

令和元年6月12日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17263

研究課題名(和文) T-box転写因子Brachyuryによる癌幹細胞形質の制御機構

研究課題名(英文) T-box transcription factor BRACHYURY regulate the cancer stem cell phenotype

研究代表者

秋本 直柔 (Akimoto, Naonari)

九州大学・歯学研究院・共同研究員

研究者番号：20772940

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)：これまで当分野において、癌幹細胞様細胞株に対してT-box転写因子Brachyuryをノックダウンすることで上皮間葉移行(EMT)形質、癌幹細胞形質が抑制され、Brachyuryが癌幹細胞の制御因子であることを示唆してきた。

当研究ではヒト口腔癌細胞株に対しBrachyury強制発現させ、癌幹細胞形質を解析したところ、元の細胞株と比較して一定レベルの形質亢進を確認した。次いで、Sox2の強制発現も行った結果、Brachyury、Sox2の単独発現よりも、同時に強制発現することで相乗的に癌幹細胞形質が誘導されることが明らかになり、特にFibronectin、TGF- $\beta$ 2の発現が著明に亢進していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BRACHYURYとSOX2を同時に強制発現させることにより、EMT形質、癌幹細胞形質および細胞の遊走能、浸潤能が促進され、同時にTGF $\beta$ 2とFibronectinの発現が著明に亢進していたことを明らかにした。この相乗効果はBRACHYURY、SOX2、TGF $\beta$ 2、Fibronectinが蛋白、もしくは遺伝子の同一ネットワーク上に存在している可能性を示唆し、これらが癌治療において有効な標的因子となり得るが、応用させていくためには更なる詳細なメカニズムの解析が望まれる。

研究成果の概要(英文)：Recently, we showed that the T-box transcription factor BRACHYURY could be a strong regulator of EMT and the cancer stem cells (CSCs) phenotype, which were effectively suppressed by a BRACHYURY knockdown in an adenoid cystic carcinoma cell line.

In this study, we further tested whether BRACHYURY is a regulator of cancer stemness by means of forced expression of BRACHYURY in oral cancer cell lines. BRACHYURY, SOX2, or both were stably transfected into oral carcinoma cell lines. Forced expression of BRACHYURY or SOX2 slightly increased expression of EMT and stem cell markers. The expression levels, however, were much lower compared to those of cancer stem cell-like cells. Forced co-expression of BRACHYURY and SOX2 strongly upregulated EMT and stem cell markers and the self-renewal phenotype. These synergistic effects increased expression levels of FIBRONECTIN and TGF- $\beta$ 2. We found that BRACHYURY and SOX2 synergistically promote cancer stemness in oral cancer cells.

研究分野：癌幹細胞

キーワード：Brachyury Sox2

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまで当分野において、培養ヒト腺様嚢胞癌細胞株 ACCS-GFP をマウスの舌に接種し、そこから肺へ転移した細胞を抽出し、再度その細胞をマウスの舌に接種するといった手順を繰り返すことで *in vivo* selection を行い、造腫瘍性・高転移性・癌幹細胞様細胞株 ACCSM-GFP を樹立した。ACCS-GFP と ACCSM-GFP を PCR にて遺伝子発現解析したところ、ACCSM-GFP でより高発現していた *Brachyury* に着目した。T-box 転写因子である BRACHYURY は、発生過程における中胚葉形成に必須の遺伝子であり、ヒトの腫瘍細胞において EMT を誘導することが他の文献より報告されている。ACCSM-GFP に対して *Brachyury* ノックダウンすることによって、ACCSM-GFP がもつ上皮間葉移行 (EMT) 形質、癌幹細胞形質が抑制されることを報告した。さらに BRACHYURY ノックダウンが *in vitro* での遊走能、浸潤能、抗癌剤抵抗性、放射線治療抵抗性、および *in vivo* での造腫瘍性、転移能を抑制することを明らかにしている。これらの結果より、BRACHYURY が癌幹細胞の制御因子であり、癌治療の標的因子になり得ることが示唆されている。しかし BRACHYURY がどのようなメカニズムで癌幹細胞形質発現に寄与しているかは明らかにしていない。

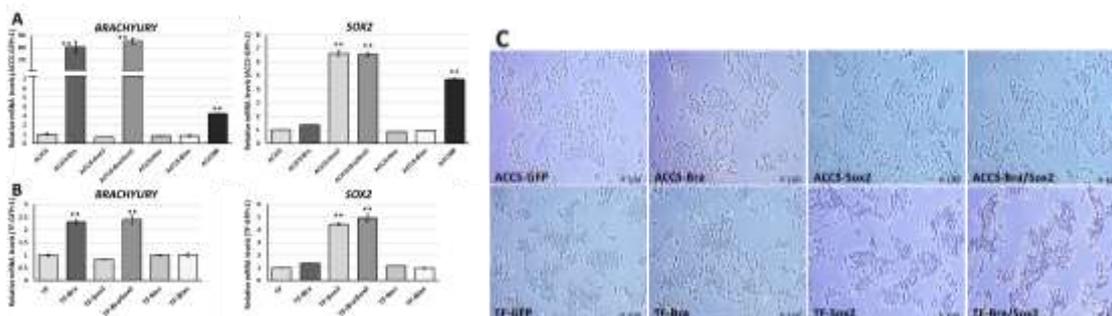
### 2. 研究の目的

培養ヒト口腔癌細胞株に対し BRACHYURY を強制発現することによって、BRACHYURY がどのようなメカニズムで EMT や癌幹細胞形質を発現させるのかという点と口腔癌において BRACHYURY が広い範囲で治療標的因子として応用できるかという点を明らかにする。

### 3. 研究の方法

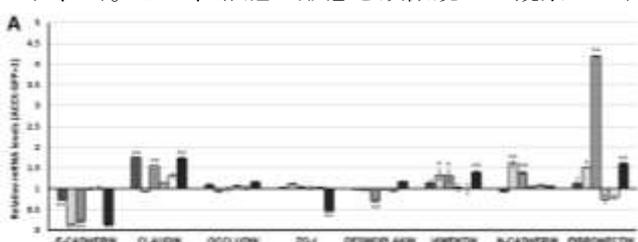
ACCS-GFP とヒト口腔舌扁平上皮癌細胞株 TF-GFP に対し、*Brachyury* 導入を行い強制発現させた細胞株を樹立した。この細胞株を用いて EMT や癌幹細胞形質の解析を行った。また、*Sox2* を強制発現させた細胞株も樹立し、さらに *Brachyury* が強制発現されている細胞株へも *Sox2* の強制発現を行い、*Brachyury* と *Sox2* を同時強制発現した細胞株も樹立した。これらの細胞株も同様に EMT、癌幹細胞形質の解析を行った。

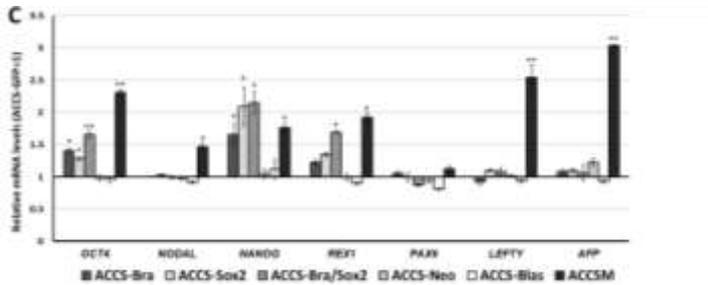
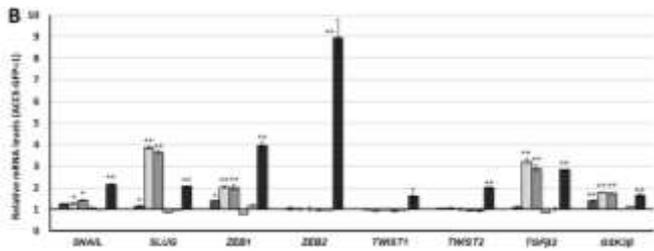
### 4. 研究成果



#### 1、BRACHYURY、SOX2の単独強制発現細胞株および BRACHYURYと SOX2の同時強制発現細胞株の樹立

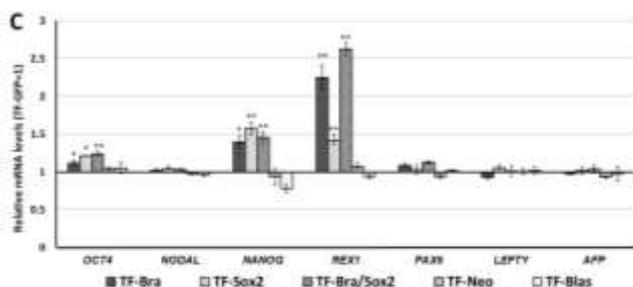
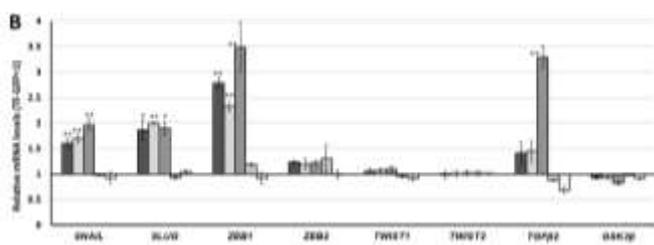
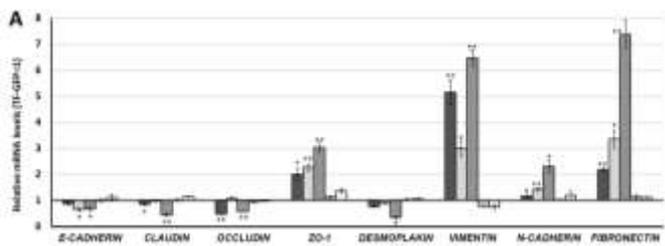
ACCS-GFP (ヒト腺様嚢胞癌細胞株)、TF-GFP (ヒト扁平上皮癌細胞株) に対し、BRACHYURY 発現ベクターおよびコントロールベクターを導入し、ACCS-Bra、TF-Bra (BRACHYURY 導入細胞)、ACCS-Neo、TF-Neo (コントロールベクター導入細胞) をそれぞれ樹立した。次いで ACCS-GFP、TF-GFP に対し、*SOX2* 発現ベクターおよびコントロールベクターを導入し、ACCS-Sox2、TF-Sox2 (*SOX2* 導入細胞)、ACCS-Blas、TF-Blas (コントロールベクター導入細胞) をそれぞれ樹立した。また、ACCS-Bra、TF-Bra に対し、*SOX2* 発現ベクターを導入し、ACCS-Bra/Sox2、TF-Bra/Sox2 (BRACHYURY、*SOX2* 導入細胞) を樹立した。樹立した細胞株の BRACHYURY と *SOX2* の発現量をリアルタイム RT-PCR にて確認した(A、B)。また、細胞の形態を顕微鏡にて観察した(C)。(n=3、\*P < 0.05、\*\*P < 0.01)





## 2、*BRACHYURY* と *SOX2* の同時強制発現が ACCS-GFP における各種マーカーの mRNA 発現レベルに与える影響

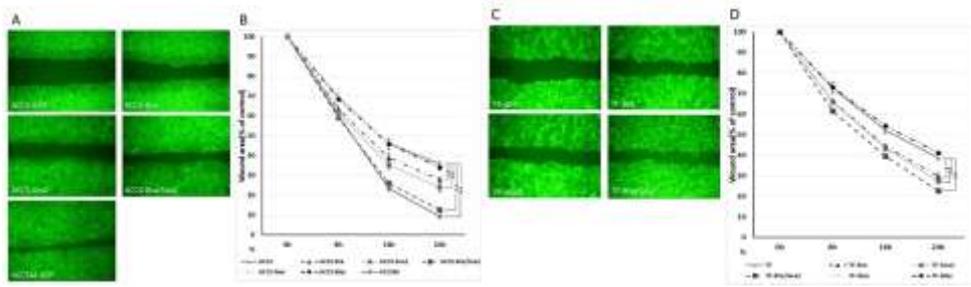
ACCS-GFP、ACCS-Bra (*BRACHYURY* 導入細胞)、ACCS-Sox2 (*SOX2* 導入細胞)、ACCS-Bra/Sox2 (*BRACHYURY*、*SOX2* 導入細胞)、ACCS-Neo、ACCS-Blas (コントロールベクター導入細胞)、ACCSM-GFP の mRNA 発現レベルをリアルタイム PCR で評価した。ACCS-GFP の発現量を 1 と基準付けし、各種細胞の発現レベルを比較した。EMT 関連マーカー (A、B)、幹細胞マーカー (C) の結果をそれぞれ棒グラフで示す。バーは標準偏差を示す。データの有意差は Student-t 検定で判定した。(n=3、\*P < 0.05、\*\*P < 0.01)



## 3、*BRACHYURY* と *SOX2* の同時強制発現が TF-GFP における各種マーカーの mRNA 発現レベルに与える影響

TF-GFP、TF-Bra (*BRACHYURY* 導入細胞)、TF-Sox2 (*SOX2* 導入細胞)、TF-Bra/Sox2 (*BRACHYURY*、*SOX2* 導入細胞)、TF-Neo、TF-Blas (コントロールベクター導入細胞)、の

mRNA 発現レベルをリアルタイム PCR で評価した。TF-GFP の発現量を 1 と基準付けし、各種細胞の発現レベルを比較した。EMT 関連マーカー (A、B)、幹細胞マーカー (C) の結果をそれぞれ棒グラフで示す。バーは標準偏差を示す。データの有意差は Student-t 検定で判定した。(n=3、\*P < 0.05、\*\*P < 0.01)

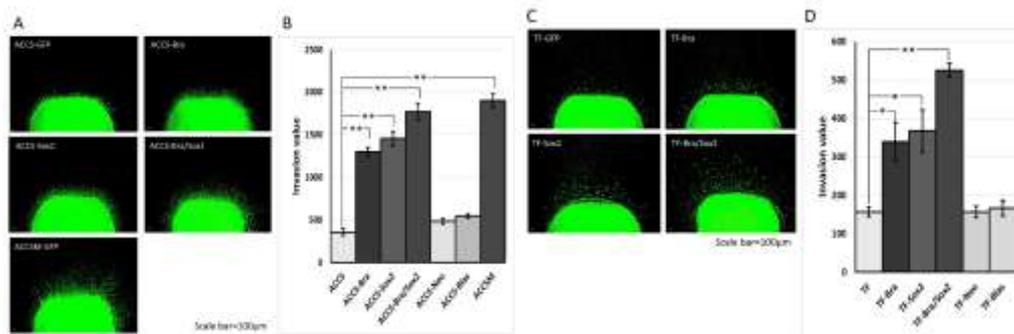


#### 4、BRACHYURY と SOX2 の同時強制発現が腫瘍細胞の遊走能に与える影響

各種腫瘍細胞の遊走能を wound healing assay で評価した。6 穴平型プレートに細胞を 1 穴あたり  $3 \times 10^5$  個になるよう播種し、増殖培地でコンフルエントになるよう 24 時間培養した。その後、200  $\mu$ l ピペットチップにてウェル内に直線状に“傷”を付け、PBS で洗浄したのちに 24 時間培養した。傷によって形成されたスペースからランダムで選択した領域を創部面積とし、蛍光顕微鏡で 24 時間経過するまで 8 時間毎に撮影を行った (A、C)。創部面積は以下の計算式を用いて評価した (B、D)。

創部面積 (%) = (観察した時点での創部面積 / 観察開始直後の創部面積)  $\times$  100

バーは標準偏差を示す。データの有意差は Student-t 検定で判定した。(n=3、\*P < 0.05、\*\*P < 0.01)



#### 5、BRACHYURY と SOX2 の導入および両者の共発現が腫瘍細胞の浸潤能に与える影響

各種腫瘍細胞の浸潤能を仮想原発巣離脱モデルで評価した。各種細胞をそれぞれ  $1 \times 10^5$  個を遠心分離にてペレットとした後、25  $\mu$ l の DMEM 培地と 25  $\mu$ l の I 型コラーゲンゲル (高研、東京) で懸濁し 100  $\mu$ l マイクロチューブ内で 37°C、30 分で硬化させ、細胞凝集塊とした。6 穴平型プレートに、ヒト歯肉由来線維芽細胞を  $1 \times 10^5$  個/ml の濃度で浮遊させた I 型コラーゲンゲル 500  $\mu$ l を播種し、そこへ腫瘍細胞凝集塊を中央に埋没し、凝集塊ごとコラーゲンゲルを硬化させた。培養液をコラーゲンが浸るまで加え、37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。培養 7 日後に、腫瘍の細胞凝集塊からの離脱の様子を蛍光顕微鏡で観察し、写真を撮影した (A、C)。各種腫瘍細胞の凝集塊からの離脱の評価は写真上で  $500 \times 100 \mu$ m の領域をランダムに 5 視野選択し、凝集塊の辺縁からの離脱した全ての細胞の距離を測定し、その総和を浸潤能として評価した (B、D)。バーは標準偏差を示す。データの有意差は Student-t 検定で判定した。(n=3、\*P < 0.05、\*\*P < 0.01)

Brachyury の強制発現により、元の細胞株と比較して EMT および癌幹細胞形質の亢進を確認したが、ACCSM-GFP に及ぶものではなかった。Brachyury と Sox2 を同時に強制発現することで EMT および癌幹細胞形質が相乗的に誘導されることが明らかになり、特に Fibronectin, TGFβ2 の発現が著明に亢進していた。また、in vitro での遊走能、浸潤能についても解析したところ同様の結果が得られた。以上より、腫瘍細胞において癌幹細胞様形質の制御には少なくとも Brachyury、Sox2 が強力な制御因子として働いていることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

① Naonari Akimoto, Kodai Nakamura, Hiroshi Hijioka, Kenichi Kume, Yoshiaki Matsumura, Tsuyoshi Sugiura Transfection of T-Box Transcription Factor BRACHYURY and SOX2 Synergistically Promote Self-Renewal and Invasive Phenotype in Oral Cancer Cells. International Journal of Molecular Sciences (査読無し) 2018, 19, 3620 DDI : 10.3390/ijms19113620

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁) :

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名 :

ローマ字氏名 :

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。