

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：34504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07666

研究課題名(和文) がん代謝物に基づくスタチン適応がんの分類と微小腫瘍環境におけるスタチンの影響解析

研究課題名(英文) Classification based on oncometabolites of cancers for which statins are used and analysis of the effects of statins in tumor microenvironment

研究代表者

割田 友子 (Warita, Tomoko)

関西学院大学・生命環境学部・講師

研究者番号：00753112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：スタチンが抗腫瘍薬として有効となり得るがん細胞の特性について解析を試みた。HMG-CoAを合成するHMGCS1の発現は耐性株で高かったが、耐性・感受性株ともにスタチン処置による変動は大きくなかった。HMG-CoAを基質とするHMGCRCの発現はスタチン処置により両細胞株ともに有意に増加し、HMGCRCの分解を誘導するとスタチンの制がん効果が増強した。また、スタチンはがん細胞を酸化ストレスに脆弱にさせる可能性が示唆された。本研究より、スタチン耐性株は、HMGCS1発現が高くスタチンによるHMGCRC阻害を凌いで細胞内HMG-CoA量を維持し、また、酸化ストレスに対して巧妙に応答する可能性が考えられた。

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実績のある既存薬であり、副作用のデータも蓄積されていることから、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できる薬剤である。しかし、スタチンはすべてのがんに制がん効果を発揮するわけではなく、スタチンが奏効するがんを診断するための細胞特性の同定が必須である。本研究では、臨床応用に繋げていくために、がんにおけるスタチン適用範囲を広げるべく、がん細胞のスタチン感受性の増強を試みたことに意義がある。

研究成果の概要(英文)：We examined the cell characteristics of cancers for which statins are effective antitumor agents. Expression of HMGCS1, which synthesizes HMG-CoA, was higher in statin-resistant cancer cells than in statin-sensitive cancer cells; however, it did not profoundly alter statin-resistant or statin-sensitive cancer cells after statin treatment. Expression of HMGCRC, whose substrate is HMG-CoA, was significantly increased by statin treatment in both statin-resistant and statin-sensitive cancer cells, and induction of HMGCRC degradation augmented the anticancer effects of statins. Additionally, statins have been suggested to make cancer cells vulnerable to oxidative stress. This study suggests that in statin-resistant cancer cells, high HMGCS1 expression maintains intracellular HMG-CoA levels, counteracting HMGCRC inhibition by statins; statin-resistant cancer cells may also respond to oxidative stress using more sophisticated mechanisms.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：スタチン系薬剤 がん細胞 ドラッグリポジショニング スタチン感受性 HMGCRC

1. 研究開始当初の背景

スタチンは血中コレステロールの低下薬として開発され、脂質異常症の治療薬として使用されている。近年、すでに承認された既存薬から新しい薬効を見出し、別の病気の治療薬として再開発するドラッグリポジショニングが盛んに行われており、スタチンはがん治療薬としての転用が期待されている。スタチンは、メバロン酸経路の律速因子である HMG-CoA 還元酵素 (HMGR) を特異的に阻害することによって、最終産物であるコレステロールの生合成を抑制する。メバロン酸経路からは、コレステロール以外に、低分子 G タンパクの翻訳後修飾に必須な脂質や、電子伝達系に関わるユビキノンの中間代謝体も生合成される。スタチンがそのような細胞活動に重要な物質も阻害することやがんは代謝が盛んであることに鑑みると、スタチンががん細胞の増殖を抑えるのではないかと考えに至るまでに時間を要さなかった。そして、スタチンが上市されてわずか数年後に、スタチンの制がん効果が報告された (Buchwald, *The Lancet*. 1992)。その後、多くの疫学調査や *in vivo* および *in vitro* 実験で、スタチンが制がん効果を発揮することが報告されている (Nielsen *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 2012; Pisanti *et al.*, *Pharm. Res.* 2014; Scott *et al.*, *Breast Cancer Res Treat.* 2023.)。

がん治療には高額な費用や副作用が問題となっているが、スタチンはコレステロール低下薬として実績のある安価な既存薬であることから、安全で医療経済性が高いがん治療薬として期待できる。しかし実際には、スタチンが全く効かないがん細胞が存在し、かつ、無駄なスタチンの投薬は副作用のみを惹起することから、スタチンに感受性をもつがんを見極めなければ臨床応用は難しい。

がんが正常細胞と異なる特異的な代謝を行うことに鑑みても、スタチンに耐性を示すがん細胞がスタチンに感受性を示すがん細胞と異なる代謝を行うことは十分予想される。よって、代謝の違いに着目した解析は、スタチンが有効ながん細胞特性を見出すために大変意義があるといえる。

2. 研究の目的

研究代表者らはこれまでに、E-カドヘリンを発現している上皮系のがん細胞ではスタチンが効きづらく (スタチン耐性)、E-カドヘリンを発現していない間葉系のがん細胞ではスタチンが効果を発揮しやすいこと (スタチン感受性) を明らかにしている (Warita *et al.*, *Sci. Rep.* 2014)。次いで、研究代表者らはスタチンが有効ながん細胞と効果を発揮しないがん細胞の違いとして、がん代謝物の差異に着目した。メタボローム解析の結果より、スタチン感受性がん細胞は、スタチン耐性がん細胞に比べ HMGR の基質である HMG-CoA が少ないことが示唆された (図 1)。「スタチンが効きやすいがん細胞は細胞内 HMG-CoA 量が少ないのではないか」という仮説が導かれたが、現段階では、HMG-CoA 代謝物量の多寡がスタチン感受性を決定する根拠の裏付けに至っていない。本研究の目的として、とくに HMG-CoA に関連する因子に焦点を当て、スタチン適応がんを見極めるための細胞特性の同定を試みた。また、臨床応用に繋げていくためには、スタチンの制がん効果をより高めることが望ましい。よって、同時に、スタチンに対する感受性の増強法を検討した。

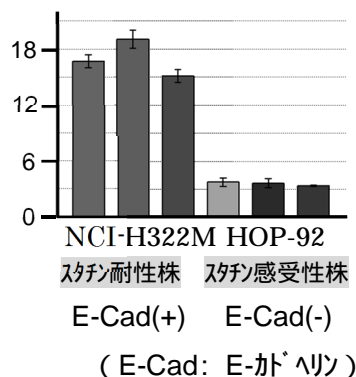


図 1. HMG-CoA 代謝物量

3. 研究の方法

【細胞】

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

【試薬および濃度】

- ・アトルバスタチン濃度
 - NCI-H322M: 0, 0.3, 1, 3, 10, 30 μ M
 - HOP-92: 0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 μ M
- ・SR-12813 濃度: 5 μ M
- ・H₂O₂ 濃度: 0, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2 mM

(1) 遺伝子発現解析

0.1-10 μM のアトルバスタチン処置 24 時間後に RNA 抽出を行った。1 μg の total RNA を逆転写し、cDNA 合成を行った。HMGC1 および HMGC2 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。また、内在性コントロールとして RPLP1 を用いた。

RPLP1 (Product size: 81 bp)

Forward 5' - AGCCGGTGTAATGTTGAGC -3'

Reverse 5' - CAGATGAGGCTCCCAATGTT -3'

HMGC1 (Product size: 90 bp)

Forward 5' - CTCTGGGATGGACGGTATGC -3'

Reverse 5' - GCTCCAACCTCCACCTGTAGG -3'

HMGC2 (Product size: 136 bp)

Forward 5' - GCCTGGCTCGAAACATCTGAA -3'

Reverse 5' - CTGACCTGGACTGGAAACGGATA -3'

(2) タンパク発現解析

0.1-10 μM アトルバスタチン処置 24 時間後にタンパクを抽出した。HMGC1 および HMGC2 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。10 $\mu\text{g}/\text{Lane}$ のタンパクをアプライし、SDS-PAGE およびウェスタンブロットを行った。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 HMGC1 ウサギモノクローナル抗体 (#36877; Cell Signaling Technology)

抗 HMGC2 マウスモノクローナル抗体 (AMAb90618; Atlas)

抗 GAPDH ウサギモノクローナル抗体 (#2118; Cell Signaling Technology)

HRP 標識二次抗体

抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (SeraCare)

抗マウス IgG ヤギ抗体 (R&D Systems)

(3) 細胞増殖の測定

HMGC2 タンパク分解誘導剤として SR-12813 を用い、0.3-30 μM のアトルバスタチンと併用し、がん細胞への影響を検討した。アトルバスタチンおよび SR-12813 処置 72 時間後、細胞増殖の評価をホルマザン色素の比色定量により行った。

(4) HMGC2 の蛍光免疫染色

スタチンおよび SR-12813 処置 24 時間後に、Anti-HMGC2 Polyclonal Antibody, ALEXA FLUOR®488 Conjugated を用いて免疫染色を行った。F-アクチン染色には Acti-stain™ 488 ファロイジンを、核染色には Hoechst 33342 を使用した。FluoView FV10i laser scanning confocal microscope (Olympus) を使用して撮影した。

(5) 酸化ストレス下でのスタチンのがん細胞への影響解析

H_2O_2 (0.1-2 mM) 存在下で 1 μM アトルバスタチンに曝露させ、がん細胞への影響を検討した。スタチンおよび H_2O_2 処置 24 時間後、Scepter™ Handheld Automated Cell Counter、Scepter™ Tips-60 μm sensor (Merck Millipore) を用いて細胞数を計測した。

4. 研究成果

HMGC1 は、スタチンの標的である HMGC2 の基質となる HMG-CoA を合成する。スタチンは競合阻害薬であることから、基質量が多いほど阻害効果は低下すると考えられる。内在性 HMGC1 発現量は、スタチン耐性がん細胞では感受性がん細胞に比べ高かったが (図 2C 上段)、スタチン処置による発現変動は、遺伝子レベルにおいてもタンパクレベルにおいても、大きな増加はみられなかった (図 2A および D)。耐性がん細胞は感受性がん細胞に比べ、スタチン処置に対し HMGC1 発現を増加させる能力が顕著に高いと考えるよりも、元々 HMG-CoA を多く細胞内に有していることがスタチンの阻害効果への対抗につながっているのではないかと推察された。

一方、HMG-CoA を基質とする HMGC2 の発現は、スタチン処置後、mRNA レベルではわずかに増加傾向を示しただけであったが (図 2B)、タンパクレベルではスタチン耐性および感受性がん細胞ともに、スタチンによって顕著な HMGC2 の誘導が認められた (図 2 C 下段および E)。両がん細胞における HMGC2 誘導能の明らかな差はなく、HMGC2 発現量がスタチン感受性を反映する指標というより、HMGC2 発現制御がスタチンの効果を増強するための鍵であることが推察された。

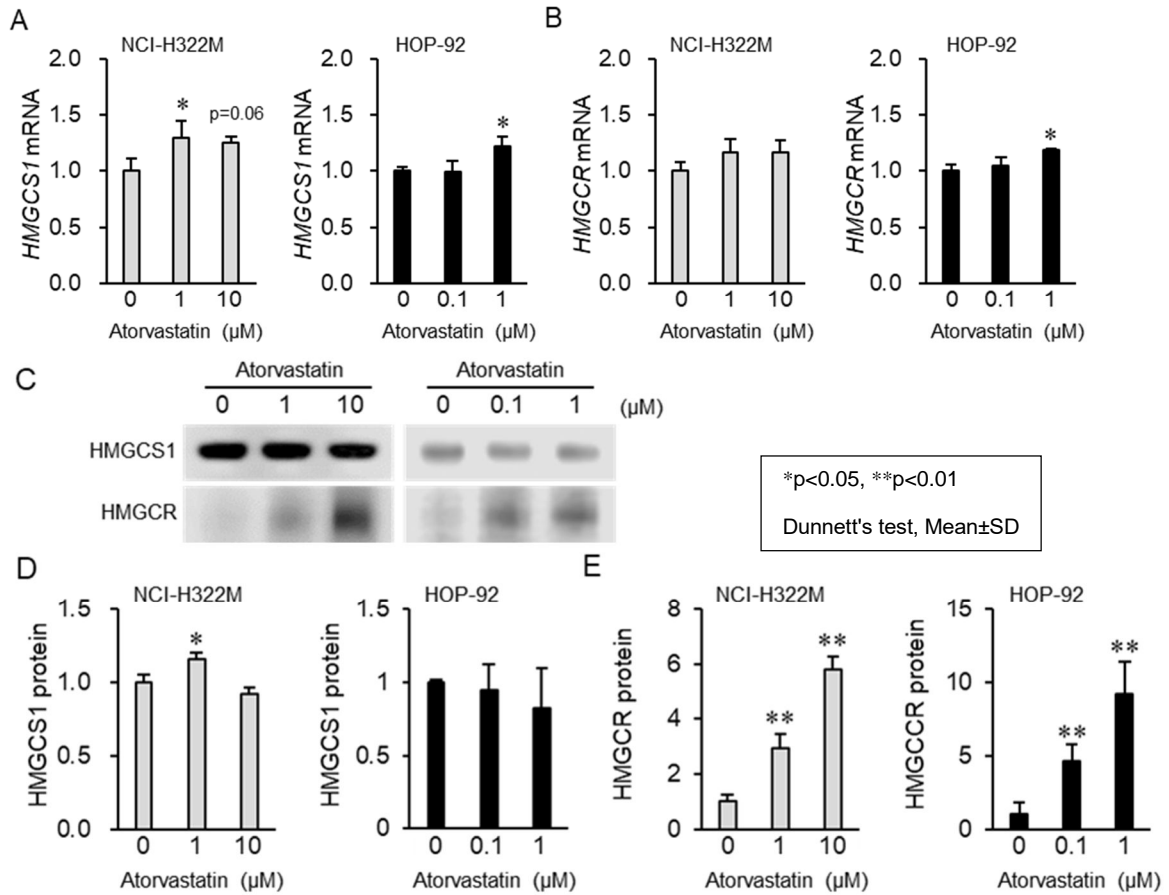


図 2. HMGCS1 および HMGCRC への遺伝子およびタンパクレベルでのスタチンの影響

「HMGCRC タンパク量の制御がスタチン感受性を増強させる鍵ではないか？」との問いが導かれたため、HMGCRC タンパク分解誘導によるスタチンの制がん効果の増強を試みた。その結果、HMGCRC タンパク分解誘導剤として用いた SR-12813 をスタチンと併用すると、スタチン単独よりも細胞増殖の抑制効果がより高いことが示された(図 3)。HMGCRC タンパク分解誘導剤は、スタチンにより上方制御された HMGCRC の分解を促進し、細胞増殖抑制を増強することが示唆された。また、SR-12813 の HMGCRC 局在への影響はみとめられなかった(図 4)。

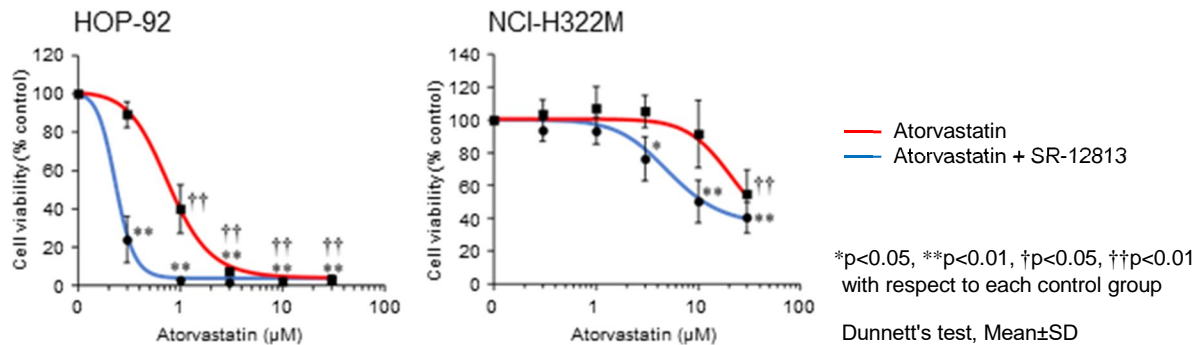


図 3. HMGCRC タンパク分解誘導剤とスタチンの併用における制がん効果

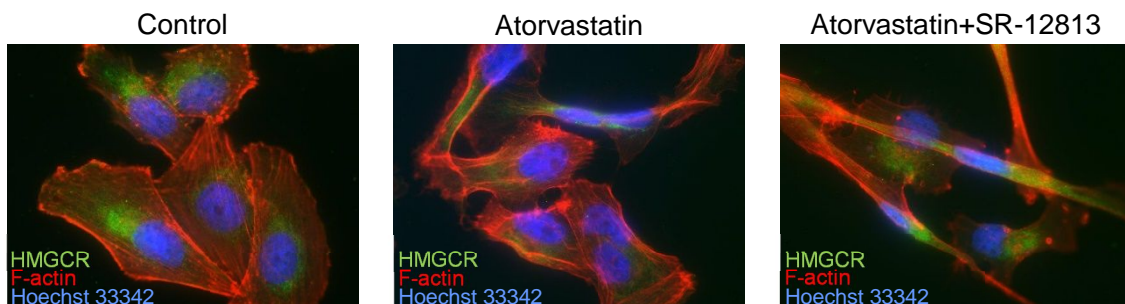


図 4. HMGCRC タンパク分解誘導剤とスタチンの併用における HMGCRC 局在への影響

HMG-CoA は解糖系からのアセチル CoA に由来することに鑑みると、スタチン感受性は糖代謝の差である可能性が考えられた。解糖系中間体を出発点とするペントースリン酸経路は抗酸化ストレス作用を担うため、スタチン耐性がん細胞と感受性がん細胞の酸化ストレスへの応答を解析した。具体的には、スタチン単独または酸化ストレス誘導剤である H_2O_2 で処置した。 H_2O_2 処置により、スタチン耐性および感受性がん細胞の細胞増殖が濃度依存的に減少することが示された (図 5A および B)。ただし、スタチン処置は、比較的低濃度の H_2O_2 下で、スタチン感受性 HOP-92 細胞においてのみ細胞増殖抑制効果を増強した (図 5B)。すなわち、スタチンは、がん細胞を酸化ストレスに脆弱にさせる可能性が示唆され、スタチン耐性株は、酸化ストレスに対して巧妙に応答するのではないかと考えられた。また、この結果はメタボローム解析の結果を反映しているものと推察された。スタチン処置により特徴的な代謝変動を示したものとして、酸化還元反応に関わるグルタチオンが挙げられる。還元型グルタチオン (GSH) と酸化型グルタチオン (GSSG) の比である GSH/GSSG の値が大きいほど、還元型の割合が大きいことを示し、つまり、細胞内は酸化ストレスが低い状態と考えられる。GSH および GSSG とともにスタチン感受性 HOP-92 細胞においては存在量が少なく、スタチン耐性 NCI-H322M 細胞と比べると細胞内の酸化ストレスに対して脆弱である可能性が示唆された (図 6 左および中央)。また、GSH/GSSG 比は、NCI-H322M ではスタチン処置により増加傾向を示し、一方 HOP-92 では減少傾向を示した (図 6 右)。すなわち、スタチン存在下では、スタチン耐性がん細胞で細胞内の酸化ストレスが低く、スタチン感受性がん細胞で酸化ストレスが高いことが示唆された。

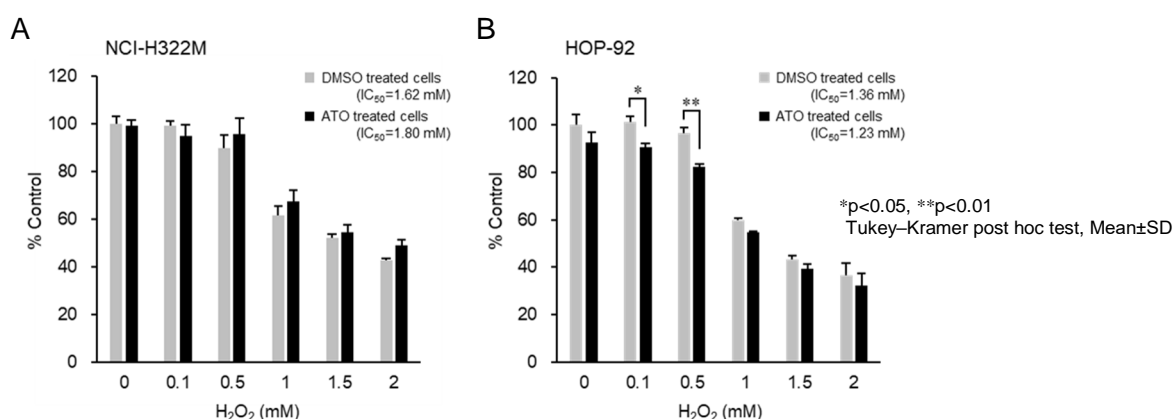


図 5. 酸化ストレス下でのスタチンの制がん効果の検討

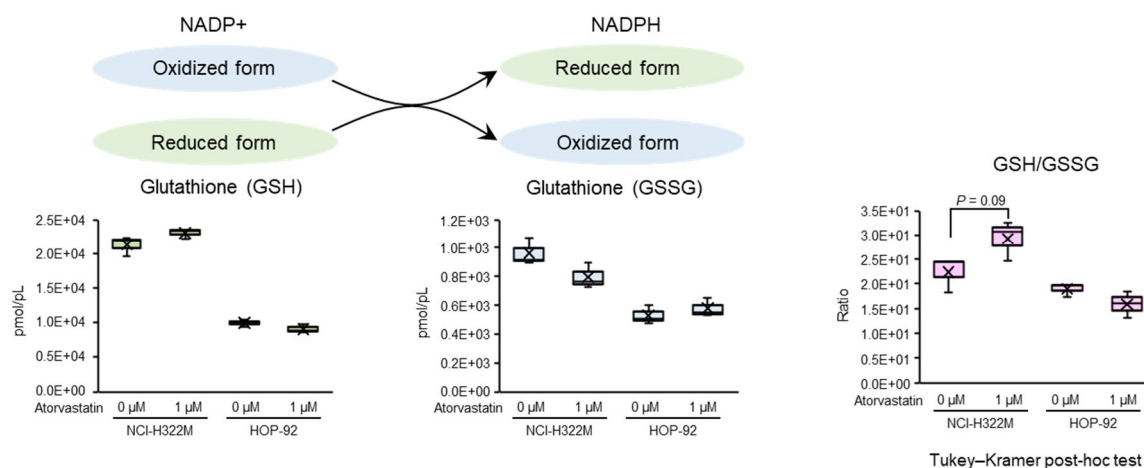


図 6. 酸化還元関連代謝物へのスタチンの影響

本研究の成果より、スタチン耐性がん細胞は、内在性 HMGCS1 発現が高くスタチンによる HMGCR 阻害を凌いで細胞内 HMG-CoA 量を維持し、下流への影響を最小限に抑える可能性が考えられた。また、スタチン耐性がん細胞は、スタチン処置後、細胞内酸化ストレスが低下する傾向がみとめられたため、酸化ストレスに打ち勝つ代謝経路が存在する可能性が考えられた。さらに、スタチンの制がん効果の増強剤として、SR-12813 が有望である可能性が示唆された。

[References]

Buchwald, 1992. Lancet. 339:1154-1156.
 Nielsen *et al.*, 2012. N. Engl. J. Med. 367:1792-1802.
 Pisanti *et al.*, 2014. Pharmacol. Res. 88:84-98.
 Scott *et al.*, 2023. Breast Cancer Res. Treat. 199: 195-206.
 Warita *et al.*, 2014. Sci. Rep. 4:7593.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 N. Irie, K. Warita, Y. Zhou, Z. Oltvai, T Warita
2. 発表標題 Identification of Optimal Internal Reference Gene to Analyze the Anticancer Effects of Statins in Lung Cancer Cells
3. 学会等名 2022 World Conference on Lung Cancer of the International Association for the Study of Lung Cancer (WCLC 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 周雅軒、大谷清、割田友子
2. 発表標題 スタチンとHMG-CoA還元酵素分解誘導剤SR-12813との併用による制がん効果
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 入江七海、大谷清、割田友子
2. 発表標題 スタチンによる制がん効果の解析を目的とした最適な内部標準の探索
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹本昂平、割田友子、大谷清
2. 発表標題 がん細胞の糖代謝活性レベルとスタチン感受性との関連
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 割田友子、入江七海、周雅軒、田代二郎、杉浦曜大、溝口佳奈、大谷清、石川拓郎、割田克彦、Oltvai ZN.
2. 発表標題 スタチン感受性の異なる肺がん細胞におけるメタボロームおよびトランスクリプトームプロファイリングの比較解析
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 T. Warita, K. Ohtani, T. Ishikawa, Z. N. Oltvai, K. Warita
2. 発表標題 Relationship between cholesterol synthesis in cancer cells and anticancer effect of statins.
3. 学会等名 2021 World Conference on Lung Cancer of the International Association for the Study of Lung Cancer (WCLC 2021) (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
研究分担者	大谷 清 (Ohtani Kiyoshi) (30201974)	関西学院大学・生命環境学部・教授 (34504)	
研究分担者	割田 克彦 (Warita Katsuhiko) (40452669)	鳥取大学・農学部・教授 (15101)	

	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	入江 七海 (Irie Nanami)		

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	周 雅軒 (Yaxuan Zhou)		
研究協力者	溝口 佳奈 (Mizoguchi Kana)		
研究協力者	オルトバイ ゴルタン (Oltvai Zoltan N.)		

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