AGによってp38 MAPKのリン酸化は有意に誘導されることが明らかとなった (Figure 16)。この作用は2-AGの処置後30分以内に生じ、1時間後に最大に達したのち、6時間後にはCtrlレベルまで減少していた。処置後30分以内にp38 MAPKの活性化がみられた点において、DCP1aのリン酸化およびP-bodyの形成が処置後30分以内に誘導されている点とも一致する。

続いて、p38 MAPKがDCP1aのリン酸化およびP-bodyの形成に関与しているかについて検討するため、p38 MAPK特異的阻害薬であるTAK-715を用いて検討を行った。その結果、TAK-715の前処置によって2-AGによるDCP1aのリン酸化およびP-bodyの形成促進は有意に抑制された (Figure 17)。このことから、2-AGによるDCP1aのリン酸化およびP-bodyの形成促進作用はp38 MAPKを介していることが考えられた。その一方で、p38 MAPKの活性化が6時間後までにCtrlレベルまで減少しているのに対し、DCP1aのリン酸化およびP-bodyの形成促進作用は6時間後まで維持されていた。このことから、p38 MAPKの活性化はDCP1aのリン酸化およびP-bodyの形成促進作用の始動には必要であるが、そのリン酸化および形成維持には関与していない可能性が考えられた。

最後に、p38 MAPKが2-AGによるCOX-2発現抑制作用に関与するかについての検討を行った。その結果、p38 MAPK阻害薬であるTAK-715の前処置によって、2-AGによるCOX-2発現抑制作用はmRNAレベルおよびタンパク質レベルのどちらにおいてもキャンセルされた (Figure 19A, B)。このことから、2-AGによるCOX-2発現抑制作用はp38 MAPKの活性化を介していることが考えられた。興味深いことに、TAK-715と2-AGを処置した群において、COX-2発現の有意な上昇が認められた。これは、p38 MAPKの阻害により、2-AGが引き起こすP-bodyの形成促進およびCOX-2 mRNAの分解促進作用が阻害され、mRNAが安定化したことで、処置された2-AGがCOX-2によってPGE₂-GEへと代謝され、Figure 3で示したのと同様にEP4受容体に作用したことにより引き起こされた結果である可能性が考えられた。

なお、2-AG による COX-2 抑制作用は HCA-7 細胞以外のヒト結腸がん細胞 HCT-15 細胞や DLD-1 細胞でも認められたが、その効果は HCA-7 細胞と比べると著しく低かった。それは、HCT-15 細胞や DLD-1 細胞は Dukes' C の後期結腸がん細胞であり³⁰⁾、初期結腸がん細胞である HCA-7 細胞と比べると内因性の COX-2 の発現が低いためと考えられる。これはすなわち、2-AG の効果は、バイオマーカーとしての COX-2 が多く発現している初期結腸がんにおいて最も効果が高いことが予想され、がん悪性化を防ぐ重要な働きを担うと考えられる。

以上のことから、2-AG は、HCA-7 細胞において、p38 MAPK の活性化を介して P-body の形成を促進させ、COX-2 mRNA の分解を誘導することで、COX-2 の発現を抑制している可能性が示唆された (Figure 21)。また、2-AG の作用は、HCA-7 細胞において CB 受容体が発現していないと考えられることや、TRPV1 の阻害によってキャンセルされなかったことなどから、これらの受容体を介した従来の作用機序とは異なることが考えられた。すなわち、本研究において見出された 2-AG の新規効果はこれまで知られている作用とは全く異なることが考えられた。本研究のさらなる発展が、2-AG の特に初期結腸がんへの新たな抗がん作用と新規治療薬の開発につながることを期待される。

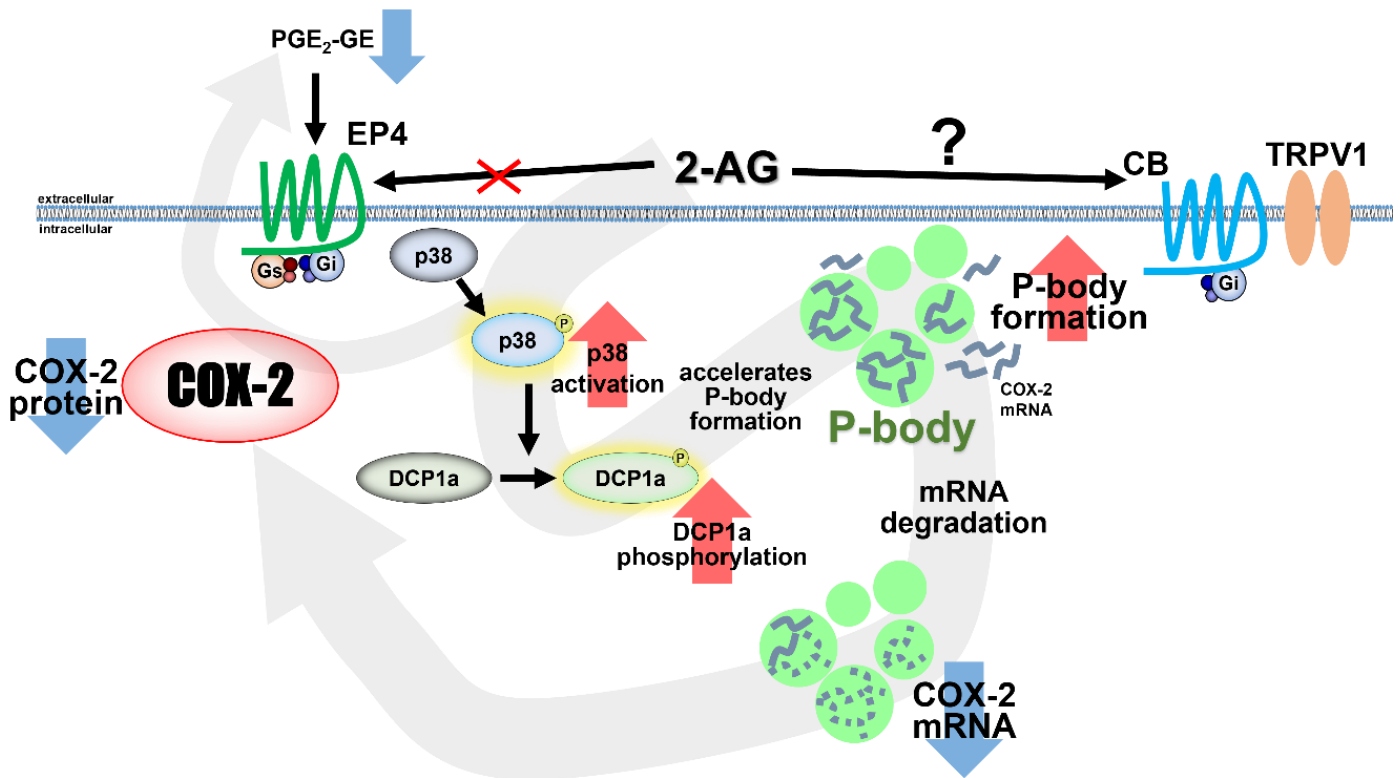


Figure 21. A schematic diagram of effects of 2-AG on PGE₂-induced COX-2 expression in HCA-7 cells.

2-AG suppresses PGE₂-induced COX-2 expression by accelerating P-body formation through the activation of p38 MAPK, thereby inducing the degradation of COX-2 mRNA. This effect is different from the canonical mechanism of 2-AG via CB receptors.

6. 総括

本研究により以下の可能性が示唆された。

- 初期結腸がん HCA-7 細胞株において、内因性カンナビノイドおよびその代謝物と前駆体である AA の計 5 種類の化合物うち、2-AG のみが PGE₂ によって誘導される COX-2 発現抑制作用を有している。
- 2-AG は COX-2 遺伝子の mRNA への転写を抑制しないが、mRNA の分解を誘導することで COX-2 の発現を抑制している。
- 2-AG は mRNA を分解する P-body の形成を促進することで COX-2 の mRNA の分解を促進していると考えられる。
- 2-AG は p38 MAPK を活性化することで DCP1a のリン酸化を誘導し、P-body の形成を促進し、COX-2 の mRNA の分解を促進させている。
- 2-AG が作用する TRPV1 は HCA-7 細胞に発現しており、2-AG は TRPV1 を介して [Ca²⁺]_i を上昇させるが、TRPV1 に対する作用は COX-2 阻害作用とは独立した作用であると考えられる。
- HCA-7 細胞には CB 受容体 CB1 および CB2 は発現していないと考えられ、また、CB 受容体のアンタゴニストを用いた検討からも、2-AG による COX-2 発現抑制作用はこれらの受容体を介していないと考えられる。
- 2-AG の効果は、HCT-15 細胞や DLD-1 細胞のような中期～後期結腸がんよりも、HCA-7 細胞のような初期結腸がんへの効果が高いと考えられる。

NSAIDs の使用は大腸がんの死亡率や罹患率を低下させるという報告がある一方で、アメリカの FDA は NSAIDs の長期連用は心血管系のリスクを高めると警告している。NSAIDs の作用機序は COX-2 の機能を阻害するものである。しかし、本研究において見出された 2-AG の COX-2 発現抑制作用は、従来の NSAIDs とは異なり、COX-2 の機能ではなく発現そのものを抑制するものである。そのため、2-AG の作用点の同定など本研究のさらなる発展は、新たな作用機序を有する抗炎症薬、大腸がん治療薬および予防法の開発につながることを期待される。

7. 参考文献

- 1) Cancer Statistics. Cancer Information Service, National Cancer Center, Japan (National Cancer Registry, Ministry of Health, Labour and Welfare).
- 2) Cancer Statistics. Cancer Information Service, National Cancer Center, Japan (Vital Statistics of Japan, Ministry of Health, Labour and Welfare).
- 3) Tanaka H, Tanaka S, Togawa K, Katanoda K. Practical Implications of the Update to the 2015 Japan Standard Population: Mortality Archive From 1950 to 2020 in Japan. *J. Epidemiol.*, **33**, 372–380 (2023).
- 4) Dubois RN. Role of inflammation and inflammatory mediators in colorectal cancer. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.*, **125**, 358–372; discussion 372-373 (2014).
- 5) Sheng J, Sun H, Yu F-B, Li B, Zhang Y, Zhu Y-T. The Role of Cyclooxygenase-2 in Colorectal Cancer. *Int. J. Med. Sci.*, **17**, 1095–1101 (2020).
- 6) Nanda N, Dhawan DK. Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. *Front. Biosci. (Landmark Ed)*, **26**, 706–716 (2021).
- 7) Fujino H. The Roles of EP4 Prostanoid Receptors in Cancer Malignancy Signaling. *Biol. Pharm. Bull.*, **39**, 149–155 (2016).
- 8) Huang W-W, Hsieh K-P, Huang R-Y, Yang Y-H. Role of cyclooxygenase-2 inhibitors in the survival outcome of colorectal cancer patients: A population-based cohort study. *Kaohsiung J. Med. Sci.*, **33**, 308–314 (2017).
- 9) Rothwell PM, Wilson M, Elwin C-E, Norrving B, Algra A, Warlow CP, Meade TW. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *The Lancet*, **376**, 1741–1750 (2010).
- 10) Research C for DE and. FDA Drug Safety Communication: FDA strengthens warning that non-aspirin nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) can cause heart attacks or strokes. *FDA*, (2023).
- 11) Lopez DH, Fiol-deRoque MA, Noguera-Salvà MA, Terés S, Campana F, Piotto S, Castro JA, Mohaibes RJ, Escribá PV, Busquets X. 2-Hydroxy Arachidonic Acid: A New Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug. *PLOS ONE*, **8**, e72052 (2013).
- 12) Kurata N, Tokashiki N, Fukushima K, Misao T, Hasuoka N, Kitagawa K, Mashimo M, Regan JW, Murayama T, Fujino H. Short chain fatty acid butyrate uptake reduces expressions of prostanoid EP4 receptors and their mediation of cyclooxygenase-2 induction in HCA-7 human colon cancer cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **853**, 308–315 (2019).
- 13) Cuddihey H, MacNaughton WK, Sharkey KA. Role of the Endocannabinoid System in the Regulation of Intestinal Homeostasis. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, **14**, 947–963 (2022).
- 14) Baggelaar MP, Maccarrone M, van der Stelt M. 2-Arachidonoylglycerol: A signaling lipid with

- manifold actions in the brain. *Prog. Lipid Res.*, **71**, 1–17 (2018).
- 15) Orellana-Serradell O, Poblete CE, Sanchez C, Castellón EA, Gallegos I, Huidobro C, Llanos MN, Contreras HR. Proapoptotic effect of endocannabinoids in prostate cancer cells. *Oncol. Rep.*, **33**, 1599–1608 (2015).
 - 16) Guindon J, Hohmann AG. The endocannabinoid system and cancer: therapeutic implication. *Br. J. Pharmacol.*, **163**, 1447–1463 (2011).
 - 17) Inoue H, Nanayama T, Hara S, Yokoyama C, Tanabe T. The cyclic AMP response element plays an essential role in the expression of the human prostaglandin-endoperoxide synthase 2 gene in differentiated U937 monocytic cells. *FEBS Lett.*, **350**, 51–54 (1994).
 - 18) Naydenov NG, Lechuga S, Zalavadia A, Mukherjee PK, Gordon IO, Skvasik D, Vidovic P, Huang E, Rieder F, Ivanov AI. P-Cadherin Regulates Intestinal Epithelial Cell Migration and Mucosal Repair, but Is Dispensable for Colitis Associated Colon Cancer. *Cells*, **11**, 1467 (2022).
 - 19) Hiraoka, Y., Yamada, K., Yamasaki, R., Kawasaki, Y., Kitabatake, R., Matsumoto, Y., Ishikawa, K., Umezu, Y., Hirose, H., & Yasumizu, Y., ikra v2.0.1: RNAseq pipeline centered on Salmon. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4718200>, (2021).
 - 20) Yoshida K, Fujino H, Otake S, Seira N, Regan JW, Murayama T. Induction of cyclooxygenase-2 expression by prostaglandin E₂ stimulation of the prostanoid EP4 receptor via coupling to G α i and transactivation of the epidermal growth factor receptor in HCA-7 human colon cancer cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **718**, 408–417 (2013).
 - 21) Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **389**, 816–824 (1997).
 - 22) Zygmunt PM, Ermund A, Movahed P, Andersson DA, Simonsen C, Jönsson BAG, Blomgren A, Birnir B, Bevan S, Eschalier A, Mallet C, Gomis A, Högestätt ED. Monoacylglycerols Activate TRPV1 – A Link between Phospholipase C and TRPV1. *PLOS ONE*, **8**, e81618 (2013).
 - 23) Sheth U, Parker R. Decapping and Decay of Messenger RNA Occur in Cytoplasmic Processing Bodies. *Science*, **300**, 805–808 (2003).
 - 24) Hubstenberger A, Courel M, Bénard M, Souquere S, Ernoult-Lange M, Chouaib R, Yi Z, Morlot J-B, Munier A, Fradet M, Daunesse M, Bertrand E, Pierron G, Mozziconacci J, Kress M, Weil D. P-Body Purification Reveals the Condensation of Repressed mRNA Regulons. *Mol. Cell*, **68**, 144-157.e5 (2017).
 - 25) Blanco FF, Sanduja S, Deane NG, Blackshear PJ, Dixon DA. Transforming Growth Factor β Regulates P-Body Formation through Induction of the mRNA Decay Factor Tristetraprolin. *Mol. Cell. Biol.*, **34**, 180–195 (2014).
 - 26) Sharma NR, Zheng Z-M. RNA Granules in Antiviral Innate Immunity: A Kaposi’s Sarcoma-Associated Herpesvirus Journey. *Front. Microbiol.*, **12**, 794431 (2022).
 - 27) Rzczkowski K, Beuerlein K, Müller H, Dittrich-Breiholz O, Schneider H, Kettner-Buhrow D,

- Holtmann H, Kracht M. c-Jun N-terminal kinase phosphorylates DCP1a to control formation of P bodies. *J. Cell Biol.*, **194**, 581–596 (2011).
- 28) Blumenthal J, Behar L, Elliott E, Ginzburg I. Dcp1a phosphorylation along neuronal development and stress. *FEBS Lett.*, **583**, 197–201 (2009).
- 29) Wang S, Zhang H, Geng B, Xie Q, Li W, Deng Y, Shi W, Pan Y, Kang X, Wang J. 2-arachidonyl glycerol modulates astrocytic glutamine synthetase via p38 and ERK1/2 pathways. *J. Neuroinflammation*, **15**, 220 (2018).
- 30) Cui H, Zhang AJ, McKeage MJ, Nott LM, Geraghty D, Guven N, Liu JJ. Copper transporter 1 in human colorectal cancer cell lines: Effects of endogenous and modified expression on oxaliplatin cytotoxicity. *J. Inorg. Biochem.*, **177**:249-258 (2017).

8. 謝辞

本研究の遂行、および本論文の作成に当たり終始御指導御鞭撻を賜りました徳島大学薬学部生命薬理学分野の藤野 裕道教授、福島 圭穰助教に心より感謝いたします。

また、数々の貴重な御助言等頂きました徳島大学薬学部生命薬理学分野の皆様にも心より感謝いたします。

9. 補足資料

実験方法・結果・考察

S1. Tristetraprolin (TTP)の発現に対する影響の検討

tristetraprolin (TTP)は mRNA 中の 3'-untranslated region (3'-UTR)に存在する AU-rich element (ARE)に結合し、mRNA を P-body へと輸送することでその分解を誘導するタンパク質である。TNF- α や IL-6 など炎症に関与するタンパク質の mRNA の 3'-UTR には ARE が存在している。また、COX-2 の mRNA の 3'-UTR にも ARE が存在することが知られており、TTP によって P-body に輸送されることも報告されている。そこで、2-AG によって TTP の発現が誘導されるかについて、RT-PCR および western blotting による検討を行った。使用した primer (Fasmac)および抗体は下記のとおりである。

RT-PCR primers

primer sequences

TTP forward: 5'- CGCTACAAGACTGAGCTATG-3'

TTP reverse: 5'- CCTGGAGGTAGAACTTGTG-3'

GAPDH forward: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA-3'

GAPDH reverse: 5'-TTCACACCCATGACGAACAT-3'

antibodies

● anti-TTP

Primary antibody: anti-TTP (#71632, Cell Signaling Technology)

1:500 in 5% BSA in TBA-T

Secondary antibody: goat anti-rabbit HRP conjugate (#1705046, Bio-Rad Laboratories)

1:10000 in 5% BSA in TBS-T

その結果、2-AG 処置によって、TTP の mRNA およびタンパク質発現が有意に増加した (Figure S1A, B)。

mRNA 発現については 2-AG 単独処置群では処置 0.5 および 1 時間後に有意に増加した (Figure S1A)。また、2-AG と PGE₂ の共処置群においても、処置 0.5 時間後に有意な増加が認められた (Figure S1A)。しかし、どちらの群においても 2 時間後以降は Ctrl レベルまで減少していた (Figure S1A)。

タンパク質発現においては 2-AG 処置後 0.5 時間から Ctrl と比較して 3 倍程度と有意な発現増加が認められ、4 時間後まで有意な増加が認められたが、6 時間後には 1.5 倍程度まで減少していた (Figure S1B)。

2-AG によって TTP の発現が誘導されたことから、2-AG による COX-2 発現抑制作用は TTP を介している可能性が考えられた。

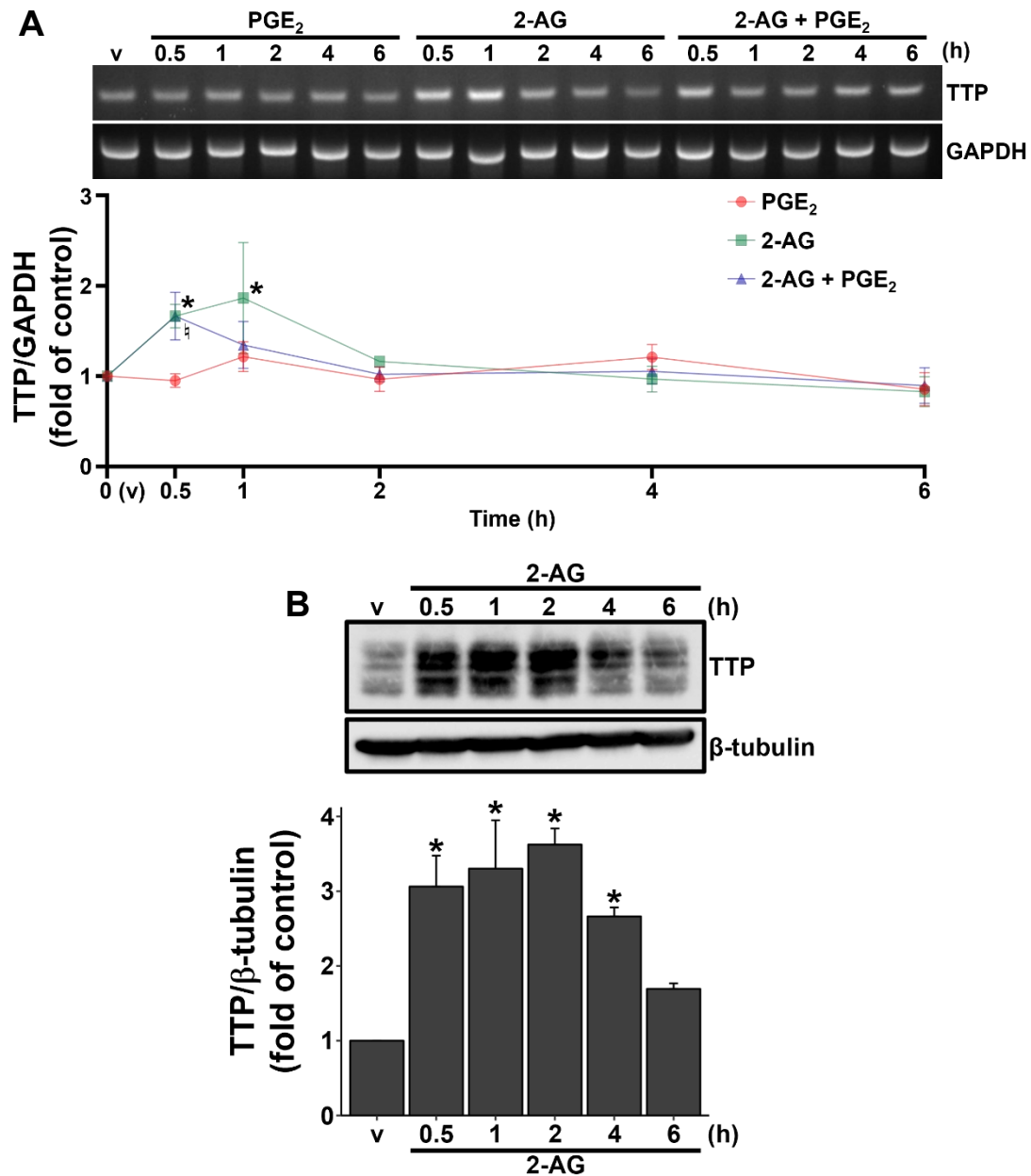


Figure S1. 2-AG induced TTP mRNA and protein expression.

(A) Cells were pretreated with vehicle (v) or 30 μ M 2-AG for 30 min followed by treatment with 1 μ M PGE₂ for the indicated times and mRNA expression was examined. Data are means \pm S.D. of three independent experiments. *, $\dagger p < 0.05$ versus vehicle treatment, One-way ANOVA followed by Tukey's test. (B) Cells were treated with vehicle (v) or 30 μ M 2-AG for the indicated times and TTP expression was examined. Data are means \pm S.D. of three independent experiments. $p < 0.05$ versus vehicle treatment, One-way ANOVA followed by Dunnett's test. v: vehicle, TTP: tristetraprolin.

S2. TTP の siRNA を用いた COX-2 発現抑制作用への検討

2-AG によって TTP の発現の誘導が認められたため、siRNA を用いて TTP を knockdown することにより COX-2 発現抑制作用における TTP の関与を RT-qPCR や western blotting により検討した。siRNA のトランスフェクションは RNAiMAX を用いて添付のプロトコールに従い以下の条件で reverse transfection 法により行った。トランスフェクションの 48 時間後に Opti-MEM に培地を置換し、その後の処置や回収はこれまでと同様に行った。

siRNA transfection (reverse transfection)

2.0×10^5 個の HCA-7 細胞を 6-well plate に播種し、10% FBS を含む DMEM を用いて、95% air, 5% CO₂, 37°C でインキュベーションした。reverse transfection は、1.5 mL tube に分注した Opti-MEM に、トランスフェクション試薬である Lipofectamine RNAiMAX Reagent (13778, Thermo Fisher Scientific) と、siRNA を加え、25 分間インキュベートすることで形成させた複合体を、細胞の播種時に同時に各 well に添加することにより行った。48 時間インキュベート後、100 µg/mL streptomycin, 100 IU/mL penicillin を含む Opti-MEM に培地を交換し、さらに 16 時間インキュベートした。その後 2-AG などの薬物を処置し、RIPA 回収や RNA 抽出は本文記載のプロトコールと同様に行った。

reverse transfection conditions

siZFP36 (siTTP) (7538-2, Bioneer, Daejeon, Korea): 30 pmol/well (final concentration)

siCtrl (4390843, Thermo Fisher Scientific): 30 pmol/well (final concentration)

Lipofectamine RNAiMAX Reagent (13778, Thermo Fisher Scientific): 7.5 µL/well

Opti-MEM: 250 µL/well

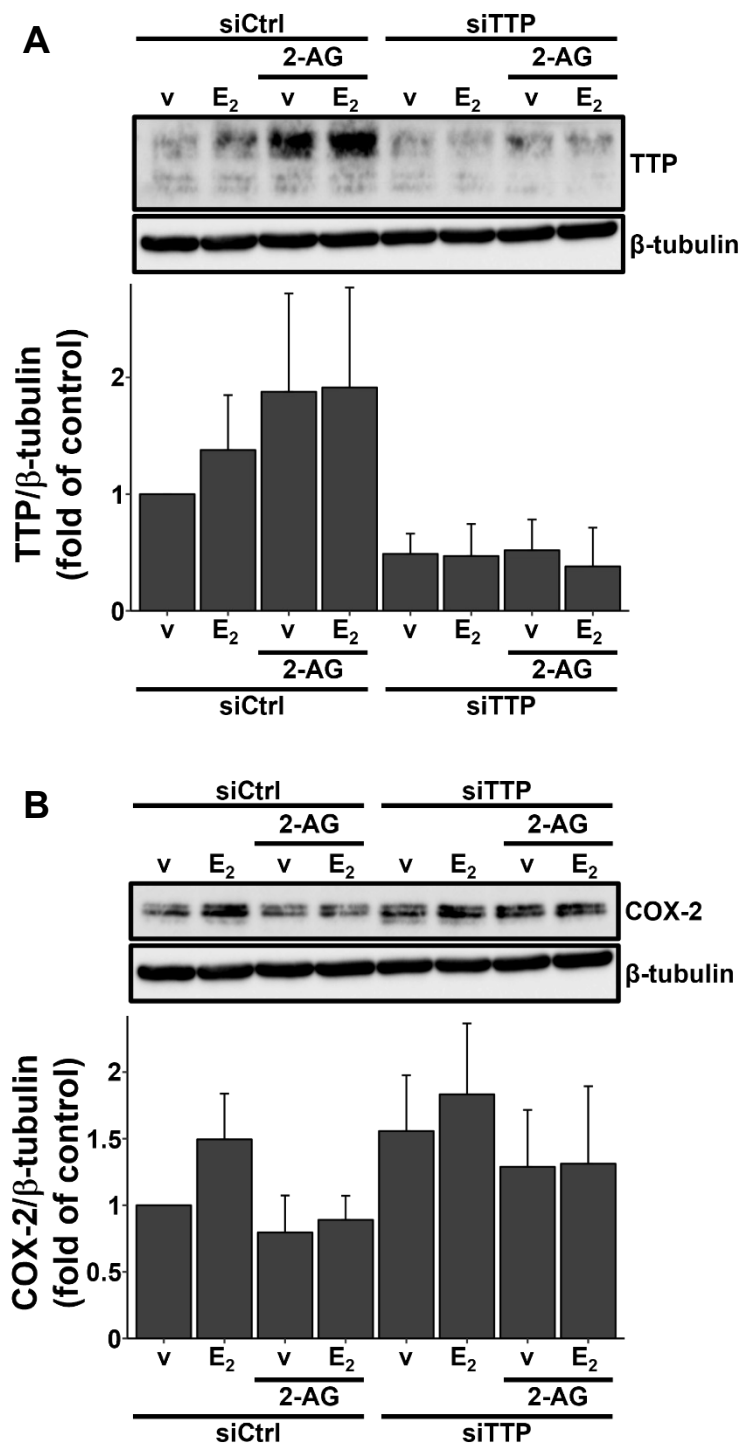
その結果、データの標準偏差が大きく、有意な差は得られなかったが、siTTP によって TTP のタンパク質発現量が減少したことから、TTP の knockdown は成功していると考えられる (Figure S2A)。COX-2 についても、データの標準偏差が大きく有意な差は得られなかったものの、siTTP によって COX-2 発現の増加傾向が認められた (Figure S2B)。

しかし、COX-2 について、2-AG の作用が siTTP によってキャンセルされたように見えたが、siTTP 単独でも COX-2 の発現量が増加しており、siTTP 群において PGE₂ 処置によって誘導された COX-2 の発現は 2-AG によって抑制されていることから、2-AG の作用を完全にはキャンセルできなかったと考えられる。

また、siTTP 単独群でも COX-2 の発現増加が認められたことから、過去の報告通り COX-2 の発現は TTP によって制御されていると考えられる^{S1)}。

また、RT-qPCR の結果もデータの標準偏差が大きく、有意な差は得られなかったものの、western blotting と同様の傾向を示している (Figure S2C)。

より詳細な検討の必要性はあるが、これらのことから、2-AG による COX-2 発現抑制作用は部分的には TTP を介している可能性も考えられるが、TTP の 2-AG 作用への寄与は限定的であることが示唆された。



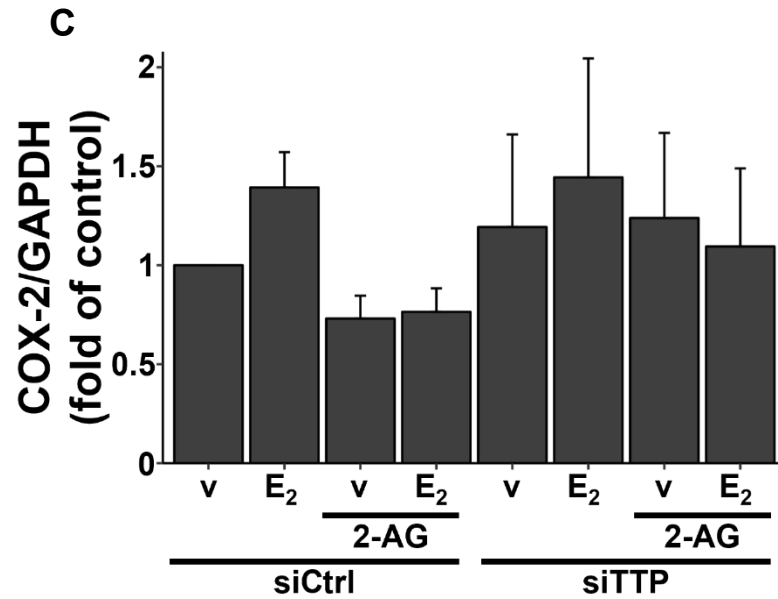


Figure S2. siTTP did not suppresses the effect of 2-AG on COX-2 expression.

Cells were transiently transfected with siTTP and pretreated with vehicle (v) or 30 μ M 2-AG for 30 min followed by treatment with 1 μ M PGE₂ and TTP expression (A), COX-2 protein expression (B) and COX-2 mRNA expression (C) were examined. Data are means \pm S.D. of three independent experiments. v: vehicle, E₂: PGE₂, TTP: tristetraprolin.

S1) Young LE, Dixon DA. Posttranscriptional Regulation of Cyclooxygenase 2 Expression in Colorectal Cancer. *Curr. Colorectal Cancer Rep.*, **6**, 60–67 (2010).