

平成24年3月28日提出

対象研究テーマ：GSK3 $\beta$  阻害によるがん治療法の開発と臨床試験

研究期間：2011年4月1日～2012年3月31日

研究題目：GSK3 $\beta$  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：

膵癌の難治性の根底には腫瘍細胞の高い増殖能・浸潤能・薬剤耐性などがある。我々は膵癌で glycogen synthase kinase (GSK) 3 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 (Shimasaki T, et al. J Gastroenterol 2011 Epub)。本研究では、膵癌の浸潤に伴うがん細胞の形態特性と運動能に着目して GSK3 $\beta$  の機能を多角的に解析した。培養細胞のスクラッチ試験とトランスウェルアッセイにより、GSK3 $\beta$  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 (epithelial-mesenchymal transition) と、がん浸潤を誘引するある種の熱ショック蛋白質の発現や FAK (focal adhesion kinase)/Rac1/MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) 機軸経路が抑制された。これらの解析と並行して、GSK3 $\beta$  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 00005095) を 2011 年に開始した。

研究分野：腫瘍内科学、分子腫瘍学

キーワード：膵癌、GSK3 $\beta$

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌の標的分子の探索と同定では、発がん・進展過程で活性化されている細胞シグナル伝達系が注目されている。分子標的治療薬のうち上皮増殖因子受容体 (EGFR) の阻害剤や抗体医薬が、いくつかの癌種では良好な治療効果を示している。一方、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ず、今後、新たな標的分子の探索と薬剤の開発が望まれている。我々は最近、glycogen synthase kinase (GSK) 3 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  の発現や活性の亢進に伴う病的作用が観察され、研究代表者らは GSK3 $\beta$  阻害により腫瘍細胞の生存・増殖抑制のみならず、gemcitabine (GEM) の感受性を高めることを培養細胞と担がん動物モデ

ルで実証した。また、低濃度の GEM が膀胱癌細胞の上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) を誘導して浸潤性を高めるが、GSK3 $\beta$  阻害によりこの EMT 誘導が抑制されることを見いだしている (未発表)。これらの予備結果から、GSK3 $\beta$  が膀胱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 $\beta$  は膀胱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、膀胱癌における GEM による EMT 誘導のメカニズムと GSK3 $\beta$  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、同定した膀胱癌細胞から分泌される EMT 誘導分子の発現・機能解析を行ない、GEM による EMT 誘導作用機序を明らかにする。(2) この EMT 誘導分子について、GSK3 $\beta$  阻害による発現や分泌への影響、機能解析を行い、GSK3 $\beta$  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 $\beta$  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・再発膀胱癌の第 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 $\beta$  阻害剤の併用による膀胱がん治療法の作用分子基盤の解明とともに、進行膀胱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、複数の培養ヒト膀胱癌細胞株において、低濃度の抗がん剤により細胞間接着性が低下し、EMT が誘導されて細胞の遊走と浸潤能が亢進することを発見した。膀胱癌細胞 PANC-1 の調整培地のプロテオーム解析により、EMT 誘導因子の候補となる 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 EMT 同様の形態変化を誘導する蛋白質を発見した (EMT-related Protein: EP1~EP3 と略す)。

1) EP1~EP3 の EMT 誘導効果の検証: EP1~EP3 のそれぞれに特異的な抗体、小分子阻害薬、RNAi、cDNA を用いて、膀胱由来培養細胞における EP1~EP3 の機能解析を行う。EP1~EP3 に対する特異抗体、小分子阻害薬、RNA 干渉法によるそれぞれの分子の活性や発現の抑制及びそれぞれの遺伝子導入による強制発現を行い、EP1~EP3 の発現量の違いからみた EMT 誘導性について解析する。EMT 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 などの EMT 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する。

### 2) EP1~EP3 の細胞内発現条件の検討:

EP1~EP3 がどのような条件で細胞内に発現するかを解析する。具体的には、抗がん剤の種類・濃度を変えて、細胞内発現量に違いがあるか、組換え EP1~EP3 蛋白質を培地に添加した場合に、各分子の細胞内発現量の変化、小分子 GSK3 $\beta$  阻害剤による EP1~EP3 の細胞内発現抑制効果、を解析する。これらの細胞内発現量は real-time RT-PCR、Western blot 法、免疫蛍光染色法を用いて観察・計測する。②GSK3 $\beta$  阻害による抗がん剤誘導性 EMT の抑制メカニズムの解明

GSK3 $\beta$  阻害による EMT 抑制効果の作用機序について、EP1~EP3 の発現あるいは機能の抑制によるものであるかを検討する。具体的には、小分子 GSK3 $\beta$  阻害剤や RNA 干渉法を用いて、GSK3 $\beta$  阻害による影響を検討する。EP1~EP3 の蛋白発現量の測定には、Western blot 法を用いる。EP1~EP3 の機能抑制であるかどうかについては、既に EP1~EP3 の機能的な経路は明らかとなっているため、EP1~EP3 関連経路を構成する分子群を対象にして、Real-time RT-PCR 法や Western blot 法を用い、mRNA レベルあるいは、蛋白質レベル (発現量やリン酸化解析) における制御であるかなどを明らかにする。

③GSK3 $\beta$  阻害剤の併用による進行膀胱がん治療の第 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 $\beta$  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、進行膀胱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

膀胱癌で glycogen synthase kinase (GSK) 3 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  が膀胱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 $\beta$  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、ヒト膀胱癌細胞移植動物において薬理学的 GSK3 $\beta$  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、ゲムシタピン (GEM) の抗腫瘍効果を相乗的に増強するこ

とを実証した。GSK3 $\beta$  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(EMT)と、がん浸潤を誘引するある種の熱ショック蛋白質の発現やFAK/Rac1/MMP-2 機軸経路が抑制された。これらの解析と並行して、GSK3 $\beta$  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3件)

1. Shimasaki T, Ishigaki Y, Nakamura Y, Takata T, Nakaya N, Nakajima H, Sato I, Zhao X, Kitano A, Kawakami K, Tanaka T, Takegami T, Tomosugi N, Minamoto T, Motoo Y. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  inhibition sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine. *J Gastroenterol.* 2011 Nov 1. [Epub ahead of print]
2. Ishigaki Y, Nakamura Y, Takehara T, Shimasaki T, Tatsuno T, Takano F, Ueda Y, Motoo Y, Takegami T, Nakagawa H, Kuwabata S, Nemoto N, Tomosugi N, Miyazawa S. Scanning electron microscopy with an ionic liquid reveals the loss of mitotic protrusions of cells during the epithelial-mesenchymal transition. *Microsc Res Tech.* 2011 Mar 16.
3. Motoo Y, Shimasaki T, Ishigaki Y, Nakajima H, Kawakami K, Minamoto T. Metabolic Disorder, Inflammation, and Deregulated Molecular Pathways Converging in Pancreatic Cancer Development: Implications for New Therapeutic Strategies. *Cancers*, 3(1), 446-460, 2011.

[学会発表] (計9件)

1. Nakaya N, Ishigaki Y, Bian Q, Ma S, Shimasaki T, Nakajima H, Motoo Y. Molecular mechanisms of TP53INP1 in the gemcitabine sensitivity. The International Pancreatic Research Forum 2011, (Osaka, '11.11.26).
2. Motoo Y. Pancreatic cancer: experimental sensitization to gemcitabine and patient care with traditional Japanese medicine. International Conference on Cancer Prevention, (Seoul, Korea, '11.8.26).

3. Motoo Y. Chemotherapy for pancreatic cancer: Molecular analysis and clinical application. "Asian Oncology Summit 2011" GI Symposium 3, (Hong Kong SAR, China, '11.4.9).
4. 島崎 猛夫, 石垣 靖人, 高田 尊信, 中村 有香, 川上 和之, 舟木 洋, 上田 順彦, 小坂 健夫, 友杉 直久, 源 利成, 元雄 良治. 膵癌細胞におけるgemcitabine誘導性EMTに関連する新規分子の同定. 第22回日本消化器癌発生学会, (佐賀, '11.11.25).
5. 島崎 猛夫, 川上 和之, 上田 順彦, 小坂 健夫, 源 利成, 元雄 良治. 切除不能進行膵癌に対するGSK3 $\beta$ を標的とした新規治療戦略. 第53回日本消化器病学会大会, (福岡, '11.10.21).
6. 中谷 直喜, 島崎 猛夫, 元雄 良治. ゲムシタビン感受性の分子機構におけるTP53INP1の意義. 第53回日本消化器病学会大会, (福岡, '11.10.21).
7. 島崎 猛夫, 石垣 靖人, 高田 尊信, 中村 由香, 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)3 $\beta$ : 化学療法戦略の新展開. 第70回日本癌学会学術総会, (名古屋, '11.10.3).
8. 島崎 猛夫, 石垣 靖人, 高田 尊信, 中村 有香, 川上 和之, 上田 順彦, 小坂 健夫, 源 利成, 友杉 直久, 元雄 良治. ゲムシタビン単剤療法の壁への挑戦: 新規標的分子の同定と膵癌化学療法への展望. 第42回日本膵臓学会大会, (弘前, '11.7.29).
9. 高田 尊信, 島崎 猛夫, 石垣 靖人, 元雄 良治, 友杉 直久. 膵癌培養細胞PANC-1に対する塩酸ゲムシタビンの作用についてのプロテオミクス解析. 金沢医科大学医学会第47回学術集会, (内灘, '11.7.9).

[図書] (計1件)

Motoo Y, Xia QS, Nakaya N, Shimasaki T, Nakajima H, Ishigaki Y. Stress responses of pancreatic cancer cells and their significance in invasion and metastasis. In: Kwang-Sup Soh, Kyung A Kang, David K. (eds), *The Primo Vascular System: Its Role in Cancer and Regeneration*, Springer, New York, etc. 213-217, 2012.

[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

金沢医科大学腫瘍内科学・准教授

中島日出夫

金沢医科大学総合医学研究所・准教授

石垣靖人

金沢医科大学腫瘍内科学・講師 島崎猛夫

金沢医科大学腫瘍内科学・助教 中谷直喜

(3) 本研究所担当者

腫瘍制御・教授 源 利成