

令和元年6月18日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15022

研究課題名(和文) GSK3 が制御するがん特異的エネルギー獲得機構の解明とがん治療への応用

研究課題名(英文) Exploring biological basis of aberrant cancer energy metabolism induced by GSK3beta toward application to cancer treatment

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多くのがん細胞に共通したエネルギー代謝特性である解糖系の亢進(Warburg効果)とオートファジーに焦点を当て、GSK3 のがん促進作用のメカニズムを検討した。大腸がん細胞ではGSK3 の活性化により、解糖系が亢進すること、及びオートファジー関連転写因子群の発現誘導によってオートファジー活性を亢進していることを見出した。GSK3 阻害剤の併用はオートファジー阻害剤による細胞増殖抑制効果を顕著に増強したことから、がん特有のエネルギー代謝を標的とした治療にGSK3 は格好の候補分子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの主要エネルギー源である解糖系とオートファジーをGSK3 が統合的に制御していることが示され、GSK3 阻害によって、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開発の科学的基盤になることが期待される。また、GSK3 は多彩な細胞機能を制御し、ひろく疾患に関与している。したがって、本研究の成果はがんの病態解明や医療応用に繋がることはもとより、近接領域の細胞現象への理解や他の疾患に関する治療へ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 mechanisms induced by GSK3 on energy metabolism including Warburg effect and autophagy. Aberrant GSK3 enhanced glycolysis, and led autophagic activation by induction of expression of autophagy-related transcription factors in colon cancer cells. Combined treatment with specific GSK3 inhibitor (AR-A014418) and autophagy inhibitor (hydroxychloroquine) synergistically suppressed proliferation of cancer cells. These results suggest that GSK3 is attractive candidate for cancer energy metabolism targeted therapy.

研究分野：分子腫瘍学 腫瘍生物学

キーワード：分子標的治療 がん代謝 GSK3

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

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は酸素供給の多寡に関係なく、解糖系を亢進する (Warburg 効果) ことでエネルギーを生産している。一方、オートファジーは、低酸素・低栄養という劣悪な環境に置かれたがん細胞が自身の構成成分を分解し、生じたアミノ酸や脂肪酸を新たなタンパク質合成やエネルギー源として再利用することで短期的な飢餓状態を乗り越えるシステムとして機能している。こうしたエネルギー代謝は多くのがんに共通した機構として考えられ、がん特有の代謝を標的にした治療法開発が期待されている。

我々が独自に見出した治療標的の GSK (glycogen synthase kinase) 3 β が、がんの主要エネルギー源である解糖系とオートファジーを統合的に制御しているという発想と仮説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独創的な治療法に繋がるのが期待される。

2. 研究の目的

我々は、がん細胞で異常な発現と活性を示す GSK3 β のがん促進作用を大腸がんや難治・希少がんで見出し、その阻害による治療効果を実証してきた。そのメカニズムとして、GSK3 β が固有の分子経路により増殖や浸潤を誘導するとともに、がん特有の糖代謝 (Warburg 効果) を司っていることを見出した。がんはこうした奇異な糖代謝特性とともに自食作用 (オートファジー) によりエネルギーを獲得し、悪性形質を発現・維持している。本研究では、大腸がん細胞のオートファジー経路における GSK3 β の機能を系統的に解析することにより、がんの新たな代謝病態を明らかにする。そして、GSK3 β 阻害によるがん治療作用をエネルギー代謝の視点から解明する。これにより、がんの代謝病態をより広く理解し、GSK3 β を指標とする大腸がんの病態解明と治療法開発の分子基盤形成を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 大腸がんにおける GSK3 β のオートファジーに及ぼす影響の系統的な解析

我々が保有する GSK3 β 特有の大腸がんメタボロームとリン酸化プロテオームデータベースから GSK3 β が調節しうるオートファジー関連分子の同定を試みた。

(2) 大腸がん細胞におけるオートファジー可視化モデルの作成と機能解析への応用

ヒト大腸がん細胞を用いて、オートファジー成立要件のオートファゴソーム形成とそれに続く細胞成分の分解活性を経時的に観察するために、遺伝子組換えによりそれぞれのプロセスにおけるマーカー分子を可視化する細胞株を樹立して、がん細胞オートファジーにおける GSK3 β の作用を解析した。また、GSK3 β 阻害剤 (AR-A014418) と作用機序の判明しているオートファジー阻害剤 (hydroxychloroquine: HCQ) を組み合わせて併用し、遺伝子と蛋白質レベルでの変化を定量 RT-PCR やウエスタンブロット法で比較解析することで GSK3 β の作用点を探索した。

(3) 大腸がん腫瘍における GSK3 β の発現、活性とオートファジーとの関連解析

我々の研究室で作製した大腸がん細胞のマウス皮下移植腫瘍の組織切片 (対照群と GSK3 β 阻害剤投与群) を用いて、GSK3 β とオートファジー関連分子の発現を免疫染色で比較解析することによって、オートファジーの状態と生体内での腫瘍形成への影響を評価した。

(4) GSK3 β 阻害剤とオートファジー阻害剤併用によるがん抑制効果の検討

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、がんに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検討した。

4. 研究成果

(1) GSK3 β の大腸がんにおけるオートファジーに及ぼす影響の系統的な解析

正常細胞と比較して複数の大腸がん細胞で通常培養状態においてもオートファジーレベルが高い状態で維持されていることを確認した。そして、大腸がん細胞で GSK3 β を阻害するとオートファジー活性が減弱し、逆に、恒常的な活性型の GSK3 β を過剰発現させると亢進した。オートファジー活性の高い大腸がん細胞のメタボロームとリン酸化プロテオーム解析データで GSK3 β 阻害によって変動するオートファジー関連蛋白質を探索したが、双方の解析結果に共通する蛋白質は同定できなかった。このことから、GSK3 β は転写因子などを介して間接的にオートファジー誘導に関与している可能性が考えられた。

(2) 大腸がん細胞におけるオートファジー可視化モデルの作成と機能解析への応用

オートファゴソームの形成とオートファジー活性を経時的に蛍光で観察可能な大腸がん細胞株を樹立した。この細胞で GSK3 β を阻害するとオートファゴソームを形成する

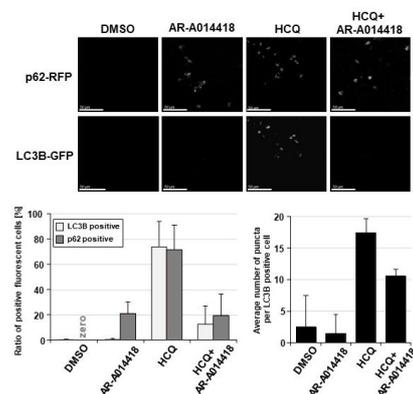


図1 オートファジー可視化モデル細胞で検証した GSK3 β のオートファジー活性への関与。GSK3 β 阻害剤 (AR-A014418) とオートファジー阻害剤 (HCQ) を処理したモデル細胞の蛍光画像 (上部)。各画像から蛍光を示す細胞数を計測し、全細胞数における割合を表示した (下部左)。LC3B-GFP 蛍光画像から1細胞あたりのオートファゴソーム形成数 (LC3B-GFP puncta) を計測し表示した (下部右)。

ことなく、オートファジー活性が減少した。また、オートリソソームの形成阻害剤 (HCQ) を処理してオートファゴソームが蓄積した状態で GSK3 β を阻害すると、オートファゴソームの形成が抑制され、オートファジー活性が減少した (図 1)。代表的なオートファジー関連の転写因子について発現を解析した結果、GSK3 β の活性は複数の転写因子の発現に影響することが判明した。とくに、FOXO3A の発現や活性は GSK3 β の阻害で抑制され、転写標的である ATG12 の発現も減少した。

(3) 大腸がん腫瘍における GSK3 β の発現、活性とオートファジーとの関連解析

免疫不全マウスに GSK3 β 活性の高い大腸がん細胞を皮下移植した腫瘍でオートファジー関連転写因子の発現と局在を免疫染色で検討した。その結果、DMSO 投与群と比較して GSK3 β 阻害投与群の腫瘍では、活性型を示す FOXO3A の核局在が減少し、腫瘍抑制効果を示した。また、GSK3 β 阻害剤投与群のマウスの正常組織に副作用を示唆する所見は認められなかった。

(4) GSK3 β 阻害剤とオートファジー阻害剤併用によるがん抑制効果の検討

大腸がん細胞に GSK3 β 阻害剤とオートファジー阻害剤 (HCQ) を処理して細胞増殖抑制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乗的効果を示した (図 2)。とくに、オートファジー阻害剤単独では、高濃度で処理した場合にのみ細胞増殖抑制効果が認められたが、GSK3 β 阻害剤との併用の場合には、オートファジー阻害剤が低濃度であっても顕著に細胞増殖抑制効果を発揮した。こうした作用は、HCQ によるオートリソソーム形成の阻害と GSK3 β 阻害剤によるオートファジー関連分子の発現抑制がオートファジーに対して二重で抑制することによる効果であると考えられた。これらのことから、オートファジー抑制効果を併せ持つ GSK3 β 阻害剤は、がん特有の代謝を標的にした治療に有用であることが示唆された。

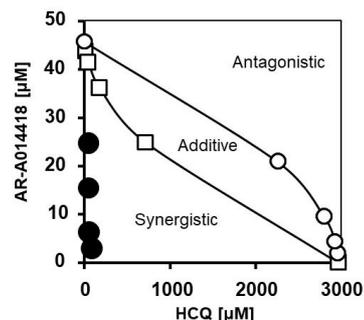


図 2 GSK3 β 阻害剤とオートファジー阻害剤の細胞増殖抑制に対する併用効果の検討
AR-A014418とHCQを種々の濃度で処理し、細胞生存数を計測した。各薬剤濃度における細胞生存率を算出し、イソボログラム解析によって細胞増殖抑制に対する薬剤併用効果を評価した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Firli R.P. Dewi*, Takahiro Domoto*, Masaharu Hazawa, Akiko Kobayashi, Takayuki Douwaki, Toshinari Minamoto, Richard W. Wong. Colorectal cancer cells require glycogen synthase kinase-3 β for sustaining mitosis via translocated promoter region (TPR)-dynein interaction. *Oncotarget*. 9:13337-52, 2018. *: equal contribution

[学会発表](計 18 件)

Takahiro Domoto, Toshinari Minamoto. GSK3 β participates in tumor-promoting metabolism in colon cancer. 第 29 回日本消化器癌発生学会総会, 2018 年 11 月 16-17 日, 都市センターホテル, 千代田区.

Takahiro Domoto, Toshinari Minamoto. Involvement of aberrant GSK3 β in tumor-promoting autophagy in colorectal cancer. The 13th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Science, 2018 年 10 月 18-19 日, 九州大学, 福岡市.

Takahiro Domoto, Ilya V. Pyko, Dilireba Bolidong, Masahiro Uehara, Toshinari Minamoto. Glycogen synthase kinase (GSK) 3 β induces protooncogenic autophagy in colon cancer. 第 77 回日本癌学会学術総会, 2018 年 9 月 27-29 日, 大阪国際会議場, 大阪市.

Kensaku Abe, Norio Yamamoto, Takahiro Domoto, Katsuhiko Hayashi, Akihiko Takeuchi, Kentaro Igarashi, Yuta Taniguchi, Hirotaka Yonezawa, Yoshihiro Araki, Toshinari Minamoto, Hiroyuki Tsuchiya. Novel molecular therapy targeting aberrant glycogen synthase kinase-3 β in soft tissue sarcoma: a basic research. 19th EFORT Annual Congress Barcelona 2018, 2018 年 5 月 30 日-6 月 1 日, FIRA de Barcelona, Barcelona.

Takeo Shimasaki, Satoko Yamamoto, Takahiro Domoto, Toshinari Minamoto.

Influence of anti-cancer drug against exosome dynamics in pancreatic cancer cells. 第 28 回日本消化器癌発生学会・第 9 回国際消化器癌発生会議, 2017 年 11 月 17-18 日, メルパルク熊本, 熊本市.

上原将大, 堂本貴寛, 竹中 哲, ピコイリア, 島崎猛夫, 宮下知治, 太田哲生, 源 利成. 膵がんのゲムシタピン耐性獲得における glycogen synthase kinase (GSK)-3 β の役割. 第 28 回日本消化器癌発生学会・第 9 回国際消化器癌発生会議, 2017 年 11 月 17-18 日, メルパルク熊本, 熊本市.

Takahiro Domoto, Ilya V. Pyko, Masahiro Uehara, Dilireba Bolidong, Toshinari Minamoto. Aberrant glycogen synthase kinase (GSK) 3 β participates in tumor-promoting autophagy in colorectal cancer. 第 28 回日本消化器癌発生学会・第 9 回国際消化器癌発生会議, 2017 年 11 月 17-18 日, メルパルク熊本, 熊本市.

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. GSK3 β 阻害による軟部肉腫の新しい分子標的治療. 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2017 年 10 月 26-27 日, 沖縄コンベンションセンター, 宜野湾市.

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. Novel molecular therapy targeting aberrant GSK3 β in soft tissue sarcomas. 第 55 回日本癌治療学会学術集会, 2017 年 10 月 20-22 日, パシフィコ横浜, 横浜市.

Takeo Shimasaki, Satoko Yamamoto, Takahiro Domoto, Etsuko Kiyokawa, Tomiyasu Arisawa, Toshinari Minamoto. Influence of anti-cancer drug against exosome dynamics in pancreatic cancer cells. 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017 年 9 月 28-30 日, パシフィコ横浜, 横浜市.

Masahiro Uehara, Takahiro Domoto, Satoshi Takenaka, Ilya V. Pyko, Takeo Shimasaki, Tomoharu Miyashita, Tetsuo Ohta, Toshinari Minamoto. Putative role of glycogen synthase kinase (GSK)-3 β in acquired resistance to gemcitabine (GEM) in pancreatic cancer. 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017 年 9 月 28-30 日, パシフィコ横浜, 横浜市.

Dilireba Bolidong, Takahiro Domoto, Tomoyuki Okumura, Yoshio Endo, Masahiro Uehara, Ilya V. Pyko, Tomoharu Miyashita, Toshinari Minamoto. Aberrant glycogen synthase kinase (GSK)3 β participates in proliferation of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017 年 9 月 28-30 日, パシフィコ横浜, 横浜市.

Ilya V. Pyko, Takahiro Domoto, Mitsutoshi Nakada, Toshinari Minamoto. Sensitizing patient-derived glioblastoma stem-like cells to temozolomide by glycogen synthase kinase 3 β inhibition. 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017 年 9 月 28-30 日, パシフィコ横浜, 横浜市.

Takahiro Domoto, Tomoharu Miyashita, Satoshi Takenaka, Masahiro Uehara, Tetsuo Ohta, Toshinari Minamoto. Glycogen synthase kinase (GSK)3 β facilitates invasive capacity in pancreatic cancer with acquired gemcitabine resistance. 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017 年 9 月 28-30 日, パシフィコ横浜, 横浜市.

竹中 哲, 宮下知治, 上原将大, 堂本貴寛, 源 利成, 太田哲生. 膵がん治療耐性に伴う幹細胞性と GSK3 β /STAT3 経路の機能解析. 第 26 回日本がん転移学会学術集会・総会, 2017 年 7 月 27-28 日, 大阪国際会議場, 大阪市.

堂本貴寛, 竹中 哲, 宮下知治, 上原将大, 太田哲生, 源 利成. ゲムシタピン獲得耐性膵がん細胞の幹細胞性と浸潤能における GSK3β の作用. 第 26 回日本がん転移学会学術集会・総会, 2017 年 7 月 27-28 日, 大阪国際会議場, 大阪市.

富田泰斗, 藤井頼孝, 三浦聖子, 藤田 純, 甲斐田大資, 大西敏雄, 藤田秀人, 木南伸一, 中野泰治, 上田順彦, 堂本貴寛, 源 利成, 小坂健夫. 大腸がんにおける CRD-BP の発現とがんの臨床病理学的特性や分子病態との関連解析. 第 72 回日本消化器外科学会総会, 2017 年 7 月 20-22 日, 石川県立音楽堂ほか, 金沢市.

島崎猛夫, 山本聡子, 堂本貴寛, 源 利成. 膵癌細胞のエクソソーム動態の解析. 第 48 回日本膵臓学会大会, 2017 年 7 月 14-15 日, 京都市勧業館みやこめッセ, 京都市.

〔図書〕(計 1 件)

島崎猛夫, 堂本貴寛, 宮下知治, 中田光俊, 元雄良治, 太田哲生, 源 利成. 特集: 膵がん研究の Cutting Edge 「膵がんの増殖, 浸潤と治療不応性を繋ぐ治療標的 GSK3β」肝胆膵 75 巻 4 号, 2017 年.

〔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

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/shuyoseigyoo/index.html>

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: 源 利成

ローマ字氏名 : (MINAMOTO, toshinari)

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。