

学 位 論 文 要 旨

氏名 石川 拓郎

題 目：ヒト・イヌがん細胞株に対するスタチン系薬剤の制がん効果の解析およびその感受性
識別因子の比較腫瘍学的検討

論文要旨：

がん細胞は、その持続的な増殖や、浸潤・転移などの活発な活動のため、正常細胞より多くの生体分子やエネルギーを必要とする。これに適応するため、がん細胞は代謝リプログラミングにより、正常細胞とは異なる状態をとる。コレステロール代謝の変化はその一つであり、複数のがん細胞において、細胞内コレステロール合成系であるメバロン酸経路が異常に活性化することが知られている。腫瘍の成長においてメバロン酸経路が重要な役割を果たすことから、近年、メバロン酸経路の阻害剤であるスタチン系薬剤のがん治療への応用に向けた研究が進んでいる。複数の疫学研究によりスタチン服用とがん関連死亡率の低下との相関が明らかとなっており、これを裏付けるように多くの *in vitro* および *in vivo* 研究でスタチンの多面的な抗腫瘍効果が報告されている。しかしながら、スタチンはすべてのがん細胞に効果を発揮するわけではなく、スタチンが効きやすいがん細胞（感受性株）と効きにくいがん細胞（耐性株）が存在することが分かっている。がん細胞におけるスタチン感受性の違いが何に起因するものなのかは未だ不明であり、個別化医療が進む現代のがん治療において、治療対象の腫瘍がスタチン適応か否かを識別するバイオマーカーの確立が重要な課題である。また、スタチンのがん治療応用に向けた研究は医学領域で盛んに行われているものの、獣医学領域ではほとんど進んでいないのが現状である。医療・獣医療の双方におけるがん治療にスタチンを応用することを目指し、本研究ではヒトおよびイヌがん細胞株を用いて、スタチンの制がん効果およびその感受性に関わる因子の解析を行なった。

I 章では、スタチン耐性株と感受性株の違いを見出すべく、ヒトがん細胞株を用いてコレステロール代謝に関わる HMG-CoA 還元酵素 (HMGCR) および低比重リポタンパク質受容体 (LDLR) に対する依存度を耐性株—感受性株間で比較した。さらに、耐性株に対するスタチンの増殖抑制効果を増強する併用療法について検討した。スタチン添加時に誘導される HMGCR および LDLR 発現量の上方調節能の解析では、耐性株、感受性株いずれもスタチン濃度依存的な両遺伝子発現量の増加傾向がみられ、これらの遺伝子の上方調節機構が耐性をもたらすわけではないことが示唆された。両細胞株のメバロン酸経路への依存度の解析により、感受性株は耐性株に比べて本経路への依存度が高く、とくにゲラニルゲラニル二リン酸 (GGPP) がその生存に重要であることを明らかにした。さらに、スタチン耐性の克服につながる有効な併用療法として、HMGCR の発現抑制が耐性株に対するスタチンの増殖抑制効果を増強することを示した。

II 章では、医学領域において先行するスタチンの抗腫瘍効果に関する研究成果を、獣医学領域に応用することを目的として、イヌがん細胞株におけるスタチンの制がん効果およびその感受性と相関する因子について比較腫瘍学的検討を行なった。その結果、スタチンはイヌがん細胞株に対して増殖抑制効果を発揮するが、その感受性は細胞により様々であることが分かった。ヒトでの報告と同様に、イヌがん細胞においても上皮系/間葉系という形質の違いがスタチン感受性と相関しており、スタチンは間葉系がん細胞の増殖を優先的に阻害することを明らかにした。とくに、スタチン感受性の高い細胞では、上皮間葉転換 (EMT) を誘導する因子である *ZEB1/2* の発現量が顕著に高いことから、その感受性を予測するバイオマーカー候補として、*ZEB1/2* が有用である可能性を示した。しかしながら、感受性株の *ZEB2* を発現抑制してもスタチン耐性を獲得することはなかったことから、*ZEB1/2* の高発現は感受性株の特徴ではあるものの、それ自体がスタチン感受性をもたらすわけではないことが明らかとなった。

本研究では、ヒト・イヌがん細胞株を用いてスタチンの制がん効果、およびその感受性に関わる因子の解析を行なった。ヒト・イヌいずれにおいても、スタチンは間葉系がん細胞の増殖を優先的に阻害することが分かった。一般に、EMT により間葉系へと変化したがん細胞は、浸潤・転移につながる細胞運動性の亢進、薬剤耐性の獲得、およびがん幹細胞化などを起こし、悪性度を増すことが知られる。すなわち、間葉系がん細胞に効果を発揮するスタチンは悪性度の高いがんに対する有効な治療薬になると考えられる。また、*in vitro* における結果はヒトとイヌとで類似しており、それぞれの細胞株で得られた知見を相互に活用できることが示唆された。このような比較腫瘍学的検討により得られた結果は医療・獣医療双方の発展に寄与するものと期待される。

学位論文審査の結果の要旨

氏名	石川 拓郎
審査委員	主査：鳥取大学 准教授 割田 克彦
	副査：鳥取大学 教授 保坂 善真
	副査：山口大学 教授 加納 聖
	副査：鳥取大学 教授 森田 剛仁
	副査：鳥取大学 准教授 樋口 雅司
題目	ヒト・イヌがん細胞株に対するスタチン系薬剤の制がん効果の解析およびその感受性識別因子の比較腫瘍学的検討
<p>審査結果の要旨：</p> <p>石川 拓郎 氏の博士課程における研究は、既存薬再開発の 1 つとして注目されている脂質異常症治療薬スタチンを、がん治療に応用することを目的としている。具体的には、スタチンの制がん効果を増強する併用療法を検討、ならびにヒトとイヌのがん細胞を用いてスタチン感受性を予測するバイオマーカーについて比較腫瘍学的検討を行なったものである。</p> <p>スタチン系薬剤は血中コレステロール値の低下薬としてその有用性が証明され、1980 年代以降、脂質異常症の患者に広く使用されている。一般に、がんは脂質代謝が盛んであることから、スタチンによりがん細胞のコレステロール合成系を阻害することで、がん細胞の増殖を抑えられることが期待される。一方で、先行研究に着目すると、スタチンによる制がん効果は、がん細胞種によってかなりの差があることが報告されている。同じ肺がん由来の細胞であっても、スタチンがよく効くもの（感受性株）と、まったく効かないもの（耐性株）が存在し、どのようながん細胞にスタチンが有効なのか、具体的な特徴が不明であった。この課題を解決するため、博士学位論文の第 I 章では、スタチン感受性株と耐性株の違いを見出すべく、コレステロール合成系（メバロン酸経路）の律速酵素であるヒドロキシメチルグルタリル CoA 還元酵素（HMGCR）、および細胞外からのコレステロールの取り込みに関与する低密度リポタンパク質受容体（LDLR）への依存度を解析した。研究の開始当初の仮説として、これらの因子のアップレギュレーションがスタチン耐性がん細胞の特徴ではないかと想定していたが、予想に反して両因子は、スタチン感受性株・耐性株ともにスタチン濃度依存的な発現の増加がみられた。これらの結果から、がん細胞のスタチン感受性は、細胞内コレステロールの枯渇に起因するものではないと考えられた。続いて、スタチン感受性株と耐性株のメバロン酸経路への依存度を比較するため、スタチンを処置したがん細胞にメバロン酸</p>	

経路の各種中間産物の添加を試みた。その結果、スタチンに感受性を示すがん細胞では、低分子 G タンパクの脂質修飾（ファルネシル化）に必要なゲラニルゲラニルニリン酸（GGPP）とファルネシルニリン酸（FPP）が枯渇していることが明らかとなった。さらに、HMGR 遺伝子の siRNA を用いた実験から、スタチンの制がん効果を増強する併用療法として、HMGR の発現を抑制する薬剤が有効であることを示した [Ishikawa *et al.*, 2018, *Oncotarget*, 9: 29304-29315]。

第 II 章では、現在、人医学領域において先行するスタチンの抗腫瘍効果に関する研究成果を、獣医学領域にも応用することを目的として、11 種類のイヌのがん細胞株（乳がん 2 種、扁平上皮がん 3 種、肺がん 3 種、およびメラノーマ 3 種）におけるスタチンの制がん効果およびその感受性と相関するバイオマーカーについて比較腫瘍学的検討を行った。その結果、イヌのがん細胞株に対してもスタチンは顕著な増殖抑制効果を発揮することが示されたが、その感受性の程度はがん細胞種により様々であった。ヒトにおける報告と同様に、イヌのがん細胞においても上皮系/間葉系の形質の違いがスタチン感受性と大きく相関しており、スタチンは間葉系がん細胞の増殖を優先的に阻害することを明らかにした。とくに、スタチンに対し感受性の高いがん細胞では、Zinc finger E-box-binding homeobox (ZEB) 遺伝子の発現量が顕著に高いことから、スタチン感受性を予測するバイオマーカーの候補として、ZEB 遺伝子の発現の有無が有用であることを示した。これらの結果は、スタチン耐性のバイオマーカーである E-カドヘリンの発現情報に、ZEB の発現情報を加えることで、よりの確なスタチン感受性の判定が可能となることを意味している。さらに、ZEB2 遺伝子の siRNA を用いた解析から、ZEB2 タンパクを低下させる薬剤とスタチンとの併用療法が相乗的な増殖抑制効果をもたらす可能性があることを示した [Ishikawa *et al.*, 2021, *Vet. Comp. Oncol.*, doi: 10.1111/vco.12778, in press]。

以上の研究成果は、スタチンに対し異なる感受性を示すがん細胞の細胞特性を多角的に解明したものであり、スタチンのがん治療への応用に重要な基礎的知見を提供するものである。本研究によって明らかにしたがん細胞の細胞特性とスタチンの制がん効果に関する知見は、腫瘍生物学の発展に大いに寄与するものであり、今後ますます高まっていく既存薬再開発の一翼を担うものと考えられる。

以上により、本論文は博士（獣医学）の学位論文に値する価値があることを認める。