

# 論文内容要旨

論文題目

## 腎細胞癌における GSK-3 による mTORC1 下流シグナル経路制御機構の解明 —薬剤耐性腎細胞癌に対する新規治療戦略の探求—

指導教授：土谷 順彦  
氏名：伊藤 裕美

【内容要旨】（1, 200字以内）

**【背景】** 腎細胞癌（RCC）において PI3K/Akt/mTORC1 経路は強く活性化されていることが知られている。以前私の所属する研究室において glycogen synthase kinase-3 $\beta$ （GSK-3 $\beta$ ）が RCC の増殖に関与していることを明らかにした。今回私は、GSK-3 による PI3K/Akt/mTORC1 経路と、その下流分子である 4EBP1、S6K、S6RP とのクロストーク制御機構を明らかにすることを目的とし、GSK-3 によるクロストーク機構が薬剤耐性 RCC に対する新規治療標的となりうる可能性を検討した。

**【方法】** ヒト RCC 細胞 ACHN, Caki1, A498 と正常尿細管上皮細胞 HRPTEpC、ヒト正常腎組織を用いて GSK-3 および mTORC1 下流分子の蛋白質発現を比較した。阻害剤と siRNA により GSK-3 を阻害し、mTORC1 下流分子のリン酸化状態変化を検討した。さらに *in vitro* キナーゼアッセイにより GSK-3 と 4EBP1 の直接的相互作用を調べた。mTORC1 阻害剤であるラパマイシン耐性 ACHN（ACHN/RR）は ACHN をラパマイシン添加培地で約 6 ヶ月間培養することで得た。その間、ラパマイシン濃度を段階的に上げた（1nM から 1 $\mu$ M）。薬剤併用効果は CompuSyn ソフトウェアで解析した。

**【結果】** RCC 細胞において 4EBP1、S6RP の発現とリン酸化は GSK-3 発現と共に亢進していた。GSK-3 阻害により、細胞増殖と 4EBP1、S6RP のリン酸化が抑制された。ラパマイシンと PI3K/Akt/mTORC1 阻害剤 LY294002 は S6RP のリン酸化を強く阻害したが、4EBP1 のリン酸化は中程度の阻害にとどまった。GSK-3 $\beta$  は 4EBP1 を直接リン酸化し、そのリン酸化は GSK-3 阻害剤により抑制された。ACHN/RR において、GSK-3 阻害剤は細胞増殖と 4EBP1、S6RP のリン酸化を ACHN 同様に抑制した。GSK-3 阻害剤とラパマイシンを併用すると、低濃度では相加的効果を示し、高濃度では拮抗した。

**【結論】** RCC 細胞において GSK-3 $\beta$  は、4EBP1 を直接リン酸化することにより mTORC1 下流のシグナル経路を活性化させた。GSK-3 を標的とした治療は mTORC1 阻害剤耐性を克服する新規治療戦略となる可能性が示された。

平成 29 年 8 月 18 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：伊藤 裕美


論文題目：腎細胞癌における GSK-3 による mTORC1 下流シグナル経路制御機構の解明

— 薬剤耐性腎細胞癌に対する新規治療戦略の探求 —


審査委員：主審査委員

石井 邦 明 

副審査委員

吉 岡 秀 志 

副審査委員

三 井 哲 夫 

審査終了日：平成 29 年 8 月 17 日

### 【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

腎細胞癌では PI3K/Akt/mTORC1 経路が活性化していることが知られており、mTORC1 阻害剤であるエベロリムス、テムシロリムスが腎細胞癌に対する分子標的薬として用いられる。しかし、抗癌剤に共通した問題であるが、mTORC1 阻害剤による治療においても、腎細胞癌は薬剤耐性を獲得するため、治療効果が減弱してしまう。そのため、新たな作用機序を有する薬物の開発が求められている。

伊藤裕美君は、このような観点から、所属教室における GSK-3 に関するこれまでの研究結果に注目し、腎細胞癌において GSK-3 が mTORC1 の下流分子に影響している可能性について検討を行った。また、腎細胞癌の mTORC1 阻害剤耐性株を作製し、mTORC1 阻害剤に対する耐性を回避できる可能性について検討を行い、以下の結果を得た。

1. 腎細胞癌細胞において GSK-3、ならびに mTORC1 の下流分子である 4EBP1 および S6RP の発現は上昇しており、4EBP1、S6RP のリン酸化は亢進していた。
2. GSK-3 の薬理的阻害によって 4EBP1、S6RP のリン酸化は抑制され、4EBP1 リン酸化の抑制は、GSK-3 に対する siRNA を用いたノックダウン実験によっても確認された。
3. mTORC1、PI3K、GSK-3 に対する特異的阻害剤を用いた検討によって、GSK-3 は PI3K/Akt/mTORC1 経路とは独立して 4EBP1、S6RP をリン酸化している可能性が示された。
4. *in vitro* キナーゼアッセイによって、GSK-3 による 4EBP1 の直接的リン酸化が明らかになった。
5. GSK-3 阻害剤は、濃度依存的に腎細胞癌細胞株の生存率を低下させ、その程度は mTORC1 阻害剤による作用よりも強かった。
6. GSK-3 阻害剤は、ラパマイシン (mTORC1 阻害剤) 耐性腎癌細胞株において 4EBP1、S6RP のリン酸化を抑制し、耐性株の生存率を非耐性株と同程度に低下させた。

本研究は、GSK-3 が、PI3K/Akt/mTORC1 経路を介さずに、mTORC1 の下流分子を調節していることを明らかにし、GSK-3 の新たな治療ターゲットとしての可能性を示唆したものである。本研究結果は、基礎医学的な重要性に加え、臨床的意義も有しており、審査会は本研究が学位に値するものと判定した。