

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26890019

研究課題名(和文) 癌細胞のスタチン系薬剤感受性を決定する分子メカニズム 感受性マーカーの探索

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms involved in the susceptibility to statins on cancer cells

研究代表者

割田 克彦 (Warita, Katsuhiko)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：40452669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：スタチンは血中コレステロール値の低下作用以外に制がん作用を発揮することが報告され近年注目を集めている。しかしスタチンがどのような特徴をもつがん細胞に有効なのはわかっていない。これまでに我々はスタチン感受性マーカー候補としてE-カドヘリンを同定してきた。本研究では、がん細胞のスタチン感受性がE-カドヘリンの発現制御で変化するかどうかを解析した。感受性株にE-カドヘリン遺伝子を組み込んで発現させると、50%阻害濃度は約3.7倍増加し、スタチンに対する耐性の獲得がみられた。一方、耐性株がもつE-カドヘリンを抑制した結果、感受性が増強し、スタチン耐性の1因子としてE-カドヘリンの存在が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：The anti-proliferative effect of statins on cancer cells has received widespread attention, since it has been reported that the statins may exhibit an anti-cancer effect in addition to their cholesterol-lowering effect. However, what type of cancer cell statin is effective for is unclear. Our previous study identified E-cadherin as a candidate factor determining the susceptibility to statin. To demonstrate that E-cadherin actually determines the susceptibility of cancer cells to statin, we examined if the regulation of E-cadherin expression has an influence on the susceptibility of cancer cells to statin in the present study. When E-cadherin gene (CDH1) was inserted into the statin-sensitive cells which had no E-cadherin, the half maximal inhibitory concentration (IC50) increased 3.7-fold. On the other hand, E-cadherin knockdown in the statin-resistant cancer cells increased their susceptibility to statin. These results strongly suggest that E-cadherin is a statin resistance factor.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：薬効評価と予測 がん細胞の特性 化学療法 スタチン系薬剤

1. 研究開始当初の背景

近年、スタチン系薬剤が血中コレステロール値の低下作用以外に、制がん作用を発揮する可能性があることが報告され、がん細胞に対する効果が注目され始めた。スタチン系薬剤の制がん作用が注目される一方で、本薬剤に対する反応性は細胞種によりかなり差が存在する。これまでに我々は、NCI-60 細胞パネル（薬剤の潜在的な抗がん性を評価するための 60 種類のがん細胞サンプル集）を用いて、スタチン系薬剤の 1 つであるアトルバスタチンの制がん作用を検討してきた。スタチンの作用点がヒドロキシメチルグルタリル CoA (HMG-CoA) 還元酵素 (HMGCR) であることから、当初はその発現量の差が感受性を左右する因子ではないかと考えた。しかし、スタチンに対して感受性を示すがん細胞と耐性を示すがん細胞との間に大きな差はみられず、がん細胞のスタチン感受性を決める因子は未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

(1) これまでに我々はプロテオーム解析のデータ比較により、スタチンが効かないがん細胞、すなわちスタチン耐性株には上皮系細胞に特有の細胞接着因子である E-カドヘリンが高発現していることを報告してきた。本研究課題では、これまでの成果を裏付けることを目的とし、E-カドヘリンを細胞に強制発現あるいは発現抑制することで、がん細胞のスタチン感受性が変化するか否か検討することを試みた。

(2) がん細胞が発現しているタンパク質を網羅的に解析した結果、スタチン感受性マーカー候補分子として前述の E-カドヘリンをスクリーニングするに至ったが、それを確実にするにはスタチンの標的分子である HMGCR の遺伝子に異常がないかを確かめる必要がある。HMGCR は 7 つの一塩基多型 (SNP) が報告されているが、そのうちの 2 つ (rs17244841 および rs17238540) はスタチンの感受性に関わることが明らかとなっている。本研究では、これらの変異を DNA シークエンス法により確認し、がん細胞のスタチン感受性と相関があるか否かを解析した。

(3) スタチン系薬剤はその作用の強弱によりスタンダードスタチンとストロングスタチンに分類され、また化学性状の違いにより脂溶性スタチンと水溶性スタチンに分類される。各スタチン系薬剤は HMGCR を阻害し、メバロン酸経路を抑制するという点では共通であるが、作用の強弱、コレステロール合成阻害以外の作用、薬物動態に関連した相互作用などは薬剤によって違いが存在する。本研究ではアトルバスタチン (ストロングかつ脂溶性スタチン) で得られた知見が他のスタチン系薬剤全般に共通するのかを調べた。

3. 研究の方法

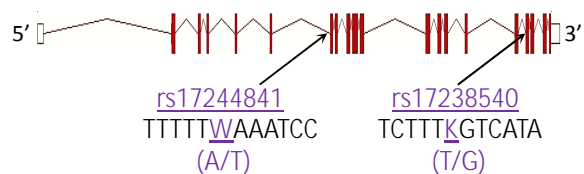
本研究には細胞情報が豊富な NCI-60 細胞パネルを用い、60 種類のがん細胞サンプル集のうち、以下に示した 7 器官 15 種類のがん細胞株を用いた。

- ・大腸がん：HCT-116, KM-12
- ・卵巣がん：IGROV1, OVCAR3
- ・乳がん：HS-578T, T47D, MDA-MB-231
- ・肺がん：HOP-92, NCI-H322M
- ・前立腺がん：PC-3, DU-145
- ・メラノーマ：SK-MEL-5, MDA-MB-435
- ・脳腫瘍：SF-295, SF-539

(1) pcDNA3.1 プラスミドベクターを用いて、E-カドヘリン遺伝子をスタチン感受性株 MDA-MB-231 に組み込み、E-カドヘリンを強制発現させた。1 x 10⁵/mL の細胞を 12-well プレートに培養し、翌日、0.1 ~ 30 μM のアトルバスタチンを曝露した。72 時間後、クリスタルバイオレット染色により生細胞数を測定し、50% 阻害濃度 IC₅₀ の決定を行った。対照群として、pcDNA3.1 プラスミドベクターのみを組み込んだ MDA-MB-231 を準備した。

一方、E-カドヘリンの発現抑制実験には、スタチン耐性株である DU-145 を用いた。siRNA で E-カドヘリン遺伝子をノックダウンし、スタチンに対する感受性が增強するかを検討した。scramble siRNA を導入した DU-145 を対照群とした。

(2) ヒトの HMGCR 遺伝子は 20 個のエクソンを持ち、以下に示した 2 か所に、スタチン感受性に関わる SNP があることが報告されている (rs17244841 および rs17238540)。



本研究では、これらの変異を DNA シークエンス法で確認し、がん細胞のスタチン感受性との関連性を検討した。

(3) アトルバスタチン (脂溶性) と化学性状が異なるロスバスタチン (水溶性) について、がん細胞の増殖抑制効果を検討した。1 x 10⁵/mL の細胞を 12-well プレートに培養し、翌日、10 μM アトルバスタチンおよび 10 μM ロスバスタチンを曝露した。その 2 日後、4 日後、および 6 日後に細胞数を測定し、その値から増殖抑制の程度を判定した。

4. 研究成果

(1) スタチン感受性株 MDA-MB-231 に E-カドヘリンを強制発現させると IC₅₀ は 1.16 μM から 4.30 μM (約 3.7 倍) に増加し、スタチンに対する耐性の獲得がみられた (図 1)。

また、プラスミドベクターのみを組み込んだ対照群と E-カドヘリンを強制発現させた細胞株に、3 μM のアトルバスタチンを曝露した結果、明らかな増殖の違いが観察された (図 2)。

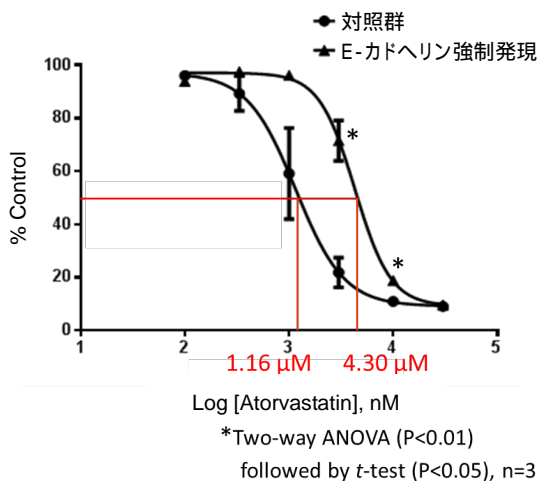


図 1. E カドヘリン強制発現細胞株の生存曲線

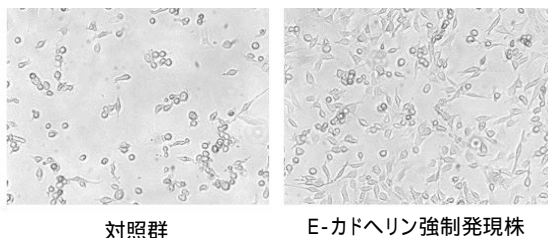


図 2. アトルバスタチン 3 μM 曝露 72 時間後の細胞像

次に、スタチン耐性株 DU-145 を用いて、scramble siRNA を導入した細胞 (対照群) と、E-カドヘリンの siRNA を導入した細胞 (E-カドヘリン発現抑制株) を準備した (図 3)。siRNA で E-カドヘリンの発現が抑制されたことを蛍光免疫染色で確認後、これらの細胞に 0.3 ~ 30 μM のアトルバスタチンを曝露し、それぞれの生存率を比較した。その結果、E-カドヘリンをノックダウンした細胞株は、3 μM 以上の濃度で有意に生存率の低下がみられた (図 4)。すなわち、スタチン耐性株である DU-145 は、E-カドヘリンの発現を抑制することでアトルバスタチンに対し感受性が増すことが示された。

以上から、E-カドヘリンの存在がスタチン感受性と強く相関するものと考えられた。

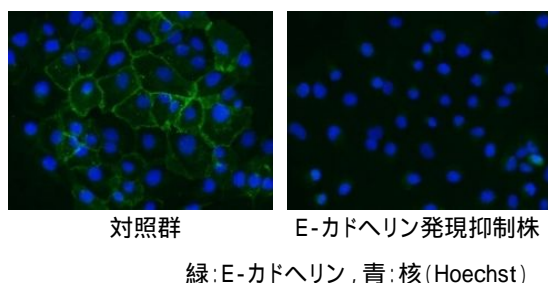


図 3. E-カドヘリンの蛍光免疫染色像

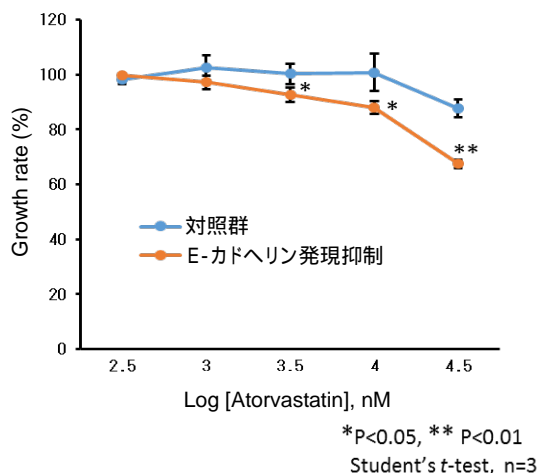


図 4. E カドヘリン発現抑制細胞株の増殖率

(2) DNA シークエンス法により HMGCR 遺伝子の塩基配列の決定を行った結果、大腸がんの細胞株 HCT-116 において、rs17244841 で A と T の、rs17238540 で G と T の置換があることが明らかとなった。その他の細胞株ではこれらの変異はみられなかった (図 5)。唯一、変異がみられた HCT-116 だが、この細胞株はスタチンに対して耐性株でも感受性株でもない中間株であり、HMGCR の遺伝子型とがん細胞のスタチン感受性との間に相関を見出すことは出来なかった。

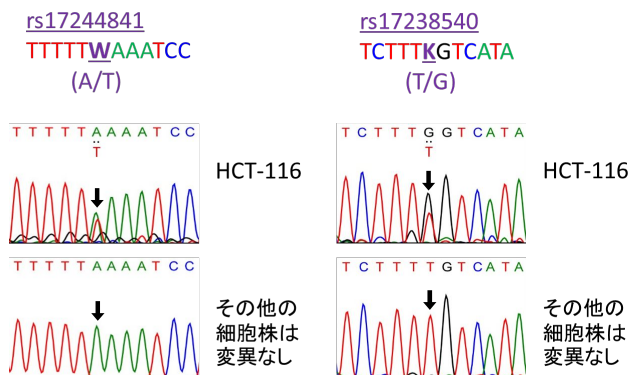


図 5. HMGCR 遺伝子の SNP 解析

(3) これまでに得たアトルバスタチン (脂溶性スタチン) での知見が、他のスタチン系薬剤にもあてはまるか否かを調べた結果、ロスバスタチン (水溶性スタチン) では、がん細胞の増殖抑制効果が低下する傾向がみられた (図 6)。これは水溶性スタチンの方が脂溶性スタチンよりも細胞膜透過性が低いことに起因すると考えられるが、HOP-92 など、一部のがん細胞では、脂溶性・水溶性に関わらず同程度の増殖抑制効果を示し、スタチンに対して強い感受性をもつ何らかの因子があることが示唆された。

肝臓などの細胞では、水溶性物質を細胞内に取り込む有機アニオン輸送体が存在することが知られているが、がん細胞における水溶性物質 (水溶性スタチン) の細胞内輸送と、

それによる増殖抑制効果との関連性については今後の検討課題である。

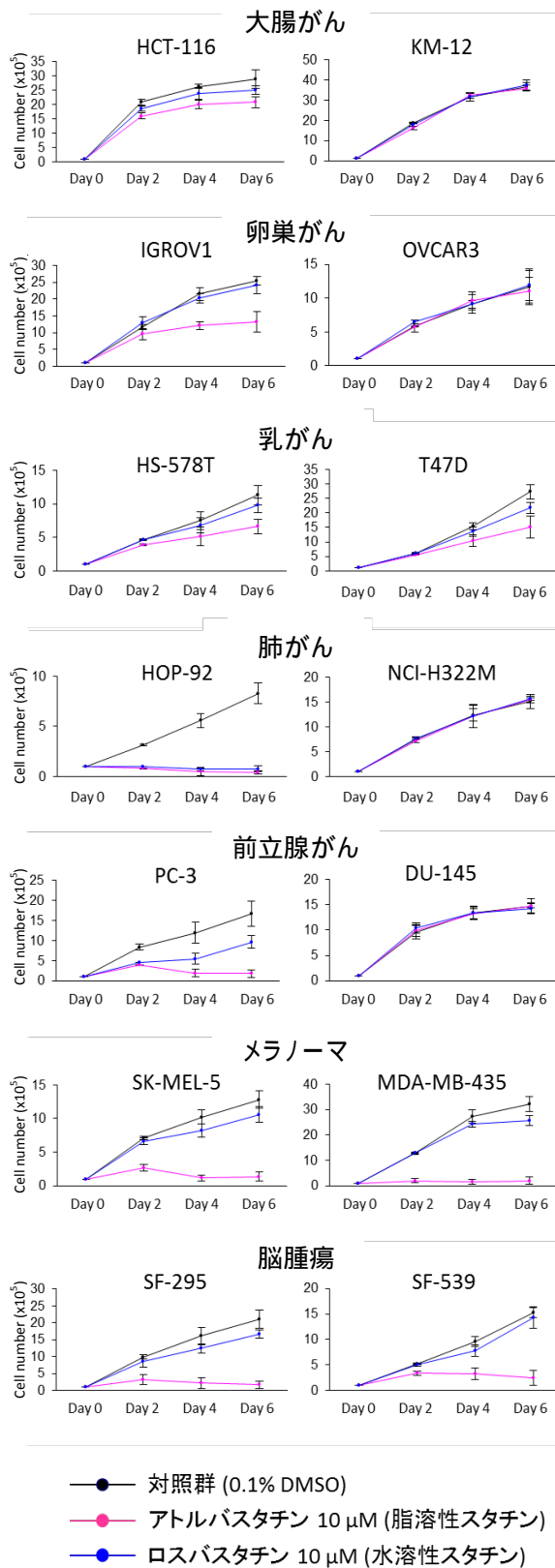


図6. スタチンの化学性状の違いとがん細胞増殖抑制効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Warita K, Warita T, Beckwitt CH, Schurdak ME, Vazquez A, Wells A, Oltvai ZN. Statin-induced mevalonate pathway inhibition attenuates the growth of mesenchymal-like cancer cells that lack functional E-cadherin mediated cell cohesion. *Scientific Reports*, 4:7593, 2014. 査読有. DOI: 10.1038/srep07593

〔学会発表〕(計2件)

割田克彦, 保坂善真, 三觜友子, 太田健一, 鈴木辰吾, 三木崇範, Zoltan N. Oltvai: 癌細胞のスタチン系薬剤感受性に関わる細胞特性に関する研究. 日本解剖学会第70回中国・四国支部学術集会, 2015.10.24-25, 愛媛大学(松山市)

割田克彦, 保坂善真, 三觜友子, 三木崇範, Zoltan N. Oltvai: 癌細胞のスタチン系薬剤感受性を決定する因子に関する研究. 第158回日本獣医学会学術集会, 2015.9.7-9, 北里大学(十和田市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

割田 克彦 (WARITA KATSUHIKO)
鳥取大学・農学部・准教授
研究者番号: 40452669

(2) 連携研究者

三木 崇範 (MIKI TAKANORI)
香川大学・医学部・教授
研究者番号: 30274294

保坂 善真 (HOSAKA YOSHINAO)
鳥取大学・農学部・教授
研究者番号: 00337023

太田 健一 (OHTA KEN-ICHI)
香川大学・医学部・助教
研究者番号: 50403720

鈴木 辰吾 (SUZUKI SHINGO)
香川大学・医学部・助教
研究者番号: 50451430

(3) 研究協力者

割田(三觜)友子 (WARITA TOMOKO)
徳島文理大学・薬学部・研究員
研究者番号: 00753112

Zoltan N. Oltvai
ピッツバーグ大学・医学部・准教授