

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15378

研究課題名(和文) 癌特異的代謝異常に着目した家族性乳癌の化学予防法の開発

研究課題名(英文) Development of chemoprevention for familial breast cancer focusing on the cancer metabolism

研究代表者

渡邊 元樹 (Watanabe, Motoki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40723581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：家族性乳癌の化学予防実現を念頭に、『癌の遺伝子異常に対する分子標的薬と、癌の代謝異常に対する代謝経路阻害剤の併用戦略』として、(1)HDAC阻害剤vorinostatとグルタチオン代謝経路阻害剤サラゾピリン、(2)MEK阻害剤とメバロン酸経路阻害剤スタチン、の併用効果について各々検証した。いずれの組み合わせにおいても、乳癌細胞含め、複数の癌細胞株において顕著な細胞死の誘導と細胞増殖抑制効果を認め、本研究課題の根幹である分子標的薬と代謝経路阻害剤の併用戦略は、乳癌以外の幅広い癌腫に対しても応用できる可能性が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、網羅的遺伝子解析の実用化に伴い、がん予防の分野においても、個人個人の遺伝的背景に応じた発がん予防を目指した『先制医療』の考え方が注目されている。我々は今回、こうしたがんゲノム医療全盛の時代に、がんゲノムのみを標的とする医療は不十分で、がん細胞の代謝環境にも注目する重要性を明らかにし、実際、「分子標的薬と代謝制御薬の併用戦略」として、2つのモデル(HDAC阻害剤とグルタチオン代謝制御/MEK阻害剤とメバロン酸代謝制御)を提案した。本研究をさらに発展させることにより、がん予防効果を最大限に発揮する『ゲノムと代謝の双方を標的とした新時代のがん先制医療の実現』に貢献できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether the combination of molecular-targeting agents against the abnormalities of cancer-related genes with the inhibitors of cancer-related metabolism could be a feasible strategy for the chemoprevention of the familial breast cancer. We thus tried two combination therapies as follows: (1) HDAC inhibitor vorinostat and the inhibitor of the glutathione pathway, salazosulfapyridine (2) MEK inhibitors and the inhibitor of the mevalonate pathway, statins. We here found that both combinations inhibited the cell growth with the induction of cell death in several cancer cell lines, including breast cancer, indicating that our concept may be applied to the prevention or treatment against various types of cancer.

研究分野：がん予防医学

キーワード：HDAC阻害剤 vorinostat salazosulfapyridine グルタチオン代謝 MEK阻害剤 statins メバロン酸代謝 トリプルネガティブ乳癌

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

家族性乳癌とは家族性集積を示す乳癌の総称で、本邦においては全乳癌の15~20%が該当するとされるが、必ずしも家族歴の間診が徹底されているわけではなく、潜在的な患者層はより多いものと推察される。家族性乳癌は、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、ヒト上皮増殖因子受容体2型の発現がいずれも陰性である、いわゆるトリプルネガティブ (以下、TNBC) 乳癌の病型を示す割合が多く、通常の乳癌よりも悪性度が高く、難治性であることが知られている。それゆえ、家族性乳癌のリスク保因者にとって、発症への不安は大きく、また社会的偏見や差別も問題となっている。私たちの教室ではこれまで癌に対し、天然物や低分子化合物を用いて、数多くの「遺伝子調節化学予防」研究を行ってきた。今回、これまでの実績をもとに、新たな戦略として、安全性が担保された医薬品を用いて「乳癌特異的な代謝異常」を制御することで、より確実かつ現実性に優れた家族性乳癌の発症予防法の開発を目指すこととした。

2. 研究の目的

乳癌は日本人女性の罹患率第1位の悪性腫瘍であるが、そのうち実に15~20%が家族性乳癌に該当し、公衆衛生的見地からも家族性乳癌の病態解明とその抜本的予防法の確立は喫緊の課題である。今回、私たちは家族性乳癌に特徴的な「遺伝子異常」と「代謝異常」の双方に着目し、それらの異常を既に臨床使用されている医薬品を組み合わせることで制御するという、これまでにない独自の戦略をもって家族性乳癌の化学予防法の開発を目標とした。

3. 研究の方法

本研究課題においては、家族性乳癌患者への現実的な化学予防法の確立を念頭に、使用する薬剤は全て現在臨床使用されている、もしくは臨床試験中の医薬品を選択する。即ち、分子標的薬としては vorinostat (HDAC 阻害剤) と、CH5126766 および trametinib (MEK 阻害剤)、グルタチオン経路およびメバロン酸経路の代謝異常に対しては、それぞれサラゾピリン (salazosulfapyridine、以下 SASP) とスタチンを使用した。これらの薬剤を後述する理論的根拠に基づいて組み合わせ、主に TNBC 型ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 細胞を用いて、各薬剤の併用効果を検証するとともに、その分子メカニズムについて解明することとした。

4. 研究成果

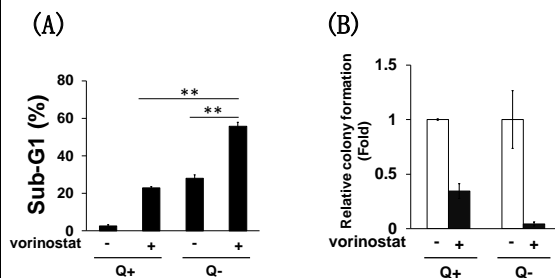
併用戦略1: vorinostat および SASP の併用効果

「遺伝子調節化学予防薬」として HDAC 阻害剤である vorinostat を選択した。vorinostat は活性酸素種 (reactive oxygen species、以下 ROS) を誘導することで、癌細

胞を殺傷し、また動物実験において乳癌の発癌予防効果が報告されている (*Anticancer Res.* 1999;19:4999-5005)。次に癌代謝経路阻害剤としては SASP を選択した。TNBC 型乳癌においては、グルタチオン (以下、GSH) 合成経路が亢進しており、GSH は細胞内の ROS を消去する。SASP はシスチン/グルタミン酸トランスポーター-xCT の機能を阻害することにより、細胞内 GSH 量を負に制御し、vorinostat による ROS 産生および細胞死誘導を増強させるのではないかと仮説を立案した。以下、主だった実験結果について報告する。

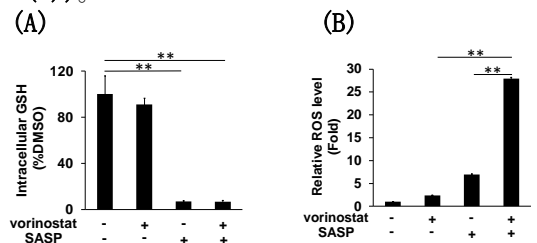
【図1】グルタミンの枯渇下による、vorinostat の細胞死誘導とコロニー形成抑制

まず予備実験として、MDA-MB-231 細胞に対し、培地中のグルタミン (図中では Q と表示) を枯渇させた条件において、vorinostat を処理したところ、グルタミン枯渇下において、細胞死誘導 (図1(A)) およびコロニー形成抑制 (図1(B)) 効果の増強が認められた。グルタミン枯渇は細胞内 GSH の減少を惹起することから、vorinostat の感受性は細胞内 GSH 量に依存する可能性が示唆された。



【図2】 vorinostat+SASP 併用による細胞内 GSH の減少および相乗的な ROS 誘導効果

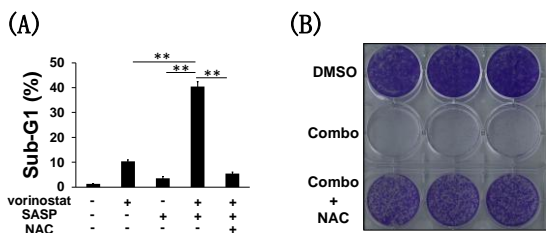
次に SASP の細胞内 GSH 量に対する影響について評価したところ、SASP 500 μ M 処理 24 時間において、著明な GSH 量の減少を認め (図2(A))、さらに vorinostat 1.6 μ M および SASP 500 μ M を併用処理したところ、処理後 48 時間において、相乗的な ROS 産生を認めた (図2(B))。



【図3】 vorinostat+SASP 併用による相乗的な細胞死誘導およびコロニー形成抑制効果

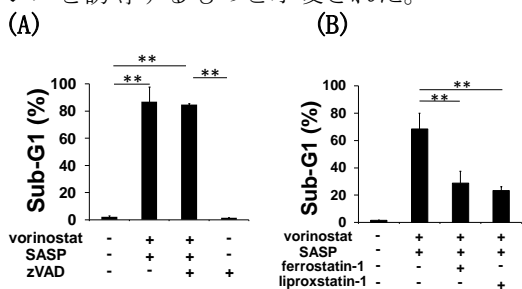
次に vorinostat 1.6 μ M および SASP 500 μ M 処理 144 時間において、相乗的な細胞死誘導 (図3(A)) および著明なコロニー形成抑制 (図3(B)) を認めた。これらの現象は GSH の前駆物質である N-acetylcystein (以下、NAC) の添加により相殺されたことから (図

3(A, B)), vorinostat と SASP の併用効果は GSH 依存的な現象であるものと考えられた。



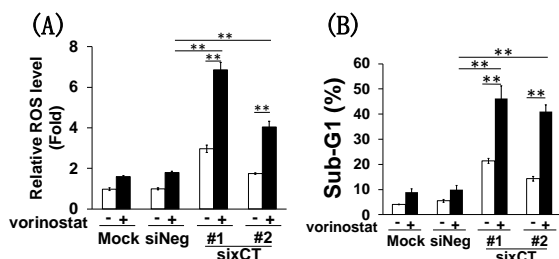
【図4】 vorinostat+SASP 併用によるフェロトローシス誘導

さらに vorinostat+SASP 併用による細胞死誘導の詳細なメカニズムを解析するために、両剤併用時に全カスパーゼ阻害剤である Z-VAD-FMK を処理したところ、sub-G1 細胞の減少は認めず (図 4(A))、アポトーシス以外の細胞死の可能性が示された。SASP は既に脂質の過酸化を誘引とする鉄依存性の細胞死形態であるフェロトローシスを誘導することが知られているため、2 種のフェロトローシス阻害剤 ferrostatin-1 および liproxstatin-1 を処理したところ、vorinostat+SASP 併用による sub-G1 細胞の増加は有意に減少した (図 4(B))。以上の結果から、MDA-MB-231 細胞において、vorinostat+SASP 併用はフェロトローシスを誘導するものと示唆された。

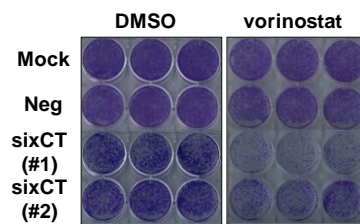


【図5】 xCT の発現枯渇による vorinostat の感受性増強

xCT 阻害活性を有する SASP が vorinostat の感受性を増強させたことから、xCT を siRNA により発現枯渇させることで、vorinostat の感受性が増強するかどうかについて検証した。siRNA による xCT の発現枯渇により、ROS の誘導 (図 5(A))、細胞死の増強 (図 5(B)) およびコロニー形成抑制効果 (図 5(C)) が認められ、これらのことから、xCT の発現を負に制御することで、ROS 誘導依存性に vorinostat の感受性が増強する可能性が示唆された。



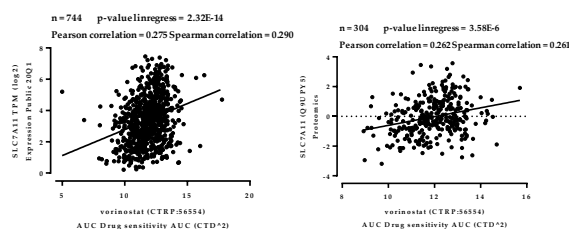
(C)



【図6】 vorinostat の感受性と xCT 発現量の逆相関性

最後に公共データベース DepMap を用いて、様々な癌細胞における vorinostat と xCT 発現の相関性について解析したところ、xCT の mRNA レベル (図 6(A)) およびタンパク質レベル (図 6(B)) いずれにおいても、vorinostat の感受性と xCT の発現レベルは逆相関することを見出した。これは即ち、我々がこれまで示した xCT の阻害および発現減少が、vorinostat の感受性を増強させる結果と矛盾せず、また今後、xCT の発現レベルが vorinostat の感受性予測マーカーとして応用しうることを示唆している。

(A) (B)



【総括1】

● vorinostat による HDAC 阻害作用と、SASP による、xCT 阻害を介したグルタチオン代謝阻害作用は、トリプルネガティブ型乳癌細胞に対し、相乗的な ROS 誘導を介して、細胞死 (フェロトローシス) を誘導する可能性が示された。

● xCT の発現レベルは vorinostat の感受性予測マーカーとなりうる可能性が示された。

● 今回一連の実験を用いた SASP の濃度が臨床上の Cmax を超過しており、実際、動物実験では、SASP の毒性のため、十分な併用効果の検証には至らなかった。今後、実践的な癌予防の達成には、何らかのドラッグデリバリーシステムの開発含め、安全域でグルタチオン代謝経路の抑制を達成しうるような創薬戦略が必要と考える。

併用戦略2：MEK 阻害剤およびスタチンの併用効果

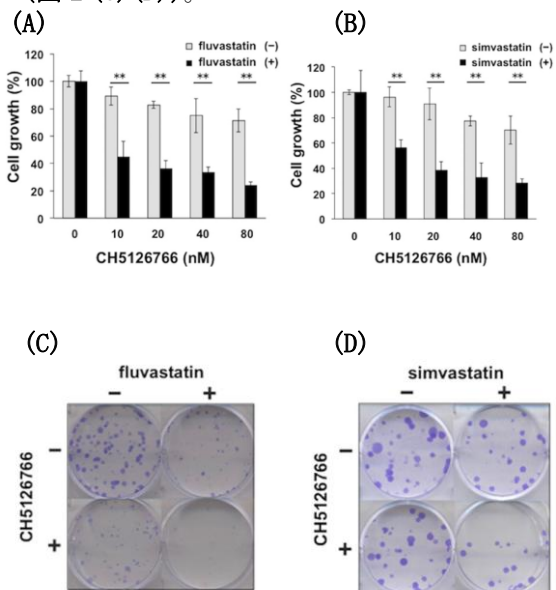
第2の併用戦略は、「遺伝子調節化学予防薬」として MEK 阻害剤である CH5126766 および trametinib を選択した。MEK 経路は多くの癌種において活性化しており、家族性乳癌の約半数にみられる BRCA1 変異乳癌においても、EGFR 経路の活性化や、約半数に EGFR の活性

化変異がみられる (*Br J Cancer*.2005; 92:1922-6)ことから、家族性乳癌においてもEGFRの下流であるMEK経路が活性化しているものと考えられ、MEK阻害剤の効果が期待される。しかしながら一方で、MEK経路の抑制により生じるAkt経路の二次的な活性化が、MEK阻害剤耐性の一因として問題視されている。そこで私たちは、メバロン酸経路がコレステロール合成の他に、低分子Gタンパク質のプレニル化を介し、Akt経路を活性化させることに着目し、メバロン酸経路阻害剤として高コレステロール血症治療薬のスタチンを使用し、MEK阻害剤と併用することにより、Akt活性の抑制を通じて、MEK阻害剤の耐性を克服できるのではないかと仮説を立てた。以下に主だった実験結果について報告する。

【図1】CH5126766とスタチンはMDA-MB-231細胞の増殖抑制において併用効果を示す

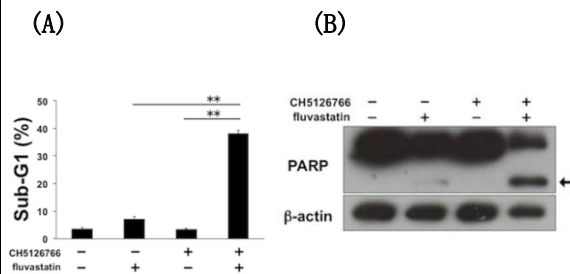
MDA-MB-231細胞に対し、CH5126766およびfluvastatin 0.3 μMを72時間併用処理し、細胞増殖抑制効果について、WST-8 assayにより評価したところ、2剤は有意な併用効果を示した (図1(A))。simvastatinとの併用においても同様の傾向がみられた (図1(B))。

次にコロニー形成試験においても、CH5126766 40 nMおよびfluvastatin/simvastatin 0.3 μM併用処理により、有意なコロニー形成の抑制を認めた (図1(C)(D))。



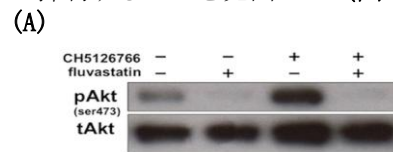
【図2】CH5126766とfluvastatinの併用はアポトーシスを誘導する

次に、CH5126766とfluvastatinの併用効果のメカニズムについて、フローサイトメトリー解析を行ったところ、2剤の併用により、sub-G1細胞の増加を認めた (図2(A))。またウエスタンブロット法により、2剤併用時にPARPが切断し活性化型になることも見出した (図2(B))。以上より、2剤の併用効果はアポトーシス誘導によるものと考えられた。



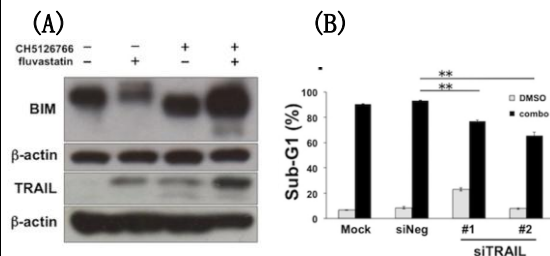
【図3】CH5126766はAktを活性化させるが、fluvastatinがこれを抑制する

次にMEK阻害剤のアポトーシス耐性に重要とされるAktの活性化について、ウエスタンブロット法により解析した結果、CH5126766処理により活性化したAktを、fluvastatinが抑制することを見出した (図3(A))。



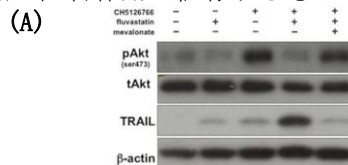
【図4】CH5126766とスタチンの併用によりTRAILが誘導される

次に、CH5126766とスタチン併用によるアポトーシスに関わる分子を探索したところ、アポトーシス誘導分子であるBIMとTRAILの発現上昇が認められた (図4(A))。より発現上昇が顕著であったTRAILに関して、siRNAを用いてノックダウンしたところ、2剤併用により誘導されたアポトーシスが部分的に減弱したことから (図4(B))、TRAILがCH5126766とスタチン併用によるアポトーシス誘導に関与していることが示唆された。

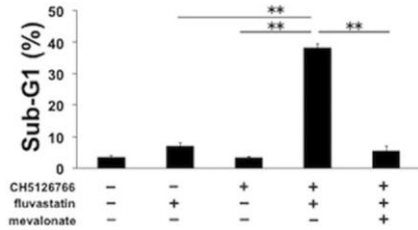


【図5】メバロン酸の添加によりfluvastatinによるAkt抑制効果が相殺される

次にCH5126766とスタチンの併用効果が、スタチンのon-target効果であるかどうかを評価するために、メバロン酸経路の中間代謝物であるメバロン酸 (以下、MVA) を添加するadd-back実験を行ったところ、MVAの添加により、スタチンによるAktの抑制効果およびTRAILの上昇はキャンセルされ (図5(A))、また2剤併用によるアポトーシス誘導も減弱した (図5(B))。以上より、一連の効果はスタチンのon-target効果であるメバロン酸経路の阻害作用に依存するものと考えられた。



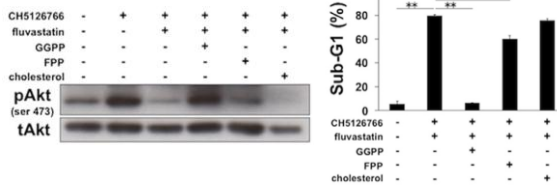
(B)



【図6】 ゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP) の添加により fluvastatin による Akt 抑制効果が相殺される

同様に、メバロン酸経路の最終代謝産物であるゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP)、ファルネシルニリン酸 (FPP)、コレステロール、各々を添加したところ、fluvastatin による Akt のリン酸化抑制 (図6(A)) および、2 剤併用処理により誘導されたアポトーシス (図6(B)) は GGPP の添加によってのみ相殺された。以上のことから、CH5126766 によるアポトーシス耐性にはゲラニルゲラニル化が関わっていることが示唆された。

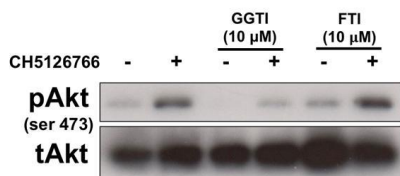
(A)



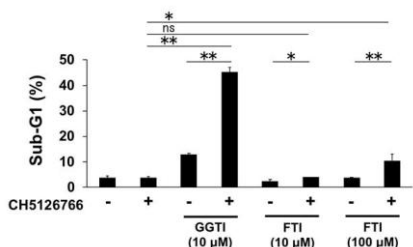
【図7】 ゲラニルゲラニル化の抑制により MEK 阻害剤による Akt の活性化が阻害されアポトーシスが誘導される

MEK 阻害剤のアポトーシス耐性とゲラニルゲラニル化の関連性についてさらに検証するために、ゲラニルゲラニル化阻害剤 (GGTI) およびファルネシル阻害剤 (FTI) と、CH5126766 を併用処理したところ、GGTI 処理でのみ、CH5126766 処理に伴う Akt の活性化が抑制され (図7(A))、かつ相乗的なアポトーシス誘導が認められた (図7(B))。以上のことから、CH5126766 によるアポトーシス誘導にはゲラニルゲラニル化阻害が重要であると考えられた。

(A)



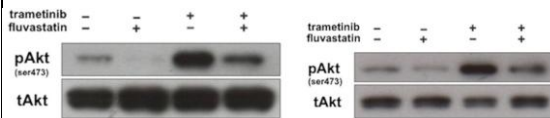
(B)



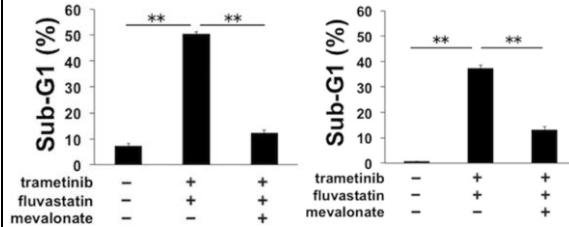
【図8】 他の癌細胞においても、MEK 阻害剤とスタチンのアポトーシス誘導効果が認められる

MEK 阻害剤とスタチンの併用効果が他の癌腫においてもみられるかどうかについて、メラノーマ細胞株 SK-MEL-28 および非小細胞肺癌細胞株 A549 に対して、MEK 阻害剤 trametinib を用いて、検証したところ、いずれの細胞においても、trametinib 処理により活性化した Akt を fluvastatin が抑制し (図8(A))、さらに 2 剤併用により、アポトーシスの増強を認め、かつその効果は MVA 添加により相殺された (図8(B))。

(A) (左) SK-MEL-28 (右) A549



(B) (左) SK-MEL-28 (右) A549



【総括2】

●MEK 阻害剤による MEK 経路抑制と、スタチンによるメバロン代謝阻害作用は、TNBC 型乳癌細胞に対し、Akt 経路の抑制を介して、細胞死を誘導する可能性が示唆された。

●今回、一連の実験に用いた CH5126766 と fluvastatin の濃度はともに Cmax 以下の濃度であり、これらの組み合わせが、実践的な癌予防を考えるうえにおいて実現可能性の高い併用投与となることが期待される。

●MEK 阻害剤とスタチンのアポトーシス誘導の併用効果は TNBC 型乳癌以外の癌腫にも認められたことから、本課題のコンセプトである、癌の遺伝子異常を標的とした「遺伝子調節化学予防」と、癌特異的な代謝異常に着目した「代謝調節化学予防」との併用戦略は、様々な癌腫に対し、普遍的に応用できる可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

(1) Iizuka-Ohashi M, Watanabe M*, Sukeno M et al. (*corresponding author)

Blockage of the mevalonate pathway overcomes the apoptotic resistance to MEK inhibitors with suppressing the activation of Akt in cancer cells *Oncotarget* (査読あり)

2018 13;9(28):19597-19612.
doi: 10.18632/oncotarget.24696.

(2) Miyamoto K, Watanabe M*, Boku S et al.
(*corresponding author)

xCT Inhibition Increases Sensitivity to Vorinostat
in a ROS-Dependent Manner
Cancers (査読あり) 2020 30;12(4):827.
doi: 10.3390/cancers12040827.

[学会発表] (計 4 件)

(1) Iizuka-Ohashi M, Watanabe M et al.
Combined effects of MEK inhibitors and
statins on cancer cells

TAT (targeted anticancer therapies)
(2018 年)

(2) 渡邊 元樹* (*筆頭演者)
メバロン酸経路の阻害は Akt 経路の活性化を
抑制し MEK 阻害剤によるアポトーシスを惹起
する

がん予防学術大会 (2018 年)

(3) 飯塚 まひろ、渡邊 元樹
メバロン酸経路の阻害はゲラニルゲラニル
化の抑制を介して MEK 阻害剤および mTOR 阻
害剤の効果を増強する

第 77 回日本癌学会学術総会 (2018 年)

(4) 飯塚 まひろ、渡邊 元樹
Blockage of the mevalonate pathway
overcomes the apoptotic resistance to MEK
inhibitors

第 11 回四大学連携研究フォーラム (2018 年)

[図書] (計 件)

該当なし。

[産業財産権]

該当なし。

○出願状況 (計 件)

該当なし。

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 件)

該当なし。

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<https://www.kpu-m.ac.jp/doc/classes/igaku/tiiki/1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 元樹 (WATANABE Motoki)

京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：40723581

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()