

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791491

研究課題名(和文) GSK3 を分子標的とする悪性グリオーマ治療の基礎基盤の構築

研究課題名(英文) Basic base construction of malignant glioma therapy targeting for GSK3beta

研究代表者

宮下 勝吉 (Miyashita, Katsuyoshi)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：80624874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：我々は悪性神経膠種における、セリン・スレオニンキナーゼファミリーであるglycogen synthase kinase 3 (GSK3) の関与に着目し、GSK3 を阻害することで、膠芽腫細胞の増殖・浸潤が抑制され、現在臨床で使用されている抗がん剤の効果を相乗的に増加させるという基礎研究結果をすでに得ている。マウス腫瘍モデルを用いた検討では、生体内でもGSK3 阻害による腫瘍増殖抑制効果を確認、その分子生物学的メカニズムの解明も進めており、C-Mycという分子が関与していることを報告した。また、GSK3 阻害作用をもつ既存の薬剤を使用した、再発膠芽腫に対する第Ⅰ相臨床試験を行っている。

研究成果の概要(英文)：We focus on the glycogen synthase kinase 3beta, serine-threonine kinase family, demonstrated that inhibition of GSK3beta suppresses proliferation and invasion of glioblastoma cells, and increases the effect of anti-cancer drugs synergistically. In the study using a mouse tumor model, we demonstrated tumor growth inhibitory effect of GSK3beta inhibition in vivo. We reported that GSK3beta inhibition sensitizes human glioblastoma cells to temozolomide by affecting O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation via c-Myc signaling. In addition, using existing drugs with GSK3beta inhibitory effect, we conducted clinical trial for recurrent glioblastoma.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：glioblastoma GSK3beta

### 1. 研究開始当初の背景

脳内原発の腫瘍である膠芽腫は人類に残された致死性悪性腫瘍の一つである。腫瘍摘出術に加え放射線化学療法を行っても多くの場合その生存期間は2年を越えないこと、さらに医療技術の進歩によりがんの予後が劇的に改善している今日にあって、膠芽腫の治療成績はこの30年間でほとんど変わらない。悪性グリオーマは人類に残されたもっとも悪性度の高い腫瘍の一つであり本疾患の克服は医学上の重要課題である。

膠芽腫は周囲の正常脳に対して浸潤性に増殖する特徴があり、ヒトとしての知的、精神的高次機能を司る脳という臓器の性質を考えた時、外科的手術が常に絶対非治癒切除に終わる点で他臓器癌の治療と比較すると圧倒的に不利な状況に立たされている。したがって、手術後の放射線療法や化学療法は残存腫瘍の再発予防に必須である。とりわけ本腫瘍の予後を改善させるには新たな化学療法薬剤の開発が重要であることは明白である。申請者はグリオーマの臨床と研究に携わる中で、その生物学的特徴とセリン・スレオニンキナーゼファミリーである **glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ )** の関与に着目した。GSK3 $\beta$  は糖代謝をはじめ細胞周期、増殖・分化、アポトーシスなどを制御するセリン・スレオニンリン酸化酵素である。GSK3 $\beta$  の脳疾患への関与としては、アルツハイマー病のアミロイド沈着や tau タンパクのリン酸化・重合などの促進作用を有し、神経細胞の変性に関与しているとされる。そこで、脳組織への浸潤・破壊を特徴とするグリオーマにおける GSK3 $\beta$  の病的作用と分子機構の検討に着手した。これまでの GSK3 $\beta$  に関する基礎的・臨床的研究から下記の知見を得て、すでに複数の学会、学術誌に報告している(*Clin Can Res*, 2009)。

1, 膠芽腫細胞株、および膠芽腫手術検体において、正常脳組織と比較して膠芽腫では GSK3 $\beta$  の発現は高く、第 216 チロシンのリン酸化(活性化型分画)が亢進していた。

2, 膠芽腫細胞株において GSK3 $\beta$  小分子阻害剤 (AR-A014418) と RNA 干渉法で GSK3 $\beta$  の活性と発現をそれぞれ阻害したところ、腫瘍細胞の増殖が抑制され、アポトーシスが誘導された。

3, 膠芽腫細胞の GSK3 $\beta$  を阻害した時の細胞増殖やアポトーシスに関連するシグナル分子の発現変化を検証した。GSK3 $\beta$  阻害により、p53-p21 経路および CDK4/6-Rb 経路を介して腫瘍細胞の増殖が抑制され、アポトーシスが誘導されていることが明らかにされた。

4, Temozolomide に低濃度の AR-A014418 を併用して各腫瘍細胞株に作用させたところ、各薬剤の IC50 が有意に低下し、相加効果や相乗効果が得られた。また、放射線抵抗性を示す腫瘍細胞株に対して阻害剤を併用することにより、放射線感受性は亢進した。すなわち GSK3 $\beta$  は膠芽腫細胞の薬剤感受性や放射

線感受性を制御している可能性が示唆された。

### 2. 研究の目的

膠芽腫における GSK3 $\beta$  関連分子機構の理解を深めるとともに臨床試験に使用する四種類の薬剤の有効性を証明する基礎基盤を構築することにある。さらに将来的には個々の患者の病態を正確に捉えて有効な治療法を提供するテーラーメイド分子標的療法を目指す。

### 3. 研究の方法

特異的な GSK3 $\beta$  阻害剤である AR-A014418 および GSK3 $\beta$  阻害活性を有する四種類の既存薬剤を使用し、手術で得られる検体から確立した初代細胞株とグリオーマ細胞株に対してその浸潤阻害効果と薬剤感受性亢進作用を *in vitro* で確認するとともにその詳細な分子メカニズムを解明し作用機序を明確にする。これにより得られる明確な実験的根拠を基盤としてマウスモデルを使用した前臨床試験を行い現在の臨床研究に直結する知見を得る。

#### 1) GSK3 $\beta$ による浸潤能亢進メカニズムの解明

AR-A014418 により膠芽腫細胞株の浸潤が抑制される知見を予備実験で得ている。そこで AR-A014418 により阻害される浸潤関連分子およびそのシグナル伝達を解析する。

##### 浸潤関連分子の発現に与える影響の解析

AR-A014418 による浸潤関連分子への影響を mRNA level で解析する。薬剤を作用させた初代細胞株(当科の膠芽腫手術検体から得られたもの)および膠芽腫細胞株から mRNA を抽出する。これを用いて cDNA を作成し、当教室で保有している 60 種類の浸潤関連分子のプライマーセットを使用し Housekeeping genes ( $\alpha$ -tubulin,  $\beta$ -actin など) を内部コントロールとした定量的 RT-PCR を行う。各分子の発現量をコントロール群と比較する。

##### 浸潤シグナル下流分子の解析 small

#### GTPase 活性化の検討

細胞浸潤に small GTPase (R-Ras, Rac1, RhoA, Cdc42) の活性化バランスが重要であることが知られている。AR-A014418 の添加によりこれらの分子の活性化の変化を観察する。活性化型 small GTPase は kit (Pierce, Rockford, IL) にて検出可能である。

#### MMP, MEK/MAPK シグナルの検討

一般に浸潤シグナルは独立しておらず複雑に関連している。AR-A014418 添加による細胞外基質分解酵素 MMP (matrix metalloproteinase) と浸潤・増殖シグナルである PI3K/Akt, MEK/MAPK 経路の活性化の変化を検討する。MMP の活性化の検出には zymography, PI3K/Akt, MEK/MAPK シグナルの活性化の検出はリン酸化型 p-Akt, p44/p42MAPK, p38 抗体を用いた western blotting を行う。

#### 2) GSK3 $\beta$ 阻害による薬剤感受性亢進メカニズムの解明

AR-A014418 添加による Temozolomide (TMZ) 治療の効果増強の確認と薬剤抵抗分子：O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) の動態変化を観察する。

初代細胞株および膠芽腫細胞株に対する TMZ と AR-A014418 の相加効果、相乗効果を細胞増殖 assay および Isobologram で検討する。

Methylation specific PCR (MSP), Methylated promoter 定量, MGMT 発現解析 MGMT promoter のメチル化の変化を MSP 法で検討し, methylated promoter の定量を行う。MGMT の mRNA 量を QRT-PCR 法で調べ両者の相関関係を見出す。

### 3) GSK3β阻害医薬品の GSK3β活性阻害効果の証明

申請者らが現在行っている臨床試験「は GSK3β 阻害作用を有する四剤の併用療法であり、いずれがより効果的な薬剤であるか今のところ不明である。これらの医薬品が、膠芽腫細胞株に対してどの程度の治療効果を示すかを *in vitro* と *in vivo* の実験で評価する。

### GSK3β 阻害医薬品の GSK3β 阻害効果の検討

四種類の薬剤による GSK3β 阻害効果を、初代細胞株と複数の膠芽腫細胞株とを対象として検証する。方法として活性化型 GSK3β を認識する特異的抗体を使用した Western blotting を行う。これまでの準備的実験から四剤の GSK3β 阻害薬剤のうち複数で異なるレベルで膠芽腫細胞株の GSK3β 活性を阻害することが分かっている。

### GSK3β 阻害医薬品の悪性グリオーマ細胞に対する *in vitro* 効果解析

これらの薬剤が、初代細胞株および膠芽腫細胞株に対してどの程度の治療効果を示すかを *in vitro*、*ex vivo* の実験で評価する。上記の薬剤を用い、細胞遊走 assay、細胞浸潤 assay、アポトーシス assay、細胞増殖 assay、*ex vivo* rat brain slice 細胞遊走・浸潤 assay を行う。薬剤の濃度は生体内で作用可能な濃度 (μmol レベル) を中心にして、濃度を振って作用が max になる濃度を見出す。さらに TMZ、放射線療法との併用療法の効果判定を行う。相加作用、相乗作用の評価には Isobologram 法を使用する。

【平成 25 年度以降】

### 1) マウス脳腫瘍モデルを使用した前臨床試験

申請者らの教室で確立されたマウス脳腫瘍モデル (*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009) により *in vivo* での薬剤効果の評価を行う。なお確立されたマウス腫瘍においては GSK3β が高発現、かつ活性化されていることを確認してある。

#### 効果判定

前年度で得られた至適薬剤量をもとに四種類の GSK3β 阻害医薬品をそれぞれ単剤あるいは併用療法でマウス脳腫瘍モデルに経口投与し抗腫瘍効果を評価する。エンドポイントは 生存期間、腫瘍の容量、切片組織

の観察によるアポトーシスと腫瘍浸潤程度の評価、神経毒性の有無とする。また標的分子の阻害効果を確認するため抽出腫瘍からタンパクを抽出し western blotting を行う。

### TMZ、放射線療法との併用療法の有用性評価

実験 2 の結果に基づき候補薬剤と TMZ あるいは放射線療法との併用療法を行う。マウスの実験で治療プロトコルが多岐に及んだ場合に使用するマウスが多数になる可能性があるため適宜、最小限の匹数になるよう配慮する。

#### 4. 研究成果

1) 申請者らの教室で構築されたマウス脳腫瘍モデル (*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009) を用い、至適薬剤量をもとに四種類の GSK3β 阻害医薬品をそれぞれ単剤投与した。投与マウス腫瘍では GSK3β の基質である GS (glycogen synthase) のリン酸化が低下しており、*in vivo* での GSK3β 阻害効果を確認した。また、それぞれの薬剤で種々の程度に細胞浸潤が抑制された (論文作成中)。

2) 神経膠芽腫細胞株 4 種に対し、GSK3 小分子阻害剤 (AR-A014418) を使用したところ、

methylation specific PCR アッセイで MGMT プロモーターのメチル化が促進されていた。また、下流に位置する c-Myc に注目し、MGMT プロモーターへの結合をクロマチン免疫沈降法で測定したところ、c-Myc は DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A を誘導し MGMT プロモーターに結合し、プロモーターのメチル化を促進していた。これらの結果から、GSK3β 阻害による temozolomide 感受性の亢進のメカニズムが、c-Myc を介した MGMT プロモーターメチル化であることを証明した (*Carcinogenesis* 2013)。

3) 1. で前述した基礎研究結果を元に、トランスレーショナルリサーチとして、学内倫理委員会の承認を受けて、「GSK 阻害作用を有する薬品を使用した悪性グリオーマの化学療法」と題した小規模第 1 相臨床研究を開始している (倫理委員会課題番号 774、特開 2012-41314)。現在までに 8 例の患者に施行し、その解析結果を示す (直近の 1 例は解析途中であり、それ以外の 7 例の結果を示す)。臨床試験に登録された 7 症例は初発時の抽出検体における活性化型 GSK3β の高発現を確認されている。再発後に GSK カクテルを連日投与し、TMZ は 200mg/m<sup>2</sup> を 28 日毎に投与した。全登録症例が死亡し 4 例に剖検を実施した。初回手術時検体と剖検検体を使用し、免疫組織染色を施行した。GSK カクテルによる GSK3β の阻害効果は、基質である glycogen synthase (GS) のリン酸化、増殖能の抑制は MIB-1 staining index、TMZ 感受性は O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) の発現で検討した。

4) 死亡直前まで GSK カクテルを継続投与されていた 3 例の剖検腫瘍組織において、リ

ン酸化型 GS の発現が低下していた。MIB-1 staining index は著明に減少、MGMT の発現も低下していた。一方、GSK カクテルの投与を中断した 1 例では、リン酸化型 GS、MGMT とともに剖検例において発現の抑制を認めなかった。

5) 再発後 OS が著明に延長した 2 症例 (A 群) と中等度の 5 例 (B 群) に分け、各症例の年齢、KPS、初回手術摘出量、初回手術検体の GSK3 $\beta$  発現量、MGMT promotor type、IDH1 mutation の有無について検討した。MGMT promotor メチル化型/非メチル化型は 4/3 例、IDH1 は 7 例中 6 例が wild type であった。初回手術摘出量は、95% が 1 例、99% が 1 例、肉眼的全摘出が 4 例、生検術が 1 例であった。A 群/B 群における年齢の平均 (範囲) KPS の平均 (範囲) はそれぞれ 72.5 (70-75) / 64.4 (60-77) 歳、30 (20-40) / 46 (30-50) であり、有意差は認めなかった。初回手術検体における GSK3 $\beta$  発現量、初回手術摘出量、IDH1 mutation、MGMT promotor type についても、両群間での差異は認めなかった。

#### 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 2 件)

1) Pyko IV, Nakada M, Sabit H, Teng L, Furuyama N, Hayashi Y, Kawakami K, Minamoto T, Fedulau AS, Hamada J. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  inhibition sensitizes human glioblastoma cells to temozolomide by affecting O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation via c-Myc signaling. Carcinogenesis. 2013 Oct;34(10):2206-17[査読有]

2) Yoshikawa A, Nakada M, Kita D, Watanabe T, Kinoshita M, Miyashita K, Furuta T, Hamada J, Uchiyama N, Hayashi Y. Visualization of angiographical arteriovenous shunting in perisylvian glioblastomas. *Acta Neurochir (Wien)*. 2013 Apr;155(4):715-9 [査読有]

[学会発表](計 5 件)

1) 宮下勝吉, 中田光俊, 林 裕, 渡邊卓也, 木下雅史, 古田拓也, 淑瑠へムラサビット, 源利成, 瀧田潤一郎: 再発膠芽腫に GSK3 $\beta$  阻害作用を有する薬剤を用いた第 1 相臨床試験 第 31 回 日本脳腫瘍学会学術集会, 平成 25 年 12 月 8-10 日, 宮崎

2) 宮下勝吉, 中田光俊, 林 裕, 渡邊卓也, 木下雅史, 古田拓也, 淑瑠へムラサビット, 源利成, 瀧田潤一郎:

GSK3 $\beta$  阻害作用を有する既存薬剤を用いた再発膠芽腫治療の第 I・II 相臨床試験における患者背景とバイオマーカーに関する検討 第 72 回 日本脳神経外科学会学術総会, 平成 25 年 10 月 16-18 日, 横浜

3) 宮下勝吉, 中田光俊, 林 裕, 渡邊卓也, 古田拓也, 淑瑠へムラサビット, 源利成, 瀧田潤一郎:

GSK3 $\beta$  阻害作用を有する既存薬剤を用いた再発膠芽腫の免疫組織学的検討 第 31 回 日本脳腫瘍病理学会, 平成 25 年 5 月 24-25 日, 東京

4) 宮下勝吉, 中田光俊, 林 裕, 木下雅史, 古田拓也, 淑瑠へムラサビット, 渡邊卓也, 喜多大輔, 林 康彦, 内山尚之, 川上和之, 源 利成, 瀧田潤一郎:

再発膠芽腫治療に対して GSK3 $\beta$  阻害作用を有する既存薬剤を用いた単施設第 I・II 相臨床試験 第 30 回 日本脳腫瘍学会学術総会 平成 24 年 11 月 25-27 日, 広島

5) 宮下勝吉, 中田光俊, 林 裕, 渡邊卓也, 木下雅史, 古田拓也, 淑瑠へムラサビット, 喜多大輔, 林康彦, 内山尚之, 川上和之, 源利成, 瀧田潤一郎:

再発神経膠芽腫に対して GSK3 $\beta$  阻害作用を有する既存薬剤を用いた第 I・II 相臨床試験における剖検例の免疫組織学的検討 第 71 回 日本脳神経外科学会総会 平成 24 年 10 月 17-19 日, 大阪

[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 0 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

宮下勝吉 (Miyashita Katsuyoshi)  
金沢大学・医学系・助教  
研究者番号：80624874

(2) 研究分担者

研究者番号：

(3) 連携研究者

中田光俊 (Nakada Mitsutoshi)  
金沢大学・医学系・講師  
研究者番号：20334774

田中慎吾 (Tanaka Shingo)  
金沢大学・医学系・協力研究員  
研究者番号：40507084

古田拓也 (Furota Takuya)  
金沢大学・大学病院・医員  
研究者番号：20646690