

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 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791321

研究課題名（和文） 悪性胸膜中皮腫に対するオートファジー誘導薬物療法の開発

研究課題名（英文） Anti-tumor effects of autophagy induction in malignant pleural mesothelioma.

研究代表者

朝倉 啓介 (ASAKURA KEISUKE)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：90383786

研究成果の概要（和文）：

悪性胸膜中皮腫は、治療抵抗性の悪性腫瘍であり、新規治療法の開発が求められている。これまで、スタチンの悪性胸膜中皮腫に対する *in vitro* での抗腫瘍効果に関する報告はあるが、その詳細な作用機序については検討されていない。我々は、スタチンが *in vivo* で悪性胸膜中皮腫に対して抗腫瘍効果を持つこと、またオートファジー誘導がその機序に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Malignant pleural mesothelioma is widely resistant to therapies, and new treatment strategies are needed. Recent reports have indicated the potential efficacy of statins against malignant pleural mesothelioma cells *in vitro*. Here we show that lovastatin reduces primary tumor and metastasis in a mouse model of human malignant pleural mesothelioma, and that induction of autophagic changes may at least in part be involved in this process.

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	900,000	270,000	1,170,000
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：悪性胸膜中皮腫、スタチン、オートファジー

1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫は、アスベストが原因で胸膜に発生する予後不良の悪性腫瘍である。アスベスト曝露から悪性胸膜中皮腫の発生までに約 40 年かかることから、本邦においても今後 10 年間に罹患率は上昇しつづけると予測されている。近年の手術・放射線・化学療法による集学的治療の進歩にも関わらずその予後は非常に不良であり、新規治療法の

開発が求められている。

我々は悪性胸膜中皮腫に対する薬物療法の新しい機序としてオートファジーに着目した。オートファジーは本来、飢餓に対する細胞のストレス反応であるが、細胞にオートファジーが誘導されると増殖能・浸潤能が低下することが知られている（静細胞的抗腫瘍効果）。また、既存の生活習慣病治療薬・神経疾患治療薬の中に、静細胞的抗腫瘍効果をもつ薬剤をもつものがあることも分かって

いる。

そこで、複数の候補の中から有望な薬剤として高脂血症治療薬ロバスタチンを選択し、そのヒト悪性胸膜中皮腫細胞に対する抗腫瘍効果について検討を行うこととした。

2. 研究の目的

高脂血症治療薬ロバスタチンの、ヒト悪性胸膜中皮腫に対する抗腫瘍効果を、*in vitro*、*in vivo* で検討し、その作用機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 試薬・細胞株

ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株 ACC-MESO-1 (理研セルバンク) を RPMI1640 培地 (Sigma 社) で培養し、実験には継代回数が 5 回までのものを使用した。脂溶性スタチンであるロバスタチン (Cayman chemical 社) を DMSO に溶解し 10 μ M に調整した。メバロン酸回路の代謝産物である Geranylgeranyl pyrophosphate に細胞内で変化する Geranylgeraniol (BIOMOL 社) を DMSO に溶解して 10 μ M に調整した。オートファジー阻害薬である 3 メチルアデニン (3MA) は Calbiochem 社、ラパマイシンとマイオイノシトールは和光純薬、リコンビナント活性型 Akt1 は Signalchem 社、細胞膜を透過して細胞内で IP3 として作用する 2, 3, 6-Tri-O-Butyryl-myo-Inositol-1, 4, 5-Trisphosphate-Hexakis(acetoxymethyl) Ester (Bt-IP3) は A. G. Scientific 社から入手した。またウェスタンブロットに用いる抗 Rac1 抗体、抗 Pak1 抗体は Sigma 社、抗 LC3B 抗体、抗 β アクチン抗体は Abcam 社、抗 Caspase3、抗 pAkt、抗 pmTOR、抗 p4EBP1 抗体は Cell Signaling Technology 社より入手した。

(2) MTT アッセイ

Cell viability は MTT アッセイにて評価した。MTT アッセイは 3-(4, 5-di-methylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) が生細胞において、紫色に呈色するホルマザリンに代謝されることを利用したアッセイである。MTT は和光純薬より入手した。ACC-MESO-1 細胞を 96 ウェルディッシュに 2000 個/ウェルずつ撒き、翌日に薬剤を含む培地に交換した。48 時間後に MTT アッセイを行った。

(3) 細胞遊走アッセイ

細胞遊走は cell wounding assay にて評価した。100mm ディッシュがコンフルエントになるまで ACC-MESO-1 細胞を培養した。ディッシュの中央に線を引き、その線より一方に付着する細胞をスクレイパーで除去した。薬剤

を 48 時間投与した後に、中央の線を越えて遊走してきた細胞数を ImageJ software の particle analysis 機能を用いて計測した。

(4) アポトーシスアッセイ

アポトーシス誘導は APOPercentage kit (Biocolor 社) を用いて評価した。APOPercentage 色素はディッシュ上でアポトーシス細胞だけを選択的に染める色素である。ACC-MESO-1 細胞に薬剤を 48 時間投与した後に、APOPercentage 色素を加えて、赤色に染まるアポトーシス細胞数を評価した。また Caspase3 のウェスタンブロットにてもアポトーシス誘導を評価した。アポトーシス誘導のポジティブコントロールとして、Hydrogen peroxide (5mM) を用いた。

(5) ウェスタンブロット

ACC-MESO-1 細胞に薬剤を 48 時間投与した後、Extraction buffer (Cell Signaling Technology 社) で細胞を溶解した。遠心分離 (16000g, 15 分, 4°C) で上清を抽出した後、タンパク濃度を Bradford 法で測定した。上清は 10%SDS-PAGE で泳動して、その後 PVDF 膜に転写した。ブロッキングワン (NACARAI TESQUE 社) で非特異的反応を抑制した後、各種一次抗体および抗 β アクチン抗体を室温で 4 時間反応させた。つづいて二次抗体の HRP 標識抗マウス IgG 抗体もしくはウサギ IgG 抗体と室温で 1 時間反応させた。バンドは Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific 社) で化学発光を増幅して検出した。バンドはイメージ J (NIH) で濃度測定を行って数値化し、 β アクチンで標準化した。

(6) GTP 結合型 Ras/ Rac1 アッセイ

GTP 結合型の Ras および Rac1 を EZ-detect Ras activation kit と Rac1 activation kit (Thermo Scientific 社) を用いて測定した。測定原理は、GTP 結合型の GTPase のみが下流のエフェクタータンパク質と結合することを利用し、免疫沈降で GTP 結合型 GTPase のみを分離するものである。

(7) 細胞分画アッセイ

ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem 社) を用いて細胞内タンパク質を細胞質分画と細胞膜分画に分離して、ウェスタンブロットを行った。

(8) Rac1 の免疫沈降

1000 μ g のタンパク質を含む細胞溶解液を用意した。Protein A セファロース・ビーズ (Sigma 社) と 1 μ g の抗 Rac1 抗体、radioimmunoprecipitation assay buffer を 4°C で 3 時間インキュベートした。これに細

胞溶解液を添加し、4°Cで一晩インキュベートした。Lysis buffer で3回洗浄した後、SDS-PAGE サンプルバッファーに溶出し、SDS-PAGE で泳動した。抗 Pak1 抗体によるウェスタンブロットを行い、Rac1 に結合している Pak1 を定量した。

(9)免疫染色

後述する方法で NOG マウスに移植した ACC-MESO-1 腫瘍を摘出し、ホルマリン固定した。パラフィン包埋し、5 μm に薄切した。免疫染色は一般的な酵素抗体法にて行った。一次抗体は、抗 Beclin1 抗体 (Santa Cruz 社)、抗 LC3A 抗体 (Sigma 社) を用いた。

(10)透過電子顕微鏡

薬剤を投与した細胞を PBS で洗浄した後 2% グルタルアルデヒドを含む 0.1M Sodium phosphate buffer (pH7.4) で固定した。その後、1% Osmium tetroxide (pH7.2) にて 4°C で 2 時間固定した。エタノールで脱水した後に Quetol 812 epoxy resin (日清 EM 社) に包埋した。Ultratome III (LKB 社) を用いて 90nm に超薄切したのちに 1% 酢酸ウラニルとクエン酸鉛にて染色した。JEM-1200EX 電子顕微鏡 (JEOL 社) で撮影した。

(11) ACC-MESO-1 細胞の NOG マウス胸腔内移植モデル

オスの NOD/SCID/γ null マウス (NOG マウス) を実験動物中央研究所より入手し、無菌環境で飼育した。10 週齢の NOG マウスをケタミン/キシラジン筋注により麻酔し、左側胸部を除毛・消毒した。皮膚・皮下組織・筋肉を 1cm 長切開し、胸膜を露出した。肺を穿刺しないように注意しつつ左胸腔内に ACC-MESO-1 細胞 (107 個) を 23G 針で注入した。胸壁は縫合閉鎖した。翌日からコントロール群 (n=10) に DMSO (5 mg/kg) を週 3 回、8 週間腹腔内注射した。ロバスタチン群には DMSO に溶解したロバスタチン (12.5 mg/kg) を週 3 回、8 週間腹腔内注射した。8 週間後に NOG マウスを犠牲死させ、胸腔内の腫瘍の重量を計測し、腫瘍の一部をホルマリン固定した。

4. 研究成果

(1) ロバスタチンは、NOG マウスに移植した ACC-MESO-1 腫瘍の増殖を抑制した。

NOG マウスの左胸腔内に ACC-MESO-1 細胞を移植して 8 週間後に、左胸腔内 (原発巣) および右胸腔内 (転移巣) に腫瘍形成を認めた。ロバスタチン投与により、腫瘍の増殖は原発巣、転移巣ともに有意に抑制された。

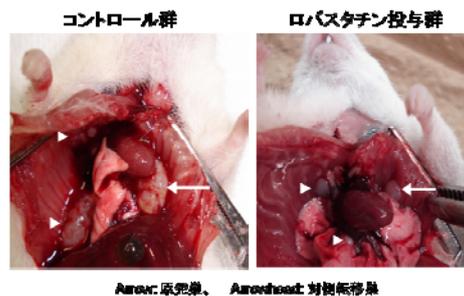


図1 ヒト悪性胸膜中皮腫 NOGマウス胸腔移植モデル

(2) ロバスタチンは、in vitro にて ACC-MESO-1 細胞の viability および遊走を抑制したが、アポトーシスは誘導しなかった。MTT アッセイにおいて、10 μM ロバスタチンの 48 時間投与は ACC-MESO-1 細胞の viability を有意に抑制した。また、wounding assay においてロバスタチンは ACC-MESO-1 細胞の遊走を有意に抑制した。しかし、APOPercentage kit を用いたアッセイ、Cleaved caspase-3 のウェスタンブロットティングにおいて、ロバスタチンの ACC-MESO-1 細胞に対するアポトーシス誘導は認めなかった。

(3) ロバスタチンは、in vitro および in vivo において ACC-MESO-1 細胞にオートファジーを誘導した。

In vitro で ACC-MESO-1 細胞にロバスタチンを投与すると、細胞は球状に形態変化し (rounding)、培養皿底面から剥脱した。また光学顕微鏡にて細胞質内に空胞形成を認めた。これらの形態変化とアポトーシス誘導の欠如から、我々は cell viability および細胞遊走の低下にオートファジーが関与している可能性を考えた。電子顕微鏡にて、ロバスタチンを投与した ACC-MESO-1 細胞を観察したところ、細胞質内に多数のオートファジー空胞を認めた。また、ウェスタンブロットにて代表的なオートファジーマーカーである LC3B-II/LC3B-I 比の増加、LC3B-II/β アクチン比の増加を認めた。さらにロバスタチンによる LC3B-II 発現の増加は、オートファジー阻害薬である 3-メチルアデニン (3MA) の同時投与により抑制された。ロバスタチンによる cell viability の低下、細胞遊走の低下も 3MA の同時投与により抑制された。これらの結果より、ロバスタチンによる cell viability と細胞遊走の低下にはオートファジーが関与していると考えられた。また、NOG マウスに移植した ACC-MESO-1 腫瘍においても、ロバスタチン投与群においてオートファジーマーカーである LC3A と Beclin1 免疫染色陽性細胞の増加を認めた。In vitro にて、

ロバスタチンによる ACC-MESO-1 細胞の cell viability 低下、遊走能低下、オートファジー誘導は、Geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) の同時投与によって抑制された。GGPP は Rho GTPases の活性化に必要なメバロン酸回路の代謝産物であり、ロバスタチンの抗腫瘍効果に Rho GTPases が関与している可能性が示唆された。

(4) ロバスタチンは、ACC-MESO-1 細胞において Rac1 の膜移行を阻害した。

つづいて代表的な Rho GTPase である Rac1 に対するロバスタチンの作用について検討した。Rac1 は GDP 結合型で細胞質に局在しているときは不活性化型であり、GTP 結合型に変化して細胞膜に局在すると活性化して Pak1 と結合、下流にシグナルを伝達するとされている。ロバスタチンを投与した ACC-MESO-1 細胞においては GTP 結合型の Rac1 が増加した。しかし、細胞膜に局在する Rac1 はむしろ減少し、下流のエフェクター因子である Pak1 との結合も減少した。以上により、ロバスタチンは Rac1 の活性を阻害したと考えられた。

Rac1 は Akt を活性化することが知られている。ロバスタチン投与により ACC-MESO-1 細胞内のリン酸化 Akt は減少し、GGPP の同時投与によりリン酸化 Akt レベルは保たれた。しかし、リコンビナント・リン酸化 Akt を同時投与しても、ロバスタチンによる cell viability 低下を阻害することはできなかった。また、Akt の下流にある代表的なオートファジー制御因子である mTOR や 4EBP1 のリン酸化状態にはロバスタチン投与により変化を認めなかった。さらに、mTOR 活性を阻害するラパマイシンを ACC-MESO-1 細胞に投与しても、cell viability に変化はなかった。以上の結果より、ロバスタチンによるオートファジーは Akt/mTOR 経路とは無関係と考えられた。

(5) ロバスタチンは、ACC-MESO-1 細胞にイノシトール 3 リン酸を介してオートファジーを誘導した。

ACC-MESO-1 細胞にロバスタチンと同時にイノシトール 3 リン酸 (IP3) を投与すると、ロバスタチンによるオートファジー誘導、cell viability 低下、遊走低下は抑制された。一方で IP3 の前駆物質であるイノシトールを同時投与しても、ロバスタチンの効果を抑制することはできなかった。以上より、ロバスタチンがイノシトールから IP3 への転換を阻害している可能性が示唆された。その反応を司る酵素 Phospholipase C beta2 (PLC-beta2) は、Rac1 と結合して細胞膜に移行することで活性化する。ロバスタチンの投与により ACC-MESO-1 細胞の細胞膜に局在する

PLC-beta2 は低下した。さらにロバスタチンと GGPP を同時投与することで細胞膜の PLC-beta2 量はコントロール群と同レベルに戻った。以上より、ロバスタチンによる ACC-MESO-1 細胞へのオートファジー誘導は、少なくとも部分的に、Rac/ PLC/ IP3 経路を介したものと考えられた。

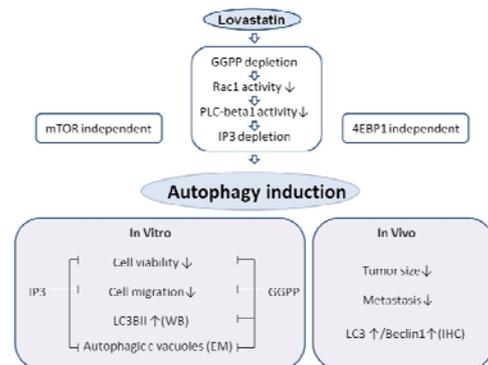


図2 ロバスタチンの抗腫瘍効果の機序

【考察】

スタチンの in vitro、in vivo での癌に対する増殖抑制効果、アポトーシス誘導効果、遊走浸潤抑制効果に関して、これまでに多くの報告がある。臨床試験では、スタチン単剤での抗腫瘍効果を証明したものはないが、肝細胞癌に対して抗がん剤との併用で MST が延長したとの報告 (Ⅲ相試験) がある。発がん予防の観点では、肺癌、大腸癌、前立腺がんのリスクを減少させるとの報告がある。しかし、スタチンの悪性胸膜中皮腫に対する抗腫瘍効果に関してはこれまでほとんど報告がなかった。理由のひとつとして、適当な動物モデルがなかったことが考えられる。我々が作成した ACC-MESO-1 細胞の NOG マウス胸膜移植モデルでは、過去に報告された動物モデルに比べて早期に腫瘍形成・転移巣形成が認められ、ヒト悪性胸膜中皮腫の in vivo 実験に有用なモデルになると考えた。

本研究で、ロバスタチンの ACC-MESO-1 細胞に対する静細胞的抗腫瘍効果は、Rac1 のゲラニルゲラニル化阻害、IP3 産生抑制を介したオートファジー誘導によるものと示唆された。本来オートファジーは細胞生存のためのストレス反応であるが、過剰なオートファジーは細胞死に至ることも分かっている。また、オートファジーは腫瘍細胞をいわゆる Tumor dormancy の状態に導き、転移を抑制するとも言われている。しかし、ひとたび腫瘍がオートファジーを脱すれば、更に悪性度の高い表現型を獲得する可能性もあり、オートファジー誘導の腫瘍細胞に対する影響は両義的なものと考えられる。

スタチンによるオートファジー誘導については近年いくつかの報告がみられる。本研究においては、ACC-MESO-1 に対するオートファジー誘導は mTOR 非依存性であることが示唆された。最近、mTOR 非依存性オートファジー誘導について主に神経変性疾患研究の分野で報告が見られるようになった。この経路は細胞内イノシトールおよび IP3 濃度の変化、細胞内カルシウムイオン濃度の変化を介したものである。ホスホリパーゼ C は IP2 から IP3 とジアシルグリセロールを産生する酵素である。ホスホリパーゼ C の活性化には Rho GTPases が関与している。我々は、ロバスタチンがホスホリパーゼ C 活性低下と IP3 濃度低下を介してオートファジーを誘導している、との仮説を立てた。実際に、ロバスタチンを投与すると細胞膜局在型ホスホリパーゼ C- $\beta 2$ が減少した。また、IP3 を同時投与するとロバスタチンによるオートファジー誘導は抑制された。

mTOR 非依存性オートファジーを誘導する薬剤には様々なものがあり、これらの研究はおもに神経芽腫、褐色細胞腫、腎細胞などを用いて行われている。これらの mTOR 非依存性オートファジー誘導薬が、既存の殺細胞性抗腫瘍薬との併用で、十分な抗腫瘍効果を示す可能性はある。今後、悪性胸膜中皮腫細胞株を用いてそれらの薬剤の効果を検討することが必要である。

Rac1 などの Rho GTPases は細胞の遊走・浸潤に関与している。本研究においては、オートファジー阻害薬である 3MA の同時投与でもロバスタチンによる ACC-MESO-1 の遊走能低下が抑制された。このことはオートファジー誘導そのものが細胞遊走を阻害することを示唆している。

GGPP の同時投与により、ロバスタチンによる cell viability 低下はほぼ完全に抑制されたが、細胞遊走能低下は部分的にしか戻らなかった。これは、スタチンの抗腫瘍効果が、メバロン酸回路の抑制によるものだけではなく、Histone deacetylase (HDAC) 抑制など他の経路を介した作用もあるためであろう。近年、スタチンが HDAC 抑制作用をもつとの報告もみられる。HDAC 阻害薬はオートファジーを介して、抗腫瘍効果をもつとの報告もある。

本研究にて用いられたロバスタチンの投与量は、臨床で高脂血症治療薬として使用される濃度よりもかなり高いものである。しかし、本研究の意義はスタチンの抗腫瘍効果の作用機序を明らかにしたことであり、将来より選択的な作用点をもつ薬剤の開発がなされれば、副作用も軽減し臨床応用も可能になるであろう。

【結論】

スタチンの悪性胸膜中皮腫に対する抗腫

瘍効果についてはこれまで詳細に検討されたことはなかった。我々はロバスタチンがヒト悪性胸膜中皮腫細胞株 ACC-MESO-1 細胞に対してオートファジーを誘導すること、そしてこれが少なくとも一部は Rac/PLC/IP3 経路を介したものであることを明らかにした。

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 2 件)

(1) Asakura K, Izumi Y, Yamamoto M, Yamauchi Y, Kawai K, Serizawa A, Mizushima T, Ohmura M, Kawamura M, Wakui M, Adachi T, Nakamura M, Suematsu M, Nomori H. The cytostatic effects of lovastatin on ACC-MESO-1 cells. J Surg Res. 2011 Oct;170(2):e197-209. Epub 2011 Jul 19.

(2) Yamauchi Y, Izumi Y, Asakura K, Fukutomi T, Serizawa A, Kawai K, Wakui M, Suematsu M, Nomori H. Lovastatin and valproic acid additively attenuate cell invasion in ACC-MESO-1 cells. Biochem Biophys Res Commun. 2011 Jul 1;410(2):328-32. Epub 2011 Jun 6.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝倉 啓介 (ASAKURA KEISUKE)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：90383786