

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591016

研究課題名(和文) 化学療法により誘発される EMT 誘導因子の同定とその制御による膵がん治療法の開発

研究課題名(英文) Development of the pancreatic cancer therapy by identification of EMT inducer by chemotherapy

研究代表者

島崎 猛夫 (SHIMASAKI, Takeo)

金沢医科大学・総合医学研究所・講師

研究者番号：50377420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：膵癌は、難治性癌の代表であり、転移浸潤能が高く、化学療法に抵抗性を示す。我々は、膵癌の標準的抗癌剤gemcitabineを低濃度で癌細胞に投与すると、1回投与でも上皮間葉転換(EMT)と呼ばれる細胞形態変化と運動性が変化し、この変化はGSK3beta阻害により抑制されることを明らかにした。これらの研究成果を元に、GSK3beta阻害による新たな治療法としてGSK3beta阻害作用を持つ複数の医薬品による進行・再発膵癌の第Ⅰ相臨床試験を立案、実施した。本研究は、膵癌の新しい治療方法開発に貢献する可能性を持っている。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer is obstinate and results in a highly invasive and metastatic tumor phenotype that is a major obstacle to chemotherapy. We found that the pancreatic cancer cell lines exposed to low concentration of gemcitabine triggered the cellular morphological change showing epithelial to mesenchymal transition (EMT) and up-regulated motility. These phenomena are inhibited by GSK3beta inhibitor. We proposed a new strategy of inhibiting EMT-induced by chemotherapy by GSK3beta inhibiting drugs. In order to investigate the safety and antitumor response to this combination of GSK3beta inhibiting drugs, investigator initiated phase I clinical trial are conducted with advanced pancreatic cancer. This research may contribute to the development of a new pancreatic cancer treatment.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：化学療法 EMT ドラッグリポジショニング 膵臓がん GSK3

1. 研究開始当初の背景

いくつかの癌種で表皮増殖因子受容体 (EGFR) 阻害剤や抗体等の分子標的治療薬が、良好な治療効果を示しているが、膵癌では erlotinib のみが第 Ⅲ 相試験で 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 β 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 β 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、アポトーシスや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。我々は、GSK3 β の過剰発現や酵素活性の調節不全が癌細胞の生存や増殖を維持・推進するという 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 β 阻害の抗腫瘍効果が大腸癌や膠芽腫で実証し、本酵素が新しいがん治療標的であると提唱した。

今までに膵癌でも同様に GSK3 β の発現、活性の亢進にともなう病的作用が観察され、研究代表者らは GSK3 β 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 (J Gastroenterol., 2012)。

これまでの研究の過程で、GEM が膵癌細胞に対して、epithelial-mesenchymal transition (EMT) 様の形態変化を誘導して浸潤性を高め、GSK3 β 阻害により、EMT が抑制されることを観察していたことから抗癌剤による EMT 誘導メカニズムの解明と GSK3 β 抑制による浸潤や転移抑制効果を検証することを思い立った。

2. 研究の目的

本研究では抗癌剤による EMT 誘導のメカニズムを主に基礎研究にて解明し、これらの研究成果を臨床応用するために、GSK3 β 阻害作用を持つ医薬品による進行膵癌の臨床試験を行い、今後の新しい治療とするための検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 膵癌細胞及びその培養上清を用いて、EMT 誘導効果の確認と EMT 誘導蛋白の同定・機能解析を行ない、抗がん剤による EMT 誘導作用のメカニズムを明らかにするとともに、膵癌の浸潤や治療抵抗性と GSK3 の異常活性との関連について培養細胞を用いて検討した。具体的には、膵癌細胞 PANC-1 の培地に 10 μ g/mL の GEM を添加して 24 時間後に無血清培地に交換し、48 時間後に培地を回収して分子量 3 kD 以上の成分を濃縮した。濃縮培地の蛋白質を Cy-Dye 標識し、2 次元電気泳動により蛋白質発現を対照 (GEM 無添加) 細

胞と比較解析した。また 3 種類の膵癌細胞株を用い GSK3 の発現とリン酸化をウエスタンブロット法により解析し、小分子阻害剤と RNA 干渉により抗がん剤ゲムシタピンや放射線に対する GSK3 阻害の影響を検討した。癌細胞の遊走と浸潤能はスクラッチ試験とトランスウェルアッセイにより計測した。

(2) 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 β 阻害作用を示すことが報告されている複数の医薬品と gemcitabine の併用による進行・再発膵癌の第 Ⅰ 相臨床試験を立案実施する。実験で用いているような GSK3 β 小分子阻害剤を臨床試験に直ちに使用できないため、近年注目されてきているドラッグリポジショニングを活用することとした。DR (ドラッグリポジショニング) とは、既に医薬品として長期にわたり使用され安全性がよく知られている薬剤の作用メカニズムを網羅的に解明することで、その薬が有する未知の薬効を発見し、別の疾患の治療薬として確立することを目的とした手法である。既に文献的に報告されていた GSK3 β 抑制作用を持つ医薬品を組み合わせることで新しいがん治療ストラテジーの開発を目指した。「GSK3 β 阻害効果を有する市販医薬品を併用した化学療法 (UMIN000005095) 」を行った。

研究計画とデザイン

無対照臨床試験 (オープン試験)、介入研究

対象患者 (適格基準)

金沢医科大学病院で治療を受けている、あるいは今後治療を受ける予定の進行膵癌患者で、本臨床試験に同意が得られた患者を対象とする。以下に述べる一般の膵癌臨床試験の患者選択基準及び除外基準をすべて満たす患者を対象とする。

選択基準

年齢が 15 歳以上、90 歳以下。
像所見にて膵癌の診断が確定し、臨床的に進行期であると診断されている。
与薬剤にアレルギーがない。
切な臓器機能を有する。
経口薬の服用を妨げる病状がない。
本試験の参加に関して本人あるいは家族から同意が文書で得られている。

除外基準

投与薬剤に対し過敏症の既往歴のある患者。
妊娠または妊娠している可能性のある婦人、あるいは授乳中の婦人。
その他、研究担当者 (医師) が対象として不適当と判断した患者。

研究の評価項目

主要評価項目（プライマリーエンドポイント）：有害事象

全治療例を対象とし、下記の有害事象についてそれぞれ NCI-CTCAE (National Cancer Institute-Common Terminology Criteria for Adverse Events; CTCAE version 3.0) 日本語訳 JCOG/JSCO (Japan Clinical Oncology Group/Japanese Society of Clinical Oncology) 版(2004.10)による全コース中の最悪の Grade を求める。

自覚症状 (NCI-CTCAE の有害事象)

皮膚：放射線性皮膚炎
血液：ヘモグロビン、白血球、好中球/顆粒球、血小板

全身状態：発熱
消化管系：食欲不振、悪心、口内炎、咽頭炎、嘔吐
電解質代謝：カリウム、ナトリウム
肝臓：ビリルビン、AST (GOT)、ALT (GPT)

腎：クレアチニン
出血：Grade3、4 の血小板減少を伴う出血、中枢神経系の出血
感染：発熱性好中球減少、Grade3、4 の好中球減少を伴う感染、好中球減少を伴わない感染

肺：肺臓炎 / 肺浸潤
神経：痙攣発作、言語障害、くも膜炎 / 髄膜炎 / 神経根炎、中枢神経系脳血管虚血、神経障害 (脳神経)、神経障害 - 運動性、神経障害 - 知覚性

疼痛：頭痛
耐糖能異常：空腹時血糖、ヘモグロビン A1c

Performance Status

副次的評価項目（セカンダリーエンドポイント）：抗腫瘍効果

画像による腫瘍の大きさの評価
患者予後の評価

治療研究は 6 症例を予定とし、予定期間は学内倫理委員会の承認日から 5 年間とした。進行期であることが指摘され、投与を希望する患者に対して GSK3β 阻害作用のある医薬品とジェムザール®を投与した。

研究治療薬（GSK3β 阻害医薬品）の概要

リチウム製剤（商品名：リーマス）
（200）錠剤
オランザピン（商品名：ジプレキサ）
（10）錠剤
シメチジン（商品名：タガメット）
（200）錠剤
バルプロ酸（商品名：デパケン R）
（200）錠剤

研究期間（試験参加期間）

前観察期間：試験開始前 7 日間
試験薬投与期間：個々の対象症例が内服不能となるまで。

用法・用量

リチウム製剤（商品名：リーマス X 200）
2 錠/朝・夕 6 錠まで増量可
オランザピン（商品名：ジプレキサ）
（10）1 錠/夕 2 錠まで増量可
シメチジン（商品名：タガメット）
（200）4 錠/朝・夕
バルプロ酸（商品名：デパケン R）
（200）4 錠/朝・夕 6 錠まで増量可

投与量の調整について

デパケン R については、血中濃度を測定し、有効血中濃度内で増量可能であれば、上記投与量に従い増量する。

リーマスについては、有効血中濃度になるまで、増量可能な範囲で増量する。

ジプレキサについては、覚醒時間、意識レベルを見ながら増減し、日中の眠気がなければ 2 錠まで増量する。眠気があれば、5 mg まで減量する。

用法・用量に関連する使用上の注意（減量・中止基準）：添付文書に従って投与する。

個々の薬剤の薬物動態及び薬物療法に詳しい神経精神科医師を研究分担者として、個々の薬剤の投与量と投与スケジュールを決めるとともに、投与中の末梢血中薬剤濃度のモニタリングや有害事象の早期発見と回避に努める。

4. 研究成果

(1) 本研究では、低濃度の化学療法が癌細胞の浸潤を促進するという従来考えられていなかった発想をもとに、その転移浸潤誘導因子を同定することを目的とした。膀胱癌細胞に対して Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT; 上皮間葉転換) が抗癌剤により起こることを分子細胞学的評価方法（ウエスタンブロット、免疫染色）により明らかにした。抗癌剤処理により膀胱癌細胞から EMT 誘導因子が分泌されることが想定されたため、抗癌剤に曝露させた培養細胞上清のプロテオーム解析を行った。質量分析の結果、117 の蛋白を同定したが、GEM により 38 種類の蛋白質の発現が 50% 以上増加あるいは 67% 以下に減少した。この中でこれまで抗がん剤による発現の変化が報告されていない heat shock protein 90 に注目した。HSP90 の組換え蛋白質の投与により膀胱癌細胞に EMT が誘導され、PANC-1 マウス皮下移植腫瘍に対する GEM 投与後の免疫染色でも HSP90 の発現が誘導されたことから、EMT に関与する新規分子と考えられた。HSP90 を阻害すると抗癌剤による EMT 誘導効果が抑制されたことから、HSP90 阻害剤が化学療法による EMT 誘導効果を抑制し、

しいては癌細胞の転移を抑制する可能性が示唆された(論文投稿予定)。既に HSP90 阻害剤は、臨床応用に向けて臨床試験等が開始されているところであり、今後の成果が期待される。

一方、同様に GSK3 β を阻害すると、がん細胞の増殖と浸潤能は低下し、ゲムシタピンや放射線への感受性が増加した。EMT 誘導も抑制され、細胞の移動・浸潤能は低下した。GSK3 β 阻害により、サイクリン D1 発現と Rbリン酸化の低下、Rac-1 や F-actin の細胞内局在変化、葉状仮足 (lamellipodia) 形成の抑制、および matrix metalloproteinase-2 の分泌や focal adhesion kinase のリン酸化の低下が観察されたことから、GSK3 β は細胞周期と運動を制御する分子経路や細胞微細構造に関与していること、GSK3 β 阻害による膵癌細胞の治療抵抗性の改善や浸潤性の抑制の作用機序として、FAK (focal adhesion kinase)/Rac1/MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) 機軸経路が関与していることを明らかにした(PLoS ONE 2013)。

前述の抗癌剤処理により膵癌細胞から EMT 誘導因子が分泌されることを確認するために必要な実験器具が市販されておらず、研究代表者は、企業と共同で実験器具を製作した。実験器具自体が今後の各種研究に役立ち、新規性進歩性が認められることが予想されたため新たな「細胞培養機器」として特許の申請(特願 2013-164907)を行った。

(2)本報告書作成の時点で4名の患者が本試験に登録されている。患者の年齢中央値は72才、男女比は1:3であった。観察期間の中央値は753.5日であった。これら4例の患者はすべて Stage IV の進行癌と診断され、ジェムザール、TS-1 の両者が奏効しなくなり、PD と判定された症例である。そのうち、best supportive care に移行する前に本臨床試験を希望された最初の3例において、リーマスによる腎障害(Grade 2)を認めたため、リーマスは第4例目より中止した。その他の副作用として、食欲不振、全身倦怠感、眠気、手足のしびれを認めたが、いずれも Grade 1 と軽度であった。第4例目の患者は糖尿病を合併しており、ジプレキサは投与禁忌であるため、デパケンとタガメットの2剤投与とした。当初、初期に計画した4剤をカクテル療法薬として考えていたが、リーマスは膵癌で頻用される非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)との併用により高頻度に腎障害を来すため(添付文書にも注意喚起の記載あり)膵癌に対するGSK3 β 阻害療法薬としては不適であると判断した。また現時点では、ジプレキサの使用は糖尿病では禁忌となっているため、膵癌患者に多い糖尿病併発例に対する治療薬としては今後、さらなる検討を要する。ジプレキサが糖尿病で禁忌となっている理由は高血糖などの副作用である。例えば、既にインスリン治療が行われ、あるいはイン

スリン治療を行いながら、適切な管理体制のもとであればジプレキサの併用は重篤な副作用を来す可能性は低いと考えられる。この点に関しては、さらなる検討を要する。本臨床試験では、すべての薬剤の添付文書の適応、禁忌、投与量を厳守している。

Phase I として4例を施行し、投与薬剤を減量せざるを得なかったことから、リーマス以外の3剤を至適投与薬剤とし、その保険適応上の最大投与量を至適投与量に決定した。本臨床試験の有効性を示唆する結果が得られたため、GSK3 β 阻害作用を持つ既存医薬品に関して、「膵臓癌治療剤」として特許を申請した(特願 2013-93072)。今後は、Phase II として多施設臨床試験を計画する予定である。

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4件)

1. Kitano A, Shimasaki T, Chikano Y, Nakada M, Hirose M, Higashi T, Ishigaki Y, Endo Y, Takino T, Sato H, Sai Y, Miyamoto K, Motoo Y, Kawakami K, Minamoto T. Aberrant glycogen synthase kinase 3 is involved in pancreatic cancer cell invasion and resistance to therapy. PLoS One. 2013;8(2):e55289 査読有
2. 島崎猛夫、上田順彦、源利成。GSK3 β 阻害作用を持つ医薬品を用いた難治性膵癌の新規治療法の開発。がん治療のあゆみ 第33巻、p42-51,2013 査読無。
3. 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 inhibition sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine. J Gastroenterol. 47(3):321-33, 2012. 査読有
4. Shimasaki T, Kitano A, Motoo Y, Minamoto T. Aberrant glycogen synthase kinase 3 in the development of pancreatic cancer. J Carcinog. 11(1):15, 2012. doi: 10.4103/1477-3163.100866. Epub 2012 Sep 13. 査読有

[学会発表](計6件)

1. DDW 2014 (Chicago, USA)
2014/05/04-05/06 Shimasaki T, Tomosugi N, Minamoto T, et al. Phase I clinical trial of the combination therapy using gemcitabine and GSK3 β inhibiting drugs for

- gemcitabine-resistant advanced pancreatic cancer patients.
- 第44回日本膵臓学会大会(仙台国際センター)2013/07/25-07/26 島崎猛夫, 石垣靖人, 源利成, 友杉直久他。GSK3βを標的治療とした既存医薬品による膵がんの新規治療。
 - DDW 2013 (Orland, FL, USA) 2013/05/19-05/21 Shimasaki T, Ishigaki Y, Tomosugi N, Minamoto T, et al. GSK3 is an emerging therapeutic target in pancreatic cancer: its implication for cancer cell migration and invasion.
 - 第20回JDDW(神戸国際展示場・ポートピアホテル・神戸こうくさい会議場) 2012/10/10-10/13 GSK3β標的治療を併用した膵癌の新規治療戦略と分子基盤。島崎猛夫, 石垣靖人, 源利成, 友杉直久他。
 - 第71回日本癌学会学術総会(ロイトン札幌)2012/09/19-09/21 島崎猛夫, 石垣靖人, 源利成, 友杉直久他。膵癌の新規治療標的としての glycogen synthase kinase (GSK) 3β:がん浸潤に対する作用。
 - 第43回日本膵臓学会大会(ホテルメトロポリタン山形)2012/06/28-06/29 島崎猛夫, 石垣靖人, 源利成, 友杉直久他 GSK3β標的治療と化学療法を併用する膵がんの新規治療戦略と分子基盤。

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称:細胞培養容器

発明者:島崎猛夫、北野裕美子、山田秀樹

権利者:学校法人金沢医科大学、伸晃化学株式会社

種類:特許

番号:特願 2013-164907

出願年月日:2013/08/08

国内外の別:国内

名称:膵臓癌治療剤

発明者:島崎猛夫、中田光俊、源利成

権利者:学校法人金沢医科大学、国立大学法人金沢大学

種類:特許

番号:特願 2013-093072

出願年月日:2013/04/25

国内外の別:国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

島崎 猛夫 (SHIMASAKI, Takeo)

金沢医科大学・総合医学研究所・講師

研究者番号:50377420

(2)研究分担者

石垣 靖人 (ISHIGAKI, Yasuhito)

金沢医科大学・総合医学研究所・准教授
研究者番号:20232275

友杉 直久 (TOMOSUGI, Naohisa)

金沢医科大学・総合医学研究所・教授

研究者番号:8015580

(3) 連携研究者

元雄 良治 (MOTOO, Yoshiharu)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号:80210095

源 利成 (MINAMOTO, Toshinari)

金沢大学・がん研究所・教授

研究者番号:50239323