

令和元年6月12日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18439

研究課題名(和文)スタチン系薬剤の制がん機構の解明と抗腫瘍効果を予測する新たな評価法への展開

研究課題名(英文)Elucidation of the anti-cancer mechanism of statins and development of a new evaluation method to predict their anti-tumor effect

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、脂質異常症治療薬スタチンの制がん効果が注目されている。スタチンは間葉系のがん細胞に効果を発揮しやすいことが報告されているが、間葉系のがん細胞ではなぜスタチンが効きやすいのか、その分子メカニズムには不明な点が多い。そこで本研究では、スタチン感受性株(間葉系がん細胞)と耐性株(上皮系がん細胞)を用い、スタチンが阻害するメバロン酸経路への依存度の違いを両細胞株間で比較した。その結果、間葉系がん細胞は上皮系がん細胞に比べてメバロン酸経路への依存度が高く、また、上皮系がん細胞であってもスタチンのターゲット分子をsiRNAで発現抑制すると、スタチンに対する感受性が顕著に高まることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スタチンは血中コレステロールの低下薬としてすでに実績のある薬剤であり、従来の抗がん剤と違い副作用が少なく、また、副作用のデータ蓄積も豊富であるため、がん治療への臨床応用までに長い時間と膨大な費用を要しないのが利点である。本研究を通して、スタチン耐性を示す上皮系がん細胞にスタチン感受性を付加・増強する方法が明らかとなってきた。本研究で得られた成果を発展させれば、転移する前の上皮系がん細胞にもスタチンが制がん効果を発揮し、がんの治療成績の向上が望めると考えている。

研究成果の概要(英文)：In recent years, the anti-tumor effect of statins, drugs used for hyperlipidemia, has become the focus of attention. Statins are reported to be effective against mesenchymal cancer cells; however, the molecular mechanism underlying the effect of statins on these cells remains unclear. In this study, differences in dependence on the mevalonate pathway, the route of endogenous cholesterol synthesis that is inhibited by statins, were compared between statin-sensitive cell lines (mesenchymal cancer cells) and statin-resistant cell lines (epithelial cancer cells). Results showed that mesenchymal cancer cells were more dependent on the mevalonate pathway than epithelial cancer cells; moreover, statin sensitivity significantly increased when expression of the statin-target molecule was suppressed with siRNA, even in epithelial cancer cells.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：スタチン がん細胞 化学療法 薬効評価と予測 制がん効果

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

スタチン系薬剤は脂質異常症の治療薬としてその有用性が証明され、現在広く使用されている。近年、スタチンが血中コレステロール値の低下作用以外に、抗腫瘍効果を発揮することが明らかとなってきた。スタチンはすでに認可されている薬剤であり、副作用の情報も多いことから、がん治療への応用は非常に有用である。

これまでに我々は、上皮系細胞マーカーとしても知られる細胞接着因子E-カドヘリンを細胞膜上にもたないがん細胞、つまり間葉系様のがん細胞ではスタチンが強い制がん効果を発揮することを明らかにしてきた。しかし、間葉系のがん細胞ではなぜスタチンが効果を発揮しやすいのか、逆に、上皮系のがん細胞ではなぜスタチンが効きづらいのか、その分子的背景はよくわかっていない。

## 2. 研究の目的

スタチンは細胞のコレステロール合成系であるメバロン酸経路を阻害することでその作用を發揮する。しかし、本経路からはコレステロールのほか、細胞活動に必須な多くの中間物質が生合成されるため、具体的にどの物質がスタチンの制がん効果に関わるのか不明な点が多い。そこで、アトルバスタチンが効果を發揮するがん細胞（感受性株）と効果を發揮しないがん細胞（耐性株）を用い、以下の実験(1)~(3)を通して、両細胞株のメバロン酸経路への依存度の違いを解析した。とくに本経路の中間産物に焦点を当てがんの細胞死に関わる因子の同定を試み、スタチンが効果を發揮するがん細胞の診断に結び付く基礎的知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

実験(1) スタチン感受性株として HOP-92 (肺がん由来)、PC-3 (前立腺がん由来) を、耐性株として NCI-H322M (肺がん由来)、DU-145 (前立腺がん由来) を用い、がん細胞のメバロン酸経路への依存度の検討として、スタチンの標的である HMG-CoA 還元酵素 (HMGCR) の発現を siRNA で抑制し、各細胞の生存率を比較した。

実験(2) 確実に細胞死を引き起こすアトルバスタチン 10  $\mu$ M を感受性株である HOP-92 に曝露し、同時にメバロン酸経路の主要な中間産物およびコレステロールの細胞外からの取込みに関与する LDL を添加して、細胞生存率の変化を解析した。本実験に用いたメバロン酸経路の中間産物は、メバロン酸、ファルネシルニリン酸 (FPP)、ユビキノン、ドリコール、ゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP)、スクアレンとした。

実験(3) スタチン耐性株 DU-145 および NCI-H322M を用いて、上記の実験(2)で同定した中間産物の合成酵素ならびにスタチンの標的である HMGCR を siRNA でノックダウンし、アトルバスタチンに対する感受性の変化を解析した。Scramble siRNA を導入した DU-145 と NCI-H322M を対照群として細胞生存率を比較した。

## 4. 研究成果

(1) 4種類のがん細胞株に HMGCR siRNA を導入して 72 時間後、HMGCR の遺伝子発現 (図 1A)、タンパク合成 (図 1B) とともに顕著な低下がみられた。HMGCR を発現抑制すると、いずれの細胞株も対照群に比べ生存率が有意に低下した (図 1C)。とくにスタチン感受性株では、耐性株に比べ HMGCR の発現抑制による生存率の低下が顕著であったことから、メバロン酸経路への依存度がより高いと考えられた。

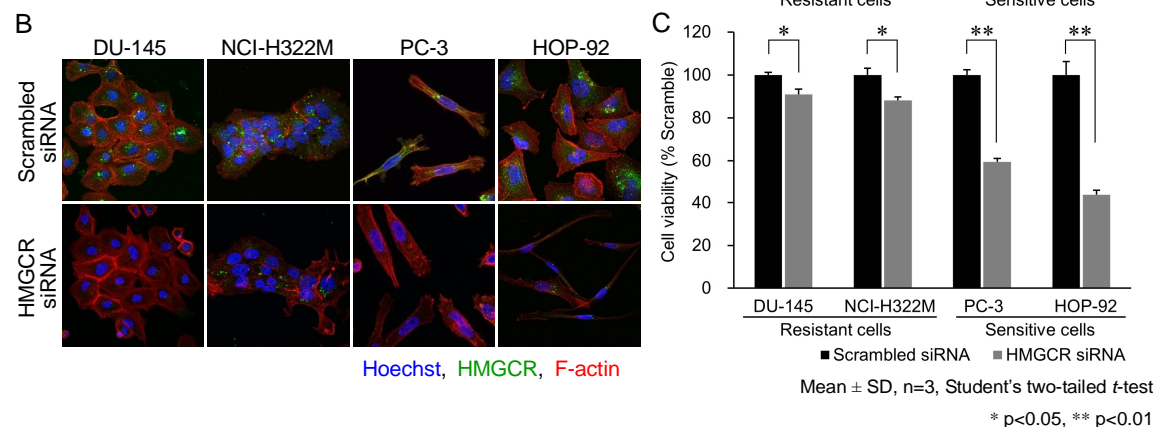


図 1. siRNA による HMGCR のノックダウンと細胞生存率の変化

(2) スタチン感受性株である HOP-92 にアトルバスタチン 10  $\mu\text{M}$  を曝露し、同時にメバロン酸経路の各中間産物ならびに細胞外からのコレステロール供給源である LDL を添加した際の細胞生存率を図 2 に示した。スタチンとともにメバロン経路の上流に位置するメバロン酸 (Mev.) を添加すると、対照群と同程度にまで細胞生存率の回復がみられた (図 2A)。一方、LDL (図 2C) ならびにメバロン酸経路の下流に位置するスクアレノール (Squ.; 図 2D)、ユビキノリン (Ubi.; 図 2E)、ドリコール (Dol.; 図 2F) の添加では、細胞生存率に変化がみられなかった。しかし、ファルネシルピリン酸 (FPP; 図 2B) およびゲラニルゲラニルピリン酸 (GGPP; 図 2G) の添加では細胞生存率が濃度依存的に増加した。本研究では、メバロン酸経路の下流に位置しスタチンによる制がん効果を顕著に打ち消した GGPP に焦点を当て、以降の解析を進めることとした。

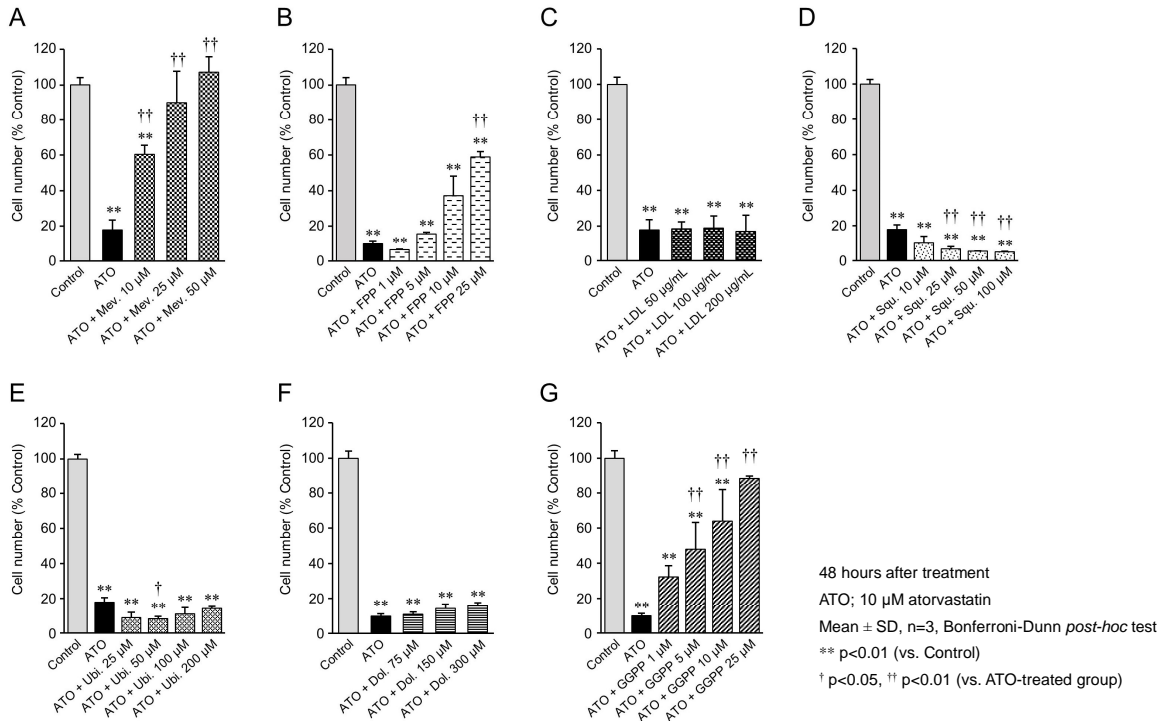


図 2. スタチン感受性株におけるメバロン酸経路中間産物添加の影響

(3) スタチン耐性株である DU-145、NCI-H322M において、GGPP の合成酵素 GGPS1 およびスタチンのターゲットである HMGR を siRNA で発現抑制した際のスタチン感受性の変化を図 3 に示した。当初は GGPS1 をノックダウンすることにより GGPP の枯渇が惹起され、耐性株におけ

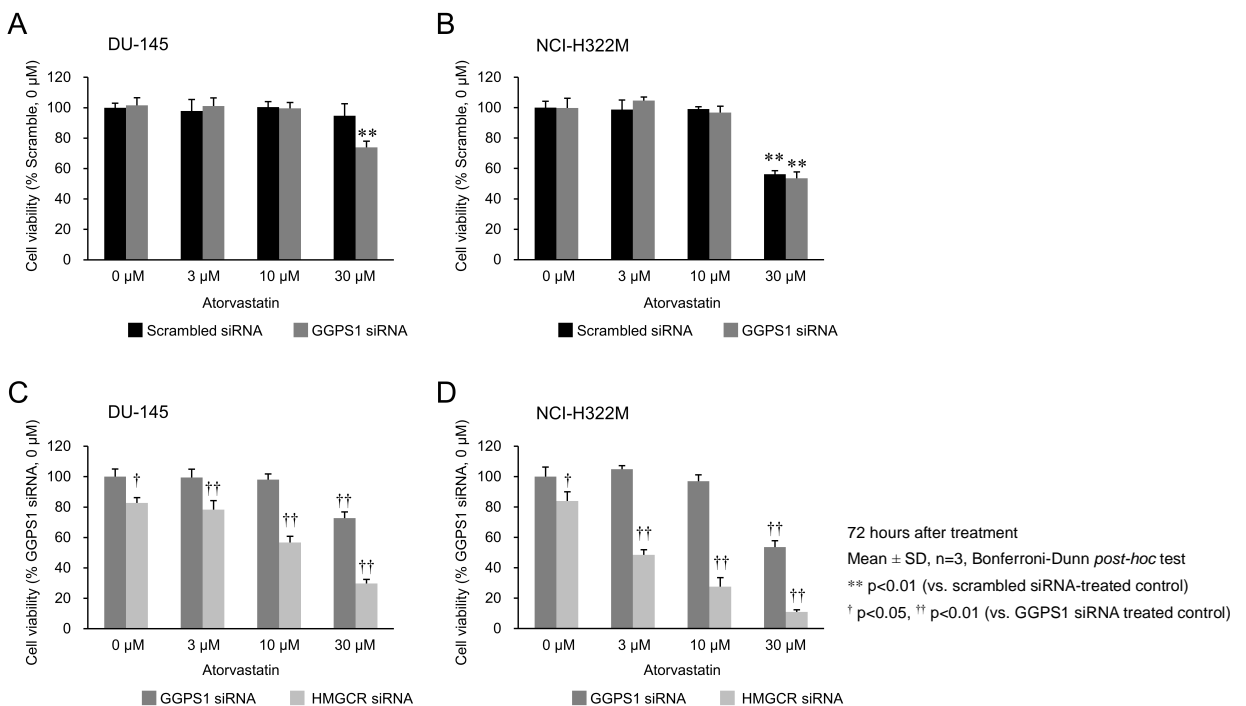


図 3. スタチン耐性株における GGPS1 および HMGR の発現抑制とスタチン感受性の変化

るスタチン感受性が上がるものと考えたが、予想に反して顕著な細胞生存率の低下は起こらなかった(図 3A,B)。一方、HMGCR のノックダウンでは、GGPS1 のノックダウンと比べて顕著にスタチン感受性が上昇することが明らかとなった(図 3C,D)。スタチン耐性株ではスタチン曝露に対して HMGCR の遺伝子発現を増加させることがわかっている。本実験の結果から、スタチン耐性がん細胞でみられる HMGCR のアップレギュレーションが、スタチン耐性の鍵を握っていると考えられた。我々はこれまでに、上皮系のがん細胞と間葉系のがん細胞では、後者の方がスタチンの制がん効果が強いことを報告してきた。今後は、上皮系と間葉系のがん細胞における HMGCR の発現制御メカニズムの相違点を解析していく予定である。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

- (1) T. Ishikawa, Y. Z. Hosaka, C. Beckwitt, A. Wells, Z. N. Oltvai, K. Warita. Concomitant attenuation of HMG-CoA reductase expression potentiates the cancer cell growth-inhibitory effect of statins and expands their efficacy in tumor cells with epithelial characteristics. *Oncotarget*. 9:29304-29315. 2018. 査読有り  
doi: 10.18632/oncotarget.25448.
- (2) V. K. Raghu, C. H. Beckwitt, K. Warita, A. Wells, P. V. Benos, Z. N. Oltvai. Biomarker identification for statin sensitivity of cancer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 495:659-665. 2018. 査読有り  
doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.065.

[学会発表](計9件)

- (1) T. Ishikawa, K. Warita, Y. Z. Hosaka. Study of combination therapy to enhance the anticancer effect of statins on statin-resistant cells. Association of Japan-Indonesia Veterinary Education 3rd International Symposium in Veterinary Science, Surabaya (Indonesia) 2019.2
- (2) T. Ishikawa, K. Warita. Differences in the dependence of statin-sensitive and -resistant cancer cells on the mevalonate pathway. The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Osaka (Japan) 2018.9
- (3) 石川拓郎, 割田克彦, 保坂善真. スタチン系薬剤と siRNA の併用による相乗的制がん効果の検討. 第 161 回日本獣医学会学術集会, 筑波 2018.9
- (4) K. Warita, Y. Z. Hosaka, Z. N. Oltvai. Study on cell characteristics related to statin drug sensitivity of cancer cells. International Symposium in Veterinary Science 2018: Strengthening the regional veterinary education and research for the future excellent veterinary graduates, Yogyakarta (Indonesia) 2018.2
- (5) C. H. Beckwitt, A. M. Clark, K. Warita, Z. N. Oltvai, A. Wells. Adjuvant statin therapy efficacy is dictated by tumor dormancy and statin lipophilicity in ex vivo and in vivo models of metastatic breast cancer. 2017 San Antonio Breast Cancer Symposium, San Antonio, Texas (USA) 2017.12
- (6) K. Warita, Y. Z. Hosaka, Z. N. Oltvai. Characteristics of statin-sensitive cancer cells. The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama (Japan) 2017.9
- (7) 石川拓郎, 割田克彦, 保坂善真. スタチン系薬剤が癌の細胞死を引き起こす因子に関する研究. 第 160 回日本獣医学会学術集会, 鹿児島 2017.9
- (8) C. H. Beckwitt, K. Warita, A. M. Clark, Z. N. Oltvai, A. Wells. Adjuvant statin therapy efficacy is dictated by tumor dormancy and statin lipophilicity in in vitro and ex vivo models of metastatic breast cancer. Experimental Biology 2017 Conference, Chicago, Illinois (USA) 2017.4
- (9) 割田克彦. 発生由来の異なるがん細胞種のスタチン感受性に関する研究. 第 159 回日本獣医学会学術集会(サテライトフォーラム), 藤沢 2016.9

## 6 . 研究組織

### (1)研究協力者

研究協力者氏名：石川 拓郎

ローマ字氏名：(ISHIKAWA, takuro)

研究協力者氏名：保坂 善真

ローマ字氏名：(HOSAKA, yoshinao)

研究協力者氏名：Oltvai, Zoltan N.

ローマ字氏名：(Oltvai, zoltan n.)

研究協力者氏名：Wells, Alan

ローマ字氏名：(Wells, alan)