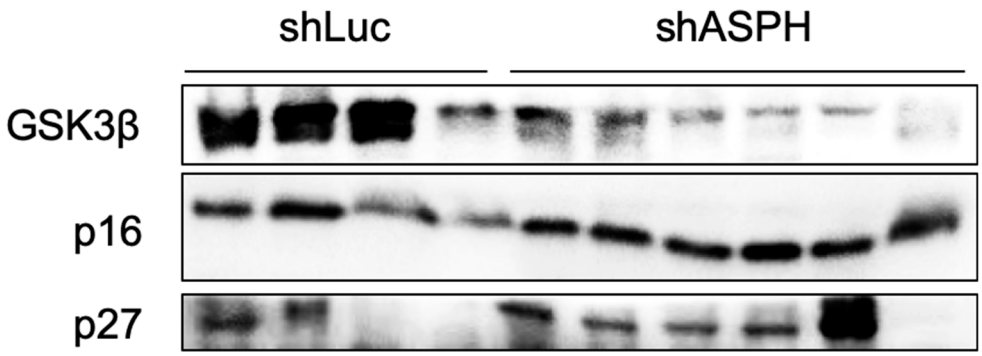
190　胆道癌に対するGSK3を介したSenescence induction therapyの開発	岩上　佳史

【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 β-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 β-galactosidase染色では青色に染色されるβ-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



190. 胆道癌に対する GSK3 を介した Senescence induction therapy の開発

岩上　佳史

大阪大学 大学院医学系研究科 消化器外科学

Key words：胆道癌，GSK3，Senescence，p16

緒　言

我が国の癌死の第 9 位であり、5 年生存率は膵癌に次いで 2 番目に低く、極めて予後不良な疾患である。胆道癌の根治治療は外科的切除であるが、切除可能であってもその治療成績は十分ではない。根治切除以外に胆道癌で有効性の確認された治療はほとんどなく、ゲムシタビンベースにシスプラチンを上乗せしたゲムシタビン・シスプラチン併用化学療法が第 1 選択とされているが、その生存期間中央値は 11.7 ヶ月［1］にすぎず、現時点で推奨される第 2 選択の化学療法はない。そのため、癌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が急務とされている。2008 年に Wang Z らにより、Glycogen synthase kinase 3（以下、GSK3）が、ある特定の白血病の治療標的となることが報告［2］されてから、固形癌においても GSK3 の機能解析が注目されている。我々はこれまで、肝細胞癌において、腫瘍特異的に発現する Aspartate β-hydroxylase（以下、ASPH）の解析を進める中で、ASPH の発現抑制および酵素活性阻害が GSK3 のリン酸化（不活性化）を来たし、p16、p15、p21 を介して Cellular senescence を誘導し、cyclin D1 と PCNA の発現低下が認められることを証明［3］し、固形癌においても GSK3 が中心的な治療標的となり得ることを報告してきた。このような背景より、我々は胆道癌細胞株を用いて GSK3 の発現と機能解析を行い、GSK3 の阻害を介した治療の有効性とその効果予測について検討することを立案した。本研究の結果、GSK3 の阻害を介した胆道癌の新たな治療法への応用に繋がることが期待される。

方法および結果

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。細胞増殖能の評価を、SSP25 において MTT を用いた Proliferation assay を行い、Cellular senescence の評価を、H1、SSP25、RBE の 3 系統において Senescence-associated β-galactosidase 染色、ウェスタンブロットによるタンパク発現解析を行った。

shLuc をコントロールとして、2 種の shRNA を用いて ASPH の knockdown を行い（shASPH#1 および#2）、SSP25 において Proliferation assay を行った。結果、図 1a に示すように ASPH の発現抑制は 2 種の shRNA において shASPH#2 に比し shASPH#1 の方がより強く発現を抑制することを確認した。また図 1b に示すように 2 種の shASPH 導入株は、shLuc コントロールに比して有意に増殖能の低下が認められた（$p<0.001$）が、shASPH#2 に比し shASPH#1 の方がより増殖能は低下しており、ASPH の発現低下の程度に伴い増殖能が低下することを確認した。

本結果より、以降の実験は shASPH#1 を用いて行うこととした。

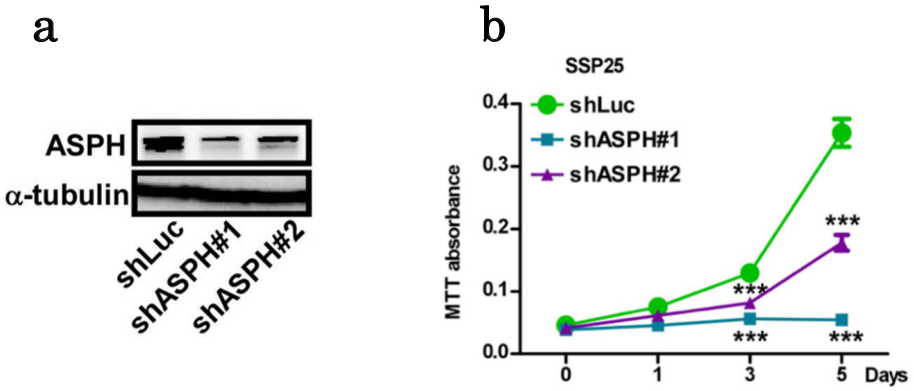


図 1. ヒト胆道癌細胞株（SSP 25）における ASPH の発現と細胞増殖能の関係

a) SSP 25 における shRNA を用いた ASPH のタンパク発現の抑制。

b) SSP25 における shRNA を用いた細胞増殖能の変化（t-test、*** $p < 0.001$）。

続いて、ヒト胆道癌細胞株として RBE、SSP25、H1 の 3 系統を用いて、cellular senescence の評価を目的として、Senescence-associated β-galactosidase 染色を行った。RBE、H1 とも shASPH を導入すると SSP25 と同様に細胞増殖能の低下が認められ、また図 2 に示すように青色に染色される β-galactosidase 陽性細胞が多く観察された。

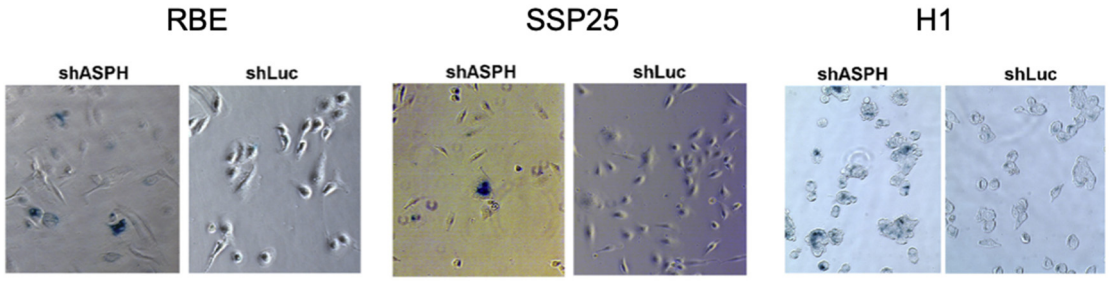


図 2. ASPH の発現抑制下におけるヒト胆道癌細胞株（RBE、SSP25、H1）の Senescence-associated β-galactosidase 染色（×200）

また、ヒト胆道癌細胞株として SSP25、H1、RBE の 3 系統を用いたウェスタンブロットによる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図 3 に示すように cyclin D1 の発現低下を認めた。

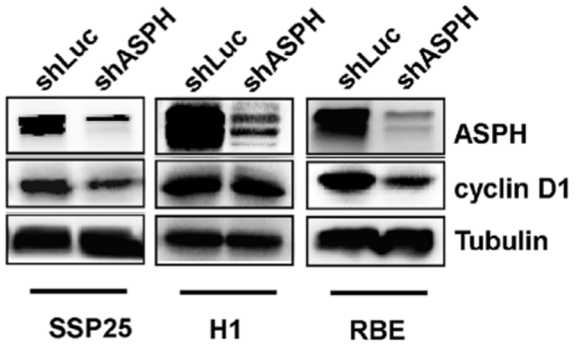


図 3. ヒト胆道癌細胞株（SSP25、H1、RBE）における ASPH 発現抑制下での cyclin D1 タンパク発現の変化

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 [4]。課題 1 に引き続き、GSK3 の機能阻害は shRNA を用いた ASPH の発現抑制にて行った。適切な条件での麻酔下にラットを開腹し、BDEneu-CL24 に shLuc, shASPH をそれぞれ導入した細胞株を 3×10^6個、肝内に直接 injection し、肝外胆管を結紮した上で 18 日目に標本を回収し評価した。また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解析を行い GSK3 と senescence marker（p16、p27）を評価した。

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腫瘍に比して小さく、得られた腫瘍を用いたタンパク発現解析では、図 4 に示すように 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、より GSK3 の発現が低下し、p16 および p27 の発現が上昇していた。

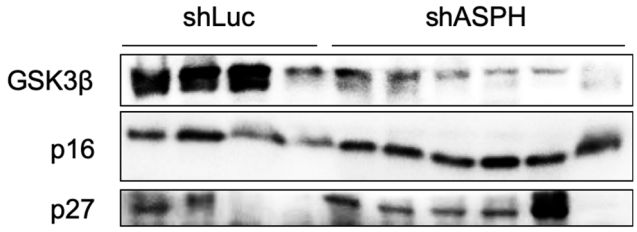


図 4. ラット胆道癌細胞株（BDEneu-CL24）由来の肝内腫瘍モデルにおける ASPH の発現抑制と GSK3、p16、p27 のタンパク発現の変化

考　察

我々は、これまでに肝細胞癌、膵癌、胆道癌、乳癌、肺癌など、固形癌において広く ASPH の強発現が認められていることを確認してきたが、本研究では ASPH の発現を抑制することで、GSK3 の機能を阻害し [3]、胆道癌細胞株における解析を行った。

研究課題 1 の結果のように、ヒト胆道癌細胞株において ASPH の発現を抑制すると、有意な細胞増殖能の低下を認めた（図 1）。一方、β-galactosidase 陽性の青色染色細胞は cellular senescence を来した細胞であり、shASPH 導入株で増加していた（図 2）ことから、細胞増殖能の低下の一因として cellular senescence が強く関わっていることが示唆された。また研究課題 2 の結果のように、ラット由来の胆道癌細胞株（BDEneu-CL24）を用いたラット肝内腫瘍モデルでは、ASPH の発現抑制と、それに伴う GSK3 の機能阻害、および senescence のマーカーである p16、p27 の発現低下（図 4）を認めており、胆道癌においても図 5 に示す概念図のごとく GSK3 の阻害が cellular senescence を引き起こす可能性が示唆された。

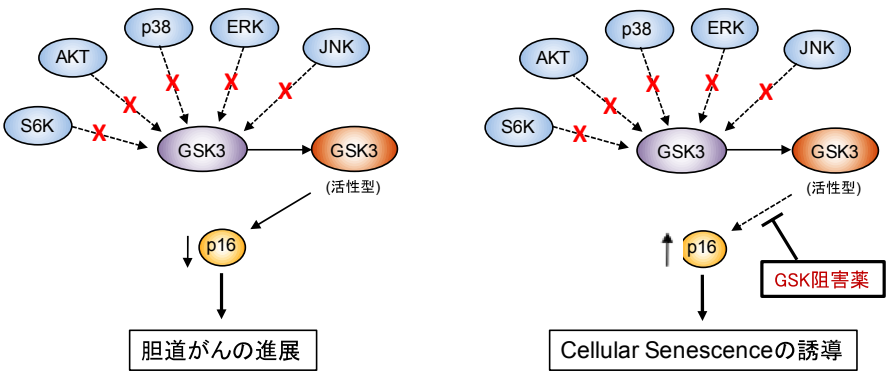


図 5. GSK の阻害を介した胆道癌における cellular senescence の誘導の概念図

GSK 阻害についてはアルツハイマーの治療薬として Phase2 の臨床試験が終了している［5］ことから、ヒトへの臨床応用についての安全性が確認されている。また最近では、歯科領域において歯を修復する自然なプロセスが促進されることも報告されており［6］、様々な領域でその治療効果が期待されていると言える。

本研究の結果は、胆道癌に対する治療成績向上につながるものと考えられ、GSK の阻害薬を用いた早期臨床応用の可能性を期待する。

文 献

1） Valle J, Wasan H, et al. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. N Engl J Med. 2010 Apr 8;362(14):1273-81. doi: 10.1056/NEJMoa0908721.

2） Wang Z, Smith KS, et al. Glycogen synthase kinase 3 in MLL leukaemia maintenance and targeted therapy. Nature. 2008 Oct 30;455(7217):1205-9. doi: 10.1038/nature07284. Epub 2008 Sep 17.

3） Iwagami Y, Huang CK, et al. Aspartate β-hydroxylase modulates cellular senescence through glycogen synthase kinase 3β in hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2016 Apr;63(4):1213-26. doi: 10.1002/hep.28411. Epub 2016 Feb 19.

4） Noda T, Shimoda M, et al. Immunization with aspartate-β-hydroxylase-loaded dendritic cells produces antitumor effects in a rat model of intrahepatic cholangiocarcinoma. Hepatology. 2012 Jan;55(1):86-97. doi: 10.1002/hep.24629.

5） Lovestone S, Boada M, et al. A phase II trial of tideglusib in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2015;45(1):75-88. doi: 10.3233/JAD-141959.

6） Neves VC, Babb R, et al. Promotion of natural tooth repair by small molecule GSK3 antagonists. Sci Rep. 2017 Jan 9;7:39654. doi: 10.1038/srep39654.