

平成22年 3月25日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19591686

研究課題名（和文）髄芽腫におけるSOX4遺伝子の発現意義と治療への応用

研究課題名（英文）Expression of SOX4 gene and its roles in medulloblastoma

研究代表者

庄野 禎久（SHONO TADAHISA）

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：00346793

研究成果の概要（和文）：

脳腫瘍の手術標本を使って遺伝子解析した結果、Sox4遺伝子が髄芽腫において、他の脳腫瘍に比較して著明に発現が亢進していることを確認した。また脳腫瘍の培養細胞においても、髄芽腫細胞において、Sox4遺伝子が高発現していることを確認した。さらに悪性グリオーマの培養細胞にSox4遺伝子を導入することで、細胞増殖能が増加することを確認した。逆に、髄芽腫培養細胞にSox4遺伝子を導入しても、その細胞増殖能に変化はなかった。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the expression of Sox4 mRNA in various brain tumor samples obtained by surgical resection or tumor cell lines using real-time PCR analysis. We found that the expression levels of Sox4 mRNA in medulloblastomas are especially increased among these brain tumors. When we transfer Sox4 gene into malignant glioma cell lines, the cell growth was strongly enhanced. Conversely, when we transfer Sox4 gene into medulloblastoma cell lines, there was no significant change in cell growth.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、脳神経外科学

キーワード：Sox4／髄芽腫／グリオーマ／アポトーシス／神経分化

1. 研究開始当初の背景

Sry-related high mobility group (HMG) box 4 (Sox4)は、胎生期の脳、心臓、肺、胸腺などに発現が認められる転写制御因子である。Sox4の機能についての詳細は、現

在も解析途中であるが、その発現は胎生期の脳でも認められ、embryonic stem cell (ES cell)がneural stem cellに分化する際に発現が増加することが報告されている。近年Sox4の発現が白血病細胞や肝臓癌、膀

膀胱癌、大腸癌などでも認められることが報告され、これらの細胞では特に細胞のアポトーシスや増殖に関連した機能があることが解明されている。

脳腫瘍においては代表的な小児悪性脳腫瘍である髄芽腫 (medulloblastoma) で Sox4 の発現が認められるという報告がある。

2. 研究の目的

髄芽腫や神経膠腫などの脳腫瘍における Sox4 の遺伝子発現について詳細な検討を行う。また脳腫瘍培養細胞に Sox4 を遺伝子導入した際に認められる生物学的変化について検討し、脳腫瘍における Sox4 の機能について解析する。また mouse や chicken では Sox4 が神経系の発生・分化に関わっていることが報告されているが、human の脳の発生・分化に関する報告は今のところない。そこでヒト脳の発生・分化における Sox4 の役割についても検討を加える。

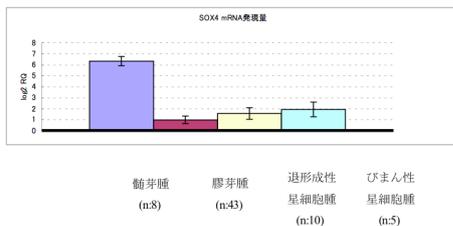
3. 研究の方法

髄芽腫や神経膠腫などの脳腫瘍における Sox4 の遺伝子発現について real time PCR 法を用いて検討した。さらに脳腫瘍培養細胞に Sox4 を遺伝子導入した際に認められる生物学的変化について検討し、Sox4 の脳腫瘍における機能について解析した。さらに墮胎されたヒト胎児 (胎生 7 週, 15 週, 18 週, 25 週) および成人脳のパラフィン切片で SOX4 の免疫染色を行い、human の脳の発生における SOX4 の発現パターンを検討した。

4. 研究成果

(1) 脳腫瘍における Sox4 mRNA の発現
手術中に採取された脳実質腫瘍の凍結標本 (髄芽腫; 8 例、膠芽腫; 43 例、退形成性星細胞腫; 10 例、びまん性星細胞腫; 5 例) から Total RNAeasy isolation kit (Qiagen, Germany) を用いて total RNA を抽出し、7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems, USA) を用いて Sox4 mRNA の発現を定量的に測定した。側頭葉てんかん症例で採取された正常脳組織の Sox4 mRNA の発現量をコントロール (RQ=1, Log₂ RQ=0) として、それぞれの脳腫瘍での Sox4 mRNA の発現量を比較した。

図 1

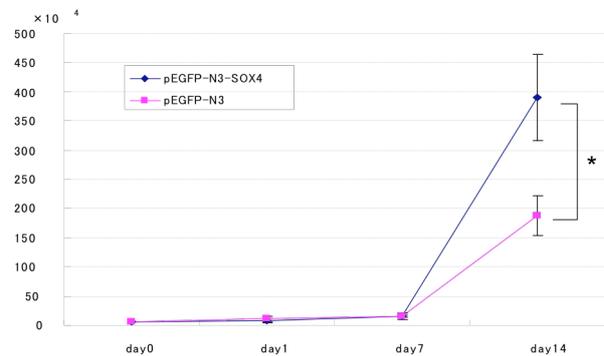


その結果、髄芽腫 8 例において Sox4 mRNA の発現は著明に増加しており、その発現量の平均は、正常脳の 2⁶ 倍、つまり 64 倍程度、過剰発現していることがわかった。その他の腫瘍では正常脳の 2¹ から 2²、つまり 2 倍から 4 倍程度の発現量であった。このことから Sox4 mRNA はこれらの脳腫瘍の中でも特に、髄芽腫において過剰発現しており、この腫瘍の発生や増殖に関与している可能性が示唆された。

(2) 培養脳腫瘍細胞における Sox4 mRNA 強制発現の生物学的効果

Sox4 遺伝子発現の生物学的意義を検討するため、wild-type Sox4 遺伝子を組み込んだ pEGFP-N3-Sox4 プラスミドを作成した。このプラスミドを Sox4 mRNA が低発現の悪性神経膠腫培養細胞株、U87 細胞に transfect し、Sox4 遺伝子を強制発現させた。その結果、細胞の形態に関しては、コントロールプラスミド (pEGFP-N3) を transfect した細胞と pEGFP-N3-Sox4 プラスミドを transfect した細胞に明らかな違いは認められなかった。しかしこれらの細胞で細胞増殖能を比較したところ、図 2 に示すように、Sox4 を過剰発現している細胞で有意に細胞増殖能が増強されている事が確認できた。

図 2



(3) ヒト発生期脳における SOX4 の発現パターンの免疫組織化学的検討

Human, rat とともに同様の SOX4 の発現パターンを示した。胎生期脳では SOX4 陽性細胞は脳室下帯を中心にみられた (図 3)。皮質では浅層の、より遅い時期に産生されたニューロンに発現が強かった。基底核部は胎生初期では SOX4 陽性細胞はみられなかったが、胎生中期には陽性細胞がみられた。胎児期には海馬にも SOX4 陽性細胞が見られた。小脳では外顆粒層に SOX4 陽性細胞がみられ、小脳の分化とともに内顆粒層にも陽性細胞がみられた。成人期にはいずれの部位でも SOX4 の発現が消失していた。このことから SOX4 は human の脳においても、ニューロンの分化に関与していることが示唆された。

図3 胎生期大脳における Sox4 の発現



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

1. Kameda K, Shono T, Hashiguchi K, Yoshida F, Sasaki T: Effect of tumor removal on tinnitus in patients with vestibular schwannoma. J Neurosurg. (査読有)112: 152-157, 2010.
2. Shono T, Mizoguchi M, Yoshimoto K, Amano T, Natori Y, and Sasaki T: Clinical course of abducens nerve palsy associated with skull base tumours. Acta Neurochir (Wien). (査読有)151: 733-738, 2009.
3. Sasaki T, Shono T, Hashiguchi K, Yoshida F, Suzuki SO: Histological considerations of the cleavage plane for preservation of facial and cochlear nerve functions in vestibular schwannoma surgery. J Neurosurg, (査読有)110: 648-655, 2009.
4. Kuga D, Mizoguchi M, Guan Y, Hata N, Yoshimoto K, Shono T, Suzuki SO, Kukita Y, Tahira T, Nagata S, Sasaki T, Hayashi K: Prevalence of copy number neutral LOH in glioblastomas revealed by genome-wide analysis of laser-microdissected tissues. Neuro-Oncol, (査読有) 10:995-1003, 2008.
5. Shono T, Yokoyama N, Uesaka T, Kuroda J, Takeya R, Yamasaki T, Amano T, Mizoguchi M, Suzuki SO, Niuro H, Miyamoto K, Akashi K, Iwaki T, Sumimoto H, Sasaki T: Enhanced expression of NADPH oxidase Nox4 in human gliomas and its roles in cell proliferation and survival. Int J Cancer, (査読有) 123: 787-792, 2008.
6. Guan Y, Hata N, Kuga D, Yoshimoto K, Mizoguchi M, Shono T, Suzuki SO, Tahira T, Kukita Y, Hisaga K, Yokoyama N, Nagata S, Iwaki T, Sasaki T, Hayashi K: Narrowing of the regions of allelic losses of chromosome 1p36 in meningioma tissues by an improved SSCP analysis. Int J Cancer, (査読有) 122: 1820-1826, 2008.
7. Uesaka T, Shono T, Kuga D, Suzuki SO, Niuro H, Miyamoto K, Matsumoto K, Mizoguchi M, Ohta M, Iwaki T, Sasaki T: Enhanced expression of DNA topoisomerase II genes in human medulloblastoma and its possible association with etoposide sensitivity. J Neurooncol (査読有) 84: 119-129, 2007.
8. Uesaka T, Shono T, Suzuki SO, Nakamizo A, Niuro H, Mizoguchi M, Iwaki T, Sasaki T: Expression of VEGF and its receptor genes in intracranial schwannomas. J Neurooncol (査読有) 83: 259-266, 2007.

[学会発表] (計3件)

1. Shono T 他: Enhanced expression of DNA topoisomerase II genes in human medulloblastoma and its possible association with etoposide sensitivity. The 17th International Conference on Brain Tumor Research & Therapy, 2008年6月12日, 函館市
2. Shono T 他: Enhanced expression of NADPH oxidase Nox4 in human gliomas and its roles in cell proliferation and survival. The 3rd Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology, 2009年5月14日, 横浜市

3. 庄野禎久 他：小児グリオーマ症例における MEP モニタリング下腫瘍摘出術とその長期成績，第 68 回日本脳神経外科学会総会，2009 年 10 月 15 日，東京都

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

庄野 禎久 (SHONO TADAHISA)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：00346793

(2) 研究分担者

吉本 幸司 (YOSHIMOTO KOJI)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：70444784

松本 健一 (MATSUMOTO KENICHI)
九州大学・医学研究院・研究員
研究者番号：80423581

天野 敏之 (AMANO TOSHIYUKI)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：70448413

(3) 連携研究者

なし