

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 9 月 11 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04928

研究課題名(和文) GSK3 経路を標的とする大腸がんの病態解明と治療法開発の基盤形成

研究課題名(英文) Investigation of biological basis of GSK3beta-targeted therapy and its translation to colorectal cancer treatment

研究代表者

源 利成 (MINAMOTO, Toshinari)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：50239323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000 円

研究成果の概要(和文)：グリコーゲン合成酵素キナーゼ(GSK)3 と大腸がん病態の関連をがんの代謝特性や micro(mi)-RNAなどに着目して解析した。GSK3 は70%の大腸がん症例の腫瘍で発現亢進し、let-7 miRNAの発現と逆相関したが、K-rasやSrcの活性とは相関しなかった。大腸がん細胞と腫瘍組織の代謝における機能解析から、GSK3 はがん促進的な代謝を誘導することを見いだした。GSK3 標的療法のがん治療への応用のため、阻害剤シード化合物の効果の予備検討を行った。

研究成果の概要(英文)：We explored the biological role of glycogen synthase kinase (GSK)3 in colorectal cancer (CRC) progression by focusing on the distinct metabolic profile and micro(mi)-RNA. Expression of GSK3 was increased in 70% of clinical CRC tumors, which was associated inversely with expression of tumor suppressive let-7 miRNA but not with activation of K-ras or Src oncoprotein. Metabolic analysis of GSK3 in CRC cells and tumors found that GSK3 was responsible for tumor-promoting aberrant metabolism. For translation of GSK3 -targeted therapy to cancer treatment, we also conducted preliminary studies on cancer therapeutic effects of GSK3 -inhibiting seed compounds.

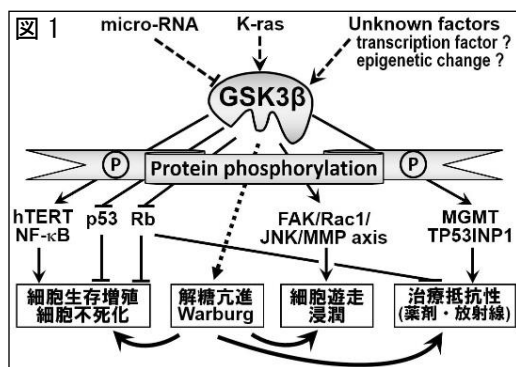
研究分野：医歯薬学

キーワード：大腸がん 病態 治療

1. 研究開始当初の背景

グリコーゲン合成酵素キナーゼ (GSK) 3 β はリン酸化基質の多様性から糖代謝をはじめ広範な細胞生命現象を調節し、ひろく疾患の発症や病態に機能している¹⁾。とくに糖尿病やアルツハイマー病の創薬標的として注目されている GSK3 β が、“Wnt 経路を抑制する”という従来の認識とは異なり「がん促進的に作用する治療標的である」ことを我々は発見した²⁾。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で実証し、GSK3 β 阻害作用を示す既存医薬品の転用と抗がん剤を併用するがん治療法を考案し、医師主導型臨床研究により安全性と効果を検証してきた (UMIN000005095, 000005111)³⁾。

GSK3 β 阻害によるがん治療法の開発と応用には、これまでに我々が明らかにしてきた GSK3 β のがん促進作用の生物学的基盤 (図 1: 点線は本研究の仮説)⁴⁾を深化させることが重要である。



2. 研究の目的

本研究は、GSK3 β と大腸がんの悪性形質に関する分子病態をがんの代謝特性や micro-RNA (miR) などの視点から明らかにする。それに基づいて、臨床応用を視野に入れたシード化合物とアンチセンスオリゴ核酸のがん治療効果を検討するとともに、新規 GSK3 β 阻害剤の同定のため化合物スクリーニング法を考案する。これにより、GSK3 β を標的とする大腸がんの病態解明と治療法開発の基盤形成を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 大腸がんにおける GSK3 β 発現と K-ras 変異、GSK3 β 制御性 miR 発現と臨床病理学的所見との比較解析

分子レベルの研究で、変異型 K-ras が MAPK を介して GSK3 β の転写を促進することと、特定の miR (miR-29b, miR-101, miR-199a; GSK3 β 制御性 miR) が GSK3 β の発現を抑制することが報告されている^{5,6)}。一方、GSK3 β 活性亢進のメカニズムに関して、チロシンキナーゼ Src が第 216 チロシンをリン酸化して GSK3 β を活性化することが報告された⁷⁾。複数の大腸がん細胞株と大腸がん組織検体を対象に、GSK3 β の発現を K-ras 変異、Src の活性化型リン酸化と GSK3 β 制御性 miR の発現と比較解析した。また、これらの分子発現と大腸がん症例の臨床病理学的所見を対比した。

(2) 大腸がんにおける GSK3 β と let-7 miRs 発現の比較解析

let-7 は個体発生や細胞分化の制御に重要な役割を果たす複数種類の miR ファミリーである。がんでは Ras や high-mobility group A (HMGA) 2 などのオンコプロテインの発現を制御してがん抑制的に作用する。近年、GSK3 β が let-7 の発現を制御することが報告された⁸⁾。そこで、大腸がん細胞と大腸がん組織検体を対象に、GSK3 β と let-7 ファミリー-miR (let-7c, let-7d, miR-98) の発現レベルを比較し、臨床病理学的所見との関連を調べた。

(3) がんの糖代謝における GSK3 β の機能解析

正常細胞と大腸がん細胞 (SW480, HCT116) を対象に、GSK3 β 阻害による解糖経路と酸化的リン酸化 (TCA) 回路における個々の中間代謝産物量の変化を、それぞれの解析キットを用いて比較測定した。

免疫不全マウスに大腸がん細胞 (SW480, HCT116) を皮下移植した。これらのマウスを対照 (DMSO 投与) 群と GSK3 β 阻害剤 (AR-A014418) 治療群に分け、それぞれ肝 (正常組織) と移植腫瘍における個々の中間代謝産物量を上記の細胞解析と同様に計測した。

(4) 新規 GSK3 β 阻害剤のがん治療効果の解析

現在、米国で白血病と固形がん治療の臨床試験で使用されているイーライリリー社の新規 GSK3 β 阻害剤 LY2090314^{9, 10)}のがん細胞に対する効果を MTT アッセイにより解析した。

(5) リン酸化グリコーゲン合成酵素 (glycogen synthase: GS) ペプチド特異抗体の作成

GSK3 β の基質 GS の第 641 セリンリン酸化 (pGS^{S641}) ペプチドを合成し、ウサギに免疫した。得られた抗血清から、リン酸化ペプチドあるいは非リン酸化ペプチドを結合させた抗原カラムを用いて GS^{S641} リン酸化ペプチド特異抗体を精製した。抗体の特異性はと力価は ELISA 法により検定した。

4. 研究成果

(1) 大腸がんにおける GSK3 β 発現亢進のメカニズムと、臨床病理学的所見との関連

複数の大腸がん細胞株と大腸がん 58 例を対象に GSK3 β 発現を解析した結果、多くの細胞株で発現が亢進し、70%の症例で正常粘膜よりがん組織で高い発現を認めた。58 例の大腸がん症例うち、miR-29b, miR-101, miR-199a の発現が非がん部粘膜に比べてがん組織で低下していた症例はそれぞれ 33 例 (57%)、48 例 (83%)、44 例 (76%)であった。それぞれの miR 発現と GSK3 β 発現を waterfall plot で比較すると、GSK3 β 蛋白質と GSK3 β 制御性 miR の発現はいずれも逆相関を示した (図 2A-C)。GSK3 β 発現の waterfall plot に 3 種類の miR の発現を重ね

比較して、逆相関の傾向であった(図 2D)。GSK3 β 発現と、K-ras コドン 12, 13 の変異や Src リン酸化とは相関しなかった。また、腫瘍における GSK3 β 発現と臨床病理学的所見やがんの病期には明らかな相関は認められなかった。

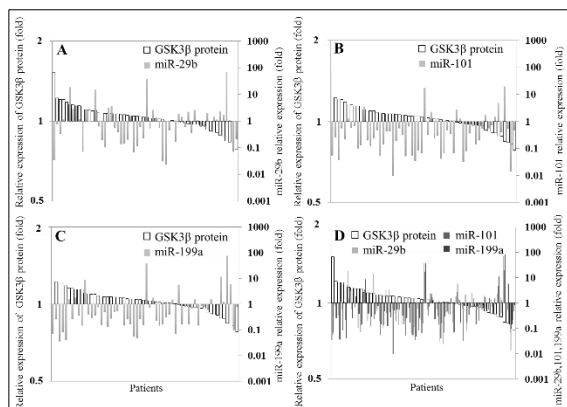


図2. 大腸がんにおける GSK3 β 蛋白質と GSK3 β 制御性 miR (miR-29b, -101, -199a) の発現の比較解析。GSK3 β 蛋白質発現の waterfall plot において、同一症例にそれぞれ miR-29b, miR-101, miR-199a の発現量を重ねて表示した (A-C)。縦軸左は非がん部粘膜に対するがん組織での GSK3 β 蛋白質の相対的発現を、縦軸右は同様にかん組織でのそれぞれの miR 相対的発現量を示す。横軸は大腸がん患者 58 例を示す。(D) GSK3 β 蛋白質発現の waterfall plot の同一症例に 3 種類の miR の発現変化をすべて重ねて表示した。

これらの結果より、GSK3 β 制御性 miR 発現抑制が大腸がんにおける GSK3 β 発現亢進の一因と考えられた。

(2) 大腸がんにおける GSK3 β と let-7 miRs 発現

大腸がん 52 症例中、let-7 family 発現が非がん部粘膜に比べてがん組織で低下していた症例は let-7c が 44 例 (85%)、let-7d が 37 例 (71%)、miR-98 が 35 例 (67%) であった。waterfall plot で比較すると、GSK3 β 蛋白質と let-7 family miR の発現はいずれも逆相関を示した (図 3A-C)。

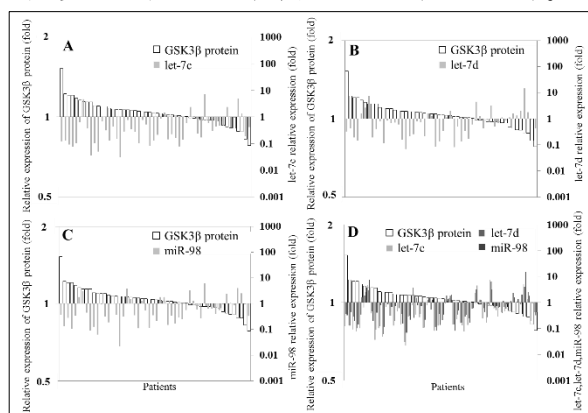


図3. 大腸がんにおける GSK3 β 蛋白質と let-7 miR family の発現の比較解析。GSK3 β 蛋白質発現の waterfall plot において、同一症例にそれぞれ let-7c, let-7d, miR-98 の発現量を重ねて表示した (A-C)。縦軸左は非がん部粘膜に対するがん組織での GSK3 β 蛋白質の相対的発現を、縦

軸右は同様にかん組織での各 miR の相対的発現量を示す。横軸は大腸がん患者 52 例を示す。(D) GSK3 β 蛋白質発現の waterfall plot の同一症例に 3 種類の miR の発現量を重ねて示した。

GSK3 β 発現の waterfall plot に let-7 family miR の発現量を重ね比較すると、両者は逆相関を示した (図 3D)。統計学的には、GSK3 β 蛋白質の高発現を示す症例では let-7c ($p=0.0056$) と miR-98 ($p=0.0051$) が低発現のとき有意に高頻度であった。

本解析結果より、腫瘍におけるがん抑制性 let-7 family miR の発現低下が GSK3 β のがん促進作用メカニズムの 1 つであると考えられる。

(3) がん特有の糖代謝における GSK3 β の機能

正常細胞に比べて大腸がん細胞の中間代謝産物量は解糖系優位で、ワールブルグ効果に相当する結果であった。

がん特有のエネルギー代謝は酸素の多寡によらない解糖亢進 (ワールブルグ効果) であり、乳酸蓄積、ミトコンドリア不調和とグルタミン異化を伴う。そして、ミトコンドリア膜過分極、過酸化水素 (H_2O_2) 産生やチトクローム C 放出の低下により、がん細胞は抗がん剤や放射線に抵抗する¹⁾。GSK3 β は本来、グリコーゲン合成酵素の制御によりグリコーゲン合成と糖の異化という相反経路の起点で作用する¹⁾。

(4) 新規 GSK3 β 阻害剤のがん治療効果

米国リリー社で開発され、白血病や固形がんの治療で臨床試験されている LY2090314 は複数の消化器がん細胞に対して細胞生存や増殖の抑制効果を示した。その効果は用量と時間依存性であり、IC₅₀ が 10 μ M 前後であった。有望ながん治療薬の候補になると考え、作用メカニズムや正常細胞への影響などの解析を進める予定である。

【参考文献】

- 1) Patel P, Woodgett JR. Glycogen synthase kinase 3: a kinase for all pathways? *Curr Top Dev Biol* 2017;123:278-302.
- 2) Miyashita K, et al. An emerging strategy for cancer treatment targeting aberrant glycogen synthase kinase 3 β . *Anti-Cancer Agents Med Chem* 2009;9:1114-22.
- 3) Furuta T, et al. Biological basis and clinical study of glycogen synthase kinase-3 β -targeted therapy by drug repositioning for glioblastoma. *Oncotarget* 2017;8:22811-24.
- 4) Domoto T, et al. Glycogen synthase kinase 3 β is a pivotal mediator in cancer invasion and resistance to therapy. *Cancer Sci* 2016;107:1363-72.
- 5) Zhang JS, et al. Mutant K-ras increases GSK-3 β gene expression via an ETS-p300 transcriptional complex in pancreatic cancer. *Oncogene* 2011;30:3705-15.
- 6) Liu Y, et al. MicroRNAs modulate the Wnt

signaling pathway through targeting its inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;408:259-64.

- 7) Goc A, et al. Targeting Src-mediated Tyr216 phosphorylation and activation of GSK-3 in prostate cancer cells inhibit prostate cancer progression in vitro and in vivo. *Oncotarget* 2014;5:775-87.
- 8) Guo R, et al. Novel microRNA reporter uncovers repression of Let-7 by GSK-3 β . *PLoS One* 2013;8:e66330.
- 9) Zamek-Gliszczynski MJ, et al. Pharmacokinetics, metabolism, and excretion of the glycogen synthase kinase-3 inhibitor LY2090314 in rats, dogs, and humans: a case study in rapid clearance by extensive metabolism with low circulating metabolite exposure. *Drug Metab Dispos* 2013;41:1174-8.
- 10) Gray JE, et al. A first-in-human phase I dose-escalation, pharmacokinetic, and pharmacodynamic evaluation of intravenous LY2090314, a glycogen synthase kinase 3 inhibitor, administered in combination with pemetrexed and carboplatin. *Invest New Drugs* 2015;33:1187-96.
- 11) Cantor JR, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer Discov* 2012;2:881-98.

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 5件)

- (1) Furuta T, Sabit H, Dong Y, Miyashita K, Kinoshita M, Uchiyama N, Hayashi Y, Hayashi Y, Minamoto T, Nakada M. Biological basis and clinical study of glycogen synthase kinase-3 β -targeted therapy by drug repositioning for glioblastoma. *Oncotarget* 8 (14): 22811-24, 2017. doi: 10.18632/oncotarget.15206. 査読有り
- (2) 島崎猛夫, 堂本貴寛, 宮下知治, 中田光俊, 元雄良治, 太田哲生, 源 利成. 膵がんの増殖, 浸潤と治療不応性を繋ぐ治療標的 GSK3 β . *肝胆膵* 75 (4): 769-75, 2017. 査読あり
- (3) Shimozaki S, Yamamoto N, Domoto T, Nishida H, Hayashi K, Kimura H, Takeuchi A, Miwa S, Igarashi K, Kato T, Aoki Y, Higuchi T, Hirose M, Hoffman RM, Minamoto T, Tsuchiya H. Efficacy of glycogen synthase kinase-3 β targeting against osteosarcoma via activation of β -catenin. *Oncotarget* 47 (7): 77038-51, 2016. doi: 10.18632/oncotarget.12781. 査読有り
- (4) Domoto T, Pyko IV, Furuta T, Miyashita K, Uehara M, Shimasaki T, Nakada M, Minamoto T. Glycogen synthase kinase 3 β is a pivotal mediator in cancer invasion and resistance to

therapy. *Cancer Sci* 107 (10): 1363-72, 2016. doi: 10.1111/cas.13028. 査読有り

- (5) Chikano Y, Domoto T, Furuta T, Sabit H, Kitano-Tamura A, Pyko IV, Takino T, Sai Y, Hayashi Y, Sato H, Miyamoto KI, Nakada M, Minamoto T. Glycogen synthase kinase 3 β sustains invasion of glioblastoma via the focal adhesion kinase, Rac1 and c-Jun N-terminal kinase-mediated pathway. *Mol Cancer Ther* 14 (2): 564-74, 2015. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0479. 査読有り

[学会発表](計 20件)

- (1) Takahiro Domoto, Ilya V. Pyko, Masahiro Uehara, Dilireba Bolidong, Toshinari Minamoto. Aberrant glycogen synthase kinase (GSK)3 β participates in tumor-promoting autophagy in colorectal cancer. The 9th International Conference on the International Society of Gastroenterological Carcinogenesis, November 17, 18, 2017, Kumamoto, Japan.
- (2) Masahiro Uehara, Takahiro Domoto, Satoshi Takenaka, Ilya Pyko, Takeo Shimasaki, Tomoharu Miyashita, Tetsuo Ohta, Toshinari Minamoto. Putative role of glycogen synthase kinase (GSK)-3 β in acquired resistance to gemcitabine (GEM) in pancreatic cancer. The 9th International Conference on the International Society of Gastroenterological Carcinogenesis, November 17, 18, 2017, Kumamoto, Japan.
- (3) 堂本貴寛, 宮下知治, 竹中 哲, 上原将大, 太田哲生, 源 利成. GSK3 β はゲムシタビン獲得耐性膵がんの浸潤を促進する. 第76回日本癌学会学術総会, 2017年9月28日-30日, パシフィコ横浜, 横浜市.
- (4) 上原将大, 堂本貴寛, 竹中 哲, ピコ イリア, 島崎猛夫, 宮下知治, 太田哲生, 源 利成. 膵がんのゲムシタビン耐性獲得における glycogen synthase kinase (GSK)-3 β の役割. 第76回日本癌学会学術総会, 2017年9月28日-30日, パシフィコ横浜, 横浜市.
- (5) ボリドン ディリレバ, 堂本貴寛, 奥村知之, 遠藤良夫, 上原将大, ピコ イリア, 宮下知治, 源 利成. Glycogen synthase kinase (GSK)3 β の食道扁平上皮がん促進作用の検討. 第76回日本癌学会学術総会, 2017年9月28日-30日, パシフィコ横浜, 横浜市.
- (6) 堂本貴寛, 竹中 哲, 宮下知治, 上原将大, 太田哲生, 源 利成. ゲムシタビン獲得耐性膵がん細胞の幹細胞性と浸潤能における GSK3 β の作用. 第26回日本がん転移学会学術集会・総会, 2017年7月27日, 28日, 大阪国際会議場, 大阪市.
- (7) 竹中 哲, 宮下知治, 上原将大, 堂本貴寛, 源 利成, 太田哲生. 膵がん治療耐性に伴う幹細胞性と GSK3 β /STAT3 経路の機能解析. 第26回日本がん転移学会学術集会・

総会, 2017 年 7 月 27 日, 28 日, 大阪国際会議場, 大阪市.

- (8) Shingo Shimozaki, Norio Yamamoto, Takahiro Domoto, Toshinari Minamoto, Robert M. Hoffman, Hiroyuki Tsuchiya. Therapeutic effect of glycogen synthase kinase-3 β inhibition against osteosarcoma via activation of β -catenin. The 19th International Society of Limb Salvage General Meeting. May 10-12, 2017, Hotel Nikko Kanazawa, Kanazawa, Japan.
- (9) 源 利成. 消化器・難治がんの糖代謝特性と治療:創薬標的 GSK3 β に着目して. 第4回山梨医学フォーラム, 2017 年 2 月 16 日, 山梨大学医学部 臨床小講堂, 山梨県中央市.
- (10) 源 利成. 大腸がん研究から同定した治療標的:難治, 希少がんへの展開. 埼玉大腸がん地域連携カンサード, 2017 年 2 月 3 日, ラ・ボア・ラクテ, 川越市.
- (11) 堂本貴寛, 上原将大, Ilya V. Pyko, 源 利成. GSK3 β はがん促進性オートファジーを介して大腸がん細胞の生存に関与する. 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月 6 日-8 日, パシフィコ横浜, 横浜.
- (12) 上原将大, 堂本貴寛, 竹中 哲, 竹内 修, ピコ イリア, 島崎猛夫, 宮下知治, 太田哲生, 源 利成. 膵がんの化学療法耐性獲得にける glycogen synthase kinase (GSK)-3 β の役割. 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月 6 日-8 日, パシフィコ横浜, 横浜.
- (13) 宮下知治, 松井大輔, 源 利成, 太田哲生. TJ-14 による食道発癌抑制とその機序. 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月 6 日-8 日, パシフィコ横浜, 横浜.
- (14) 竹中 哲, 宮下知治, 太田哲生, 堂本貴寛, 源 利成. GSK3 β を阻害することによる膵臓がんの化学療法耐性解除への可能性. 第 25 回日本がん転移学会学術集会・総会, 2016 年 7 月 21 日, 22 日, 米子コンベンションセンター, 米子.
- (15) 源 利成. GSK3 β 阻害によるがん悪性形質の制御とがん治療法の開発・臨床応用. 金沢医科大学大学院医学研究セミナー, 2015 年 11 月 27 日, 金沢医科大学医学教育棟 4 階 E41 講義室, 河北郡内灘町.
- (16) 下崎真吾, 山本憲男, 林 克洋, 木村浩明, 武内章彦, 三輪真嗣, 稲谷弘幸, 青木 裕, 樋口貴史, 阿部健作, 堂本貴寛, 大塚隆信, 源 利成, 土屋弘行. GSK3 β 阻害薬を用いた骨肉腫への分子標的治療. 第 53 回日本癌治療学会学術集会, 2015 年 10 月 29 日-31 日, 国立京都国際会館, 京都.
- (17) 堂本貴寛, 古田拓也, 滝野隆久, 佐藤 博, 中田光俊, 源 利成. GSK3 β は FAK/Rac1/JNK 経路を介する MMPs の発現亢進によって膠芽腫細胞の浸潤を推進する. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 8 日-10 日, 名古屋国際会議場, 名古屋.
- (18) 島崎猛夫, 山本聡子, 堂本貴寛, 有沢富康,

友杉直久, 源 利成. ゲムシタピンにより膵癌細胞に誘導される EMT 促進因子の同定と機能解析:GSK3 β 阻害による制御. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 8 日-10 日, 名古屋国際会議場, 名古屋.

- (19) Toshinari Minamoto. Biological basis of cancer treatment by GSK3 β inhibition. 2015 Kanazawa University Cancer Research Institute and Fudan University Shanghai Cancer Center Joint Symposium/International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa, September 11, 2015, Kanazawa University School of Medicine Memorial Hall, Kanazawa, Japan.
- (20) 堂本貴寛, 滝野隆久, 佐藤 博, 源 利成. GSK3 β は FAK-Rac1-JNK 経路を介して膠芽腫細胞の浸潤を推進する. 第 24 回日本がん転移学会学術集会・総会, 2015 年 7 月 23 日, 24 日, シティプラザ大阪, 大阪.

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔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
<http://ganken.cri.kanazawa-u.ac.jp/shuyoseigyoo/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

源 利成(MINAMOTO, Toshinari)
金沢大学・がん進展制御研究所・教授
研究者番号: 50239323

(2) 研究分担者

宮下 知治(MIYASHITA, Tomoharu)
金沢大学・附属病院・助教
研究者番号: 30397210

(3)連携研究者

太田 哲生(OHTA, Tetsuo)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号: 40194170

(4)連携研究者

曾我 朋義(SOGA, Tomoyoshi)

慶応義塾大学・環境情報学部・教授

研究者番号: 60338217

(5)連携研究者

清尾 康志(SEIO, Kohshi)

東京工業大学・生命理工学研究科・准教授

研究者番号: 20313356

(6)研究協力者

堂本 貴寛(DOMOTO, Takahiro)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号: 80635540