

機関番号：74314
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591599
 研究課題名（和文） SOXファミリーによるWntシグナルを介した大腸癌進展の制御と臨床応用
 研究課題名（英文） SOX Family Regulate Colon Cancer Progression through Wnt Signaling.
 研究代表者
 橋田 裕毅（HASHIDA HIROKI）
 財団法人田附興風会・医学研究所 第1研究部・研究員
 研究者番号：70281607

研究成果の概要（和文）： 大腸癌細胞に SOX4 を発現誘導させることにより、beta-catenin の核への移行を変化させ、SOX4 の発現が強陽性の場合、病期が進行しており、予後が不良であることが判明した。microRNA signature を検討したところ、signature の強弱により、大腸癌の進展が起こっていると考えられた。SOX4 が beta-catenin を介し Wnt シグナルを制御することが示唆され、大腸の発生と癌化に関与している可能性と考えられた。SOX4 のワクチン療法として microRNA の導入によるものの可能性があるとし唆されうる。

研究成果の概要（英文）： When the appearance of SOX4 was a strong positivity by inducing SOX4 to colon cancer cell, it turned out that the shift of beta-catenin to the nucleus was changed, and the disease stage advanced, and the prognosis was poor. In the examination for microRNA signature, it was thought that the progress of colon cancer had happened because of strength of signature. It was suggested that SOX4 controls the Wnt signaling by beta-catenin, and was thought the possibility of taking part in generating and making of colon cancer. It was suggested that there was a possibility of the one by the introduction of microRNA as a vaccine therapy of SOX4.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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・消化器外科学

キーワード：SOX4 SOX family 大腸癌 大腸発生 ワクチン療法 microRNA

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、これまで大腸癌に関する基礎的研究やそれらの研究をもとにした臨床応用への可能性について報告してきた。現在の研究課題としては、大腸の発生と大腸癌発癌にともに関わる遺伝子を探索し、それらの分子を用い、大腸癌治療への応用することを目的とし展開している。大腸において、胎生期に発現し、生後は発現を認めず、発癌の過程で、再び発現する遺伝子を同定し、大腸癌治療の戦略機構としての応用を目指している。大腸の発生にはいくつかの因子が同定されており、一方、大腸癌の発癌においては TGF-beta や Wnt などのシグナルが関与していることが分かっている。さらに CEA などの胎生に関わる因子が、発癌の過程においては関与している可能性も示唆されている。我々は、胎生 13.5 日目、14.5 日目、15.5 日目、16.5 日目、17.5 日目、18.5 日目の C57BL/6 マウスの大腸をマイクロアレイにて解析し、発生とともに減弱していく遺伝子を 22 個同定した。さらに Apc、Smad3、TGF-beta1 を遺伝子操作したマウスや AOM 処理したマウスでの大腸癌をマイクロアレイにて解析した。またヒト大腸癌の標本を用い検討を行った。それらの解析結果をもとに、大腸の発生と大腸癌発癌に関わる遺伝子として転写因子である SRY (sex determining region Y)-box 4、(以下 SOX4) を同定した。SOX4 は HMG ドメインを持つ転写因子でヒトでは 474 個のアミノ酸から成っていて、CTTTGTT sequence motif を認識する。また B cell の分化に関わり、一方では髄芽腫の進展に関わるとされる報告がある。大腸癌細胞株における SOX4 の発現は、大多数の細胞株でその発現を認めた。Serial analysis of gene expression (SAGE)での解析では、SOX4 は正常大腸に比し、大腸癌において強発現していた。またヒト大腸癌と正常大

腸を用いた PCR では、SOX4 は大腸癌において強発現していた。SOX4 抗体を用いた免疫染色では SOX4 は大腸癌の癌細胞の核に発現していた。SW480 細胞に SOX4 を導入すると同じく核に発現を認めた。前述のごとく、大腸癌の発癌については Wnt などのシグナルが関与していることが示唆されていて、SOX4 に関して、luciferase assay を用いた検討では、Wnt シグナルにおいて beta-catenin のシグナルを抑制することが判明している。以上のことから、SOX4 は、大腸の発生と大腸癌発癌に関わり、その過程において Wnt シグナルを制御していることが示唆され、大腸癌治療の標的になりうる可能性がある。

また、最近の知見では SOX4 のみならず SOX11、SOX17 などの SOX ファミリーのメンバーの一部も大腸癌の進展に関与している可能性が示唆されている。いずれも Wnt シグナルを制御しているが、予備実験では、その制御は異なっていると推測され、SOX4 は beta-catenin タンパクを stabilize し、一方、SOX17 は beta-catenin の分解を促進することが判明してきている。これらを組み合わせることで、より強力に Wnt シグナルを制御できると考えられる。

2. 研究の目的

SOX4 をはじめとする SOX ファミリーが生体内の癌細胞増殖に及ぼす影響や治療に対する効果を明らかにする。また大腸癌増殖における SOX ファミリーによる制御機構の詳細が明らかになれば、ワクチン療法をはじめとした大腸癌治療に対する戦略が構築されることが期待される。すなわち、癌ワクチン療法の効果を更に強力なものにするため、腫瘍抗原ペプチドを提示する樹状細胞などの抗原提示細胞を用いた工夫や、腫瘍に対する生体反応を増強する物質 (biological response

modifier;BRM) を併用した治療、遺伝子治療との併用など様々な角度からの研究を進めることを目的とし、SOXファミリーを抗原とした、gene-、peptide-、protein- based ワクチン療法として、SOXファミリー抗原特異的免疫反応を検討し、それをを用い癌治療への応用を確認する。癌ワクチン療法を含めた腫瘍免疫療法は、癌に対する手術療法、抗癌化学療法、放射線療法に続くこれからの治療法として期待されている。また、近年、注目されている microRNA との関係も検討する。

3. 研究の方法

(1) SOXファミリーの大腸における発現の解析

これまでの研究においてマイクロアレイの解析結果をもとに、大腸の発生と大腸癌発癌に関わる遺伝子として転写因子である SOX4を同定した。これをもとにSOX11、SOX17をはじめSOXファミリーの抗体を作成する。これを用い大腸癌細胞株での発現の検討や、正常大腸、胎児マウス大腸、大腸癌での免疫染色を行い、発現分布を確認する。さらに、我々の作成したSerial analysis of gene expression (SAGE)データベースにおいて、SOXファミリーの発現を正常大腸、大腸癌はじめ各種癌で評価する。

(2) SOXファミリーのシグナルに関わる検討

SOXファミリーに関して、luciferase assayを用いた検討を予定している。一部は既に予備実験として施行している。我々は、すでにSOX4 (Wild typeと Dominant negative)、SOX11他、Wntシグナル(Wnt3a、Frizzled、beta-catenin、TOPflash、FOPflash) の発現ベクターを作成し、また一部は譲渡にて入手し、蛋白作成や luciferase assayに使用する。HEK293細胞や、SW480細胞などの大腸癌細胞株にtransfection

を行い、SOXファミリーがWntシグナルに関わり、制御可能かどうか評価する。またWntシグナルのgene chipを用いたマイクロアレイを行い、SOXファミリーの発現によりWnt関連因子がどのように変化するかを詳細に検討する。

(3) ワクチン療法に対する準備

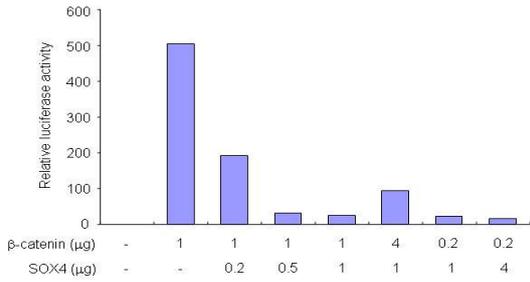
SOX4 ペプチドを作成しており、マウスに接種する予定である。今後 SOX11、SOX17の新たなペプチド、蛋白も作成する予定である。

(4) microRNA に関わる研究

大腸癌における SOX4 にかかわる microRNA を同定するため、ヒト大腸癌の microarray を行う。SOX4 (Wild type と Dominant negative)、Wnt シグナル (Wnt3a、Frizzled、beta-catenin、TOPflash、FOPflash) の発現ベクターを作成し、HEK293 細胞や SW480 細胞をはじめ大腸癌細胞株に transfection を行い、また、候補 microRNA を導入した luciferase assay を行い、microRNA signature を検討する。

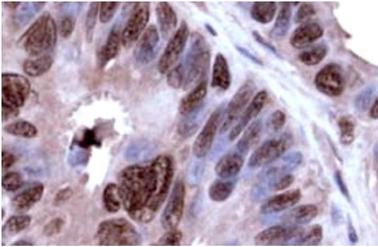
4. 研究成果

予備実験からmicroarrayにより、大腸の発生発癌に関わる遺伝子として同定した転写因子のSOX4とその属するSOXファミリーの発現ベクターを作成した。Wntシグナルに関わる検討行ったところ、SOX4がbeta-cateninを有意に制御することが判明した。またその他のいくつかのメンバーにおいても同様の結果であった。SOXファミリーは、Wntシグナルを制御し、大腸の発生と癌化に関与している可能性が示唆された。大腸癌細胞にSOX4を発現誘導させることにより、beta-cateninの核への移行を変化させ、大腸癌の進展を制御する可能性が示唆された。



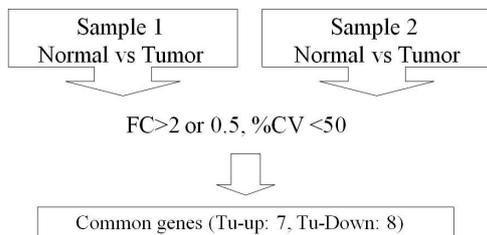
また、ヒト大腸癌組織において免疫染色を実施し、SOX4の分布を確認したところ、核に分布し、また一方では細胞質にも発現を認めた。統計処理を行い検討したところ、SOX4の発現が強陽性の場合、病期が進行しており、予後が不良であることが判明した。

大腸癌におけるSOX4の発現（免疫染色）

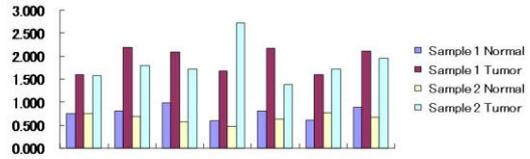


さらに大腸癌におけるSOX4にかかわるmicroRNAを同定するため、ヒト大腸癌のmicroarrayを行い、15種類の候補microRNAを導入した。

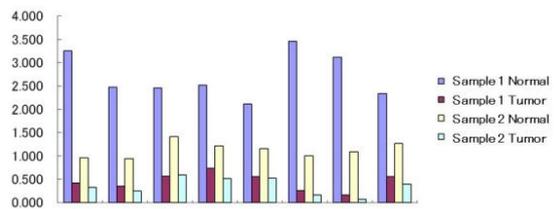
Strategy



大腸癌で増加しているmiRNA



大腸癌で減少しているmiRNA



SOX4 (Wild type と Dominant negative)、Wnt シグナル (Wnt3a、Frizzled、beta-catenin、TOPflash、FOPflash) の発現ベクターを作成し、HEK293 細胞や SW480 細胞をはじめ大腸癌細胞株に transfection を行い、また、候補 microRNA を導入した luciferase assay を行ったところ、一部の microRNA は SOX4 を制御し Wnt シグナルに関わる beta-catenin を制御することが判明した。また、それらの microRNA signature を検討したところ、signature の強弱により、大腸癌の進展が起きていると考えられた。

すなわち、SOX4 を用いた大腸癌の制御には、SOX4 のワクチン療法としての利用と、microRNA の導入によるものの可能性があると思われうる。

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 5 件)

- ① Pancreatic endometrial cyst: Report of a Case. Masaharu Oishi, Hiroki Hashida, Yoshiaki Yuba, Arimichi Takabayashi. Surgery Today, 査読あり、in press
- ② Suppression of colon cancer metastasis by Aes through inhibition of Notch signaling. Masahiro Sonoshita, Masahiro Aoki, Haruhiko Fuwa, Koji Aoki, Hisahiro Hosogi, Yoshiharu Sakai, Hiroki Hashida, Arimichi Takabayashi, Makoto Sasaki, Sylvie Robine, Kazuyuki Itoh, Kiyoko Yoshioka, Fumihiko Kakizaki, Takanori Kitamura, Masanobu Oshima, Makoto Mark Taketo. Cancer Cell, 査読あり、2011、Vol.19、No.1、pp.125-137
- ③ Inactivation of chemokine (C-C motif) receptor 1 (CCR1) suppresses colon cancer liver metastasis by blocking accumulation of immature myeloid cells in a mouse model. Takanori Kitamura, Teruaki Fujishita, Pius Loetscher, Laszlo Revesz, Hiroki Hashida, Shinae Kizaka-Kondoh, Masahiro Aoki, Makoto Mark Taketo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 査読あり、Vol.107、No.29、2010、pp.13063-13068
- ④ Case report of gastric cancer patient who suffered life-threatening adverse events including severe myelosuppression during neoadjuvant chemotherapy with S-1 and CDDP combination.

Shugo Ueda, Masahiro Yoshida, Hiroki Hashida, Masaharu Tada, Arimichi Takabayashi, Michiyuki Kanai. Gan To Kagaku Ryoho, 査読有り、Vol.35、No.9、2008、pp.1577-1581

- ⑤ Prognostic Significance of the Immediate Early Response Gene X-1 (IEX-1) Expression in Pancreatic Cancer. Tetsuro Sasada, Koichi Azuma, Tatsuya Hirai, Hiroki Hashida, Michiyuki Kanai, Takashi Yanagawa, Arimichi Takabayashi. Annals of Surgical Oncology, 査読有り、Vol.15、No.2、2008、609-617

[学会発表] (計 7 件)

- ① 橋田裕毅、骨盤臓器脱を考慮した完全直腸脱に対する腹腔鏡下直腸後方固定術の検討、第 65 回日本消化器外科学会総会、2010 年 7 月 14 日、下関
- ② 橋田裕毅、クローン病に対する手術治療と術前術後インフリキシマブ投与の有用性、第 110 回日本外科学会定期学術集会 2010 年 4 月 8 日、名古屋
- ③ 橋田裕毅、クローン病手術症例におけるインフリキシマブ使用の有用性、第 6 回日本消化管学会学術集会、2010 年 2 月 19 日、福岡
- ④ 上田修吾、橋田裕毅、StageIII 胃癌に対する術前・術後補助化学療法の有効性に関する検討、第 47 回日本癌治療学会総会、2009 年 10 月 22 日、横浜
- ⑤ 橋田裕毅、胆管癌における Mcl-1 の発現の検討、第 21 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、2009 年 6 月 11 日、名古屋
- ⑥ 橋田裕毅、切除不能酔瘳癌に対する血行再建を用いた選択的動注化学療法の有効性、第 46 回日本癌治療学会総会、2008

年 10 月 31 日、名古屋

- ⑦ 橋田裕毅、進行直腸癌に対する術前放射線療法と MRI 拡散強調像によるリンパ節転移診断の有用性、第 108 回日本外科学会定期学術集会、2008 年 5 月 15 日、長崎

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋田 裕毅 (HASHIDA HIROKI)

財団法人田附興風会・医学研究所 第 1 研究部・研究員

研究者番号：70281607