

令和元年6月26日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06844

研究課題名(和文)放射線治療耐性食道癌に対するSOCS1遺伝子治療の有用性

研究課題名(英文)Suppressor of cytokine signaling-1 gene therapy improves radiosensitivity in esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

朴 正勝 (Pak, jongsung)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80804468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌におけるSTAT3の活性化と放射線治療抵抗性の関連についての評価、及び、放射線治療とSOCS1遺伝子治療の併用による治療効果について検討を行った。その結果、食道癌においてSTAT3の活性化が放射線治療の抵抗性と関連があり、STAT3を標的とした治療として、SOCS1のウイルスを用いた遺伝子治療が相加効果を示すことを示した。

また、アデノウイルス受容体(CAR)の発現レベルについて、切除検体を用いてその発現を評価し、放射線や化学療法後の食道癌患者に対する治療適応についての検討を行った。特にSTAT3-Mcl-1 axisへのSOCS1治療が放射線治療のDNA損傷を増幅示唆する結果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治癌である食道癌に対する放射線治療耐性のメカニズムの解明ならびにその克服についての研究を行った。本研究成果は、食道癌放射線治療の併用療法の可能性を示唆するものであり、今後の臨床応用が期待される結果である。現在SOCS-1アデノウイルスベクターによる遺伝子治療は、ヒトへの臨床応用化に向けて治験準備中であり、実臨床につながる成果と考える。

研究成果の概要(英文)：Recent reports show that signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) plays a prominent role in mediating irradiation (IR)-resistance in various cancers. We firstly investigated the association between STAT3 and IR-resistance in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). Strong expression of p-STAT3 were significantly observed in ESCC patients with preoperative CRT, and their prognosis was significantly poor. Also, the expression of p-STAT3 and anti-apoptotic protein, such as Mcl-1 and survivin was strongly induced after IR. Moreover, ESCC cells with stably STAT3 high expression acquired resistance to IR compared to parent and mock cell. Next, we investigated whether SOCS1 gene therapy using adenovirus (AdSOCS1) improves radiosensitivity in ESCC. Combination radiotherapy with AdSOCS1 showed better growth inhibitory effect and reduced colony forming ability compared to each monotherapy.

研究分野：消化器外科

キーワード：食道がん SOCS1 放射線治療 治療耐性

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

1. 研究開始当初の背景

一つであり、将来的にも、罹患率や死亡数も増加すると予想されている。治療法としては外科治療、放射線治療、化学療法を組み合わせた集学的治療が行われる。特に、外科切除不能局所進行食道癌に対しては、食道癌治療ガイドラインでは放射線化学療法が推奨されているものの、治療後の局所遺残・再発例を少なからず認め、その克服が臨床課題となっている。局所遺残・再発例に対するサルベージ治療として、外科治療は手術関連有害事象や死亡率が高く、また内視鏡的治療の治療効果に関しても十分な評価はなされておらず、有効かつ安全な治療法の確立が求められている。そのため、放射線治療の効果を向上させる併用薬や、局所遺残・再発例といった放射線耐性食道癌に対する新たなサルベージ治療としての新規治療薬の開発が期待されている。

2. 研究の目的

進行食道癌に対する集学的治療は、近年確立されてきつつある一方でその治療成績は未だ満足の出来るものではない。特に、局所進行食道癌に対する放射線治療の抵抗性は、臨床の現場において大きな課題の一つとなっている。近年、放射線治療抵抗性と STAT3 の活性化との関連が多数報告され、着目されている。我々は JAK/STAT シグナルの negative regulator である Suppressor of Cytokine Signaling(以下 SOCS)を細胞内で過剰発現させることで、食道癌を含む多くの癌種に対する抗腫瘍効果を過去報告してきた。本研究では放射線治療抵抗性食道癌における STAT3 の活性化との関連を明らかにし、さらには放射線治療抵抗性食道癌における SOCS 遺伝子を用いた新規遺伝子治療の有効性について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、食道癌での STAT3 の活性化と放射線治療抵抗性との関連を評価し、SOCS1 遺伝子治療の有用性を検討することを目的とし、主に以下の3点について研究を実施した。1つ目は、食道癌放射線治療による STAT3 の活性化と治療抵抗性の関連、及び、STAT3 の活性化変化を *in vitro* 及び臨床検体を用いて評価する。2つ目は、食道癌に対する放射線治療耐性食道癌に対する SOCS1 遺伝子治療の有効性、及び、併用療法の有効性について *in vitro* 及び *in vivo* で検討を行った。3つ目は、アデノウイルスを用いた遺伝子治療で重要なアデノウイルス受容体 (CAR)の発現を、食道癌の切除検体を用いてその発現強度の評価を行い、また、食道癌皮下移植モデルを用いて放射線照射後の経時的变化についても検討を行った。

4. 研究成果

過去に他の固形癌で報告されているように食道癌患者の予後不良因子である STAT3 の活性化が、食道癌を含む多くの固形癌において根治的外科的切除と組み合わせられる標準的治療法である CRT に対する治療抵抗性を改善させる標的分子として有望な候補であることが最近の多くの研究によって明らかになってきた。STAT3 の活性化は、アポトーシス遺伝子の抑制及び細胞増殖遺伝子の誘導を促進し、DNA 修復遺伝子にも作用するといった様々な(病態)生理的細胞プロセスを制御する多様な機能を有しているために、STAT3 が CRT に対する耐性因子として重要な役割を果たすことを示す様々な報告が記載されている。

今回の食道癌患者の切除検体を用いた検討では、CRT 後の食道癌患者では未治療の食道癌患者と比較して CRT の耐性因子と考えられている p-STAT3 の強発現症例が有意に増加していた。以上のことから、STAT3 の活性化をターゲットとした治療を放射線治療と併用することによって、CRT 抵抗性を改善し、より良好な治療効果を得る可能性が期待される。

さらに、我々は非増殖型アデノウイルスを用いて JAK/STAT signaling の negative regulator である SOCS1 を細胞内で過剰発現させることで良好な抗腫瘍効果を得ることを報告し、食道癌においても PDX model mice において良好な抗腫瘍効果を得たことを前臨床的に報告してきた。また、SOCS1 遺伝子治療の増殖抑制メカニズムの一つとして、pSTAT3 阻害によって Mcl-1 などの anti-apoptosis protein が抑制されることを報告してきた。Mcl-1 は BCL-2 ファミリーの一つであり pro-apoptosis protein を阻害することによって apoptosis を調整している。近年、Mcl-1 阻害剤が単剤および他の抗がん剤との併用によって固形腫瘍に対して良好な抗腫瘍効果を示すことが報告されている。他の固形癌での我々の報告と同様に、食道癌においても SOCS1 の過剰発現による pSTAT3 の阻害によって、Mcl-1 や survivin といった anti-apoptosis protein の発現が著明に阻害されていることを明らかにした。また本研究では、食道癌細胞株に対して siRNA を用いて Mcl-1 を阻害することで強くアポトーシスが誘導されることを明らかにし、SOCS1 遺伝子治療が STAT3-Mcl-1 axis を阻害することで良好な抗腫瘍効果を得ることを明らかにした。一方、食道癌細胞株に対して放射線照射を行うと、STAT3 の活性化だけでなく Mcl-1 や survivin といった anti-apoptosis protein の発現が強く誘導され、SOCS1 遺伝子治療と比較してアポトーシスへの誘導はほとんど認めなかった。我々は、そのことが放射線治療抵抗性及び治療後の再増殖に関与している可能性があると考えた。よって、それらを阻害する SOCS1 遺伝子治療を併用した放射線治療は、放射線照射による anti-apoptosis protein の発現誘導を抑制することで放射線治療抵抗性を改善し、放射線治療に対して上乘せの抗腫瘍効果を得ていたと考えられる。

そのメカニズムとして、STAT3 阻害による放射線感受性が向上したという過去の報告では、

様々な機序が報告されているが、今回我々は前述した anti-apoptosis の阻害効果だけでなく、DNA 損傷との関連に着目した。STAT3 は放射線照射後の DNA 修復機能に関連するとされる [Barry SP] [Han TJ]。また、STAT3 の活性化を阻害することで放射線照射による DNA 修復能を低下させ、放射線感受性を向上させると報告されている。本研究では、STAT3 の活性化を良好に阻害する SOCS1 遺伝子治療を併用することによって、放射線照射後の DNA 損傷として double-strand break の指標とされる γ -H2AX の発現が放射線照射後に in vitro および in vivo で増強していた。また、我々は SOCS1 遺伝子治療の増殖抑制メカニズムの一つである STAT3-Mcl-1 axis に着目し、Mcl-1 と DNA 損傷との関連についても検討した。近年、MCL-1 depletion increases 53BP1 and RIF1 colocalization at DSBs, which inhibits BRCA1 recruitment, and sensitizes cells to DSBs from IR or stalled replication forks that require HR for repair と報告されており、Mcl-1 と DNA 修復との関連が報告されている。今回の検討では、STAT3 の活性化を強制発現させた細胞株では放射線照射後の Mcl-1 の発現も強くなり、DSB も軽度であったのに対して、Mcl-1 が阻害された細胞では DSB が強く遷延していた。以上のメカニズムによって、SOCS1 遺伝子治療併用放射線治療は、放射線照射による DNA 損傷を増強させる可能性もあると考える。

今後の臨床応用を考えると、食道癌における現在の放射線治療の臨床的問題点として以下のことが考えられている。一つ目に、放射線治療による他臓器への影響である。現在、放射線治療は正常臓器への影響を最小限にするために様々な工夫がなされているが、食道癌においては食道正常組織や周囲臓器が照射されることによる合併症が問題となっている。今回我々が用いた AdSOCS1 は、食道癌に対して内視鏡的に局所注射することによって腫瘍特異的な投与が容易に可能である。そのため SOCS1 が発現した領域 (=癌部) は、SOCS1 が発現していない領域 (=正常組織) と比べて放射線治療の感受性が向上することが期待される。よって、放射線治療の腫瘍特異性をより向上させ、そのことが癌部に対する治療効果を向上させるだけでなく、放射線照射量の減少につながる可能性があるかもしれない。二つ目の問題点として、放射線治療後の再増殖である。現在は放射線治療の効果を向上させるために化学療法を併用しているが、治療後の再増殖及び局所再発は臨床的に散見される。今回のマウスモデルでの検討において、放射線照射のみでは治療終了後に腫瘍の再増殖を認めていた。しかし、SOCS1 遺伝子治療併用放射線治療法は、STAT3-Mcl-1 axis を阻害することによって、放射線治療抵抗性を改善し良好な抗腫瘍効果を示したのに加えて、治療後の再増殖も認めなかった。それゆえ、SOCS1 遺伝子治療は放射線治療の臨床的な問題点を改善する可能性もあると考える。

本研究では、我々が過去に報告した STAT3 の活性化を主なターゲットとすることで良好な抗腫瘍効果を示すアデノウイルスを用いた SOCS1 遺伝子治療を併用することによって、放射線治療の治療効果が増強されることを in vitro 及び in vivo で証明した。そのメカニズムとして、SOCS1 の発現によって STAT3-Mcl-1 axis を阻害することで、放射線治療抵抗性を改善し、より強力にアポトーシスが誘導されるとともに、放射線治療による DNA 損傷を増強していた。臨床的にも CRT 後食道癌患者では STAT3 の活性化が誘導されており、SOCS1 遺伝子治療を併用した放射線治療は新たな食道癌治療の一つとなることが期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

SOCS1 Gene Therapy Improves Radiosensitivity and Enhances Irradiation-Induced DNA Damage in Esophageal Squamous Cell Carcinoma.
Cancer Res. 2017 Dec 15;77(24):6975-6986. (査読有り)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。