

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09100

研究課題名(和文) GSK3 を基軸とした食道発癌機構の解明と新規治療戦略の開発

研究課題名(英文) Inhibitor of GSK3beta impedes the development of reflux-induced esophageal cancer

研究代表者

宮下 知治 (Miyashita, Tomoharu)

金沢大学・がん進展制御研究所・研究協力員

研究者番号：30397210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、GSK3 阻害による悪性形質と微小環境両面の制御に重点を置いた新規治療法の可能性を検討とした。十二指腸胃食道逆流ラットモデルを作成し、40週目に屠殺して食道の病変を観察した。コントロール群における腺癌の発癌率は67%であったのに対し、GSK3 阻害剤投与群には腺癌は認められず、発癌が有意に低率であった($p=0.0001$)。またM2型マクロファージの浸潤は癌部およびBarrett上皮部においてGSK3 阻害剤投与群では有意に低率であった($p=0.05$)。以上の結果より、GSK3 阻害剤は慢性持続性食道炎による食道発癌を抑制するとともに、免疫抑制性微小環境を改変する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

欧米諸国ではBarrett食道と食道腺癌が急増し、健康被害の要因となっている。食道扁平上皮癌が依然として多い本邦でも近い将来、腺癌が食道癌の主体となることが危惧され、その早期診断、治療、予防に向けて発癌の仕組みや病態の解明が急がれる。本研究の成果から、胃・十二指腸液逆流による食道の慢性持続性炎症によりGSK3 を介してSTAT3がリン酸化され、それが上皮細胞の形質転換と悪性形質獲得、および免疫抑制性癌微小環境の形成に帰結することが確認された。したがって、GSK3 阻害は癌細胞の悪性形質獲得と免疫抑制性癌微小環境、双方の制御に基づく食道腺癌の効果的な治療戦略の一つになり得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We propose to utilize a GSK3 inhibitor as a chemopreventive agent in a surgical rat reflux model of esophageal carcinogenesis. The rat reflux model was created by performing an end-to-side esophagojejunostomy in Sprague Dawley rats. Beginning four weeks post surgery, all animals were administered either 5mg/kg body weight injections of GSK3 inhibitor or equivalent injections of DMSO 3 days per week into the subcutaneous tissue of the back. Animals were sacrificed 40 weeks after surgery and their esophagi were examined. 12 were included in the control group, and the remaining 11 received GSK3 inhibitor administration. 67% of the controls developed esophageal cancer, but animals that received the GSK3 inhibitor did not develop cancer ($p=0.0001$). GSK3 inhibitor protected against the development of esophageal cancer in a clinically relevant surgical reflux model.

研究分野：消化器外科

キーワード：食道発癌 逆流性食道炎 GSK3 がん悪性形質 がん微小環境 STAT3

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、慢性炎症依存的発癌機構が明らかにされつつある。

(2) 効果的な癌治療を行うには慢性炎症が誘導する2つの要因すなわち、(1) 多段階的な遺伝子変異・発現異常を伴うがん細胞の悪性形質と、(2) がん細胞の生存を助長するがん微小環境の制御が重要である。

(3) 多段階発癌過程におけるがん関連遺伝子の異常とエピジェネティック変化による遺伝情報システム異常を探索することは、発癌初期の“がん細胞の悪性形質獲得”のメカニズム解明に重要である。

(4) 遺伝情報異常により癌細胞が発生しても、多くは宿主の免疫機構により認識、排除される。そのため癌の発生と増殖には宿主免疫機構を回避する“免疫抑制性がん微小環境の形成”が必要である。

(5) 申請者らはラットを用いて発癌剤を投与せずに逆流性食道炎からバレット食道腺癌に至る自然発癌動物モデルを開発し、遺伝子発現の改変を行わず、手術後約40週で癌が発生することを報告してきた。

(6) このモデルの特徴は、ヒトでも生理的に起こり得る胃液や十二指腸液の食道への逆流による病態を外挿することと、組織学的に腺癌が発生する前に扁平上皮基底部に腺上皮化生が観察され、ヒトの Inflammation-Metaplasia-Adenocarcinoma (IMA) 経路を再現していることである。

(7) この発癌モデルが外挿する逆流性食道炎を含め、持続性慢性炎症病巣で誘導される interleukin-6 (IL-6) /STAT3 経路が発癌の誘因として注目されている。

(8) 発癌から腫瘍形成にかけて浸潤するマクロファージが M1 型から M2 (腫瘍随伴) 型優位になるが、この段階でも STAT3 の関与が示唆されている。さらにがん微小環境においては制御性 T 細胞 (Treg) も続いて誘導され、癌細胞の増殖を助長する免疫抑制性腫瘍環境が形成される。

(9) Glycogen synthase kinase (GSK) 3 β が STAT3 を活性化してがん細胞の生存や増殖を促進し、悪性形質の獲得とともに自然免疫担当細胞の不活化による微小環境の形成に関わることが示唆されている。

(10) 細胞の悪性形質獲得(癌化)と腫瘍免疫環境はともに炎症依存性癌の発生や病態に寄与することは明白でありながら、これまで別々の課題として研究が進められていることが問題であり、この両面からのアプローチが必要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では

(1) ヒト食道腺癌細胞株と、我々のラットモデルと同じ手法により自然発生した食道癌から樹立した腺癌細胞株を用いて STAT3 の発現と GSK3 β 阻害剤によるリン酸化 (pSTAT3) の抑制効果を検討する。

(2) 我々が開発した自然食道発癌モデルを用いて、発癌過程において組織内に浸潤した細胞のうち M2 型マクロファージを中心とした抑制性免疫細胞の浸潤度を解析する。さらに GSK3 β 阻害剤による食道発癌抑制効果と “がん微小環境” の変化を検討する。

3 . 研究の方法

(1) ヒト食道腺癌細胞株 (OE33、OE19) と我々のラットモデルと同じ手法により自然発生した食道癌から樹立した腺癌細胞株 (ESCC-DR、K14D) を使用し、GSK3 阻害剤 AR-A014418 による増殖活性と細胞毒性を MTT アッセイにて検討した。それぞれの細胞株における GSK3 阻害剤投与 72 時間後の IC50 値を同定し、増殖活性と細胞毒性の濃度を測定した。次にウエスタンブロッティングにて STAT3 および pSTAT3 の発現を検討し、さらにそれぞれの IC50 に基づいた GSK3 阻害剤の投与による抑制効果を検討した。

(2) モデルラットを標準飼料群と GSK3 β 阻害剤投与群とに分け、50 週後に屠殺後、食道を採取し GSK3 β 阻害剤投与による腫瘍抑制効果と抑制性免疫細胞の浸潤度を解析した。

4 . 研究成果

(1) 細胞株を用いた解析では

それぞれの細胞株における GSK3 β 阻害剤投与 72 時間後の IC50 値を同定した。

IC50 に基づいた GSK3 β 阻害剤の投与により OE19、ESCC-DR、K14D では pSTAT3 の発現が低下したが、OE33 では低下は認められなかった。

(2) ラットを用いた検討では

発癌率はコントロール群では 67%であったのに対し GSK3 β 阻害剤投与群では発癌は認められず、GSK3 β 阻害剤投与群では有意に低率であった。

バレット上皮の発生率はコントロール群 87%、GSK3 β 阻害剤投与群 27%で GSK3 β 阻害剤投与群では有意に低率であった。

扁平上皮過形成では両群間で差は認められなかった。

CD163免疫染色による食道への M2 マクロファージの浸潤度はバレット上皮部、扁平上皮過形成部ともに GSK3 β 阻害剤投与群ではコントロール群に比べて有意に低率であった。

以上の結果より、GSK3 阻害剤の投与は逆流により惹起される慢性持続性食道炎と食道発癌を抑制するとともに、pSTAT3 依存性免疫抑制性微小環境を改変する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 宮下知治、源 利成、高村博之	4. 巻 48
2. 論文標題 GSK3 を基軸とする食道発がん機構の解明と新規治療戦略の開発	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 461-463
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomoharu Miyashita, Toshinari Ninamoto, Hiroyuki Takamura
2. 発表標題 Inhibitor of GSK3 impedes the development of reflux-induced esophageal cancer
3. 学会等名 The Society of Surgical Oncology 2023（国際学会）
4. 発表年 2023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	太田 哲生 (Ohta Tetsuo) (40194170)	金沢大学・医学系・協力研究員 (13301)	
研究分担者	源 利成 (Minamoto Toshinari) (50239323)	金沢大学・がん進展制御研究所・教授 (13301)	
研究分担者	島崎 猛夫 (Takeo Shimazaki) (50377420)	金沢医科大学・総合医学研究所・准教授 (33303)	

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
---------	---------