

令和 4 年 4 月 23 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07710

研究課題名（和文）GSK3 によるがん促進的糖代謝特性の解明と制御への応用

研究課題名（英文）Exploring the characteristics of tumor-promoting glycometabolism enhanced by GSK3beta toward application to cancer therapy.

研究代表者

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：大腸がん細胞におけるGSK3 のがん促進作用をがん細胞の栄養獲得機構に焦点を当てて解析し、乳酸産生・分泌とオートファジー誘導に対するGSK3 の作用を見出した。また、GSK3 阻害剤とオートファジー阻害剤併用による細胞増殖に対する効果とその分子機構の解析から、両阻害剤の併用により、がん細胞の栄養獲得機構を標的とした効率的ながん治療法の開発につながることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんは解糖系優位な代謝への依存とともに、オートファジーをエネルギー源として利用している。GSK3 が解糖系とオートファジーを一連の経路として統合的に制御しているというメカニズムが示されることによって、がん特有の代謝を一括で標的にするという独創的な治療法の科学的基盤になることが期待される。また、がん特有の代謝経路を広く理解することにより、がんの病態解明と新たな治療法の開発につながることはもとより、代謝異常による細胞現象への理解や他の疾患に対する治療法開発の応用に波及する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We investigated the tumor promoting role of GSK3 by focusing on nutrient acquisition mechanism in cancer cells, and clarified the effect of GSK3 on lactate production and induction of autophagy in colon cancer. Analysis of the efficacy of combined treatment with GSK3 inhibitor and autophagy inhibitor for cell growth and of its mechanism suggest that nutrient acquisition mechanism may be as a promising therapeutic target for cancer treatment.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：分子標的治療 がん代謝 GSK3 オートファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

GSK3 β は糖代謝をはじめ、さまざまな構造分子や転写因子など機能性分子の安定性や活性を調節する多機能セリン・スレオニンキナーゼである。申請者はこれまでに大腸がん細胞のメタボローム解析をもとにして、多くの代謝産物量が変動するなかから GSK3 β 阻害によって乳酸量の減少とともに、がん細胞特有の酸素多寡に依存しない解糖経路 (Warburg 効果) が抑制されることを見出した。この代謝シフトはミトコンドリアの酸化的リン酸化 (TCA) 回路の賦活化を伴っていることから、GSK3 β による代謝変化ががん特有の代謝を制御している可能性が示唆された。また、GSK3 β 阻害による代謝変動を解析する過程で、がん細胞の奇異なエネルギー獲得性を支えるオートファジーの関与が示唆された。多くの固形がんは低酸素・低栄養に加えて過剰な乳酸産生による低 pH という劣悪な環境に置かれているが、このような腫瘍環境に関係なく恒常的にオートファジーを活性化させて、増殖、浸潤、治療耐性などの悪性形質を獲得している。このためオートファジーは格好のがん治療標的として国内外で注目され、その誘導や悪性形質の賦与に関するメカニズムが盛んに研究されている。がんは解糖系優位の代謝への依存とともに、オートファジーをエネルギー源として利用しているため、がん特有の代謝経路を広く理解することにより、がんの病態解明と新たな治療法の開発につながることを期待される。

2. 研究の目的

我々はこれまでの大腸がん研究により、GSK3 β はがん治療標的であることを見出し、膵がん、膠芽腫、骨肉腫などの難治・希少がんについても検証した。そして、GSK3 β 阻害によるがん治療効果がこれらのがん種に共通する生物学的メカニズムとそれぞれに固有の分子経路を介することを明らかにしてきた。また、大腸がんで異常活性を示す GSK3 β が代謝に及ぼす影響についてメタボローム解析を試みた結果、GSK3 β が解糖系中間代謝産物のピルビン酸からミトコンドリアの TCA 回路に触媒するピルビン酸脱水素酵素 (PDH) を特異的リン酸化により不活性化して、Warburg 効果の一因になることのみならず、GSK3 β によるオートファジー活性化を示す代謝変動が生じることが判明した。GSK3 β を標的とするがん治療法の確立とその安全性を確定するためには、この治療法の分子機構を明らかにすることが不可欠である。本研究では大腸がん細胞における GSK3 β のがん促進作用をがん細胞の栄養獲得機構に焦点を当てて解析する。我々が独自に見出した治療標的 GSK3 β が解糖系とオートファジーを一連の経路として統合的に制御しているというメカニズムを示すことによって、がん特有の代謝を一括で標的にするという治療法の科学的基盤形成を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 大腸がん細胞における乳酸産生・分泌とオートファジー誘導に対する GSK3 β の機能解析

正常大腸上皮細胞 (CCD 841 CoN) と大腸がん細胞 (SW480, HCT116, LoVo) におけるオートファジー活性状態と乳酸分泌量を比較解析した。また、細胞外に分泌された乳酸によるオートファジー活性状態の変化を解析した。そして、これらの細胞で GSK3 β 阻害あるいは GSK3 β 強制発現によるオートファジー活性の変化と関連分子の発現に対する影響を解析した。

(2) マウス大腸がん細胞皮下移植腫瘍におけるオートファジー活性状態の解析

先行研究で作製した大腸がん細胞 (SW480) のマウス移植腫瘍の組織切片 (非治療群と GSK3 β 阻害剤 AR-A014418 投与群) を用いて、オートファジー関連分子の発現を免疫染色で解析した。これにより、マウス個体における GSK3 β 阻害による代謝変動ががん促進的オートファジーにどのように影響するのかを検討した。

(3) GSK3 β 阻害剤とオートファジー阻害剤併用による細胞増殖に対する効果と分子機構の解析

大腸がん細胞株 SW480 と HCT116 に対して、GSK3 β 阻害剤 AR-A014418 とオートファジー阻害剤ヒドロキシクロキンを併用することによる細胞増殖に対する効果をイソボログラム解析で検討した。GSK3 β 阻害によるがん特異的な糖代謝の制御とともに、アミノ酸や脂肪酸代謝を調節するオートファジーを阻害することにより、がんの特徴的な代謝を広く標的とする治療へ応用できるかを実験的に評価した。

4. 研究成果

(1) 大腸がん細胞における乳酸産生・分泌とオートファジー誘導に対する GSK3 β の機能解析

大腸がん細胞 (SW480, HCT116, LoVo) では正常大腸上皮細胞 (CCD 841 CoN) や非腫瘍性細

胞 (HEK293) と比較して、乳酸分泌が亢進されていたが、GSK3 β 阻害剤を処理することによって乳酸分泌が有意に減少することを見出した (図 1 A)。また、大腸がん細胞の培地に乳酸を添加することによって、オートファジーの駆動分子である LC-3B-II の形成を促進できることが判明した (図 1 B)。これまでに我々は、大腸がん細胞では RNA 干渉や阻害剤で GSK3 β を抑制することによって、オートファジー活性を減弱できることを明らかにしている。実際、大腸がん細胞で GSK3 β を阻害すると、LC-3B-II の形成が抑制され、リソソーム膜蛋白質 LMAP-1 が蓄積した (図 2 A)。これに対し、各細胞で恒常的活性型 GSK3 β を過剰発現させると LC-3B-II の形成が促進した (図 2 B)。また、大腸がん細胞におけるオートファジー関連分子の発現を定量的 RT-PCR により測定、比較した結果、大腸がん細胞では正常大腸細胞と比較して、ピルビン酸から乳酸に変換する LDHA の発現およびオートファゴソームの形成に必須な Atg12 の発現が亢進していることを見出した。これらの発現プロファイルは、TCGA データベースにおけるヒト大腸がん組織の遺伝子発現パターンと結果が一致した。以上のことから、GSK3 β は LDHA の発現誘導による乳酸産生の亢進とともに、転写因子などを介して間接的なオートファジー誘導にも関与している可能性が示唆された。

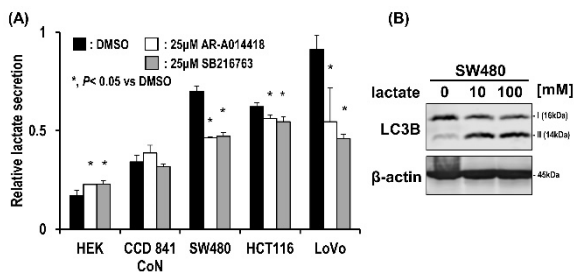


図 1 大腸がん細胞における GSK3 β の乳酸産生への影響と乳酸のオートファジーへの影響
(A) GSK3 β 阻害剤 (AR-A014418, SB-216763) の非腫瘍性細胞 (HEK293) と正常大腸上皮細胞 (CCD 841 CoN) および大腸がん細胞 (SW480, HCT116, LoVo) における乳酸分泌に対する効果。(B) 大腸がん細胞の乳酸処理による LC3B-II 形成に対する影響。

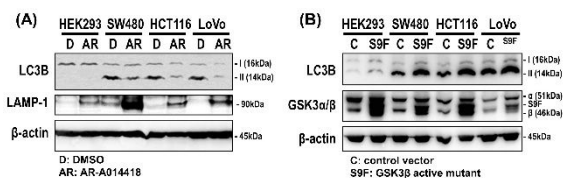


図 2 GSK3 β によるオートファジー関連分子の制御
(A) GSK3 β 阻害剤 (AR-A014418) を処理した非腫瘍性細胞 (HEK293) と大腸がん細胞 (SW480, HCT116, LoVo) におけるオートファジー駆動分子の発現変化を解析した。(B) 恒常的活性型 GSK3 β (GSK3 β -S9F 変異体) を各細胞に導入し、LC3B-II 形成の変化を比較した。

(2) マウス大腸がん細胞皮下移植腫瘍におけるオートファジー活性状態の解析

マウス移植腫瘍を対象にオートファジー関連分子の発現を免疫染色で解析した結果、移植腫瘍における LC3 と Beclin1 の発現が GSK3 β 阻害剤の投与によって減少した。また、移植腫瘍では、GSK3 β 阻害によって p62 / SQSTM1 が過剰蓄積したことから、GSK3 β はオートファジーを活性化することによって腫瘍形成を促進していることが示唆された。

(3) GSK3 β 阻害剤とオートファジー阻害剤併用による細胞増殖に対する効果と分子機構の解析

大腸がん細胞株 SW480 および HCT116 に対して、GSK3 β 阻害剤とオートファジー阻害剤ヒドロキシクロロキンによる増殖抑制効果を検討した。その結果、両薬剤とも単独で細胞増殖を有意に減弱した。両薬剤における併用効果をイソボログラム解析した結果、両薬剤の種々の濃度の組合せによる併用は、相加的あるいは相乗的効果を示した (図 3)。また、GSK3 β によって誘導される Atg12 発現を RNA 干渉法で抑制したところ、細胞増殖が有意に抑えられた。これらの結果から、シグナル伝達経路をオートファジー阻害剤で抑制することに加え、乳酸を介したオートファジーを GSK3 β 阻害剤により抑えることで、効率的ながん治療効果を期待できることが示唆された。

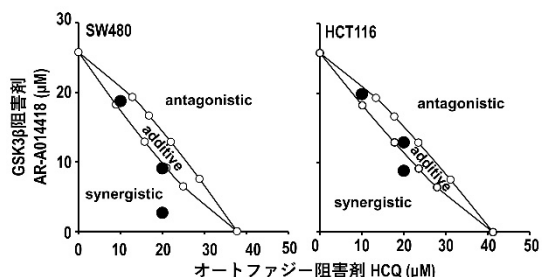


図 3 GSK3 β 阻害剤とオートファジー阻害剤の細胞増殖抑制に対する併用効果の検討
各薬剤濃度における細胞生存率を算出し、イソボログラム解析によって細胞増殖抑制に対する薬剤併用効果を評価した。

効率的ながん治療効果を期待できることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Takahiro Domoto, Masahiro Uehara, Dilireba Bolidong, Toshinari Minamoto	4. 巻 9
2. 論文標題 Glycogen synthase kinase 3 in cancer biology and treatment.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1388
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells9061388	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Dilireba Bolidong, Takahiro Domoto, Masahiro Uehara, Hemragul Sabit, Tomoyuki Okumura, Yoshio Endo, Mitsutoshi Nakada, Itasu Ninomiya, Tomoharu Miyashita, Richard W Wong, Toshinari Minamoto	4. 巻 10
2. 論文標題 Potential therapeutic effect of targeting glycogen synthase kinase 3 in esophageal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11807
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-68713-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Masahiro Uehara, Takahiro Domoto, Satoshi Takenaka, Dilireba Bolidong, Osamu Takeuchi, Tomoharu Miyashita, Toshinari Minamoto	4. 巻 111
2. 論文標題 Glycogen synthase kinase-3 participates in acquired resistance to gemcitabine in pancreatic cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4405-4416
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14668	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kitabayashi Tomohiro, Dong Yu, Furuta Takuya, Sabit Hemragul, Jiapaer Shabierjiang, Zhang Jiakang, Zhang Guangtao, Hayashi Yasuhiko, Kobayashi Masahiko, Domoto Takahiro, Minamoto Toshinari, Hirao Atsushi, Nakada Mitsutoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of GSK3 inhibitor kenpaullone as a temozolomide enhancer against glioblastoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10049
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-46454-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Abe Kensaku, Yamamoto Norio, Domoto Takahiro, Bolidong Dilireba, Hayashi Katsuhiko, Takeuchi Akihiko, Miwa Shinji, Igarashi Kentaro, Inatani Hiroyuki, Aoki Yu, Higuchi Takashi, Taniguchi Yuta, Yonezawa Hirotaka, Araki Yoshihiro, Aiba Hisaki, Minamoto Toshinari, Tsuchiya Hiroyuki	4. 巻 111
2. 論文標題 Glycogen synthase kinase 3 as a potential therapeutic target in synovial sarcoma and fibrosarcoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 429 ~ 440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14271	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 堂本貴寛, 宮下知治, Bolidong Dilireba, 上原将大, 竹中 哲, 竹内 修, 太田哲生, 源 利成
2. 発表標題 Role of GSK3 in malignant progression of pancreatic cancer associated with gemcitabine resistance.
3. 学会等名 第29回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takahiro Domoto, Tomoharu Miyashita, Satoshi Takenaka, Masahiro Uehara, Dilireba Bolidong, Tetsuo Ohta, Toshinari Minamoto
2. 発表標題 GSK3 interconnects cancer stemness and invasive capacity in pancreatic cancer with acquired resistance to gemcitabine
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masahiro Uehara, Takahiro Domoto, Satoshi Takenaka, Diliraba Bolidong, Takeo Shimasaki, Tomoharu Miyashita, Tetsuo Ohta, Toshinari Minamoto
2. 発表標題 Glycogen synthase kinase (GSK)-3 as a new target to overcome acquired resistance to gemcitabine in pancreatic cancer
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名	Potential therapeutic effect of targeting glycogen synthase kinase 3 in esophageal squamous cell carcinoma
2. 発表標題	Dilireba Bolidong, Takahiro Domoto, Masahiro Uehara, Tomoyuki Okumura, Yoshio Endo, Mitsutoshi Nakada, Itasu Ninomiya, Tomoharu Miyashita, Richard W. Wong, Toshinari Minamoto
3. 学会等名	第31回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	上原将大, 堂本貴寛, 竹中 哲, ディリラバ ポリドン, 竹内 修, 宮下知治, 源 利成
2. 発表標題	GSK3 は膵がんのゲムシタピン耐性獲得に寄与する
3. 学会等名	第31回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	Takahiro Domoto, Satoshi Takenaka, Masahiro Uehara, Dilireba Bolidong, Tatsuhiko Furukawa, Tomoharu Miyashita, Toshinari Minamoto
2. 発表標題	Glycogen synthase kinase (GSK)3 renders pancreatic cancer acquiring resistance to gemcitabine via STAT3 activation
3. 学会等名	第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	Takahiro Domoto, Masahiro Uehara, Satoshi Takenaka, Dilireba Bolidong, Tatsuhiko Furukawa, Osamu Takeuchi, Tomoharu Miyashita, Toshinari Minamoto
2. 発表標題	GSK3 interconnects the malignant properties in therapy-resistant pancreatic cancer
3. 学会等名	The 10th International Conference of the International Society of Gastroenterological Carcinogenesis (ISGC) (国際学会)
4. 発表年	2021年

1. 発表者名 Masahiro Uehara, Takahiro Domoto, Satoshi Takenaka, Dilireba Bolidong, Osamu Takeuchi, Tomoharu Miyashita, Toshinari Minamoto
2. 発表標題 Glycogen synthase kinase (GSK) 3 participates in acquired resistance to gemcitabine in pancreatic cancer
3. 学会等名 The 10th International Conference of the International Society of Gastroenterological Carcinogenesis (ISGC) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Dilireba Bolidong, Takahiro Domoto, Masahiro Uehara, Hemragul Sabit, Tomoyuki Okumura, Yoshio Endo, Mitutoshi Nakada, Tomoharu Miyashita, Richard W. Wong, Toshinari Minamoto
2. 発表標題 Potential therapeutic effect of targeting glycogen syntase kinase (GSK)3 in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC)
3. 学会等名 The 10th International Conference of the International Society of Gastroenterological Carcinogenesis (ISGC) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堂本貴寛, 宮下知治, 竹中 哲, 上原将大, 太田哲生, 源 利成
2. 発表標題 Glycogen synthase kinase (GSK)3 links tumor stemness, invasion and acquisition of drug resistance in pancreatic cancer
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堂本貴寛, 竹中 哲, 宮下知治, 上原将大, 太田哲生, 源 利成
2. 発表標題 GSK3 enhances stemness and invasion of pancreatic cancer in acquiring resistance to gemcitabine.
3. 学会等名 第28回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堂本貴寛, 竹中 哲, 宮下知治, 上原将大, 竹内 修, 太田哲生, 源 利成
2. 発表標題 肺がんの抗がん剤耐性, 浸潤, 幹細胞性の悪性連関とGSK3 の病理作用
3. 学会等名 第28回日本癌病態治療研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>金沢大学 がん進展制御研究所 腫瘍制御研究分野 ホームページ http://ganken.cri.kanazawa-u.ac.jp/shuyoseigy/index.html</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	源 利成 (Minamoto Toshinari) (50239323)	金沢大学・がん進展制御研究所・教授 (13301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------