

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

山口大学大学院連合獣医学研究科

石川 拓郎

2022年3月

目次

緒論	1
第 I 章 スタチン耐性株—感受性株間のメバロン酸経路依存度の比較およびスタチンの制がん効果を増強する併用療法の検討	4
1. 背景	5
2. 材料と方法	7
(1) 細胞培養	7
(2) <i>HMGCR</i> および <i>LDLR</i> 発現量の解析	7
(3) siRNA による遺伝子発現抑制	8
(4) 免疫細胞化学染色	8
(5) ウェスタンブロッティング	9
(6) メバロン酸経路中間産物の添加実験	10
(7) <i>HMGCR</i> および <i>GGPS1</i> siRNA 導入時におけるスタチン感受性試験	11
(8) 統計学的解析	11
3. 結果	12
(1) スタチン添加による <i>HMGCR</i> および <i>LDLR</i> 発現量の変化	12
(2) 各細胞株の <i>HMGCR</i> および <i>LDLR</i> に対する依存度の違い	12
(3) メバロン酸経路中間産物がスタチンによる細胞死に及ぼす影響	12
(4) 各細胞株の <i>GGPS1</i> に対する依存度の違い	13
(5) <i>GGPS1</i> および <i>HMGCR</i> 発現抑制がスタチン感受性に及ぼす影響	14
4. 考察	15

第II章 イヌがん細胞株におけるスタチン感受性と上皮系/間葉系形質との相関...	19
1. 背景.....	20
2. 材料と方法.....	22
(1) 細胞培養.....	22
(2) スタチン感受性試験.....	22
(3) スタチンの50%阻害濃度 (IC ₅₀) の算出.....	22
(4) 遺伝子発現解析.....	23
(5) ウェスタンブロッティング.....	23
(6) 免疫細胞化学染色.....	24
(7) ZEB2 siRNA 導入時におけるスタチン感受性試験.....	25
(8) 統計学的解析.....	25
3. 結果.....	26
(1) イヌがん細胞株に対するスタチンの増殖抑制効果.....	26
(2) イヌがん細胞株のスタチン感受性と上皮系/間葉系形質との相関.....	26
(3) 不均一ながん細胞集団におけるスタチン感受性の違い.....	27
(4) スタチン感受性と EMT マーカー発現量との相関.....	27
(5) ZEB2 発現抑制がスタチン感受性に及ぼす影響.....	28
4. 考察.....	29
総括.....	33
謝辞.....	35
引用文献.....	36
付表・付図.....	47

緒論

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、がん細胞はワールブルグ効果に代表される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 (Hanahan and Weinberg, 2011)。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の活性が亢進することが知られている (Göbel *et al.*, 2020)。メバロン酸経路は、解糖系や β 酸化により生じるアセチル CoA を基質として始まり、およそ 30 段階の酵素反応により様々な中間産物を経て、最終的にコレステロールが合成される代謝経路である (図 1)。本経路の律速段階である、3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) からメバロン酸への反応を触媒する HMG-CoA 還元酵素 (HMGCR) は、正常細胞において最も緻密に制御されている酵素の一つとして知られる (Goldstein and Brown, 1990)。その調節は主にメバロン酸経路のネガティブフィードバック機構によるものであり、転写および翻訳抑制、タンパク分解促進、さらにはリン酸化による不活化と多角的に制御される。しかしながら、がん細胞ではこの制御が十分に機能せず、メバロン酸経路が異常に活性化する。興味深いことに、がん抑制タンパクとして知られる p53 の変異が、がん細胞のメバロン酸経路活性化に関与しており (Freed-Pastor *et al.*, 2012)、野生型 p53 はメバロン酸経路を阻害することにより腫瘍形成を抑制することが報告されている (Moon *et al.*, 2019)。

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に制がん効果を期待できるのではないかと注目を集めている (Thurnher *et al.*, 2012; Guerra *et al.*, 2021)。スタチン

は 1973 年、遠藤章博士により青カビ由来の生理活性物質コンパクチンとして見出された。その作用は、メバロン酸経路の律速酵素である HMGCR を競合阻害することにより、血中コレステロールを低下させるものである。1980 年代に上市されて以来、脂質異常症治療薬として世界中で広く使用され、2000 年代にはスタチン系薬剤の一つであるアトルバスタチンが世界の医薬品売上高 1 位となるなど優れた実績を持つ。このような、すでに開発済みで実績のある薬剤を異なる疾患の治療薬として活用する手法はドラッグリポジショニングと呼ばれ、新規の薬剤開発と比較して開発コスト（期間・費用）が低いなど多くの利点を有する（Jourdan *et al.*, 2020）。すなわち、より安価で安全性の高いがん治療の提供につながることから、スタチンの制がん剤としての応用が期待されている。

これまでに多くの *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。例えば、細胞周期の停止、アポトーシスやオートファジーの誘導、がん免疫反応の活性化、および浸潤・転移の抑制などの抗腫瘍効果を示すことが明らかとなっている（Alizadeh *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2014; Gruenbacher *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2012; Beckwitt *et al.*, 2018）。さらに、複数の疫学研究のメタアナリシスにおいてもがん治療におけるスタチンの有効性が示されている（Zhong *et al.*, 2015; Mei *et al.*, 2017）。このように、スタチンの抗腫瘍効果は多くの研究によって裏付けられているが、その詳細なメカニズムについては未だ不明な点が多い。また、スタチンはすべてのがん細胞に増殖抑制効果を発揮するわけではなく、スタチンが効きやすい細胞（感受性株）と効きにくい細胞（耐性株）が存在することが分かっている（Wong *et al.*, 2007; Warita *et al.*, 2014; Goard *et al.*, 2014; Göbel *et al.*, 2019）。実際、スタチンの抗腫瘍効果を評価するために複数の臨床試験が行われているが、そのすべてにおいて良好な成績が得られているわけではない（Iannelli *et al.*, 2018; Ahmadi *et al.*, 2020）。スタチン耐性株の存在がこ

の一因となっていることは言うまでもなく、スタチンをがん治療に効果的に用いるためには、治療対象となる腫瘍がスタチン感受性であるか否かを識別することが重要である。

近年、患者ごとに異なる多様ながんの病態に対して最適な治療法を判断するため、その治療効果を事前に予測するバイオマーカーの活用が進んでいる。例えば、特定の分子標的治療薬の効果予測マーカーとして、乳がんにおける HER2 (*ERBB2*) 増幅、消化管間質腫瘍 (GIST) における *KIT* 変異、および大腸がんにおける *KRAS* 変異などはその有用性が認められており (Piccart-Gebhart *et al.*, 2005; Heinrich *et al.*, 2003; Amado *et al.*, 2008), これらの指標に基づいた個別化医療を実施することで治療成績の向上に寄与している。スタチンの制がん効果についても、その感受性を識別するバイオマーカーとなりうる候補因子が報告されているが、その特異性などの問題から未だ確立には至っていない (Longo *et al.*, 2020)。

スタチンのがん治療への臨床応用に向けた研究が進むなかで、スタチン耐性がん細胞の存在がその大きな障壁となっている。個別化医療が進む現代のがん治療において、スタチンをより有効に活用するためには、感受性を予測するバイオマーカーの確立、あるいはスタチン耐性をも克服する併用療法の実現が待たれる。本研究ではスタチン耐性株と感受性株の違いを見出すため、両細胞株のメバロン酸経路への依存度を比較した。また、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。さらに、現在医学領域で先行しているスタチンのがん治療応用に向けた研究を、未だ進んでいない獣医学領域にも応用するべく、イヌがん細胞株におけるスタチンの制がん効果とその感受性識別因子について比較腫瘍学的検討を行った。

第 I 章

スタチン耐性株—感受性株間のメバロン酸経路依存度の比較および

スタチンの制がん効果を増強する併用療法の検討

I-1 背景

コレステロールは生体膜の主要な構成成分の一つであり，細胞の生存にとり不可欠な物質である．正常細胞において細胞内コレステロール量は緻密な制御を受け，その恒常性が維持されている．すなわち，細胞内コレステロール量の多寡に応じて，その供給に関わる因子が転写，翻訳，および翻訳後のレベルで高度に調節されている (Luo *et al.*, 2020)．コレステロールの供給経路には，メバロン酸経路による細胞内合成系と低比重リポタンパク質受容体 (LDLR) を介した細胞外からの取り込み経路が存在する．細胞内コレステロールが不足した際には両経路からの供給を促進する一方，過剰になると供給を抑制するフィードバック機構がはたらく．しかし，がん細胞ではこの調節機構が破綻しており，それが腫瘍形成に有利にはたらくことが報告されている (Chen *et al.*, 2001; Clendening *et al.*, 2010a; Göbel *et al.*, 2020)．

メバロン酸経路からはコレステロールのみならず，広範な細胞機能に関わる多種の中間産物が合成される．具体的には，ミトコンドリア電子伝達系ではたらくユビキノン，糖鎖修飾に関わるトリコール，翻訳後脂質修飾 (プレニル化) に関わるファルネシル二リン酸 (FPP) およびゲラニルゲラニル二リン酸 (GGPP) などが本経路から合成される (Goldstein and Brown, 1990)．とくに，FPP や GGPP による低分子 G タンパク質のプレニル化は様々な細胞活動に関与しており，がん細胞においては細胞生存，増殖，および浸潤・転移などに関わることが知られている (Berndt *et al.*, 2011)．

このように，メバロン酸経路はがん細胞の活動に重要な物質を多数供給することから，2000 年代半ばより，メバロン酸経路の阻害剤であるスタチン系薬剤に制がん効果を期待できるのではないかとの報告がなされていた (Demierre *et al.*,

2005). 2012年には、デンマークにおける大規模な疫学調査により、スタチン服用とがん関連死亡率の低下との相関が報告され (Nielsen *et al.*, 2012), さらにこの年、変異型 p53 が、がん細胞のメバロン酸経路活性化に関与することが明らかとなったことから (Freed-Pastor *et al.*, 2012), スタチンの制がん効果がより一層注目されることとなった。

現在までにスタチンのがん治療への応用に向けた研究が盛んに行われ、数多くの報告でがん治療におけるスタチンの有用性が示されているが、制がん効果の詳細な機序については不明な点が多い。実際、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、がん細胞によりスタチン感受性に差があることが分かっているが (Wong *et al.*, 2007; Warita *et al.*, 2014; Goard *et al.*, 2014; Göbel *et al.*, 2019), その感受性の違いがなぜ生じるのかについては未だ明らかとなっていない。スタチン感受性の違いが何に起因するものなのか明らかにすることができれば、スタチンの治療効果を予測するバイオマーカーの確立や、スタチン耐性株に対するより有効な併用療法の実現につながる。本研究ではスタチン耐性株と感受性株の違いを見出すため、両細胞株のメバロン酸経路への依存度を比較した。また、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。

I-2 材料と方法

1. 細胞培養

米国国立がん研究所 (NCI) が提供する NCI-60 ヒトがん細胞パネル (National Cancer Institute, Frederick, MD, USA) から, 先行研究 (Warita *et al.*, 2014) でスタチンに対する感受性が明らかとなっている細胞株 4 種—DU-145 (前立腺がん由来, 耐性株), NCI-H322M (肺がん由来, 耐性株), PC-3 (前立腺がん由来, 感受性株), および HOP-92 (肺がん由来, 感受性株) —を使用した. 培養液には 10% ウシ胎仔血清 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA), 100 units/ml ペニシリンおよび 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン (Thermo Fisher Scientific) を含む RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific) を用い, 37°C, 5% CO₂ 条件下で培養した.

2. *HMGCR* および *LDLR* 発現量の解析

各細胞株を 12 穴プレートに 1×10^5 cells/ml で播種し, 12 時間前培養後, 0.3–30 μM アトルバスタチン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を添加し, 48 時間培養した. 対照群には溶媒であるジメチルスルホキシド (DMSO; FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) を終濃度 0.3% となるよう添加した. 培養後, RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて total RNA の抽出を行った. 得られた total RNA 1 μg を ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo, Osaka, Japan) により cDNA へと逆転写した. これを鋳型とし, *HMGCR* または *LDLR* 特異的に設計したプライマー (表 1) および LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I (Roche Diagnostics, Lewes, UK) を用いて, LightCycler rapid thermal cycler system (Roche Diagnostics) でリアルタイム RT-PCR を行なった. 内部標準には glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) を用いた.

3. siRNA による遺伝子発現抑制

HMGCR (siRNA ID#s142; Thermo Fisher Scientific), LDLR (siRNA ID#s4; Thermo Fisher Scientific), および GGPS1 (siRNA ID#s18107; Thermo Fisher Scientific) 特異的に設計された siRNA を使用した。陰性対照には scrambled siRNA (Silencer Select Negative Control #1 siRNA; Thermo Fisher Scientific) を用いた。siRNA の導入は Lipofectamine RNAiMax (Thermo Fisher Scientific) および Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) を用いてリバーストランスフェクション法により行なった。具体的には、終濃度 10 nM となるよう調製した siRNA を 12 穴プレートに分注し、そこへ各細胞株を 6×10^4 cells/ml で播種した。siRNA の導入から 72 時間後、Scepter handheld automated cell counter (EMD Millipore, Billerica, MA, USA) により細胞数を測定し、対照群の細胞数で除して細胞生存率を算出した。なお、siRNA の導入効果の確認として、リアルタイム RT-PCR, 免疫細胞化学染色, およびウェスタンブロッティングを行なった。リアルタイム RT-PCR には、各 siRNA 切断部位を挟むように設計したプライマーを使用した (表 1)。

4. 免疫細胞化学染色

カバーガラス上で培養した細胞を 2%パラホルムアルデヒド (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) で 30 分間固定した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4; Thermo Fisher Scientific) で洗浄後, 0.1% Triton-X-100 (Nacalai Tesque) で 15 分間透過処理をした。PBS で洗浄し, 2%ウシ血清アルブミン (BSA; FUJIFILM Wako Pure Chemical) で 15 分間ブロッキングを行った。一次抗体には抗 HMGCR ポリクローナルウサギ抗体 (1:80, ab98018, Abcam, Cambridge, UK), 抗 LDLR モノクローナルウサギ抗体 (1:100; ab52818, Abcam), または抗 GGPS1 モノクローナルマウス抗体 (1:100; 1C3, Abnova, Taiwan) を用い, 室温で 1 時間反応させた。PBS で

洗浄した後、二次抗体として CFTM488A 標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (1:200; Biotium, Hayward, CA, USA), または CFTM488A 標識抗マウス IgG ヤギ抗体 (1:200; Biotium) を用い、遮光して室温で 15 分間反応させた。二次抗体反応と同時に、0.1 μ M rhodamine-labeled phalloidin (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) による F-actin 染色を行った。PBS で洗浄し、Hoechst 33342 (5 μ g/ml; Nacalai Tesque) による核染色を室温 15 分間で行った。PBS で洗浄後、水溶性封入剤 (Fluoromount/Plus; Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, USA) で封入し、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FLUOVIEW FV10i; Olympus, Tokyo, Japan) で観察を行った。

5. ウェスタンブロッティング

siRNA を導入した各細胞株を冷却した PBS で洗浄後、Protease Inhibitor Cocktail (CalBiochem, La Jolla, CA, USA) を添加した Pierce RIPA lysis buffer (Thermo Fisher Scientific) を加え、氷上で 5 分間静置した。細胞溶解液を 27G の注射針でホモジナイズし、冷却遠心機で 15 分間遠心後、上清を回収した。タンパク質の定量はビシンコニン酸 (BCA) 法 (BCA Protein Assay; Thermo Fisher Scientific) により行った。サンプルタンパク質を 4 \times Laemmli sample buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) に懸濁し、95°C で 5 分間処理した。NuPAGE 4–12% Bis-Tris Gel (Thermo Fisher Scientific) のウェルにサンプルタンパク質を 10 μ g アプライし、PowerPac HC (Bio-Rad) を用いて、定電圧 200 V で電気泳動を行った。メンブレンへの転写は iBlot Gel Transfer Device (Thermo Fisher Scientific) を使用し、iBlot Gel Transfer Stacks Nitrocellulose (Thermo Fisher Scientific) に転写した。メンブレンを 5% スキムミルク (Morinaga Milk Industry, Tokyo, Japan) に浸し、室温で 1 時間ブロッキングした。一次抗体には抗 HMGCR モノクローナルウサギ抗体 (1:3000; ab174830,

Abcam), 抗 LDLR モノクローナルウサギ抗体 (1:5000), 抗 GGPS1 モノクローナルマウス抗体 (1:500) または抗 GAPDH モノクローナルウサギ抗体 (1:1000; 14C10, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を用い, 室温で 1 時間反応させた. Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBS-T) で洗浄後, 二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (1:5000; SeraCare Life Sciences, Milford, MA, USA), または抗マウス IgG ヤギ抗体 (1:1000; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用い, 室温で 1 時間反応させた. TBS-T で洗浄後, 発色液 (Clarity Western ECL Substrate; Bio-Rad) を滴下し, 遮光して 5 分間反応させた. その後, C-DiGit Blot Scanner (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA) により解析を行った.

6. メバロン酸経路中間産物の添加実験

感受性株 HOP-92 を 12 穴プレートに 1×10^5 cells/ml で播種し, 12 時間前培養後, 10 μ M アトルバスタチンとともに主要なメバロン酸経路中間産物であるメバロン酸 (10–50 μ M; Sigma-Aldrich), FPP (1–25 μ M; Echelon, Salt Lake City, UT, USA), GGPP (1–25 μ M; Sigma-Aldrich), スクアレン (10–100 μ M; FUJIFILM Wako Pure Chemical), ユビキノン (25–200 μ M; FUJIFILM Wako Pure Chemical), ドリコール (75–300 μ M; Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA), および LDL (50–200 μ g/ml; Alfa Aesar, Ward Hill, MA, USA) をそれぞれ添加した. 対照群には各試薬の溶媒である PBS または DMSO を添加した. 48 時間培養後, Scepter handheld automated cell counter (EMD Millipore) により細胞数を測定し, 対照群の値で除して細胞生存率を算出した.

7. HMGCR および GGPS1 siRNA 導入時におけるスタチン感受性試験

耐性株 DU-145 および NCI-H322M を用い，上述の方法で HMGCR および GGPS1 siRNA を導入すると同時に，各濃度のアトルバスタチン（3, 10, 30 μ M）を添加した．72 時間培養後における細胞数を Scepter handheld automated cell counter（EMD Millipore）により測定し，対照群（scrambled siRNA + 0.3% DMSO）の細胞数で除して細胞生存率を算出した．

8. 統計学的解析

解析には StatView software（version 5.0; SAS Institute, Cary, NC, USA）を使用した．二群間の比較は Student's *t*-test を，多群間の比較は Bonferroni-Dunn *post hoc* test を用いて評価し， $P < 0.05$ を有意差ありとした．

I-3 結果

1. スタチン添加による *HMGCR* および *LDLR* 発現量の変化

アトルバスタチン添加後の *HMGCR* および *LDLR* 発現量を解析したところ、耐性株、感受性株ともにアトルバスタチン濃度依存的な増加傾向がみられた (図 2)。耐性株 DU-145 および NCI-H322M では 30 μM の濃度まで発現量の解析を行い、両遺伝子とも有意な増加がみられた。一方、感受性株である PC-3 および HOP-92 は 3 μM 以上の濃度では多くの細胞が死滅しており定量を行わなかったものの、1 μM の濃度で発現量が有意に増加していた。

2. 各細胞株の *HMGCR* および *LDLR* に対する依存度の違い

siRNA 導入効果の確認として、リアルタイム RT-PCR、免疫細胞化学染色、およびウェスタンブロッティングを行ったところ、いずれにおいても対照群 (scramble) と比較して、siRNA 導入群では標的遺伝子発現量およびタンパク量の低下がみられた (図 3A-C および図 4A-C)。細胞生存率を算出すると、*HMGCR* の発現抑制ではいずれの細胞株も対照群に比べて有意に低下していた (図 3D)。とくに感受性株はその低下が顕著であり、耐性株の生存率が約 90%であるのに対し、感受性株 PC-3 では 60%、HOP-92 では 44%まで低下していた。一方、*LDLR* の発現抑制ではいずれの細胞株でも生存率の低下はみられなかった (図 4D)。

3. メバロン酸経路中間産物がスタチンによる細胞死に及ぼす影響

メバロン酸経路から合成される様々な中間産物のうち、どの物質の枯渇がスタチンの制がん効果に重要であるか調べるため、スタチン感受性株である HOP-92 にアトルバスタチンと各中間産物を共添加したときの細胞生存率への影響を

解析した。10 μ M アトルバスタチン単独では、細胞生存率が対照群の約 20%まで低下するのに対し、メバロン酸を加えると対照群と同程度まで回復した (図 5A)。また、メバロン酸経路の下流に位置する FPP の添加で部分的な回復がみられ (図 5B)、さらにその下流に位置する GGPP の添加では対照群と同程度まで生存率の回復がみられた (図 5C)。一方で、スクアレン、ユビキノン、ドリコール、および LDL の添加では生存率の回復はみられなかった (図 5D-G)。なお、いずれの中間産物も単独添加では細胞生存率の増加を示さなかった (図 6)。生存率の回復がみられた中間産物のうち、もっとも下流に位置する GGPP に着目し、アトルバスタチンと GGPP を共添加したときの細胞の形態への影響を観察した (図 7)。10 μ M アトルバスタチンの単独添加では、48 時間後には細胞が萎縮し、死滅することが観察された。しかし、アトルバスタチンと GGPP を共添加すると、対照群と同程度にまで細胞の形態が回復することが観察された。

4. 各細胞株の GGPS1 に対する依存度の違い

GGPP の枯渇がスタチンの制がん効果に重要であることから、スタチン耐性株と感受性株とでは GGPP への依存度に差があるのではないかと考え、GGPP 合成酵素である *GGPS1* の発現を siRNA で抑制したときの細胞生存率への影響を解析した。siRNA 導入効果の確認として、リアルタイム RT-PCR、免疫細胞化学染色およびウェスタンブロッティングを行ったところ、いずれにおいても対照群 (scramble) と比較して、siRNA 導入群では遺伝子およびタンパク量の低下がみられた (図 8A-C)。siRNA の導入から 9 日目まで 3 日おきに細胞生存率を測定したところ、いずれの細胞株も経時的に生存率が低下した (図 8D)。とくに感受性株では、耐性株に比べ、3 日目から有意な低下がみられた。9 日後における

生存率では、耐性株は約 80%であるのに対し、PC-3 では 47%、HOP-92 では 35%にまで低下していた。

5. *GGPS1* および *HMGCR* 発現抑制がスタチン感受性に及ぼす影響

膵臓がん細胞株を用いた先行研究により、FPP 合成酵素阻害剤である Zoledronic acid (図 1) とスタチンを併用することで、その制がん効果が増強されることが報告されている (Elsayed *et al.*, 2016)。そこで、スタチン耐性を克服する方法として、*GGPS1* または *HMGCR* の発現抑制とアトルバスタチンの併用が有効か否か検討した。耐性株に対して、*GGPS1* siRNA とアトルバスタチンを併用したときの細胞生存率を解析したところ、DU-145 では増殖抑制効果がわずかに増強したが、NCI-H322M では対照群と差がみられなかった (図 9A,B)。一方、*HMGCR* siRNA との併用では両細胞株ともに、*GGPS1* siRNA に比べて増殖抑制効果が増強された (図 9C,D)。

I-4 考察

コレステロールは生体膜の構成成分として膜の完全性・流動性を保持するほか、ステロイドホルモン、ビタミンD、胆汁酸などの前駆体として、細胞および生体にとって不可欠な物質である。コレステロールの恒常性は転写、翻訳、および翻訳後レベルで緻密に調節されている。その重要性ゆえに、調節機構の異常および恒常性の破綻は様々な疾患につながる。例えば、*LDLR* などの遺伝子異常に起因する家族性高コレステロール血症では、*LDLR* を介した血中からの LDL コレステロール取り込みが阻害されることで、血中コレステロール値が顕著に上昇し、粥状動脈硬化症などを引き起こす (Henderson *et al.*, 2016)。また、コレステロール代謝の異常はアルツハイマー病にも関与しており、脂質異常症治療薬であるスタチンはアルツハイマー病などによる認知症リスクを低減することが報告されている (Poly *et al.*, 2020)。同様に、細胞内コレステロール合成系であるメバロン酸経路の異常な活性化が腫瘍形成に有利にはたらくことから、スタチンは抗腫瘍効果を有することが知られている (Clendening *et al.*, 2010a; Moon *et al.*, 2019)。

これまでの研究から、スタチンの抗腫瘍効果に対する感受性はがん細胞により様々であることが分かっているが、その違いがなぜ生じるのかについては未だ明らかとなっていない。本研究ではその感受性が異なる理由として、コレステロール調節に関わる因子のフィードバック機構に着目した。すなわち、スタチン添加により細胞内コレステロール量が低下した際に誘導される、*HMGCR* および *LDLR* 発現量の上方調節機能の差が関わっているか検討した。実際に、ある骨髄腫細胞株では *HMGCR* 発現量とスタチン感受性との間に相関があり、感受性株と比較して耐性株ではスタチン添加後における *HMGCR* 発現量の増加が顕著で

あることが報告されている (Clendening *et al.*, 2010b). しかし, 本研究では耐性株, 感受性株ともにスタチン濃度依存的な *HMGCR* および *LDLR* 発現量の増加傾向がみられ (図 2), その上方調節機能に差は認められなかった. とくに, 低濃度 (1 μ M) における発現量の変化をみると, 耐性株よりも感受性株である PC-3 で有意な増加が認められた. 先の報告 (Clendening *et al.*, 2010b) を鑑みると, スタチン感受性株の中でも, *HMGCR* 発現量の上方調節機能は一様ではないことが示唆された.

いずれの細胞株においても *LDLR* 発現抑制では細胞生存率が低下せず, *HMGCR* 発現抑制では細胞生存率が低下したことから, コレステロールの供給経路として細胞内合成系への依存度が高いことが考えられる (図 3 および 4). このことはアトルバスタチンとともに LDL を添加しても細胞生存率が回復しないのに対し, メバロン酸を添加すると対照群と同程度にまで回復したことから示唆される (図 5). あるいは, 細胞の生存にはコレステロールよりもメバロン酸経路の中間産物が重要である可能性がある. これは中間産物の一つである GGPP の添加により対照群と同程度まで細胞生存率および細胞の形態が回復したことから裏付けられる (図 5 および 7). また, 他のがん細胞株を用いた研究においても, スタチンの制がん効果がコレステロールの添加では打ち消されず, GGPP の添加により打ち消されることが報告されており, 複数のがん細胞株に共通する結果であった (Elsayed *et al.*, 2016; Alizadeh *et al.*, 2017). ただし, これらの結果はがん細胞におけるコレステロールの重要性を否定するものではない. 本研究では, *LDLR* の発現抑制から 72 時間後という比較的短期間における細胞生存率への影響を解析したに過ぎない. 実は, 他の研究では 96 時間の血清飢餓培養というより過酷な条件下において *LDLR* の発現を抑制すると, 対照群よりも有意に細胞数が減少することが報告されている (Gallagher *et al.*, 2017).

さらにこの報告では、がん細胞を移植した高脂血症モデルマウスにおいて、長期の *LDLR* 発現抑制により、対照群に比べて腫瘍サイズが減少することを示しており、腫瘍の成長における *LDLR* の重要性を明らかにしている。

HMGCR および *GGPS1* の発現抑制によりスタチン感受性株は耐性株に比べて顕著な細胞生存率の低下を示した (図 3 および 8)。このことから、耐性株と感受性株の違いとしてメバロン酸経路、とくに *GGPP* に対する依存度の高さが明らかとなった。*GGPP* や *FPP* はイソプレノイドと総称される物質で、低分子 G タンパク質にプレニル化を施すことで膜局在化を促し、活性化させる。低分子 G タンパク質は様々な細胞機能に関わっており、がん細胞においては細胞生存、増殖、および浸潤・転移などに寄与することが知られている (Berndt *et al.*, 2011)。最近の研究においても、*t(4;14)*染色体転座を有する骨髄腫細胞株では、他の細胞株に比べて *GGPP* 合成への依存度が高いために、スタチンが効きやすいことが報告されている (Longo *et al.*, 2021)。

スタチン耐性株である DU-145 および NCI-H322M 細胞において、*GGPS1* ではなく *HMGCR* の発現を抑制することにより、アトルバスタチンの増殖抑制効果が顕著に増強されることが明らかとなった (図 9)。このことは、スタチン耐性株においては *GGPP* 単独の減少ではなく *HMGCR* の阻害による *FPP* と *GGPP* 両方の減少が、細胞増殖の抑制に必要なことを示唆している。低分子 G タンパク質のプレニル化は修飾基の炭素数により、*FPP* が関わるファルネシル化、*GGPP* が関わるゲラニルゲラニル化に分類され、*FPP* と *GGPP* はそれぞれ異なる種類の低分子 G タンパク質を修飾する。例えば *HRAS* や *RHEB* はファルネシル化を、*RHOA* や *RAC* はゲラニルゲラニル化を受けることが知られている (Winter-Vann and Casey, 2005)。ただし、なかには両方の修飾を受けるものや、通常はファルネシル化を受けるが、それが阻害された場合はゲラニルゲラニル化を受け

るようになるものも存在する (Berndt *et al.*, 2011). そのため, がん細胞によってはいずれか一方を阻害するだけでは増殖抑制効果をもたらすのに不十分であり, 両方を阻害する必要があることが示唆された.

ある疾患に対する治療薬について, その標的となる分子を治療薬とは異なる方法を用いて二重に阻害することにより, 治療効果を向上させることが試みられている. メバロン酸経路の律速酵素である HMGCR は, 転写, 翻訳, および翻訳後の多角的な調節を受ける酵素であることから, 本酵素を標的とした二重阻害には様々なアプローチが考えられる. 例えば, HMGCR の発現を制御するステロール調節配列結合タンパク (SREBP) や, リン酸化による HMGCR の不活化制御を担う AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) などを標的とすることにより, スタチンの制がん効果を向上させることが期待されている (Mullen *et al.*, 2016). 実際, AMPK の活性化作用を持つ薬剤であるメトホルミンは, がん細胞株や腫瘍モデルマウスに対するスタチンの増殖抑制効果を増強することが報告されている (Babcock *et al.*, 2014; Pennanen *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017). 本研究における HMGCR に対する遺伝子発現抑制とスタチンの併用による相乗的制がん効果は, 単一酵素に焦点を当てた二重阻害の有効性を裏付けるものである.

結論として, スタチン耐性株と感受性株とではメバロン酸経路に対する依存度が異なっており, 感受性株ではとくに GGPP に対する依存度が高いことを明らかにした. また, スタチン耐性の克服につながる併用療法として, HMGCR を標的とした二重阻害が有効であることを示した. ただし, 臨床応用に向けては生体における副作用などを十分に検討することが必須であり, 適切なドラッグデリバリーシステムの利用などさらなる研究が必要である.

第II章

イヌがん細胞株におけるスタチン感受性と上皮系／間葉系形質との相関

II-1 背景

近年、獣医療の発展や良質な動物用飼料の普及等によりペットの寿命は延伸している。それに伴い死因も変化しており、現在、成犬の最も多い死因はがんで、その占める割合はおよそ 30%とされている (Hoffman *et al.*, 2018)。がんの病態は、人と動物とで類似しているが、治療法のニーズは必ずしも同じではない。皆保険制度のない獣医療においては、経済的な理由から高度ながん治療を選択することは難しいことが多い。また、飼い主の心情として、動物に負担の大きいがん治療を望まないこともある。このような動物のがん治療においては、安価で副作用の少ない治療法のニーズが高いと言えるが、その確立には至っていない。

ドラッグリポジショニングの観点から、脂質異常症治療薬であるスタチン系薬剤のがん治療への応用が期待されている (Longo *et al.*, 2020)。スタチンは抗がん剤に比べて安価で、安全性が広く認められた薬剤であることから、獣医がん治療のニーズを満たす新たな選択肢となりうる。しかしながら、スタチンのがん治療への応用に向けた研究は主に医学領域で行われており、獣医学領域においてはほとんど進んでいないのが現状である。現在のところ、複数のイヌがん細胞株に対してスタチンは増殖抑制効果を示すことが報告されている (Torres *et al.*, 2015; Kobayashi *et al.*, 2021)。一方で、先行する医学領域での研究で課題となっている、がん細胞のスタチン感受性を識別する因子については十分に検討されていない。

これまでの研究から、ヒトがん細胞株におけるスタチン感受性を識別する因子として上皮系/間葉系という形質の違いが報告されており、スタチンは上皮系がん細胞よりも間葉系がん細胞の増殖を優先的に阻害することが明らかとなっている (Warita *et al.*, 2014; Viswanathan *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2018)。一般に、が

ん細胞はその進行過程において上皮間葉転換 (EMT) と呼ばれる現象を起こし、上皮系から間葉系へと形質を変えることが知られる。間葉系に変化したがん細胞では、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がみられ、EMT は腫瘍の悪性化に多面的にはたらくことが報告されている (Shibue and Weinberg, 2017)。ヒトでは固形がんによる死亡の約 90% は転移が原因であるとされており (Gupta and Massagué, 2006)、転移に重要な役割を果たす EMT を阻害することができれば予後改善に大きく貢献する。そのため、EMT はがんにおける新たな治療標的として注目されている (Fontebasso and Dubinett, 2015)。EMT を標的とした治療法は大きく 3 つに分類される。すなわち、EMT 誘導の阻害、EMT の逆過程である間葉上皮転換 (MET) の促進、および EMT 後の間葉系細胞を標的とする方法である (Marcucci et al., 2016)。このうち、スタチンは EMT 後の間葉系細胞を標的とする方法として、悪性度の高いがんに対する有効な治療薬になりうる。

EMT は、ヒトのみならずイヌのがんでも観察され、悪性化に関連していると考えられている (Cervantes-Arias *et al.*, 2013; Yoshida *et al.*, 2014; Fonseca-Alves *et al.*, 2015)。スタチンがイヌにおいても間葉系がん細胞の増殖を優先的に阻害するのであれば、その予後改善に寄与することが期待される。本研究では、乳腺がん、扁平上皮がん、肺がん、メラノーマ由来のイヌがん細胞株、計 11 種を用いて、イヌがん細胞に対するスタチンの制がん効果を解析した。さらに、イヌがん細胞株のスタチン感受性と上皮系/間葉系という形質の違いとの相関を評価し、感受性を識別するバイオマーカーとなりうる因子の同定を試みた。

II-2 材料と方法

1. 細胞培養

鳥取大学農学部附属動物医療センターで樹立されたイヌがん細胞株 11 種—乳腺がん (KOH, SNP), 扁平上皮がん (UBCLN, UBC, Gal), 肺がん (HDC, LuBi, JDM), およびメラノーマ (YCC, ITP, HTR) —を使用した。培養液には 10%ウシ胎仔血清 (Biosera, Boussens, France), 100 units/ml ペニシリンおよび 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン (FUJIFILM Wako Pure Chemical) を含む RPMI 1640 を用い, 37°C, 5% CO₂ 条件下で培養した。

2. スタチン感受性試験

各細胞株を 6 穴プレートに 1×10^4 cells/ml で播種し, 12 時間前培養後, 10 μM アトルバスタチンを添加した。対照群には溶媒である DMSO を 0.1% 添加した。培養 2, 4, 6 日後における細胞数を Scepter handheld automated cell counter (EMD Millipore) により測定した。

3. スタチンの 50% 阻害濃度 (IC₅₀) の算出

各細胞株を 12 穴プレートに 1×10^5 cells/ml で播種し, 12 時間前培養した。細胞の接着後, 各濃度のアトルバスタチン (1, 3, 10, 30, 100 μM) を添加した。対照群には 1% DMSO (100 μM アトルバスタチンの DMSO 濃度に相当) を添加した。48 時間培養後における細胞数を Scepter handheld automated cell counter (EMD Millipore) により測定し, 対照群の細胞数で除した値を細胞生存率とした。ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD) を用いて細胞生存率曲線を求め, IC₅₀ を算出した。

4. 遺伝子発現解析

80%コンフルエントまで培養した各細胞株から，RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて total RNA の抽出を行った。得られた total RNA 1 μg を ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo) により cDNA へと逆転写した。この cDNA を鋳型とし，LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I (Roche Diagnostics)，および各遺伝子特異的なプライマー (表 2) を用いて，LightCycler rapid thermal cycler system (Roche Diagnostics) でリアルタイム RT-PCR を行なった。また，ヒトがん細胞株における遺伝子発現量と比較するため，NCI-60 ヒトがん細胞パネルの 14 細胞株 (大腸がん，卵巣がん，乳がん，肺がん，前立腺がん，メラノーマ，および脳腫瘍から各 2 種類) から RNA を抽出し，各遺伝子特異的なプライマー (表 3) を用いて，同様の手順で解析を行なった。

5. ウェスタンブロッティング

80%コンフルエントまで培養した各細胞株を冷却した PBS で洗浄後，Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher Scientific) を添加した Cell Lytic M (Sigma-Aldrich) を加え，氷上で 15 分間静置した。細胞溶解液を 27G の注射針でホモジナイズし，冷却遠心機で 15 分間遠心後，上清を回収した。タンパク質の定量は BCA 法により行った。サンプルタンパク質を 4 \times Laemmli sample buffer (Bio-Rad) に懸濁し，95°C で 5 分間処理した。NuPAGE 4–12% Bis-Tris Gel (Thermo Fisher Scientific) のウェルにサンプルタンパク質を 10 μg アプライし，PowerPac HC (Bio-Rad) を用いて，定電圧 200 V で電気泳動を行った。メンブレンへの転写は iBlot Gel Transfer Device (Thermo Fisher Scientific) を使用し，iBlot Gel Transfer Stacks Nitrocellulose (Thermo Fisher Scientific) に転写した。メンブレンを 5% スキムミルク (Morinaga Milk Industry) に浸し，室温で 1 時間ブロッキ

ングした。一次抗体には抗 E-cadherin モノクローナルウサギ抗体 (1:1000, 24E10; Cell Signaling Technology), 抗 vimentin モノクローナルマウス抗体 (1:1000, ab8978; Abcam), または抗 β -actin モノクローナルマウス抗体 (1:1000, 8H10D10; Cell Signaling Technology) を用い, 室温で 1 時間反応させた。TBS-T で洗浄後, 二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (1:10000, SeraCare Life Sciences), または抗マウス IgG ヤギ抗体 (1:1000, R&D Systems) を用い, 室温で 1 時間反応させた。TBS-T で洗浄後, Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) を滴下し, 遮光して 5 分間反応させた。その後, C-DiGit Blot Scanner (Li-Cor Biosciences) により解析を行った。

6. 免疫細胞化学染色

カバーガラス上で 50%コンフルエントまで培養した細胞を, 2%パラホルムアルデヒドで 30 分間固定した。PBS で洗浄後, 0.1% Triton-X-100 (Nacalai Tesque) で 15 分間透過処理をした。PBS で洗浄した後, 2% BSA で 15 分間ブロッキングを行った。一次抗体には抗 E-cadherin モノクローナルウサギ抗体 (1:200, 24E10; Cell Signaling Technology) および抗 vimentin モノクローナルマウス抗体 (1:200, ab8978; Abcam) の混合液を用い, 37°C で 1 時間反応させた。二次抗体には CFTM488A 標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (1:200, Biotium) および CFTM568A 標識抗マウス IgG ヤギ抗体 (1:200, Biotium) を用い, 遮光して室温で 15 分間反応させた。PBS で洗浄し, Hoechst 33342 (5 μ g/ml; Nacalai Tesque) による核染色を室温 10 分間で行った。PBS で洗浄後, 水溶性封入剤 (Fluoromount/Plus; Diagnostic Biosystems) で封入し, 共焦点レーザー走査型顕微鏡 FLUOVIEW FV10i (Olympus) で観察を行った。

7. ZEB2 siRNA 導入時におけるスタチン感受性試験

ZEB2 siRNA (siRNA ID#s19032; Thermo Fisher Scientific) および scrambled siRNA (Silencer Select Negative Control #1 siRNA; Thermo Fisher Scientific) を Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) で希釈し, siRNA 溶液 (最終濃度 10 nM) を作製した. siRNA 溶液と 2% Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) を同量ずつ混合し, 20 分間室温で反応させた後, 12 穴プレートに分注した. そこに, YCC および ITP 細胞を 6×10^4 cells/ml で播種した. 48 時間培養後, 10 μ M アトルバスタチンまたは 0.1% DMSO を添加した siRNA 含培養液に交換し, さらに培養を続けた. アトルバスタチン添加から 48 時間後における細胞数を Scepter handheld automated cell counter (EMD Millipore) により測定し, 対照群 (scrambled siRNA + 0.1% DMSO) の細胞数で除した値を細胞生存率とした. また, siRNA 切断部位を挟むように設計したプライマー (表 2) を用いたリアルタイム RT-PCR, および抗 ZEB2 ポリクローナルウサギ抗体 (1:1000, PA5-40759; Thermo Fisher Scientific) を用いたウェスタンブロッティングにより, siRNA 導入効果の確認を行なった.

8. 統計学的解析

解析には StatView software (version 5.0; SAS Institute) を使用した. Bonferroni's または Dunnett's *post hoc* test により評価を行い, $P < 0.05$ を有意差ありとした.

II-3 結果

1. イヌがん細胞株に対するスタチンの増殖抑制効果

アトルバスタチンの細胞増殖抑制効果に対する感受性はイヌがん細胞株により様々であった (図 10). KOH, SNP, および UBCLN はアトルバスタチン添加後 6 日における細胞数が対照群と同程度まで増加していた. また, HDC は対照群と比べると有意差があるものの, アトルバスタチン存在下でも増殖を続けており, その他の細胞と比べて耐性を有していた. 本研究では上記 4 細胞株をスタチン耐性株に分類した. 一方で, UBC, Gal, LuBi, JDM, YCC, ITP, および HTR は対照群に比べ顕著に増殖が抑制されていたことから, スタチン感受性株に分類した. 同様に, IC_{50} の値をみると, $5.92\text{--}71.5\ \mu\text{M}$ と細胞により大きく異なっていた (図 11 および表 4). また, 細胞の由来に着目すると, 乳腺がん 2 種はいずれもスタチン耐性であり, メラノーマ 3 種はいずれもスタチン感受性であった. 扁平上皮がんおよび肺がん由来の細胞株については, スタチン耐性, 感受性いずれも含まれていた. スタチン添加後の細胞の形態に着目すると, スタチン耐性株ではほとんど変化がみられない一方で, スタチン感受性株では細胞の顕著な萎縮が観察された (図 12 および 13).

2. イヌがん細胞株のスタチン感受性と上皮系/間葉系形質との相関

上皮系マーカーである E-cadherin の遺伝子発現・タンパク量を調べたところ, スタチン耐性株 (KOH, SNP, UBCLN, HDC), および一部の感受性株 (Gal, LuBi, JDM) で E-cadherin の発現がみられた (図 14A,C). これらの細胞間では, その発現量の大きさとスタチン感受性に相関は認められなかった. 一方で, E-cadherin を発現していない細胞株 (YCC, ITP, UBC, HTR) は, いずれもスタチン感受性株

であった。IC₅₀の値（表4）と照らし合わせると、感受性株の中でも、E-cadherinを発現していない細胞は発現している細胞に比べてIC₅₀値が低く、よりスタチン感受性が高いことが分かった。さらに、これらの高感受性株では他の細胞株に比べてvimentinの発現が高い傾向にあった（図14B,C）。また、免疫細胞化学染色によりE-cadherinおよびvimentinの細胞内局在を観察したところ、スタチン耐性株および一部の感受性では細胞膜上のE-cadherin発現がみられたが、スタチン高感受性株ではE-cadherin発現がみられなかった（図14D）。E-cadherinとvimentinを両方発現している細胞株では、一つの細胞に両タンパクを共発現しているものがほとんどである一方で、GalはE-cadherinのみを発現する細胞とvimentinのみを発現する細胞が混在した不均一な細胞集団であった。

3. 不均一ながん細胞集団におけるスタチン感受性の違い

同じ腫瘍由来の不均一な細胞集団の中でも、スタチンは間葉系細胞により効果を発揮するのか調べるため、Gal細胞にスタチンを添加したときの細胞の形態変化を観察した（図15A）。その結果、vimentin陽性細胞ではアトルバスタチンによる細胞死に特徴的な顕著な細胞萎縮がみられたのに対し、E-cadherin陽性細胞では萎縮がみられなかった。さらに、アトルバスタチン添加によるタンパク発現の変化を解析すると、E-cadherinはわずかに増加する一方で、vimentinは減少していた（図15B）。

4. スタチン感受性とEMTマーカー発現量との相関

上皮系/間葉系形質とスタチン感受性との関連をより詳細に明らかにするべく、EMTマーカーである*ZEB1*, *ZEB2*, *SNAI1*, *SNAI2*, および*CDH2*発現量の解析を行なった。*ZEB1/2*の発現量はスタチン高感受性のYCC, ITP, UBC, およびHTR

において、他の細胞株よりも顕著に高かった（図 16A,B）。各細胞株に対するアトルバスタチンの IC₅₀ 値と *ZEB1/2* 発現量との相関係数を算出すると、*ZEB1* および *ZEB2* の値はそれぞれ、-0.37 および-0.47 であった。*SNAI1*, *SNAI2*, および *CDH2* の発現量とスタチン感受性との相関はみられなかった（図 16C-E）。相関がみられた *ZEB1/2* について、スタチン感受性が明らかとなっているヒトがん細胞株における遺伝子発現量を解析したところ、イヌがん細胞株同様、スタチン感受性株で耐性株よりも高い傾向がみられた（図 17）。

5. *ZEB2* 発現抑制がスタチン感受性に及ぼす影響

ZEB を高発現している細胞はスタチン高感受性であることから、*ZEB* の発現抑制によりスタチン感受性が変化し、耐性を獲得するのか否か検討した。高感受性株のうち、*ZEB1* 低発現かつ *ZEB2* 高発現である YCC および ITP を用いて、*ZEB2* を発現抑制した上でスタチンを添加したときの細胞生存率を解析した。両細胞株とも、siRNA の導入により *ZEB2* 発現が抑制されるとともに、*CDH1* 発現の増加がみられた（図 18A,B,D,E）。タンパクレベルでは、YCC は *ZEB2*, E-cadherin とともに変化がみられなかったが、ITP では遺伝子発現と同様に *ZEB2* の低下と、それに伴う E-cadherin の増加がみられた（図 18C,F）。*ZEB2* の発現を抑制したときの YCC および ITP の細胞生存率は、それぞれ対照群の 73% および 64% まで減少した（図 18G,H）。さらに、アトルバスタチンを添加すると、YCC および ITP の細胞生存率は、それぞれ対照群の 20% および 23% まで減少した。

II-4 考察

EMT は元来、発生過程にみられる細胞内在性プログラムとして提唱され、成体においても創傷治癒等に関与しており、正常細胞が有する重要な機能の一つである (Yang *et al.*, 2020). 一方で、がん細胞においては浸潤・転移の促進、薬剤耐性の獲得、がん幹細胞化、およびがん免疫の抑制に関与し、腫瘍の悪性化に多面的にはたらくことが報告されている (Shibue and Weinberg, 2017; Terry *et al.*, 2017). EMT は上皮系マーカーである E-cadherin の減少、および間葉系マーカーである vimentin の増加に特徴づけられ、その制御には様々な因子が関与している (Nieto *et al.*, 2016). 例えば、低酸素や酸化ストレスが引き金となり、トランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β) などのシグナル伝達が活性化し、ZEB1/2 や Snail1/2 などの EMT 誘導性転写因子 (EMT-TF) が間葉系の形質誘導にはたらく。EMT の指標となる E-cadherin の消失や、vimentin および EMT-TF の増加は予後不良と相関することがヒト・イヌにおける多種のがんで報告されている (Birchmeier and Behrens, 1994; Yang *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2021; Shinada *et al.*, 2020; Xavier *et al.*, 2018). したがって、EMT は医療・獣医療の双方で、がんにおける新たな治療標的になると考えられる。

ヒトがん細胞株を用いた先行研究では、上皮系がん細胞に比べて間葉系がん細胞はスタチン感受性が高いことが報告されている (Warita *et al.*, 2014; Viswanathan *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2018). しかしながら、イヌがん細胞における上皮系/間葉系の違いとスタチン感受性との相関については検討されていない。本研究では 11 種のイヌがん細胞株を用い、その相関の解明を試みた。

E-cadherin および vimentin 発現量の大きさとスタチン感受性との間に直線的な相関関係はないものの、スタチン感受性の高い細胞の特徴として E-cadherin の

欠如を明らかにした (図 14). このことは, E-cadherin のみを発現している細胞と vimentin のみを発現している細胞が混在する Gal 細胞において, アトルバスタチンが vimentin 陽性細胞に対して選択的に細胞死を誘導したことから裏付けられた (図 15).

がんの進行過程では, EMT とその逆の現象である MET が動的かつ可逆的に起こるため, 同一腫瘍内に完全な上皮系, 完全な間葉系, あるいはその中間状態を示すがん細胞が不均一に存在する (Nieto *et al.*, 2016). Gal 細胞を用いた実験の結果 (図 15) は, 同じ腫瘍由来の不均一ながん細胞集団においても, アトルバスタチンは EMT 後の悪性度の高いがん細胞の増殖を優先的に抑制することを示唆している. また我々は最近, TGF- β が誘導する EMT により上皮系がん細胞株のスタチン感受性が増強されること, とくに EMT 誘導前からスタチン処置をしている場合に顕著な増強を示すことを報告した (Warita *et al.*, 2021). がん細胞の形質が流動的に変化する過程において, 継続的なスタチンの服用が治療効果の向上につながることを示唆される.

また, スタチンは浸潤・転移を起こす間葉系がん細胞に有効であることから, 原発巣を標的とした外科手術や放射線治療と組み合わせることで, 予後の改善に寄与すると考えられる. 実際に, 術前・術後のスタチン服用により, 大腸がんや肝細胞がんの外科的切除後における生存率が改善することが報告されている (Ishikawa *et al.*, 2014; Higashi *et al.*, 2016). また, 直腸がん細胞を用いた *in vitro* 研究では, 放射線とシンバスタチンの併用により治療効果が増大することが報告されている (Karagkounis *et al.*, 2018). このように, スタチンは, 従来の治療法を補うネオアジュバントおよびアジュバント療法としての活用が期待される.

イヌがん細胞株間における ZEB, SNAI, CDH2 発現量の比較により, スタチン感受性の高い細胞の特徴として, ZEB1 または ZEB2 の顕著な高発現とそれに伴

う E-cadherin の欠如が見出された (図 14 および 16). ZEB は E-cadherin のプロモーターに結合し, その発現を抑制することで EMT を誘導する転写因子であり, 種々の抗がん剤に対する耐性との関連が報告されている (Arumugam *et al.*, 2009; Hanrahan *et al.*, 2017; Zou *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2019). スタチン感受性の高い細胞では ZEB が高発現していることから, ZEB2 ノックダウンとそれに伴う E-cadherin の発現増加が, スタチン感受性株に耐性をもたらすのではないかと考えたが, 予想に反して, スタチン耐性を獲得しなかった (図 18). これらの結果から, ZEB の高発現とそれに伴う E-cadherin の欠如は, スタチン高感受性株を識別するバイオマーカーとなりうる特徴である一方で, ZEB 自体がスタチン感受性をもたらすわけではないことが示唆された.

イヌ乳腺がん細胞を用いた先行研究では, ZEB1 および ZEB2 発現量の高い細胞は相対的に悪性度が高いことから, ZEB が治療標的となる可能性が報告されている (Xavier *et al.*, 2018). 同様に, ヒト大腸がん細胞を用いた研究においても, ZEB2 を過剰発現させることで腫瘍の増殖および転移性が高まり, ZEB2 を抑制すると逆の結果になることが報告されている (Li *et al.*, 2017). 本研究でも, ZEB2 を発現抑制することで細胞生存率が低下しており, さらにその効果はアトルバスタチンとの併用により増強された (図 18). 間葉系がん細胞のスタチン感受性は, ZEB2 の発現を抑制しても失われなかったことから, 悪性度の高い間葉系がん細胞に対する新たな治療法として, スタチンと ZEB 標的療法の併用が有効であることが示唆された.

なお, 本研究におけるアトルバスタチンの濃度は, 脂質異常症治療薬として用いられる値よりも高濃度である. イヌで臨床的に使用されているアトルバスタチンの用量は約 0.5–2 mg/kg/day であり, 忍容性が高く, 副作用や生化学的異常を誘発しないとされる (Cunningham *et al.*, 2013). 実験的には, 20 mg/kg/day を

2週間、または 10 mg/kg/day を 13 週間投与しても、臨床症状や病理組織学的病変は認められないとする報告がある (Walsh *et al.*, 1996). 同様に、イヌにおけるアトルバスタチンの毒性研究では、40 mg/kg/day を 1 週間投与しても忍容性が高く、この試験における 7 日目の最大血漿濃度は 166–1,535 ng/ml (0.30–2.75 μ M) であった (Herron *et al.*, 2015). これらの濃度は、本研究で用いた細胞のうち最も低い IC₅₀ 値 (5.92 μ M) よりも低かった. このように、臨床的に使用される濃度と制がん効果を発揮するために必要となる濃度の間に乖離があることは、先行研究でも同様に議論されている (Otahal *et al.*, 2020; Kobayashi *et al.*, 2021; Guerra *et al.*, 2021). この問題を解決するためには、適切なドラッグデリバリーシステムと組み合わせる方法や (Mekhail *et al.*, 2012), 前述した ZEB 標的療法のような他の化学療法剤と併用する方法などにより、臨床的に使用される濃度のスタチンでも制がん効果が得られるような治療法を確立する必要がある. また、スタチンの抗腫瘍効果は、*in vitro* で観察される直接的な増殖抑制のみならず、*in vivo* における血中コレステロール低下作用に伴う間接的な効果も考えられる. そのため、生体内におけるスタチン感受性がんの効果を生かすために必要な濃度が、臨床的に使用される濃度で達成できるか否かは今後の検討課題である.

結論として、スタチン感受性はイヌがん細胞株によって様々であり、ヒト同様に、その感受性は E-cadherin および vimentin の発現パターンと関連することが分かった. さらに、ZEB の高発現はスタチン高感受性株を識別するためのバイオマーカーとなりうることを明らかにした. しかしながら、ZEB そのものがスタチン感受性をもたらすわけではなく、スタチン感受性を決定する要因については未だ不明である. がん細胞におけるスタチン感受性を制御する分子メカニズムを明らかにするためには、さらなる研究が必要である.

総括

脂質異常症治療薬であるスタチンを医療・獣医療におけるがん治療へ応用することを旨とし、その大きな障壁となっているスタチン耐性がん細胞への対応に焦点を当て研究を行なった。

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供給に関わるメバロン酸経路および LDLR への依存度を耐性株—感受性株間で比較するとともに、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 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 [Ishikawa *et al.*, *Oncotarget*, 9(50):29304–29315, 2018].

II 章では、現在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、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、イヌがん細胞株に対してもスタチンは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 *ZEB* 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、*ZEB* が有用である可能性を示した。さらに、*ZEB* を標的とした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を示した [Ishikawa *et al.*, *Vet. Comp. Oncol.*, 20(1):313–323, 2022].

スタチンのがん治療への臨床応用に向けた今後の課題として、適切な投薬量・期間や、副作用リスクを十分に検討する必要がある。がんによりスタチン感受性が異なるため、現実的に使用可能な濃度で治療効果を示すような感受性がんを識別するバイオマーカーの確立が待たれる。また、バイオマーカーを確立する際には、それに基づきスタチン適応と判断される腫瘍が、実際の患者・患畜においてどれほどの割合で存在するのか実態調査を行うことも必要である。

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。少なくとも、細胞レベル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は医療・獣医療双方の発展に寄与する重要な研究である。スタチンのがん治療への応用に向けた研究成果は、現在のところ医学領域におけるものが大半であることから、当面はヒトを対象にして得られた研究成果をイヌで活用していくことが必要である。ひいては、獣医学領域におけるスタチン研究が発展し、そこで得られた新たな知見を医学領域に還元することができると期待される。

謝辞

本稿を終えるにあたり、学部学生時より懇切丁寧なご指導を賜りました鳥取大学獣医解剖学教室 割田克彦准教授に心より深謝申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり、多大なるご助言を賜りました鳥取大学獣医解剖学教室 保坂善真教授，ならびに本論文をご高閲賜りました山口大学獣医発生学研究室 加納聖教授，鳥取大学獣医病理学教室 森田剛仁教授，鳥取大学獣医生化学教室 樋口雅司准教授に厚く感謝申し上げます。

さらに、貴重な培養細胞を提供下さいました鳥取大学獣医外科学教室 大崎智弘准教授，鳥取大学獣医神経病・腫瘍学教室 山下真路准教授に心より感謝いたします。

最後になりますが、日頃からお世話になりました鳥取大学獣医解剖学教室の教室員の皆様に感謝いたします。

引用文献

- Ahmadi, M., Amiri, S., Pecic, S., Machaj, F., Rosik, J., Los, M. J., Alizadeh, J., Mahdian, R., da Silva Rosa, S. C., Schaafsma, D., Shojaei, S., Madrakian, T., Zeki, A. A. and Ghavami, S. 2020. Pleiotropic effects of statins: A focus on cancer. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1866(12)**:165968.
- Alizadeh, J., Zeki, A. A., Mirzaei, N., Tewary, S., Rezaei Moghadam, A., Glogowska, A., Nagakannan, P., Eftekharpour, E., Wiechec, E., Gordon, J. W., Xu, F. Y., Field, J. T., Yoneda, K. Y., Kenyon, N. J., Hashemi, M., Hatch, G. M., Hombach-Klonisch, S., Klonisch, T. and Ghavami, S. 2017. Mevalonate cascade inhibition by simvastatin induces the intrinsic apoptosis pathway via depletion of isoprenoids in tumor cells. *Sci. Rep.* **7**:44841.
- Amado, R. G., Wolf, M., Peeters, M., Van Cutsem, E., Siena, S., Freeman, D. J., Juan, T., Sikorski, R., Suggs, S., Radinsky, R., Patterson, S. D. and Chang, D. D. 2008. Wild-type *KRAS* is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **26(10)**:1626–1634.
- Arumugam, T., Ramachandran, V., Fournier, K. F., Wang, H., Marquis, L., Abbruzzese, J. L., Gallick, G. E., Logsdon, C. D., McConkey, D. J. and Choi, W. 2009. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer Res.* **69(14)**:5820–5828.
- Babcook, M. A., Shukla, S., Fu, P., Vazquez, E. J., Puchowicz, M. A., Molter, J. P., Oak, C. Z., MacLennan, G. T., Flask, C. A., Lindner, D. J., Parker, Y., Daneshgari, F. and Gupta, S. 2014. Synergistic simvastatin and metformin combination chemotherapy for osseous metastatic castration-resistant prostate cancer. *Mol. Cancer Ther.* **13**:2288–2302.
- Beckwitt, C. H., Clark, A. M., Ma, B., Whaley, D., Oltvai, Z. N. and Wells, A. 2018. Statins attenuate outgrowth of breast cancer metastases. *Br. J. Cancer* **119(9)**:1094–1105.

- Berndt, N., Hamilton, A. D. and Sebti, S. M. 2011. Targeting protein prenylation for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*. **11(11)**:775–791.
- Birchmeier, W. and Behrens, J. 1994. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim. Biophys. Acta*. **1198(1)**:11–26.
- Brown, M., Hart, C., Tawadros, T., Ramani, V., Sangar, V., Lau, M. and Clarke, N. 2012. The differential effects of statins on the metastatic behaviour of prostate cancer. *Br. J. Cancer* **106(10)**:1689–1696.
- Cervantes-Arias, A., Pang, L. Y. and Argyle, D. J. 2013. Epithelial-mesenchymal transition as a fundamental mechanism underlying the cancer phenotype. *Vet. Comp. Oncol.* **11(3)**:169–184.
- Chen, Y. and Hughes-Fulford, M. 2001. Human prostate cancer cells lack feedback regulation of low-density lipoprotein receptor and its regulator, SREBP2. *Int. J. Cancer* **91**: 41–45.
- Clendening, J. W., Pandyra, A., Boutros, P. C., El Ghamrasni, S., Khosravi, F., Trentin, G. A., Martirosyan, A., Hakem, A., Hakem, R., Jurisica, I. and Penn, L. Z. 2010a. Dysregulation of the mevalonate pathway promotes transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107(34)**:15051–15056.
- Clendening, J. W., Pandyra, A., Li, Z., Boutros, P. C., Martirosyan, A., Lehner, R., Jurisica, I., Trudel, S. and Penn, L. Z. 2010b. Exploiting the mevalonate pathway to distinguish statin-sensitive multiple myeloma. *Blood* **115**:4787–4797.
- Cunningham, S. M., Rush, J. E. and Freeman, L. M. 2013. Short-term effects of atorvastatin in normal dogs and dogs with congestive heart failure due to myxomatous mitral valve disease. *J. Vet. Intern. Med.* **27(4)**:985–989.
- Demierre, M. F., Higgins, P. D., Gruber, S. B., Hawk, E. and Lippman, S. M. 2005. Statins and cancer prevention. *Nature Reviews Cancer* **5**: 930–942.

- Elsayed, M., Kobayashi, D., Kubota, T., Matsunaga, N., Murata, R., Yoshizawa, Y., Watanabe, N., Matsuura, T., Tsurudome, Y., Ogino, T., Ohdo, S. and Shimazoe, T. 2016. Synergistic antiproliferative effects of zoledronic acid and fluvastatin on human pancreatic cancer cell lines: an *in vitro* study. *Biol. Pharm. Bull.* **39**:1238–1246.
- Fonseca-Alves, C. E., Kobayashi, P. E., Rivera-Calderón, L. G. and Laufer-Amorim, R. 2015. Evidence of epithelial–mesenchymal transition in canine prostate cancer metastasis. *Res. Vet. Sci.* **100**:176–181.
- Fontebasso, Y. and Dubinett, S. M. 2015. Drug Development for Metastasis Prevention. *Crit. Rev. Oncog.* **20(5-6)**:449–473.
- Freed-Pastor, W. A., Mizuno, H., Zhao, X., Langerod, A., Moon, S. H., Rodriguez-Barrueco, R., Barsotti, A., Chicas, A., Li, W., Polotskaia, A., Bissell, M. J., Osborne, T. F., Tian, B., Lowe, S. W., Silva, J. M., Borresen-Dale, A. L., Levine, A. J., Bargonetti, J. and Prives, C. 2012. Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway. *Cell* **148**:244–258.
- Gallagher, E. J., Zelenko, Z., Neel, B. A., Antoniou, I. M., Rajan, L., Kase, N. and LeRoith, D. 2017. Elevated tumor LDLR expression accelerates LDL cholesterol-mediated breast cancer growth in mouse models of hyperlipidemia. *Oncogene* **36(46)**:6462–6471.
- Goard, C. A., Chan-Seng-Yue, M., Mullen, P. J., Quiroga, A. D., Wasylshen, A. R., Clendening, J. W., Sendorek, D. H., Haider, S., Lehner, R., Boutros, P. C. and Penn, L. Z. 2014. Identifying molecular features that distinguish fluvastatin-sensitive breast tumor cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **143(2)**:301–312.
- Göbel, A., Rauner, M., Hofbauer, L. C. and Rachner, T. D. 2020. Cholesterol and beyond - The role of the mevalonate pathway in cancer biology. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **1873(2)**:188351.

- Göbel, A., Breining, D., Rauner, M., Hofbauer, L. C. and Rachner, T. D. 2019. Induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase mediates statin resistance in breast cancer cells. *Cell Death Dis.* **10(2)**:91.
- Goldstein, J. L. and Brown, M. S. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**:425–430.
- Gruenbacher, G., Gander, H., Nussbaumer, O., Nussbaumer, W., Rahm, A. and Thurnher, M. 2010. IL-2 costimulation enables statin-mediated activation of human NK cells, preferentially through a mechanism involving CD56⁺ dendritic cells. *Cancer Res.* **70(23)**:9611–9620.
- Guerra, B., Recio, C., Aranda-Tavío, H., Guerra-Rodríguez, M., García-Castellano, J. M. and Fernández-Pérez, L. 2021. The mevalonate pathway, a metabolic target in cancer therapy. *Front. Oncol.* **11**:626971.
- Gupta, G. P. and Massagué, J. 2006. Cancer metastasis: building a framework. *Cell* **127(4)**:679–695.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144(5)**:646–674.
- Hanrahan, K., O'Neill, A., Prencipe, M., Bugler, J., Murphy, L., Fabre, A., Puhr, M., Culig, Z., Murphy, K. and Watson, R. W. 2017. The role of epithelial–mesenchymal transition drivers ZEB1 and ZEB2 in mediating docetaxel-resistant prostate cancer. *Mol. Oncol.* **11(3)**:251–265.
- Heinrich, M. C., Corless, C. L., Demetri, G. D., Blanke, C. D., von Mehren, M., Joensuu, H., McGreevey, L. S., Chen, C. J., Van den Abbeele, A. D., Druker, B. J., Kiese, B., Eisenberg, B., Roberts, P. J., Singer, S., Fletcher, C. D., Silberman, S., Dimitrijevic, S. and Fletcher, J. A. 2003. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J. Clin. Oncol.* **21(23)**:4342–4349.
- Henderson, R., O'Kane, M., McGilligan, V. and Watterson, S. 2016. The genetics and screening of familial hypercholesterolaemia. *J. Biomed. Sci.* **23**:39.

- Herron, C. E., Brueckner, C. C., Chism, J. P., Kemp, D. C., Prescott, J. S., Smith, G. A., Melich, D. H., Oleas, N. and Polli, J. W. 2015. Toxicokinetics and toxicity of atorvastatin in dogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **289(1)**:117–123.
- Higashi, T., Hayashi, H., Kitano, Y., Yamamura, K., Kaida, T., Arima, K., Taki, K., Nakagawa, S., Okabe, H., Nitta, H., Imai, K., Hashimoto, D., Chikamoto, A., Beppu, T. and Baba, H. 2016. Statin attenuates cell proliferative ability via TAZ (WWTR1) in hepatocellular carcinoma. *Med. Oncol.* **33(11)**:123.
- Hoffman, J. M., Creevy, K. E., Franks, A., O'Neill, D. G. and Promislow, D. E. L. 2018. The companion dog as a model for human aging and mortality. *Aging Cell.* **17(3)**:e12737.
- Iannelli, F., Lombardi, R., Milone, M. R., Pucci, B., De Rienzo, S., Budillon, A. and Bruzzese, F. 2018. Targeting mevalonate pathway in cancer treatment: repurposing of statins. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* **13(2)**:184–200.
- 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. 2014. Statins inhibit tumor progression via an enhancer of zeste homolog 2-mediated epigenetic alteration in colorectal cancer. *Int. J. Cancer* **135(11)**:2528–2536.
- Ishikawa, T., Hosaka, Y. Z., Beckwitt, C., Wells, A., Oltvai, Z. N. and Warita, K. 2018. Concomitant attenuation of HMG-CoA reductase expression potentiates the cancer cell growth-inhibitory effect of statins and expands their efficacy in tumor cells with epithelial characteristics. *Oncotarget* **9(50)**:29304–29315.
- Ishikawa, T., Osaki, T., Sugiura, A., Tashiro, J., Warita, T., Hosaka, Y. Z and Warita, K. 2022. Atorvastatin preferentially inhibits the growth of high ZEB-expressing canine cancer cells. *Vet. Comp. Oncol.* **20(1)**:313–323.

- Jiang, P., Mukthavaram, R., Chao, Y., Nomura, N., Bharati, I. S., Fogal, V., Pastorino, S., Teng, D., Cong, X., Pingle, S. C., Kapoor, S., Shetty, K., Aggrawal, A., Vali, S., Abbasi, T., Chien, S. and Kesari, S. 2014. *In vitro* and *in vivo* anticancer effects of mevalonate pathway modulation on human cancer cells. *Br. J. Cancer* **111(8)**:1562–1571.
- Jourdan, J. P., Bureau, R., Rochais, C. and Dallemagne, P. 2020. Drug repositioning: a brief overview. *J. Pharm. Pharmacol.* **72(9)**:1145–1151.
- Karagkounis, G., DeVecchio, J., Ferrandon, S. and Kalady, M. F. 2018. Simvastatin enhances radiation sensitivity of colorectal cancer cells. *Surg. Endosc.* **32(3)**:1533–1539.
- Kobayashi, K., Baba, K., Kambayashi, S. and Okuda, M. 2021. Effect of simvastatin on cell proliferation and Ras activation in canine tumour cells. *Vet. Comp. Oncol.* **19**:99–108.
- Li, M. Z., Wang, J. J., Yang, S. B., Li, W. F., Xiao, L. B., He, Y. L. and Song, X. M. 2017. ZEB2 promotes tumor metastasis and correlates with poor prognosis of human colorectal cancer. *Am. J. Transl. Res.* **9(6)**:2838–2851.
- Longo, J., van Leeuwen, J. E., Elbaz, M., Branchard, E. and Penn, L. Z. 2020. Statins as anticancer agents in the era of precision medicine. *Clin. Cancer Res.* **26(22)**:5791–5800.
- Longo, J., Smirnov, P., Li, Z., Branchard, E., van Leeuwen, J. E., Licht, J. D., Haibe-Kains, B., Andrews, D. W., Keats, J. J., Pugh, T. J., Trudel, S. and Penn, L. Z. 2021. The mevalonate pathway is an actionable vulnerability of *t(4;14)*-positive multiple myeloma. *Leukemia.* **35(3)**:796–808.
- Luo, J., Yang, H. and Song, B. L. 2020. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21(4)**:225–245.
- Marcucci, F., Stassi, G. and De Maria, R. 2016. Epithelial-mesenchymal transition: a new target in anticancer drug discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **15(5)**:311–325.

- Mei, Z., Liang, M., Li, L., Zhang, Y., Wang, Q. and Yang, W. 2017. Effects of statins on cancer mortality and progression: A systematic review and meta-analysis of 95 cohorts including 1,111,407 individuals. *Int. J. Cancer* **140(5)**:1068–1081.
- Mekhail, G. M., Kamel, A. O., Awad, G. A. and Mortada, N. D. 2012. Anticancer effect of atorvastatin nanostructured polymeric micelles based on stearyl-grafted chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* **51(4)**:351–363.
- Moon, S. H., Huang, C. H., Houlihan, S. L., Regunath, K., Freed-Pastor, W. A., Morris, J. P. 4th, Tschaharganeh, D. F., Kastenhuber, E. R., Barsotti, A. M., Culp-Hill, R., Xue, W., Ho, Y. J., Baslan, T., Li, X., Mayle, A., de Stanchina, E., Zender, L., Tong, D. R., D'Alessandro, A., Lowe, S. W. and Prives, C. 2019. p53 Represses the Mevalonate Pathway to Mediate Tumor Suppression. *Cell* **176(3)**:564–580.
- Mullen, P. J., Yu, R., Longo, J., Archer, M. C. and Penn, L. Z. 2016. The interplay between cell signalling and the mevalonate pathway in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **16**:718–731.
- Nielsen, S. F., Nordestgaard, B. G. and Bojesen, S. E. 2012. Statin use and reduced cancer-related mortality. *N. Engl. J. Med.* **367**:1792–1802.
- Nieto, M. A., Huang, R. Y., Jackson, R. A and Thiery, J. P. 2016. EMT: 2016. *Cell* **166(1)**:21–45.
- Otahal, A., Aydemir, D., Tomasich, E. and Minichsdorfer, C. 2020. Delineation of cell death mechanisms induced by synergistic effects of statins and erlotinib in non-small cell lung cancer cell (NSCLC) lines. *Sci. Rep.* **10(1)**:959.
- Pennanen, P., Syväälä, H., Bläuer, M., Savinainen, K., Ylikomi, T., Tammela, T. L. and Murtola, T. J. 2016. The effects of metformin and simvastatin on the growth of LNCaP and RWPE-1 prostate epithelial cell lines. *Eur. J. Pharmacol.* **788**:160–167.

- Piccart-Gebhart, M. J., Procter, M., Leyland-Jones, B., Goldhirsch, A., Untch, M., Smith, I., Gianni, L., Baselga, J., Bell, R., Jackisch, C., Cameron, D., Dowsett, M., Barrios, C. H., Steger, G., Huang, C. S., Andersson, M., Inbar, M., Lichinitser, M., Láng, I., Nitz, U., Iwata, H., Thomssen, C., Lohrisch, C., Suter, T. M., Rüschoff, J., Suto, T., Greaorex, V., Ward, C., Straehle, C., McFadden, E., Dolci, M. S. and Gelber, R. D. 2005. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **353(16)**:1659–1672.
- Poly, T. N., Islam, M. M., Walther, B. A., Yang, H. C., Wu, C. C., Lin, M. C. and Li, Y. C. 2020. Association between Use of Statin and Risk of Dementia: A Meta-Analysis of Observational Studies. *Neuroepidemiology* **54(3)**:214–226.
- Shibue, T. and Weinberg, R. A. 2017. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14(10)**:611–629.
- Shinada, M., Saeki, K., Yoshitake, R., Eto, S., Tsuboi, M., Chambers, J. K., Uchida, K., Kato, D., Yoshimoto, S., Kamoto, S., Ikeda, N., Kinoshita, R., Fujita, N., Nishimura, R. and Nakagawa, T. 2020. Evaluation of epithelial and mesenchymal cell markers in canine urinary bladder transitional cell carcinoma. *Vet. J.* **266**:105571.
- Terry, S., Savagner, P., Ortiz-Cuaran, S., Mahjoubi, L., Saintigny, P., Thiery, J. P. and Chouaib, S. 2017. New insights into the role of EMT in tumor immune escape. *Mol. Oncol.* **11(7)**:824–846.
- Thurnher, M., Nussbaumer, O. and Gruenbacher, G. 2012. Novel aspects of mevalonate pathway inhibitors as antitumor agents. *Clin. Cancer Res.* **18(13)**:3524–3531.
- Torres, C. G., Olivares, A. and Stoore, C. 2015. Simvastatin exhibits antiproliferative effects on spheres derived from canine mammary carcinoma cells. *Oncol. Rep.* **33(5)**:2235–2244.
- Viswanathan, V. S., Ryan, M. J., Dhruv, H. D., Gill, S., Eichhoff, O. M., Seashore-Ludlow, B., Kaffenberger, S. D., Eaton, J. K., Shimada, K., Aguirre, A. J., Viswanathan, S. R., Chattopadhyay, S., Tamayo, P., Yang, W. S., Rees, M. G., Chen, S., Boskovic, Z. V., Javaid,

S., Huang, C., Wu, X., Tseng, Y. Y., Roider, E. M., Gao, D., Cleary, J. M., Wolpin, B. M., Mesirov, J. P., Haber, D. A., Engelman, J. A., Boehm, J. S., Kotz, J. D., Hon, C. S., Chen, Y., Hahn, W. C., Levesque, M. P., Doench, J. G., Berens, M. E., Shamji, A. F., Clemons, P. A., Stockwell, B. R. and Schreiber, S. L. 2017. Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway. *Nature* **547(7664)**:453–457.

Walsh, K. M., Albassam, M. A. and Clarke, D. E. 1996. Subchronic toxicity of atorvastatin, a hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor, in beagle dogs. *Toxicol. Pathol.* **24(4)**:468–476.

Wang, Z. S., Huang, H. R., Zhang, L. Y., Kim, S., He, Y., Li, D. L., Farischon, C., Zhang, K., Zheng, X., Du, Z. Y. and Goodin, S. 2017. Mechanistic Study of Inhibitory Effects of Metformin and Atorvastatin in Combination on Prostate Cancer Cells *in vitro* and *in vivo*. *Biol. Pharm. Bull.* **40**:1247–1254.

Warita, K., Warita, T., Beckwitt, C. H., Schurdak, M. E., Vazquez, A., Wells, A. and Oltvai, Z. N. 2014. Statin-induced mevalonate pathway inhibition attenuates the growth of mesenchymal-like cancer cells that lack functional E-cadherin mediated cell cohesion. *Sci. Rep.* **4**:7593.

Warita, K., Ishikawa, T., Sugiura, A., Tashiro, J., Shimakura, H., Hosaka, Y. Z., Ohta, K. I., Warita, T. and Oltvai, Z. N. 2021. Concomitant attenuation of HMGCR expression and activity enhances the growth inhibitory effect of atorvastatin on TGF- β -treated epithelial cancer cells. *Sci. Rep.* **11(1)**:12763.

Winter-Vann, A. M. and Casey, P. J. 2005. Post-prenylation-processing enzymes as new targets in oncogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **5**:405–412.

Wong, W. W., Clendening, J. W., Martirosyan, A., Boutros, P. C., Bros, C., Khosravi, F., Jurisica, I., Stewart, A. K., Bergsagel, P. L. and Penn, L. Z. 2007. Determinants of sensitivity to lovastatin-induced apoptosis in multiple myeloma. *Mol. Cancer Ther.* **6(6)**:1886–1897.

- Wu, D. M., Zhang, T., Liu, Y. B., Deng, S. H., Han, R., Liu, T., Li, J. and Xu, Y. 2019. The PAX6-ZEB2 axis promotes metastasis and cisplatin resistance in non-small cell lung cancer through PI3K/AKT signaling. *Cell Death Dis.* **10(5)**:349.
- Xavier, P. L. P., Cordeiro, Y. G., Rochetti, A. L., Sangalli, J. R., Zuccari, D. A., Silveira, J. C., Bressan, F. F. and Fukumasu, H. 2018. ZEB1 and ZEB2 transcription factors are potential therapeutic targets of canine mammary cancer cells. *Vet. Comp. Oncol.* **16(4)**:596–605.
- Yang, J., Antin, P., Berx, G., Blanpain, C., Brabletz, T., Bronner, M., Campbell, K., Cano, A., Casanova, J., Christofori, G., Dedhar, S., Derynck, R., Ford, H. L., Fuxe, J., García de Herreros, A., Goodall, G. J., Hadjantonakis, A. K., Huang, R. J. Y., Kalcheim, C., Kalluri, R., Kang, Y., Khew-Goodall, Y., Levine, H., Liu, J., Longmore, G. D., Mani, S. A., Massagué, J., Mayor, R., McClay, D., Mostov, K. E., Newgreen, D. F., Nieto, M. A., Puisieux, A., Runyan, R., Savagner, P., Stanger, B., Stemmler, M. P., Takahashi, Y., Takeichi, M., Theveneau, E., Thiery, J. P., Thompson, E. W., Weinberg, R. A., Williams, E. D., Xing, J., Zhou, B. P., Sheng, G. and EMT International Association (TEMTIA). 2020. Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21(6)**:341–352.
- Yang, L., Wang, X. W., Zhu, L. P., Wang, H. L., Wang, B., Zhao, Q. and Wang, X. Y. 2018. Significance and prognosis of epithelial-cadherin expression in invasive breast carcinoma. *Oncol. Lett.* **16(2)**:1659–1665.
- Yoshida, K., Yoshida, S., Choisunirachon, N., Saito, T., Matsumoto, K., Saeki, K., Mochizuki, M., Nishimura, R., Sasaki, N. and Nakagawa, T. 2014. The relationship between clinicopathological features and expression of epithelial and mesenchymal markers in spontaneous canine mammary gland tumors. *J. Vet. Med. Sci.* **76(10)**:1321–1327.
- Yu, R., Longo, J., van Leeuwen, J. E., Mullen, P. J., Ba-Alawi, W., Haibe-Kains, B. and Penn, L. Z. 2018. Statin-induced cancer cell death can be mechanistically uncoupled from prenylation of RAS family proteins. *Cancer Res.* **78(5)**:1347–1357.

Zhong, S., Zhang, X., Chen, L., Ma, T., Tang, J. and Zhao, J. 2015. Statin use and mortality in cancer patients: Systematic review and meta-analysis of observational studies. *Cancer. Treat. Rev.* **41(6)**:554–567.

Zhou, B., Xiang, J., Jin, M., Zheng, X., Li, G. and Yan, S. 2021. High vimentin expression with E-cadherin expression loss predicts a poor prognosis after resection of grade 1 and 2 pancreatic neuroendocrine tumors. *BMC Cancer* **21(1)**:334.

Zou, J., Liu, L., Wang, Q., Yin, F., Yang, Z., Zhang, W. and Li, L. 2017. Downregulation of miR-429 contributes to the development of drug resistance in epithelial ovarian cancer by targeting ZEB1. *Am. J. Transl. Res.* **9(3)**:1357–1368.

付表・付図

表 1. リアルタイム RT-PCR に用いたプライマー配列

Gene	Accession No.	Primer Sequence	Amplicon Size (bp)	Efficiency (%)	Cross Intron
<i>HMGCR</i>	NM_000859.2	5'-AGGAACCTGAAATTGAACTT-3' 5'-TAACTGTCGGCGAATAGATA-3'	200	98.8	yes
<i>LDLR</i>	NM_000527.4	5'-TACAAGTGGGTCTGCGATGG-3' 5'-TGAAGTCCCCGGATTGTCAG-3'	97	96.1	yes
<i>GAPDH</i>	NM_002046.7	5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3' 5'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3'	238	101.8	yes
<i>HMGCR*</i>	NM_000859.2	5'-CCCAGCCTACAAGTTGGAAA-3' 5'-AACCAAGCTCCCATCACCAAG-3'	152	101.8	yes
<i>LDLR*</i>	NM_000527.4	5'-TCACTCCATCTCAAGCATCG-3' 5'-GGTGGTCTCTCACACCAGT-3'	268	97.2	yes
<i>GGPS1*</i>	NM_001037277.1	5'-CACTTGGGCTCTTTTTCCAA-3' 5'-GCGCAAGATATTCTGCACCT-3'	170	88.6	no

*For assessing the efficiency of siRNA transfection

表 2. リアルタイム RT-PCR に用いたイヌ遺伝子特異的プライマー配列

Gene	Accession No.	Primer Sequence	Amplicon Size (bp)	Efficiency (%)	Cross Intron
<i>CDH1</i>	NM_001287125.2	5'-GGTGCTCACATTTCCCAGTT-3' 5'-AAATGGGCCTTTCTCGTTTT-3'	100	98.8	no
<i>VIM</i>	NM_001287023	5'-ATTGCTCTGCCTCTTCCAAA-3' 5'-GGCAAGCTTCACTCAAGGTC-3'	179	95.3	yes
<i>ACTB</i>	NM_001195845	5'-GGTGAGAGGTGGATTGAG-3' 5'-CCAGAACTTTGAGAAATAGGG-3'	79	94.2	no
<i>ZEB1</i>	XM_003638879.5	5'-ACGATGAGCAGCCTCAATCT-3' 5'-GGCTCTTCTTGTGCACCTTC-3'	217	101	no
<i>ZEB2</i>	XM_005631964.3	5'-ACGACATTCTGCAAGCCTCT-3' 5'-GTGTCAGTGCAGCTGAAGGTA-3'	217	91.3	yes
<i>SNAI1</i>	XM_025470381.1	5'-AAGACCTGTTCCCGAACCTT-3' 5'-AGCAGCCTGATTCTTGGTGT-3'	64	95.3	no
<i>SNAI2</i>	NM_001097981.1	5'-CGTTTTCCAGACCCTGGTTA-3' 5'-GCAGTGAGGGCAAGAAAAG-3'	77	98.8	yes
<i>CDH2</i>	NM_001287156.1	5'-CAGCAATGACGGCTTAGTCA-3' 5'-TGGCACTTGATTTTCAGCAG-3'	94	87.3	yes
<i>ZEB2*</i>	XM_005631964.3	5'-AAAGCTTCTCTGGTCCCATT-3' 5'-GTTGATGGGGCTTGTCAATC-3'	188	83.3	no

*For assessing the efficiency of siRNA transfection

表 3. リアルタイム RT-PCR に用いたヒト遺伝子特異的プライマー配列

Gene	Accession No.	Primer Sequence	Amplicon Size (bp)	Efficiency (%)	Cross Intron
ZEB1	NM_001174096.2	5'-TTCTCACA CTCTGGGTCTTATTC-3' 5'-TTCTTCCATCTCTTTATCCTCCT-3'	243	92.0	no
ZEB2	NM_014795.4	5'-TTCTGCGACATAAATACG-3' 5'-GAGTGAAGCCTTGAGTGC-3'	109	87.6	yes

表 4. イヌがん細胞株の増殖に対するアトルバスタチンの 50%阻害濃度 (IC₅₀)

	IC ₅₀ (48 h, μM)
KOH (Mammary gland tumour)	71.5
SNP (Mammary gland tumour)	41.2
UBCLN (Squamous cell carcinoma)	37.5
HDC (Lung cancer)	31.6
Gal (Squamous cell carcinoma)	17.7
LuBi (Lung cancer)	14.0
JDM (Lung cancer)	10.2
YCC (Melanoma)	9.56
ITP (Melanoma)	9.16
UBC (Squamous cell carcinoma)	7.18
HTR (Melanoma)	5.92

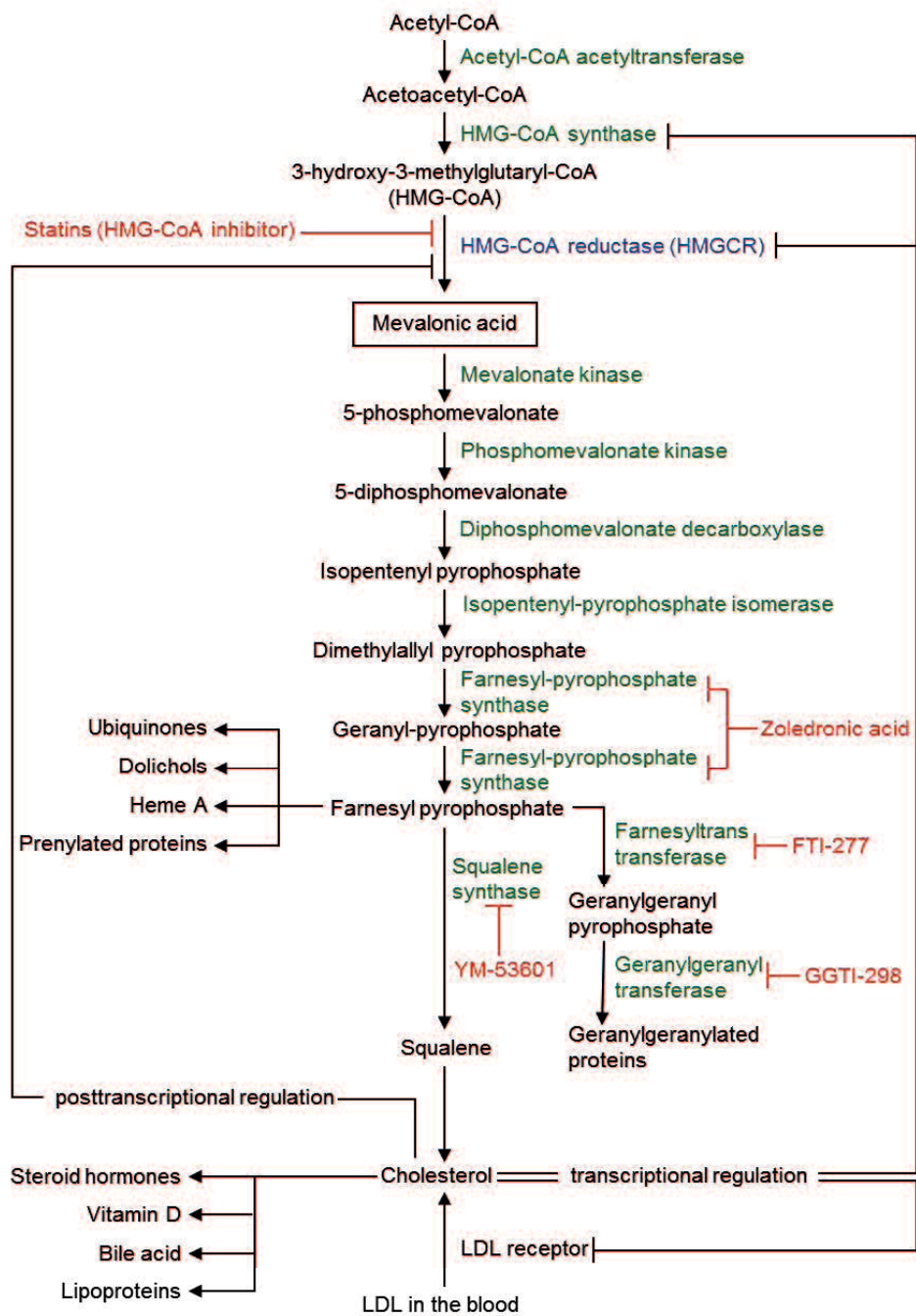


図 1. メバロン酸経路の概略図

メバロン酸経路の律速酵素である HMGCR (青字), 各反応を触媒する酵素 (緑字), およびその化学阻害剤 (赤字) を示す.

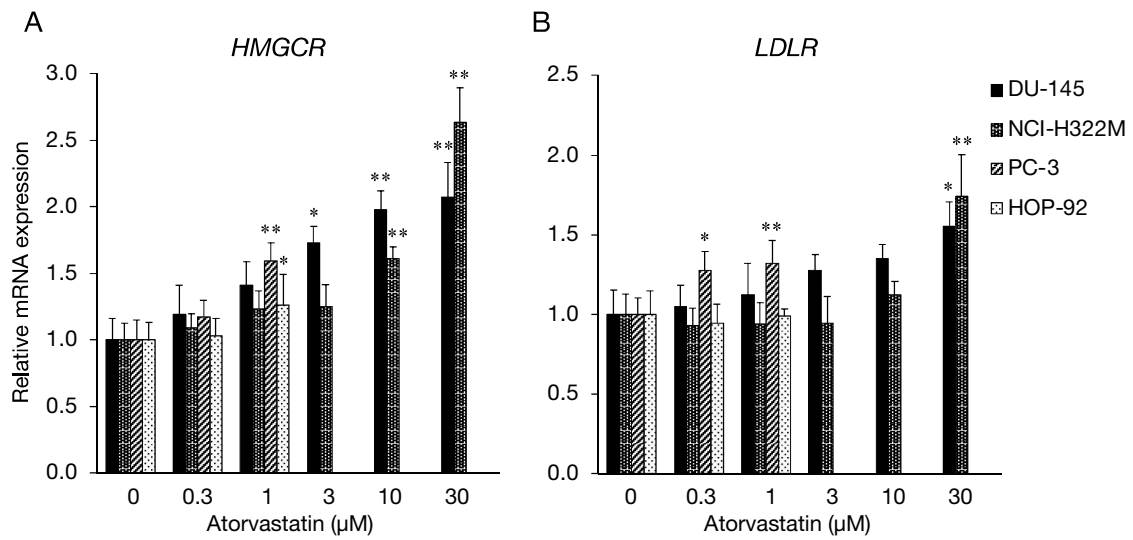


図 2. アトルバスタチン添加による *HMGCR* および *LDLR* 発現量の変化
 0.3–30 μM のアトルバスタチンを添加して 48 時間後における (A) *HMGCR* および (B) *LDLR* 発現量をリアルタイム RT-PCR により解析した. 各サンプルを *GAPDH* 発現量で補正し, 対照群 (0 μM) との比で示した. mean ± SD (n = 5), * p < 0.05, ** p < 0.01 compared to control group.

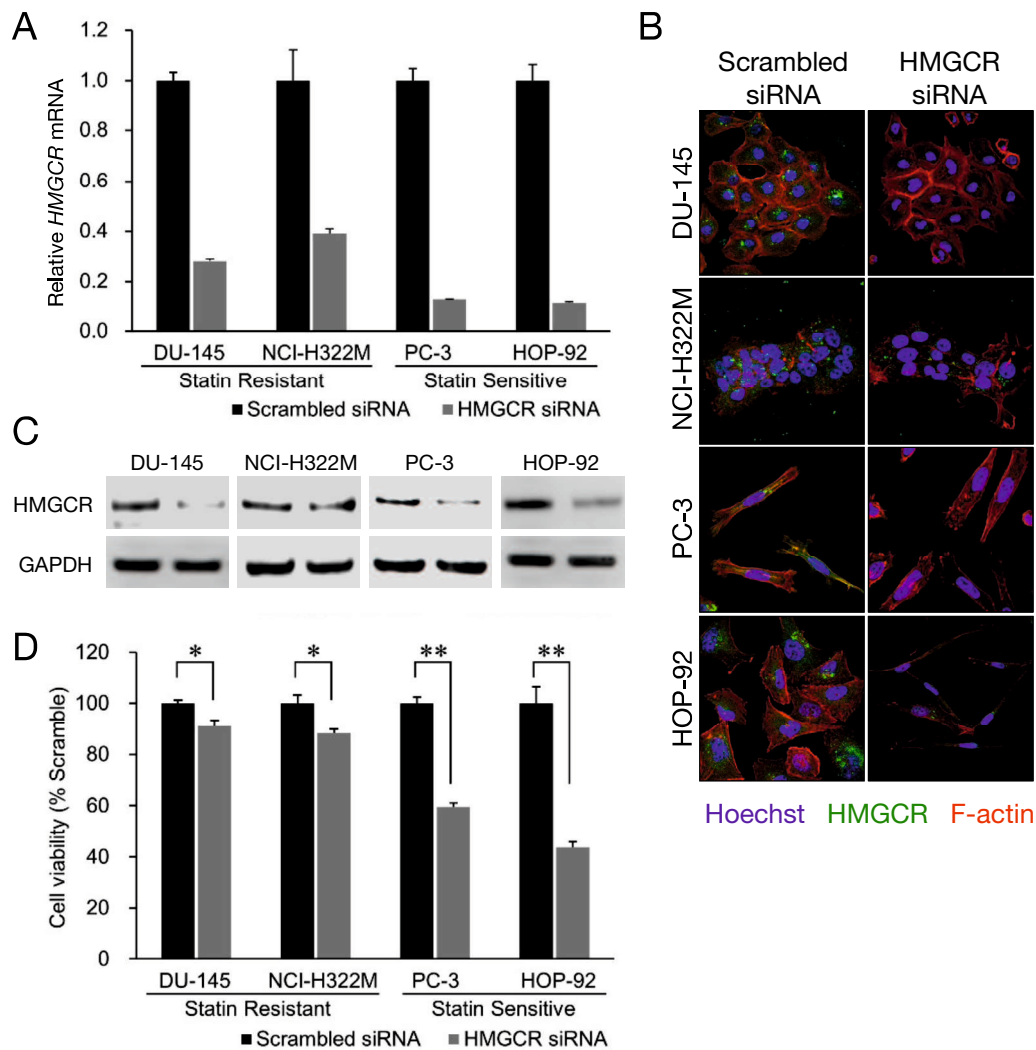


図 3. *HMGCR* の発現抑制が細胞生存率に及ぼす影響

(A) siRNA による *HMGCR* 発現の抑制をリアルタイム RT-PCR により確認した。各サンプルを *GAPDH* 発現量で補正し、対照群との比で示した。mean \pm SD (n = 3)。 (B) 免疫細胞化学染色および (C) ウェスタンブロッティングにより *HMGCR* のタンパクレベルでの抑制効果を確認した。各細胞株の左レーンが対照群、右レーンが *HMGCR* siRNA 処置群。 (D) siRNA 導入後、72 時間における細胞生存率を解析した。mean \pm SD (n = 3)。* p < 0.05, ** p < 0.01

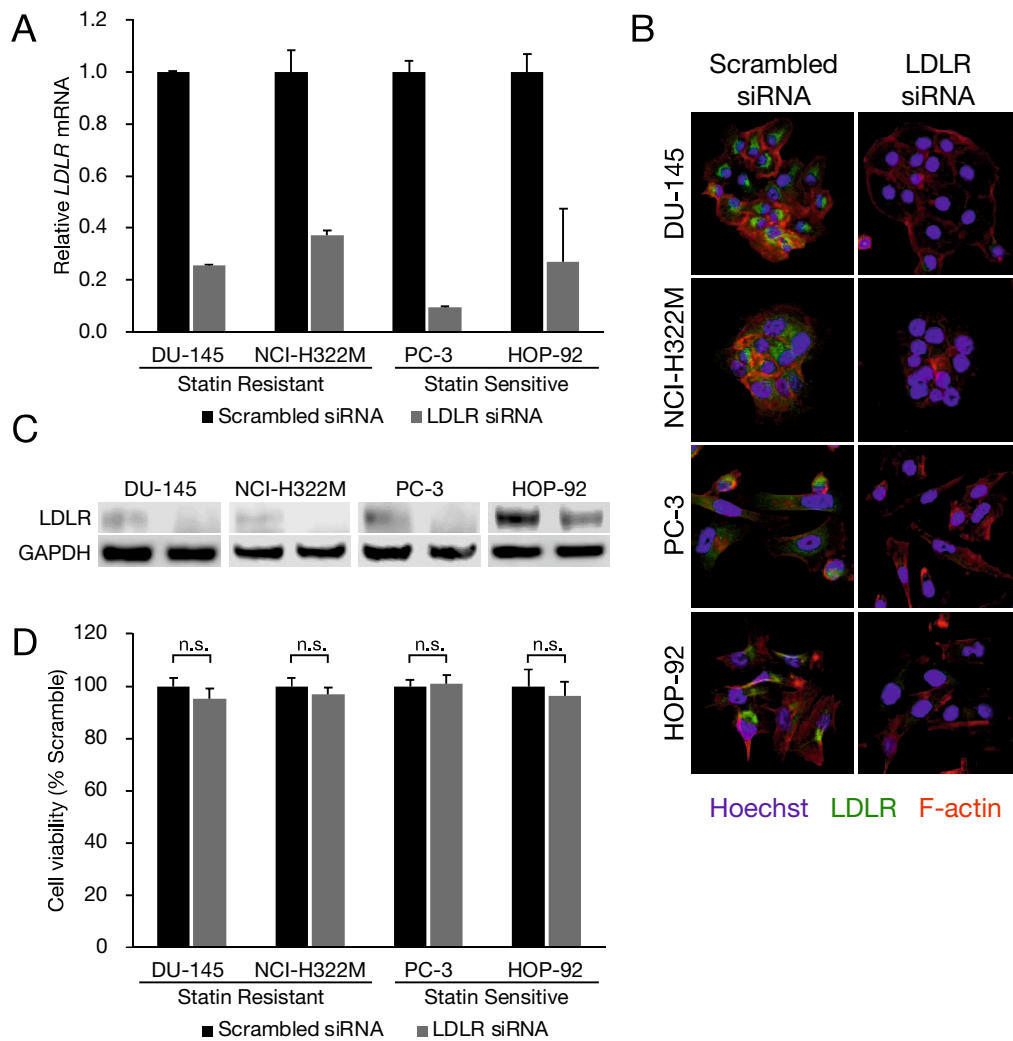


図 4. *LDLR* の発現抑制が細胞生存率に及ぼす影響

(A) siRNA による *LDLR* 発現の抑制をリアルタイム RT-PCR により確認した。各サンプルを *GAPDH* 発現量で補正し、対照群との比で示した。mean \pm SD (n = 3)。 (B) 免疫細胞化学染色および (C) ウェスタンブロッティングにより *LDLR* のタンパクレベルでの抑制効果を確認した。各細胞株の左レーンが対照群、右レーンが *LDLR* siRNA 処置群。 (D) siRNA 導入後、72 時間における細胞生存率を解析した。mean \pm SD (n = 3)。

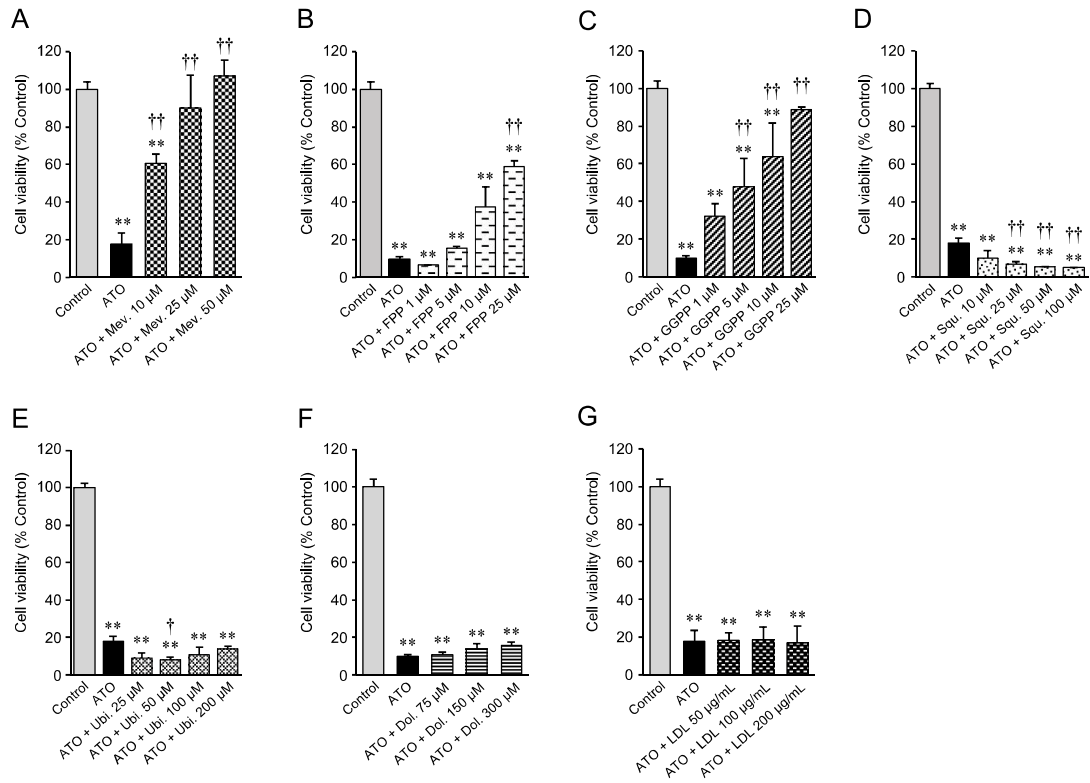


図 5. メバロン酸経路中間産物がアトルバスタチンによる細胞死に及ぼす影響
HOP-92 に 10 μ M アトルバスタチン (ATO) とともに (A) メバロン酸, (B) FPP, (C) GGPP, (D) スクアレン, (E) ユビキノン, (F) ドリコール, (G) LDL を各濃度で添加し, 48 時間培養後における細胞生存率. mean \pm SD (n = 3). ** p < 0.01 compared to control, \dagger p < 0.05, $\dagger\dagger$ p < 0.01 compared to the ATO-treated positive cells.

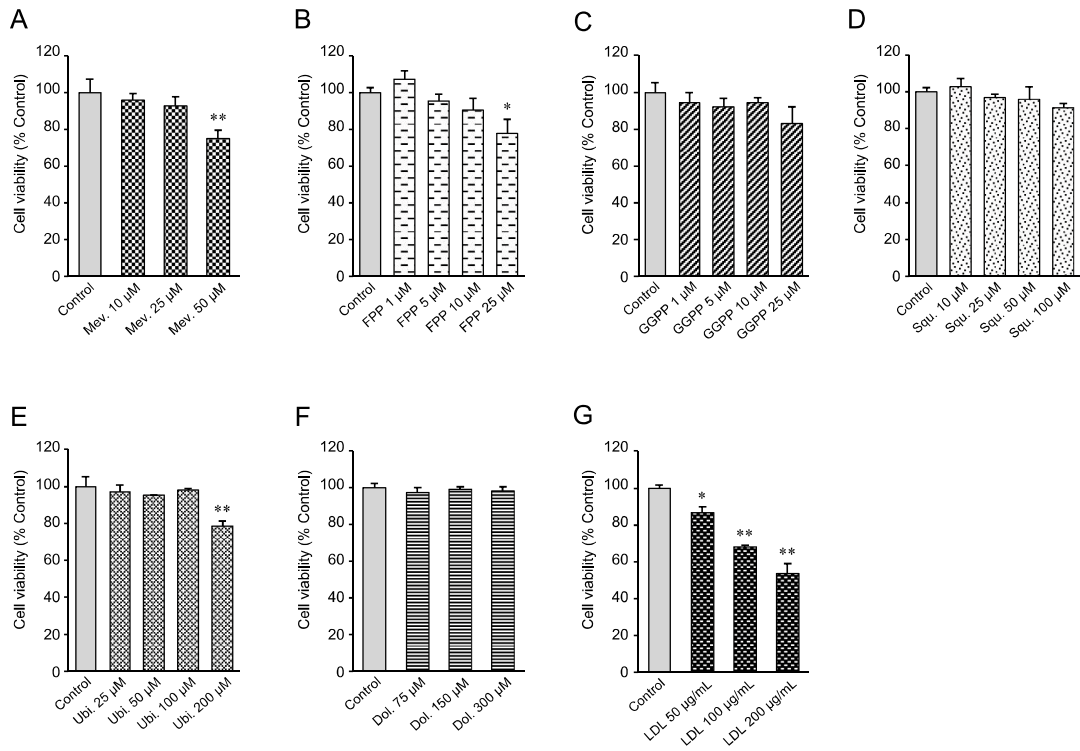


図 6. メバロン酸経路中間産物が細胞生存率に及ぼす影響

HOP-92 に (A) メバロン酸, (B) FPP, (C) GGPP, (D) スクアレン, (E) ユビキノン, (F) ドリコール, (G) LDL を各濃度で添加し, 48 時間培養後における細胞生存率. mean \pm SD (n = 3). ** p < 0.05, ** p < 0.01 compared to control group.

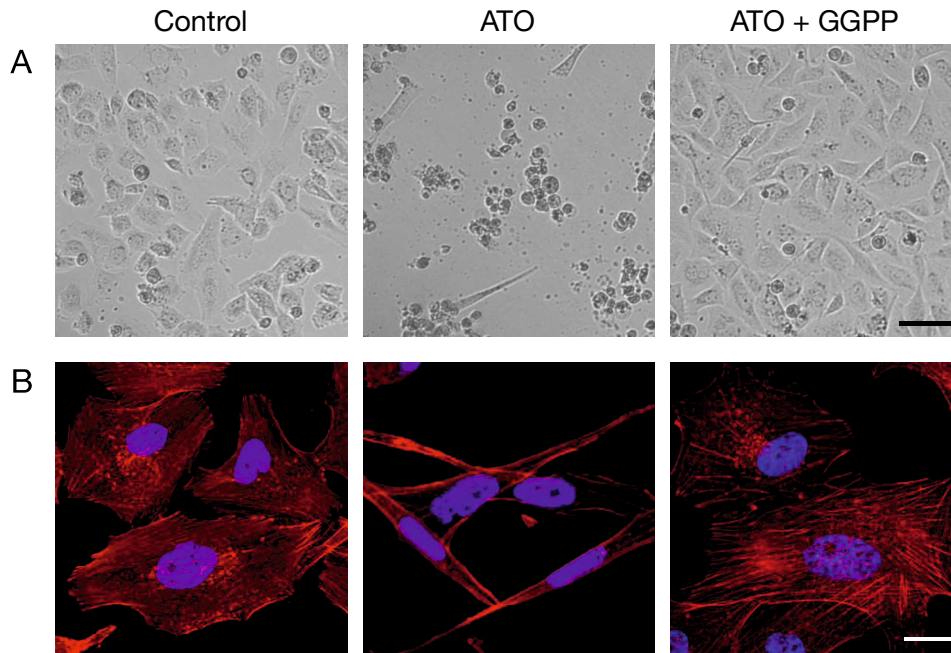


図 7. アトルバスタチンと GGPP を共添加したときの細胞の形態

HOP-92 に 10 μ M アトルバスタチン (ATO) 単独, または 25 μ M GGPP を共添加し, 48 時間培養したときの (A) 顕像 (Scale bar: 100 μ m) および (B) 蛍光染色像 (赤: F-actin, 青: Hoechst 33342, Scale bar: 20 μ m)

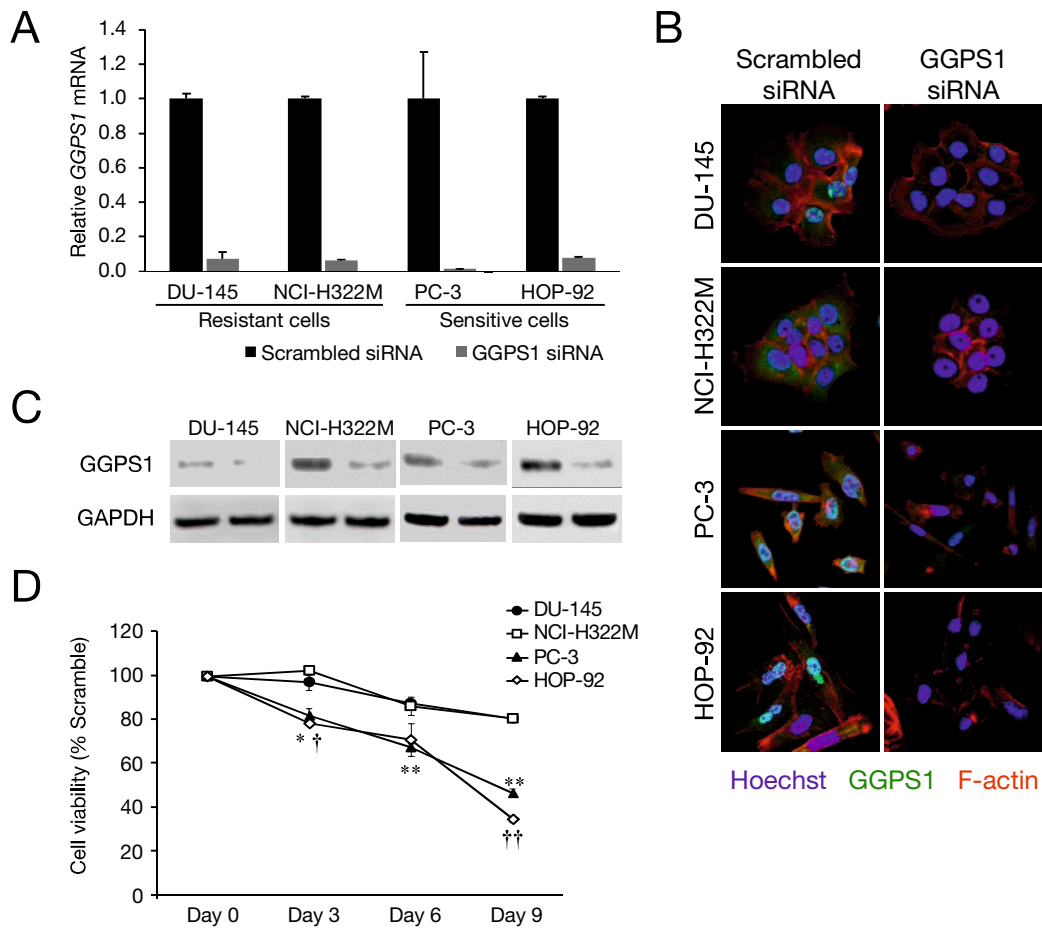


図 8. *GGPS1* の発現抑制が細胞生存率に及ぼす影響

(A) siRNA による *GGPS1* 発現の抑制をリアルタイム RT-PCR により確認した. 各サンプルを *GAPDH* 発現量で補正し, 対照群との比で示した. mean \pm SD (n = 3). (B) 免疫細胞化学染色および (C) ウェスタンブロッティングにより *GGPS1* のタンパクレベルでの抑制効果を確認した. 各細胞株の左レーンが対照群, 右レーンが *GGPS1* siRNA 処置群. (D) siRNA 導入後, 3, 6, 9 日における細胞生存率を解析した. mean \pm SD (n = 3). * p < 0.05, ** p < 0.01 (PC-3 vs. DU-145 at the same point in time), † p < 0.05, †† p < 0.01 (HOP-92 vs. NCI-H322M at the same point in time).

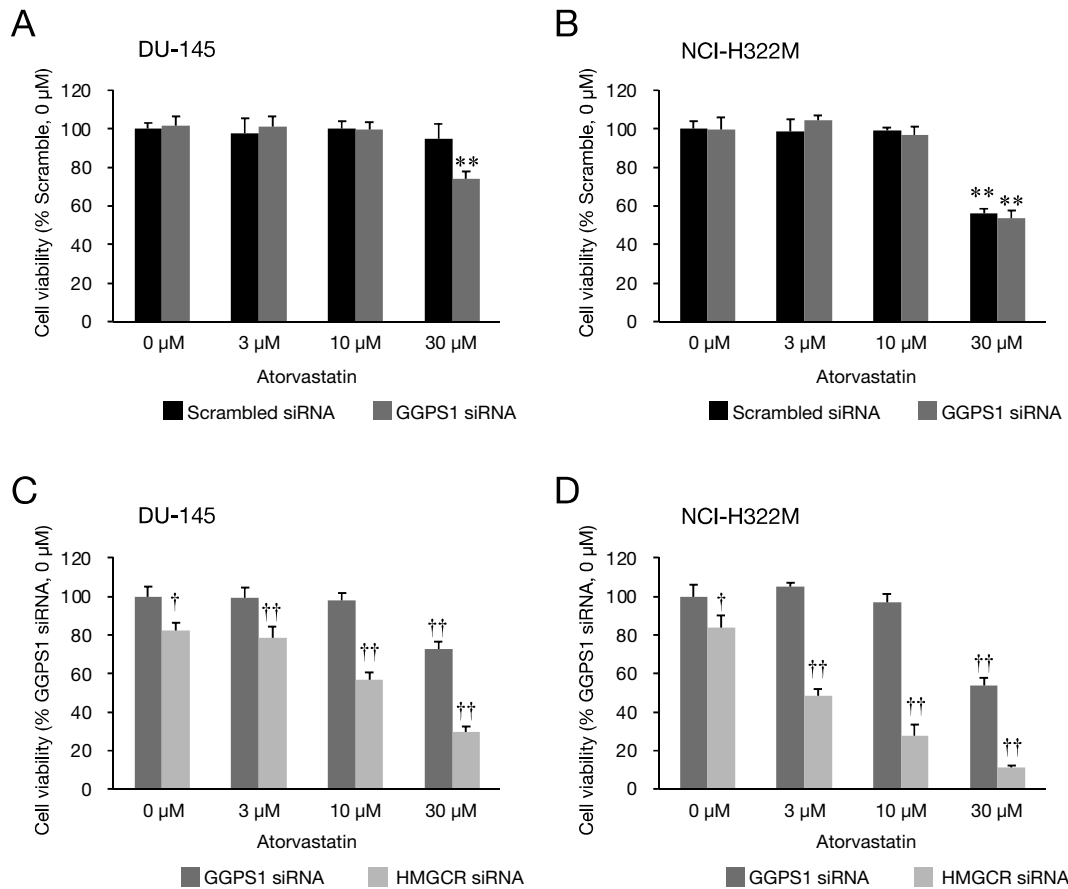


図 9. GGPS1 および HMGR 発現抑制がスタチン感受性に及ぼす影響

GGPS1 および HMGR 発現を抑制し、3–30 μM アトルバスタチンを添加して 72 時間培養後における (A, C) DU-145 および (B, D) NCI-H322M の細胞生存率. mean ± SD (n = 3). ** p < 0.01 Comparison with scrambled siRNA-treated vehicle control cells, † p < 0.05, †† p < 0.01 Comparison with GGPS1 siRNA-treated vehicle control cells.

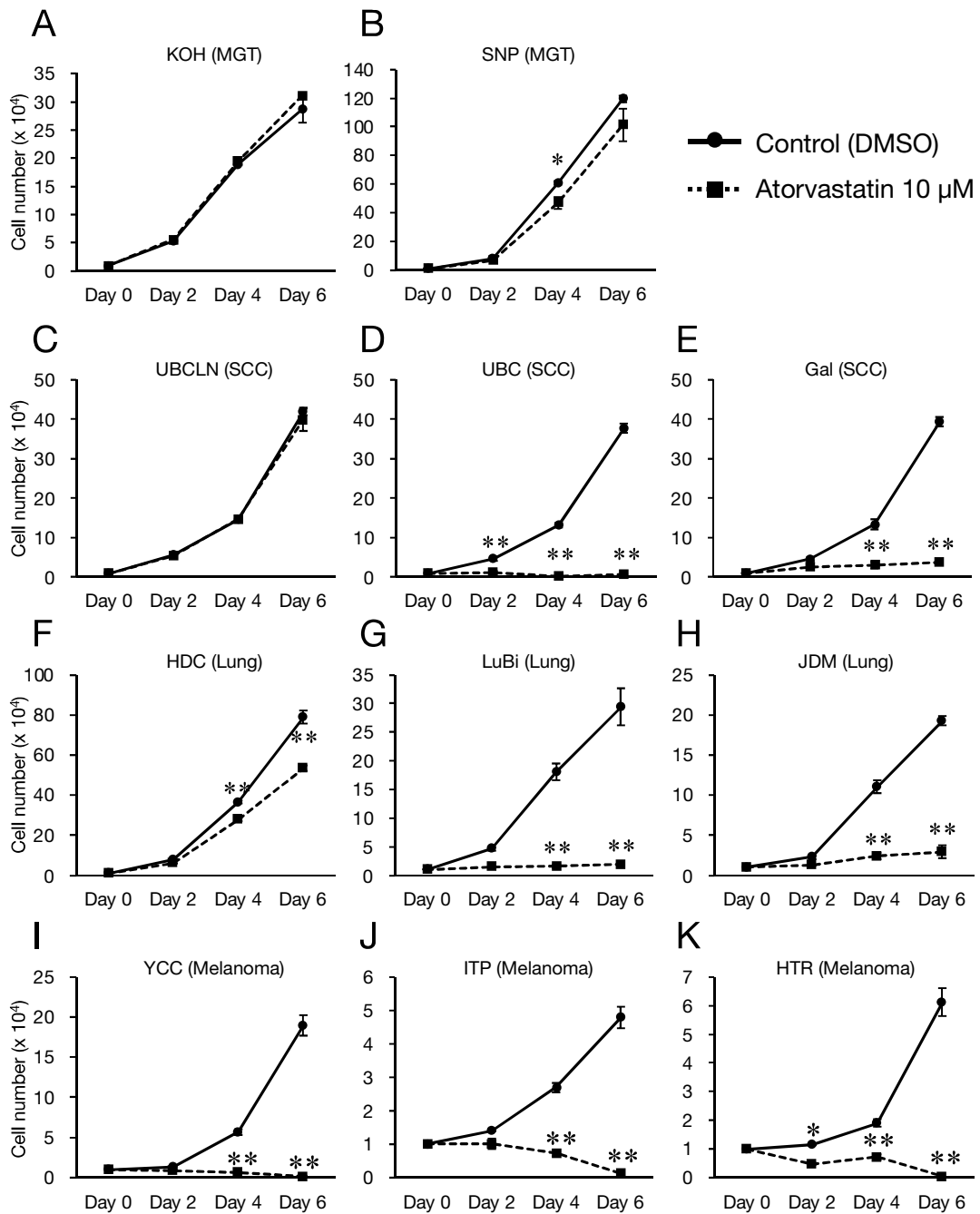


図 10. イヌがん細胞株の増殖に対するアトルバスタチンの影響

乳腺がん (MGT; A. KOH and B. SNP), 扁平上皮がん (SCC; C. UBCLN, D. UBC, and E. Gal), 肺がん (F. HDC, G. LuBi, and H. JDM), メラノーマ (I. YCC, J. ITP, and K. HTR) 由来の各細胞株を 10 μ M アトルバスタチン (破線) または DMSO (実線) で処置し, 2, 4, 6 日後における細胞数を測定した。

mean \pm SD (n = 3), * p < 0.05, ** p < 0.01 compared to the vehicle control group.

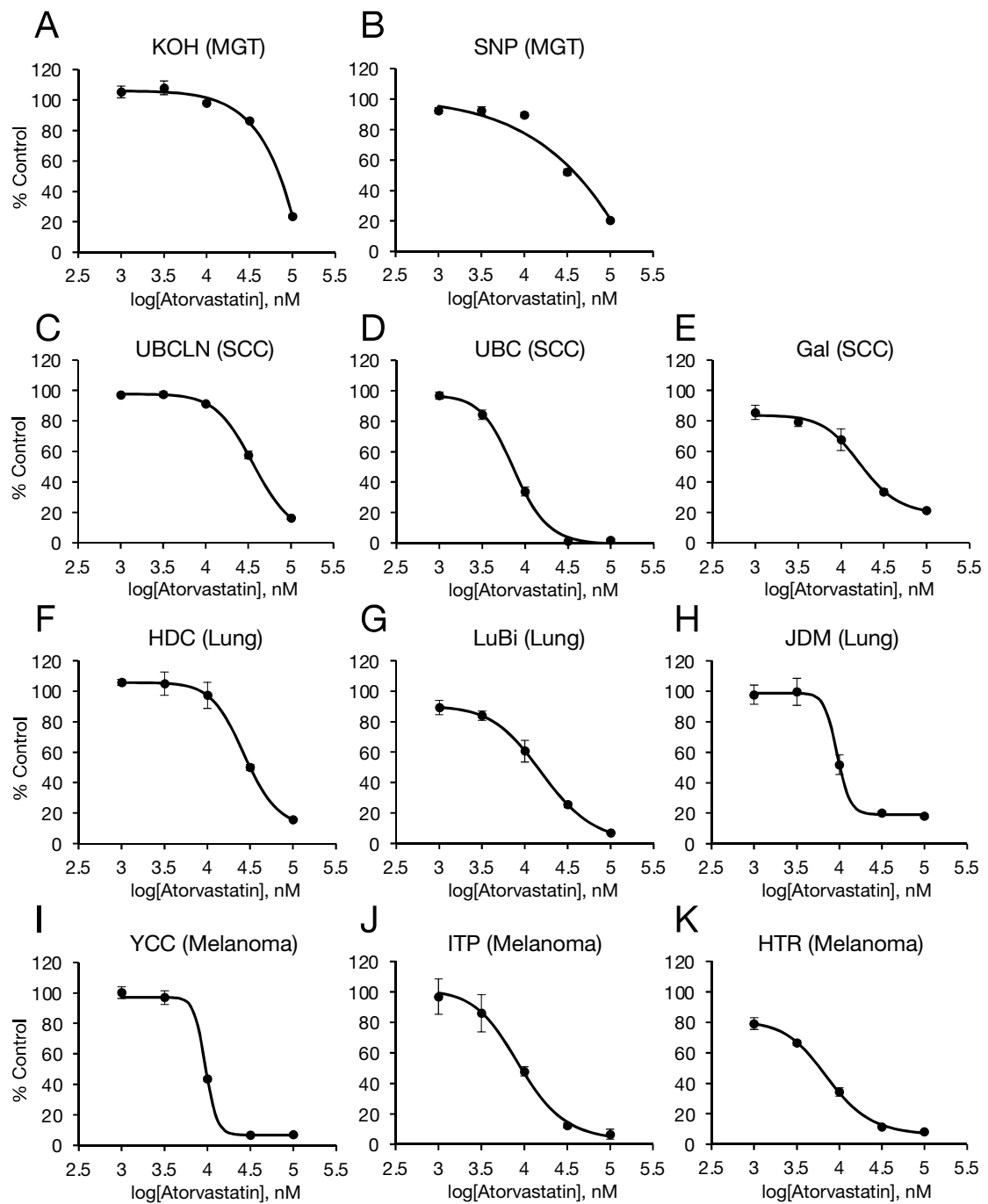
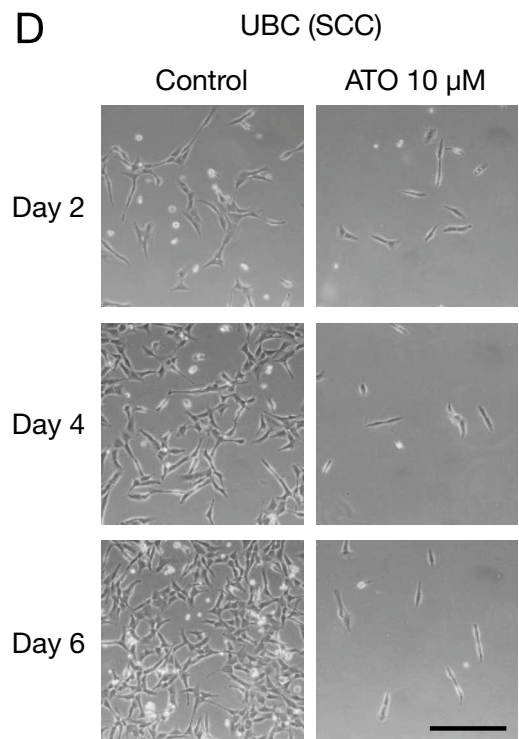
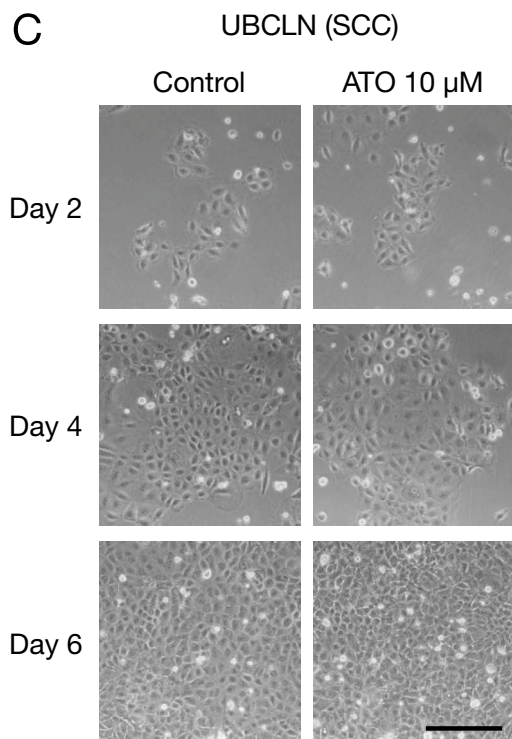
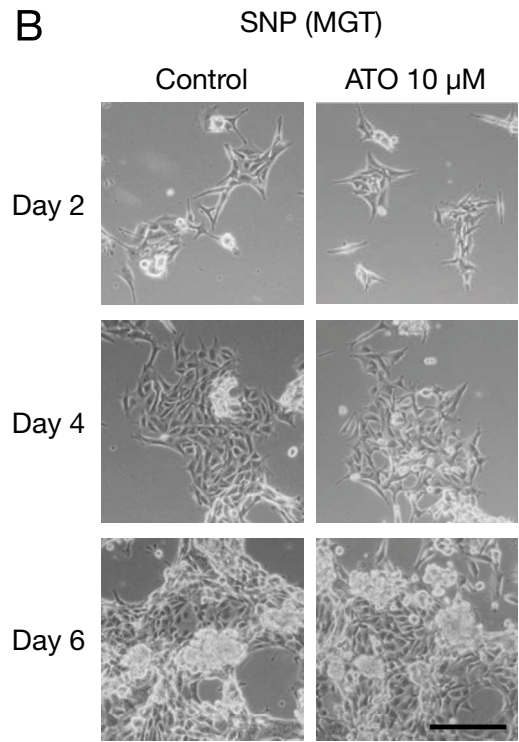
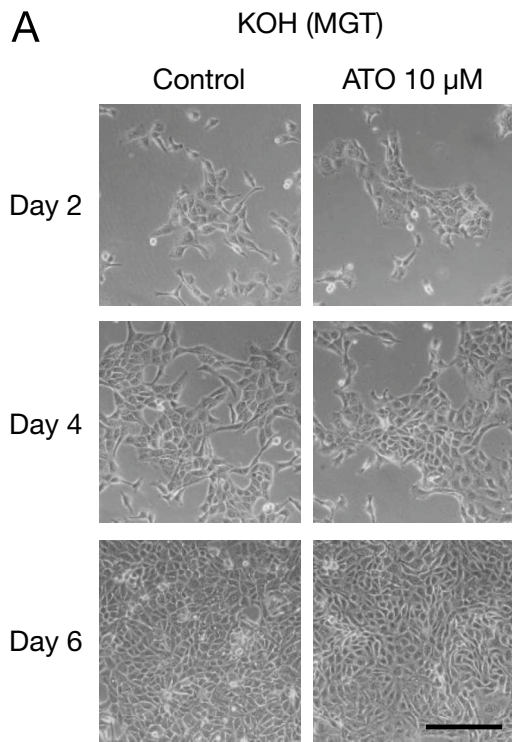
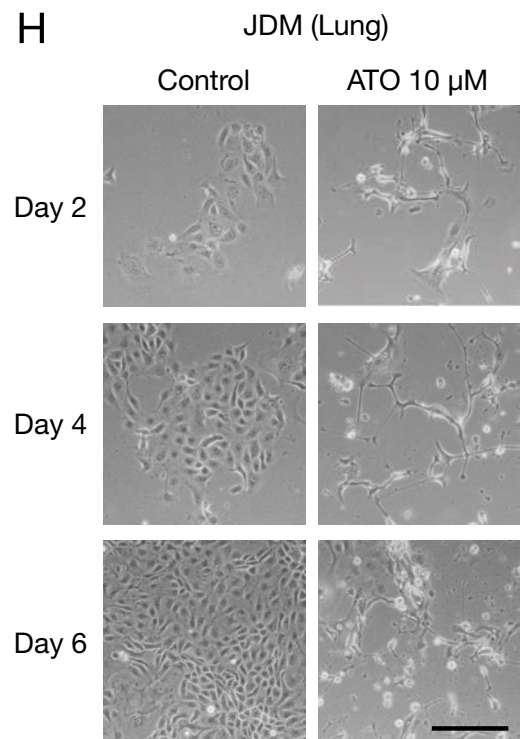
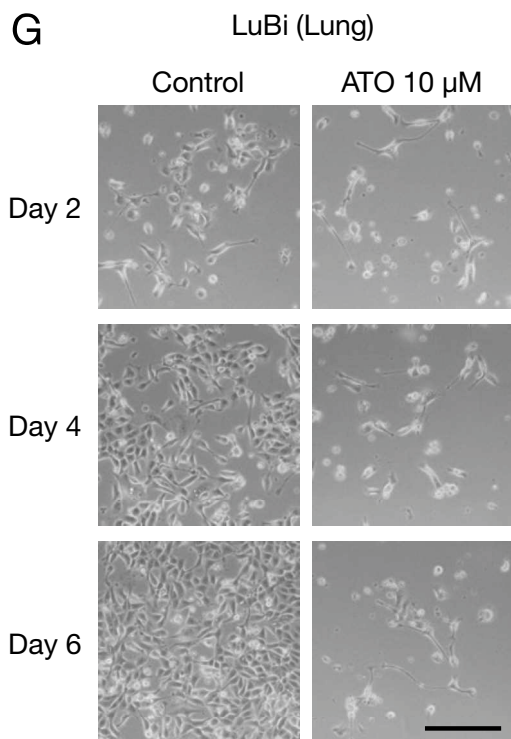
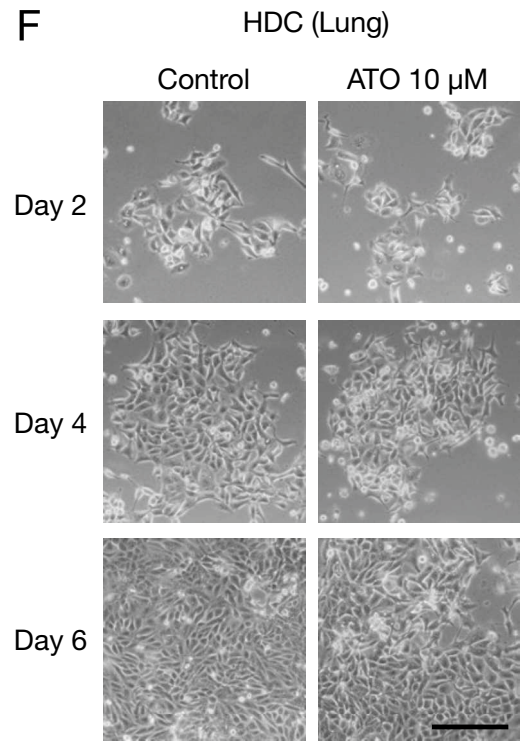
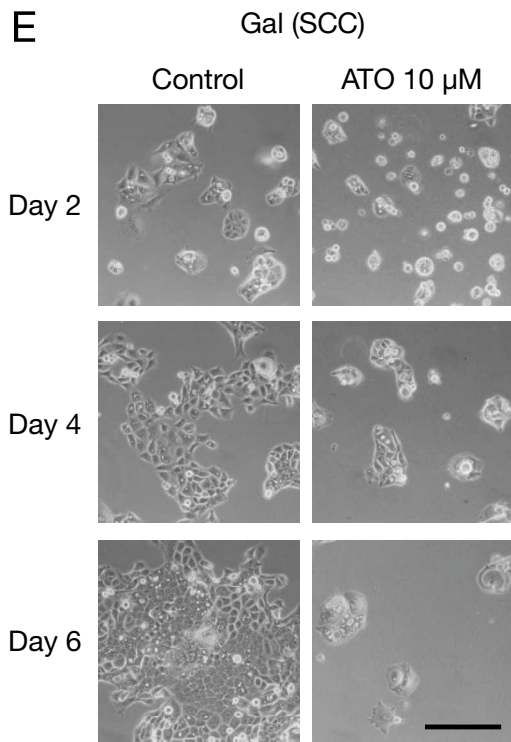


図 11. アトルバスタチン処置時におけるイヌがん細胞株の細胞生存率曲線
 乳腺がん (MGT; A. KOH and B. SNP), 扁平上皮がん (SCC; C. UBCLN, D. UBC, and E. Gal), 肺がん (F. HDC, G. LuBi, and H. JDM), メラノーマ (I. YCC, J. ITP, and K. HTR) 由来の各細胞株を用い, 各濃度のアトルバスタチン (1, 3, 10, 30, 100 μ M) で 48 時間処置したときの細胞数を測定し, 対照群 (DMSO) の細胞数で除することで細胞生存率を算出した。





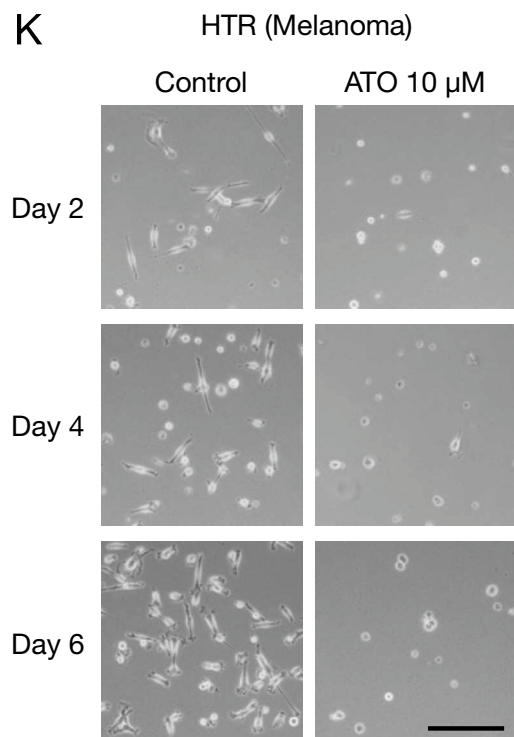
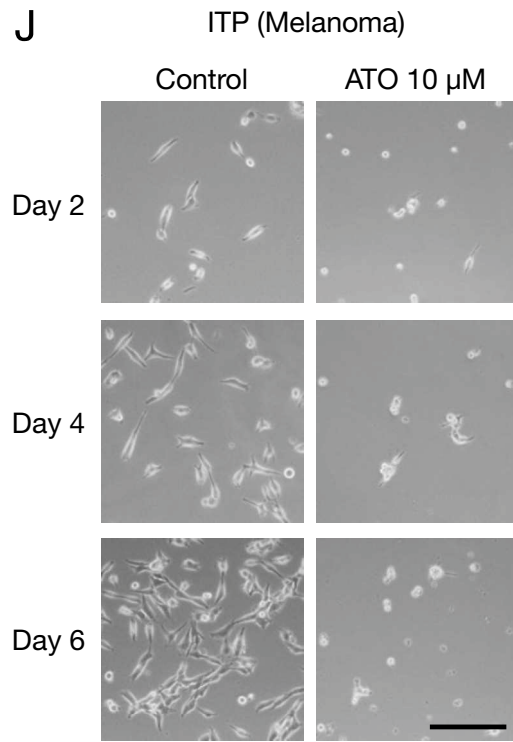
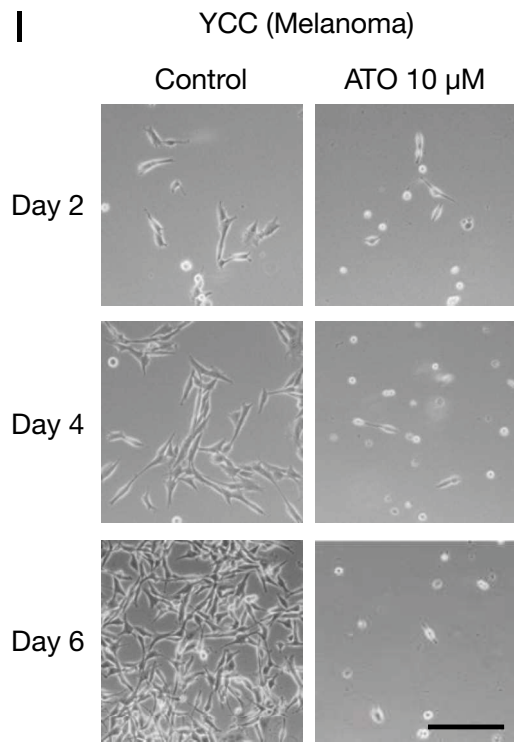
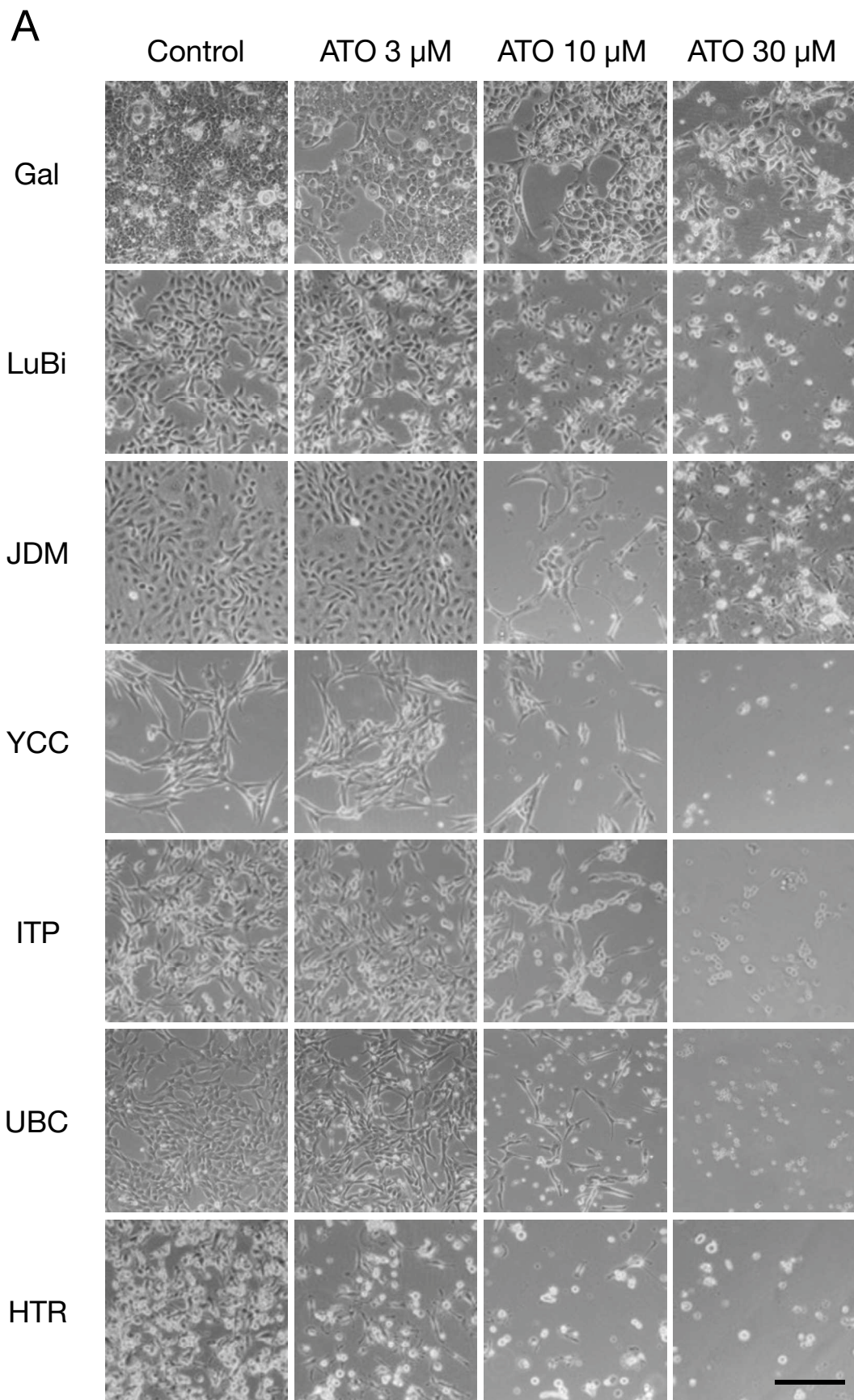


図 12. アトルバスタチン添加後のイヌがん細胞株の経時的観察像
 乳腺がん (MGT; A. KOH and B. SNP), 扁平上皮がん (SCC; C. UBCLN, D. UBC, and E. Gal), 肺がん (F. HDC, G. LuBi, and H. JDM), メラノーマ (I. YCC, J. ITP, and K. HTR) 由来の各細胞株を 10 μ M アトルバスタチン (ATO) または DMSO (Control) で処置し, 2, 4, 6 日培養後における光顕像. Scale bar: 500 μ m



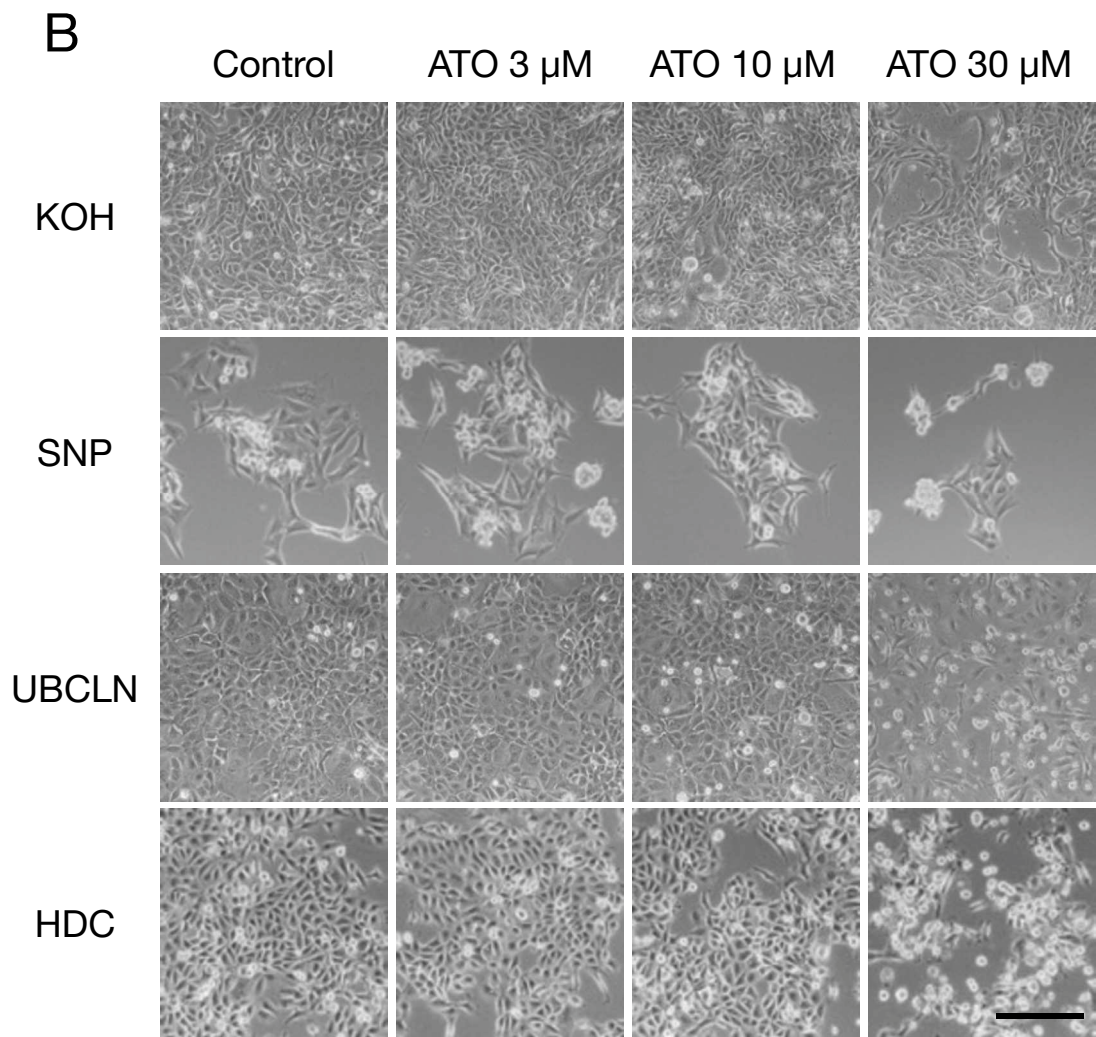


図 13. イヌがん細胞株に対するアトルバスタチンの濃度依存的な影響

(A) スタチン感受性株および (B) スタチン耐性株に対し、各濃度のアトルバスタチン (ATO; 3, 10, 30 μM) または DMSO (Control) で 48 時間処置したときの光顕像. Scale bar: 500 μm

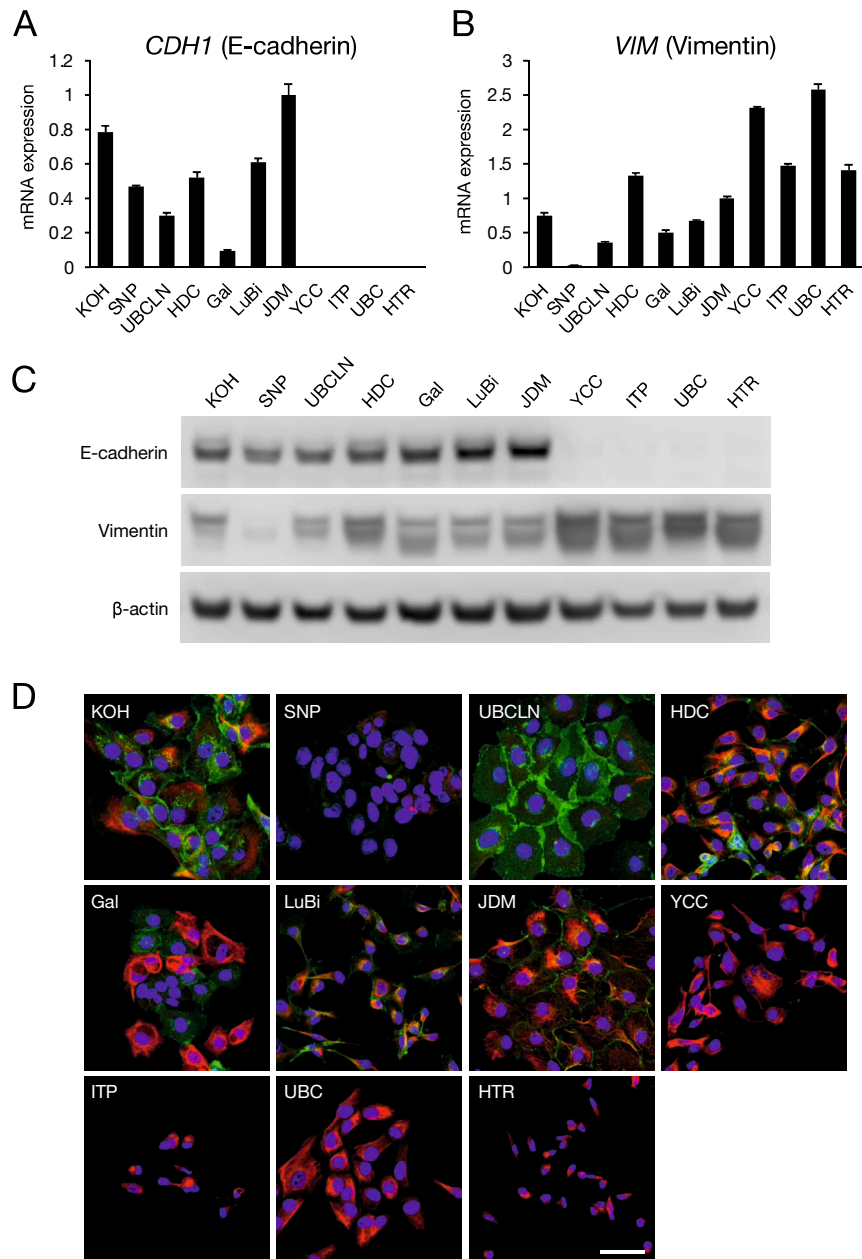


図 14. E-cadherin および vimentin の遺伝子・タンパク発現の解析

イヌがん細胞株における (A) *CDH1* (E-cadherin) および (B) *VIM* (vimentin) 発現量をリアルタイム RT-PCR により解析した。JDM 細胞の発現量を 1 としたときの相対値を示す。図中における細胞株の並びは、表 2 に基づき左から IC₅₀ 値降順である。mean \pm SD (n = 3)。 (C) E-cadherin および vimentin のタンパク量をウェスタンブロッティングにより解析した。ローディングコントロールとして β -actin を用いた。 (D) 免疫細胞化学による染色像 (緑: E-cadherin, 赤: vimentin, 青: Hoechst 33342, Scale bar: 50 μ m)

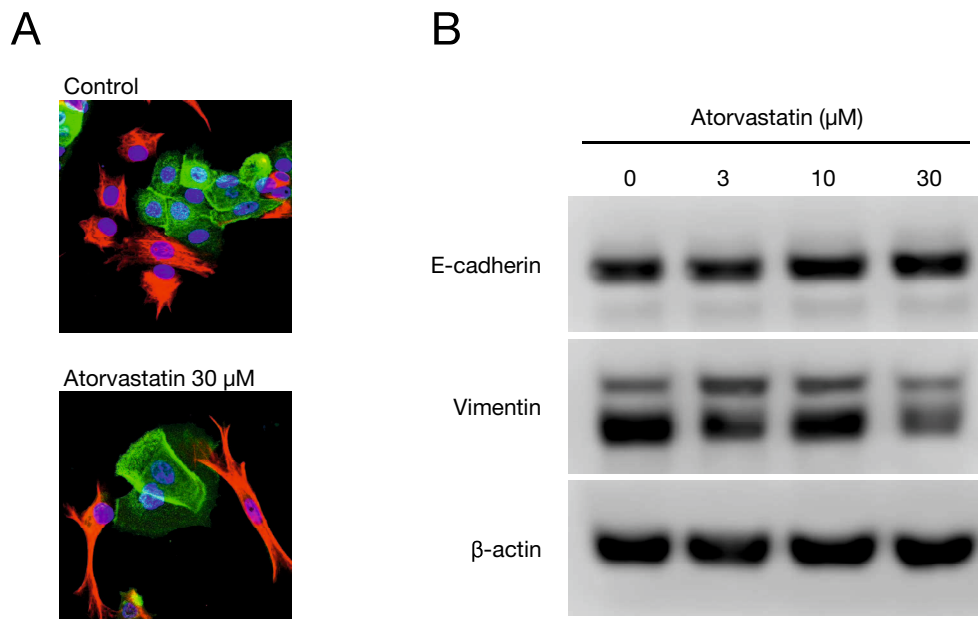


図 15. E-cadherin 陽性細胞と vimentin 陽性細胞におけるスタチン感受性の違い

(A) 免疫細胞化学による Gal 細胞の染色像 (緑: E-cadherin, 赤: vimentin, 青: Hoechst 33342). アトルバスタチン処置群では vimentin 陽性細胞の顕著な萎縮が観察される. (B) 各濃度のアトルバスタチン (3, 10, 30 μM) または DMSO (0 μM) で 48 時間処置した Gal 細胞の E-cadherin および vimentin タンパク量をウェスタンブロッティングにより解析した. ローディングコントロールとして β -actin を用いた.

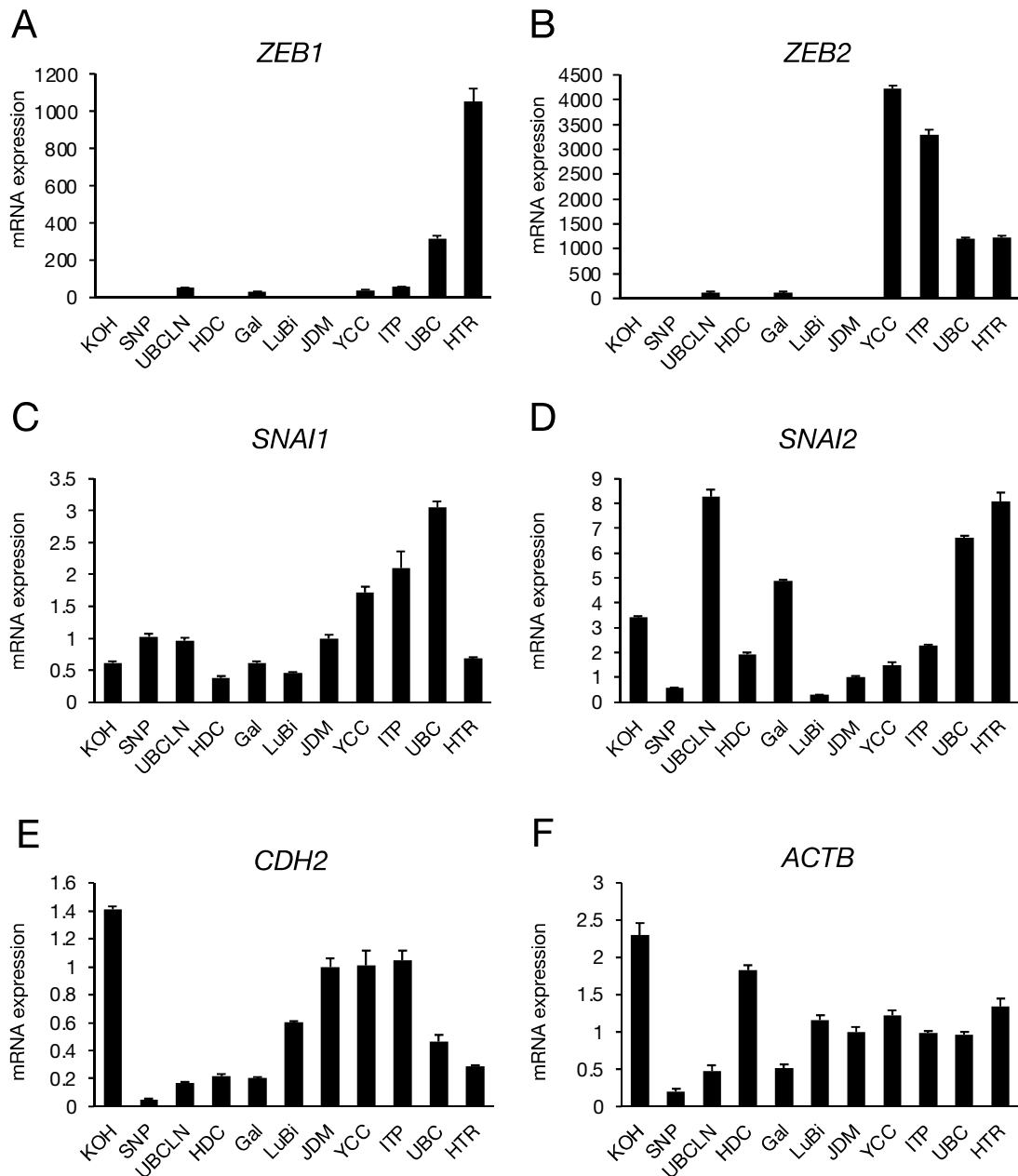


図 16. イヌがん細胞株における上皮間葉マーカーの遺伝子発現量

(A) *ZEB1*, (B) *ZEB2*, (C) *SNAI1*, (D) *SNAI2*, (E) *CDH2*, および (F) *ACTB* の発現量をリアルタイム RT-PCR により解析した. JDM 細胞の発現量を 1 としたときの相対値を示す. mean \pm SD (n = 3)

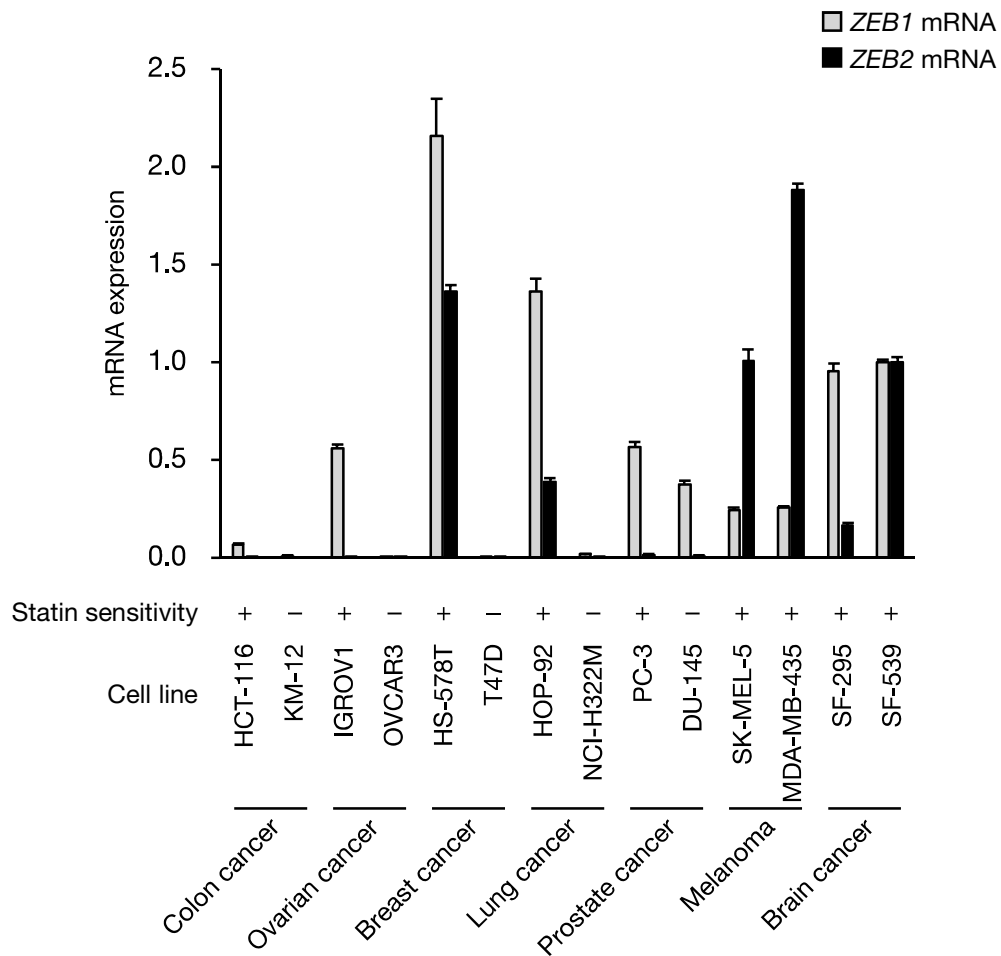


図 17. ヒトがん細胞株における *ZEB1/2* 発現量

NCI-60 がん細胞株パネルのうち、スタチン感受性が明らかとなっているヒトがん細胞株 14 種について、*ZEB1/2* の発現量をリアルタイム RT-PCR により解析した。SF-539 細胞の発現量を 1 としたときの相対値を示す。図中におけるスタチン感受性は先行研究 (Warita *et al.*, 2014) に基づく。mean \pm SD (n = 4)

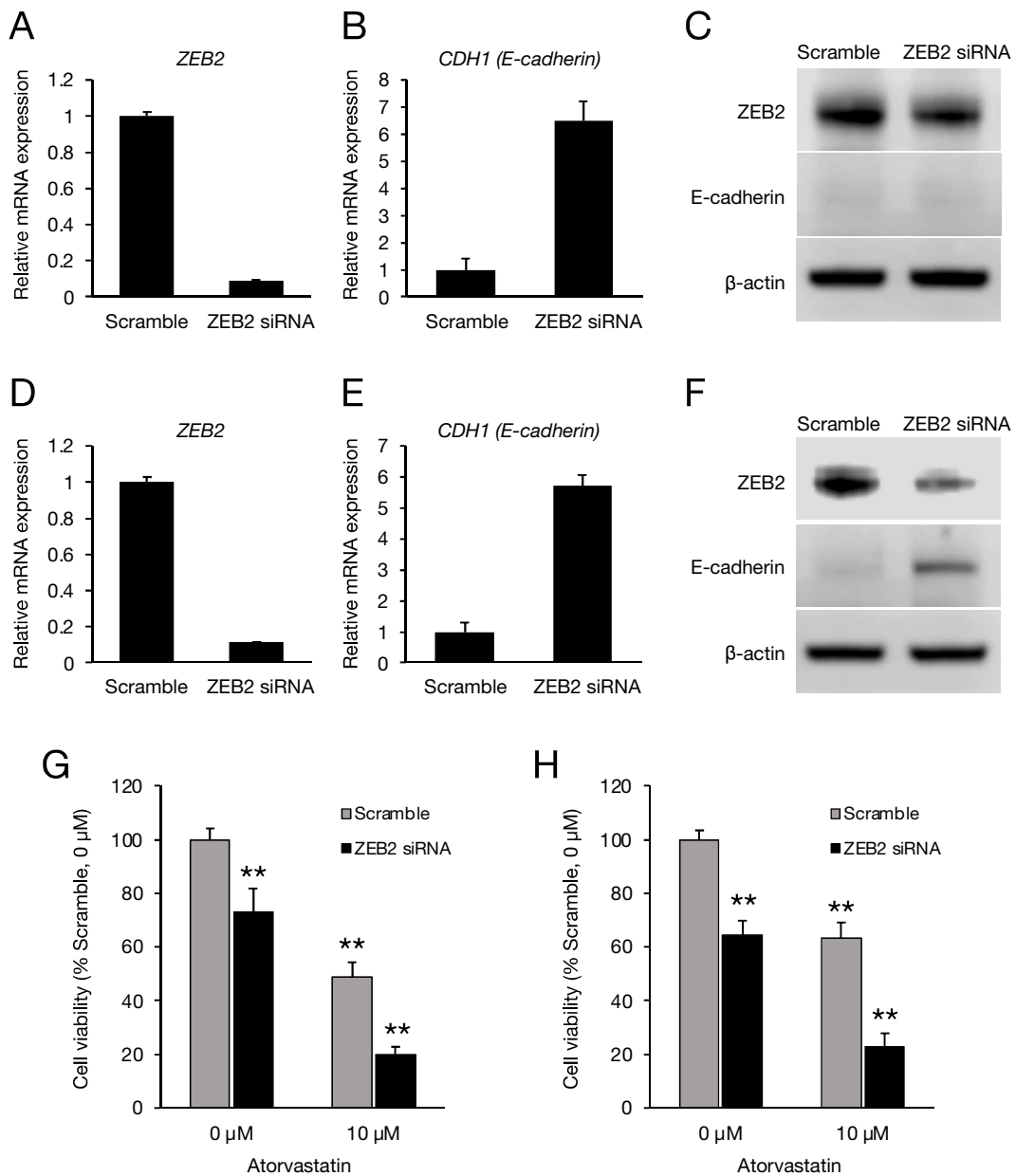


図 18. *ZEB2* 発現抑制がスタチン感受性に及ぼす影響

(A–C, G) YCC および (D–F, H) ITP 細胞に *ZEB2* siRNA を導入し、48 時間培養した。(A, D) *ZEB2* および (B, E) *CDH1* (E-cadherin) の発現量をリアルタイム RT-PCR により解析した。各サンプルを *ACTB* 発現量で補正し、対照群との比で示した。(C, F) *ZEB2* および E-cadherin のタンパク量をウェスタンブロッティングにより解析した。ローディングコントロールとして β -actin を用いた。(G, H) siRNA 導入後、10 μ M アトルバスタチンまたは DMSO (0 μ M) で 48 時間処置したときの細胞生存率を解析した。mean \pm SD (n = 3), ** p < 0.01 compared with scrambled siRNA-treated vehicle control cells.