

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790938  
 研究課題名（和文）GSK3β のがん細胞生存・増殖維持機能の解明と分子標的がん治療法の開発  
 研究課題名（英文）Molecular basis for developing a strategy of cancer treatment targeting aberrant GSK3β  
 研究代表者：麦 威（MAI WEI）  
 金沢大学・がん研究所・研究員  
 研究者番号：10447659

## 研究成果の概要：

正常細胞の Wnt 経路制御作用からがん抑制的に働く機能分子と認識されている glycogen synthase kinase 3 (GSK3) の大腸がんへの関与に着目した。そして、GSK3 の過剰発現やそのリン酸化による酵素活性調節の破綻ががん細胞の生存や増殖を維持・推進するという、Wnt 経路抑制機能とは異なる病的作用を発見した。その後、GSK3 阻害の制がん効果を消化器がん細胞と担がん動物で実証し、本酵素が新しいがん治療標的であると提唱した。現在までに、その制がん効果ががん抑制分子経路に依存するという結果をえて、膵がんや脳悪性腫瘍などの難治性がんに対象を広げて分子機構を解析している。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,100,000	390,000	3,490,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：消化器がん，分子標的，GSK3，治療

## 1. 研究開始当初の背景

糖代謝経路で発見された glycogen synthase kinase 3 (GSK3) は基幹的細胞シグナルを制御するセリン・スレオニンリン酸化酵素である。GSK3 はインスリンシグナルを阻害することで耐糖能異常をきたし、中枢神経系ではアミロイド A や tau の蓄積を誘導して神経細胞変性の誘因となる。正常細胞では Wnt シグナルを抑制する一方で、NF- $\kappa$ B 細胞生存機構に必須であると指摘されている。

細胞生存と増殖の調節破綻を本態とするがん

における GSK3 の機能を明らかにするために我々の研究グループは、大腸がんを中心に本酵素の発現、活性と機能を解析してきた。そして、大腸がんの解析から、GSK3 ががん細胞の生存と増殖を維持・推進するという本酵素に関する従来の理論や知見から予測されなかった「がん促進機能」を発見した。

## 2. 研究の目的

本研究では、種々の消化器がんに共通する GSK3 の病的作用の検証、GSK3 阻害に基

づく制がん効果の分子細胞メカニズムの解明と、本酵素の簡便で高精度の活性検出方法を開発する。本課題を通じて、GSK3 阻害によるがん抑制作用に基づく新しいがん治療法や制がん剤開発の知的基盤および、本酵素阻害物質のスクリーニングと同定のための基盤技術を創出することを目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 異なるがん腫に共通する GSK3 の病的作用の検証

これまでの大腸がんの解析結果、すなわち、(a) がん細胞と実際のがん患部では GSK3 の発現と活性が増強し、リン酸化による活性調節が破綻している；(b) GSK3 の活性と発現をそれぞれ小分子 GSK3 阻害剤 (SB-216763, AR-A014418) と RNA 干渉法により阻害・抑制すると、がん細胞の生存と増殖が抑制され、アポトーシスが誘導される；(c) HEK293 などの非腫瘍性(正常)と考えられる細胞ではこれらの現象は観察されない、という成果から GSK3 の「がん促進機能」を見いだしてきた。そこで、種々の消化器がん(胃がん、膵がん、肝細胞がん)や、乳がん、肺がん、脳腫瘍(神経膠芽腫)などの難治性がん由来のがん細胞について同様の解析を行い、我々が発見した、がんにおける GSK3 の病的作用がこれらの異なるがん腫に共通するかを検証する。また、治療抵抗性を示す膵がんや神経膠芽腫などを中心に、GSK3 の活性や発現の阻害がこれらのがん細胞の制がん剤感受性に及ぼす効果を解析する。

#### (2) GSK3 阻害の制がんメカニズムの共通性の解明

これまでに、大腸がん細胞で GSK3 を RNA 干渉によりノックダウンして、その遺伝子発現を cDNA マイクロアレイにより解析した。その結果、GSK3 により発現制御を受け、がん細胞の生存や増殖に関わる可能性のある遺伝子群を選定した。そこで、これらの遺伝子群の変化が各種消化器がんや、その他の難治性がん由来のがん細胞に共通するかを調べるために、リアルタイム RT-PCR により発現変化を解析する。そして、GSK3 阻害に基づく制がん効果の分子細胞メカニズムを明らかにし、それが異なるがん種に共通するかを検証する。

#### (3) GSK3 阻害物質のスクリーニングと活性阻害効果のハイスループット検証システムの考案

分子標的治療の観点から、既存物質の GSK3 阻害効果の検出や本酵素阻害効果を指標にする新規制がん物質のスクリーニング技術の開発は重要である。そこで、GSK3 の免疫沈降法とその基質  $\beta$ -catenin のリン酸化ペプチド認識抗体による免疫プロット法を組み合わせ、非放射性試験管内活性検出法を開発し、がん

細胞由来の GSK3 に対する既知の GSK3 阻害剤の本酵素活性阻害効果があるかを検証する。我々が期待している方法が開発できる場合には、さらにその方法を、マイクロタイター・プレート上で蛍光光度解析に対応できるような検出法へ改良することをめざして基礎的検討を実施する。

#### (4) GSK3 阻害剤による動物腫瘍モデルの治療実験

これまでの予備実験により、ヒト大腸がん細胞株 SW480 のヌードマウス移植腫瘍に対して、小分子 GSK3 阻害剤 (SB-216763, AR-A014418) の腹腔内投与が有害事象を伴わずに腫瘍増殖抑制効果を示すことを明らかにした。そこで、この抗腫瘍効果の再現性を検証するために、別のヒト大腸癌細胞株 HT-29 のヌードマウス移植腫瘍モデルを作成し、小分子 GSK3 阻害剤の長期間(10 週間程度)投与の効果を調べる。金沢医科大学・腫瘍内科学との共同研究により、ゲムシタピン耐性を示す膵がん細胞株 PANC-1 についても同様の検討を実施する。

#### (5) GSK3 により制御されるがん細胞の分子解析

前記の解析では、大腸がん細胞株において GSK3 の RNA 干渉により転写レベルで発現変動する分子群を cDNA マイクロアレイを用いて同定した。そこで、異なる細胞株について RNA 干渉によるこれらの分子群の個々の発現変化を定量的 RT-PCR やウエスタンブロット法により検証し、複数のがん細胞株に共通するかを検証する。

#### (6) 大腸がんおよび胃がん組織における GSK3 の発現、リン酸化と活性解析

本研究の成果に基づくがん治療法を開発するためには、治療標的となる GSK3 の実際のがん組織における特性を明らかにする必要がある。そこで、これまでに集積してきた胃がんと大腸がん臨床検体を対象にして、同一症例のがん組織、非がん部粘膜組織における GSK3 の発現、その活性を制御するリン酸化(第9セリン、第216チロシン)と活性を比較解析する。GSK3 の酵素活性は、本研究課題で開発する非放射性酵素活性検出法(non-radio-isotopic *in vitro* kinase assay; NRIKA)を用いて検出する。また、これらの臨床検体を用いて、上記の解析から得られる GSK3 により制御されるがん細胞の分子特性を実際のがん組織において検証する。

### 4. 研究成果

#### (1) 異なるがん腫に共通する GSK3 の病的作用の検証

大腸がんの解析から見いだしてきた GSK3 の「がん促進機能」を、種々の消化器がん(胃がん、膵がん、肝細胞がん)や、乳がん、脳腫瘍(神経膠芽腫)などについて検証した、その結果、

我々が発見した GSK3 の病的作用がこれらのがん種に共通することを実証した。なお、肺がんでは同様の結果は得られなかった。

(2) GSK3・阻害の制がんメカニズムの共通性の解明

大腸がん細胞で GSK3 を RNA 干渉によりノックダウンして、cDNA マイクロアレイにより遺伝子発現の変化を解析した。その結果、GSK3 により発現制御を受け、がん細胞の生存や増殖に関わる可能性のある遺伝子群を選定した。

(3) GSK3 の活性とその阻害効果の検証システムの考察

GSK3 の免疫沈降法とその基質 -catenin のリン酸化ペプチド認識抗体による免疫プロット法を組み合わせ、NRICA 法を開発した。本法により、がん細胞由来の GSK3 に対する既知の阻害剤の GSK3 活性阻害効果を検証した。

(4) GSK3 阻害剤による動物腫瘍モデルの治療実験

これまでに、ヒト大腸がん細胞株 SW480 のヌードマウス移植腫瘍に対して、小分子 GSK3 阻害剤の腹腔内投与が有害事象を伴わずに腫瘍増殖を抑制することを明らかにした。ついで、別のヒト大腸がん細胞株 HT-29 のヌードマウス移植腫瘍モデルを作成し、GSK3 阻害剤の長期間(10週間)投与の抗腫瘍効果を実証した。金沢医科大学腫瘍内科学との共同研究により、ゲムシタピン耐性を示す膵がん細胞株 PANC-1 についても同様の結果を得た。いずれも、論文投稿中である。

(5) GSK3 により制御されるがん細胞の分子解析

上記の解析で、大腸がん細胞株において GSK3 の RNA 干渉により発現変動する分子群を cDNA マイクロアレイを用いて同定した。そこで、異なる細胞株について GSK3 阻害によるこれらの分子群の個々の発現変化やリン酸化を定量的 RT-PCR やウエスタンブロット法により検証し、JNK/c-Jun 経路が複数のがん細胞株に共通して変動することが判明した(投稿準備中)。

(6) 大腸がんおよび胃がん組織における GSK3 の発現、リン酸化と活性解析

がん組織における GSK3 の発現、第 216 チロシンリン酸化と酵素活性は同一症例の非がん粘膜に比べて亢進していた。この結果から、消化管がんにおける GSK3 の病的特性が推定され、GSK3 を標的とするがん治療法開発の理論と根拠を明らかにした(論文投稿中)。

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 3 件)

1. Miyashita K, Kawakami K, Nakada M, Mai W, Shakoori A, Fujisawa H, Hayashi Y, Hamada J, Minamoto T. Potential therapeutic effect of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  inhibition against human glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 15 (3): 887-897, 2009. (査読有)
2. Shakoori A\*, Mai W\*, Miyashita K, Yasumoto K, Takahashi Y, Ooi A, Kawakami K, Minamoto T. Inhibition of GSK-3 $\beta$  activity attenuates proliferation of human colon cancer cells in rodents. *Cancer Sci* 98 (9): 1388-93, 2007. \*equal contribution (査読有)
3. Mai W, Miyashita K, Shakoori A, Zhang B, Yu ZW, Takahashi Y, Motoo Y, Kawakami K, Minamoto T. Detection of active fraction of GSK3 $\beta$  in cancer cells by nonradioisotopic in vitro kinase assay. *Oncology* 71 (3-4): 297-305, 2006 (published in July 23, 2007). (査読有)

[学会発表](計 17 件)

1. Shimasaki T, Ishigaki Y, Nakaya N, Nakajima H, Tomosugi N, Tanaka T, Mai W, Kawakami K, Minamoto T, Motoo Y. Combined effect of gemcitabine and GSK3 $\beta$  inhibitor against pancreatic cancer: basic analysis for future clinical trial. 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008 年 10 月 28 日 - 30 日, 名古屋。
2. Miyashita K, Nakada M, Fujisawa H, Mai W, Kawakami K, Jun-ichiro Hamada, Minamoto T. GSK3 $\beta$  inhibition sensitizes glioblastoma cells to chemotherapy and radiation by modulating p53 and Rb pathways. GSK3 $\beta$ 阻害による p53 と Rb 経路を介した神経膠芽腫細胞の抗がん剤および放射線感受性の修飾。第 67 回日本癌学会学術総会, 2008 年 10 月 28 日 - 30 日, 名古屋。
3. Mai W, Miyashita K, Shakoori A, Shimasaki T, Yasumoto K, Yoshiharu Motoo, Kawakami K, Minamoto T. Distinct pathologic property of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) in gastrointestinal, pancreatic and liver cancers. 胃がん, 大腸がん, 膵がんと肝がん共通する glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) の病的作用。第 67 回日本癌学会学術総会, 2008 年 10 月 28 日 - 30 日, 名古屋。
4. 島崎猛夫, 石垣靖人, 夏啓勝, 中谷直喜, 友杉直久, 田中卓二, 麦威, 川上和之, 源利成, 元雄良治。膵癌の臨床試験を目指した GSK3 $\beta$ 阻害剤と塩酸ゲムシタピンの併用療法に関する基礎的解析。第 19 回日本消化器癌発生学会総会: ミニシン

- ポジウム (4) 化学療法, 2008 年 8 月 28 - 29 日, 別府 .
5. 川上和之, 金 明姫, 斉藤健一郎, 麦 威, 宮下勝吉, 源 利成. 遺伝子多型とアレル欠失を利用した癌特異的治療開発. 第 19 回日本消化器癌発生学会総会: ミニシンポジウム (8) 癌の診断と治療, 2008 年 8 月 28 - 29 日, 別府 .
  6. 島崎猛夫, 石垣靖人, 中谷直喜, 中島日出夫, 友杉直久, 田中卓二, 麦 威, 川上和之, 源 利成, 元雄良治. 膵癌における新しい分子標的としての GSK3 $\beta$  とその関連遺伝子群の解析. 第 6 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2008 年 3 月 20 - 21 日, 福岡 .
  7. Kawakami K, Jin MJ, Saito K, Miyashita K, Mai W, Watanabe Go, Minamoto T. Methylation level of LINE-1 repeats as a prognostic factor for the patients with primary colorectal cancer. Annual Meeting 2008 of the American Association for Cancer Research, April 12-16, 2008, San Diego, CA, U.S.A.
  8. Minamoto T, Shakoori A, Mai W, Miyashita K, Yasumoto K, Takahashi Y, Ooi A, Kawakami K. Inhibition of GSK3 $\beta$  activity attenuates proliferation of human colon cancer cells in rodents. Annual Meeting 2008 of the American Association for Cancer Research, April 12-16, 2008, San Diego, CA, U.S.A.
  9. Mai W, Shakoori A, Miyashita K, Zhang B, Motoo Y, Kawakami K, Takahashi Y, Minamoto T. Detection of active fraction of GSK3 $\beta$  in cancer cells by non-radioisotopic *in vitro* kinase assay. Annual Meeting 2008 of the American Association for Cancer Research, April 12-16, 2008, San Diego, CA, U.S.A.
  10. 島崎猛夫, 石垣靖人, 趙 霞, 友杉直久, 田中卓二, 麦 威, 川上和之, 源 利成, 元雄良治. 膵癌に対する塩酸ゲムシタピンと GSK3 $\beta$  阻害剤併用の抗腫瘍効果とその分子機構. 第 18 回日本消化器がん発生学会総会 W3. 消化器癌化学療法の基礎と臨床, 2007 年 11 月 8 - 9 日, 札幌 .
  11. 川上和之, 麦 威, 島崎猛夫, 宮下勝吉, 安本和生, 高橋 豊, 大井章史, 元雄良治, 源 利成. 消化器がんの新しい治療標的 GSK3 $\beta$  の発現, 活性, 機能解析. 第 18 回日本消化器がん発生学会総会 W2. 消化器癌分子標的治療の基礎と臨床, 2007 年 11 月 8 - 9 日, 札幌 .
  12. Mai W, Miyashita K, Shakoori A, Shimasaki T, Motoo Y, Kawakami K, Minamoto T. Expression, deregulated activity and pathologic role of GSK3 $\beta$  in gastrointestinal, pancreas and liver cancers. 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007 年 10 月 3 日 - 5 日, 横浜 .
  13. Miyashita K, Mai W, Fujisawa H, Hamada J-I, Kawakami K, Minamoto T. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) in glioblastoma attenuates tumor cells' viability and induces apoptosis depending on p53 (GSK3 $\beta$  阻害による神経膠芽腫細胞の生存・増殖抑制と p53 関連アポトーシス誘導機構の解明). 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007 年 10 月 3 日 - 5 日, 横浜 .
  14. Shimasaki T, Ishigaki Y, Nakajima H, Tomosugi N, Tanaka T, Mai W, Kawakami K, Minamoto T, Motoo Y. Synergistic effect of gemcitabine and GSK3 $\beta$  inhibitors against human pancreas cancer: GSK3 $\beta$  as a new therapeutic target. 第 66 回日本癌学会学術総会 English Workshops 14 Kinase Inhibitors, 2007 年 10 月 3 日 - 5 日, 横浜 .
  15. Kawakami K, Mai W, Miyashita K, Watanabe G, Minamoto T. Methylation level of LINE-1 repeats as a prognostic factor for the patients with colorectal cancer (大腸癌における予後因子としての LINE-1 メチル化). 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007 年 10 月 3 日 - 5 日, 横浜 .
  16. Minamoto T, Shakoori A, Mai W, Miyashita K, Yasumoto K, Takahashi Y, Ooi A, Kawakami K. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) attenuates proliferation of human colon cancer cells in rodents. 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007 年 10 月 3 日 - 5 日, 横浜 .
  17. Shimasaki T, Ishigaki Y, Zhao X, Tomosugi N, Tanaka T, Mai W, Kawakami K, Minamoto T, Motoo Y. Synergistic effect of gemcitabine and GSK3 $\beta$  inhibitor against human pancreas cancer: GSK3 $\beta$  as a new therapeutic molecular target. Annual Meeting of American Pancreatic Association, November 1-3, 2007, Chicago, Illinois, U.S.A.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
麦 威 (MAI WEI)  
金沢大学・がん研究所・研究員  
研究者番号: 10447659
  - (2) 研究分担者  
なし
  - (3) 連携研究者  
なし