

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16722

研究課題名(和文)オートファジーに着目した前立腺癌細胞におけるスタチンの抗腫瘍効果メカニズムの解明

研究課題名(英文)Antitumor effect mechanism of statin in prostate cancer cells focusing on autophagy

研究代表者

宮澤 慶行(Miyazawa, Yoshiyuki)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90647083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では前立腺癌細胞株を用い、高脂血症薬であるスタチンの投与が引き起こすオートファジーに着目し研究を進めた。濃度依存性にオートファジー発現の増加が確認できた。オートファジーを高発現させる薬剤(ラパマイシン)、オートファジーを低下させる薬剤(クロロキン)を投与し、前立腺癌細胞で有意に増殖抑制効果を認めた。以上の結果から、スタチン投与とラパマイシンによるオートファジー増加は相乗的に増殖抑制効果をもたらす可能性が示されたが、オートファジーを抑制することでも相乗効果が認められたことから、スタチンの抗腫瘍効果においてオートファジーが果たす役割が中心的ではない可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺癌細胞株に対しスタチンを投与することでオートファジーが増加することが確認された。また、オートファジー増加効果のある薬剤併用により、単剤よりも増殖抑制効果が増強されることも判明した。しかし、オートファジーを抑制する薬剤によっても増殖効果があることがわかり、オートファジーが腫瘍細胞に対し二面性を持つことがもともと広く論じられていることを反映しているものと思われる。オートファジーに関しては未解明な部分も多く、オートファジーを促進させることによる抗腫瘍効果についてはさらに研究を進めることで新規治療戦略の足がかりになる可能性があると思われる、次年度以降の研究課題に引き継ぐこととしている。

研究成果の概要(英文)：Statins have recently been studied for their proapoptotic and antimetastatic effects. However, the exact mechanisms of their anticancer actions remain unclear. We have studied the novel castration resistant prostate cancer (CRPC) treatment with statins. The expression level of LC-3 was up-regulated by simvastatin in PC-3, LNCaP-LA, 22RV1-LA and DU145 cells. In PC-3 cells treated with statin, a significant increase in autophagosomes was confirmed by fluorescence microscopy. The expression of LC-3 and autophagosomes were increased in a concentration-dependent manner. It was found that statin administration enhances autophagy induction in a prostate cell line. We plan to study the combined effect with other drugs that induce autophagy. We would like to develop CRPC treatment by inducing autophagy cell death.

研究分野：前立腺癌

キーワード：前立腺癌 CRPC スタチン オートファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国において前立腺癌は増加傾向にあり、2016年度の国立がん研究センターの予測で男性における予想罹患数が第1位となった。転移性前立腺癌や根治治療後の再発症例における治療の主軸であるアンドロゲン除去療法に抵抗性となった去勢抵抗性前立腺癌 (Castration Resistant Prostate Cancer; CRPC)による患者死亡数も併せて増加傾向にある。その現状に対し、新規治療を導き出すことが急務である。前立腺癌の成因として数多くのものが存在するが、その一つに食事が挙げられる。特に、前立腺癌罹患率の違いから、前立腺癌患者の多い欧米型の食事(高脂肪食)が前立腺癌の発症、進展に影響を与えているのではないかと、いう事は以前より指摘されてきており、当教室の関根らは高脂肪食によって血中で増加する、LDL コレステロールやレムナントリポタンが前立腺癌細胞増殖を引き起こすことを示してきた(Sekine Y, et al. Clinica chimica acta 2007、Sekine Y, et al. Cancer epidemiology 2009)。一方で、HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるスタチンは高コレステロール血症の治療薬として広く使用されているが、その作用に加えて抗腫瘍効果があることが知られている。スタチン内服群では前立腺癌の罹患率が低い(Breau RH, et al. J Urol. 2010)、根治的前立腺全摘術や放射線療法後の前立腺癌の再発率が低いことなどが報告されている(Hamilton RJ, et al. Cancer. 2010)(Gutt R, et al. J Clin Oncol. 2010)。スタチンが抗腫瘍効果を引き起こすメカニズムとしては、細胞内シグナル伝達に関連した細胞膜ドメインのコレステロールを低下させることや細胞周期に関連した酵素を阻害することなどが報告されている。自分はスタチンが誘導する前立腺癌増殖抑制因子の解明を大学院の研究テーマとして2012年から4年間研究し博士号を取得した。スタチンが癌抑制遺伝子とされる ANXA10 を誘導し前立腺癌増殖抑制をもたらすことを明らかにし、報告してきた。スタチンによる前立腺癌増殖抑制機構については、いまだ不明な点も多く、解明することで新たな治療法へつなげる可能性がある。

従来、細胞傷害性抗癌剤投与による1型プログラム細胞死であるアポトーシス誘導ががん治療の主体となってきたが、近年、アポトーシスとは異なる細胞死があることが数多く報告され、注目されているものの中にオートファジーがある。オートファジーはリソソームによる自食作用である。不必要なタンパク質や古い細胞内小器官をリサイクルするための細胞内自己タンパク質分解機構であり、隔離膜によって取り囲まれたオートファゴソームの形成を特徴とする。Clarke はオートファジーを2型のプログラム細胞死と定義した(Clarke PG, et al. Anat. Embryol. 1990)。癌細胞においてオートファジーが果たす役割については諸説あり、細胞増殖抑制作用を引き起こす場合もあれば、癌細胞をより生存させる方向に働くとする報告もあり現在多くの研究者が取り組み、研究が進められている。

我々が研究してきたスタチンとオートファジーの関係に着目すると、Atorvastatin が前立腺癌細胞株 PC-3 におけるオートファジーを誘導し増殖抑制を引き起こすとする報告(Topfer N, et al. Cancer Biol. and Ther. 2011, Peng X, et al. PLOS one, 2013)があり、オートファジーが増殖抑制を引き起こす可能性が指摘されている。また、CRPC に対する抗癌剤として使用されている Cabazitaxel は PI3K/Akt/mTOR 系の阻害を介して前立腺癌細胞株においてオートファジーを誘導することなどが報告されている(Huo R, et al. Mol. Rep. 2016)。泌尿器科領域では腎癌で使用されている mTOR 阻害剤はオートファジーを誘導する作用があることが報告されている。以上のことから、既存の治療にスタチンを併用することで効果を増幅させることが期待できるものと思われる。

今回、我々は CRPC 細胞に見立てた前立腺癌細胞株を用い、スタチン投与が引き起こすオートファジーに着目し、スタチンの前立腺癌増殖抑制効果と他薬剤との併用効果、重粒子線治療効果の増幅について検討を行い、新規治療に繋がる機序解明を図りたい。

2. 研究の目的

前立腺癌患者は日本において増加傾向にあり、既存治療抵抗性獲得後の治療開発は急務であると思われる。疫学的にスタチン投与が前立腺癌発症リスクを低下すること、スタチンの pleiotropic な作用としての抗腫瘍効果が報告されており、当教室ではスタチンがもつ前立腺癌増殖抑制効果について研究してきた。近年、オートファジーの概念が癌治療領域で注目され、その抗腫瘍効果が期待されている。スタチンはオートファジーを誘導する効果が報告されており、オートファジー誘導が前立腺癌増殖抑制をもたらすとする報告もある。本研究では、オートファジー作用に着目したスタチンの抗腫瘍効果の解明と、前立腺癌に対し臨床で使用されている薬剤との併用効果の確認を行う。スタチン併用によるオートファジー発現効果、抗腫瘍効果を検討し、新規治療の開発に繋げたい。

3. 研究の方法

前立腺癌細胞株に対するスタチンの投与が誘導するオートファジー発現の確認:

本研究で対象とするのは前立腺癌細胞株のなかでもアンドロゲン非依存性に増殖し CRPC のモデルとされる細胞株(PC-3、DU145、LNCaP-LA:当教室で作成した LNCaP をアンドロゲン除去下で培養し CRPC 化した細胞)を用いた。これらの細胞にスタチンを投与し、オートファジーの発現をオートファジー検出キット(Cell Meter TM)と蛍光顕微鏡を用いた確認を行い、非スタチン投与群とスタチンの濃度別に比較検討した。この際に使用するスタチンとしては当教室で研究経験豊富である Simvastatin を使用した。同時に増殖能の評価を MTS アッセイ、浸潤能はマイクロ

チャンパープレートを用いた Invasion アッセイ、遊走能を Migration アッセイにて評価し、抗腫瘍効果とオートファジーの発現の関係を検討する。

4. 研究成果

スタチン投与を行なった去勢抵抗性前立腺癌細胞株での増殖抑制、浸潤能抑制、遊走能抑制の確認: 増殖能の評価を MTS アッセイ、浸潤能はマイクロチャンパープレートを用いた Invasion アッセイ、遊走能を Migration アッセイにて評価し、抗腫瘍効果とオートファジーの発現の関係を検討した。simvastatin 投与により、PC-3、DU-145、LNCaP-LA の増殖能抑制、浸潤能抑制、遊走能抑制を確認した(濃度依存性に増強することも確認された)。

スタチン投与を行なった前立腺癌細胞株(PC-3、LNCaP-LA、DU145、22RV-1)において投与したスタチンの濃度依存性にオートファジー発現の増加をウエスタンブロットにて LC-3 タンパクの増加にて確認した。LC-3 はオートファジーが活性化される際に発現するとされるタンパク質であり、多くの実験報告に用いられている。

標的の細胞にてオートファジーが活性化したかどうかを判別するため、オートファゴソームを蛍光染色できるキットを用い、スタチン投与によるオートファゴソーム増加を確認した。

最も LC-3 発現が顕著であった PC-3 の細胞(去勢抵抗性前立腺癌細胞のモデル)スタチンを投与し、オートファジーを高発現させる薬剤(ラパマイシン)、オートファジーを低下させる薬剤(クロロキン)を投与し、増殖にどのような影響をもたらすのか MTS アッセイを用い検証した。ラパマイシンとスタチン投与を併用した場合においても、クロロキンを併用した場合においても PC-3 細胞で有意に増殖抑制効果を認めた。ラパマイシン、クロロキン単剤投与においても増殖抑制効果が確認できた。オートファジーの発現の程度は、スタチン+ラパマイシンにおいてはオートファゴソーム形成が増加したことが先の蛍光染色のアッセイで確認できた。スタチン+クロロキン併用群においてはオートファゴソーム形成がスタチン単独投与時に比べ低下したが増殖抑制効果は増強した結果となった。

以上の結果から、スタチン投与とラパマイシンによるオートファジー増加は相乗的に増殖抑制効果をもたらす可能性が示されたが、ラパマイシン投与によるオートファジー誘導と異なるメカニズムによる可能性もあり、今後の研究課題とした。また、オートファジーを抑制することでも相乗効果が認められたことから、スタチンの抗腫瘍効果においてオートファジーが果たす役割が中心的ではない可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----