

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462062

研究課題名(和文) 消化器癌の発育進展に関与する脂質代謝メカニズムの解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Clarification of the lipid metabolism concerning progression of gastrointestinal cancer, followed by developing new therapy.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：高脂血症治療薬であるスタチンが有する大腸癌細胞株に対する抗腫瘍効果はスタチンの種類に異なり、そのメカニズムはメバロン酸カスケード(スタチンの主要経路)とは関連がなく、DNAのメチル化に関連する分子、EZH2の発現低下とそれに伴うp27の発現増加によるものであることを発見した。この経路を選択的に抑制すると、相乗的な抗腫瘍効果が発揮され、新規治療法開発の一助となりえる成果を認めた。

スタチンのEZH2発現調節機構は不明だが、スタチン投与後に細胞増殖に関わる分子の動きと殺細胞数との関連から、スタチンが2通りのキナーゼ阻害作用を有する可能性が示唆され、これらの経路を標的にした新規治療法開発中である。

研究成果の概要(英文)： We have found out that the anti-tumor effect of statins (a therapeutic drug for hyperlipidemia) against colon cancer cell lines was different to the type of statin. We also discovered that this mechanism was not related to the mevalonate cascade (the major pathway of statins) but associated with the decrease expression of EZH2 (a molecule related to DNA methylation) that were found to be due to increased expression of p27.

Though the mechanism how statins regulate EZH2 expression is unknown, from the relation between the number of cells killed by statin administration and the expression level of the molecules involved in cell proliferation by statin administration, the possibility that statins have dual kinase inhibitory effect are suggested. We are now investigating a new treatment strategy by targeting this pathway.

研究分野：消化器外科

キーワード：スタチン 大腸癌 EZH2 HDAC5 p27 MEK/ERK

1. 研究開始当初の背景

これまでの研究成果から、コレステロール合成経路が大腸癌の浸潤・転移機構と関連があることが判明した。大腸癌の危険因子として食事の欧米化や肥満が上げられ、現代日本人の大腸癌罹患患者数が増加していると考えられているが、これまで体重増加や肥満と大腸癌とを結びつける明確な根拠はなかった。

2. 研究の目的

脂質代謝経路とがん浸潤転移機構の関連を解明、その経路をターゲットとした新規治療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

高コレステロール血症治療薬(スタチン)内服状況と消化器癌予後との関連を検討した。多施設共同で症例を蓄積し、スタチン内服群、非内服群の2群に分け、臨床病理学的因子や予後の相違を検討した。

6種類の大腸癌細胞株と4種類のスタチンを使用し、スタチン投与による抗腫瘍効果の確認を cell counting kit で施行した。スタチンの主要経路であるメバロン酸カスケードに関連する分子の発現状況なども RT-PCR、Western blotting で施行した。Epigenetic molecule のスクリーニングを RT-PCR で施行し、スタチンの持つ抗腫瘍効果のメカニズムを解明した。

Killing assay を用い、上記経路をターゲットにした新規治療法を開発した。

4. 研究成果

大腸癌切除症例 742 例のうち、スタチン内服群は 61 例、非内服群は 681 例であった。スタチン内服群は非内服群に比べ、有意に大腸癌の OS、DFS とともに生存率が良好であった。

6種類の大腸癌細胞株に4種類のスタチンを投与し、killing assay を施行したところ、pravastatin には抗腫瘍効果が認められなかった。スタチンの主要経路であるメバロン酸カスケードの中で、鍵となる分子は SREBP2 であり、この分子が核内移行を確認すれば、スタチンの主たる薬効であるコレステロール合成阻害が発揮されていることがわかるため、スタチン投与前後で SREBP2 の核内移行を検討したところ、pravastatin でもこの現象が認められた。つまり、in vitro では pravastatin はコレステロール合成阻害左葉は他のスタチン同様に発揮されるが、抗腫瘍効果は発揮されていないと結論付けられた。そこで臨床データを確認したところ、スタチン内服群で再発を認めた症例は全て pravastatin 内服症例であった。つまり、他のスタチン内服症例は1例も再発を認めていなかった。このことは、in vitro の検討の検

討が、臨床症例でも同様であることの証明となった。つまり、スタチンの持つ抗腫瘍効果はメバロン酸カスケードとは関連がないという発見になった。

スタチンの抗腫瘍効果がメバロン酸カスケードと関連がないとなると、どういうメカニズムなのか、全く報告がなかった(これまでの報告は全てメバロン酸カスケードと関連付けられていた)。そこで、epigenetic molecule をスクリーニングすることとした。HDAC family を中心にスクリーニングしたところ、スタチン投与(simvastatin)により DNA メチル化に関連する分子である、EZH2 の発現低下と HDAC5 の発現増加を認めた。また、EZH2 発現低下に伴い、p27 の発現増加が認められ、大腸癌細胞株に対するスタチンの抗腫瘍効果のメカニズムと考えられた。さらに、大腸癌切除標本を使用し、EZH2 と p27 の免疫染色を行ったところ、スタチン非内服群と pravastatin 内服群では、癌部の EZH2 発現(+) と p27 発現(-)を認めたが、スタチン内服症例(pravastatin 以外)では、癌部で EZH2 が染まる部位は p27 は染まらず、EZH2 が染まらない部位は p27 が染まるという現象を認めた。これは、in vitro での結果が臨床検体で確認されたことを証明するものであり、スタチン内服(pravastatin 以外)による大腸癌再発抑制のメカニズムが EZH2 の発現低下とそれに伴う p27 発現増加によるものであることが証明されたことになる。

スタチン投与(simvastatin)による HDAC5 発現増加のメカニズムは、feed back であった。つまり、EZH2 の発現が低下してしまい、DNA のメチル化を保つために、癌細胞は HDAC5 を発現していたのである。そこで、simvastatin と Class の HDAC inhibitor とを併用し、killing assay を行ったところ、相乗的な抗腫瘍効果が発揮された。つまり、スタチン投与で EZH2 を抑えたことで、HDAC5 が発現してくるところを HDAC inhibitor で抑え込むことになるため、それぞれ単独投与を行うよりも相乗的な抗腫瘍効果に至ったものと考えられた。これは、大腸癌に対する新規治療法開発につながる結果である。

他の癌腫での検討も行われた。肝細胞癌の症例でも同様にスタチン内服群と非内服群、さらに、pravastatin 内服症例を除いた症例で検討したところ、大腸癌の場合と同様の結果が得られた。つまり、少なくとも、大腸癌、肝細胞癌においては、pravastatin 以外のスタチンを内服している症例の予後は良好であったといえる(肝細胞癌に関しては未発表)。

スタチン(pravastatin 以外)の EZH2 発現調節機構はまだ不明のままのため、大腸癌細胞増殖に関連する分子の動きを検討した。候

補として、MEK/ERK 経路を考え、Simvastatin と、MEK inhibitor (U0126) を4つの細胞株に投与し、EZH2、p-ERK、p27の発現を検討した。全ての細胞株で、U0126投与で simvastatin と同様に、EZH2、p-ERK の抑制と、p27 の発現上昇を認めた。つまり、simvastatin による EZH2 の発現低下は MEK/ERK 経路のリン酸化阻害によると思われる。ところが、growth assay をしてみると、不思議なことに増殖抑制効果に違いが認められた。DLD1 と HCT116 では、U0126 による増殖抑制効果は simvastatin より弱く、HT29 と SW620 では U0126 による増殖抑制効果は simvastatin より強いという結果であった。Western では明らかに U0126 による MEK/ERK 系の抑制が強く、p27 の発現も強いにも関わらず、このような乖離がみられた。恐らく、HT29 と SW620 の増殖に関わるシグナル伝達経路は MEK/ERK 経路が主なのだろうが、DLD1 と HCT116 では別な経路が関連しており、simvastatin はその経路をも抑制しているようである。その候補として、Akt/PKB 経路を考え、DLD1 と HCT116 で p-Akt を検討した。Simvastatin 投与で、p-Akt (Ser473)、p-Akt (Thr308)の両者とも抑制された。これらから、simvastatin には ERK inhibitor と Akt inhibitor の両方の機能がある可能性が示唆された (dual kinase inhibitor)。これらの経路を標的にした新規治療法の可能性を検討中である。

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 1 件)

Ishikawa S, Hayashi H, Kinoshita K, Abe M, Kuroki H, Tokunaga R, Tomiyasu S, Tanaka H, Sugita H, Arita T, Yagi Y, Watanabe M, Hirota M and Baba H.
Statins inhibit tumor progression via an enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)-mediated epigenetic alteration in colorectal cancer.
Int J Cancer. 2013 Dec 17. doi: 10.1002/ijc.28672

[学会発表](計 10 件)

大内繭子、坂本快郎、徳永竜馬、玉置裕香、糸山明莉、江藤二男、黒田大介、中村健一、小澄敬祐、原田和人、志垣博信、藏重淳二、岩槻政晃、馬場祥史、宮本裕士、吉田直矢、馬場秀夫、「大腸癌での

adenoma-carcinoma sequence における EZH2 発現の変化」第 26 回日本消化器癌発生学会総会、2015 年 11 月 20 日、米子全日空ホテル(鳥取県・米子市)

Mayuko Ohuchi, Yasuo Sakamoto, Kenichi Nakamura, Keisuke Kosumi, Ryuma Tokunaga, Kazuto Harada, Hironobu Shigaki, Junji Kurashige, Masaaki Iwatsuki, Yoshifumi Baba, Yuji Miyamoto, Naoya Yoshida, Hideo Baba, "Prognostic impact of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) in patients underwent hepatectomy for colorectal liver metastases who received preoperative oxaliplatin-based chemotherapy." 3rd International Conference of Federation of Asian Clinical Oncology(FACO), 2015 年 10 月 29 日, 国立京都国際会館(京都府・京都市)

東孝暁、林洋光、甲斐田剛圭、有馬浩太、高城克暢、岡部弘尚、新田英利、橋本大輔、近本亮、別府透、馬場秀夫、「スタチンは TAZ を抑制して肝細胞癌に対する抗腫瘍効果を発揮する」第 24 回日本がん転移学会学術集会・総会、2015 年 7 月 23 日、シティプラザ大阪(大阪府・大阪市)

東孝暁、林洋光、武山秀晶、甲斐田剛圭、岡部弘尚、新田英利、橋本大輔、近本亮、別府透、馬場秀夫、「肝細胞癌に対するスタチンの抗腫瘍効果の検討」第 70 回日本消化器外科学会総会、2015 年 7 月 16 日、アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)

Mayuko Ohuchi, Yasuo Sakamoto, Ryuma Tokunaga, Kenichi Nakamura, Yuki Kiyozumi, Daisuke Izumi, Keisuke Kosumi, Kazuto Harada, Junji Kurashige, Yukiharu Hiyoshi, Shiro Iwagami, Yoshifumi Baba, Yuji Miyamoto, Naoya Yoshida, Hideo Baba, "Prognostic impact of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) in patients underwent hepatectomy for colorectal liver metastases who received preoperative oxaliplatin-based chemotherapy." AACR Annual Meeting 2015, 2015 年 4 月 20 日, Pennsylvania Convention Center (Pennsylvania, USA)

東孝暁、林洋光、武山秀晶、有馬浩太、

甲斐田剛圭、高城克暢、坂本慶太、坂田和也、岡部弘尚、新田英利、橋本大輔、近本亮、**別府透**、馬場秀夫、「スタチン内服による肝細胞癌に対する肝切除後再発抑制効果に関する検討」、第115回日本外科学会定期学術集会、2015年4月18日、名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）

徳永竜馬、中川茂樹、坂本快郎、今村 裕、石本崇胤、岩上志朗、馬場祥史、宮本裕士、吉田直矢、馬場秀夫、「大腸癌肝転移症例における EZH2 発現と術前化学療法との関連」、第69回日本消化器外科学会総会、2014年7月17日、郡山総合体育館（福島県・郡山市）

石川晋之、木下浩一、阿部道雄、田中 洋、富安真二郎、杉田裕樹、有田哲正、八木泰志、廣田昌彦、馬場秀夫、「大腸癌術後補助療法としてのスタチンの導入」、第68回日本消化器外科学会総会、2013年7月17日、シーガイアコンベンションセンター（宮城県・宮崎市）

石川晋之、木下浩一、阿部道雄、徳永竜馬、田中 洋、富安真二郎、杉田裕樹、有田哲正、八木泰志、廣田昌彦、馬場秀夫、「大腸癌術後補助療法としてのスタチンの可能性とそのメカニズム」、第113回日本外科学会定期学術集会、2013年4月11～13日、福岡国際会議場（福岡県・福岡市）

中川茂樹、岡部弘尚、坂本快郎、坂本慶太、黒木 秀幸、今井克憲、新田英利、林洋光、橋本大輔、生田義明、近本亮、石河隆敏、**渡邊雅之**、**別府透**、馬場秀夫、「胆管癌において EZH2 は p16INK4A、p27KIP1 を制御し、癌の進展に関与する」、第113回日本外科学会定期学術集会、2013年4月11日、福岡国際会議場（福岡県・福岡市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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

別府 透 (BEPPU, Touru)
熊本大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：70301372

渡邊 雅之 (WATANABE, Masayuki)
公益財団法人がん研究会・その他部局等・食道担当部長
研究者番号：80254639

(3) 研究協力者

徳永 竜馬 (TOKUNAGA, Ryoma)
熊本大学・大学院生命科学研究部・大学院生

東 孝暁 (HIGASHI, Takaaki)
熊本大学・大学院生命科学研究部・大学院生

大内 繭子 (OHUCHI, Mayuko)
熊本大学・大学院生命科学研究部・大学院生