

対象研究テーマ：GSK3 β 阻害によるがん治療法の開発と臨床試験

研究期間：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：GSK3 β 阻害による新規膵がん化学療法の開発と臨床試験

研究代表者：金沢医科大学腫瘍内科学 教授 元雄良治

研究成果の概要：

我々は膵癌細胞で glycogen synthase kinase (GSK) 3 β の発現と活性が高く、膵癌細胞の生存と増殖に GSK 3 β が必須であることを見出し、GSK3 β 阻害によるがん治療効果を細胞レベルと担がん動物モデルで実証し、GSK3 β が膵癌の新しい治療標的であることを同定した。GSK 3 β の機能解析により、GSK3 β が誘導するシグナルが p53 がん抑制分子経路、Rb 細胞周期制御経路、細胞不死化経路に影響することを明らかにした。また、ヒト膵癌細胞移植動物において薬理的 GSK3 β 阻害剤の併用が TP53INP1 (tumor protein 53-induced nuclear protein 1) を介する DNA 修復機構を制御して、ゲムシタビン(GEM)の抗腫瘍効果を相乗的に増強することを実証した (Shimasaki T, et al. J Gastroenterol 2012)。本研究では、とくに膵癌細胞の形態特性と運動能に着目して GSK3 β の機能を多角的に解析した。膵癌培養細胞のスクラッチアッセイとトランスウェルアッセイにより、GSK3 β 阻害剤は膵癌細胞の遊走と浸潤を抑制した。また、GEM により誘導される膵癌細胞の形態変化と FAK (focal adhesion kinase)/Rac1/MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) 機軸経路が GSK3 β 阻害剤により抑制された。これらの基礎的解析と並行して、GSK3 β 阻害作用を有する既存医薬品の適応外使用と GEM の併用による進行膵癌治療の医師主導型第 I / II 相臨床研究 (UMIN 000005095) を継続中である。

研究分野：

キーワード：膵癌、GSK3 β 、浸潤、TP53INP1、ゲムシタビン(GEM)

1. 研究開始当初の背景

固形癌の分子標的治療薬では上皮増殖因子受容体(EGFR)の阻害剤や抗体医薬が、いくつかの癌種で良好な治療効果を示しているが、膵癌では erlotinib のみが第 III 相臨床試験で GEM との併用効果が証明されているにすぎない。我々は最近、glycogen synthase kinase (GSK) 3 β が膵癌を含む多くの消化器癌に共通する治療標的であることを明らかにしてきた。

GSK3 β はインスリン経路で発見され、その基質に応じて細胞周期、増殖・分化、アポトーシス、細胞運動など、基幹的細胞生命現象を司る多機能セリン・スレオニンリン酸化酵素である。疾患との関連では、インスリン経路・神経細胞・造骨細胞への作用から、2型糖尿病、アルツハイマー病、骨粗鬆症などの創薬標的として注目され、多数の阻害剤が開発されている。GSK3 β は正常細胞の Wnt 経路制御作用からがん抑制的に作用すると認識されてきたが、我々は、GSK3 β の過剰発現や酵素活性の調節不全ががん細胞の生存や増

殖を維持・促進するという Wnt 経路抑制機能とは異なる病的作用を発見した。そして、GSK3 β 阻害の抗腫瘍効果を大腸癌や脳膠芽腫で実証し、本酵素が新しいがん治療標的であると提唱した。その機能解析から、がん細胞で異常活性を示す GSK3 β が誘導するシグナルが、がん抑制分子 (p53) 経路、細胞周期制御 (Rb) 系や細胞不死化経路に影響を及ぼすことを明らかにした。

膵癌でも同様に GSK3 β の発現や活性の亢進に伴う病的作用が観察され、我々は GSK3 β 阻害により膵癌細胞の生存・増殖抑制のみならず、ゲムシタビン(GEM)の感受性を高めることを *in vitro* と *in vivo* で実証した。これらの予備結果から、GSK3 β が膵癌細胞の浸潤を促進しているのではないかとという着想に至った。我々の研究と前後して GSK3 β は膵癌の新たな治療標的であること示唆する成果が海外で報告されているが、本研究と同じ発想の研究報告は国内外ではみられない。

2. 研究の目的

本研究では、膵癌における GEM による形態変化誘導のメカニズムと GSK3 β 阻害の作用機序の解明を目的として、下記の到達目標を設定した。(1) 我々が最近、同定した膵癌細胞から分泌される因子の発現・機能解析を行ない、GEM による形態変化誘導作用機序を明らかにする。(2) この形態変化誘導因子について、GSK3 β 阻害による影響、機能解析を行い、GSK3 β によるがん細胞の浸潤抑制機序を明らかにする。(3) 本研究から期待される結果と今までに得た知見を応用して、GSK3 β 阻害作用を示すことが報告されている複数の医薬品と GEM の併用による進行・再発膵癌の第 I / II 相臨床試験を現在、実施している。これらの臨床試験の結果とともに、同定した EMT 誘導分子が本治療法のバイオマーカーとなるかについて検討する。本研究により、GEM と GSK3 β 阻害剤の併用による膵がん治療法の作用分子基盤の解明とともに、進行膵癌患者に対する同治療法の安全性と効果を見極めることができると期待される。

3. 研究の方法

①我々は、複数の培養ヒト膵癌細胞株において、低濃度の抗がん剤により細胞の遊走と浸潤能が亢進することを発見した。膵癌細胞 PANC-1 の調整培地のプロテオーム解析により、候補となる 55 種類の分子を同定した。ほとんどの分子は GEM 投与により分泌が低下したが、有意に分泌が上昇した 8 種類の分子のうち、組換え蛋白質の添加により同様の形態変化を誘導する蛋白質を発見した。

形態変化の評価は、顕微鏡による形態学的観察と、N-cadherin, E-cadherin, vimentin, ZO-1, snail など、関連マーカーの発現と細胞内局在の変化を、Western blot 法と免疫蛍光染色法により観察した。

②GSK3 β 阻害による抗がん剤誘導性形態変化の抑制メカニズムの解明

GSK3 β 阻害による形態変化抑制効果の作用機序について、小分子 GSK3 β 阻害剤や RNA 干渉法を用いて、GSK3 β 阻害による影響を検討した。

③GSK3 β 阻害剤の併用による進行膵がん治療の第 I・II 相臨床試験の実施 すでに医薬品として処方されているものの中で GSK3 β 阻害作用を有する複数の薬剤を GEM と併用する化学療法により、進行膵癌患者における腫瘍の縮小や良好な QOL を保ちながらの生存期間の延長が得られるかを検証する。すでに金沢医科大学病院倫理審査委員会で承認を受け、本臨床試験を開始した。

4. 研究成果

膵癌で glycogen synthase kinase (GSK) 3 β の発現と活性が高く、腫瘍細胞の生存と増殖に必須であることを見出した。そして、

GSK3 β 阻害によるがん治療効果を細胞レベルと担がん動物モデルで実証し、GSK3 β が膵癌の新しい治療標的であることを同定した。その機能解析から、がん細胞で異常活性を示す GSK3 β が誘導するシグナルが p53 がん抑制分子経路, Rb 細胞周期制御系や細胞不死化経路に影響を及ぼすことを明らかにした。また、ヒト膵癌細胞移植動物において薬理的 GSK3 β 阻害剤の併用は TP53INP1 (tumor protein 53-induced nuclear protein 1) を介する DNA 修復機構を制御して、ゲムシタビン (GEM) の抗腫瘍効果を相乗的に増強することを実証した。GSK3 β 阻害剤はがん細胞の遊走と浸潤を抑制した。その効果に伴い、GEM により誘導されるがん細胞の形態変化と、FAK/Rac1/MMP-2 機軸経路が抑制された

(Kitano A et al. PLoS One 2013) . これらの解析と並行して、GSK3 β 阻害効果が科学的に立証された既存医薬品の適応外使用と GEM の併用による進行膵癌治療の医師主導型第 I / II 相臨床研究 (UMIN 000005095) を 2011 年に開始し、現在までに 4 例の症例に対して治療を行ない、治療薬の投与量の検討を行った。

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 7 件)

1. Kitano A, Shimasaki T, Chikano Y, Nakada M, Hirose M, Higashi T, Ishigaki Y, Endo Y, Takino T, Sato H, Sai Y, Miyamoto K, Motoo Y, Kawakami K, Minamoto T. Aberrant glycogen synthase kinase 3 β is involved in pancreatic cancer cell invasion and resistance to therapy. PLoS One, 8(2):e55289, 2013.
2. Nakaya N, Ishigaki Y, Nakajima H, Murakami M, Shimasaki T, Takata T, Ozaki M, Dusetti NJ, Iovanna JL, Motoo Y. Meaning of tumor protein 53-induced nuclear protein 1 in the molecular mechanism of gemcitabine sensitivity, Mol Clin Oncol 1 :100-104, 2013.
3. Takata T, Ishigaki Y, Shimasaki T, Tsuchida H, Motoo Y, Hayashi A Tomosugi N. Characterization of proteins secreted by pancreatic cancer cells with anticancer drug treatment *in vitro*. Oncol Rep 28: 1968-1976, 2012.
4. Nakajima H, Koizumi K, Tanaka T, Ishigaki Y, Yoshitake Y, Yonekura H, Sakuma T, Fukushima T, Umehara H, Ueno S, Minamoto T, Motoo Y. Loss of

HITS(FAM107B) expression in cancers of multiple organs: tissue microarray analysis. Int J Oncol, 41: 1347-1357, 2012.

5. Okada G, Watanabe H, Ohtsubo K, Mouri H, Yamaguchi Y, Motoo Y, Sawabu N. Multiple factors influencing the release of hTERT mRNA from pancreatic cancer cell lines in in vitro culture. Cell Biol Int. 36(6): 545-53, 2012.
6. Shimasaki T, Kitano A, Motoo Y, Minamoto T. Aberrant glycogen synthase kinase 3 β in the development of pancreatic cancer. J Carcinog. 11(1):15, 2012.
7. 島崎 猛夫, 石垣 靖人, 高田 尊信, 川上 和之, 上田 順彦, 友杉 直久, 小坂 健夫, 源 利成, 元雄 良治. GSK3 β 標的治療と化学療法を併用する膵がんの新規治療戦略と分子基盤. 膵臓 27(3): 469, 2012.

[学会発表] (計 4 件)

1. 島崎 猛夫, 川上 和之, 上田 順彦, 小坂 健夫, 源 利成, 元雄 良治. ポスター 消化器病 膵臓(腫瘍 4): GSK3 β 標的治療を併用した膵癌の新規治療戦略と分子基盤. 第 54 回日本消化器病学会大会, (神戸, '12.10.10).
2. 島崎 猛夫, 北野 綾子, 石垣 靖人, 高田 尊信, 川上 和之, 竹上 勉, 友杉 直久, 源 利成, 元雄 良治. 膵癌の新規治療標的としての glycogen synthase kinase(GSK)3B β : がん浸潤に対する作用. 第 71 回日本癌学会学術総会, (札幌, '12.9.19).
3. 島崎 猛夫, 北野 綾子, 佐藤 博, 源 利成, 元雄 良治. 肝胆膵がん②: GSK3 β の異常活性に起因する膵がん細胞の浸潤と治療抵抗性. 第 10 回日本臨床腫瘍学会学術集会, (大阪, '12.07.28).
4. 島崎 猛夫, 石垣 靖人, 高田 尊信, 川上 和之, 上田 順彦, 友杉 直久, 小坂 健夫, 源 利成, 元雄 良治. 主題関連セッション 切除不能膵癌 (1): GSK3 β 標的治療と化学療法を併用する膵がんの新規治療戦略と分子基盤. 第 43 回日本膵臓学会大会, (山形, '12.06.29).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金沢医科大学腫瘍内科学・教授 元雄良治

(2) 研究分担者

金沢医科大学総合医学研究所・准教授

石垣 靖人

金沢医科大学総合医学研究所・講師

島崎猛夫

金沢医科大学・大学院生 馬 少福

(3) 本研究所担当者

腫瘍制御・教授 源 利成