

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：31201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640092

研究課題名(和文)糖輸送タンパク質を分子標的とした新規抗がん治療薬の探索研究

研究課題名(英文) Searching for new types of anti-cancer agents which modulate glucose transporter expression

研究代表者

北川 隆之 (Kitagawa, Takayuki)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：80092188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：癌化に伴う糖輸送の増加は早期診断法としてPET(陽電子放射線断層診断)にも応用されているが、分子標的治療薬は未開発である。我々はヒト腫瘍細胞を用いた選択的な薬剤スクリーニングより、GSK3阻害薬(タンパク質リン酸化阻害薬)を見出し、腫瘍特異的な糖輸送タンパク質の発現阻害も明らかにした。GSK3阻害薬はヒト大腸がん細胞に対しても有効性を示し、ヌードマウスを用いた動物実験でも抗腫瘍効果が確認された。以上の結果より、GSK3阻害薬はヒト腫瘍に対する新しい分子標的薬となる可能性が示唆された。(特許公開2013)

研究成果の概要(英文)：Increased glucose uptake is fundamental to many solid tumors and well associated with increases in glycolysis and the over-expression of glucose transporters (GLUT) at the plasma membrane. Tumor-suppressed HeLa hybrid cells express GLUT1 alone, whereas the tumorigenic HeLa cell hybrids express GLUT1 and GLUT3, which were shown to be differential distribution within the plasma membranes. In previous studies, we identified GSK-3 inhibitors that selectively kill GLUT3-expressing tumorigenic HeLa cell hybrids by using a cell-based screening of compounds in chemical libraries (Oncogenesis 2012). In this study, we found inhibition of cell growth and GLUT3-expression by GSK-3 inhibitor was also evident in human colon cancers. In addition, GSK-3 inhibitor showed a partial inhibitory effect on the in vivo tumor growth of CGL4 cells. These results suggest a potential use of GSK-3 inhibitors to selectively kill cancer cells that modulate GLUT3-dependent glucose metabolism.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：腫瘍生物学 がん化学療法 分子標的治療薬 糖輸送タンパク質 糖代謝 膜たんぱく質

1. 研究開始当初の背景

がんは我が国の死因の1位であり、有効な診断法や治療薬の開発が望まれている。近年は分子細胞生物学的な解析の進展によりがんの特性に着目した多くの分子標的薬が開発され、生存率の向上が図られているが、なお難治性のがんも多く、新しい着想に基づいた新規な分子標的薬の開発が期待される。

「癌化に伴う糖輸送の亢進」は古くより報告され、近年は早期診断法としてPET(陽電子放射線断層診断)にも応用されているが、その分子的基盤や分子標的治療薬は未解明である。我々はヒトHeLa融合がん細胞株を用いた研究より、癌化に伴う糖輸送タンパク質GLUT1・GLUT3の発現変化や異なる細胞膜分布を明らかにしたが、糖輸送タンパク質を分子標的とする新規抗がん剤は未だ報告がない。我々は、これらの研究成果を基盤として「糖輸送タンパク質を分子標的とする新規抗がん治療薬の探索研究」を新規な着想に基づいて行い、新規抗がん治療薬候補として、数種のGSK3阻害薬を見出した。本研究ではこれらの知見をヒト腫瘍への応用を目的として、「新規抗がん治療薬の開発へ向けた挑戦的萌芽的研究」を行う。

2. 研究の目的

生体の基本的なエネルギー源であるグルコース(ブドウ糖)は、糖輸送タンパク質(GLUT)と呼ばれる膜タンパク質により細胞内に取り込まれ、解糖系によりエネルギー産生に利用される。現在、ヒトを含む動物細胞では、臓器特異的な10数種の糖輸送タンパク質が同定されているが、発現組織や細胞内分布には特異性があり、それぞれ異なる増殖調節機能や発現調節機構が推定されるが、詳細な分子機構は不明である。また、がん化に伴う糖代謝の亢進やGLUTタンパク質の発現増加はヒト腫瘍においても多数報告され、その重要性は「ワーバーグ効果」として報告されたが、分子病態との関連は長く不明

であった。しかし、近年になってがんの分子病態における「ワーバーグ効果」の重要性が再認識されてきたが(Science 2009, Nature 2009)、糖輸送タンパク質(GLUT1~5)の発現や機能調節、ならびにがん化や転移との関係は未解明であり、分子標的抗がん薬としての解析も行われていない。

申請者らは、これまでヒト腫瘍を含む多くの動物細胞で発現するGLUT1について、「増殖因子による膜情報伝達や増殖調節機構に関する分子細胞生物学研究」において基盤的な研究成果をあげ(JBC, 1991; BBA, 1993,1994)、近年にはカルフォルニア大学のE.J. Stanbridge博士が確立したヒト融合細胞系(Nature 1978)を活用して、新規癌抑制遺伝子機能と関連する腫瘍化に伴うGLUT1, GLUT3の発現変化や細胞膜分布に関する新たな知見を得た(JCS, 1995; BBRC, 1997; EJB, 1999; BBA, 2002; FEBS J, 2007)。これらの研究により、ヒト融合細胞系の造腫瘍性には神経組織特異的なGLUT3の発現促進を伴うことを見出し、GLUT3の発現を転写レベルで阻害する薬剤の探索を行った結果、アドリアマイシン等のDNA障害性の既知抗がん剤が、ERK活性化を介してp53非依存的にGLUT3発現を阻害することを明らかにし、ハイライト欄でも紹介された(Mol. Cancer Res. 2010)。

しかし、アドリアマイシン等のDNA障害性の既知抗がん剤には、ヒト融合細胞系において腫瘍選択的な増殖阻害作用は認められなかった。そこで、腫瘍性の異なるHeLa融合細胞株を用いて腫瘍細胞に選択的な増殖阻害作用を有する薬剤について、癌研より分与された約300種の化合物ライブラリーよりスクリーニングを行った結果、活性型化合物として数種のGSK3阻害薬(セリンプロテインキナーゼ阻害薬)を得た。これらのGSK3

阻害薬は、腫瘍性HeLa融合細胞のGLUT3発現を特異的に抑制し、invitroでの抗腫瘍

効果を明らかにした (Oncogenesis 2012; 特許出願 2012)。本研究では、糖輸送タンパク質 GLUT3 の発現阻害を介したヒト腫瘍細胞に対する GSK3 阻害薬の増殖阻害作用について、in vitro, in vivo 系で以下のように研究し、新規抗がん性分子標的薬としての妥当性を検証する。

3. 研究の計画・方法

ヒトの細胞がん化・転移性に関与することが推定される「糖輸送タンパク質を分子標的とする新規抗がん薬」について、HeLa 融合細胞株の腫瘍選択的な増殖阻害と GLUT3 の特異的発現阻害を指標として同定された GSK3 阻害薬をリード化合物として、1) 有効な分子標的薬の探索研究、2) シグナル伝達系と作用機構の分子解析、3) ノードマウスを用いた in vivo 解析、4) 治療標的となるがん細胞種の検索、等について、細胞膜に発現する特異的な糖輸送タンパク質 (GLUT1, GLUT3) の発現を指標として、以下の方法で解析し、新たな分子標的がん治療薬の開発並びに画像診断法への臨床応用を目的とした萌芽研究を計画した。

1) HeLa 融合細胞株を用いた腫瘍選択的阻害薬のスクリーニング

腫瘍性/非腫瘍性の HeLa 融合細胞株を用いて、抗がん剤キットライブラリー (がん研究所・矢守部長提供) より、腫瘍性細胞に選択毒性を示す化合物のスクリーニングにより GSK3 阻害薬を数種類同定した。さらに、得られたシグナル伝達系より推定される関連化合物の増殖阻害作用を検討し、阻害作用点や増殖阻害に至るシグナル伝達系を解析する。(補足説明) 約 250 種の既知化合物を用いた初期探索より、腫瘍性融合細胞に対して選択毒性の高い GSK3 阻害薬を数種類特定した。現在、市販の関連化合物についてさらにスクリーニングを継続するとともに、この観点からの探索も行っており、本課題の研究基盤は整っている。

2) 腫瘍選択的阻害薬のシグナル伝達機構の分子的解析

抗がん剤キットライブラリーより得られた候補阻害剤について、その分子作用メカニズムを解析する。

3) 腫瘍選択的阻害薬の糖輸送タンパク質遺伝子発現への作用

HeLa 融合細胞株に対して腫瘍選択毒性を示した化合物について、GLUT1, GLUT3 の遺伝子発現への作用を WB, RT-PCR 法を用いて定量的に解析する。この候補化合物の GLUT1・GLUT3 転写活性への影響について、5' プロモーター領域を組み込んだ発現ベクターを用いて検討する。また、シグナル伝達系より推定される関連化合物の作用についても同様に検討し、候補化合物の作用を評価する。

4) 治療標的となり得るがん細胞種の検索

腫瘍性 HeLa 融合細胞の選択毒性作用より同定された GSK3 阻害薬は、細胞膜に GLUT3 を発現するがん細胞に対して有効性を示すと推定している。実際に、他のがん細胞について GSK3 阻害薬の作用を基礎的に検討した結果、GLUT3 を高発現するヒト大腸がん細胞ではアドリアマイシンとの併用により顕著な抗がん促進作用を示したのに対し、GLUT3 非発現性の皮膚がん細胞では、併用効果は全く認められなかった。細胞バンクより供給可能な大腸がん細胞株、ならびに GLUT3 発現が報告されるグリオーマ細胞等について、GLUT3 発現と GSK3 阻害薬の作用 (増殖阻害、GLUT3 発現阻害) を in vitro 系で比較検討する。また、アドリアマイシンとの併用効果についても検討する。

5) 造腫瘍形成阻害作用の in vivo 解析

腫瘍性 HeLa 融合細胞をノードマウスの皮下に移植し、in vitro 系で増殖阻害活性をもつ GSK3 阻害薬について、抗腫瘍効果について投与量、投与回数、投与方法を基礎的に検討する。増殖阻害活性は、腫瘍体積の増加を継

時的に測定して評価する。また、薬剤投与終了時においては、腫瘍を摘出し、腫瘍重量の変化とともに、腫瘍組織における GLUT3 発現阻害を WB, RT-PCR 法により解析する。

HeLa 融合細胞のヌードマウスにおける造腫瘍能についてはすでに確認済みである。

4. 研究成果

1) GSK3 阻害薬の治療標的となり得るヒトがん細胞の検索

腫瘍性 HeLa 融合細胞の選択毒性作用より見出された GSK3 阻害薬は、細胞膜に GLUT3 を発現するがん細胞に対して有効性を示すと推定される。ヒトがん細胞株に関する予備的な検討では、GLUT3 を高発現するヒト大腸がん細胞 (Caco-2) ではアドリアマイシンとの併用により顕著な抗がん促進作用を示したのに対し、GLUT3 非発現性の皮膚がん細胞 (A431) では、併用効果は全く認められなかった。そこで細胞バンクより供給可能な大腸がん細胞株を用いて、GSK3 阻害薬 (GSK3-) による GLUT3 発現と *in vitro* 増殖阻害作用を比較検討した。その結果、GLUT3 を高発現するヒト大腸がん細胞 (Caco-2) では、非発現株 HT29 よりも GSK3 阻害薬に対する薬剤感受性が高く、増殖阻害における IC50 値は HT29 細胞の約 1/2 であった。また、Caco-2 細胞の増殖阻害に伴い、GLUT3 発現の顕著な阻害も確認され、GSK3 阻害薬の増殖阻害における GLUT3 の関与がヒト大腸がん細胞においても示唆された。

2) 腫瘍選択的阻害薬のシグナル伝達機構の分子的解析

HeLa 融合細胞を用いた解析において、GSK3 阻害薬による GLUT3 発現と細胞増殖阻害は p53 に非依存性の Nf- κ B 経路により調節されていることが示唆されている (Oncogenesis 2012)。これらの解析においては、GSK3 阻害薬の 1 つである GSK3- を主に用いているが、GSK3- は GSK3 と共に

GSK3 の活性もほぼ同等に阻害することが知られている。そこで、より有効性の高い GSK3 阻害薬の探索を目的として、GSK3 に特異性の高い市販薬 (CHIR-99021, TWS119) の作用を比較検討した結果、GSK3- と同様な腫瘍性 HeLa 融合細胞に対する増殖阻害作用は認められたものの、特に顕著な特異性は見られなかった。今後は更に有効な阻害薬の探索を引き続き行う予定である。

GSK3 の細胞内シグナル伝達において、-カテニンの核内移行を伴う Wnt シグナル経路がよく知られている。GSK3 を処理した HeLa 融合細胞において、-カテニンの核内移行が特異抗体を用いた解析により確認された。しかし、-カテニン発現を RNAi によりノックダウンした場合にも、GSK3 による細胞増殖阻害反応には顕著な影響は認められなかった。以上の結果より、Wnt/ -カテニン経路に非依存性の阻害作用であることが示唆された。

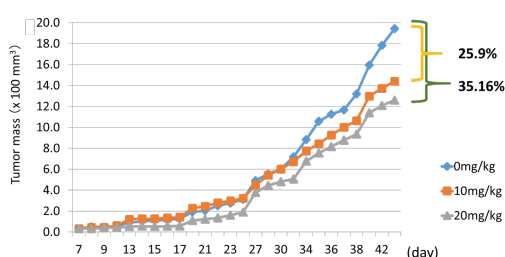
ヒト大腸がん細胞株を用いた GSK3 阻害薬の検討の過程で、GLUT3 発現が高発現株 (Caco-2) に比べて約 1/1000 と低い HCT-116 は、GSK3 阻害薬 (GSK3-) に最も高い感受性を示し、増殖阻害における IC50 値は Caco-2 の約 1/2 であり、使用したヒト大腸がん細胞株の中で最も高感受性であった。しかし、HCT-116 における低レベルの GLUT3 発現は Caco-2 と異なり、GSK3 阻害薬ではほとんど阻害を受けず、薬剤処理後の継時的な細胞形態変化もより早期に起こることが判明し、阻害機序は異なることが示唆された。また、これらの形態観察において、HCT-116 では GSK3 阻害薬による早期のアポトーシス誘導が推定された。そこで、カスパーゼ-3 の分解促進を指標としたアポトーシス誘導を継時的に比較検討した結果、HCT-116 では薬剤処理後の数時間以内に顕著なアポトーシス誘導が確認されたのに対して、Caco-2 や HT29 細胞では遅延性の誘導であった。更

に、薬剤処理に伴う細胞周期の解析等により、より詳細な分子機構を解析する予定である。

3) GSK3 阻害薬の in vivo 抗腫瘍効果

腫瘍性 HeLa 融合細胞をヌードマウスの皮下に移植し、GSK3 阻害薬の in vivo 抗腫瘍効果を検討した。予備的条件検討により、 2×10^6 cells の腫瘍細胞を 5 週齢マウス背部皮下に移植した後、腫瘍サイズが約 100 mm^3 となった後に、5 ~ 20 mg/kg の GSK3 阻害薬を腹腔内に週 3 回 4 週間投与した際に抗腫瘍効果が認められた。そこで、各濃度について 2x4 匹について、定量的な解析を行った。その結果、10 ~ 20 mg/kg の薬剤投与の際に、約 30% 程度の腫瘍抑制効果が認められた(図 1)。しかし、同一条件下での移植にも関わらず、形成されるマウスごとの腫瘍サイズにバラツキが大きく、腫瘍抑制効果の評価にはまだ課題が残るが、抗腫瘍効果は比較的小さな腫瘍に対してより有効性が高い傾向を示した。更に、薬剤処理後の腫瘍塊中の GLUT3 発現を RT-PCR, WB 法で測定したところ、抗腫瘍効果の大きい腫瘍塊では GLUT3 発現の抑制効果が高いことが判明した。以上の結果は、GSK3 阻害薬による in vivo 抗腫瘍効果と GLUT3 発現阻害との相関性を示唆する知見と考えられる。今後は、更に有効性の高い投与条件の検討を継続する予定である。

(図1)



以上、H25 ~ 26 年度に実施した本研究課題において、予定した研究計画の一部は達成できなかったが、糖輸送タンパク質を分子標的とする新規抗がん薬の開発に向けて、今後も研究を継続する予定である。

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 2件) 投稿準備中

[学会発表](計 9件)

及川 亜美、佐京 智子、奈良場 博昭、北川 隆之、ヒト大腸がん細胞における GSK3 inhibitor の有効性検討、日本薬学会 135 年会、平成 27 年 3 月 26 日、神戸

大久保 美希、藤盛 真衣、榎本 俊介、佐京 智子、奈良場 博昭、北川 隆之、GSK3 阻害剤の in vivo 抗腫瘍効果と GLUT3 発現抑制、日本薬学会 135 年会、平成 27 年 3 月 26 日、神戸

佐京 智子、佐々木 かな恵、三浦 佳奈子、川口 未央、奈良場 博昭、北川 隆之、GSK3 阻害剤によるヒト大腸がん由来 Caco-2 細胞の増殖抑制と GLUT3 発現抑制、日本薬学会 134 年会、平成 26 年 3 月 30 日、熊本

北川 隆之、渡辺 勝、佐京 智子、川口 未央、奈良場 博昭、糖輸送タンパク質を分子標的とする新規抗がん治療薬の探索第 86 回日本生化学会大会、平成 25 年 6 月 13 日、横浜

北川 隆之、佐京 智子、渡辺 勝、糖輸送タンパク質を分子標的とする新規抗がん治療薬の探索、第 17 回日本がん分子標的治療学会・学術集会、平成 25 年 6 月 13 日、京都

[図書](計 件)

[産業財産権]
出願状況(計 1件)

名称：抗ガン剤のスクリーニング方法およびガン患者に適した抗ガン剤の選択方法。

発明者：北川隆之、他 3 名

権利者：北川隆之、他 3 名

種類：技術分野

番号：特願 2012-126704

出願年月日：平成 24 年 6 月 4 日

国内外の別：国内

取得状況(計 1件)

名称：抗ガン剤のスクリーニング方法およびガン患者に適した抗ガン剤の選択方法。

発明者：北川隆之、他 3 名

権利者：北川隆之、他 3 名

種類：技術分野

番号：特開 2013-247935

出願年月日：平成 24 年 6 月 4 日

取得年月日：平成 25 年 12 月 12 日

国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川 隆之 (KITAGAWA, Takayuki)
岩手医科大学・薬学部・細胞病態生物学講
座・教授
研究者番号：80092188

(2) 研究分担者

佐京 智子 (SAKYO, Tomoko)
岩手医科大学・薬学部・細胞病態生物学講
座・助教
研究者番号：405755

(3) 連携研究者

()

研究者番号：