

平成 27 年 9 月 24 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790339

研究課題名(和文) 食道癌の増幅遺伝子SOX2のAKT経路を介した腫瘍増殖機序の解明と治療への応用

研究課題名(英文) SOX2, an amplification target of 3q26.3, promote tumor proliferation via AKT signaling in esophageal cancer

研究代表者

玄 泰行(GEN, YASUYUKI)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80596156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌においてSOX2は遺伝子増幅により過剰発現している。一方、進行食道癌に対する治療法は限られており、その予後は不良である。今回の研究では、SOX2がどのようなシグナル経路を介して食道癌で癌促進的に作用するのかを明らかにし、SOX2が過剰発現している食道癌に対する分子標的治療の基礎的検討を行った。SOX2は食道癌細胞において、AKT/mTORC1経路を活性化させ、腫瘍増殖を促進することを明らかにした。またAKT/mTORC1経路の阻害はSOX2過剰発現食道癌の増殖を抑制することができた。さらに食道癌臨床標本においてSOX2とリン酸化AKTの発現は正の相関を認めた。

研究成果の概要(英文)：The transcription factor SOX2 is essential for the maintenance of embryonic stem cells and normal development of the esophagus. We have revealed that the SOX2 gene is an amplification target of 3q26.3 in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). To identify the oncogenic activity of SOX2 in ESCC cells, using a phosphoprotein array, we assayed multiple signaling pathways activated by SOX2 and determined that SOX2 activated the AKT/mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling pathway. LY294002, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, suppressed the ability of SOX2 to enhance proliferation of ESCC cells in vitro. In mouse xenografts, SOX2 promoted in vivo tumor growth of ESCC, which was dependent on AKT/mTORC1 activation. LY294002 suppressed the ability of SOX2 to enhance tumor growth of ESCC. Furthermore, tissue microarray analysis of 61 primary ESCC tumors showed a positive correlation between expression levels of SOX2 and phosphorylated AKT.

研究分野：消化器内科

キーワード：食道癌 SOX2 遺伝子増幅 AKT mTOR

1. 研究開始当初の背景

「癌は体細胞に生じた遺伝子病」であり、遺伝的素因に加え、感染や炎症、発癌物質などによる環境的因子によりゲノム異常が蓄積し、その結果、無秩序な増殖、浸潤・転移あるいは薬剤耐性といった癌の悪性形質を獲得する。分子レベルの癌の病態解明のためには、癌の本質であるゲノム異常を明らかにすることが必要である。

これまでに、ゲノム異常の解析によって ERBB2 や EGFR やといった癌遺伝子が遺伝子増幅によって活性化することが同定され、現在、乳癌に対する抗 ERBB2 抗体 (ハーセプチン) や肺癌に対する抗 EGFR 抗体 (イレッサ) として分子標的治療薬として、臨床応用されている。このような閾値を越えた活性化を導く変異である遺伝子増幅の標的を同定することは、癌発生の分子機構の解明に寄与するだけでなく、癌細胞を選択的に傷害する分子標的治療薬の開発という側面からも重要である。

こうした観点から、申請者は、高密度オリゴヌクレオチド・アレイを用いて、DNA コピー数解析を推進してきた。このアレイは 20 万個を超えるマーカーで全ゲノム領域をカバーし、癌に生じた DNA コピー数変化を詳細かつ定量的に解析することができ、微細な新規の遺伝子増幅領域やホモ欠失領域をピンポイントで検出することができる。

これまでの検討で、高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いて、食道扁平上皮癌における新規 3q26 増幅領域の標的遺伝子 (遺伝子増幅に伴って、その発現と機能が亢進している遺伝子) が SOX2 であることを同定した (Cancer genetics cytogenet 2010)。同時期に他のグループから肺の扁平上皮癌においても SOX2 が同様に増幅の標的遺伝子であることが報告されている (Nature genetics 2009)。

2. 研究の目的

SOX2 は幹細胞における多分化能と自己複製の維持に必須の転写因子であり、induced pluripotent cell (iPS 細胞) の作成にも必須である。一方、食道において、SOX2 は食道重層扁平上皮の形成に決定的な役割を果たす。しかし、食道癌における機能は明らかではない。本研究の目的は、食道癌において SOX2 過剰発現がどのようなシグナル経路を介して癌促進的に作用するのかを明らかにし、SOX2 が遺伝子増幅/過剰発現している食道癌に対する分子標的治療に対する基礎的検討を行うことである。これまでの予備的検討において、SOX2 過剰発現に伴い、細胞生存・増殖に関わるセリン/スレオニンキナーゼである AKT のリン酸化を亢進しその下流の mTOR 経路も活性化されていることが明ら

かになっており、SOX2 の AKT 経路を介した腫瘍増殖機序と SOX2 高発現食道癌に対する AKT 経路阻害効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) SOX2 が遺伝子増幅している食道癌細胞において RNAi 法を用いて SOX2 を抑制したときに変動するシグナル経路のスクリーニングのため、リン酸化蛋白アレイ (抗体アレイ) を行う。得られた結果は、ウェスタンブロットティング法を用いて検証した。

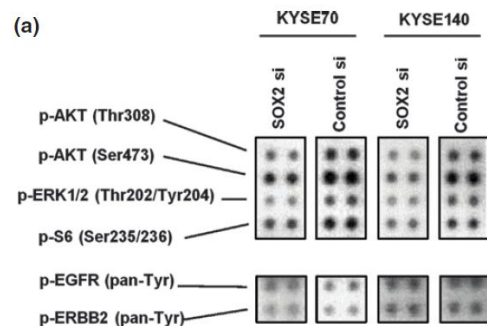
(2) SOX2 の発現が低い食道癌細胞に対して SOX2 を導入し、SOX2 安定発現株を作製した。SOX2 安定発現株およびコントロールの細胞をヌードマウスの皮下に接種し、腫瘍形成させることで、*in vivo* における腫瘍増殖能を評価した。また、*in vivo* で形成された腫瘍を回収し、SOX2 の過剰発現に伴う AKT / mTOR シグナル経路の亢進を調べた。

(3) SOX2 過剰発現細胞における AKT 経路阻害剤の効果を調べた。すなわち、AKT 経路の阻害による AKT/mTORC1 経路抑制の確認と、それにともなう SOX2 過剰発現細胞の増殖抑制効果を *in vitro* および *in vivo* で検証した。

(4) 食道癌臨床標本を用いて SOX2 およびリン酸化 AKT の免疫組織染色を行い、発現の相関について検討した。

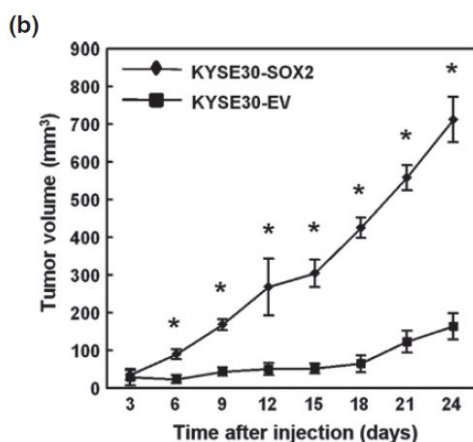
4. 研究成果

(1) SOX2 が遺伝子増幅し、過剰発現している食道癌細胞 KYSE70 と KYSE140 において、RNAi 法を用いて SOX2 をノックダウンし、そのときに変化するシグナル経路をリン酸化蛋白アレイを用いて、スクリーニングした。その結果、リン酸化 AKT (p-AKT) および mTOR 経路 (リン酸化 S6(p-S6)) の発現が SOX2 のノックダウンにより減弱化することが明らかとなった (図 a)。AKT は mTOR 複合体 (mTORC1) を介して、4E-BP1 や p70S6K、S6 のリン酸化を促し、細胞増殖を促進することが知られているため、SOX2 は AKT/mTORC1 経路を亢進させ、増殖を促進している可能性が示唆される結果であった。一方で、AKT 経路の上流となりうるリン酸化



EGFR やリン酸化 ERBB2 といったレセプター型チロシンキナーゼのリン酸化レベルは明らかな差を認めなかった。これらの結果はウェスタンブロットングで検証した。

(2) SOX2 の発現が極めて低い食道癌細胞 KYSE30 細胞に対して SOX2 を強制発現させた安定発現株を作成した。コントロールの細胞と SOX2 安定発現株をヌードマウスの皮下に接種し、腫瘍形成させ、増殖能を検討すると SOX2 安定発現株は腫瘍増殖が速い結果であった(図 b)。 *in vivo* で形成された腫瘍サンプルを回収し、SOX2 および AKT/mTORC1 経路 (p-AKT、p-p70S6K、p-4EBP-1、p-S6) の発現をウェスタンブロットングで検証したところ、SOX2 の発現に伴い、AKT/mTORC1 経路が亢進していることを示した。



(3) つぎに SOX2 過剰発現細胞に対する AKT/mTORC1 経路の阻害効果を AKT の活性を阻害する LY294002 を用いて検証した。SOX2 の遺伝子増幅のある KYSE70 および KYSE140 細胞に対して LY294002 を *in vitro* で投与すると、いずれの細胞においても濃度依存性に p-AKT および mTORC1 経路の指標である p-6 の発現が減弱し、細胞増殖が抑制された。さらに SOX2 安定発現株をヌードマウスの皮下に接種して腫瘍形成させ、その後、LY294002 を投与すると、*in vivo* において腫瘍増殖を抑制することができた。*In vivo* の腫瘍は回収し、ウェスタンブロットングで LY294002 の投与により p-AKT、p-S6 が減弱していることを確認した。

(4) 食道癌臨床標本 61 検体を用いて、SOX2 および p-AKT の免疫染色を行った。SOX2 の発現が高い標本において p-AKT の発現も高く、正の相関を認めた。

以上の結果から、食道癌において SOX2 は AKT/mTORC1 経路を介して腫瘍増殖を促進していることが明らかとなり、SOX2 高発現の食道癌に対して AKT あるいは mTOR 阻害剤を用いる治療が有効な可能性を示唆する

結果であった。

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4件)

Gen Y, Yasui K, Nishikawa T, Yoshikawa T. SOX2 promotes tumor growth of esophageal squamous cell carcinoma through the AKT/mammalian target of rapamycin complex 1 signaling pathway. *Cancer Sci.* 査読あり 2013;104:810-6. doi: 10.1111/cas.12155.

Endo M, Yasui K, Zen Y, Gen Y, et al. Alterations of the SWI/SNF chromatin remodelling subunit-BRG1 and BRM in hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 査読あり 2013;33:105-17. doi: 10.1111/liv.12005.

Akazawa T, Yasui K, Gen Y, Yamada N, et al. Aberrant expression of the PHF14 gene in biliary tract cancer cells. *Oncol Lett.* 査読あり 2013;5:1849-1853. doi:10.3892/ol.2013.1278

Dohi O, Yasui K, Gen Y, Takada H, et al. Epigenetic silencing of miR-335 and its host gene MEST in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol.* 査読あり 2013;42:411-8. doi: 10.3892/ijo.2012.1724.

(学会発表)(計5件)

玄 泰行: SOX2 は miR-19a を介して PTEN を抑制し、AKT 経路を亢進させる
第 74 回日本癌学会学術総会。
2014 年 9 月 25 日
パシフィコ横浜(神奈川県)

玄 泰行: 食道扁平上皮癌の増幅遺伝子 SOX2 は PTEN/AKT/mTORC1 経路を介して腫瘍増殖を促進する
2014 年 4 月 23 日
第 100 回日本消化器病学会総会
東京国際フォーラム(東京都)

Yasuyuki Gen: SOX2 promotes tumor growth via activation of the PI3K/Akt/mTORC1 signaling pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *Proceedings of the 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*
2014 年 4 月 7 日
サンディエゴ・コンベンションセンター
(サンディエゴ、米国)

玄 泰行: SOX2 promotes tumor growth
via activation of PI3K/AKT/mTORC1
pathway in esophageal squamous cell
carcinoma

2013年10月3日

第72回日本癌学会学術総会

パシフィコ横浜（神奈川県）

玄 泰行: SOX2 promotes tumor growth
via activation of PI3K/Akt/mTOR pathway
in esophageal squamous cell carcinoma

2012年9月20日

第71回日本癌学会学術総会

札幌教育文化会館（北海道）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玄 泰行 (GEN, YASUYUKI)

京都府立医科大学大学院消化器内科・助教

研究者番号：80596156