

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19040

研究課題名(和文)食道扁平上皮癌の増幅遺伝子SOX2のmiRNA発現制御を介した発癌促進機構の解明

研究課題名(英文) Examination of the mechanisms by which SOX2 promotes cell proliferation in esophageal cancer

研究代表者

玄 泰行 (GEN, Yasuyuki)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：80596156

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)：SOX2は食道扁平上皮癌において、高頻度に遺伝子増幅によって発現亢進し、癌の発育進展に寄与している。これまでに、SOX2はAKT-mTOR経路を亢進させ、*in vitro/in vivo*において腫瘍増殖を促進していることを明らかにしてきた。本研究において、SOX2はmiR-19a-3pの発現を間接的に制御し、AKTを負に制御するPTENを抑制することでAKT-mTOR経路を亢進させることを明らかにした。さらにAKT-mTORの阻害剤はSOX2増幅癌細胞の増殖を著明に抑制し、SOX2増幅癌細胞に対する治療の有効性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Our previous study revealed that the SOX2 gene is frequently amplified and overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), and that SOX2 promotes ESCC cell proliferation *in vitro* and *in vivo* via upregulation of AKT/mTOR signaling pathway. In the present study, we showed that SOX2 increased the expression of miR-19a-3p indirectly. miR-19a-3p upregulated AKT signaling pathway by repressing PTEN, a negative regulator of AKT. Furthermore, we showed that AKT/mTOR dual inhibitor suppressed the proliferation of SOX2-amplified ESCC cells.

研究分野：消化器内科学

キーワード：SOX2 esophageal cancer miRNA

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・エピ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。これまでの検討で、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)。さらに、SOX2 と様々なシグナル経路を調べた結果、SOX2 は AKT 経路及びその下流である mTOR 経路を亢進させ、腫瘍増殖を促進することを明らかにしてきた (Cancer Sci 2013)。

2. 研究の目的

本研究では食道扁平上皮癌 (ESCC) における SOX2 が AKT-mTOR 経路を亢進させる分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

以下の検討を行った。

(1) SOX2 によって発現制御される miRNA の探索

(2) SOX2 の miR-17~92 cluster を介した PTEN 抑制効果及び AKT 経路亢進効果

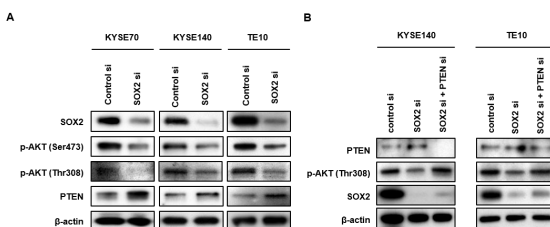
(3) SOX2 の miR-17~92 cluster のプロモータ活性

(4) SOX2 高発現食道癌に対する AKT/mTOR 分子標的薬による抗腫瘍効果

4. 研究成果

(1) まず、SOX2 が AKT 経路を亢進させる機序を明らかにするため、AKT 経路の negative regulator である PTEN の発現の変動を調べた。その結果、SOX2 の遺伝子増幅を有する KYSE70、KYSE140、TE10 の3つの細胞株において、SOX2 のノックダウンに伴い、PTEN の発現上昇を認めたと (図 1A)。SOX2 のノックダウンに加えて PTEN のノックダウンを行うと、pAKT の減少がレスキューされることから、SOX2 は PTEN の発現抑制を介して、AKT 経路を亢進していることが考えられた (図 1B)。

図 1



SOX2 をノックダウンした際の PTEN の

mRNA レベルの変動が乏しいことから SOX2 による PTEN の転写レベルの制御の可能性が低いこと、MG132 を用いた予備検討において、PTEN のタンパクの安定性の変化をみとめなかったことから、SOX2 が PTEN を制御するメカニズムとして miRNA の可能性を考えた。図 2 に示すように DICER をノックダウンし、mature miRNA の生成を抑制すると、SOX2 の発現は変化しないものの PTEN の減少及び pAKT の上昇を認め、SOX2 は miRNA の発現制御を介して PTEN を抑制し、pAKT を上昇させることが示唆された。

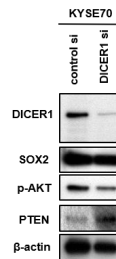


図 2

そこで、次に SOX2 によって制御される miRNA を探索するため、SOX2 の遺伝子増幅を有する KYSE70 に対して siRNA を用いて SOX2 をノックダウンした後、発現が変動する miRNA を Exiqon 社の miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, Cancer panel を用いて、探索した。その結果、表 1 に示す miRNA の発現低下を認め、特に赤字で示す miRNA は miR-17-92 cluster を形成し、これまでに PTEN を抑制することが報告されていたため、着目した。

miRNA	fold change*
hsa-miR-32-5p	0.0907
hsa-miR-96-5p	0.1867
hsa-miR-301a-3p	0.257
hsa-miR-181c-5p	0.2908
hsa-miR-143-3p	0.3241
hsa-miR-19a-3p	0.3247
hsa-miR-181a-5p	0.372
hsa-miR-138-5p	0.3793
hsa-miR-18a-5p	0.4365
hsa-miR-17-5p	0.4753
hsa-miR-20a-5p	0.4854

表 1

miR-17-92 は miR-17-5p, miR-18a-5p, miR-19a-3p, miR-19b-1-3p, miR-20a-5p, miR-92a-3p の 6 つからなるが、KYSE70, KYSE140, TE10 の3つの細胞株において、SOX2 をノックダウンすると、いずれも発現が有意に抑制されることを qRT-PCR で確認できた。

(2) 次に(1)で同定した miR-17-92 cluster が PTEN を抑制し、pAKT を亢進させるかどうかを確認した。これらの miRNA のうち、miR-19a-3p を導入すると、SOX2 増幅細胞において、PTEN の抑制および pAKT の亢進を

認められた(図3A)。また、逆に miR-19a-3p の inhibitor を導入すると、PTEN の回復を認められた(図3B)。さらに、SOX2 をノックダウンした後、miR-19a-3p を導入すると、SOX2 のノックダウンによって上昇する PTEN が低下することが示された(図3C)。また SOX2 低発現細胞である KYSE30 に対して SOX2 を導入すると、miR-19a-3p の発現上昇及び PTEN の抑制、pAKT の亢進を認められた(図3D)。これらの結果から、SOX2 は miR-19a-3p の発現上昇を介して PTEN の抑制を行い、その結果、AKT 経路が亢進すると考えられた。

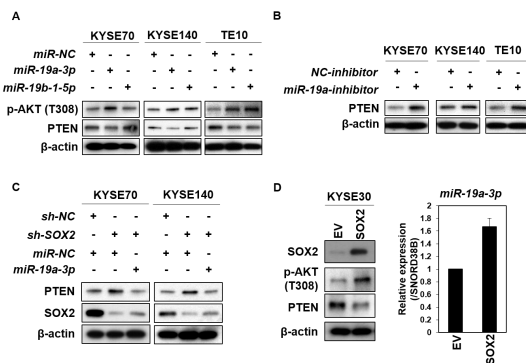


図 3

(3) 次に SOX2 が miR-17-92 cluster を直接制御しているかどうかをクロマチン免疫沈降法を用いて調べた。これまでの文献報告及びデータベースより、図4に示す領域が miR-17-92 cluster のプロモーター領域及び SOX2 の結合モチーフであることが想定された。

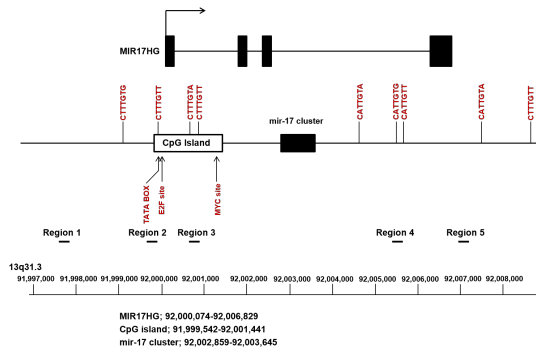


図 4

これらの複数の領域に対してプライマーを設定し、SOX2 の抗体を用いて CHIP-qPCR をおこなったが、いずれの領域も enrich されず、SOX2 の miR-17-92 cluster の制御はこの実験結果からは間接的な制御である可能性が考えられた。

(4) 次に ESCC 細胞株 13 種のパネルを用いて、AKT/mTOR 阻害剤 (BEZ-235、AKT/mTOR dual inhibitor) の効果を in vitro で検証した。段階的な薬剤濃度とその濃度における細胞生存率を算出し、IC50 の算出を行った(表2)。結果として、SOX2 の増幅のある細胞株 KYSE70、KYSE140、TE6 において IC50

は低い傾向にあった。また、予想されたことではあるが、SOX2 の遺伝子増幅以外に、PIK3CA の変異のある細胞株 TE4、TE5 においても IC50 は低い結果であった。これまでに得られた知見から SOX2 は PTEN の抑制を介して AKT 経路を活性化させていること、SOX2 増幅細胞において、AKT/mTOR 阻害剤の IC50 が低い結果であることから、SOX2 増幅細胞において、AKT/mTOR 阻害剤が有効である可能性が示唆された。

細胞株	IC50 (μM)
KYSE70	0.026
KYSE140	0.081
KYSE150	0.084
KYSE220	0.672
TE1	1.550
TE4	0.066
TE5	0.023
TE6	0.153
TE8	0.027
TE9	0.519
TE10	0.491
TE11	0.180
TE15	0.279

表 2

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6件)

Tonouchi E, Gen Y, Muramatsu T, Hiramoto H, Tanimoto K, Inoue J, Inazawa J. miR-3140 suppresses tumor cell growth by targeting BRD4 via its coding sequence and downregulates the BRD4-NUT fusion oncoprotein. Sci Rep., 査読有, 8:6769, 2017. doi: 10.1038/s41598-018-24861-7.

Gen Y, Yasui K, Kitaichi T, Iwai N, Terasaki K, Dohi O, Hashimoto H, Fukui H, Inada Y, Fukui A, Jo M, Moriguchi M, Nishikawa T, Umemura A, Yamaguchi K, Konishi H, Naito Y, Itoh Y. ASPP2 suppresses invasion and TGF-1-induced epithelial-mesenchymal transition by inhibiting Smad7 degradation mediated by E3 ubiquitin ligase ITCH in gastric cancer. Cancer Lett., 査読有, 398:52-61, 2017. doi: 10.1016/j.canlet.2017.04.002.

Kitaichi T, Yasui K, Gen Y, Dohi O, Iwai N, Tomie A, Yamada N, Terasaki K, Umemura A, Nishikawa T, Yamaguchi K, Moriguchi M, Sumida Y, Mitsuyoshi H, Naito Y, Zen Y,

Itoh Y. Loss of PAR-3 protein expression is associated with invasion, lymph node metastasis, and poor survival in esophageal squamous cell carcinoma. Human Pathol., 査読有, 62:134-140, 2017. doi: 10.1016/j.humpath.2017.01.009.

Ishikawa T, Yasuda T, Doi T, Okayama T, Sakamoto N, Gen Y, Dohi O, Yoshida N, Kamada K, Uchiyama K, Handa O, Takagi T, Konishi H, Yagi N, Kokura S, Naito Y, Itoh Y. The amino acid-rich elemental diet Elental® preserves lean body mass during chemo- or chemoradiotherapy for esophageal cancer. Oncol Rep. 査読有, 36:1093-1100, 2016. doi: 10.3892/or.2016.4877.

Yamada N, Yasui K, Dohi O, Gen Y, Tomie A, Kitaichi T, Iwai N, Mitsuyoshi H, Sumida Y, Moriguchi M, Yamaguchi K, Nishikawa T, Umemura A, Naito Y, Tanaka S, Arii S, Itoh Y. Genome-wide DNA methylation analysis in hepatocellular carcinoma. Oncol Rep., 査読有, 35:2228-2236, 2016. doi: 10.3892/or.2016.4619.

Yasui K, Konishi C, Gen Y, Endo M, Dohi O, Tomie A, Kitaichi T, Yamada N, Iwai N, Nishikawa T, Yamaguchi K, Moriguchi M, Sumida Y, Arii S, Itoh Y. EVI1, a target gene for amplification at 3q26, antagonizes transforming growth factor- β -mediated growth inhibition in hepatocellular carcinoma. Cancer Sci., 査読有, 106:929-37, 2015. doi: 10.1111/cas.12694.

〔学会発表〕(計5件)

玄泰行、井上純、稲澤譲治：機能的 miRNA スクリーニングを用いた p53 不活性型癌に細胞死を誘導する miRNA の探索. 日本人類遺伝学会第 62 回大会 2017 年 11 月 17 日、神戸国際会議場

Yasuyuki Gen, Jun Inoue¹, Johji Inazawa, The exploration of miRNAs that induce cell death in p53 inactive cancer cells using functional-miRNA screening 第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年 9 月 29 日、パシフィコ横浜

玄泰行、安居幸一郎、岩井直人、北市智子、内藤裕二、伊藤義人：ゲノム異常を指標とした食道扁平上皮癌に対する分子標的治療の戦略 第 24 回日本消化器関連学会週間 (JDDW2016) 2016 年 11 月 3 日、神戸コンベンションセンター

Yasuyuki Gen, Kohichiroh Yasui, Naoto

Iwai, Tomoko Kitaichi, Kei Terasaki, Osamu Dohi, Yuji Naito, Yoshito Itoh, ASPP2, a regulator of PAR-3, inhibits TGF- β induced epithelial mesenchymal transition in gastric cancer, The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2016 年 10 月 7 日、パシフィコ横浜

Yasuyuki Gen, Kohichiroh Yasui, Tomoko Kitaichi, Akira Tomie, Yoshito Itoh, SOX2 suppresses PTEN expression via miR-19a in esophageal squamous cell carcinoma, AACR annual meeting 2015, 2015 年 4 月 20 日 Pennsylvania Convention Center

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)

名称：マイクロ RNA 及びその誘導体を有効成分とするがん治療剤.

発明者：稲澤譲治、玄泰行、村松智輝、外内えり奈.

権利者：国立大学法人東京医科歯科大学.

種類：特許

番号：特願 2017-229046

出願年月日：2017 年 11 月 29 日

国内外の別：国内

取得状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玄泰行 (GEN, Yasuyuki)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：80596156