

**【目的】**胆道癌の治療成績は未だ十分ではなく、根治切除以外に有効性の確認された治療はほとんどない。胆道癌の進展および悪性化に関わる分子機構の解明および新たな治療標的の探索を目的として、我々は Glycogen synthase kinase 3 (以下、GSK3) に注目した。本研究では胆道癌における GSK3 の機能解析および GSK3 の阻害を介した治療の有効性について検討した。

**【方法】**以下の研究課題 1、2 に従い研究を進めた。1. 胆道癌細胞株に対する GSK3 の阻害を介した *in vitro* の実験：ヒト胆道癌細胞株として H1、SSP25、RBE の 3 系統を用いた。small hairpin RNA (以下、shRNA) を用いて ASPH の発現を抑制することで GSK3 の機能を阻害し、*in vitro* での解析を行った。細胞増殖能の評価は、MTT を用いた Proliferation assay にて行い、Cellular senescence の評価は、Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase 染色、ウェスタンブロットによるタンパク発現解析にて行った。2. *in vivo* 肝内腫瘍増殖モデルにおける GSK3 阻害の評価：ラット由来の胆道癌細胞株 (BDEneu-CL24) を用いて、ラット肝内腫瘍モデルを作製した。GSK3 の機能阻害は shRNA を用いた ASPH の発現抑制にて行い、得られた腫瘍を用いてウェスタンブロットによるタンパク発現の解析を行った。

**【結果】**1. ヒト胆道癌細胞における shASPH の導入株では、shLuc コントロールに比して ASPH のタンパク発現が低下しており、有意に増殖能の低下が認められ、また Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase 染色では青色に染色される  $\beta$ -galactosidase 陽性細胞が多く観察された。タンパク発現解析では、ASPH の発現抑制下において細胞増殖能の変化と同様に cyclin D1 の発現低下を認めた。2. shASPH を導入した BDEneu-CL24 由来の肝内腫瘍は、shLuc コントロールを導入した細胞由来の腫瘍に比して小さく、得られた腫瘍を用いたタンパクの発現解析では、ASPH の発現を抑制した shASPH 導入株由来の腫瘍の方がコントロールに比し GSK3 の発現がより低下し、また p16 および p27 の発現がより上昇していた。以上の結果より、胆道癌における GSK3 の阻害が cellular senescence を引き起こす可能性が示唆された。

胆道癌細胞株肝内腫瘍モデルにおける GSK3、16、p27 のタンパク発現の関係

