

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09694

研究課題名(和文) 頭頸部扁平上皮癌におけるSOCS1新規遺伝子治療確立のための基礎研究

研究課題名(英文) An Experimental Study for SOCS1 Gene Therapy in Head and Neck Cancers treatments

研究代表者

小森 正博 (Komori, Masahiro)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・准教授

研究者番号：30565742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Suppressor of cytokine signaling (SOCS)1はJAK-STAT伝達経路を介して、細胞増殖や分化の抑制に関与する。我々は、中咽頭がん細胞Detroit-562と舌がん細胞SCC-9を用いて頭頸部扁平上皮がんにおけるSOCS1アデノウイルスベクターの効果について検討した。SCC-9において、AdSOCS1がJAK/STATシグナル経路とMEKシグナル経路を通して、細胞増殖抑制とアポトーシス促進へ作用していることが示唆された。Detroit-562においては、細胞増殖抑制とアポトーシス促進により抗腫瘍効果を示したが、その機序は明らかにできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1998年世界初の癌遺伝子治療がP53遺伝子をターゲットに行われた。P53の性質に合致して局所腫瘍は縮小したが、転移を制御できなかった。一方、アデノウイルスベクターの安全性も示された。SOCS1がブロックするSTAT3はシグナル伝達においてP53より末梢にあり、細胞増殖だけでなく、転移や血管新生、免疫にも関与すると報告される。故に、AdSOCS1の有効性をin vitro, in vivoで示すことは、将来のヒトに対する遺伝子治療による治療を行う上で重要な基礎データとなり、将来の癌治療の進歩に貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：SOCS 1 is an inhibitor of cytokine signaling play roles in regulating cell growth and differentiation. We used cell lines of oropharyngeal and tongue cancers (Detroit-562 and SCC-9) and a recombinant adenovirus vector expressing SOCS1 (AdSOCS1). AdSOCS1 decreased cell proliferation through G2/M phase cell cycle arrest and apoptosis. AdSOCS1 inhibited cell growth more strongly in SCC-9 cells than in Detroit-562 cells. JAK inhibitor I induced cell cycle arrest at the G0/G1 and G2/M phases in Detroit-562 and SCC-9 cells, respectively. AdSOCS1 also decreased the activity of pSTAT3 and p-p44/42 MAPK, as well as Bcl-xL. JAK inhibitor I decreased the expression of pSTAT3, but not p-p44/42 or Bcl-xL. The MEK inhibitor decreased the expression of Bcl-xL in SCC-9 cells, but not in Detroit-562 cells. AdSOCS1 treatment inhibited tumor growth in mouse xenograft models. In conclusion, The varying effectiveness among cancer cells may contribute to efficacy of SOCS 1 gene therapy.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：癌遺伝子治療

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

STAT3はDNA転写因子の一つで、細胞増殖、アポトーシス抑制、血管内皮細胞増殖因子の産生亢進、内因性・獲得性免疫の抑制、浸潤転移のための上皮間葉系転換と正常細胞が癌の特徴を獲得する上で鍵となる分子で、リン酸化によって活性化される(pSTAT3)(Cancers 2014;6:1986)。また、発癌シグナルにおいて、STAT3は変異型P53やEGFRより末梢にあり、進行例ではEGFRを抑制してもSTAT3は抑制されない。故に、pSTAT3が癌の治療標的となる遺伝子とされたが、今までは、このSTAT3を選択的に安全に抑制する方法はなかった。

SOCS; Suppressor of Cytokine SignalingはIL-6やIFN- $\gamma$ などの炎症性サイトカインのシグナルによって発現が誘導され、チロシンキナーゼの一つであるJAK分子と結合して、STAT3などのアダプター分子の結合を競合阻害し、サイトカインシグナル伝達を負に制御する(Naka et al. Nature 1997)。研究分担者の仲はSOCSを発見し、pSTAT3の抑制力が最も強いSOCS1を発現するアデノウイルスベクター(AdSOCS1)を開発した。そして、胃・肺・食道・皮膚癌、悪性胸膜中皮腫にて、STAT3の活性化が抑制されること、発症部位によって異なる腫瘍増殖抑制メカニズムが付加されること、食道癌細胞において放射線治療によって増加したpSTAT3がAdSOCS1にて抑制されること(Sugase et al. Int J Cancer. 2017)を報告した。しかし、頭頸部扁平上皮癌では、AdSOCS1の作用機序や治療効果は十分に検討されていない。

頭頸部扁平上皮癌の治療には、放射線療法、化学療法が広く用いられるが、5年生存率が40~60%と治療成績は十分とはいえない(N Engl J Med.2007;357:1705)。舌(Cancer Res 2002; 62:3351)・中咽頭(Oncotarget 2015;6:2654)・喉頭癌(Head Neck Pathol 2019;13: 304)の予後不良例にてpSTAT3が増加したとされる。また、放射線照射後の乳癌細胞(Sci Rep 2013;3:1675)、シスプラチン投与後の子宮癌・口腔扁平上皮癌細胞(Cancer Lett 2013; 341:231; Sci Rep 2014; 4:7461)にてpSTAT3が増加したと報告されており、pSTAT3の発現増強が治療抵抗性の一因になる可能性が示唆される。故に、治療成績の向上には、治療効果の予測と治療抵抗性への対応が課題になる。

### 2. 研究の目的

頭頸部扁平上皮癌は観察が比較的容易であり、局所に投与する遺伝子治療のよい適応とされている(J Clin Oncol 2009; 27: 799)。既存の治療にて十分な効果が望めない症例に対するAdSOCS1の遺伝子治療の可能性を検討することは、この遺伝子治療の臨床研究につながるために重要である。以上より、頭頸部扁平上皮癌において発生部位や進行度別にpSTAT3の発現度、放射線療法や化学療法後のpSTAT3の増強度合、それぞれの状態に対するAdSOCS1の治療効果と作用機序を発生部位、進行度別に明らかにする。

### 3. 研究の方法

Cell lines: 中咽頭癌由来にDetroit 562と舌癌由来のSCC-9を用いた。

Cell proliferation assay: 細胞を培養して安定させた後、AdSOCS1とコントロール・ベクターAdLacZをそれぞれ投与して、3~6日目に細胞増殖の差を検討する。

Caspase-3/7 activity assay: a Caspase Glo 3/7 Assay kitをもちいてアポトーシスについて検討した。

Cell cycle assay: Cycle Test Plus DNA Reagent kitsを用いた。

Western blotting: pSTAT, Mcl, Bcl-xL, Suevivin, p-p44/42 MAPK, GAPDH, SOCS1を用いた。

Mouse xenograft model.: 細胞を移植し、100mm<sup>3</sup>になったところで腫瘍にベクターを注入した。

合わせて体重も測定した。

#### 4 . 研究成果

Cell proliferation assay : 両細胞株とも AdSOCS1 の投与にて大幅に減少した。AdLacZ を導入した群では、ベクターの濃度を増やしても細胞増殖の抑制効果はありませんでした。JAK 阻害剤を投与した場合でも両細胞株で細胞増殖が抑制されました。Detroit-562 では SOCS 1 と同程度の下がり幅です。一方、SCC-9 では JAK 阻害剤よりも AdSOCS1 の方が強く抑制された。このことから AdSOCS1 は JAK 蛋白を抑制しているだけではない、プラス あることが示唆されました。

Caspase-3/7 activity assay : AdSOCS1 にて、濃度依存性に Caspase3/7 の活性が有意に上昇し、アポトーシスが生じていることが示された。

Cell cycle assay : 両細胞株とも AdSOCS1 により G2/M 期で細胞周期が停止していた。JAK 阻害剤を投与した場合、SCC-9 では G2/M 期で停止したが、Detroit-562 では G0/G1 期で停止した。

Western blotting : AdSOCS1, JAK 阻害剤にてリン酸化 STAT3 の発現が抑制された。しかし、アポトーシス蛋白の Bcl-xL は、AdSOCS1 で抑制されたが、JAK 阻害剤で抑制されず、AdSOCS1 のアポトーシス経路は JAK/STAT ではなかった。次に、AdSOCS1 と MEK 阻剤を用いると、SCC-9 において p44/22 と Bcl-xL が同じように抑制され、アポトーシスの経路として MEK シグナル伝達経路を同定した。

Mouse xenograft model : 両細胞株ともに、AdSOCS 1 によって腫瘍の増殖が有意に抑制された。また、体重の変化にコントロール群と有意差はなく、ウイルスベクターによる毒性はなかった。さらに、AdSOCS1 を投与した群の方でアポトーシスが陽性となっている細胞が多かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 KAJIYAMA TAIHEI, SERADA SATOSHI, FUJIMOTO MINORU, OHKAWARA TOMOHARU, KOMORI MASAHIRO, HYODO MASAMITSU, NAKA TETSUJI	4. 巻 42
2. 論文標題 SOCS1 Gene Therapy for Head and Neck Cancers: An Experimental Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 3361 ~ 3372
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15823.	査読の有無 有
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 0件）

1. 発表者名 Taihei Kajiyama, Masahiro Komori, Masamitsu Hyodo
2. 発表標題 SOCS1 Gene Therapy for Head and Neck Cancers: An Experimental Study
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会総会学術講演会
4. 発表年 2024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	兵頭 政光 (Hyodo Masamitsu) (00181123)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授  (16401)	
研究分担者	仲 哲治 (Naka Tetsuji) (30303936)	岩手医科大学・医学部・教授  (31201)	
研究分担者	世良田 聡 (Serada Satoshi) (50463302)	岩手医科大学・医歯薬総合研究所・准教授  (31201)	

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
研究 分 担 者	梶山 泰平  (Kajiyama Taihei)  (60807931)	高知大学・医学部附属病院・医員    (16401)	削除：2021年7月12日

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