

令和元年5月30日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10751

研究課題名(和文) GSK3 を分子標的とする神経膠芽腫治療の基礎基盤の確立

研究課題名(英文) Establishment of glioblastoma therapy targeting for GSK3beta.

研究代表者

宮下 勝吉 (Katsuyoshi, Miyashita)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：80624874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々はセリンスレオニンキナーゼであるglycogen synthase kinase 3 (GSK3)に着目し、GSK3 を抑制することで腫瘍細胞の増殖・浸潤が抑制されることを報告している。また、この知見を元にGSK3 阻害作用を有する既存の4種薬剤を用いた第1/ 相臨床試験を行い、その有効性と安全性を確認したが、4種薬剤の組み合わせを「CLOVA cocktail」と称し、この有効性をこれまでの研究成果と共に2017年に論文報告した(Oncotarget.2017)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

さらなる膠芽腫の治療成績向上のため、新規薬剤の登場が必須であるも今だ有効な薬剤がないのが現状である。薬剤開発には様々なプロセスと多大な資金を必要とするため、既存する市販薬剤を適応外の疾患に応用するdrug repositioningが注目されている。我々が行った臨床試験は、GSK3 阻害作用を有する既存薬剤を膠芽腫治療に応用したdrug repositioningの1つであり、基礎研究から得られた知見を直接的に実臨床に反映させ、有効性ならびに安全性を証明し、その成果を世界に向けて報告したことが特筆すべき点である。

研究成果の概要(英文)：We have reported that inhibition of glycogen synthase kinase 3 beta(GSK3 beta) suppresses proliferation of glioblastoma cell.We conducted clinical trial for recurrent glioblastoma using existing drug with GSK3 beta inhibitory effect,confirmed its efficacy and safety. We named combination of 4 drugs with GSK3 beta inhibitory effect 'CLOVA cocktail' and we reported efficacy of the cocktail and results of our research(Oncotarget.2017).

研究分野：脳腫瘍

キーワード：glioblastoma GSK3 beta

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳内原発の腫瘍である膠芽腫は人類に残された致死性の悪性腫瘍の一つである。いかなる治療を行っても多くの場合その生存期間は2年を越えず、治療成績はこの30年間でほとんど変わっていない。本疾患は人類に残されたもっとも悪性度の高い腫瘍の一つであり、この難治性疾患の克服は医学上の重要課題である。膠芽腫は周囲の正常脳に対して浸潤性に増殖する特徴があり、高次機能が集約している脳の性質ゆえに、外科的手術で腫瘍のみを完全摘出することは不可能である。よって、術後の放射線化学療法が重要であるが、とりわけ予後を改善させる新たな化学療法薬剤の開発が急務となっている。申請者はグリオーマの臨床と研究に携わる中で、その生物学的特徴とセリン・スレオニンキナーゼファミリーである glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) の関与に着目した。GSK3 β は糖代謝をはじめ細胞周期、増殖・分化、アポトーシスなどを制御する多機能分子である。GSK3 β の脳疾患への関与としては、アルツハイマー病のアミロイド沈着や tau タンパクのリン酸化・重合などの促進作用を有し、神経細胞の変性に関与しているとされる。そこで、グリオーマにおける GSK3 β の病的作用と分子機構の検討に着手し、GSK3 β に関する基礎的・臨床的研究から下記の知見を得て、すでに複数の学会、学術誌に報告している(*Clin Can Res*, 2009, *Anticancer Agents MedChem* 2009)。

1. 膠芽腫細胞株、および膠芽腫手術検体において、正常脳組織と比較して膠芽腫では GSK3 β の発現は高く、第 216 チロシンのリン酸化(活性化型分画)が亢進していた。
2. 膠芽腫細胞株において GSK3 β 小分子阻害剤 (AR-A014418) と RNA 干渉法で GSK3 β の活性と発現をそれぞれ阻害したところ、腫瘍細胞の増殖が抑制され、アポトーシスが誘導された。
3. 膠芽腫細胞の GSK3 β を阻害すると p53-p21 経路および CDK4/6-Rb 経路を介して腫瘍細胞の増殖が抑制され、アポトーシスが誘導されていることが明らかにされた。
4. Temozolomide に低濃度の AR-A014418 を併用して各腫瘍細胞株に作用させたところ、各薬剤の IC50 が有意に低下し、相加効果や相乗効果が得られた。また、放射線抵抗性を示す腫瘍細胞株に対して阻害剤を併用することにより、放射線感受性は亢進した。すなわち GSK3 β は膠芽腫細胞の薬剤感受性や放射線感受性を制御している可能性が示唆された。

以上の基礎研究結果を受けて、トランスレイショナルリサーチとして、学内倫理委員会の承認を得て「GSK3 β 阻害作用を有する薬品を使用した悪性グリオーマの化学療法」と題する小規模第 I/II 相臨床試験を開始し、その臨床上の安全性と有効性を確認している(倫理委員会課題番号 774、特開 2012-41314)。以上の研究経過から「GSK3 β が効果的な治療標的分子である」ことを示し、GSK3 β 阻害を主眼としたグリオーマ治療の基盤構築への足がかりを作った。引き続き GSK3 β 阻害による膠芽腫治療の基礎基盤を構築すべく諸研究を開始、以下の知見を得ている。

申請者らの教室で構築されたマウス脳腫瘍モデル (*Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009)を用い、至適薬量をもとに四種類の GSK3 β 阻害薬品をそれぞれ単剤投与した。投与マウス腫瘍では GSK3 β の基質である GS(glycogen synthase)のリン酸化が低下しており、*in vivo* での GSK3 β 阻害効果を確認した。また、それぞれの薬剤で種々の程度に細胞浸潤が抑制された。

神経膠芽腫細胞株 4 種に対し、GSK3 β 小分子阻害剤 (AR-A014418) を使用したところ、methylation specific PCR アッセイで MGMT プロモーターのメチル化が促進されていた。また、下流に位置する c-Myc に注目し、MGMT プロモーターへの結合をクロマチン免疫沈降法で測定したところ、c-Myc は DNA(cytosine-5)-methyltransferase 3A を誘導し MGMT プロモーターに結合し、プロモーターのメチル化を促進していた。これらの結果から、GSK3 β 阻害による

temozolomide 感受性の亢進のメカニズムが、c-Myc を介した MGMT プロモーターメチル化であることを証明した (*Carcinogenesis* 2013)。

臨床試験に使用している4種類の医薬品(シメチジン、炭酸リチウム、オランザピン、バルプロ酸)の膠芽腫細胞に対する腫瘍抑制効果をin vivo、in vitro で検証した。その結果、4種類すべての薬剤がin vivo、in vitro においてGSK3βの基質であるリン酸化を抑制した。In vitro では、濃度依存性に細胞の遊走・浸潤を抑制し、併用することで浸潤因子であるMMP-2の発現および活性化が低下した。

膠芽腫マウスモデルにおいては、4剤いずれも単独投与でsatellite lesionが減少、Nestin陽性細胞数が減少した。4剤投与によりMIB-1 staining indexの低下およびNestin陽性の浸潤腫瘍細胞塊の減少を認めた。

in vitro でリチウムとバルプロ酸が単独投与で腫瘍の増殖・浸潤を抑制した。シメチジンとオランザピンは浸潤抑制効果を示した。4剤投与で相加的な抗腫瘍効果を示した。

当科で生検または手術を行った初発膠芽腫57例を対象に、摘出検体を用いて活性化型GSK3βの発現を免疫組織染色により高発現・低発現群に分類し、progression free survival(PFS)およびoverall survival(OS)を比較した。その結果、活性化型GSK3β高発現群では優位にPFS、OSとも不良であった。

2. 研究の目的

脳原発腫瘍であるグリオーマの中でも膠芽腫は極めて予後不良の腫瘍である。本邦でも2013年から分子標的薬であるベバシズマブが悪性神経膠腫に対し保険適応となったが、progression free survival (PFS)の延長は認めるものの、overall survival (OS)の延長までには至っていない。本研究プロジェクトでは申請者がこれまでに明らかにしたグリオーマ悪性形質促進分子であるglycogen synthase kinase (GSK)3βについて、GSK3βを分子標的とする新規グリオーマ治療法を確立させるため、実臨床への橋渡しのためのさらなる知見を得る。

3. 研究の方法

1)GSK3bによる浸潤能亢進メカニズムの解明

1. small GTPase活性化の検討：細胞浸潤にsmall GTPase (R-Ras, Rac1, RhoA, Cdc42)の活性化バランスが重要であることが知られている。AR-A014418の添加によりこれらの分子の活性化の変化を観察する。活性化型small GTPaseはkit (Pierce, Rockford, IL)にて検出可能である。2. MMP, MEK/MAPKシグナルの検討：一般に浸潤シグナルは独立しておらず複雑に関連している。AR-A014418添加による細胞外基質分解酵素MMP (matrix metalloproteinase)と浸潤・増殖シグナルであるPI3K/Akt、MEK/MAPK経路の活性化の変化を検討する。MMPの活性化の検出にはzymography、PI3K/Akt、MEK/MAPKシグナルの活性化の検出はリン酸化型p-Akt、p44/p42MAPK、p38抗体を用いたwestern blottingを行う。

2)GSK3b阻害による薬剤感受性亢進メカニズムの解明：AR-A014418添加によるTemozolomide (TMZ)もしくはbevacizumab (BEV)治療の効果増強の確認と薬剤抵抗分子について解析し、感受性亢進メカニズムを解明する。

1. MGMT promoterのメチル化を促進する分子メカニズムを解明すべく、GSK3βの下流に位置する各種分子のうちMGMT promoterのメチル化と関連があるものを抽出し、GSK3β阻害による変化を解析する。

2. 薬剤感受性を増強させるメカニズムの解析：一例として、膠芽腫細胞ではP-glycoprotein (Pgp)のようなトランスポーターが高発現している。TMZによりPgpの発現が低下し、BBBの透過性を亢進させているとの報告があり、GSK3β阻害においても同様にこれらの膜タンパクの発現に変化

を及ぼすかを解析する。

3. 薬剤感受性を増強させるメカニズムの解析: BEVは血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)に対するモノクローナル抗体であり、主に再発悪性神経膠腫に使用されている。現時点でBEVによるOSの延長はなく、BEVで不応性になった場合の選択肢がないのが現状である。GSK3β阻害によるVEGFの変化、またはそれに関連する分子の変化を解析し、GSK3β阻害薬との併用の可能性を検討する。

3) 申請者らが現在行っている臨床試験「GSK3β阻害作用を有する薬剤を使用した悪性グリオーマの化学療法」はGSK3β阻害作用を有する四剤の併用療法であるが、副作用の軽減目的に、二剤併用に抑えることができれば、さらに実臨床で施行しやすくなると考える。

1. GSK3β阻害医薬品の二種併用によるGSK3β阻害効果の検討: 四種類の薬剤のうち二種類を組み合わせた際のGSK3β阻害効果を、初代細胞株と複数の膠芽腫細胞株とを対象として検証する。方法として活性化型GSK3βを認識する特異的抗体を使用したWestern blottingを行う。これまでの準備的実験から四剤のGSK3β阻害薬剤のうち、増殖抑制効果がある群と浸潤抑制効果がある群に分類できる。

2. GSK3β阻害医薬品の悪性グリオーマ細胞に対するin vitro効果解析: 上記で最もGSK3β阻害効果を示した組み合わせで、初代細胞株および膠芽腫細胞株に対してどの程度の治療効果を示すかをin vitro、ex vivoの実験で評価する。細胞遊走assay、細胞浸潤assay、アポトーシスassay、細胞増殖assay、ex vivo rat brain slice細胞遊走・浸潤assayを行う。薬剤の濃度は生体内で作用可能な濃度を中心にして、濃度を振って作用がmaxになる濃度を見出す。さらにTMZ、放射線療法との併用療法の効果判定を行う。相加作用、相乗作用の評価にはIsobologram法を使用する。

4) マウス脳腫瘍モデルを使用した前臨床試験申請者らの教室で確立されたマウス脳腫瘍モデル (Proc Natl Acad Sci U S A. 2009) によりin vivoでの薬剤効果の評価を行う。

1. 効果判定: 至適薬剤量をもとに、四種類のGSK3β阻害医薬品のうち浸潤抑制、増殖抑制がある薬剤からそれぞれ1種類を選択し、2種類の併用で単剤投与よりどの程度効果が增加するか、どの組み合わせが最も効果があるかをin vivoで検討する。エンドポイントは 生存期間、腫瘍の容量、切片組織の観察によるアポトーシスと腫瘍浸潤程度の評価、神経毒性の有無とする。また標的分子の阻害効果を確認するため抽出腫瘍からタンパクを抽出しwestern blottingを行う。

2. TMZ、放射線療法との併用療法の有用性評価: 実験2の結果に基づき候補薬剤とTMZあるいは放射線療法との併用療法を行う。

4. 研究成果

1. 前述のように、GSK3β阻害作用を持つ既存の4週類の医薬品を用いた「GSK3β阻害作用を有する薬品を使用した悪性グリオーマの化学療法」と題する小規模第I/II相臨床試験を開始し、すでにその臨床上の安全性と有効性を確認している。臨床試験結果ならびにこれまでの研究成果を総合して、GSK3β阻害効果のある既存薬剤4種を「CLOVA cocktail」と名付け、この有効性を国際雑誌に報告した (*Oncotarget*. 2017)。薬剤開発には様々なプロセスと多大な資金を必要とするため、新規薬剤が上市され患者に恩恵をもたらすまでに長い年月を要することになる。そこで既存する市販薬剤を適応外の疾患に応用する drug repositioning が注目されているが、我々の成果は既存医薬品を他の疾患に応用する「drug repositioning」の1つであり、基礎研究から得られた知見を直接的に実臨床に反映させ、有効性ならびに安全性を証明したことが特筆すべき点である。

2. CLOVA cocktail は4種の既存薬を組み合わせたものであるが、薬剤の性質上、眠気を伴うことも多く、それに伴う意識レベル低下が問題となる。また4種を内服することの負担も少な

らずあり、2 剤程度に減らすことができれば、患者の負担が軽減される。使用する 4 種類の医薬品において、各薬剤とも in vivo、in vitro での腫瘍細胞増殖・浸潤抑制効果を確認されており、その中で最適な 2 種の組み合わせを検討中である。In vitro の結果から絞られた組み合わせで、in vivo でも効果を証明できた段階で成果を報告する予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Furuta T, Sabit H, Dong Y, Miyashita K, Kinoshita M, Uchiyama N, Hayashi Y, Hayashi Y, Minamoto T, Nakada M₂ et al. Biological basis and clinical study of glycogensynthase kinase- 3β-targeted therapy by drug repositioning for glioblastoma. Oncotarget. 2017 4;8(14):22811-22824 [査読有]

〔学会発表〕(計 0 件)

古田拓也、淑瑠へムラサビット、董 宇、宮下勝吉、木下雅史、内山尚久、林 康彦、林 裕、源 利成、中田光俊：膠芽腫に対するテモゾロミド併用 GSK3β 標的治療。
第 34 回日本脳腫瘍学会学術集会, 2016 年 12 月 4 - 6 日, 甲府。

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。