

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 黒木 大生
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 939 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 9-ING-41, a small molecule inhibitor of GSK-3 β , potentiates the effects of anticancer therapeutics in bladder cancer
(新規 GSK-3 β 阻害薬である 9-ING-41 は膀胱癌に対して抗腫瘍効果を発揮する)

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・目的】膀胱癌は世界で9番目に罹患者が多い癌腫であり、2018年には世界中で約20万人が癌死している。特に転移性膀胱癌では標準治療である Gemcitabine と Cisplatin の併用療法を行ったとしても生存期間の中央値は12-15ヶ月程度であり、生存期間を延長しうる新たな治療薬の開発が急務とされている。Glycogen Synthase Kinase (GSK)-3 β はもともと糖代謝経路において発見されたセリン・スレオニン酸化酵素であるが、悪性腫瘍との関わりにおいて近年注目を集めている。申請者らはこれまでに膀胱癌において GSK-3 β が核内に高発現することや、GSK-3 β 阻害薬が増殖抑制効果を示すことを報告した。9-ING-41 は新規に開発された GSK-3 β 阻害薬であり、320種類におよぶ他の阻害薬よりも GSK-3 β への選択性が高く、神経芽細胞腫や膠芽腫、B細胞リンパ腫、子宮体癌、膵癌、腎癌、乳癌における抗腫瘍効果が示されている。さらに現在、9-ING-41 は各種進行癌に対する臨床試験での実際の使用もされており、効果が期待されている。本論文において申請者は9-ING-41 の膀胱癌細胞株に対する有効性を検討した。

【方法】3種類の膀胱癌細胞株(T24, HT1376, RT4)に対して9-ING-41の投与を行った。細胞増殖アッセイによる細胞増殖解析、フローサイトメトリーによる細胞周期解析、ウエスタンブロッティングによる蛋白発現解析、RT-qPCRによるmRNA発現解析、細胞障害アッセイなどを行った。またこれまで進行膀胱癌治療に用いられてきた Gemcitabine、Cisplatin と 9-ING-41 の併用治療に加え、癌治療の分野でも注目されている Autophagy 阻害薬の Chloroquine との併用治療も行った。

【結果】9-ING-41 は薬剤濃度依存的に細胞増殖を抑制し、その50%阻害濃度(GI50)は0.37から0.52 μ Mであった。細胞周期解析を行ったところSub-G1分画の増加があり、さらにG2期で細胞周期が停止していた。ウエスタンブロッティングではXIAP、PARPといったアポトーシス関連蛋白の発現変化が認められ、RT-qPCRによるmRNA解析でもBcl-2、XIAPといった抗アポトーシス蛋白の発現低下が認められた。さらにCaspaseアッセイではCaspase-3の増加が認められた。これらの結果から9-ING-41はアポトーシスを促進すると考えられた。同時にウエスタンブロッティングにおいてCyclinB1、Cdk1といったG2/Mの細胞周期

に関連する蛋白の発現変化が認められた。また 9-ING-41 と Gemcitabine、Cisplatin との併用治療により抗腫瘍効果が増強されることが確認された。さらに Autophagy 阻害薬である Chloroquine との併用治療においても抗腫瘍効果の増強が認められた。また 9-ING-41 の投与によりウエスタンブロッティングにおいて LC3A/B の蛋白発現が増強した。さらに形態学的にも膀胱癌細胞株において Autophagy が誘導されていることが確認された。細胞傷害アッセイにおいて 9-ING-41 は膀胱癌細胞株をリンパ球からの傷害を受けやすくさせて、抗腫瘍効果を発揮している可能性が示唆された。

【考察】 9-ING-41 は単剤治療で膀胱癌細胞株に対して抗腫瘍効果をもつことが明らかになった。そのメカニズムはアポトーシスの促進と、主に G2/M 期において細胞周期が停止することにより細胞分裂が停止しているためと考えられた。また Gemcitabine や Cisplatin との併用治療により抗腫瘍効果が増強した理由として、9-ING-41 による GSK-3 β 阻害が、膀胱癌細胞株それぞれの p53 の状態に応じて化学療法への感受性を変化させたためと考えられた。9-ING-41 の投与により Autophagy のマーカーである LC3A/B の上昇がウエスタンブロッティングで確認され、細胞形態学的にも Autophagy の誘導が認められた。また一方で Autophagy 阻害薬である Chloroquine と 9-ING-41 の併用により抗腫瘍効果が増強された。以上より申請者は Autophagy を癌細胞の生存機構の一種であると考えた。その Autophagy を阻害されることにより、より多くの細胞が細胞死に至るのであろうと考えられた。また Chloroquine を癌治療薬として用いた、今回の 9-ING-41 との併用治療は、膀胱癌治療において新たな治療戦略であると思われた。9-ING-41 がリンパ球を活性化し、腫瘍が細胞傷害を受けやすくなるという結果は、今後膀胱癌への適応も拡大されるであろう、immune-oncological drugs と 9-ING-41 の併用治療の効果も大いに期待ができると考えられた。

【結論】今回は 9-ING-41 が膀胱癌細胞株に対して、単剤治療のみならず従来用いられてきた Gemcitabine や Cisplatin との併用で抗腫瘍効果を増強し、さらに Autophagy 阻害薬である Chloroquine との併用においても抗腫瘍効果が増強するという新たな知見を示した。9-ING-41 は今後、膀胱癌に対する臨床使用とその治療効果が大きい期待される薬剤であると思われた。

審査結果の要旨

9-ING-41 は新規に開発された GSK-3 β 阻害薬であり、各種進行癌に対する臨床治験が行われている。申請者は 9-ING-41 の膀胱癌細胞 3 株に対する有効性を検討した。9-ING-41 は薬剤濃度依存的に細胞増殖を抑制し、細胞周期解析では、Sub-G1 分画の増加と G2 期の細胞周期停止が確認された。Bcl-2、XIAP といった抗アポトーシス蛋白の発現低下の一方で Caspase-3 の増加が認められた。これらの結果から 9-ING-41 はアポトーシスを促進すると考えられた。また、CyclinB1、Cdk1 といった G2/M の細胞周期に関連する蛋白の発現変化が認められた。また 9-ING-41 と Gemcitabine、Cisplatin との併用治療により抗腫瘍効果が増強され、Autophagy 阻害薬である Chloroquine との併用治療においても抗腫瘍効果の増強が認められた。また細胞傷害アッセイにおいて 9-ING-41 は膀胱癌細胞株をリンパ球からの傷害感受性は増強していることが示された。本研究で、9-ING-41 が膀胱癌細胞株に対して、単剤治療のみならず従来用いられてきた Gemcitabine や Cisplatin との併用で抗腫瘍効果を増強し、さらに Autophagy 阻害薬である Chloroquine との併用においても抗腫瘍効果が増強するという新たな知見を示した。9-ING-41 は今後、膀胱癌に対する臨床使用とその治療効果が大きい期待される薬剤であると示したことから、学論文として価値があると認められる。