

論文内容要旨

論文題目

Glycogen synthase kinase-3 β : a prognostic marker and a potential therapeutic target in human bladder cancer
(グリコーゲンシンセースキナーゼ-3 β : 膀胱癌における予後予測マーカーおよび治療標的となる可能性の検討)

責任講座： 腎泌尿器外科学 講座

氏 名： 内藤 整

【内容要旨】(1,200 字以内)

目的：

glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) は、 α と β の 2 つの isoform を持つ serine threonine protein kinase で、 β -catenin をポリユビキチン化し分解を促進する作用があることから細胞増殖抑制的に働くと考えられてきた。しかし近年の報告では、多くの癌腫で GSK-3 β が高発現し、viability を上昇させることが示されている。今回、膀胱癌での役割が依然不明であった GSK-3 β の発現と、その阻害による膀胱癌由来細胞株の viability 抑制効果について検討した。

方法：

膀胱尿路上皮癌手術標本における GSK-3 β の発現パターンを免疫染色および核細胞質分離した検体の Western blotting 法により検討した。また、膀胱癌由来細胞株 (RT4、HT1376、T24、SCaBER) に対して、薬剤による GSK-3 阻害もしくは RNAi による GSK-3 β 阻害を行い、MTS assay、BrDU incorporation assay、フローサイトメトリー、Hoechst 染色、定量的 RT-PCR、Western blotting 法

を用いて、その作用を検討した。

結果：

膀胱癌細胞株について GSK-3 β の発現を Western blotting 法で見
たところ、全ての細胞株で発現が確認できた。ただし、尿路上皮癌
由来である RT4、HT1376、T24 と比較し、扁平上皮癌由来である
SCaBER では発現が弱かった。また高悪性度株である HT1376、T24
は核での GSK-3 β の発現が強かった。

92 例の尿路上皮癌の臨床検体を免疫染色で評価したところ、非浸
潤癌の 62% (69 症例中 43 症例)、浸潤癌の 91% (23 症例中 21 症例)
で、GSK-3 β は核に異常集積していた。核異常集積を認めた症例は、
high grade ($p<0.001$)、high stage ($p<0.05$)、有転移症例 ($p<0.05$)
が多かった。また、転移を確認した患者の全てで核異常集積を認め
ており、疾患特異的生存率も有意に低かった ($p<0.05$)。

次に、膀胱癌由来尿路上皮癌細胞株に、低分子 GSK-3 特異的阻害
剤である AR-A014418 を添加し、MTS assay により細胞の viability
を評価したところ、AR-A014418 濃度依存的な viability 低下がみら
れた。また、フローサイトメトリーにより細胞周期について検討し
たところ、subG1 population の増加が確認された。

以上の結果から GSK-3 阻害によるアポトーシス誘導に注目し、
AR-A014418 処理した細胞株の Bcl-2、XIAP、PARP の発現を
Western blotting 法により観察したところ、NF- κ B 下流蛋白である
Bcl-2、XIAP の発現は低下し、アポトーシスを示唆する Cleaved
PARP の出現が確認された。Hoechst 染色で核をみると GSK-3 阻害
剤を添加した細胞の核は多くが濃縮、断片化しており、GSK-3 阻害

による viability 低下の原因の 1 つはアポトーシス、特に NF- κ B 下流蛋白であり抗アポトーシス作用を持つ Bcl-2、XIAP の発現低下によるものと考えられた。GSK-3 阻害によるアポトーシス誘導は AR-A014418 以外の GSK-3 阻害剤 SB415286、TDZD-8 でも確認できた。また、Bcl-2、XIAP の発現低下は定量的 RT-PCR により mRNA レベルでも確認された。

考察：

本検討により high grade、high stage 尿路上皮癌では GSK-3 β の核異常集積が見られることが示された。このような症例の予後の悪く、予後予測マーカーとなる可能性がある。また、GSK-3 阻害により膀胱癌 viability 低下、アポトーシス誘導が見られ、GSK-3 は膀胱癌治療のターゲットになるかもしれない。

平成 27 年 1 月 13 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学 位 論 文 審 査 結 果 報 告 書

申請者氏名： 内藤 整

論文題目： Glycogen synthase kinase-3 β : a prognostic marker and a potential
therapeutic target in human bladder cancer
(グリコーゲンシンセースキナーゼ-3 β : 膀胱癌における予後予測マーカーおよび治療標的となる可能性の検討)

審査委員：主審査委員

木村 理



副審査委員

松 田 勉



副審査委員

佐藤 恒哉



審査終了日：平成 27 年 1 月 4 日

【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

本研究は、glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) が近年多くの癌腫で高発現し、viability を上昇が示されている。膀胱癌での役割が依然不明であった GSK-3 β の発現と、その阻害による膀胱癌細胞株の viability 抑制効果について発現パターンを免疫染色および核細胞質分離した検体の Western blotting 法により検討した。膀胱癌細胞株 (RT4, HT1376, T24, SCaBER) に対して、阻害剤と RNAi によって GSK-3 を阻害し、MTS assay、BrDU incorporation assay、フローサイトメトリー、Hoechst 染色、定量的 RT-PCR、Western blotting 法を用いて、その作用を検討した。GSK-3 阻害によるアポトーシス誘導に注目し、Western blotting 法にて Bcl-2, XIAP, PARP の発現を見たところ、GSK-3 阻害によって Bcl-2, XIAP の発現が低下し、Cleaved PARP が発現していた。Hoechst 染色で核をみると GSK-3 阻害剤を添加した細胞の核は多くが断片化しており、GSK-3 阻害による viability 低下の原因の 1 つはアポトーシス、特に NF- κ B 下流遺伝子である Bcl-2, XIAP の発現低下によると考えられた。GSK-3 阻害によるアポトーシス誘導は AR-A014418 以外の GSK-3 阻害剤 SB415286, TDZD-8 でも確認できた。また、Bcl-2, XIAP の発現低下はリアルタイム rtPCR により mRNA レベルでも確認された。本検討により high grade、high stage 尿路上皮癌では GSK-3 β の核異常集積が見られることが示された。このような症例の予後の悪く、予後予測マーカーとなる可能性がある。また、GSK-3 阻害により膀胱癌 viability 低下、アポトーシス誘導が見られ、GSK-3 は膀胱癌治療のターゲットになりえることを示している。本研究は、臨床応用の可能性も示唆されている。悪性度の指標（例えば MIB-1 index）や分裂像の数等と GSK-3 β の相関についての、また今回明らかになった予後の悪い膀胱癌で GSK-3 β が核で発現するということが他の癌腫でも認められているか否かについてのディスカッション、また核内 GSK-3 β $\uparrow$ というのは結果なのか原因なのかについての追加されれば、学位を授与するに値すると判断した。