

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：34504

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23926

研究課題名（和文）スタチン高感受性がんを用いた「スタチンの効きやすさを保証する分子」の絞り込み

研究課題名（英文）Search for key role-players on the efficacy of statins using statin-sensitive cancers

研究代表者

割田 友子（Warita, Tomoko）

関西学院大学・理工学部・講師

研究者番号：00753112

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：スタチン処置したがん細胞において解糖系関連の代謝物に有意な変動がみられた網羅解析の結果を踏まえ、スタチンががん細胞のワールブルグ効果に与える影響を調べた。耐性がん細胞では、スタチン処置によってもグルコースの取り込みが抑制されないことが示され、スタチン耐性につながる一要因である可能性が考えられた。また、感受性がん細胞特有の変化として、解糖系の律速因子であるホスホフルクトキナーゼの発現低下が観察された。本研究の結果より、スタチン感受性がん細胞では、スタチン曝露によりワールブルグ効果の阻害が引き起こされることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スタチンは脂質異常症の治療薬としての実績があり、かつ副作用のデータも膨大であるため、ドラッグリポジショニングによるがん治療への応用が期待される薬剤である。しかし、スタチン適応がんを診断するための確固たる科学的根拠が十分でないことから、臨床応用に至っていない。本研究では、がん細胞のスタチン感受性を反映する分子を絞り込み、臨床応用に結び付けるための解決すべき必須課題であるスタチン適応がんの的確な評価を試みたことに意義がある。

研究成果の概要（英文）：Based on the results of a comprehensive analysis having shown significant changes in glycolysis-related metabolites in statin-treated cancer cells, the effect of statins on the Warburg effect in cancer cells was analyzed. It was shown that glucose uptake was not suppressed by statin treatment in statin-resistant cancer cells, which may be one of the factors leading to statin resistance. In addition, as a specific change to statin-sensitive cancer cells, a decrease in the expression of phosphofructokinase, which is a rate-limiting factor of glycolysis, was observed. The results of the present study suggest that statin exposure causes inhibition of the Warburg effect in statin-sensitive cancer cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：スタチン系薬剤 ドラッグリポジショニング スタチン感受性 ワールブルグ効果 がん細胞 解糖系

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

スタチンの作用機序は、HMG-CoA 還元酵素を標的にしたメバロン酸経路の阻害である。本経路は最終産物のコレステロールに加え、低分子 G タンパクの脂質修飾に必要な代謝物を多数供給している (Demierre *et al.*, Nat. Rev. Cancer. 2005)。メバロン酸経路は細胞にとって1つの重要な代謝系であり、また、がん細胞の増殖にはメバロン酸塩が必要であるとの報告 (Wejde *et al.*, Anticancer Res. 1992) があることから、メバロン酸経路を阻害するスタチンのがん抑制効果が注目されるようになった。近年、新薬開発におけるコストの大幅な削減や開発期間の短縮化を図るため、既存薬を再開発する創薬戦略としてドラッグリポジショニングが精力的に進められている。がん治療においては、コレステロール低下薬であるスタチン系薬剤を含むいくつかの既存薬でドラッグリポジショニングが進められている。ある疾患に対し長年使われてきた既存薬を、これまでに想定していなかった疾患に応用していくことは大変意義があるが、その反面、薬効を発揮する作用メカニズムや投与量を十分に精査しなくてはならない。スタチンが制がん効果を発揮することは多数の先行研究で示されているが、スタチンがほとんど効果を発揮しない、いわゆるスタチン耐性のがん細胞が存在するのも事実であり、スタチン感受性のレベルを裏付ける新たな分子的背景を明らかにすることが期待される。本研究では、がん細胞のスタチン感受性に関連する分子を絞り込み、スタチン耐性がんと感受性がんの特徴を見出すことを目的とした。

2. 研究の目的

がん細胞のスタチン感受性に関わる因子の同定は、スタチンを臨床応用するために必須である。先行研究で行ったメタボローム解析では、がん細胞へのスタチン曝露で様々な代謝物が変動することが確認された (表1 および表2)。

表1. スタチン耐性がん細胞においてスタチン処理で有意に変動した代謝物 (上位 25 物質)

HMT DB Compound name	Concentration (pmol/pL)				Comparative Analysis		
	NCI-H322M-0uM		NCI-H322M-1uM		NCI-H322M-1uM vs NCI-H322M-0uM		
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Ratio [§]	p-value	
Lactate/Pyruvate	68	0.5	78	0.11	1.14	4.9E-04	***
Total Adenylate	4,971	35	5,187	30	1.04	0.001	**
3-Phosphoglyceric acid	65	1.6	48	2.7	0.75	0.002	**
NADP ⁺	23	1.1	30	0.5	1.28	0.003	**
ATP	4,596	27	4,764	35	1.04	0.004	**
2-Hydroxyglutaric acid	25	0.3	28	0.5	1.10	0.004	**
2-Phosphoglyceric acid	6.6	0.13	5.1	0.3	0.77	0.005	**
Glucose 6-phosphate	88	2.4	120	6.3	1.36	0.007	**
Lactic acid	20,951	471	23,404	678	1.12	0.009	**
2,3-Diphosphoglyceric acid	55	1.0	61	1.5	1.10	0.009	**
Fructose 6-phosphate	30	2.0	39	2.8	1.33	0.010	*
cis-Aconitic acid	14	0.3	17	0.6	1.14	0.015	*
Fructose 1,6-diphosphate	316	12	280	8.6	0.89	0.016	*
Ala	460	30	556	29	1.21	0.016	*
Xanthine	4.5	0.4	3.3	0.4	0.74	0.018	*
GMP	13	0.4	15	0.6	1.13	0.019	*
Thr	352	2.0	331	6.1	0.94	0.021	*
GDP	60	1.4	67	2.5	1.11	0.022	*
Glycerol 3-phosphate/DHAP	0.4	0.14	0.9	0.03	2.09	0.025	*
Adenylosuccinic acid	1.5	0.10	1.8	0.14	1.24	0.026	*
Malonyl CoA	0.8	0.2	1.3	0.07	1.55	0.028	*
Succinic acid	45	0.3	52	2.3	1.16	0.030	*
HMG CoA	5.6	0.2	6.3	0.3	1.14	0.032	*
ADP	343	11	389	19	1.13	0.033	*
Acetyl CoA	0.3	0.14	0.6	0.12	2.10	0.039	*

表 2. スタチン感受性がん細胞においてスタチン処理で有意に変動した代謝物（上位 25 物質）

HMT DB Compound name	Concentration (pmol/pL)				Comparative Analysis	
	HOP-92-0uM		HOP-92-1uM		HOP-92-1uM vs HOP-92-0uM	
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Ratio [†]	p-value [‡]
PRPP	17	0.7	8.4	0.4	0.50	3.3E-04 ***
Glyceraldehyde 3-phosphate	16	1.9	3.4	1.8	0.21	0.001 **
2,3-Diphosphoglyceric acid	36	1.8	24	1.5	0.68	0.001 **
2-Hydroxyglutaric acid	21	0.9	17	0.9	0.79	0.003 **
Adenylosuccinic acid	1.5	0.05	1.9	0.08	1.26	0.004 **
Fructose 1,6-diphosphate	117	11	53	5.2	0.45	0.004 **
Guanylate Energy Charge	1.0	0.002	0.9	1.1E-03	0.99	0.005 **
Dihydroxyacetone phosphate	49	7.1	18	7.4	0.36	0.006 **
Lactic acid	6,336	469	4,189	215	0.66	0.007 **
Lactate/Pyruvate	27	0.3	20	1.4	0.75	0.012 *
Fumaric acid	98	10	63	6.3	0.64	0.012 *
Malic acid	527	62	290	25	0.55	0.013 *
Adenylyate Energy Charge	0.9	0.003	0.9	1.3E-03	0.99	0.015 *
2-Oxoisovaleric acid	11	0.5	13	0.08	1.15	0.019 *
Phosphoenolpyruvic acid	24	3.3	14	1.3	0.59	0.023 *
S-Adenosylmethionine	41	3.0	34	1.5	0.82	0.032 *
Leu	710	52	586	34	0.83	0.033 *
Ile	695	49	575	43	0.83	0.034 *
AMP	61	4.4	71	1.9	1.17	0.038 *
Malate/Asp	0.2	0.03	0.10	0.009	0.56	0.039 *
GTP	983	52	864	43	0.88	0.039 *
NADP ⁺	42	5.9	29	3.4	0.69	0.042 *
Spermidine	8.0	1.1	5.0	0.014	0.62	0.042 *
3-Phosphoglyceric acid	67	4.9	55	5.3	0.82	0.043 *
Hydroxyproline	803	62	670	43	0.83	0.044 *

この網羅解析により、スタチン処置を行ったがん細胞における解糖系関連の代謝物の変動が、スタチン感受性がん細胞およびスタチン耐性がん細胞いずれにおいても、有意かつ顕著であったことから（表 1 および表 2 の赤字ならびに図 1）、特徴的な変動を示した代謝系として本研究において着目することとした。

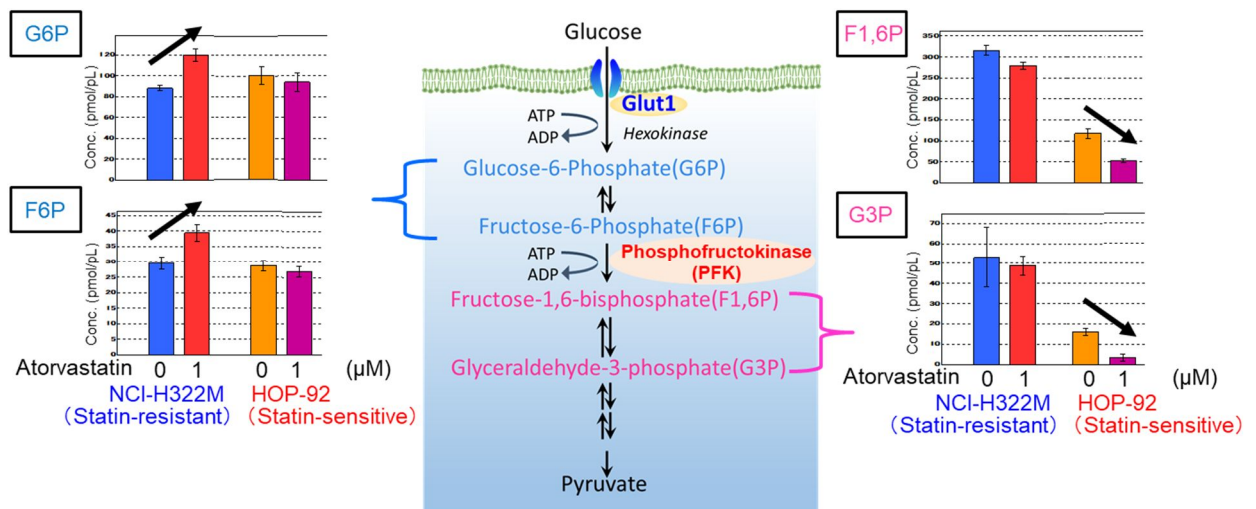


図 1. スタチン耐性および感受性がん細胞で顕著な変動の違いを見せた代謝経路—解糖系

そこで、解糖系に関連する因子を個々に解析し、遺伝子およびタンパクレベルの発現変動に加え、グルコースの取り込みや乳酸の産生量を検討することにより、スタチンががん細胞のワールブルグ効果に与える影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

NCI-60 パネルのがん細胞株から、肺がん由来の以下のがん細胞 2 種を実験に用いた。

- ・スタチン耐性がん細胞: NCI-H322M
- ・スタチン感受性がん細胞: HOP-92

これらの細胞をアトルバスタチン添加培地で 24 時間培養後、評価を行った。

アトルバスタチン濃度

NCI-H322M: 0 μ M、1 μ M、10 μ M

HOP-92: 0 μ M、0.1 μ M、1 μ M

(1) 遺伝子発現解析

アトルバスタチン添加 24 時間後に RNA 抽出を行った。1 μ g の total RNA を逆転写し、cDNA 合成を行った。GLUT1 (グルコーストランスポーター)、PFK (解糖系の律速因子) および cMyc (解糖系酵素遺伝子のレギュレーター) の各プライマーを用いて、スタチンの mRNA レベルへの影響を解析した。プライマーは以下のものを用いた。検量線法を用いて遺伝子発現の相対定量を行った。

18S rRNA (Product size: 155 bp)

Forward 5'- AAACGGCTACCACATCCAAG -3'

Reverse 5'- CCTCCAATGGATCCTCGTTA -3'

GLUT1 (Product size: 199 bp)

Forward 5'- AACCACTGCAACGGCTTAGA -3'

Reverse 5'- TCACGGCTGGCACAAAATA -3'

PFK (Product size: 265 bp)

Forward 5'- TGGACGGAGGCTCAAACATC -3'

Reverse 5'- TTATCGATCTGGCCGTTCT -3'

cMyc (Product size: 250 bp)

Forward 5'- TACAACACCCGAGCAAGGAC -3'

Reverse 5'- TCGTCGCAGTAGAAATACGG -3'

(2) タンパク発現解析

アトルバスタチン添加 24 時間後にタンパクの抽出を行った。GLUT1、PFK および cMyc の各抗体を用いて、スタチンのタンパクレベルへの影響を解析した。1 レーンあたり 10 μ g のタンパクをアプライし、SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングを行った。一次抗体および二次抗体は以下のものを用いた。バンドのシグナル強度は ImageJ により数値化した。

一次抗体

抗 Glut1 ウサギモノクローナル抗体 (Glut1 (D3J3A) Rabbit mAb #12939; Cell Signaling Technology, 1:1000)

抗 PFK マウスモノクローナル抗体 (PFK-1 (G-11): sc-166722; SANTA CRUZ, 1:200)

抗 cMyc ウサギモノクローナル抗体 (cMyc (D84C12) Rabbit mAb #5605; Cell Signaling Technology, 1:1000)

抗 GAPDH ウサギモノクローナル抗体 (GAPDH (14C10) Rabbit mAb #2118; Cell Signaling Technology, 1:1000)

HRP 標識二次抗体

抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (1:1000、SeraCare)

抗マウス IgG ヤギ抗体 (1:200、R&D Systems)

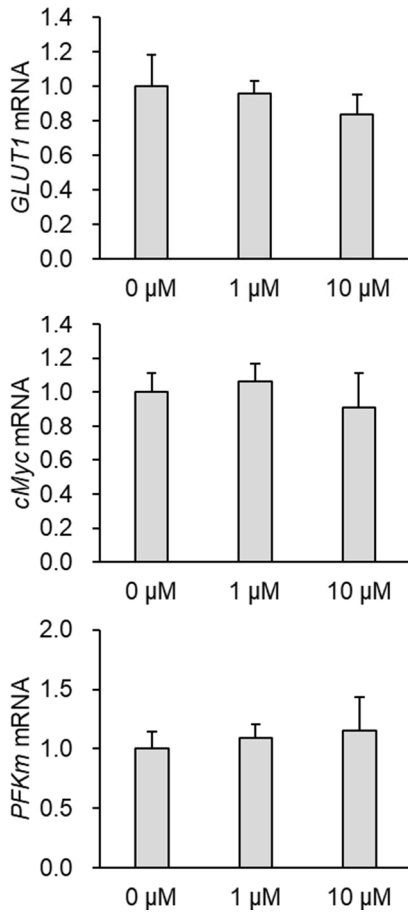
(3) グルコースおよび乳酸の測定

セルカウンターで細胞数の計測を行い、96 ウェルマイクロプレートを用いて、プレートリーダーにより培養上清の吸光度を 450 nm で測定した (Glucose Assay Kit-WST, 同仁化学 Cat. # G264、Lactate Assay Kit-WST, 同仁化学 Cat. # L256)。

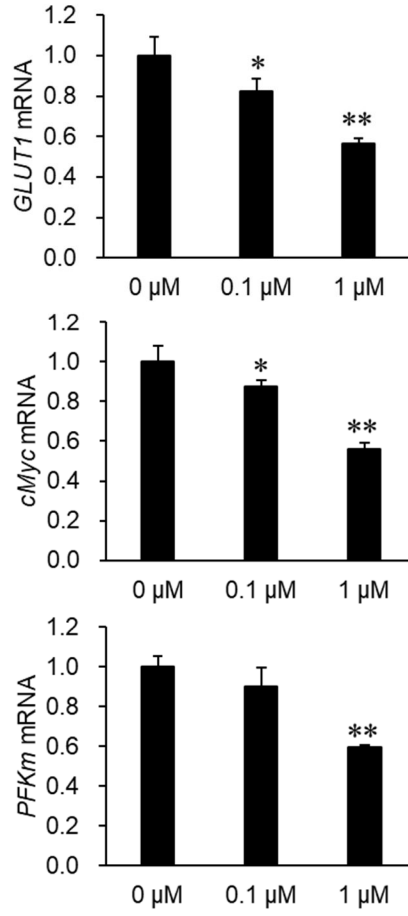
4. 研究成果

スタチンは、スタチン感受性がん細胞である HOP-92 の GLUT1 および cMyc の遺伝子発現を用量依存的に低下させるのに対し、スタチン耐性がん細胞である NCI-H322M ではこれらの発現低下が引き起こされないことが明らかとなった (図 2)。これまでに、スタチンが細胞のグルコース取り込み量を低下させることが報告されているが (Malenda *et al.*, Neoplasia. 2012)、スタチン耐性がん細胞では、スタチン処置によってもグルコースの取り込みが抑制されず、このことがスタチン耐性につながる一要因である可能性が考えられた。実際、スタチン耐性がん細胞では、グルコースの取り込み量と乳酸産生量いずれにおいてもスタチンにより有意に増加し、スタチン感受性がん細胞では、いずれも有意に減少した (図 3)。

スタチン耐性がん細胞 (NCI-H322M)



スタチン感受性がん細胞 (HOP-92)



Dunnett test
*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$
Mean \pm SD, n=3

図 2. 遺伝子発現へのスタチンの影響

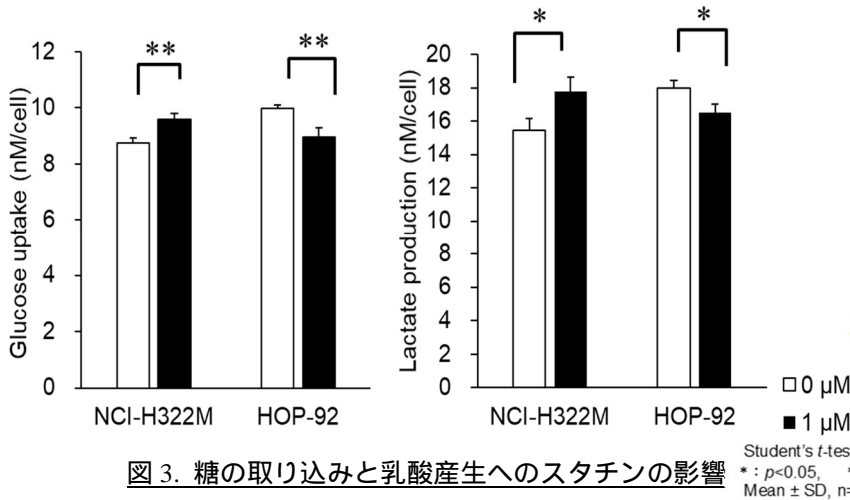


図 3. 糖の取り込みと乳酸産生へのスタチンの影響

Student's t-test
*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$
Mean \pm SD, n=3

スタチン感受性がん細胞 (HOP-92)

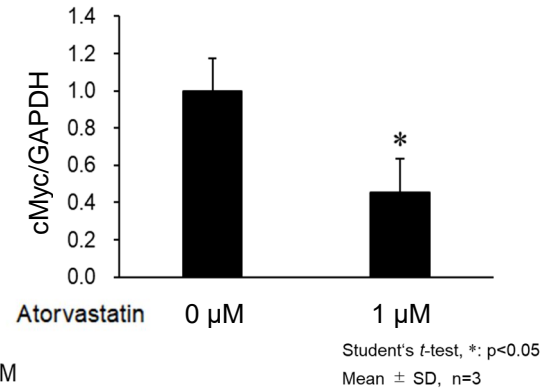


図 4. cMyc タンパク発現

Student's t-test, *: $p < 0.05$
Mean \pm SD, n=3

また、スタチン感受性がん細胞に特徴的な変化として、解糖系の律速因子であるホスホフルクトキナーゼ (PFK) 遺伝子の発現低下が観察され (図 2)、スタチンの制がん効果は、メバロン酸経路の阻害に加え、解糖系の抑制を通じて発揮される可能性が考えられた。これまでに、GLUT1 および PFK の遺伝子発現は cMyc によって制御されていること、また、cMyc はワールブルグ効果の重要な調節因子であることが報告されている (Miller *et al.*, Clin. Cancer Res. 2012)。cMyc は遺伝子およびタンパクともに、スタチン感受性がん細胞で発現低下した (図 2 および図 4)。すなわち、スタチン感受性がん細胞では、スタチン曝露によりワールブルグ効果の阻害が引き起こされることが示唆された。

以上より、本研究を通して、スタチンのがん細胞への影響は標的であるメバロン酸経路の阻害に加え、解糖系への影響が大きいことが明らかとなった。スタチン耐性がん細胞ではスタチンに曝露されても糖の取り込みが抑制されない一方で、スタチン感受性がん細胞は糖の取り込みが抑制されており、解糖系をはじめとした中心炭素代謝が大きく抑制されることが考えられた。すなわち、スタチン曝露によりワールブルグ効果の阻害が引き起こされるか否かがスタチン感受性の分子的背景の差の 1 つとして示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 割田友子、竹本昂平、大谷清
2. 発表標題 がん細胞のメタボローム変動からみたスタチン感受性因子の解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 T. Warita, K. Warita, T. Ishikawa, K. Ohtani, Z. N. Oltvai
2. 発表標題 The consideration of effects of statin on metabolism in statin-resistant cells and statin-sensitive cells
3. 学会等名 2020 World Conference on Lung Cancer of the International Association for the Study of Lung Cancer (WCLC 2020). (国際学会)
4. 発表年 2021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
研究協力者	大谷 清 (Ohtani Kiyoshi)		
研究協力者	オルトバイ ゴルタン (Oltvai N. Zoltan)		

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
研究協力者	割田 克彦 (Warita Katsuhiko)		
研究協力者	ウェルズ アラン (Wells Alan)		

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