

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861142

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構築

研究課題名(英文) Constraction of basis of glioblastoma treatment targeting for GSK3beta

研究代表者

宮下 勝吉 (Miyashita, Katsuyoshi)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：80624874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000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ファミリーであるglycogen synthase kinase 3 (GSK3)を阻害すると膠芽腫細胞の増殖が抑制されることを報告している。GSK3 阻害効果を有する既存薬剤4剤を用いた検討では、in vitro、in vivoのいずれにおいても膠芽腫細胞の増殖・遊走・浸潤が抑制された。また、nestin陽性細胞の低下を認め、GSK3 阻害による膠芽腫細胞の幹細胞性の低下が示唆された。膠芽腫患者の手術検体において、活性化型GSK3 の発現と予後の関連を検討したが、高発現群で有意に予後が悪く、GSK3 が膠芽腫の予後不良因子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have reported that inhibition of glycogen synthase kinase 3 (GSK3) supresses proliferation of glioblastoma cell. Existing drugs which have inhibitory effect for Gsk3 inhibit cell proliferation and invasion of glioblastoma in vitro and in vivo. These drugs supress nestin positive cells, that means reduction of stemness og glioblastoma. According to analysis of expression of active form of GSK3 for surgical spiecimens, progression free survival and overall survival of patients with high level expression is worse than patients with low expression.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：glioblastoma GSK3beta

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。悪性グリオーマ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本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るが、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。とりわけ本腫瘍の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 Med Chem* 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、その臨床上的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、至適薬剤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-

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)。

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。近年グリオーマに対する分子標的療法が欧米では盛んに行われているが、まだ確立された治療法ではない。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)3 β について、基礎・臨床研究を進展させ GSK3 β を標的とする新規グリオーマ治療法の基盤を確立する。

3 . 研究の方法

1. GSK3 β による浸潤能亢進メカニズムの解明 : AR-A014418 により阻害される浸潤関連分子およびそのシグナル伝達を解析する。AR-A014418 による浸潤関連分子への影響は mRNA level ですでに解析しており、この結果をもとに検討する。

1) 浸潤シグナル下流分子の解析、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 . GSK3 β 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)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) 薬剤感受性を増強させるメカニズムの解析 (MGMT プロモーターとの関連) : MGMT promoter のメチル化を促進するメカニズムとして、c-Myc を介した DNA(cytosine-5)-methyltransferase 3A の誘導を前述した。その他の分子メカニズムを解明すべく、GSK3 β の下流に位置する各種分子に着目し、GSK3 β 阻害による変化を解析する。特に MGMT promoter のメチル化と関連があるものを抽出し、それらを中心に検討する。

2) 薬剤感受性を増強させるメカニズムの解析 : 膠芽腫細胞において、上述の MGMT promoter メチル化に関与するもの以外を検討する。例えば、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おり、BBB を通過した薬剤を血中に戻すことで効果を減弱させている。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、GSK3 β 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。

4 . 研究成果

1) 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 GSK3 β の基質であるリン酸化を抑制した。

2) 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。

3) 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 (GSL カクテル) 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。

4) 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。

5) 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 GSK3 β 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 GSK3 β 高発現群では優位に PFS、OS とも不良であった。

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 3 件)

1. Nakajima R, Nakada M, Miyashita K, Kinoshita M, Okita H, Yahata T, Hayashi Y. Intraoperative Motor Symptoms during Brain Tumor Resection in the Supplementary Motor Area (SMA) without Positive Mapping during Awake Surgery. Neurol Med Chir (Tokyo) 2015 55(5);442-50 [査読有]

2. Nakajima R, Okita H, Kinoshita M, Miyashita K, Nakada M, Yahata T, Hamada J, Hayashi Y. Direct evidence for the causal role of the left supplementary motor area in working memory: A preliminary study. Clin Neurol Neurosurg. 2014 Nov;126:201-4 [査読有]

3. Tanaka S, Nakada M, Nobusawa S, Suzuki SO, Sabit H, Miyashita K, Hayashi Y. Epithelioid glioblastoma arising from pleomorphic xanthoastrocytoma with the BRAF V600E mutation. Brain Tumor Pathol. 2014 Jul;31(3):172-6 [査読有]

[学会発表](計 3 件)

1) 古田拓也、淑瑠へムラサビット、董宇、宮下勝吉、源利成、中田光俊：既存薬転用を応用した膠芽腫に対する GSK3 標的治療

第 16 回 日本分子脳神経外科学会、平成 27 年 8 月 28 - 29 日、浜松

2) 古田拓也、中田光俊、淑瑠へムラサビット、董宇、宮下勝吉、源利成、林裕：既存薬転用による膠芽腫の GSK3 標的療法 第 32 回 日本脳腫瘍学会学術集会、平成 26 年 11 月 30 日 - 12 月 2 日、千葉

3) 古田拓也、中田光俊、淑瑠へムラサビット、宮下勝吉、源利成、林裕：GSK3 阻害医薬品の膠芽腫浸潤抑制効果 第 73 回 日本脳神経外科学会学術集会、平成 26 年 10 月 9 - 11 日、東京

[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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
宮下勝吉 (Miyashita Katsuyoshi)
金沢大学・医学系・助教
研究者番号：80624874

(2) 研究分担者 ()

(3) 連携研究者
中田光俊 (Nakada Mitsutoshi)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：20334774

古田拓也 (Furuta Takuya)
金沢大学・大学病院・医員
研究者番号：20646690