

助成番号 26-2-6

## 膵癌に対する GSK3 を介した Senescence 誘導療法

大阪大学大学院医学系研究科 消化器外科学

岩上 佳史

### 1. 諸言

浸潤性膵管癌（以下、膵癌）は本邦においてがん死亡数の第4位であり、他領域のがんと比較し、5年生存率は顕著に低く、未だ予後不良な難治がんと言わざるを得ない。膵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とは言えず、また根治切除以外に有効性の確認された化学療法は限られており、がん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、代謝に関わる Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) がある特定の白血病の治療標的となることが報告<sup>1)</sup>されてから、固形がんにおいても GSK3 $\beta$  の機能解析が注目されている。申請者はこれまで、肝細胞癌において、腫瘍特異的に発現する Aspartate  $\beta$ -hydroxylase (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 $\beta$  のリン酸化（不活性化）を介して cellular senescence を誘導し、p16 の誘導、cyclin D1 と PCNA の発現低下が認められることを証明<sup>2)</sup>し、固形がんにおいても GSK3 $\beta$  が中心的な治療標的となり得ることを報告してきた。

本研究では、膵癌の新たな治療法への応用に繋がる研究となることを期待し、肝細胞癌同様、膵癌においても GSK3 $\beta$  を介して腫瘍を cellular senescence へ誘導することができるかどうか検証を行うことを目的とした。

### 2. 方法

当初は、膵癌細胞株に対する GSK3 阻害薬を用いた *in vitro* の実験より研究課題を開始する予定としていたが、膵癌における他の治療戦略に関する研究を進める中で、安定して膵癌細胞株を cellular senescence に誘導する実験系を確立し得たため、まずその中で GSK3 $\beta$  がどのように変化するのかを検討することとした。

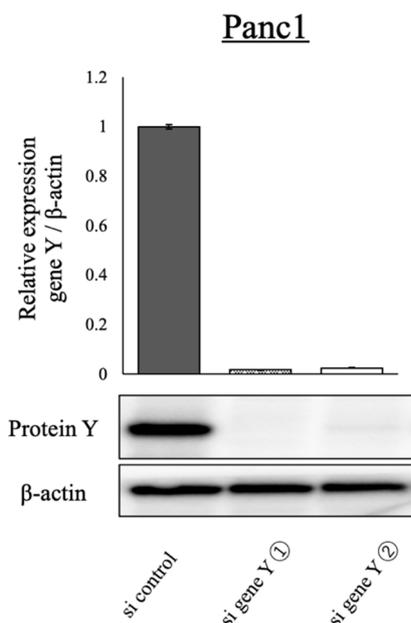
これまで教室では膵癌の epigenetic 制御に着目しメチル化に関与する EZH2<sup>3)</sup>、脱アセチル化に関与する HDAC<sup>4)</sup>を介した制御機構について報告を行ってきたが、EZH、HDAC の阻害時に大きく変化を認めると報告<sup>5)</sup>されている microRNA (miR) -X を膵癌細胞株に対して強制発現し機能解析した。miR-X を強制発現すると膵癌細胞の増殖能は著明に低下した。

また miR-X の強制発現株をコントロールと比較し、messenger RNA (mRNA) マイクロアレイ解析を行ったところ、候補標的遺伝子の一つとして遺伝子 Y が抽出された。膵癌細胞株において、siRNA を用いて遺伝子 Y の発現抑制実験を行い、その機能解析、cellular senescence に関わるパスウェイ、および GSK3 $\beta$  の変化について解析した。

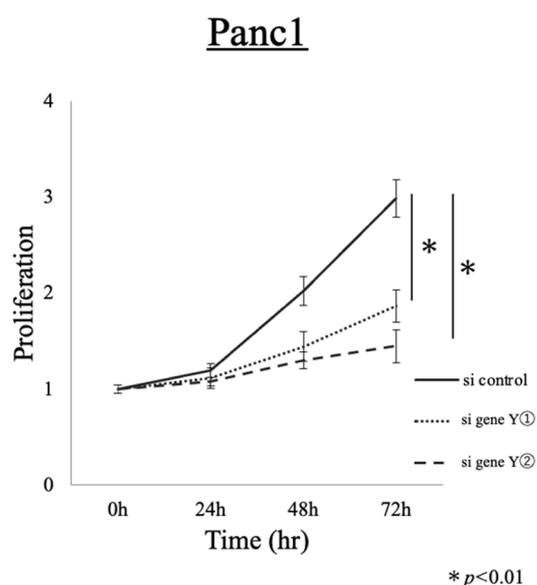
### 3.結果

#### 3.1 膵癌細胞株における Clusterin の発現抑制と増殖能の変化

膵癌細胞株は Panc1 を使用し、siRNA を用いて遺伝子 Y の発現抑制を行い、まず qRT-PCR と Western blotting で遺伝子 Y の発現変化を確認した。2 種の siRNA を用いて遺伝子 Y の発現を抑制したところ、mRNA レベル、およびタンパクレベルで良好な発現抑制が得られた (図 1)。一方、遺伝子 Y の発現抑制が得られた細胞株を用いて proliferation assay を行ったところ、2 種の siRNA で遺伝子 Y の発現抑制を行った細胞株は、コントロールと比し、著明な増殖能の低下を認めた (図 2)。



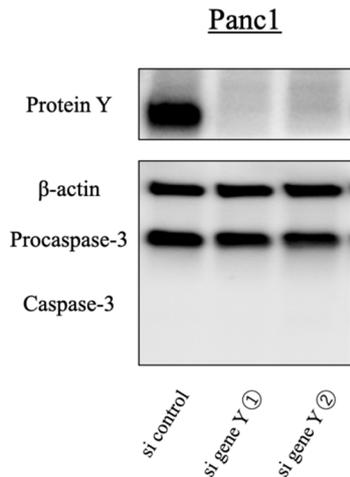
(図1) siRNAを用いた遺伝子Yの発現抑制



(図2) 遺伝子Yの発現抑制と増殖能

#### 3.2 膵癌細胞株における遺伝子 Y の発現抑制と apoptosis

siRNA を用いた遺伝子 Y の発現抑制膵癌細胞株において、増殖能が著明に低下した機序の一つとして apoptosis の変化を評価したところ、図 3 のごとく Caspase-3, procaspase-3 に明らかな変化は認められなかった。

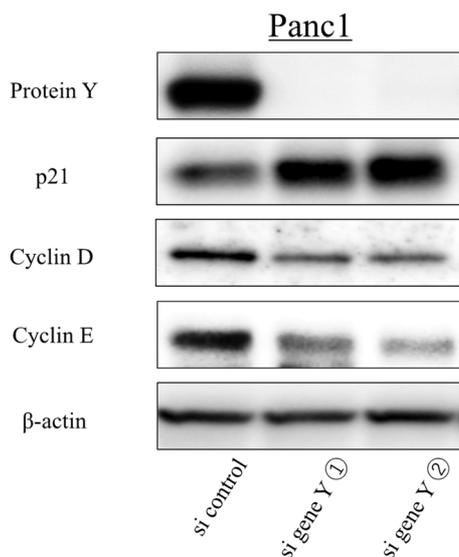


(図3) 遺伝子Yの発現抑制とapoptosis

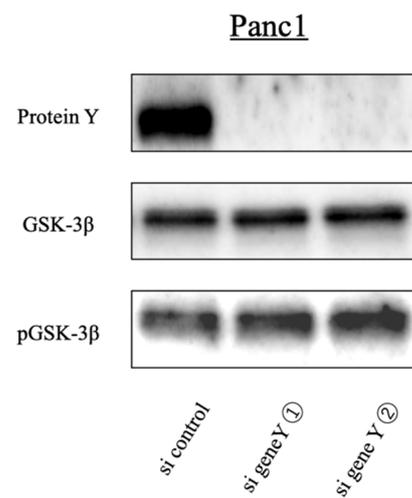
### 3.3 膵癌細胞株における遺伝子 Y の発現抑制と細胞周期、cellular senescence および GSK3 $\beta$ の変化について

siRNA を用いた遺伝子 Y の発現抑制膵癌細胞株において、apoptosis に全く変化が認められなかったことから、続いて細胞周期に関わる機能の解析を行った。

細胞周期、cellular senescence に関わる p21、Cyclin D、Cyclin E を Western blotting を用いて評価したところ、siRNA を用いた遺伝子 Y の発現抑制膵癌細胞株において、p21 の著明な上昇、および Cyclin D、Cyclin E の著明な低下が認められ、cellular senescence への誘導が認められた (図 4)。一方、GSK3 $\beta$  の変化について Western blotting を用いて評価したところ、不活性型のリン酸化 GSK3 $\beta$  の発現が siRNA を用いた遺伝子 Y の発現抑制膵癌細胞株において上昇していることが確認できた (図 5)。



(図4) 遺伝子Yの発現抑制と細胞周期



(図5) Senescence誘導下でのGSK3 $\beta$ の変化

#### 4.考察

本研究では、膵癌に対する cellular senescence の誘導について着目し GSK3 $\beta$  の変化について評価した。これまで教室で行ってきた研究から遺伝子 Y という候補遺伝子について着目し、その機能解析を行ったところ、膵癌細胞株に遺伝子 Y の発現抑制を行うことで、顕著な増殖能の低下、および apoptosis を伴わない細胞周期の停止、cellular senescence へ誘導されることを示した。膵癌細胞株における cellular senescence は、遺伝子 Y の発現抑制で安定して誘導が可能であること、また不活性型のリン酸化 GSK3 $\beta$  の発現上昇が認められることから、遺伝子 Y の発現抑制が GSK3 $\beta$  のリン酸化（不活性化）を介して cellular senescence を誘導されると考えられた。

ASPH の発現抑制が GSK3 $\beta$  を介して肝細胞癌の cellular senescence を誘導していた<sup>1)</sup>のと類似し、本研究では膵癌においては遺伝子 Y の発現抑制が GSK3 $\beta$  を介して cellular senescence を誘導することを証明した。GSK3 $\beta$  は膵癌の新たな治療標的になり得る可能性を有すると考え、今後も引き続き研究を続けることを予定する。

#### 5.結語

膵癌において遺伝子 Y の発現抑制は GSK3 $\beta$  を介して cellular senescence を誘導することが示唆された。

#### 6.文献

- 1) Wang Z, Smith KS, Murphy M, Piloto O, Somervaille TC, Cleary ML. Glycogen synthase kinase 3 in MLL leukaemia maintenance and targeted therapy. *Nature*. 2008; 455(7217): 1205-9.
- 2) Iwagami Y, Huang CK, Olsen MJ, Thomas JM, Jang G, Kim M, et al. Aspartate  $\beta$ -hydroxylase modulates cellular senescence through glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2016; 63(4): 1213-26.
- 3) Hasegawa S, Nagano H, Konno M, Eguchi H, Tomokuni A, Tomimaru Y, et al. A crucial epithelial to mesenchymal transition regulator, Sox4/Ezh2 axis is closely related to the clinical outcome in pancreatic cancer patients. *Int J Oncol*. 2016; 48(1): 145-52.
- 4) Shinke G, Yamada D, Eguchi H, Iwagami Y, Asaoka T, Noda T, et al. Role of histone deacetylase 1 in distant metastasis of pancreatic ductal cancer. *Cancer Sci*. 2018; 109(8): 2520-31.
- 5) Hibino S, Saito Y, Muramatsu T, Otani A, Kasai Y, Kimura M, et al. Inhibitors of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) activate tumor-suppressor microRNAs in human cancer cells. *Oncogenesis*. 2014; 3(5): e104.

#### 7.成果発表

なし