

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10850

研究課題名(和文) Wnt/ β -catenin経路を介した分子標的治療の開発と抗腫瘍メカニズムの解明研究課題名(英文) Glycogen synthase kinase 3 β as a potential therapeutic target in synovial sarcoma and fibrosarcoma

研究代表者

山本 憲男 (YAMAMOTO, NORIO)

金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任教授

研究者番号：90332668

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)：本研究では、軟部肉腫の主要病型である滑膜肉腫と線維肉腫に対するGSK3 阻害剤の治療効果と作用機序を検討した。本研究により、滑膜肉腫と線維肉腫において、CDK-cyclin複合体を介した細胞周期の進行による生存・増殖と、MMP-2を介した浸潤が、GSK3 に依存することが示唆された。リチウムやシメチジンなど、躁うつ病や胃潰瘍など臨床で広く使用され、安全性の確認されている薬剤がGSK3 活性阻害作用を有することが知られており、滑膜肉腫や線維肉腫においても早期の臨床応用が期待できることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦では2012年より、軟部肉腫に対してパゾパニブの使用が承認されが、残念ながら既存の抗癌剤を上回る効果は得られていない。GSK3 は、グリコーゲン合成酵素をリン酸化して不活性化させる酵素である。本研究では、軟部肉腫の主要病型である滑膜肉腫と線維肉腫に対するGSK3 阻害剤の治療効果と作用機序を検討し、腫瘍の生存、増殖、浸潤にGSK3 が大きく関連していることを明らかとした。GSK3 活性阻害作用を有する薬剤は、既に実臨床で使用されており、新たな軟部肉腫の分子標的治療薬になる可能性がある。本研究で得られた成果は、新たな軟部肉腫治療薬の開発に大きく寄与する、社会的意義の高い研究成果だといえる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the expression, activity and putative pathological role of GSK3 in synovial sarcoma and fibrosarcoma, comprising the majority of STS that are encountered in orthopedics. Expression of the active form of GSK3 was higher in synovial sarcoma and in fibrosarcoma (HT1080) tumor cell lines than in untransformed fibroblast (NHDF) cells that are assumed to be the normal mesenchymal counterpart cells. Inhibition of GSK3 activity by pharmacological agents or of its expression by RNA interference suppressed the proliferation of sarcoma cells and their invasion of collagen gel, as well as inducing their apoptosis. These effects were associated with G0/G1-phase cell cycle arrest and decreased expression of cyclin D1, CDK4 and MMP2. Intraperitoneal injection of the GSK3 inhibitors attenuated the growth of SYO-1 and HT1080 xenografts in athymic mice without obvious detrimental effects. It also mitigated cell proliferation and induced apoptosis in the tumors of mice.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：GSK3 軟部肉腫 分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫に代表される肉腫に対する化学療法は、プラチナ化合物(シスプラチン)が key drug であり、1970 年代に導入されてから、治療成績は大きく向上した。その後も様々な抗がん剤が導入されたが、治療成績の大きな向上には結びついていない。一方他のがん種領域においては、新規分子標的薬が多く開発され、治療成績が大幅に改善したものも多い。

2. 研究の目的

近年、多くのがん種で分子標的治療が導入されている。本邦では 2012 年より、軟部肉腫に対してパゾパニブの使用が承認されたが、既存の抗癌剤を上回る効果は得られていない。Glycogen synthase kinase 3 (以下 GSK3) は、グリコーゲン合成酵素をリン酸化して不活性化させる酵素である。本研究では、軟部肉腫の主要病型である滑膜肉腫と線維肉腫に対する GSK3 阻害剤の治療効果と作用機序を検討した。

本研究の目的は、未だ十分な分子標的療法が確立されていない骨肉腫あるいはその他の肉腫に対する GSK3 を標的とした新規分子標的治療の作用機序を *in vitro*, *in vivo* 研究により解明し、同薬剤の早期臨床応用を実現することである。

3. 研究の方法

細胞株は、腫瘍細胞としてヒト滑膜肉腫細胞 (SYO-1, HS-SY-II, SW982)、ヒト線維肉腫細胞 (HT1080) を、正常細胞 (対照) としてヒト線維芽細胞 (NHDF) を使用し、GSK3 阻害剤は、GSK3 に特異的に作用する AR-A014418, SB-216763 を使用した。

まず各細胞における GSK3 の発現と活性型第 216 チロシンリン酸化 (p-GSK3^{Y216})、不活性型第 9 セリンリン酸化 (p-GSK3^{S9}) を Western blotting で評価した。次に GSK3

阻害剤の効果の評価を行った。DMSO または阻害剤 (5, 10, 25, 50 $\mu\text{mol/L}$) 投与から 0, 24, 48, 72, 96 時間後の細胞生存に対する効果を WST-8 assay により測定した。増殖能は、DMSO または 25 μM の各阻害剤投与の 24 時間後に EdU assay により評価した。アポトーシスは DMSO または 25 μM の AR-A014418 を投与して 24 時間後に cleaved PARP-1 と cleaved caspase-3 の発現を Western blotting で検出し、評価した。さらに各肉腫細胞に特異的 siRNA を作用させ GSK3 発現を抑制し、96 時間後に生存能・増殖能・アポトーシスの変化を解析した。細胞増殖に関わる経路として細胞周期に着目し、DMSO または 25 μM の AR-A014418 を投与して 24 時間後に flow cytometry と Western blotting を行い、細胞周期の変化、cyclin D1 と CDK4/6 の発現を評価した。また細胞浸潤の評価として、肉腫細胞に DMSO または 25 μM の AR-A014418 を作用させ 24 時間後に collagen gel assay により比較した。また、MMP-2 の発現と活性の変化を gelatin zymography で解析した。Collagen gel assay では肉腫細胞は gel 外へ浸潤し、阻害剤

により抑制された。線維芽細胞では阻害剤の有無に関わらず、浸潤はほとんど認められなかった。Zymography で肉腫細胞に活性型 MMP-2 の発現を認め、阻害薬投与により抑制された。

マウス移植腫瘍の解析は、滑膜肉腫細胞 (SY0-1) と線維芽細胞 (HT1080) をヌードマウス背部皮下に移植し、xenograft モデルを作成した。細胞株を移植して 1 週間後から、DMSO または 2mg/kg の阻害剤を週に 3 回 3 週間にわたり腹腔内投与した。腫瘍体積を週 1 回測定し、屠殺後に腫瘍重量を測定した。摘出腫瘍は免疫染色にて pGSK-3^{Y216}、Ki-67、TUNEL を評価した。全ての腫瘍細胞において pGSK-3^{Y216} が亢進し、線維芽細胞にはこのリン酸化を認めなかった。各阻害剤は、濃度と時間依存的に腫瘍細胞の生存を抑制した。増殖能では、GSK3 阻害剤投与により肉腫細胞の EdU 陽性率が低下し、線維芽細胞の EdU 陽性率は変化しなかった。アポトーシスでは、肉腫細胞において阻害剤投与時に cleaved PARP-1 および cleaved caspase-3 の発現が亢進した。線維芽細胞では両分子の発現変化は認められなかった。GSK3 ノックダウンにおいても、全ての腫瘍細胞で有意に生存能、増殖能が抑制され、アポトーシスが亢進した。阻害剤投与後の肉腫細胞で G1 期停止を認めた。細胞周期制御分子の解析では、阻害剤投与により腫瘍細胞の cyclin D1 と CDK4/6 の発現が抑制された。マウス移植腫瘍の解析では、SY0-1、HT1080 とともに治療群において腫瘍体積・重量が有意に抑制された。組織では、治療群で pGSK-3^{Y216} の発現が抑制され、さらに Ki-67 発現の抑制および TUNEL 陽性細胞の増加を認めた。

4. 研究成果

近年 GSK3 は多くのがん種において細胞増殖に重要な働きをすることが報告されている。本研究では、滑膜肉腫と線維肉腫において、CDK-cyclin 複合体を介した細胞周期の進行による生存・増殖と、MMP-2 を介した浸潤が、GSK3 に依存することが示唆された。リチウムやシメチジンなど、躁うつ病や胃潰瘍など臨床で広く使用され、安全性の確認されている薬剤が GSK3 活性阻害作用を有することが知られており、滑膜肉腫や繊維肉腫においても早期の臨床応用が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kensaku Abe, Norio Yamamoto, Takahiro Domoto, Dilireba Bolidong, Katsuhiko Hayashi, Akihiko Takeuchi, Shinji Miwa, Kentaro Igarashi, Hiroyuki Inatani, Yu Aoki, Takashi Higuchi, Yuta Taniguchi, Hirotaka Yonezawa, Yoshihiro Araki, Hisaki Aiba, Toshinari Minamoto, Hiroyuki Tsuchiya	4. 巻 111
2. 論文標題 Glycogen synthase kinase 3beta as a potential therapeutic target in synovial sarcoma and fibrosarcoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 429-440
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14271	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----