

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09652

研究課題名（和文）脂質異常症治療薬スタチンの奏効に関わる卵巣癌の臨床病理・分子生物学的特性

研究課題名（英文）Clinicopathological and molecular biological characteristics of ovarian cancer associated with response to statins for dyslipidemia

研究代表者

小林 佑介（Kobayashi, Yusuke）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・専任講師

研究者番号：10439763

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）：脂質異常症治療薬スタチンを卵巣癌の治療薬として応用するべく、臨床導入を見据えた基礎的研究を行なった。スタチンは既存卵巣癌細胞株において細胞増殖抑制効果を示し、特に漿液性癌と明細胞癌細胞株でスタチンが奏効していた。また、マイクロアレイ解析をかけて遺伝子発現とスタチン投与による細胞生存率からピアソンの積率相関係数を算出し、VDAC1 および LDLRAP1 遺伝子発現がスタチン奏効の予測マーカーとなることを明らかとした。さらに、臨床検体でのスタチン奏効を増殖抑制率より検討すると、特に漿液性癌と明細胞癌症例に奏効しており、卵巣癌標準治療薬剤と比較しても同等の増殖抑制率を示している症例も認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂質異常症治療薬スタチンの抗腫瘍効果は様々な癌種で報告されており今後の臨床への還元が期待されているものの、他癌種での臨床試験では奏効予測に基づく症例選択が出来ていないため有望な結果が得られていないのが現状である。卵巣癌に対しては本研究において樹立したバイオマーカーVDAC1やLDLRAP1によるコンパニオン診断でスタチン製剤の奏効を期待できる症例を選択することができる。今後は奏効を確認した漿液性癌症例と明細胞癌症例を対象に、既発症症例の維持療法もしくは卵巣癌ハイリスク症例の予防薬として用いることや標準治療薬への上乗せを検証する臨床試験の実施が期待される。

研究成果の概要（英文）：A basic study was conducted to apply the dyslipidaemic drug statin as a therapeutic agent for ovarian cancer, with a view to introducing it into clinical practice. Statins showed an inhibitory effect on cell proliferation in existing ovarian cancer cell lines, particularly in serous and clear cell carcinoma cell lines. Pearson's product-moment correlation coefficients were calculated from gene expression and statin-treated cell viability by microarray analysis, and VDAC1 and LDLRAP1 gene expression were found to be predictive markers of statin response. Furthermore, when statin response in clinical samples was examined by growth inhibition rate, it was found that statin response was particularly observed in serous and clear cell carcinoma cases, with some cases showing comparable growth inhibition rates compared to standard ovarian cancer treatment agents.

研究分野：婦人科腫瘍学、遺伝腫瘍学、新規創薬

キーワード：卵巣癌 ドラッグリポジショニング スタチン 奏効予測マーカー

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌に対する最近の分子標的薬や抗体医薬の登場も卵巣癌全体の予後を大きく改善させるまでは至っておらず、更なる治療薬の開発、加えて治療から予防へのパラダイムシフトが求められている。一方、そのような新薬開発は長期間かつ多角的な基礎研究が必要となるため、開発に要した多額の費用により医薬品として高額な薬剤となり、結果として国民医療費を高騰させる原因となっている。さらにシーズから承認に至る確率も極めて低く、従来の創薬手法による開発は行き詰まり、新たな創薬手法が必要とされている。このような課題を解決するのが、既にヒトでの安全性が確認されている既存の医薬品を利用し、別の新たな疾患への適応を持つ薬剤を開発するドラッグリポジショニングであり、低コストでかつ確実性の高い創薬が可能となるため近年注目されてきている。申請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* における多面的効果による細胞増殖抑制効果、抗腫瘍効果、それらの作用機序を既に多くの論文で報告してきた(図 1)。スタチン製剤が、アポトーシスやオートファジーを誘導すること、細胞周期に関与し G1 arrest を誘起すること、クロマチン複製維持に関わる mini-chromosomal maintenance (MCM) family の発現を障害すること、これらの多面的効果により細胞増殖抑制効果、抗腫瘍効果を発揮している可能性を報告している。また、卵巣癌細胞株の増殖抑制にあたっては、スタチン製剤が抑制するメバロン酸合成経路の本流上流ではなく、同経路より分枝したタンパクのプレニル化に関わる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が重要な役割を果たしていることを明らかとしている。一方で、申請者の直近の実験結果では、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同時阻害する L-778123 を化学合成したうえでスタチン製剤と比較したところ、卵巣癌細胞株 OVSAHO と KURAMOCHI における IC50 値で L-778123 はスタチン製剤に劣った。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、申請者は、スタチン製剤がメバロン酸合成経路を阻害することで、ワールブルグ効果を回避し TCA 回路が活性化される現象を報告している(図 2)。これまでに得られた研究成果をもとに、本申請研究ではスタチン製剤をドラッグリポジショニングにより卵巣癌へ臨床応用することを見据えて、臨床検体を用いたプライマリーでの奏効確認とその奏効に影響する卵巣癌の臨床病理・分子生物学的特性を明らかにすることを目的とした。

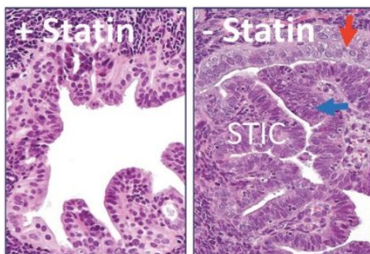


図 1: モデルマウスにおいてスタチン投与群では微小卵管上皮内癌(STIC)を認めない。

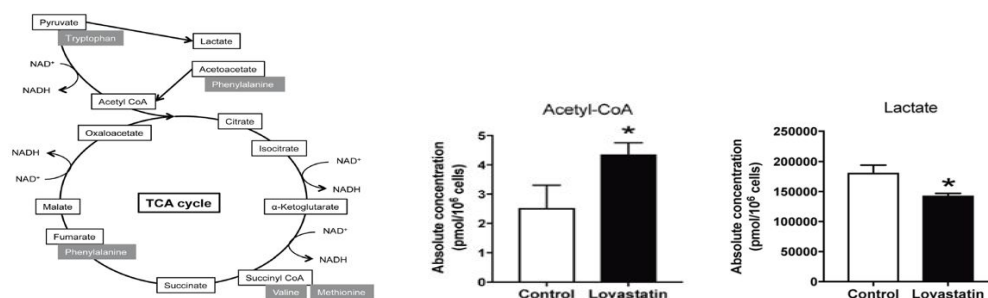


図 2: スタチン添加培養により TCA 回路関連代謝物が増加した一方で、嫌氣的解糖経路の最終産物である乳酸が減少した。

2. 研究の目的

申請者の今までの研究成果により、脂質異常症治療薬スタチンが卵巣癌に対する細胞増殖抑制効果・腫瘍進展抑制効果を有することは明らかとなった。一方で、*in vitro* で卵巣癌細胞株種によりスタチン製剤の IC50 値が異なっており、これは本申請の準備実験でも明らかとなっており、スタチン製剤の奏効に関わる何らかの臨床病理・分子生物学的因子の存在が強く示唆される。

卵巣癌に対する臨床応用を考える際には、スタチン製剤の奏効が期待できる卵巣癌症例の抽出基準は必要不可欠である。また、奏効に関わる分子生物学的特性を明らかとすることで、コンパニオン診断としてスタチン製剤の奏効を期待できる症例を選択できる。本申請研究では「スタチン製剤の奏効に関わる卵巣癌の臨床病理・分子生物学的特性とはなんだろうか?」という学術的な問いに答えるべく、臨床応用を見据えて上記課題を解決することを目的とした。

3. 研究の方法

スタチン製剤の細胞増殖抑制効果に関わる分子生物学的特性の探索

申請者がすでに行っている研究結果では、卵巣癌細胞株の種類によりスタチン製剤の IC50 値が異なる。そこで、細胞増殖抑制効果に関わる病理・分子生物学的特性を明らかとすべく、既存卵巣癌細胞株(2008, A2780, RMG-1, TOV-21G, ES-2, OVISe, OVSAHO, JHOS2)とヒト検体樹立細胞株 NOVC シリーズ(Ascites-derived ovarian cancer cell lines)を用いて IC50 値を測定し、奏効細胞株群と非奏効細胞株群とに分類した。上述の細胞株群全てにマイクロアレイ解析を行い、奏効細胞株群と非奏効細胞株群との間で有意に発現が変化している遺伝子、パスウェイを明らかにした。以上の検討によりスタチン製剤の細胞増殖抑制効果に関わる分子生物学的特性を抽出した。

ヒト臨床検体を用いたスタチン製剤の奏効確認と奏効に関わる臨床病理学的因子の検討

慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認のもと、卵巣癌患者の手術中に原発巣より腫瘍検体を採取しヒト卵巣癌検体に対するスタチン製剤の奏効を確認した。検討薬剤としてシンバスタチン 100uM/250uM/500uM を、卵巣癌標準治療薬剤であるパクリタキセル 40 µg/ml、カルボプラチン 30 µg/ml と比較検討した。評価法は申請者がすでに樹立している Histoculture Drug Response Assay(HDRA)により各薬剤の抑制率(Inhibition index)を算出した。以上の評価法によりヒト卵巣癌検体にスタチン製剤が奏効するかを明らかとした。さらに抑制率の結果から、奏効症例と非奏効症例に分類し、両群間の臨床病理学的背景を比較検討し有意に差のある因子を抽出した。

4. 研究成果

スタチン製剤の細胞増殖抑制効果に関わる分子生物学的特性の探索

細胞増殖抑制効果に関わる病理・分子生物学的特性を明らかとすべく、既存卵巣癌細胞株 10 種を用いてスタチン投与下の細胞生存率を測定した。シンバスタチン 10uM 添加 72 時間後の細胞生存率は、RMUG-S; $83.5 \pm 2.3\%$ 、2008; $77.2 \pm 3.1\%$ 、MCAS $54.6 \pm 1.6\%$ 、JHOM1; $53.3 \pm 5.7\%$ 、OVISe; $37.8 \pm 1.8\%$ 、RMG-1; $31.8 \pm 1.3\%$ 、A2780; $28.5 \pm 4.9\%$ 、TOV-21G; $28.3 \pm 10.5\%$ 、ES2; $24.6 \pm 9.2\%$ 、OVSAHO; $18.7 \pm 2.0\%$ であり、奏効しづらい細胞株から奏効しやすい細胞株まで差があり、特に漿液性癌そして明細胞癌細胞株でスタチンが奏効していることが明らかとなった(図 3)。続いて、NOVC シリーズ(Ascites-derived ovarian cancer cell lines)のシンバスタチン投与下の細胞増殖抑制率を測定した。その結果、すでに評価済みの既存卵巣癌細胞株 11 種類の結果と同様に奏効群と非奏効群に分類できることが示された。そこで、スタチンの奏効に関わる遺伝子を同定すべく、既存卵巣癌細胞株 11 種類とヒト卵巣癌腹水由来細胞株 6 種類、合計 17 細胞株を、スタチン投与後の細胞生存率より奏効群と非奏効群に分類した。この全細胞株にマイクロアレイ解析をかけて遺伝子発現とスタチン投与による細胞生存率からピアソンの積率相関係数を算出して検討し、スタチンの奏効に関与している可能性のある遺伝子群を抽出した。正の相関関係を示す上位遺伝子に NRDC、PP1D、XRN2、VDAC1、HSP90AB1 が、負の相関関係を示す上位遺伝子に LDLRAP1、EPN3、P4HTM、VPS37C、PHF2 が上がった。この中でこれまでの研究成果に関連のある VDAC1 遺伝子($r: 0.74$)と LDLRAP1 遺伝子($r: -0.88$)に着目し、両遺伝子の発現を既存卵巣癌細胞株とヒト卵巣癌腹水由来細胞株で検証したところ、VDAC1 遺伝子の発現はスタチンが奏効しやすい漿液性癌や明細胞癌で高く、ヒト卵巣癌腹水由来細胞株でもスタチンに奏効を示す細胞株での発現が高かった。一方で、LDLRAP1 遺伝子の発現はスタチンが奏効しにくい粘液性癌で高く、ヒト卵巣癌腹水由来細胞株でもスタチンの奏効率が低い細胞株での発現が高かった。以上より、スタチンの卵巣癌奏効に関わるバイオマーカーとして VDAC1 遺伝子と LDLRAP1 遺伝子が樹立された。

ヒト臨床検体を用いたスタチン製剤の奏効確認と奏効に関わる臨床病理学的因子の検討

慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認のもと、卵巣癌患者の手術中に原発巣より腫瘍検体を採取し、Histoculture Drug Response Assay(HDRA) によりシンバスタチン 100uM/250uM/500uM を、卵巣癌標準治療薬剤であるパクリタキセル 40 µg/ml、カルボプラチン 30 µg/ml と抑制率(Inhibition index)において比較検討した。20 症例のデータを収集しており、抑制率の中央値はシンバスタチン(100uM/mL) 49.1% (6.0%-77.7%)、パクリタキセル(40 µg/mL) 74.4% (34.2%-86.3%)、カルボプラチン(30 µg/mL) 36.1% (11.2%-62.9%)であった。シンバスタチンの抑制率はパクリタキセルより低いもののカルボプラチンより高く、臨床検体でもシンバスタチンが奏効することが示され、実際の臨床検体においてもスタチンは特に漿液性癌と明細胞癌に奏効することが明らかとなった。また、スタチンとパクリタキセルやパノピノスタットとの相乗効果を確認し、マウスへの投与が血液生化学的に安全であることも明らかにした。

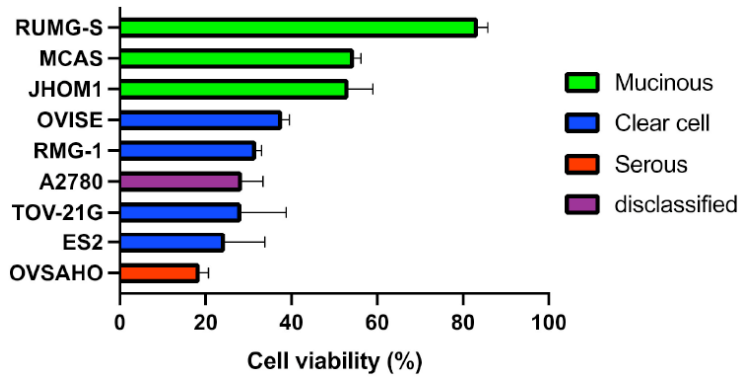


図 3: 組織型毎の細胞株におけるスタチンの細胞増殖抑制率

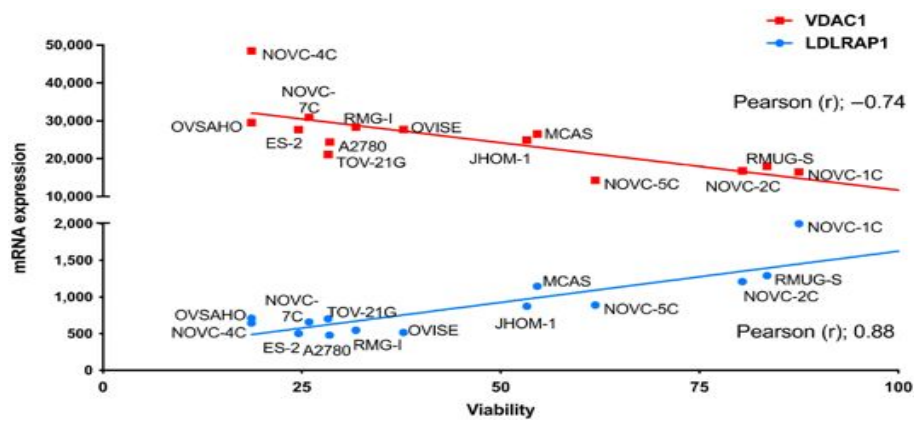


図 4: ピアソンの積率相関係数により抽出された奏効予測マーカー

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kobayashi Yusuke, Takeda Takashi, Kunitomi Haruko, Chiwaki Fumiko, Komatsu Masayuki, Nagai Shimpei, Nogami Yuya, Tsuji Kosuke, Masuda Kenta, Ogiwara Hideaki, Sasaki Hiroki, Banno Kouji, Aoki Daisuke	4. 巻 15
2. 論文標題 Response Predictive Markers and Synergistic Agents for Drug Repositioning of Statins in Ovarian Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmaceuticals	6. 最初と最後の頁 124 ~ 124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ph15020124	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yusuke Kobayashi
2. 発表標題 Drug repositioning for ovarian cancer targeting mevalonate pathway
3. 学会等名 The 36th annual meeting of Korean Society of Gynecologic Oncology (KSGO)（招待講演）（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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------