

令和 4 年 2 月 11 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19577

研究課題名（和文）代謝酵素ゲノム編集による食道扁平上皮の易発がん状態誘発の試み

研究課題名（英文）Induction of predisposition to squamous cell carcinogenesis in esophagus by genome editing of metabolic enzymes

研究代表者

源 利成（MINAMOTO, Toshinari）

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：50239323

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、食道扁平上皮発がんの初期変化である細胞内グリコーゲン低下、消失が発がんの初期選択圧力であると想定し、グリコーゲン合成系代謝酵素のゲノム編集による扁平上皮自然発がん易誘発状態の細胞、マウスモデルの作成を試みた。CRISPR-Cas9などのゲノム編集技術により、ヒト正常食道扁平上皮細胞とC57BL/6系マウスの食道粘膜特異的にグリコーゲン合成酵素(GS)欠失とGSキナーゼ(GSK)3の恒常的活性化型変異を導入した。本研究で樹立したこれらのゲノム編集細胞やマウスのグリコーゲン代謝や前がん性変化の長期観察により、易発がん状態が誘発されるかを検証する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、食道と頭頸部扁平上皮がんの連鎖に代表されるフィールドがん化現象（共通のがん誘発因子により複数の領域や組織にまたがってひろく発がんする状態）と、細胞、組織の分化や発がんにおけるグリコーゲン合成系の新たな生物学的機能の一端を拓く可能性が期待される。食道がんの90%を占める扁平上皮がんの発がん特性を外挿する自然発がんモデルの構築に新たな視点を附与することにより、健康被害を来たす本疾患の病態理解、早期診断や治療法開発に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study attempted to generate cellular and mouse models susceptible to esophageal squamous cell (ESC) carcinogenesis by genome editing of glycogen synthase (GS) and GS kinase (GSK)3, both regulating glycogen metabolism, based on the hypothesis that intracellular glycogen depletion is the critical selective pressure for cellular transformation and malignant evolution in ESC carcinogenesis. By genome editing technologies including CRISPR-Cas9, we could deplete GS or transduce the constitutively active mutant of GSK3 in patient-derived normal ESCs and C57BL/6 mouse esophageal squamous mucosa. Long term observations for changes in glycogen metabolism and preneoplastic phenotypes in these genome-edited human ESCs and mouse model established in the term of this research project are necessary to clarify an induction of susceptibility to ESC carcinogenesis.

研究分野：腫瘍外科学

キーワード：食道 扁平上皮がん 発がん 代謝酵素 ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食道がんの90%を占める扁平上皮がん (esophageal squamous cell carcinoma: ESCC) は本邦を含むアジア・アフリカ諸国で罹患者の多い病型で、集学的治療の取組みにも拘わらず健康被害をきたす疾患である¹⁻³⁾。その発がん要因は飲酒、喫煙など環境要因と aldehyde dehydrogenase (ALDH) 2 の遺伝子多型⁴⁾など内因子があげられ、系統的大規模ゲノム解析が進められている現在⁵⁻⁹⁾も発がんメカニズムは明らかではない。従来の ESCC を含む食道発がんモデル開発は、発がん病態研究や診断、治療、予防法開発に十分に応えうる段階には至っていない¹⁰⁾。

食道扁平上皮発がん初期段階の代謝変化として細胞内のグリコーゲン減少、消失が特徴的であり、狭帯域光拡大内視鏡検査 (narrow band imaging) の導入まではヨウ素染色が前がん病変のスクリーニングや早期がん診断に活かされてきた¹⁻³⁾。また、Warburg 効果などの糖・エネルギー代謝異常はがん化の初期特性である¹¹⁻¹³⁾。

2. 研究の目的

本研究は、グリコーゲン合成系が解糖系に抗する細胞がん化のバリアであるとの発想に基づいて、グリコーゲン合成系代謝酵素のゲノム編集による扁平上皮の自然発がん易誘発状態モデルの創出を試みる。(1) ヒト正常食道扁平上皮細胞と(2) C57BL/6 マウスを対象に、CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated proteins 9)¹⁴⁾などのゲノム編集技法によりグリコーゲン合成酵素 (GS) 欠失や GS を抑制する GS キナーゼ 3β (GSK3β) の恒常的活性化型変異 GSK3β^{S9F}を導入し、細胞の糖代謝特性と前がん性形質変化、食道粘膜上皮の異形成 (dysplasia) や発がん変化を観察する。また、(3) ESCC 細胞株と(4) 患者がん組織を対象に、GS や GSK3β の発現と活性、グリコーゲン含量や糖代謝特性を正常細胞や組織と比較解析する。これにより、発がん剤なしにヒトがん化過程を外挿する ESCC モデル開発に資する易発がん状態の細胞・マウスモデル創出に挑戦する。そして、ドライバー遺伝子変異とともに細胞内グリコーゲン低下が扁平上皮発がんに重要であることを明らかにする。本研究は食道と頭頸部扁平上皮がんの連鎖に代表されるフィールドがん化と、組織細胞の分化や発がん研究に新たな視点を提供すると期待される。

3. 研究の方法

(1) 正常ヒト食道扁平上皮細胞の GS 欠失や GSK3β 恒常的活性化による細胞形質変化の解析

食道がん切除検体の非がん部粘膜からディスペラーゼとトリプシン処理により扁平上皮細胞初代培養 TYNEK-3 細胞を調整した¹⁵⁾。ついで、GS のエクソン部位に対してガイド RNA (gRNA) を設計し、Cas9 発現プラスミドとともに形質移入することにより CRISPR-Cas9 システムで正常細胞のゲノム上にある GS を欠失させた。また、この細胞に GSK3β の第 9 セリンをフェニルアラニンに置換した恒常的活性化型 GSK3β^{S9F} を遺伝子導入し、細胞分裂や増殖能の変化を検討した。

(2) マウス食道粘膜の GS 欠失による細胞分化や前がん性変化の解析

GS 欠損マウスは産後すぐ死亡する¹⁶⁾ので、C57BL/6 マウスを対象に GS-loxP マウスを作製後、K5-Cre マウス¹⁷⁾と交配し扁平上皮特異的に GS を欠損させた (図1)。その1年、1.5年と2年後に食道粘膜層のヨード染色性と組織学的に扁平上皮層の分化異常や異形成 (dysplasia) など発がん素地となるような形態変化の検索に備えて、対照個体と GS 欠損マウスの通常飼育による経過観察を続けた。

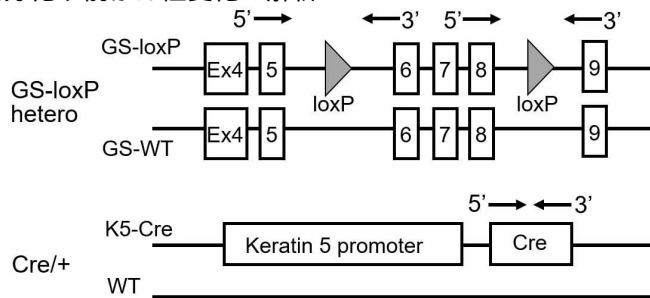


図1. 遺伝子改変マウス作出のための組換え遺伝子のデザインと、遺伝子型解析のためのプライマー設定。

(3) 正常扁平上皮細胞と ESCC 細胞におけるグリコーゲン・糖代謝の比較解析

正常細胞 TYNEK-3 と ESCC 細胞株 (TE-5、TE-8、TE-10) を対象に、グリコーゲン量、GS 発現、GSK3β による活性抑制性第 641 セリン (S) リン酸化 (pGS^{S641})、GSK3β 発現、その活性化型リン酸化 (pGSK3β^{Y216}) を比較解析した。

(4) 食道がん組織検体におけるグリコーゲン代謝酵素の比較解析

食道の表在早期がんと進行がんの手術検体 46 例を集積し、細胞や動物モデルの解析結果をこれらの組織検体を用いて検証した。

4. 研究成果

(1) 正常ヒト食道扁平上皮細胞の GS 欠失や GSK3β 恒常的活性化による細胞形質変化の解析

CRISPR-Cas9 システムで GS を欠失させるためのガイド RNA を設計し、プラスミドを構築した。また、GSK3β の第 9 セリンをフェニルアラニンに置換した恒常的活性化型 GSK3β^{S9F} の発現プラスミドを構築した。これらのプラスミドをそれぞれ、食道がん切除検体の非がん部から樹立した扁平上皮初代培養細胞 TYNEK-3 に導入した。遺伝子導入した TYNEK-3 細胞を通常培養で継代を続け、がん化 (不死化) するクローンの樹立を試みた。しかし、GS 欠失あるいは GSK3β^{S9F} の導入によっても正常細胞の分裂

回数を越えるクローンを得ることはできなかった。現在、TYNEK-3 とは別の患者由来の初代培養細胞 (TYNEK-5) を用いて GS 欠失と GSK3 β ^{S9F} の導入による影響を再度、検証中である。

(2) マウス食道粘膜の GS 欠失による細胞分化や前がん性変化の解析

C57BL/6 マウスの扁平上皮特異的に GS を欠失させるため、K5 promoter-Cre 発現マウスと GS-loxP ヘテロマウスをそれぞれ作出し、遺伝子型を確認した。これらのマウスの交配から、GS ホモ欠損マウス (GS-loxP ホモ/Cre) と対照マウス (GS-loxP ホモ/野生型) を作出し、それぞれの遺伝子型を確認した (図2)。現在、解析に必要な群の拡大とともに、食道扁平上皮細胞における蛋白質レベルの GS 欠損を免疫組織化学染色により確認する作業に着手した。

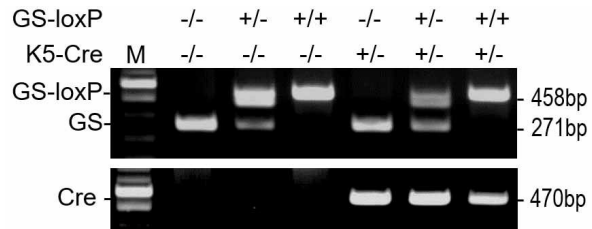


図2. 遺伝子改変マウスの遺伝子型解析結果。第6レーンはGSホモ欠失マウスで、第3レーンはその対照マウス。M: DNAサイズマーカー

(3) 正常扁平上皮細胞と ESCC 細胞におけるグリコーゲン・糖代謝の比較解析

正常 TYNEK-3 細胞に比べて、ESCC 細胞株 (TE-5、TE-8、TE-10) の細胞内グリコーゲン量は有意に低かった。これらの細胞で GS の発現は同等であったが、ESCC 細胞株では GSK3 β の発現、その活性型リン酸化 (pGSK3 β ^{Y216}) と、GSK3 β による GS の活性抑制性リン酸化 (pGS^{S641}) レベルは亢進していた。これらの結果より、ESCC 細胞ではグリコーゲン合成系に比べて解糖経路が優位であることが示唆された。

(4) 食道がん組織検体におけるグリコーゲン代謝酵素の比較解析

食道がん切除検体のがん組織と非がん部扁平上皮粘膜を免疫組織化学染色により比較観察した。その結果、がん組織では GSK3 β 発現、pGSK3 β ^{Y216} と pGS^{S641} レベルが正常粘膜に比べて高く、上記の細胞解析結果と同様の所見であった。このことから、解糖系優位の糖代謝は食道扁平上皮発がんとその進行を促進することが示唆された。

< 引用文献 >

- 1) Rustgi AK, El-Serag HB. Esophageal carcinoma. *N Engl J Med.* 2014;371:2499-509.
- 2) Ohashi S, Miyamoto S, Kikuchi O, Goto T, Amanuma Y, Muto M. Recent advances from basic and clinical studies of esophageal squamous cell carcinoma. *Gastroenterology* 2015;149:1700-15.
- 3) Lagergren J, Smyth E, Cunningham D, Lagergren P. Oesophageal cancer. *Lancet* 2017;390:2383-96.
- 4) Mizumoto A, Ohashi S, Hirohashi K, Amanuma Y, Matsuda T, Muto M. Molecular mechanisms of acetaldehyde-mediated carcinogenesis in squamous epithelium. *Int J Mol Sci* 2017;18:pii E1943.
- 5) Song YM, Li L, Ou YW, Gao ZB, Li EM, Chun X, Zhang WM, Wang JQ, Xu LY, Zhou Y, Ma XJ, Liu LY, Zhao ZT, Huang XL, Fan J, Dong LJ, Chen G, Ma LY, Yang J, Chen LY, He MH, Li M, Zhuang XH, Huang K, Qiu KL, Yin GL, Guo GW, Feng Q, Chen PS, Wu ZY, Wu JY, Ma L, Zhao JY, Luo LH, Fu M, Xu BN, Chen B, Li YR, Tong T, Wang MR, Liu ZH, Lin DX, Zhang XQ, Yang HM, Wang J, Zhan QM. Identification of genomic alterations in oesophageal squamous cell cancer. *Nature* 2014;509:91-5.
- 6) Hao JJ, Lin DC, Dinh HQ, Mayakonda A, Jiang YY, Chang C, Jiang Y, Lu CC, Shi ZZ, Xu X, Zhang Y, Cai Y, Wang JW, Zhan QM, Wei WQ, Berman BP, Wang MR, Koeffler HP. Spatial intratumoral heterogeneity and temporal clonal evolution in esophageal squamous cell carcinoma. *Nat Genet* 2014;46:467-73.
- 7) Gao YB, Chen ZL, Li JG, Hu XD, Shi XJ, Sun ZM, Zhang F, Zhao ZR, Li ZT, Liu ZY, Zhao YD, Sun J, Zhou CC, Yao R, Wang SY, Wang P, Sun N, Zhang BH, Dong JS, Yu Y, Luo M, Feng XL, Shi SS, Zhou F, Tan FW, Qiu B, Li N, Shao K, Zhang LJ, Zhang LJ, Xue Q, Gao SG, He J. Genetic landscape of esophageal squamous cell carcinoma. *Nat Genet* 2014;46:1097-102.
- 8) Hu N, Kadota M, Liu H, Abnet CC, Su H, Wu H, Freedman ND, Yang HH, Wang C, Yan C, Wang L, Gere S, Hutchinson A, Song G, Wang Y, Ding T, Qiao YL, Koshiol J, Dawsey SM, Giffen C, Goldstein AM, Taylor PR, Le MP. Genomic landscape of somatic alterations in esophageal squamous cell carcinoma and gastric cancer. *Cancer Res* 2016;76:1714-23.
- 9) Sawada G, Niida A, Uchi R, Hirata H, Shimamura T, Suzuki Y, Shiraishi Y, Chiba K, Imoto S, Takahashi Y, Iwaya T, Sudo T, Hayashi T, Takai H, Kawasaki Y, Matsukawa T, Eguchi H, Sugimachi K, Tanaka F, Suzuki H, Yamamoto K, Ishii H, Shimizu M, Yamazaki H, Yamazaki M, Tachimori Y, Kajiyama Y, Natsugoe S, Fujita H, Mafune K, Tanaka Y, Kelsell DP, Scott CA, Tsuji S, Yachida S, Shibata T, Sugano S, Doki Y, Akiyama T, Aburatani H, Ogawa S, Miyano S, Mori M, Mimori K. Genomic landscape of esophageal squamous cell carcinoma in a Japanese population. *Gastroenterology* 2016;150:1171-82.
- 10) Tétreault MP. Esophageal cancer: insights from mouse models. *Cancer Growth Metastasis* 2015;8:

37-46.

- 11) Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009;324:1029-33.
- 12) Ferreira LMR, Hebrant A, Dumont JE. Metabolic reprogramming of the tumor. *Oncogene* 2012;31:3999-4011.
- 13) Cantor JR, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer Discov* 2012;2:881-98.
- 14) Sánchez-Rivera FJ, Jacks T. Applications of the CRISPR-Cas9 system in cancer biology. *Nat Rev Cancer* 2015;15:387-95.
- 15) Okumura T, Shimada Y, Imamura M, Yasumoto S. Neurotrophin receptor p75(NTR) characterizes human esophageal keratinocyte stem cells in vitro. *Oncogene* 2003;22:4017-26.
- 16) Pederson BA, Chen H, Schroeder JM, Shou W, DePaoli-Roach AA, Roach PJ. Abnormal cardiac development in the absence of heart glycogen. *Mol Cell Biol* 2004;24:7179-87.
- 17) Tarutani M, Itami S, Okabe M, Ikawa M, Tezuka T, Yoshikawa K, Kinoshita T, Takeda J. Tissue-specific knockout of the mouse *Pig-a* gene reveals important roles for GPI-anchored proteins in skin development *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:7400-5.

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Abe Kensaku, Yamamoto Norio, Domoto Takahiro, Bolidong Dilireba, Hayashi Katsuhiko, Takeuchi Akihiko, Miwa Shinji, Igarashi Kentaro, Inatani Hiroyuki, Aoki Yu, Higuchi Takashi, Taniguchi Yuta, Yonezawa Hirotsuka, Araki Yoshihiro, Aiba Hisaki, Minamoto Toshinari, Tsuchiya Hiroyuki	4. 巻 111
2. 論文標題 Glycogen synthase kinase 3 as a potential therapeutic target in synovial sarcoma and fibrosarcoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 429 ~ 440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14271	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitabayashi Tomohiro, Dong Yu, Furuta Takuya, Sabit Hemragul, Jiapaer Shabierjiang, Zhang Jiakang, Zhang Guangtao, Hayashi Yasuhiko, Kobayashi Masahiko, Domoto Takahiro, Minamoto Toshinari, Hirao Atsushi, Nakada Mitsutoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of GSK3 inhibitor kenpaullone as a temozolomide enhancer against glioblastoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46454-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Dewi FRP, et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 Colorectal cancer cells require glycogen synthase kinase-3 for sustaining mitosis via translocated promotor region (Tpr)-dynein interaction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 13337-13352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.24344	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 堂本貴寛, 宮下知治, 竹中 哲, 上原将大, 太田哲夫, 源 利成.
2. 発表標題 GSK3 は膵がんの幹細胞性, 浸潤能, 薬剤耐性獲得にそれぞれ関連する.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 ディリラバ ポリドン, 堂本貴寛, 上原将大, 奥村智之, 遠藤良夫, イリア ピコ, 宮下知治, 中田光俊, 源 利成.
2. 発表標題 食道扁平上皮がんのGSK3 阻害は細胞周期停止とアポトーシスを誘導する.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上原将大, 堂本貴寛, 竹中 哲, ディリラバ ポリドン, ピコ イリア, 島崎猛夫, 宮下知治, 太田哲生, 源 利成.
2. 発表標題 膵がんのゲムシタピン獲得耐性はglycogen synthase kinase (GSK)-3 に依存する.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堂本貴寛, 竹中 哲, 宮下知治, 上原将大, 太田哲生, 源 利成.
2. 発表標題 膵がん細胞のゲムシタピン耐性化においてGSK3 は幹細胞性と浸潤能を増強する.
3. 学会等名 第28回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堂本貴寛, 竹中 哲, 宮下知治, 上原将大, 竹内 修, 太田哲生, 源 利成.
2. 発表標題 膵がん細胞の薬剤耐性化に伴うがん悪性形質とGSK3 の病理作用.
3. 学会等名 第28回日本癌病態治療研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	Kensaku Abe, Norio Yamamoto, Takahiro Domoto, Katsuhiko Hayashi, Akihiko Takeuchi, Shinji Miwa, Kentaro Igarashi, Takashi Higuchi, Yuta Taniguchi, Hiroataka Yonezawa, Yoshihiro Araki, Toshinari Minamoto, Hiroyuki Tsuchiya.
2. 発表標題	Glycogen synthase kinase-3 is a new therapeutic target in soft tissue sarcoma: a basic research.
3. 学会等名	American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS) Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	堂本貴寛, 源 利成.
2. 発表標題	GSK3 は大腸がんの腫瘍促進的エネルギー代謝を推進する.
3. 学会等名	第29回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	宮下知治, 源 利成, 太田哲生
2. 発表標題	バレット食道から発癌過程での微小環境の変化とGSK3 阻害による抑制
3. 学会等名	第104回日本消化器病学会総会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Miyashita T, Minamoto T, et al.
2. 発表標題	Inhibitor of GSK3 impedes the development of reflux-induced esophageal cancer in a surgical rat model
3. 学会等名	Digestive Disease Week (DDW) 2018 (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名 堂本貴寛, ほか
2. 発表標題 GSK3 は大腸がんのがん原性オートファジーを促進する
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大黒 多希子 (DAIKOKU Takiko) (30767249)	金沢大学・学際科学実験センター・教授 (13301)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	堂本 貴寛 (DOMOTO Takahiro)		
連携研究者	奥村 知之 (OKUMURA Tomoyuki) (10533523)	富山大学・附属病院・講師 (13201)	
連携研究者	曾我 朋義 (SOGA Tomoyoshi) (60338217)	慶応義塾大学・環境情報学部・教授 (32612)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	宮下 知治 (MIYASHITA Tomoharu) (30397210)	金沢大学・附属病院・助教 (13301)	
連携研究者	澤田 武 (SAWADA Takeshi) (60345626)	金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任准教授 (13301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関