

平成30年 5月24日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20205

研究課題名(和文)スタチン製剤を卵巣癌抑制薬として用いる臨床応用のための基礎的研究

研究課題名(英文)Translational research for clinical application using statins as a prevention drugs against ovarian cancer

研究代表者

小林 佑介(Kobayashi, Yusuke)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

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)：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合成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、スタチン製剤が投与された卵巣癌細胞株において、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、バリン、アセチル補酵素AなどのTCA回路に関わる代謝物が増加する一方で、嫌氣的解糖経路の最終産物である乳酸が減少していた。スタチン製剤がワールブルク効果を回避し、TCA回路を活性化させミトコンドリアでの酸化的リン酸化にシフトさせている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Statins exerts the antitumor effect by not only inhibiting the mevalonate synthesis pathway including the farnesyl transferase and geranylgeranyl transferase but also showing pleiotropic effect on other action pathways. Furthermore, in the statin mediated ovarian cancer cell line, metabolites related to the TCA circuit such as phenylalanine, methionine, tryptophan, valine, acetyl coenzyme A were increased, whereas the final product of the anaerobic glycolytic pathway lactic acid was reduced. It is suggested that the statin administration interferes the Warburg effect and activates the TCA cycle and shifts it to oxidative phosphorylation in mitochondria.

研究分野：婦人科腫瘍学

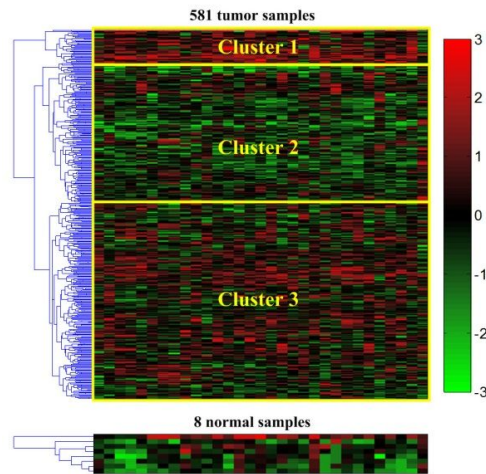
キーワード：卵巣癌 創薬 ドラッグリポジショニング

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、他癌種では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。特にメバロン酸合成経路阻害剤スタチンは、メバロン酸合成経路の最終代謝産物であるコレステロールの合成を抑制するため、脂質異常症の標準治療薬として世界中で広く内服されてきた一方で、他癌腫で腫瘍抑制効果が報告され注目されていた。デンマークの研究では、1995年から2007年に癌と診断され2009年まで追跡した患者の死亡率を評価したところ、スタチンの使用歴のない患者と比較して、スタチン使用患者で全死因死亡率および癌関連死亡率がともに有意に15%低くなるのが13種の癌腫で示された。特定の癌腫としては大腸癌において、患者1,953例と対照群2,015例が解析され、5年以上にわたるスタチンの使用はアスピリンまたは他の非ステロイド性抗炎症薬の使用の有無や、大腸癌の家族歴の有無などの交絡因子を補正した後も大腸癌の相対リスクを47%と有意に減少させていた。別のコホート研究においてもステージI~IIIの大腸癌と診断された患者7,657例、うち大腸癌による死亡症例1,647例が解析され、診断後のスタチン使用により大腸癌関連死亡率が29%減少し、全死因死亡率も25%低下していたことが認められた。また、1年以上のスタチンを使用している大腸癌患者ではその死亡率が36%低下していた一方で、スタチン使用が1年に満たない患者では21%の低下であり、スタチンの総使用量と大腸癌関連死亡率との間に関連性が認められた。このように様々な癌腫のなかでも罹患者数、死亡者数別でともに上位に挙げられる大腸癌においてもスタチンの有用性が示唆された。しかしながら、卵巣癌においては *in vitro* でスタチン製剤の有効性を試験的に検討した小報告があるのみで *in vivo* での検討も含めたエビデンスのあるデータは報告されていなかった。

2. 研究の目的

卵巣癌は国内で8千人、世界で24万人が毎年新規に罹患しており、その多くが進行期で発見されるため予後は極めて厳しく新規治療薬の開発は急務である。NIHのTCGAデータベースを解析したところ、メバロン酸合成経路に關与する遺伝子群の発現が卵巣癌症例の約60%で大きく上昇している一方で正常卵巣では抑制されていることを確認しており(図1)、メバロン酸合成経路に關与する遺伝子群が卵巣癌において新規治療標的となりうるということが明らかとなっている。



(図1;TCGA データベース解析)

スタチン製剤はメバロン酸合成経路、つまりコレステロールの合成を抑制するため、内科領域において脂質異常症治療薬として全世界的に汎用されている。研究代表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いた。スタチンは汎用投与されており、臨床における薬物動態データが蓄積されているため、臨床試験のデザインも比較的容易に作成でき、同薬剤の普及度から臨床試験へのスムーズなエントリーも予測される。そこで本研究では臨床試験 phase I/II への早期移行を念頭に臨床試験で用いるスタチン製剤の絞り込みを *in vitro* 及び *in vivo* の両面から行うとともに、その対象となる症例の抽出基準とその評価系を樹立することを目的としていた。

3. 研究の方法

- (1) 各スタチン製剤の *in vitro* 及び *in vivo* における腫瘍抑制効果の比較検討

メバロン酸合成経路を標的とする新規化合物の作成と *in vitro* 及び *in vivo* における腫瘍抑制効果の比較検討

スタチン製剤には研究代表者が検討していたロバスタチンのほかに、脂溶性スタチンとしてシンバスタチン、フルバスタチン、アトルバスタチン、ピタバスタチン、水溶性スタチンとしてプラバスタチン、ロスバスタチンがあり、薬物動態や代謝経路がそれぞれ異なる。卵巣癌細胞に対する増殖抑制効果にも差があることが予想されるため、臨床試験に用いるスタチン製剤の絞り込みを当初行う予定であった。しかし、シンバスタチンが卵巣癌細胞株に対する IC50 値で最も優れるとの報告が見られたため、今後の実験系にはシンバスタチンを用いることとした。メバロン酸

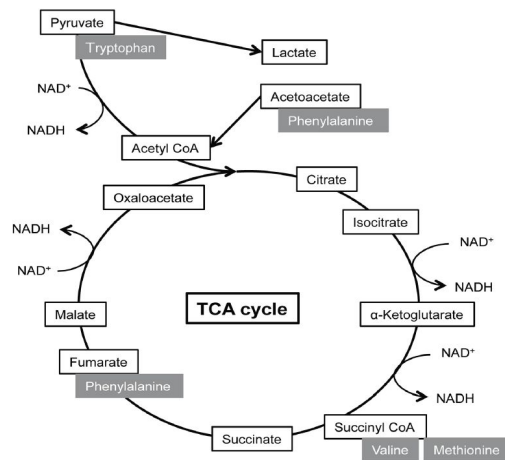
合成経路下流分枝に關与するファルネシル転移酵素ならびにゲラニルゲラニル転移酵素を阻害することで有意に強い細胞増殖抑制効果が認められることから、これらの転移酵素が卵巣癌の増殖に深く關与していることが示唆されていた。そこで、メバロン酸合成経路を阻害する約 300 種類の化合物でスクリーニングを行い、前述のファルネシル転移酵素およびゲラニルゲラニル転移酵素を同時阻害しうる化合物 L-778123 ピックアップし化学合成し、卵巣癌細胞株に対する IC50 値で Simvastatin と比較検討した。

(2) メタボロミクス解析によるスタチン製剤の作用機序の検証

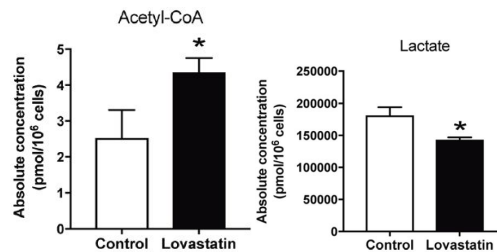
スタチン製剤の作用機序を検証するため、卵巣癌細胞株を用いてスタチン投与群と control 群とで Capillary electrophoresis mass spectrometry によるメタボロミクス解析を行い、スタチン製剤投与により変化する代謝物について検討した。

4. 研究成果

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 Simvastatin 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 (56.9 μ M, >100 μ M) は Simvastatin (2.99 μ M, 20.5 μ M) 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合成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、メタボロミクス解析では、主成分解析で分散の見られた投与 48 時間において、因子負荷量の観点から増減した代謝物リストが得られた。中でも、スタチン製剤が投与された卵巣癌細胞株において、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、バリン、アセチル補酵素 A などの TCA 回路に關わる代謝物が増加する一方で(図 2,3)、嫌氣的解糖経路の最終産物である乳酸が減少していた(図 3)。また、電子伝達体ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、NAD は、酸化型 (NAD⁺) および還元型 (NADH) の 2 つの状態を取るが、還元型 NADH と酸化型 NAD⁺ の比率は TCA 回路が活性化すると低下することが知られている。スタチン投与群においては実際にこの比率が有意に低下していた。このことよりスタチン製剤がワールブルク効果を回避し、TCA 回路を活性化させミトコンドリアでの酸化的リン酸化にシフトさせている可能性が示唆された。



(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)



(図 3; スタチン添加培養によりアセチル補酵素 A が増加し、嫌氣的解糖経路の最終産物である乳酸が減少した)

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 1 件)

Kobayashi Y, Kashima H, Rahmanto Y, Banno K, Yu Y, Matoba Y, Watanabe K, Iijima M, Takeda T, Kunitomi H, Iida M, Adachi M, Nakamura K, Tsuji K, Masuda K, Nomura H, Tominaga E, Aoki D. Drug repositioning of mevalonate pathway inhibitors as antitumor agents for ovarian cancer. *Oncotarget*.(査読あり) 8:72147-56, 2017.

〔学会発表〕(計 7 件)

- (1) 小林佑介, 「最新の分子標的薬・免疫療法と臨床試験」婦人科悪性腫瘍治療に対するドラッグリポジショニングの現状と未来, 第 59 回 日本婦人科腫瘍学会学術講演会, 2017 年
- (2) 小林佑介, メバロン酸経路を標的とした卵巣癌新規治療戦略の可能性, 第 5 回 がん代謝研究会, 2017 年
- (3) 小林佑介, メバロン酸経路を標的とした卵巣癌発癌予防を目指した基礎的研究,

第 32 回 日本女性医学学会学術集会,
2017 年

- (4) Yusuke Kobayashi, An investigation of novel treatment for ovarian cancer targeting mevalonate pathway, 25th Asian & Oceanic Congress of Obstetrics and Gynaecology (AOCOG 2017), 2017 年
- (5) Yusuke Kobayashi, Investigation of the antineoplastic effect of lovastatin on ovarian cancer using metabolomic analysis, 第 68 回 日本産科婦人科学会学術講演会, 2016 年
- (6) 小林佑介, 卵巣癌におけるメバロン酸合成経路を標的としたドラッグリポジショニングを目指した基礎的研究, 第 58 回 日本婦人科腫瘍学会学術講演会, 2016 年
- (7) 小林佑介, 漿液性卵管上皮内癌モデルマウスを用いた卵巣癌に対するドラッグリポジショニング研究, 第 48 回 日本臨床分子形態学会, 2016 年

〔図書〕(計 1 件)

小林佑介 南山堂 薬局「スタチン 明らかにされた有益性とその限界を実地臨床に活かす」 2016 年 2748-2752

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小林 佑介 (KOBAYASHI, Yusuke)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・助教
研究者番号 : 10439763

(2)研究協力者

阪埜 浩司 (BANNO, Kouji)
富永 英一郎 (TOMINAGA, Eiichiro)
國富 晴子 (KUNITOMI, Haruko)