

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22591525

研究課題名（和文）

膵癌の発育・進展におけるコレステロール合成経路と TGF $\beta$  とのクロストークの解明

研究課題名（英文）

The crosstalk between cholesterol synthesis pathway and TGF-beta in pancreatic cancer

研究代表者

石川 晋之 (ISHIKAWA SHINJI)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：80419639

研究成果の概要（和文）：

高脂血症治療薬であるスタチンを内服している大腸癌切除術後の患者は再発率が低かった。ただし、pravastatin では再発抑制効果はなく、細胞株でも抗腫瘍効果は認められなかった。Pravastatin 以外のスタチンでは容量依存的に抗腫瘍効果を認めたが、その主経路であるメバロン酸カスケードと関連がなく、ヒストンメチルトランスフェラーゼである EZH2 を抑制し、p27 の発現を誘導することで発揮されることを見出した。さらに、スタチンと HDAC 阻害剤との併用は相乗的な抗腫瘍効果を発揮し、新規治療法としての期待が持てる。

研究成果の概要（英文）：

Although statins led better survival outcomes, the anti-proliferative effects in Colorectal cancer (CRC) cells differ in statins (simvastatin  $\geq$  fluvastatin  $>$  atorvastatin  $>$  pravastatin). Indeed, the recurrence rate of CRC patients with pravastatin had no difference compared to patients without statin. As the underlying mechanism, statins except pravastatin showed the anti-cancer effects by inhibiting EZH2-mediated gene silencing of p27<sup>KIP1</sup>. As a novel epigenetic anti-cancer strategy, a simvastatin plus classII HDAC inhibitor synergistically induced the anti-proliferative effects by inhibiting EZH2-modulated HDAC5 induction. Thus, as a novel mechanism of statin-induced anti-cancer effects, EZH2-mediated epigenetic mechanism was identified. Although statin may lead to survival benefits in CRC patients, its anti-cancer effects differ in statins, suggesting that the kind of statins should be considered in clinical settings.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード:

スタチン、EZH2、p27、SREBP2、HDAC5、大腸癌

### 1. 研究開始当初の背景

消化器癌の浸潤、転移のメカニズムを解明することは新規治療法の開発につながる。発癌物質をシリアンゴールデンハムスターに投与することで発生した膵臓癌から樹立した高転移株と低転移株をRDA法で比較したところ、脂質代謝に関連する分子であるORP5が高転移株で高発現していることを認め (J. Exp. Clin. Cancer. Res. 2003)、膵臓癌症例でORP5の発現と予後を検討したところ、ORP5が高発現している症例の予後が有意に不良であることを見出した (Cancer Sci. 2008)。

脂質代謝に関連する分子が消化器癌の予後に関わることが判明し、これまでではっきりとしなかった、代謝と癌という新しい分野に科学的な証明を示すことができた。

### 2. 研究の目的

各種消化器癌における脂質代謝との関連、そのメカニズムを解明し、新規治療法の開発に寄与することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本邦において大腸癌は増加傾向にあり、各種化学療法剤の開発により予後は延長しているが、長期間の化学療法により、患者はその副作用に直面しなければならない。その上、その高額な医療費は患者だけでなく、国家全体の問題となっており、安価で安全な治療法の開発は急務である。

大腸癌とコレステロール合成経路の関連を証明するために、高脂血症治療薬であるスタチン使用の有無で切除術後の予後を判定する。

スタチン投与による抗腫瘍効果をMTT assayで確認し、スタチンの種類による違い、発現が増強または減弱する分子をRT-PCR, Western blottingによりスクリーニングし、さらにはその分子のknock downをsiRNAで検討することでメカニズムを解明する。また、そのメカニズムに則り、スタチンと各種化学療法剤との併用で、少量で高い効果が得られる組み合わせを選定し、新規治療法を開発する。

### 4. 研究成果

複数施設で得られた大腸癌根治切除術症例742例を検討した。スタチン内服群は61例、非内服群は681例であった。スタチン内服群はOS(overall survival)、DFS(disease free survival)ともに有意に予後良好であった ( $p=0.02$ ,  $p<0.01$ )。

臨床で使用されたスタチン4種類

(pravastatin, simvastatin, fluvastatin, atorvastatin)と6種類の大腸癌細胞株(DLD1, HT29, HCT116, SW620, LoVo, colo320)を使用しMTT assayを施行したところ、pravastatinのみ抗腫瘍効果を認めなかった。臨床データを見直したところ、スタチン内服群で再発した症例は全てpravastatinを内服しており、pravastatin内服群のみで検討したところ、非内服群との間に再発率に違いはなかった。さらに核内のSREBP2をWestern blottingで確認したところ、コレステロール合成経路はpravastatinでもsimvastatinでも同様に抑制されていた。つまり、スタチンの抗腫瘍効果はその主要経路であるメバロン酸カスケードとは関連がなく、pravastatinには臨床でもin vitroでも抗腫瘍効果がないと判明した。

そこで、RT-PCRを行い、epigeneticな分子をスクリーニングしたところ、スタチン投与により、EZH2の発現が抑制され、HDAC5の発現が増強した。EZH2の抑制はp27の発現を誘導し、これが抗腫瘍効果をもたらした。HDAC5はEZH2抑制によるfeed backであることがEZH2のsiRNAでの検討で明らかとなった。

スタチンがEZH2を抑制し、その結果、feed backとして(腫瘍が増殖しようとして)HDAC5の発現が増強するため、スタチン投与にMC1568(classIIのHDAC inhibitor)を加えたところ、相乗的に抗腫瘍効果が認められた。ここで使用したスタチンは5・Mであり、これは通常の内服量と同様である。また、MC1568 20・Mは単独ではスタチン5・Mと同程度の抗腫瘍効果がないが、両者を併用することで5日間でコントロールに比して平均で15%程度まで腫瘍増殖を抑制した。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計38件)

1. Ozaki N, Ohmuraya M, Ida S, Hashimoto D, Ikuta Y, Chikamoto A, Hirota M, Baba H  
「Serine protease inhibitor Kazal type 1 and epidermal growth factor receptor are expressed in pancreatic tubular adenocarcinoma. Intraductal papillary mucinous neoplasm, and pancreatic intraepithelial neoplasia.」  
J Gastroenterol (Published Online) 査読有  
DOI: 10. 1007/s00534 -012-0587-6)

2. Nakahara O, Takamori H, Iwatsuki M, Baba Y, Sakamoto Y, Tanaka H, Chikamoto A, Horino K, Beppu T, Kanemitsu K, Honda Y, Iyama K, Baba H  
「Carcinogenesis of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas: Loss of MicroRNA-101 Promotes Overexpression of Histone Methyltransferase EZH2.」  
Ann Surg Oncol ; 19 Suppl 3:565-71, 2012 査読有 DOI: 10.1245/s10434-011-2068-6.
3. Horino K, Takamori H, Ikuta Y, Nakahara O, Chikamoto A, Ishiko T, Beppu T, Baba H  
「Cutaneous metastases secondary to pancreatic cancer.」  
World J Gastrointestinal Oncol ; 4:176-180, 2012 査読有 DOI:10.4251/wjgo.v4.i7.176.
4. Takamori H, Kanemitsu K, Hirota M, Ikeda O, Tanaka H, Beppu T, Yamashita Y, Oya N, Baba H  
「Perioperative intra-arterial and systemic chemotherapy for pancreatic cancer」  
Ann Surg Oncol ; 18:1110-5, 2011 査読有 DOI : 10.1245/s10434-010-1384-6
5. Nakahara O, Takamori H, Tanaka H, Sakamoto Y, Ikuta Y, Furuhashi S, Watanabe M, Beppu T, Hirota M, Kanemitsu K, Baba H  
「Clinical significance of dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase expression in patients with pancreatic cancer.」  
Int J Clin Oncol ; 15:39-45, 2010 査読有 DOI: 10.1007/s10147-009-0008-2.
6. Ida S, Ohmuraya M, Hirota M, Ozaki N, Hiramatsu S, Uehara H, Takamori H, Araki K, Baba H, Yamamura K  
「Chronic pancreatitis in mice by treatment with cholinedeficientethionine-supplemented diet.」 Exp Anim ; 59:421-9, 2010 査読有  
URL:https://www.jstage.jst.go.jp/article/expanim/59/4/59\_4\_421/\_pdf
7. Ishikawa S, Nagai Y, Masuda T, Nakamura T, Imamura Y, Takamori H, Hirota M, Funakosi A, Fukushima M, Baba H  
「The role of oxysterol binding protein related protein 5 in pancreatic cancer.」  
Cancer Sci ; 101:898-905, 2010 査読有
- DOI:10.1111/j.1349-7006.2009.01475.x.  
[学会発表] (計 98 件)
1. 黒木秀幸、林 洋光、中川茂樹、橋本大輔、生田義明、近本 亮、別府 透、馬場秀夫  
「膵 IPMN の悪性化における EZH2 の臨床的意義」  
第 26 回日本消化器癌発生学会, 2012 年 11 月 15 日 ルネッサンスリゾートナルト (徳島県)
2. 高森啓史、中原 修、生田義明、黒木秀幸、近本 亮、土居浩一、石河隆敏、別府 透、馬場秀夫  
「通常型膵癌における性差による治療反応性の比較」  
2012 年度日本消化器関連学会週間  
2012 年 10 月 12 日 神戸国際展示場 (兵庫県)
3. 高森啓史、中原 修、生田義明、新田英利、今井克憲、林 洋光、近本 亮、土居浩一、別府 透、馬場秀夫  
「stage 4a, 4b 膵癌に対する集学的治療の検討」  
第 67 回日本消化器外科学会 2012 年 7 月 20 日 ANA クラウンプラザホテル富山 (富山県)
4. 高森啓史、生田義明、中原 修、橋本大輔、黒木秀幸、馬場秀夫  
「膵癌に治癒は望めるか? -5 年生存者からの検討」  
第 43 回日本膵臓学会 2012 年 6 月 29 日 ホテルメトロポリタン山形 (山形県)
5. 中原 修、高森啓史、黒木秀幸、生田義明、近本 亮、別府 透、馬場秀夫  
「膵癌の前癌病変 (IPMN) における悪性化の機序解明 - miR-101 と EZH2 の発現の観点から - .」  
第 112 回日本外科学会定期学術集会  
2012 年 4 月 12 日 幕張メッセ国際会議場 (千葉県)
6. 高森啓史、生田義明、中原 修、黒木秀幸、近本 亮、土居浩一、石河隆敏、別府 透、馬場秀夫  
「切除適応膵癌に対する周術期補助化学療法施行例の予後因子解析からみた治療戦略の方向性」  
第 112 回日本外科学会定期学術集会  
2012 年 4 月 12 日 幕張メッセ国際会議場 (千葉県)
7. Takamori H, Tanaka H, Nakahara O, Abe S, Chikamoto A, Horino K, Beppu T, Baba H  
「Use of the round ligament and omental flap to prevent pancreatic fistula, sequential delayed intra-

- abdominal hemorrhage after pancreaticoduodenectomy -double wrapping method.」  
第44回万国外科学会 2011年8月30日 パシフィコ横浜 (神奈川県)
8. Horino K, Takamori H, Nakahara O, Chikamoto A, Tanaka H, Ishiko T, Beppu T, Baba H  
「Utility of a critical pathway for pancreaticoduodenectomy」  
INTERNATIONAL SURGICAL WEEK 2011 (第44回万国外科学会) 2011年8月28日 パシフィコ横浜 (神奈川県)
  9. 堀野 敬, 高森啓史, 田中 洋, 阿部真也, 中原 修, 古橋 聡, 増田稔郎, 近本 亮, 石河隆敏, 別府 透, 馬場秀夫  
「膵頭十二指腸切除術前の減黄術と合併症」  
第66回日本消化器外科学会総会 2011年7月15日 名古屋国際会議場 (愛知県)
  10. 高森啓史, 田中 洋, 阿部真也, 中原 修, 堀野 敬, 増田稔郎, 近本 亮, 石河隆敏, 別府 透, 馬場秀夫  
「浸潤性膵管癌に対する治療戦略」  
第66回日本消化器外科学会総会 2011年7月14日 名古屋国際会議場 (愛知県)
  11. 中原 修, 高森啓史, 生田義明, 別府 透, 馬場秀夫  
「膵 IPMN の癌化における EZH2 と microRNA-101 の関与」  
第20回日本癌病態治療研究会, 2011年6月17日 東京大学医学部教育研究棟 (東京都)
  12. Nakahara O, Takamori H, Sakamoto Y, Tanaka H, Chikamoto A, Horino K, Beppu T, Honda Y, Iyama K, Baba H  
「Carcinogenesis of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas: Loss of microRNA-101 promotes overexpression of histone methyltransferase EZH2.」  
AACR102nd Annual Meeting 2011 2011年4月2日 Orange County Convention Center Orlando (アメリカ)
  13. 中原 修, 高森啓史, 堀野 敬, 田中 洋, 井田 智, 古橋 聡, 阿部真也, 別府 透, 馬場秀夫  
「Loss of microRNA-101 leads to carcinogenesis of pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMN) through overexpression of histone methyltransferase EZH2.」  
第21回消化器癌発生学会 2010年11月18日 軽井沢プリンスホテルウエス
- ト (長野県)
14. Horino K, Baba H  
「Preoperative biliary drainage increases the incidence of surgical site infection after pancreaticoduodenectomy.」  
20th World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists 2010年10月23日 京王プラザホテル (東京都)
  15. Ida S, Ohmuraya M, Nakahara O, Furuhashi S, Abe S, Tanaka H, Horino K, Takamori H, Beppu T, Baba H  
「Overexpression of EGFR in the exocrine pancreas induces a chronic pancreatitis.」  
9th International Conference of the Asian Clinical Oncology Society 2010年8月25日 Gifu grand Hotel (岐阜県)
  16. Horino K, Takamori H, Tanaka H, Akaboshi S, Ozaki N, Nakahara O, Furuhashi S, Ida S, Abe S, Beppu T, Baba H  
「Single Drain is enough for pancreatic reconstruction after pancreaticoduodenectomy.」  
9th 第14回国際膵臓学会・第41回日本膵臓学会合同会議 2010年7月11日 福岡国際会議場 (福岡県)
  17. Ida S, Ohmuraya M, Hirota M, Nakahara O, Furuhashi S, Abe S, Tanaka H, Horino K, Takamori H, Beppu T, Baba H  
「Cerulein induced acute pancreatitis suppress the mTOR activity.」  
第14回国際膵臓学会・第41回日本膵臓学会合同会議 2010年7月11日 福岡国際会議場 (福岡県)
- 〔図書〕 (計1件)
1. Hashimoto D, Hirota M, Takamori H, Baba H: Autophagy in Pancreatic Diseases, Pancreas: Anatomy, Diseases and Health Implications:90-107, 2012 (Nova Science Publishers, Inc. (USA))
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
石川 晋之 (ISHIKAWA SHINJI)  
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師  
研究者番号: 80419639
- (2) 研究分担者  
馬場 秀夫 (BABA HIDEO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号：20240905

堀野 敬 (HORINO KEI)  
熊本大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：60452900

高森 啓史 (TAKAMORI HIROSHI)  
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師  
研究者番号：90363514