

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20040

研究課題名(和文) 軟部肉腫のGSK3 を標的とする新規治療法の開発と分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Novel molecular therapy targeting aberrant glycogen synthase kinase-3 beta in soft tissue sarcoma

研究代表者

阿部 健作 (Abe, Kensaku)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：60749191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：すべての肉腫細胞の活性型GSK3 の発現は線維芽細胞より高く、その活性阻害により生存と増殖が抑制され、ミトコンドリア膜電位が低下、消失した。RNA干渉により同様の結果が得られた。これに伴ってmatrix metalloproteinase (MMP)-2の発現が低下し、コラーゲンゲル内での細胞浸潤能が抑制された。マウス移植腫瘍の治療実験では、対照群(阻害剤の溶媒dimethyl sulfoxide (DMSO) 投与)に比べて、GSK3 阻害剤投与により腫瘍容積と重量は有意に減少した。また摘出腫瘍では、GSK3 阻害剤投与群では腫瘍細胞の壊死像を認めた。

研究成果の概要(英文)：Expression of the active form of GSK3 was higher in sarcoma cells than in fibroblasts. Inhibition of GSK3 activity by pharmacological inhibitors or of its expression by RNA interference suppressed the proliferation of sarcoma cells and induced apoptosis. GSK3 inhibition suppressed the expression of cyclin D1, CDK4 and matrix metalloproteinase (MMP)-2 as well as sarcoma cell invasion of collagen gel. Treatment by intraperitoneal injection of either of the GSK3 inhibitors attenuated the proliferation of sarcoma xenografts in mice in comparison to the mice treated with dimethyl sulfoxide (diluent of GSK3 inhibitor). Pathology examination revealed marked necrosis in the tumors of mice treated with the inhibitor. No obvious side effects or adverse events were observed in the treated mice.

研究分野：医歯薬学

キーワード：GSK-3 soft tissue sarcoma

### 1. 研究開始当初の背景

glycogen synthase kinase (GSK) 3 $\beta$  は特定の蛋白質のセリンとスレオニン残基をリン酸化する酵素で、正常細胞の生命維持や調節に大切な働きをしている (Jope RS, et al. *Trends Biochem Sci.* 2004.) . その1つが血糖調節で、GSK3 $\beta$  はグリコーゲン合成酵素をリン酸化して失活させ、インスリンの作用を弱めることで2型糖尿病の発症や病態を進行させると考えられる。脳では、アルツハイマー病の特徴とされるアミロイド Ab や tau などの神経毒性分子を沈着、蓄積させて、神経細胞を傷害する。骨造細胞(骨芽細胞)では GSK3 $\beta$  は骨を造りだす Wnt 信号を抑制することから、骨粗しょう症に悪影響をおよぼす。このように疾病との関係において GSK3 $\beta$  は、成人期に発症し確実に進行する慢性疾患の治療標的分子として世界中の医薬分野で注目を集め、この酵素の働きを弱めるような薬剤(GSK3 $\beta$  阻害剤)の開発が進められている (Phukan S, et al. *Br J Pharmacol.* 2010.) .

このような注目度と期待にもかかわらず、GSK3 $\beta$ 阻害剤は発がん作用を示す懸念があることが論じられてきたため、現在もこれらの疾患の治療に導入されていない。その理由は、種々の「がん促進因子」なかでも大腸がんの促進因子 $\beta$ -カテニンをリン酸化して分解されやすくするというGSK3 $\beta$ の作用を大前提にして、GSK3 $\beta$ を阻害すると発がんする、すなわちGSK3 $\beta$ は「がん抑制因子」と認識されてきたからである (Luo J. *Cancer Lett.* 2009.) . しかし、GSK3 $\beta$ 阻害剤がこの「がん抑制作用」を打ち消して、細胞をがん化させるという科学的根拠はこれまでに報告されていない。本大学がん進展制御研究所では大腸がん研究を通じて、従来の認識や仮説とはまったく異なり、GSK3 $\beta$ は「がん」を促進させる働きがあることを突き止めた。そして、GSK3 $\beta$ を阻害

することは新しいがん治療法の開発に繋がることを示す成果を得てきた (Shakoori A, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005.)(Shakoori A, et al. *Cancer Sci.* 2007.)(Miyashita K, et al. *Clin Cancer Res.* 2009.)(Kitano A, et al. *PLoS ONE.* 2013.)(Chikako Y, et al. *Mol Cancer Ther.* 2015.) .

さらに整形外科学領域においても、横紋筋肉腫 (Fu-Yue Zeng, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010.)(MG Dionyssiou, et al. *Cell Death and Disease.* 2014.)(Eleanor Y Chen, et al. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 2014.)や骨肉腫 (Tang QL, et al. *J Natl Cancer Inst.* 2012)(Wang DZ, et al. *Drug Res.* 2014)(Chen C, et al. *Oncotarget.* 2015.)でGSK3 $\beta$ に関する報告が散見される。

### 2. 研究の目的

軟部肉腫の基本的な治療方針は、化学療法と手術療法である。しかし、化学療法に抵抗性の症例や、骨髄抑制や多臓器不全などの強い副作用により投与中止を余儀なくされる症例も少なくない。近年、他のがん種では分子標的治療の開発が進み、臨床でも治療効果を発揮している。分子標的薬の一つである GSK3 $\beta$  阻害薬は、リチウムやシメチジンといった双極性障害や胃潰瘍など、他の疾患で安全に使用されている薬剤であり、この適用は drug repositioning の範疇に属する。既に保険診療で処方されている薬剤であれば、厳格な安全性試験は必要とされず、早期臨床応用が可能であると考えられる。本研究の目的は、GSK3 $\beta$  を標的とする軟部肉腫の新しい治療法開発のための基礎的研究を行い、早期臨床応用へむけて研究開発を行うことである。

### 3. 研究の方法

使用する細胞株は、ヒト滑膜肉腫細胞株(SYO-1, HS-SY-2, SW982)、ヒト線維肉腫細胞株(HT-1080, SW684)とし、さらにコントロール群には軟部組織の正常細胞の代表として、ヒト線維芽細胞(NHDF-c)とした。これらの細胞における GSK3 $\beta$  の発現と、その活性を制御するリン酸化レベルを比較解析する。細胞や腫瘍における GSK3 $\beta$  の機能解析には、2種類の特異的小分子阻害剤 (AR-A014418, SB-216763) や小分子干渉 RNA (small interfering RNA, si RNA) を作用させ、腫瘍細胞に生じる分子、形態や機能の変化を観察する。さらに *in vivo* におい

ても抗腫瘍効果の検討を行う。

#### 4. 研究成果

平成 28 年度の研究実績を以下に挙げる。  
使用細胞は申請時 6 種類挙げていたが、扱いにくさが懸念され、SW684 は本研究から外すこととした。以下に述べるのはその細胞株を外した結果である。  
申請時に途中まで進めていた細胞増殖・生存能については全細胞株において濃度・時間依存性に GSK3 阻害薬の効果を認めた。増殖能については EdU assay により、腫瘍細胞において、阻害薬投与群で有意に細胞増殖(DNA 合成)能の抑制を認め、正常組織細胞株では有意差を認めなかった。western blotting においては軟部肉腫細胞株において活性型 GSK3 を認め、正常組織細胞株では認めなかった。in vivo においては滑膜肉腫細胞株 SYO-1 と線維肉腫細胞株 HT1080 をヌードマウスに移植し、阻害剤を投与した。4 週の経過で、有意に阻害剤投与群で腫瘍の増大を抑制していることを示した。また機序の一つとして、Gelatin zymography, real time PCR による腫瘍細胞の遊走・浸潤能の検討を行った。阻害剤投与により MMP-2 の発現を抑えることを認め、そこから腫瘍細胞の遊走・浸潤能を抑えられることが示唆された。  
また Wnt/ カテニン経路の関連の証明を目指していたが、過去の報告を元に、今回目的とする作用機序では辻褄が合わなくなると判断し、別の機序を調べていくこととした。そこで、cyclin D1 などの cell cycle に関わる因子の検討を現在行った。  
平成 29 年度の研究実績を以下に挙げる。  
新たな結果としてまず、アポトーシスに関する解析を、カスパーゼ 3 の発現を western blotting で評価したところ、阻害剤投与によりカスパーゼ 3 の発現が亢進することが認められた。この結果は RNA 干渉試験においても同様の結果が得られてい

る。またその上層として、シトクロム c の関わりを評価するため、ミトコンドリアの膜電位を評価したところ、阻害剤投与により、ミトコンドリア膜電位の低下を認め、シトクロム c の関わりが示唆された。次に作用機序についていくつかの実験を進めた。1 つはフローサイトメトリーにより、細胞周期について評価した。阻害剤投与後は G1 アレストを起こしていることを確認し、その原因として、cyclin D1, CDK4/6 が阻害剤投与によって抑えられるためであることが示唆された(western blotting で評価)。現在、その他の作用機序として NF- $\kappa$ B 経路との関わりがないかということルシフェラーゼアッセイによって評価しようとしているところである。他に、in vivo で得られた腫瘍組織に様々な染色を行うことで、これまでに示唆された作用が起こっているのかを確認する準備をしているところである。  
またこれらの結果を国内外の学会で発表を重ねており、そこで特に作用機序について新たなヒントが得られないかと考えている。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

2017 年度

1) American Academy of Orthopaedic Surgeons  
2017 Annual Meeting (AAOS) (ニューオーリンズ, 米国) 3月6-10日

Novel molecular therapy targeting aberrant glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in soft tissue sarcoma

Kensaku Abe, Norio Yamamoto, Takahiro Domoto, Katsuhiko Hayashi, Akihiko Takeuchi, Takashi Higuchi, Yuta Taniguchi, Hisaki Aiba, Yoshihiro Araki, Toshinari

Minamoto, Hiroyuki Tsuchiya

2) 第 36 回 日本整形外科学会基礎学術集会  
(沖縄) 10月26-27日

GSK3β 阻害による軟部肉腫の新しい分子標  
的治療

阿部健作, 山本憲男, 堂本貴寛, 林克洋, 武  
内章彦, 樋口貴史, 谷口裕太, 相羽久輝, 源  
利成, 土屋弘行

3) 第 55 回 日本癌治療学会学術集会 (横浜)  
10月19-21日

軟部肉腫に対する GSK3β 阻害による新しい  
分子標的治療

阿部健作, 山本憲男, 堂本貴寛, 林克洋, 武  
内章彦, 樋口貴史, 谷口裕太, 相羽久輝, 荒  
木麗博, 源利成, 土屋弘行

4) 第 19 回 骨軟部サマーセミナー (金沢)  
8月19日(土)

軟部肉腫に対する新しい分子標的治療の開  
発

阿部健作, 山本憲男, 堂本貴寛, 林克洋, 武  
内章彦, 樋口貴史, 谷口裕太, 相羽久輝, 荒  
木麗博, 源利成, 土屋弘行

2016 年度

5) 第 31 回 日本整形外科学会基礎学術集会  
(福岡) 10月13-14日

GSK3β 阻害による軟部肉腫の治療効果の検  
討

阿部健作, 山本憲男, 堂本貴寛, 林克洋, 武  
内章彦, 三輪真嗣, 稲谷弘幸, 樋口貴史, 谷  
口裕太, 源利成, 土屋弘行

〔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

阿部 健作 (Kensaku, Abe)  
金沢大学・附属病院・医員  
研究者番号 : 60749191

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

(4) 研究協力者

( )