

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 9 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09221

研究課題名(和文) バイオマーカーに沿ったスタチン併用大腸癌治療法の開発

研究課題名(英文) Development of statin-based therapies for colorectal cancer along with biomarkers

研究代表者

石川 晋之 (Ishikawa, Shinji)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特定研究員

研究者番号：80419639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大腸癌に対するスタチン投与の有効性を検討し、その治療効果を予測するバイオマーカーの同定を目的とした。KRAS、BRAF、PIK3CA、PTENをバイオマーカーに、頻度の高い遺伝子変異パターンに対応する大腸癌細胞株4種類を選択し、薬剤投与と抗腫瘍効果を判定した。大腸癌細胞株にシンバスタチンとWnt阻害剤を併用投与すると、KRASのみ、またはBRAFのみ変異型の細胞株では単独投与と比較して、相乗的な細胞増殖抑制効果が認められた(60%, 85%)。シンバスタチンとWnt阻害剤の併用は、KRAS、BRAF変異を有する大腸癌に対する新たな治療法となりえる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

大腸癌はRAS、BRAF遺伝子変異を持つことが多く、それらの症例は可能な治療が少なく、予後も不良であることが知られている。高脂血症薬であるシンバスタチンは抗腫瘍作用を持つことが知られている。今回我々は、シンバスタチンに細胞内シグナル分子であるWntの阻害薬を併用した所、KRASまたはBRAF遺伝子変異を持つ大腸癌細胞株では、癌細胞増殖を抑制する効果が強く認められた。KRAS、BRAF遺伝子変異を持つ大腸癌に対する新たな治療法として期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the efficacy of statin therapy for colorectal cancer and identified biomarkers that predict its efficacy. In addition, we examined each drug's antitumor effects in four colorectal cancer cell lines with frequent gene mutations, using biomarkers PIK3CA, KRAS, BRAF, and PTEN. Simvastatin and Wnt inhibitor treatment of colon cancer cell lines led to synergistic cell growth inhibition compared to treatment alone in KRAS-only or BRAF-only mutant cell lines. The results suggest that the combination of simvastatin and Wnt inhibitors may be a new treatment option for colorectal cancer with KRAS or BRAF mutations.

研究分野：消化器癌に対するHMG-CoA還元酵素阻害剤(シンバスタチン)の抗腫瘍作用に関する研究

キーワード：大腸癌 KRAS遺伝子変異 BRAF遺伝子変異 シンバスタチン Wnt阻害薬

1. 研究開始当初の背景

2014年に我々は高脂血症治療薬である HMG-CoA 還元酵素阻害(スタチン)、特に simvastatin が、大腸癌細胞株に対して抗腫瘍効果を発揮することを報告した (Ishikawa S et al. Int J Cancer. 135:2528-36, 2014.)。この報告の中で、simvastatin 投与によりエピジェネティックな遺伝子サイレンサーとして働くヒストン・メチル化酵素 EZH2 のダウンレギュレーションを引き起こし、p27KIP1 の発現を誘導すること、さらに、simvastatin と HDAC 阻害剤を併用することにより、さらなる EZH2 の発現低下と p27KIP1 の発現上昇を認め、相乗的な抗腫瘍効果が認められることを示した。大腸癌切除症例における臨床検体においても、スタチン摂取症例では大腸癌組織内の EZH2 発現低下、p27KIP1 発現上昇が認められ、非スタチン摂取症例と比較して、全生存期間、無病生存期間ともに予後が延長していることを証明した。

一方、HDAC 阻害剤は副作用が強く、実臨床での使用が広まらないという現実がある。スタチン類は高脂血症治療薬として一般に使用されており、非常に安価な薬剤である。ただ、単独での抗腫瘍効果は低く、他の抗腫瘍薬との併用、相乗効果がないと実用が難しい状況である。さらに、バイオマーカーによっては薬剤に対する反応、各分子間の cross-talk に起因した抵抗性の獲得などもあり、同じ組み合わせで全ての大腸癌を同様に治療することは困難である。

2. 研究の目的

本研究では、大腸癌化学療法に高脂血症治療薬である HMG-CoA 還元酵素阻害 (スタチン)を併用する有用性を検討し、さらに、その治療効果を予測する遺伝子変異バイオマーカーの同定を目的とした。

3. 研究の方法

まず、遺伝子変異バイオマーカーとして、大腸癌治療のターゲットとして代表的な EGFR 経路のうち、治療選択バイオマーカーとなりうる KRAS、BRAF、PI3CA、PTEN をバイオマーカー候補として検証することとした。TCGA に登録されている大腸癌症例、文献等で得られた大腸癌細胞株のデータを検討し、KRAS、BRAF、PIK3CA、PTEN をバイオマーカーに、薬剤投与と抗腫瘍効果を判定した。使用薬剤は simvastatin のほか、MEK 阻害薬 (U0126)、Akt 阻害薬 (Triciribine)をそれぞれ単独投与、併用投与を行った。さらにその後、wnt 阻害薬を単独投与とシンバスタチン併用投与し、抗腫瘍効果を比較した。

4. 研究成果

細胞株の同定

TCGA に登録された 1737 例と細胞株 76 例を KRAS、BRAF、PI3CA、PTEN の遺伝子変異別に分類した所、頻度の高い genetic status 4 パターンで約 90%の細胞株がこれに相当していた(図 1)。この

4 パターンに対応する大腸癌細胞株 4 種類 (colo320, SW620, colo205, DLD1)を選択し、その後の実験を行った。

図1 頻度の高かった上位4パターンとその割合

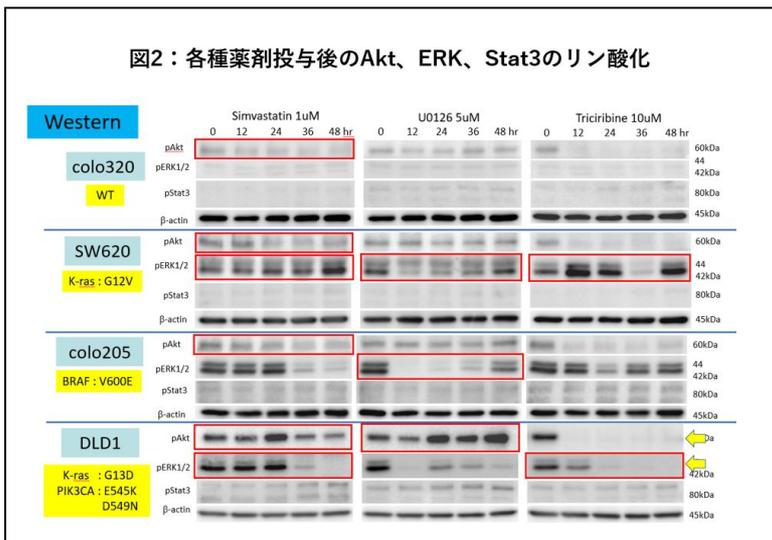
genes				clinical cases	cell line	total (%)
K-ras	BRAF	PIK3CA	PTEN	(n=1737)	(n=76)	(n=1813)
WT	WT	WT	WT	994	28	1022 (56.4)
mut	WT	WT	WT	319	21	340 (18.8)
WT	mut	WT	WT	119	5	124(6.8)
mut	WT	mut	WT	121	13	134(7.4)
				1553 (89.4)	67 (88.2)	1620 (89.4)

上位4パターンに対応する細胞株

cell line	genes			
	K-ras	BRAF	PIK3CA	PTEN
colo320	WT	WT	WT	WT
SW620	mut	WT	WT	WT
colo205	WT	mut	WT	WT
DLD1	mut	WT	mut	WT

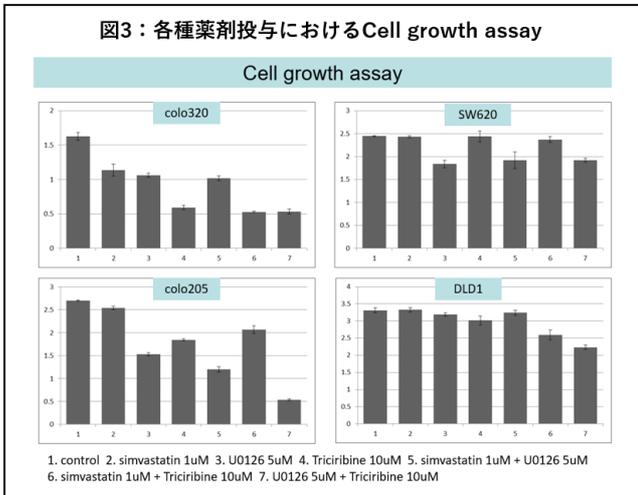
各種薬剤投与後の Akt, ERK1/2, Stat3 におけるリン酸化の時間的推移 (図 2)

Western ブロッキングにて、4 種類の細胞株にそれぞれ Simvastatin、U0126、Triciribine を投与し、経時的にリン酸化 Akt, ERK、Stat3 の発現を確認した。Simvastatin 投与後は全ての細胞株で Akt リン酸化の抑制作用が認められた。SW620 では Simvastatin 投与で pAKT が抑制されると pERK1/2 の発現が上昇した。U0126 投与で、SW620、colo205 では pERK 発現が抑制されるが、48 時間後には発現が再度上昇を認めた。DLD-1 細胞株では Triciribine 投与で、pAkt と pERK 発現が抑制された。



各種薬剤投与後の Cell growth assay (図 3)

各種薬剤を単剤、併用で投与したが、全ての細胞株で抗腫瘍効果は限定的であった。

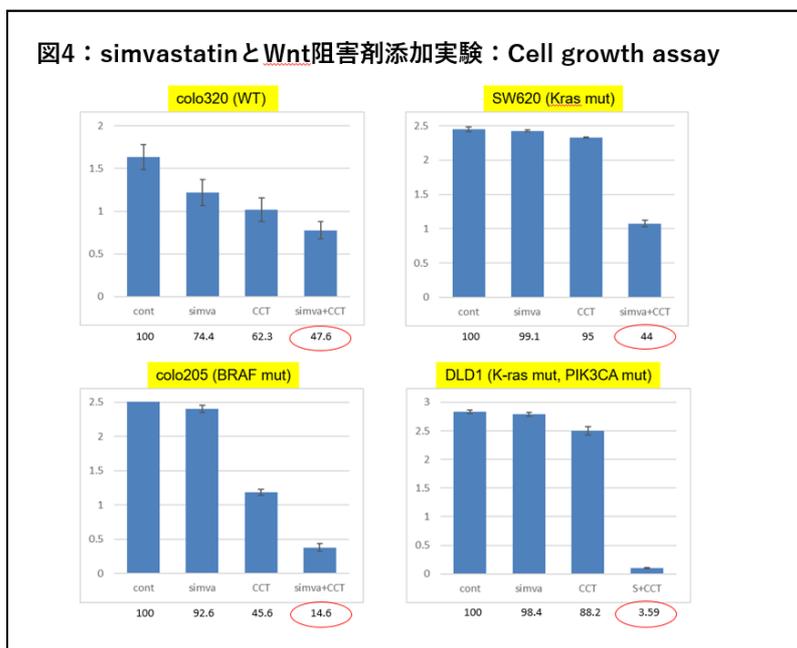


小括

1. Simvastatin には軽度の p-Akt 抑制作用があると考えられた。
2. K-ras、BRAF に変異があると、MEK/ERK を抑制しても次第に抵抗性を示すようになることが示唆された。
3. K-ras 変異に PIK3CA 変異が加わると、PI3K が MEK/ERK を制御するようになる可能性があると考えられた。
4. 各種薬剤の抗腫瘍効果は限定的であり、相乗効果のある組み合わせはなかった。

以上の結果より、EGFR 経路以外のシグナル経路を考慮することとした。大腸癌において、90%以上が APC または -catenin に偏移があるため、Wnt シグナルを検証することとした。-catenin の核内移行を抑制する作用を持つ、CCT031374 を Wnt 阻害剤として使用した。

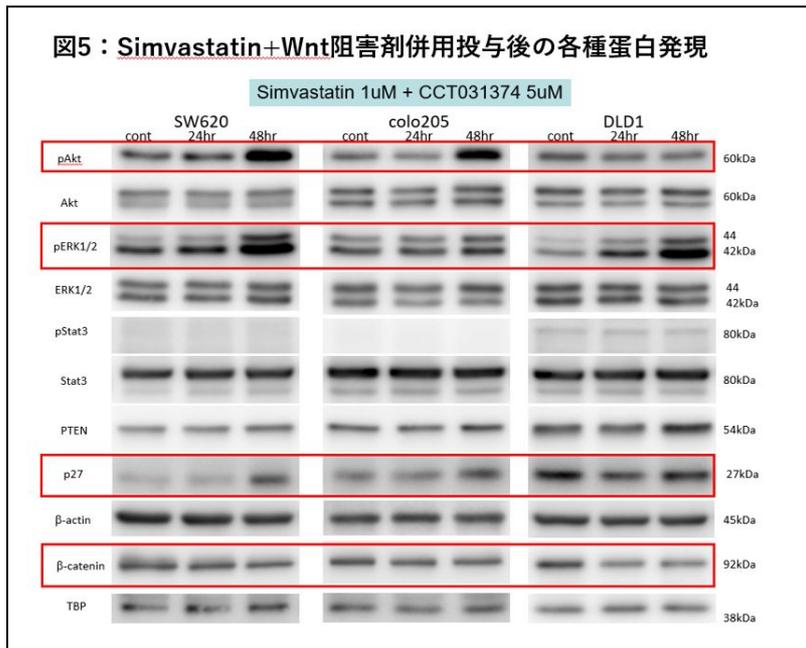
Simvastatin と Wnt 阻害剤添加実験：Cell growth assay (図 4)



Simvastatin 1uM と Wnt 阻害剤 5uM を併用すると、全て野生型の細胞株(colo320)では、それぞれ

の薬剤の持つ抗腫瘍効果の和として現れた。KRAS のみ変異型の細胞株(SW620)では細胞増殖が60%抑制された。また、BRAF のみ変異型の細胞株では細胞増殖が85%抑制された。KRAS とPIK3CA 両者が変異型の細胞株では細胞増殖が70%抑制された。野生型以外の細胞株では相乗的な抗腫瘍効果ありと判断した。

Simvastatin+Wnt 阻害剤併用投与後の各種シグナル分子の蛋白発現



2つの薬剤投与後の分子の蛋白発現を Western blotting で検証したが、検討した分子の中には共通の動きをする分子はなく、2薬剤併用時の細胞増殖抑制の相乗効果を説明するメカニズムを示すことはできなかった。

5. まとめ

1. HMG-CoA 還元酵素阻害である Simvastatin には p-Akt 抑制作用があることが示唆された。
2. K-ras、BRAF に変異があると、MEK/ERK 経路と PI3K/Akt 経路に crosstalk が現れ、これらをターゲットにしても、抗腫瘍効果は限定的な可能性がある。
3. メカニズムは不明だが、Wnt 阻害剤と simvastatin を併用すると、K-ras、BRAF に変異がある大腸癌細胞株で、相乗的な抗腫瘍効果が認められたため、新規治療法としての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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石川晋之、本田志延、廣田昌彦、蔵野良一、馬場秀夫
2. 発表標題 補助化学療法が有効だった結腸癌high risk stage IIの条件（一般市中病院のデータ）
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上村紀雄、林 洋光、松村和季、北村文優、佐藤寛紀、白石祐大、甲斐田剛圭、北野雄希、今井克憲、山下洋市、馬場秀夫
2. 発表標題 膵癌におけるStatin投与によるYAP/TAZの発現低下を介したPD-L1の抑制
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川晋之、緒方陽子、馬場秀夫
2. 発表標題 シンバスタチンと Wnt 阻害剤の併用は、K-ras、BRAF変異大腸癌細胞に対して相乗的な抗腫瘍効果を示す
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022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
研究分担者	日吉 幸晴 (Hiyoshi Yukiharu) (30573612)	公益財団法人がん研究会・有明病院 消化器外科・医員 (72602)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	清住 雄希 (Kiyozumi Yuki) (30827324)	熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・特定研究員 (17401)	
研究分担者	宮本 裕士 (Miyamoto Yuji) (80551259)	熊本大学・病院・講師 (17401)	
研究分担者	宮田 辰徳 (Miyata Tatsunori) (80594887)	熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・特定研究員 (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関