

フルバスタチンによるヒト舌がん細胞株 HSC-3 細胞に対するアポトーシス誘導効果

藤原季美子,^a 椿 正寛,^b 山添 譲,^a 西浦早織,^c 川口 建,^b
尾垣光彦,^b 西之坊実里,^b 島元健次,^a 森山健三,^a 西田升三*,^b

Fluvastatin Induces Apoptosis on Human Tongue Carcinoma Cell Line HSC-3

Kimiko FUJIWARA,^a Masanobu TSUBAKI,^b Yuzuru YAMAZOE,^a Saori NISHIURA,^c
Takeru KAWAGUCHI,^b Mitsuhiko OGAKI,^b Minori NISHINOBO,^b Kenji SHIMAMOTO,^a
Kenzo MORIYAMA,^a and Shozo NISHIDA*,^b

^aDepartment of Pharmacy, Kinki University Hospital, 377-2 Ohnohigashi, Osakasayama City 589-8511, Japan,

^bDivision of Pharmacotherapy, Kinki University School of Pharmacy, 3-4-1 Kowakae, Higashiosaka City

577-8502, Japan, ^cDepartment of Pharmacy, Nara Hospital, Kinki University School of Medicine,
1248-1 Otoda-cho, Ikoma City 630-0293, Japan

(Received June 16, 2007; Accepted September 13, 2007)

Statins, which are inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase, suppress cell proliferation and induce apoptosis in various cancer cell lines. However, the effects of statins in head and neck carcinoma have not been reported. In this study, we investigated the mechanism by which fluvastatin induces apoptosis in HSC-3 cells. An increase in caspase-3 activity was observed. The apoptosis induced by fluvastatin was inhibited by the addition of geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) to the cell culture. When we examined the survival signals at the time of apoptotic induction, we also found that fluvastatin had caused a remarkable decrease in the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2. Moreover, we also found that U0126, a MEK1/2 inhibitor, induces apoptosis in HSC-3 cells. These results suggested that fluvastatin induces apoptosis by inhibiting GGPP biosynthesis and consequently decreasing the level of phosphorylated ERK1/2. The results of this study also indicate that fluvastatin may be used as an anticancer agent for tongue carcinoma.

Key words—statin; apoptosis; extracellular signal-regulated kinase 1/2

緒 言

現在、頭頸部腫瘍の治療には腫瘍の種類や進行度によって抗がん剤などによる化学療法、放射線療法、外科的手術などが単独、あるいは併用されている。頭頸部腫瘍の中でも発生頻度が高い扁平上皮がんは放射線に感受性を示すが、抗がん剤などによる化学療法では著効を示さないことが多く、新規の抗がん剤の開発が望まれる。

3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) 還元酵素阻害剤であるスタチンは高脂血症の治療薬として広範に用いられている。スタチンはメバロン酸経路中の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素を阻害し、コレステロールの生成過程を抑制

する。また、メバロン酸経路では細胞膜の構成成分であるコレステロールのほかに、tRNA の修飾に不可欠なイソペンテニルアデニン、さらに中間生成物であるファルネシルピロリン酸 (FPP) 及びゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) を経てミトコンドリアの細胞呼吸鎖を構成するユビキノンや糖タンパク質合成に必要なドリコールが生合成されており、それぞれの因子が細胞機能に重要な役割を果たしている。^{1,2)} さらに、FPP や GGPP は Ras などの低分子 G タンパクのプレニル化に必要であり、細胞の増殖・分化に係わる下流のシグナル伝達系に深く関与している。

近年、スタチンが腫瘍細胞に対してアポトーシスを誘導することが示されているが、^{3,4)} その機序はいまだ明らかにされておらず、頭頸部腫瘍についても、報告はなされていない。そこで今回、頭頸部腫瘍のうち、ヒト舌がん由来細胞株である HSC-3 細

^a近畿大学医学部付属病院薬剤部, ^b近畿大学薬学部薬物治療学研究室, ^c近畿大学医学部奈良病院薬剤部

*e-mail: nishida@phar.kindai.ac.jp

胞を用い、フルバスタチンによるアポトーシス誘導効果及びその機序について検討を行った。

実験方法

1. 試薬 フルバスタチン、ユビキノン及びイソペンテニルアデニン は Sigma 社より購入した。これらは DMSO で溶解したのち、リン酸緩衝液 (PBS, pH 7.4) で希釈し、 $0.45 \mu\text{M}$ のメンブレンフィルターでろ過滅菌したものを使用した。メバロン酸ラクトン (MVA)、FPP 及び GGPP (Sigma) は 100% エタノールで溶解後、PBS (-) で希釈し、 $0.45 \mu\text{M}$ のメンブレンフィルターでろ過滅菌したものを使用した。スクワレン、ドリコール (Sigma) は $0.45 \mu\text{M}$ のメンブレンフィルターでろ過滅菌し、PBS (-) で希釈したものを使用した。U0126 (Promega) は DMSO で溶解したのち、PBS (-) で希釈し、 $0.45 \mu\text{M}$ のメンブレンフィルターでろ過滅菌したものを使用した。

2. 細胞株 HSC-3 細胞はペニシリン・ストレプトマイシン (Gibco)、及び 10% FBS (Gibco) を含む pH 7.4 の MEM 培地 (Sigma) にて、5% CO_2 条件下で培養した。

3. 細胞生存率の検討 1×10^4 cells/ml に調製した HSC-3 細胞を 96-well プレートに播種し、24 hr 前培養後、0.25, 0.5, 1, $2.5 \mu\text{M}$ のフルバスタチンを添加し、24, 48, 72 hr 培養後の細胞数の変化を Tetra Color One 試薬 (生化学工業) を用いて WST-8 法により吸光度 492 nm にて測定した。

4. Caspase-3 の測定 HSC-3 細胞に、 $2.5 \mu\text{M}$ フルバスタチンを添加し、24 hr 培養後の細胞に、cell lysis buffer を添加し、細胞膜を破壊後、合成ペプチド (DEVD: Asp-Glu-Val-Asp) に AFC を結合させた DEVD-AFC を $5 \mu\text{L}$ 添加し、 37°C で 1 hr インキュベートした。これを蛍光分光光度計 (日立製作所) にて emission wavelength: 400 nm, extention wavelength: 505 nm で蛍光強度を測定した。また、タンパク量を BCA 法 (Pierce) にて定量し、得られたタンパク含有量、及び反応時間 (minutes) でその蛍光強度を除いた値を unit (OD/minutes/mg of protein) と定め、これを caspase-3 活性の単位として評価した。

5. メバロン酸経路中の生成物質による細胞死誘導抑制効果 HSC-3 細胞を 96-well プレートに播

種し、24 hr 前培養後、各 well に 1 mM MVA, $10 \mu\text{M}$ FPP, $10 \mu\text{M}$ GGPP, $30 \mu\text{M}$ スクワレン, $100 \mu\text{M}$ ユビキノン, $300 \mu\text{M}$ イソペンテニルアデニン、及び $300 \mu\text{M}$ ドリコールを前投与し、4 hr 後、 $2.5 \mu\text{M}$ フルバスタチンを添加した。添加後、72 hr 培養し、細胞数の変化を WST-8 法により測定した。

6. Western blotting $2.5 \mu\text{M}$ フルバスタチンを添加し、それぞれの期間培養した HSC-3 細胞に cell lysis buffer [Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 1 μM ペプスタチン, 1 μM ロイペプチン, 2 mM オルトバナジン酸ナトリウム, 1 μM カルパインインヒビター, 1 mM PMSE, ホスファターゼインヒビターカクテル I / II 及び 0.5% ノニドット P-40] を添加し、細胞膜を破壊後、回収した細胞質分画をタンパクサンプルとした。このサンプルを 10% SDS-PAGE により電気泳動し、続いて PVDF 膜 (Amersham) にタンパクを転写した。タンパクを転写した PVDF 膜を 5% スキムミルクにてブロッキングを行った。次に、目的とするタンパクに特異的な一次抗体を反応させたのち、0.1% Tween 20 を含む TBS で洗浄し、二次抗体で反応させたのち、ECL plus (Amersham) により化学発光させ、Cool saver AE-6955 (ATTO) により撮影し、解析を行った。

7. データ解析 データは平均値 \pm 標準偏差で表した。Fig. 1 (A) の検定には ANOVA with Dunnett 検定を使用し、その他の各群間の検定には *t* 検定を用いた。また、危険率が 1% 未満のとき、有意差があると認めた。

実験結果

1. フルバスタチンの HSC-3 細胞増殖に対する影響 フルバスタチンにおいて HSC-3 細胞に対し、細胞死を誘導する濃度について検討した。フルバスタチンを終濃度 0.25, 0.5, 1, $2.5 \mu\text{M}$ で処理し、24, 48, 72 hr 培養後の生細胞数を測定した。この測定値をコントロールに対する細胞生存率として表した。その結果、フルバスタチン存在下に培養した HSC-3 細胞では各濃度の 72 hr 後の細胞生存率は 82.8, 41.3, 24.1, 13.8, 13.0% であった。細胞死に至る経路を確認するため、完全に細胞死を誘導する濃度を用いる。よって、フルバスタチン処理濃度を $2.5 \mu\text{M}$ とした (Fig. 1 (A))。次にフルバスタチンに

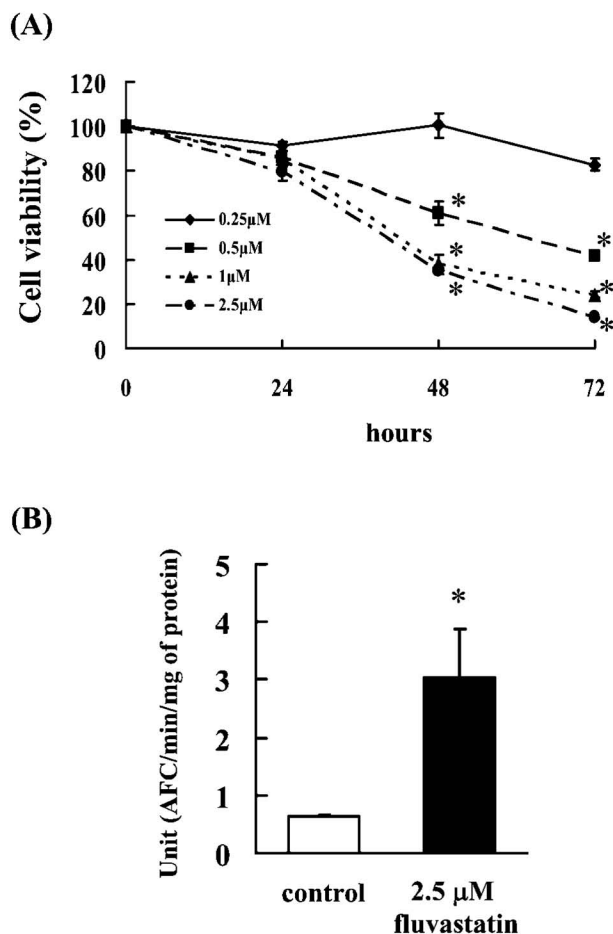


Fig. 1. (A) Cell Viability was Measured by WST-8 Assay and the Results Were Expressed as Percentage of Surviving Cells Over Control, (B) Induction of Caspase-3-like Activity Associated with Fluvastatin-induced Cell Death.

(A) Data are presented as mean \pm S.D. ($n=5$). * $p<0.01$ compared with the control. Caspase-3 activity is expressed as the picomoles (proteolytic cleavage of the caspase-3 substrate DEVD-AFC) per hour per mg of protein. Data are presented as mean \pm S.D. ($n=5$). * $p<0.01$ compared with the control.

より細胞死を起こした HSC-3 細胞の caspase-3 の活性化について検討した。2.5 μ M フルバスタチンとなるように HSC-3 細胞を処理し、24 hr 後の caspase-3 活性を測定した。その結果、コントロールと比較してフルバスタチン処理により caspase-3 活性の上昇が認められた (Fig. 1(B))。

2. メバロン酸経路中の生成物質による細胞死誘導抑制効果 スタチンは HMG-CoA 還元酵素を阻害するため (Fig. 2(A)), メバロン酸経路中で合成される MVA, FPP, GGPP, スクワレン, ユビキノン, イソペンテニルアデニン及びドリコールによる細胞死誘導抑制効果を確認し、メバロン酸経路中で細胞死に関与する下流の経路について検討し

た。その結果、フルバスタチン存在下に培養した HSC-3 細胞では細胞死の誘導が確認され、MVA 及び GGPP 併用により細胞死が有意に抑制された (Fig. 2(B))。このメバロン酸経路のうち、GGPP 産生への経路は FPP \rightarrow GGPP 及びイソペンテニルピロリン酸 (IPP) \rightarrow GGPP の 2 経路が存在し、メバロン酸経路が関与した細胞死誘導において、それぞれ優位に働く経路が異なる。^{5,6)} 今回、フルバスタチンによる細胞死が、MVA, GGPP の添加によってのみ細胞死が阻止され、FPP の添加では阻止できなかった結果は、この舌がん細胞株 HSC-3 細胞において、FPP \rightarrow GGPP ではなく、IPP \rightarrow GGPP への経路が優位に働いていること、そしてこの経路での GGPP 産生阻害がフルバスタチンの細胞死に影響していることを示唆した。

3. Ras 下流シグナル伝達因子の活性動態 フルバスタチンによる細胞死誘導に GGPP からの経路が関与していることが示唆されたため (Fig. 3 (A)), GGPP から Ras 経路の関与について検討した。2.5 μ M フルバスタチン存在下に HSC-3 細胞を培養し、ERK1/2 及び Akt の活性動態を確認した。HSC-3 細胞においてフルバスタチン処理によりリン酸化 ERK の持続的な減少を認めた。しかし、リン酸化 Akt には変化が認められなかった (Fig. 3 (B))。このことからフルバスタチンによるアポトーシス誘導は Ras/ERK 経路の活性低下による可能性が考えられた。

また、この ERK1/2 のリン酸化の低下が、MVA, FPP, GGPP 添加により影響を受けるか否かの検討を行った。結果として、フルバスタチン添加による HSC-3 細胞でのリン酸化 ERK1/2 の低下は、MVA, GGPP の添加により阻止されたが、FPP の添加は影響を示さなかった (Fig. 3(C))。以上の結果から、HSC-3 細胞におけるフルバスタチンによるアポトーシス誘導は、メバロン酸経路の GGPP 産生低下による Ras/ERK 活性の低下が重要であることが示唆された。

4. MEK1/2 阻害剤による細胞死誘導効果 フルバスタチンによる細胞死誘導が ERK1/2 の活性低下によることが考えられたため、MEK1/2 阻害剤である U0126 により細胞死を誘導できるか検討した。その結果、25, 50 μ M U0126 処理により細胞死誘導を確認した (Fig. 3(D))。

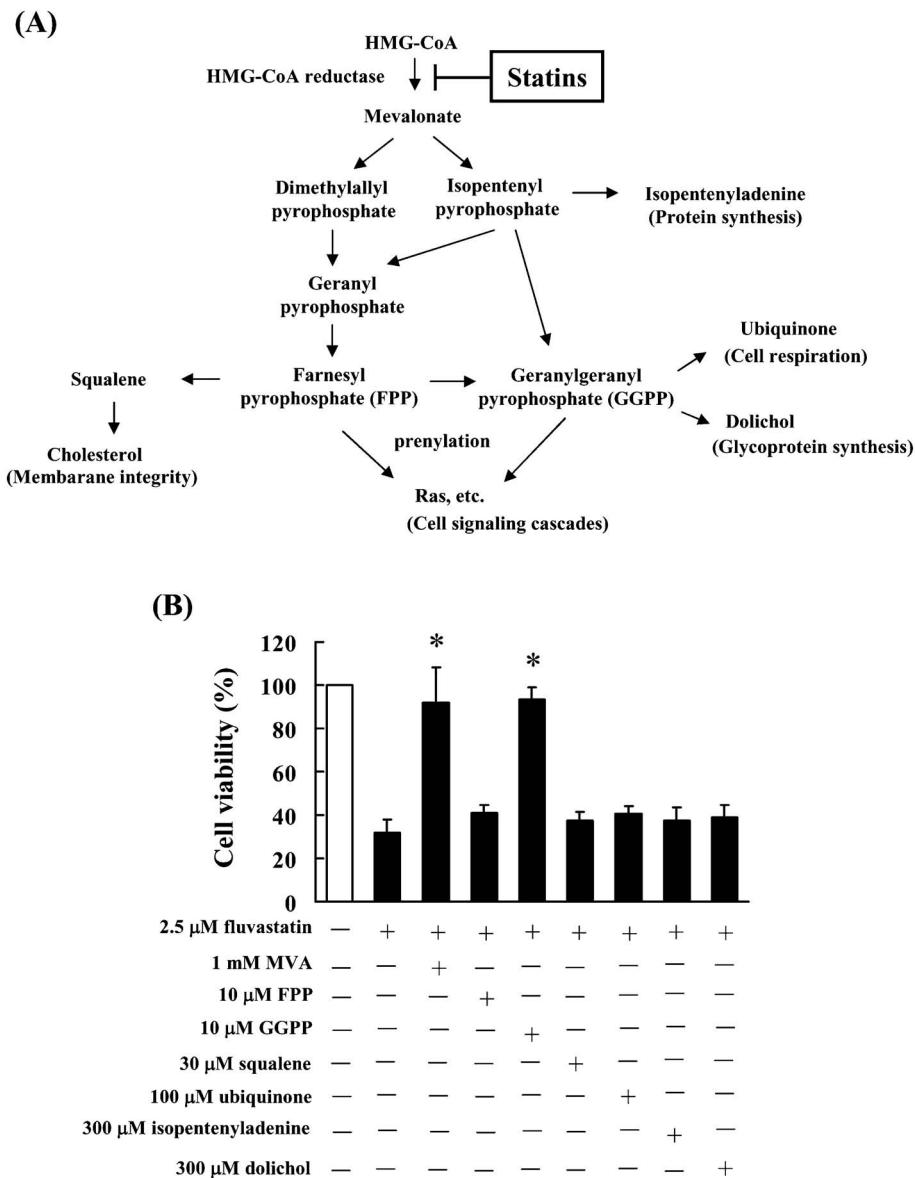


Fig. 2. (A) Schematic Representation of the Mevalonate Pathway and the Effects of Statins, (B) Inhibition of Fluvastatin-induced Apoptosis in HSC-3 Cells by Intermediates of the Mevalonate Pathway: Mevalonic Acid Lactone (MVA, 1 mM), Farnesyl Pyrophosphate (FPP, 10 μM), Geranylgeranyl Pyrophosphate (GGPP, 10 μM), Squalene (30 μM), Ubiquinone (100 μM), Isopentenyladenine (300 μM), and Dolichol (300 μM).

(A) The dynamics of each reaction depend on cell species. (b) Data are presented as mean ± S.D. (n=5). *p < 0.01 compared with the group treated with fluvastatin.

考 察

フルバスタチンは HSC-3 細胞に対してアポトーシスを誘導し、その誘導は GGPP の添加により阻害された。これらの結果から、フルバスタチンによるアポトーシス誘導機序はメバロン酸経路中の GGPP 産生阻害によるものと示唆された。GGPP は低分子 G タンパクのプレニル化に関与しており、細胞の生存、増殖において重要な役割を担っていることから、⁷⁾フルバスタチンは GGPP 産生阻害

により低分子 G タンパクのプレニル化を抑制することでアポトーシスを誘導したことが考えられる。

代表的な低分子 G タンパクである Ras は MAPK 経路を活性化し、最終的に Elk-1 や c-Myc のような様々な転写因子を活性化することで細胞の生存に深く関わっている。Ras からのシグナル伝達には MAPK ファミリーに属する ERK1/2 及び MAPK 経路とのクロストークが知られている PI3K/Akt 経路が関与している (Fig. 3(A))。今回、Ras の下流の主要な生存シグナル因子である ERK1/2 及び

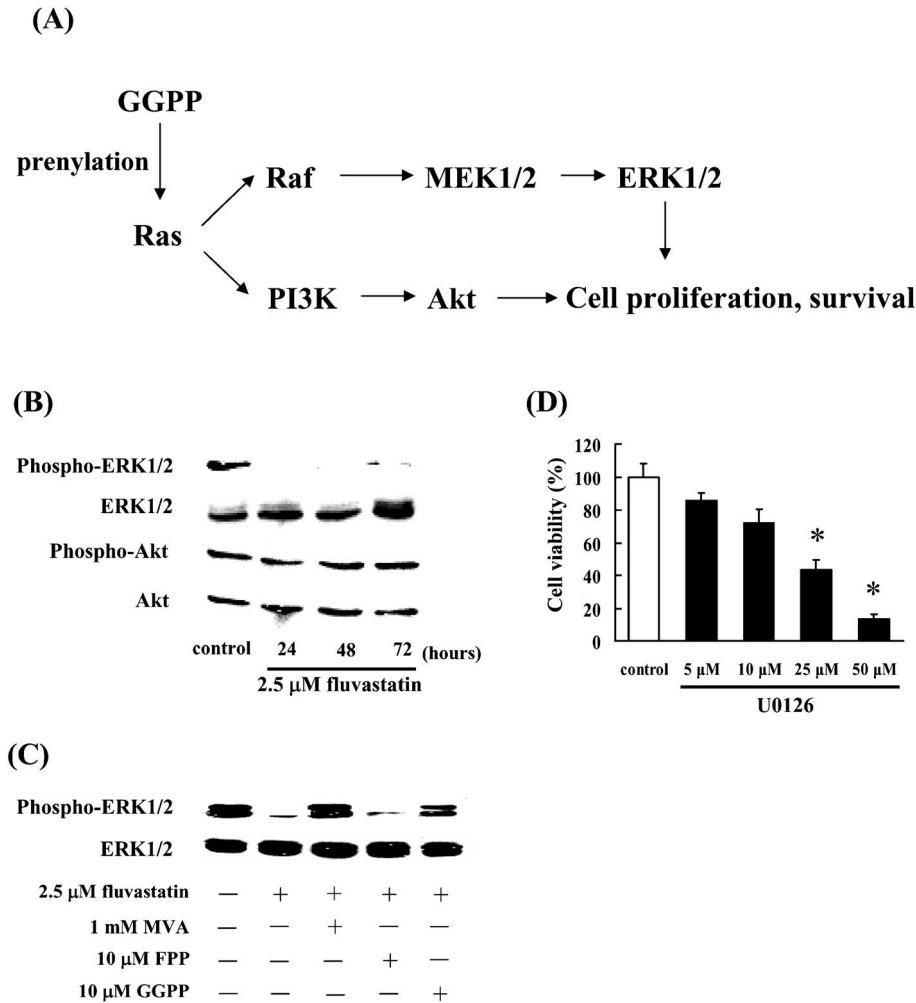


Fig. 3. (A) Ras Signaling Pathway through Geranylgeranyl Pyrophosphate (GGPP), (B) Fluvastatin Specifically Suppresses the Activation of ERK1/2 in HSC-3 Cells. (C) Inhibition of Fluvastatin-induced Decrease Phosphorylated ERK1/2 in HSC-3 Cells by MVA and GGPP Administration, (D) Effect of MEK1/2 Inhibitor, U0126, on HSC-3 Cells.

(B) HSC-3 cells were treated with 2.5 μM fluvastatin for 24, 48, and 72 hr. Whole-cell lysates were generated and immunoblotted with antibodies against phosphorylated ERK1/2 (phospho-ERK1/2), phosphorylated Akt (phospho-Akt), ERK1/2, and Akt. After administration of 2.5 μM fluvastatin, the levels of phosphorylated ERK1/2 were lower than those in control cells. (C) HSC-3 cells were pretreated with 1 mM MVA, 10 μM FPP, or 10 μM GGPP for 4 hr and then treated with 2.5 μM fluvastatin for 72 hr. Whole-cell lysates were generated and immunoblotted with antibodies against phosphorylated ERK1/2 (phospho-ERK1/2), and ERK1/2. (D) Cell viability of HSC-3 cells treated with 5, 10, 25, and 50 μM U0126 for 72 hr was measured by WST-8 assay. 25 and 50 μM U0126 induced inhibition of cell viability. Data are presented as mean ± S.D. ($n=5$). * $p<0.01$ compared with the control.

Akt の発現を検討したところ、リン酸化 ERK の低下を確認したが、リン酸化 Akt には変化が認められなかった。また、MEK1/2 阻害剤である U0126 により同様に細胞死誘導を確認した。このことから Ras/ERK 経路の活性低下により、フルバスタチンはアポトーシスを誘導していることが考えられる。近年、スタチンによる細胞死誘導はコレステロールの生合成阻害⁸⁾ または細胞周期の阻害⁹⁾ であることが示されているが、今回の結果はスタチンがシグナル伝達を阻害することを示し、スタチンによる細胞死誘導は ERK1/2 の活性低下が重要であると考えられる。

今回の検討で用いた 2.5 μM フルバスタチンは臨床における内服後 (1 回 20–40 mg) の血清中濃度 (0.3–1.0 μM) よりも高い¹⁰⁾ しかし、Fig. 1(A) で示したように血清中濃度と同等の濃度でも、2.5 μM より程度は低い、細胞増殖抑制及びアポトーシス誘導効果が認められていることから、投与方法の工夫によりフルバスタチンは舌がんなどの頭頸部腫瘍に対して効果が期待できる可能性が考えられる。また、ヒト血管内皮細胞では 5 μM 以上の濃度のフルバスタチンで細胞死が誘導されること¹¹⁾ さらに肝細胞では 10 μM、筋細胞では 100 μM という高濃度でのみ細胞死が誘導されることも示されてい

る.^{12,13)} これらのことから、フルバスタチンは正常細胞に比べ、増殖率の高いがん細胞に対して有効に作用すると考えられる。

以上の結果からフルバスタチンは HSC-3 細胞に対して GGPP 産生抑制に基づく Ras/ERK 経路の阻害によりアポトーシスを誘導することが示唆された。このことはスタチンが舌がんなどの頭頸部腫瘍の分子標的治療薬として利用可能であることを示している。今回は舌がん由来の細胞についてスタチンの影響を検討したが、今後は他の細胞についても同様にスタチンのスクリーニングを行っていくことが必要であり、また、頭頸部腫瘍の中でも特に扁平上皮がんは放射線の感受性が高いことから、スタチンとの併用療法についても検討を行う予定である。

謝辞 今回の研究成果は「文部科学省ハイテク・リサーチ・センター整備事業（平成 19-23 年度）」により助成を受けて行った。

REFERENCES

- 1) Chan K. W., Oza A. M., Siu L. L., *Clin. Cancer Res.*, **9**, 10-19 (2003).
- 2) Wong W. W., Dimitroulakos J., Minden M. D., Penn L. Z., *Leukemia*, **16**, 508-519 (2002).
- 3) Nishida S., Matsuoka H., Tsubaki M., Tanimori Y., Yanae M., Fujii Y., Iwaki M., *Mol. Cell. Biochem.*, **269**, 109-114 (2005).
- 4) Koyuturk M., Ersoz M., Altiok N., *Neurosci. Lett.*, **370**, 212-217 (2004).
- 5) Reszka A. A., Halasy-Nagy J., Rodan G. A., *Mol. Pharmacol.*, **59**, 193-202 (2001).
- 6) Ling S., Wu Y., Zheng J., Linden J., Holoshitz J., *Mutat. Res.*, **554**, 33-43 (2004).
- 7) van de Donk N. W. C. J., Schotte D., Kamphuis M. M. J., van Marion A. M. W., van Kessel B., Bloem A. C., Lokhorst H. M., *Clin. Cancer Res.*, **9**, 5735-5748 (2003).
- 8) Li Y. C., Park M. J., Ye S. K., Kim C. W., Kim Y. N., *Am. J. Pathol.*, **168**, 1107-1118 (2006).
- 9) Paaajarvi G., Roudier E., Crisby M., Hogberg J., Stenius U., *FASEB J.*, **19**, 476-478 (2004).
- 10) Scripture C. D., Pieper J.A., *Clin. Pharmacokinet.*, **40**, 263-281 (2001).
- 11) Muck A. O., Seeger H., Wallwiener D., *Z. Kardiolog.*, **93**, 398-402 (2004).
- 12) Kubota T., Fujisaki K., Itoh Y., Yano T., Sendo T., Oishi R., *Biochem. Pharmacol.*, **67**, 2175-2186 (2004).
- 13) Kaufmann P., Torok M., Zahno A., Waldhauser K. M., Brecht K., Krahenbuhl S., *Cell. Mol. Life Sci.*, **63**, 2415-2425 (2006).