

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2019
課題番号：18K16780
研究課題名（和文）スタチン製剤の多面的効果とワールブルク効果への影響に着目した卵巣癌新規創薬研究

研究課題名（英文）New drug discovery against ovarian cancer focusing on the multifaceted effects of statins and their effects on the Warburg effect

研究代表者
小林 佑介（Kobayashi, Yusuke）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：10439763
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：既承認薬を別の疾患の新規治療薬として開発するドラッグリポジショニングの観点から、脂質異常症治療薬スタチンを卵巣癌治療に導入する基礎的研究を行った。スタチンの作用経路としてメバロン酸経路以外に、様々な生物学的プロセス、構成要素、分子機能が明らかとなった。スタチンのワールブルク効果に対する制御機構として、制御因子であるPTBP1の発現がスタチン投与群において有意に上昇していることを明らかとした。術中迅速診断にて卵巣癌と診断された症例において腫瘍を採取し、ヒト卵巣癌検体に対するスタチンの奏効を確認するHistoculture Drug Response Assayの系を樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
スタチンの抗腫瘍効果における多面的効果がメバロン酸経路以外の作用経路からも誘導されることを明らかにすることができた。加えて、スタチンががん細胞に特徴的なワールブルグ効果を酸化リン酸化に誘導しているのかという学術的問いに対して制御機構の一端を明らかとすることができた。また、Histoculture Drug Response Assay(HDRA)の系を樹立できたことで、ヒト卵巣癌検体にスタチンが奏効するかを明らかとすることができる。さらに、HDRAにおける増殖抑制率の結果から、奏効症例と非奏効症例に分類し、両群間の臨床病理学的背景を比較検討し有意に差のある因子を抽出することに繋がられる。

研究成果の概要（英文）：From the perspective of drug repositioning to develop an already approved drug as a novel treatment for another disease, we conducted a basic study to apply a statin for dyslipidemia into the treatment of ovarian cancer. In addition to the mevalonate pathway, various biological processes, components, and molecular functions have been identified as pathways of action by statin. The expression of PTBP1, a regulatory factor, was significantly up-regulated in the statin-treated group. We established a system of the Histoculture Drug Response Assay to confirm the response of statin to human ovarian cancer specimens by collecting tumors from patients with ovarian cancer diagnosed by rapid intraoperative diagnosis.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：ドラッグリポジショニング 卵巣癌 スタチン がん代謝

1. 研究開始当初の背景

上皮性卵巣癌に対する新規治療薬の開発が急務である一方で新規創薬が伸び悩む背景の中、既承認薬の新しい薬理効果を明らかとし、その既承認薬を別の疾患の新規治療薬として開発するドラッグリポジショニングが注目されている。申請者は卵巣癌に対するドラッグリポジショニングとして、脂質異常症治療薬スタチンの卵巣癌に対する *in vitro* 及び *in vivo* における細胞増殖抑制効果、抗腫瘍効果を既に報告してきた(図 1)。スタチン製剤が、アポトーシスやオートファジーを誘導すること、細胞周期に関与し G1 arrest を誘起すること、クロマチン複製維持に関わる mini-chromosomal maintenance (MCM) family の発現を障害すること、これらの多面的効果により細胞増殖抑制効果、抗腫瘍効果を発揮している可能性を報告している。また、卵巣癌細胞株の増殖抑制にあたっては、スタチン製剤が抑制するメバロン酸合成経路の本流上流ではなく、同経路より分岐したタンパクのプレニル化に関わるファルネシル転移酵素およびゲラニルゲラニル転移酵素が重要な役割を果たしていることを明らかとしている。一方で、申請者の直近の実験結果では、ファルネシル転移酵素およびゲラニルゲラニル転移酵素を同時阻害する L-778123 を化学合成したうえでスタチン製剤と比較したところ、卵巣癌細胞株 OVSAHO と KURAMOCHI における IC50 値で L-778123 はスタチン製剤に劣った。このことより、スタチン製剤は、ファルネシル転移酵素およびゲラニルゲラニル転移酵素を含めたメバロン酸経路を阻害することだけでなく、その他の作用経路により多面的効果を示し抗腫瘍効果を発揮していることが示唆された。また、申請者は、スタチン製剤がメバロン酸合成経路を阻害することで、ワールブルグ効果を回避し TCA 回路が活性化される現象を報告している(図 2)。これら「スタチン製剤の抗腫瘍効果における多面的効果はどのようなメカニズムにより誘導されるのだろうか?」「スタチン製剤はなぜがん細胞に特徴的なワールブルグ効果を、酸化的リン酸化に誘導しうるのだろうか?」二つの学術的な問いを背景に研究内容を想起した。

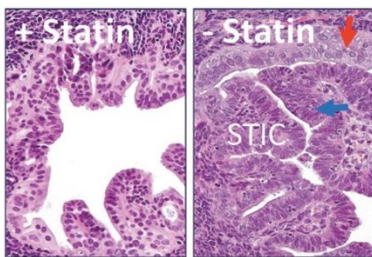


図 1: モデルマウスにおいてスタチン投与群では微小卵管上皮内癌(STIC)を認めない。

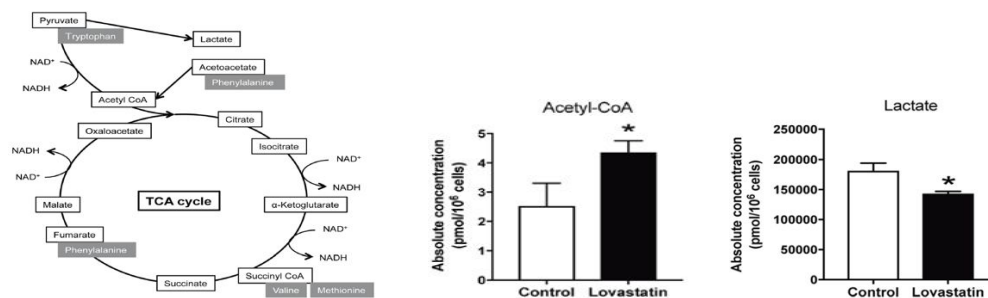


図 2: スタチン添加培養により TCA 回路関連代謝物が増加した一方で、嫌氣的解糖経路の最終産物である乳酸が減少した。

2. 研究の目的

上記の学術的な問いを明らかとするべく、本申請研究ではスタチン製剤の多面的効果とワールブルグ効果に与える影響に着目して、その作用機序を明らかにし臨床応用へ繋げることを目的とした。

3. 研究の方法

スタチン製剤の抗腫瘍効果における多面的効果の作用経路についての検討

メバロン酸合成経路以外の作用経路を明らかとするべく、L-778123 とスタチンを各々添加培養した卵巣癌細胞株を用いてマイクロアレイ解析を行う。その結果により L-778123 と比較することでスタチン製剤の抗腫瘍効果における作用経路の順位づけを図るとともに、多面的効果との

関連性について検討した。

スタチン製剤のワールブルク効果に対する制御機構の検討(in vitro)

ワールブルク効果の成立には、解糖系の律速酵素である pyruvate kinase (PK) の splicing variants M1、M2 (PKM1、PKM2)が発癌過程でPKM1からPKM2へと移行することが重要な役割を果たしていると考えられる。これらPKの選択的splicingを実行するsplicerとしてheterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP)ファミリーのPTBP1、hnRNPA1、hnRNPA2やserine/arginine-rich (SR)タンパクファミリーのSRSF3などが知られている。スタチン投与によるPTBP1、hnRNPA1、hnRNPA2、SRSF3、PKM1、PKM2の発現変化をメタボローム解析やqRT-PCR、western blotにより確認し、PK選択的splicingを介したPKMのisoformシフトによるワールブルク効果に対する制御機構の可能性を検討した。

臨床検体を用いたワールブルク効果に対する制御機構の検証と評価系の樹立(in vivo)

慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認の下、術中迅速診断にて卵巣境界悪性腫瘍もしくは卵巣癌と診断された症例において腫瘍を一部採取し、パラフィン切片の作成とRNAの抽出を行う。パラフィン切片に対しては、PTBP1、hnRNPA1、hnRNPA2、SRSF3、PKM1、PKM2の発現を免疫化学染色で確認していく。抽出されたRNAについては、定量的RT-PCRおよびメタボローム解析により、正常卵巣組織での発現と比較する。以上の結果を最終病理診断と照らし合わせ、卵巣癌発癌過程及び各組織型におけるワールブルク効果の制御機構の変化を明らかにし、スタチン製剤の今後の臨床応用を想定しその評価系の樹立を試みた。

4. 研究成果

スタチン製剤のメバロン酸合成経路以外の作用経路として、G0 bioprocessではpositive regulation of release of cytochrome c from mitochondria, apoptotic signaling pathway, cell cycle process, chromosome segregationなどが、G0 cellular componentではintegral component of plasma membrane, extracellular space, chromosome, non-membrane-bounded organelleなどが、G0 molecular functionではspermidine binding, diamine Nacetyltransferase activity, catalytic activity, acting on DNAなどの経路が明らかとなった。

解糖系の律速酵素である pyruvate kinase (PK) の splicing variants M1、M2 (PKM1、PKM2)、PKの選択的splicingを実行するsplicerとしてheterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP)ファミリーのPTBP1の、スタチン投与による発現変化について定量的qRT-PCRを行った。結果として、PKM1とPKM2の発現に変化は見られなかったが、その制御因子であるPTBP1の発現がスタチン製剤投与群において有意に上昇していた。また、スタチン製剤のワールブルク効果に対する制御機構として、PKM1とPKM2の発現に変化は見られなかったが、その制御因子であるPTBP1の発現がスタチン製剤投与群において有意に上昇していることを確認し、制御機構の一端を明らかとすることができた。

術中迅速診断にて卵巣癌と診断された症例において腫瘍を一部採取し、ヒト卵巣癌検体に対するスタチン製剤の奏効を確認するHistoculture Drug Response Assay(HDRA)の系を樹立した。検討薬剤としてシンバスタチン 100uM/250uM/500uMを、卵巣癌標準治療薬剤であるパクリタキセル 40µg/ml、カルボプラチン 30µg/mlと比較検討している。各薬剤の抑制率(Inhibition index)を算出することで、ヒト卵巣癌検体にスタチン製剤が奏効するかを明らかとすることができる。さらに抑制率の結果から、奏効症例と非奏効症例に分類し、両群間の臨床病理学的背景を比較検討し有意に差のある因子を抽出することに繋げられる。

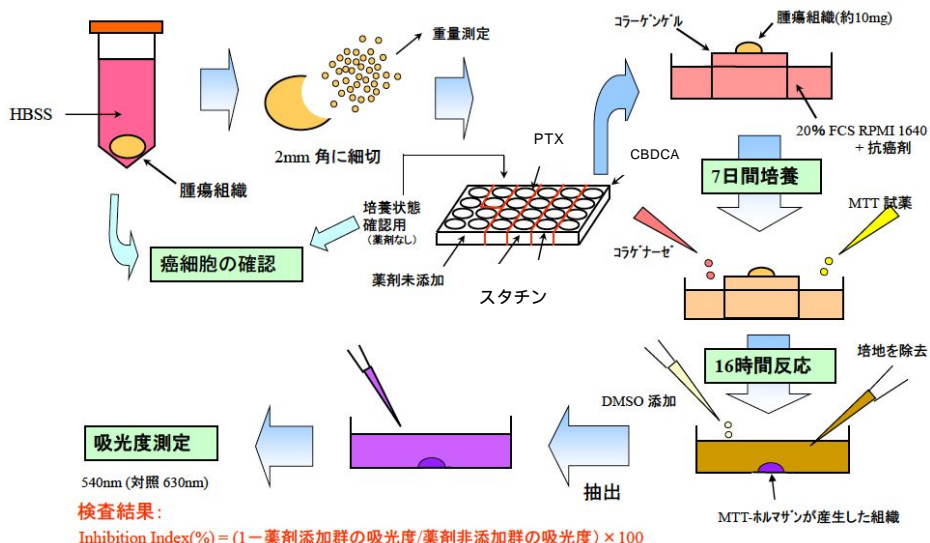


図3: 樹立したHDRAの系

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kobayashi Yusuke, Banno Kouji, Kunitomi Haruko, Nagai Shimpei, Takahashi Takayuki, Anko Mayuka, Iijima Moito, Takeda Takashi, Matoba Yusuke, Nakamura Kanako, Tsuji Kosuke, Tominaga Eiichiro, Aoki Daisuke	4. 巻 10
2. 論文標題 Is antidyslipidemic statin use for cancer prevention a promising drug repositioning approach?	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Cancer Prevention	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/CEJ.0000000000000497	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Yusuke, Banno Kouji, Kunitomi Haruko, Takahashi Takayuki, Takeda Takashi, Nakamura Kanako, Tsuji Kosuke, Tominaga Eiichiro, Aoki Daisuke	4. 巻 45
2. 論文標題 Warburg effect in Gynecologic cancers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 542 ~ 548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.13867	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Yusuke, Banno Kouji, Kunitomi Haruko, Tominaga Eiichiro, Aoki Daisuke	4. 巻 30
2. 論文標題 Current state and outlook for drug repositioning anticipated in the field of ovarian cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Gynecologic Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3802/jgo.2019.30.e10	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yusuke Kobayashi, Kouji Banno, Haruko Kunitomi, Keiko Watanabe, Yusuke Matoba, Moito Iijima, Takashi Takeda, Masataka Adachi, Miho Iida, Kanako Nakamura, Kosuke Tsuji, Eiichiro Tominaga, Mamoru Tanaka, Daisuke Aoki.
2. 発表標題 Bisphosphonates, another candidate of drug repositioning for ovarian cancer.
3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会学術講演会 International Session Workshop.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuke Kobayashi.
2. 発表標題 Drug repositioning strategy for ovarian cancer.
3. 学会等名 Asian Society of Gynecologic Oncology (ASGO) 5th Workshop. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuke Kobayashi, Haruko Kunitomi, Kouji Banno, Shimpei Nagai, Mayuka Anko, Takayuki Takahashi, Moito Iijima, Takashi Takeda, Keiko Watanabe, Yusuke Matoba, Kanako Nakamura, Kosuke Tsuji, Eiichiro Tominaga, Mamoru Tanaka, Daisuke Aoki.
2. 発表標題 Drug repositioning for ovarian cancer targeting mevalonate pathway.
3. 学会等名 Royal College of Obstetricians & Gynaecologists (RCOG) World Congress 2019. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林佑介
2. 発表標題 ドラッグリポジショニングによるメバロン酸経路を標的とした卵巣癌予防薬・治療薬の創出
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考