

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 安楽 力
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 931 号
学位授与の日付 令和2年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Clinically relevant GSK-3 β inhibitor 9-ING-41 is active as a single agent and in combination with other antitumor therapies in human renal cancer (9-ING-41 (GSK-3 阻害剤)は、腎癌に対して単剤および併用療法として有効である。)

論文審査委員 主査 教授 西條 康夫
副査 教授 味岡 洋一
副査 講師 渡部 聡

博士論文の要旨

背景と目的

転移性腎癌の全身療法は劇的に進化し、古典的免疫療法から VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) 受容体を標的とする抗血管新生薬、mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) 阻害剤、免疫チェックポイント阻害剤を含むさまざまな標的治療へと移行している。しかし、未だに転移性腎癌の多くは根治不能であり、さらなる有効な治療法の開発が期待される。グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3 (GSK-3) は、癌を含む様々な病理学的プロセスに関与しており、癌治療の標的分子として期待されている。今回申請者らは、GSK-3 阻害剤である 9-ING-41 の腎癌細胞に対する抗腫瘍効果について検証した。

方法

腎癌細胞株として (ACHN, Caki-1, KRCY, KU19-20) を用いた。MTS アッセイにて細胞生存率を、BrdU 取り込みアッセイにて細胞増殖をそれぞれ測定した。PI 染色を用いたフローサイトメトリーにて細胞周期およびアポトーシスの有無を調査した。ウエスタンブロットにて蛋白発現を、RT-PCR にて mRNA の発現を調べた。effector cell として高容量 IL-2 刺激したリンパ球 (Lymphokine-activated killer ; LAK 細胞) を用いて、免疫細胞による癌細胞毒性を調査した。

結果

ウエスタンブロットにて、腎癌細胞株で GSK 3 蛋白が高発現していることを確認した。さらに 9-ING-41 治療によって GSK-3 活性が阻害 (GSK-3 の主要な基質のリン酸化型である pGS 蛋白の発現低下) されていることを確認した。9-ING-41 は腎癌細胞株の細胞周期を G2 期において停止させ (G2 arrest)、アポトーシスを誘導することによって生存率を低下させ、細胞増殖を阻害した。9-ING-41 は抗アポトーシス蛋白である Bcl-2、XIAP や、細胞周期関連の蛋白である cyclinD1, cyclinB1, E2F1, cdc2 の発現を低下させた。9-ING-41 は腎癌の治療薬である分子標的薬 (ソラフェニブ、スニチニブ、パゾパニブ、カボザンチニブ) や、

オートファジー阻害剤（バフィロマイシン、クロロキン）との併用治療にて、これらの薬剤の抗腫瘍効果を増強させた。また細胞障害アッセイにて 9-ING-41 は、腎癌細胞の免疫細胞（LAK 細胞）に対する感受性を増強させた。

考察

GSK-3 は腎癌細胞の生存、増殖、化学療法抵抗性を促進すると考えられている。本研究は、GSK-3 阻害剤である 9-ING-41 が腎癌細胞の増殖と生存を抑制することを示した。

GSK-3 は NF- κ B 経路の促進因子であるが、NF- κ B 経路の亢進は抗アポトーシスや転移性腎癌の薬剤耐性と関連している。すなわち GSK-3 阻害は NF- κ B 経路の抑制を介してアポトーシスを促進し、薬剤耐性を克服できる可能性がある。本研究では、腎癌において 9-ING-41 がソラフェニブ、スニチニブ、パゾパニブおよびカボザンチニブの抗腫瘍効果を増強することを示した。

GSK-3 阻害は腎癌細胞にオートファジーを誘導することが報告されている。一方で、オートファジーは癌細胞のアポトーシスを回避するメカニズムとも考えられている。よって、GSK-3 阻害と同時にオートファジーも阻害することで、より有効にアポトーシスを誘導できる可能性が考えられる。本研究では、オートファジー阻害剤（クロロキン、バフィロマイシン）が腎癌細胞における 9-ING-41 の抗腫瘍効果を増加させることを示し、前述の仮説を支持する結果であった。

以前より転移性腎癌に対しては IFN α や IL-2 などの免疫療法が広く行われてきたが、現在でも免疫チェックポイント阻害剤を用いた免疫療法が標準治療として行われている。本研究では、9-ING-41 での治療により腎癌細胞が免疫細胞（LAK 細胞）に対する感受性が増強することを示した。すなわち、9-ING-41 は免疫療法と併用が有効である可能性が示唆される。

これらの結果は、進行腎癌患者に対して 9-ING-41 を用いて治療を行う根拠となりうる。

審査結果の要旨

グリコゲンシンターゼキナーゼ-3 (GSK-3) は、癌を含む様々な病理学的プロセスに関与しており、癌治療の標的分子として期待されている。今回申請者は、GSK-3 阻害剤である 9-ING-41 の腎癌細胞 4 株に対する抗腫瘍効果について検証した。ウエスタンブロットにて、9-ING-41 治療によって GSK-3 活性が阻害 (GSK-3 の主要な基質のリン酸化型である pGS 蛋白の発現低下) され、細胞周期で G2 arrest を引き起こし、アポトーシスを誘導することによって生存率を低下させ、細胞増殖を阻害した。また、9-ING-41 は抗アポトーシス蛋白である Bcl-2、XIAP や、細胞周期関連の蛋白である cyclinD1, cyclinB1, E2F1, cdc2 の発現を低下させた。9-ING-41 は腎癌の治療薬である様々な分子標的薬や、オートファジー阻害剤との併用治療にて、これらの薬剤の抗腫瘍効果を増強させた。また 9-ING-41 は、腎癌細胞の免疫細胞 (LAK 細胞) に対する感受性を増強させた。

本研究は、GSK-3 阻害剤である 9-ING-41 が腎癌細胞の増殖と生存を抑制することを示し、進行腎癌患者に対して 9-ING-41 を用いて治療を行う根拠となりうることを示したことより、学論論文として価値があると評価する。