

ヒト悪性黒色腫細胞における simvastatin の抗腫瘍効果の検討

学位論文内容の要旨

【背景と目的】悪性黒色腫はメラノサイト由来の悪性腫瘍であり、発生件数は増加傾向にある。早期例では外科的切除により治癒が期待でき、10年生存率は95%以上である。一方、リンパ節転移症例では、5年生存率は40~50%へ低下し、さらに遠隔転移を来した場合には、約10~15%となり、化学療法や免疫療法を含む各種治療法に対して非常に抵抗性がある。このため、予後改善のために悪性黒色腫の新たな治療法の開発が期待されている。

スタチン系薬剤は、コレステロール合成の過程において、3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA)からメバロン酸を合成する反応を触媒する酵素であるHMG-CoA reductaseを阻害する。現在、この薬剤は高コレステロール血症に対する治療薬として、また心血管病のハイリスク患者への予防のために広く使用されている。

スタチン系薬剤は多彩な薬理効果をもつとされ、近年では悪性腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を検討するための基礎的研究が行なわれるようになってきた。しかし、これまでに、悪性黒色腫細胞に対する抗腫瘍効果の検討を行なった報告は少なく、その機序についても不明な点が多い。そこで、本研究では、本邦で実際に使用されている simvastatin の、ヒト悪性黒色腫細胞に対する抗腫瘍効果とその機序についての検討を行なった。

【方法と結果】

悪性黒色腫細胞株である A375M, G361, C8161, GAK, MMAc に対して濃度、時間を変えて、simvastatin を作用させた。悪性黒色腫細胞における simvastatin の抗腫瘍効果とその機序を検討するために、増殖能、細胞形態、Apoptosis、細胞周期、DNA 合成能、細胞周期関連遺伝子の発現に関する解析を行った。

WST-8 アッセイによる細胞増殖能の測定では、細胞株の種類により感受性が異なるものの、simvastatin はこれら細胞株に対して増殖抑制効果を示し、その効果は GAK で弱く A375M と C8161 で強い結果となった。位相差顕微鏡を用いて、形態変化を観察したところ、濃度依存性に接着性の低下を認め、細胞形態は円形を呈していた。

次に simvastatin の細胞増殖抑制効果において、メバロン酸経路がどのように関与しているか検討するために、simvastatin とともに、この経路の中間代謝産物であるファルネシルピロリン酸 (FPP) またはゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) を加えて WST-8 アッセイを行なった。すると、GGPP を加えた細胞では、FPP を加えた細胞より cell viability が回復しており、simvastatin の細胞増殖抑制

効果には、メバロン酸経路中間代謝産物である GGPP の低下が関与していることが考えられた。次いで、simvastatin によるアポトーシス誘導を検討するために、DNA 断片化アッセイを行なった。すると、A375M と G361 ではラダー状のバンドを認め、simvastatin がこれらの細胞のアポトーシスを誘導することが示唆された。次に、simvastatin が細胞周期に与える効果の解析を、propidium iodide (PI) 染色後に、フローサイトメトリーにて行なった。すると、G361 と MMAc では濃度依存性に G0/G1 期の細胞の割合が増加し、S 期の割合が減少していた。この結果より、これらの細胞株では細胞周期 G1 期での停止(G1 アレスト)が誘導されることが示された。また、DNA 合成能を ELISA にて解析したところ、G361 と MMAc で、simvastatin の作用により DNA 合成能が低下しており、フローサイトメトリーの結果が裏付けられた。さらに、simvastatin が、細胞周期関連遺伝子の発現に与える変化を検討するために、RT-PCR を行なった。すると MMAc と G361 では、simvastatin 処理した細胞における p21、p27 の発現が、対照細胞よりも強く認めた。これらの結果から、G361 と MMAc では、simvastatin の作用により、細胞周期の進行を抑制する役割をもつ p21 と p27 が強発現し、G1 アレストを来していることが示唆された。

【考察】これまでにスタチン系薬剤が、膵臓癌細胞、多発性骨髄腫細胞や乳癌細胞など様々な悪性腫瘍細胞において抗腫瘍効果を示すことが多数報告されている。しかし、これまでに、ヒト悪性黒色腫細胞におけるスタチン系薬剤の抗腫瘍効果に関する詳細な検討は、Shellman らや Collisson らの報告に限られている。今回の研究では国内で臨床使用されている simvastatin を用いて、ヒト悪性黒色腫細胞における抗腫瘍効果を検討し、ヒト悪性黒色腫細胞における、simvastatin の抗腫瘍効果を明らかにすることができた。

ヒト悪性黒色腫細胞におけるスタチン系薬剤の抗腫瘍効果の機序には、small G 蛋白のプレニル化の阻害やアポトーシスの誘導が関与していることが報告されてきたが、細胞周期との関連は示されていなかった。また、simvastatin の抗腫瘍効果の機序に関する詳細な報告はこれまでなかった。今回の研究では、simvastatin の抗腫瘍効果の機序に、アポトーシス誘導 G1 アレストが関与していることが示唆された。

アポトーシスや細胞周期と、癌患者の予後には相関があることが報告されている。アポトーシスと悪性黒色腫の予後については、Bcl-2 ファミリーに属する Bax と Bak (アポトーシス抑制系) の蛋白発現低下が、患者予後の増悪が相関しているとの報告がある。また細胞周期関連遺伝子と悪性黒色腫の予後については、p21 の発現低下が、無再発生存の低下と相関しているとの報告や p27 の発現低下が tumor thickness の増加と結節型メラノーマにおける無病生存の低下と関連しているとの報告がある。このような研究結果から、アポトーシスを誘導し、細胞周期の進行を制御することは、悪性黒色腫の治療として有効であると考えられる。simvastatin の抗腫瘍効果については、さらに詳細な機序の解明が必要だが、simvastatin が悪性黒色腫に対する有力な治療手段の一つになりうるのではないかと期待された。

【結論】HMG-CoA 還元酵素阻害剤 simvastatin が、ヒト悪性黒色腫細胞において抗腫瘍効果を有することが明らかになった。その機序としては、simvastatin によるアポトーシス誘導と、p21 および p27 遺伝子発現亢進を介した G1 アレストが考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 本 有 平
副 査 教 授 福 田 諭
副 査 教 授 近 藤 哲

学 位 論 文 題 名

ヒト悪性黒色腫細胞における simvastatin の抗腫瘍効果の検討

スタチン系薬剤は、コレステロール合成の過程において、HMG-CoA からメバロン酸を合成する反応を触媒する酵素である HMG-CoA reductase を阻害する。現在、この薬剤は高コレステロール血症に対する治療薬として、また心血管病のハイリスク患者への予防のために広く使用されている。スタチン系薬剤は多彩な薬理効果をもつとされ、近年では悪性腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を検討するための基礎的研究が行なわれるようになってきた。しかし、これまでに、悪性黒色腫細胞に対する抗腫瘍効果の検討を行なった報告は少なく、その機序についても不明な点が多い。そこで、本研究では、本邦で実際に使用されている simvastatin の、ヒト悪性黒色腫細胞に対する抗腫瘍効果とその機序についての検討を行なった。

細胞増殖能の測定では、細胞株の種類により感受性が異なるものの、simvastatin はヒト悪性黒色腫細胞株に対して増殖抑制効果を示した。また、位相差顕微鏡を用いて、形態変化を観察したところ、濃度依存性に接着性の低下を認め、細胞形態は円形を呈していた。次に simvastatin の細胞増殖抑制効果において、メバロン酸経路がどのように関与しているか検討するために、simvastatin とともに、この経路の中間代謝産物であるファルネシルピロリン酸 (FPP) またはゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) を加えて細胞増殖能の測定を行なった。すると、GGPP を加えた細胞では、FPP を加えた細胞より cell viability が回復しており、simvastatin の細胞増殖抑制効果には、メバロン酸経路中間代謝産物である GGPP の低下が関与していることが考えられた。次いで、simvastatin によるアポトーシス誘導を検討するために、DNA 断片化アッセイを行なった。すると、A375M と G361 ではラダー状のバンドを認め、simvastatin がこれらの細胞のアポトーシスを誘導することが示された。次に、simvastatin が細胞周期に与える効果の解析を、propidium iodide (PI) 染色後に、フローサイトメリーにて行なった。すると、G361 と MMAc では濃度依存性に G0/G1 期の細胞の割合が増加し、S 期の割合が減少していた。この結果より、これらの細胞株では細胞周期 G1 期での停止(G1 アレスト)が誘導されることが示された。また、DNA 合成能を ELISA にて解析したところ、G361 と MMAc で、simvastatin の作用により DNA 合成能が低下しており、フローサイトメリーの結果が裏付けられた。さらに、simvastatin が、細胞周期関連遺伝子の発現に与える変化を検討するために、RT-PCR を行なった。すると MMAc と G361 では、

simvastatin 処理した細胞における p21、p27 の発現が、対照細胞よりも強く認められた。これらの結果から、G361 と MMac では、simvastatin の作用により、細胞周期の進行を抑制する役割をもつ p21 と p27 が強発現し、G1 アレストを来していることが示された。

これまでにスタチン系薬剤が、前立腺癌細胞、多発性骨髄腫細胞や乳癌細胞など様々な悪性腫瘍細胞において抗腫瘍効果を示すことが多数報告されている。しかし、これまでに、ヒト悪性黒色腫細胞におけるスタチン系薬剤の抗腫瘍効果に関する詳細な検討は、ほとんどされていなかった。今回の研究では国内で臨床使用されている simvastatin を用いて、ヒト悪性黒色腫細胞における抗腫瘍効果を検討し、ヒト悪性黒色腫細胞における simvastatin の抗腫瘍効果を明らかにすることができた。そして、その機序としてアポトーシスの誘導と細胞周期の停止が関与していることが示された。アポトーシスの誘導と、細胞周期の制御は、癌治療において有効な機序と考えられており、simvastatin が悪性黒色腫に対する有力な治療手段の一つになりうるのではないかと期待された。

公開発表において、副査 福田諭 教授より 1) 使用した細胞株の由来、2) スタチン系薬剤の臨床使用と、悪性黒色腫患者の生存率との関係、3) 臨床応用への方法、4) *in vivo* での研究の実施の有無について質問があった。次いで、副査 近藤哲 教授より 1) スタチン系薬剤と癌発生に関する疫学的な報告の有無、2) 本研究において simvastatin を選択した理由、3) 研究で使用した simvastatin 濃度と、臨床において使用されている濃度の違い、4) 臨床応用した際の副作用について質問があった。最後に、主査 山本有平 教授より 1) simvastatin を悪性黒色腫患者へ臨床応用することは可能か、2) 他の悪性腫瘍細胞株と比較し、悪性黒色腫に特異的な機序はあったのかという質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は学位論文の背景および本研究の経過と結果について詳細な説明を交え、最新の知見を引用し、概ね適切に回答した。

この論文は、ヒト悪性黒色腫細胞株において simvastatin が抗腫瘍効果を有することを明らかにした点で高く評価された。すでに国内において高コレステロール血症などを対象に臨床使用されていることなどからも、今後、皮膚悪性黒色腫に対する治療手段の一つになりうると期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。