

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590415

研究課題名(和文) Sox遺伝子による  $\beta$ -カテニン転写ネットワーク制御と子宮内膜癌新規治療法への展開

研究課題名(英文) Sox4 functions as a positive regulator of beta-catenin signaling through upregulation of TCF4 during morular differentiation of endometrial carcinomas

研究代表者

三枝 信 (SAEGUSA, Makoto)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：00265711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)： $\beta$ -カテニン/TCF4シグナル系による子宮内膜癌細胞の増殖制御におけるSox遺伝子の機能解析を行った。子宮内膜癌培養細胞の増殖能は、Sox4/ $\beta$ -カテニン/TCF4/p21waf1に起因するシグナル系により抑制された。一方、siRNAによるSox4ノックダウンは、増殖促進となった。Sox4は、Sox7により発現誘導された。子宮内膜癌の臨床検体でも、培養細胞の結果と同様に、Sox7/Sox4、 $\beta$ -カテニン/TCF4およびp21waf1発現の関連が確認できた。以上から、Sox4/Sox7は、 $\beta$ -カテニン/TCF4シグナル伝達系と協調してp21waf1発現を介した子宮内膜癌細胞の増殖を抑制する。

研究成果の概要(英文)：In endometrial carcinoma (EmCa) cells, Sox4 could enhance beta-catenin/TCF4 transcription, through up-regulation of TCF4 at the transcription level, without any direct beta-catenin association. Cells stably overexpressing Sox4 showed significant decreases in proliferation rate, along with increases in expression of p21waf1, in contrast to increased cell growth observed with knockdown. Sox7 could transcriptionally up-regulate Sox4 expression. Finally, Sox4 immunoreactivity was frequently pronounced in morules of Em Cas, the expression being positively correlated with status of beta-catenin, TCF4, and Sox7, and inversely with cell proliferation. These data therefore suggest that Sox4 may serve as a positive regulator of beta-catenin signaling through alteration in TCF4 expression during morular differentiation of Em Ca cells, leading to inhibition of cell proliferation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：Sox遺伝子 細胞増殖  $\beta$ -カテニン遺伝子 TCF4遺伝子 子宮内膜癌

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、生活様式の欧米化に伴い、若年者を中心にホルモン異常を基盤とする type I 型子宮内膜癌の増加が指摘され、特に生殖年齢層での罹患率増加は、少子化などの重大な社会問題へも直結する。私たちは、若年子宮内膜癌の子宮温存を目的に、  
-カテニンシグナルループを分子基盤とした非観血的新規治療法の開発のための基礎研究に着手した。

(2) -カテニンは、TCF4 をはじめとする様々な転写因子と複合体を形成して多種・多様な遺伝子の転写調節を行う分子である。私たちは、これまでに子宮内膜癌の非観血的新規治療法の確立を目指して、  
-カテニンシグナル系による子宮内膜癌細胞の分化誘導・増殖制御の分子機構を解析してきた。その結果、臨床病理学的に、  
-カテニン遺伝子異常は若年者子宮内膜癌で高率に認められ、かつ、その予後良好因子と密接な関係を示した。子宮内膜癌培養細胞において、外因的に -カテニン遺伝子を導入することにより TCF4/p300 系、p14<sup>ARF</sup>/p53/p21<sup>WAF1</sup> 系、p16<sup>INK4A</sup>/Rb/cyclin D1 系、Cdx2/p21<sup>WAF1</sup> 系、及び Akt/Slug 系などの様々なシグナル系が転写レベルで制御され、結果として子宮内膜癌細胞の分化誘導・増殖抑制が生じることを明らかにした。このように、-カテニンは、様々なシグナル系を介して子宮内膜癌の発生・増殖に関与しており、次のステップとして、この -カテニンシグナル系を直接的に制御し、効率よく子宮内膜癌細胞の分化誘導・増殖抑制を惹起する因子の同定が必要となった。

(3) 胎生期に Wnt/ -カテニン伝達系と協調して臓器形成等に重要な役割を演じる分子として、Sox 遺伝子がある。この遺伝子群の多くが、-カテニンや TCF4 と直接的な会合を示し、-カテニンシグナル系を正または負に制御調節することが明らかになった。しかしながら、現時点で子宮内膜癌での Sox 遺伝子群の機能解析は、

殆ど手付かずのまま残されている。

## 2. 研究の目的

私たちは、様々な先行実験結果に基づいて、子宮内膜癌細胞では、Sox 遺伝子群が -カテニンシグナル系を直接的に制御する因子であり、両因子間で形成されるシグナルネットワークの解明より、子宮内膜癌の新規治療法の開発が期待できるという作業仮説を立案した。本研究は、この仮説を立証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 臨床検体(非腫瘍性・過形成・癌組織)による Sox 発現と機能解析:

Sox mRNA 及び蛋白発現の解析: 60 例の非腫瘍性子宮内膜、100 例の子宮内膜癌のホルマリン固定パラフィン標本と、各々 100 例の非腫瘍性及び癌の凍結組織検体で、免疫組織化学法、RT-PCR 法および Western blots 法により、各 Sox の mRNA/タンパク質発現を検索した。

Sox 発現のエピジェネティック制御の解析: Sox7 プロモーターの CpG island 領域を、Methylation-specific PCR (MSP)法で解析した。

子宮内膜癌組織における Sox 発現の意義: パラフィン切片で、各種増殖マーカーの発現検索を行い、  
、  
で得られた Sox 発現結果との関連を検索した。

子宮内膜癌組織での Sox と -カテニンシグナル系の関連性とその意義: 子宮内膜癌組織で、Sox と -カテニンシグナル系関連分子の発現との関連性を検索し、その意義を子宮内膜癌細胞の分化誘導・増殖抑制の観点から解析した。パラフィン切片及び新鮮凍結検体で、-カテニンと TCF4 の発現様式を検索し、  
、  
で得られた各々の結果から、その関連性を検索した。

### (2) 子宮内膜癌培養細胞を用いた Sox と -カテニンシグナル系とのネットワーク形成の証明とその機能解析:

Sox3、Sox4、Sox5、Sox6、Sox7、Sox9、Sox11、Sox17 をクローニングした。また、

発現制御機構の解析のため、Sox4 と Sox7 のプロモーター領域もクローニングした。Sox 過剰発現系およびノックダウン系による子宮内膜癌細胞の分化誘導・増殖動態への影響： )子宮内膜癌培養細胞の増殖あるいは増殖抑制過程における各 Sox の mRNA/タンパク質発現変化を検索した。 ) 恒常的 Sox 発現系や siRNA によるノックダウン系を作製し、細胞増殖能の変化を検索した。 ) Sox を子宮内膜癌培養細胞へ導入し、細胞レベルでの形態や増殖能の変化を検索した。

Sox による  $\beta$ -カテニンシグナル系制御機構の解析： の結果より  $\beta$ -カテニンシグナル系を相加・相乗的に制御する Sox を選定し、 $\beta$ -カテニンシグナル系構成分子の発現調節への関与を検索した。

#### 4. 研究成果

(1) Sox4 は、 $\beta$ -カテニン/TCF4 転写系を活性化する：Sox 遺伝子群はしばしば共発現するため、11 種の子宮内膜癌培養細胞株で、8 種類の内因性 Sox 遺伝子の mRNA を検索した。その結果、Sox3, Sox6, Sox9, Sox11 および Sox17 は高発現、Sox4, Sox5, および Sox7 は低発現であった (図 1)。

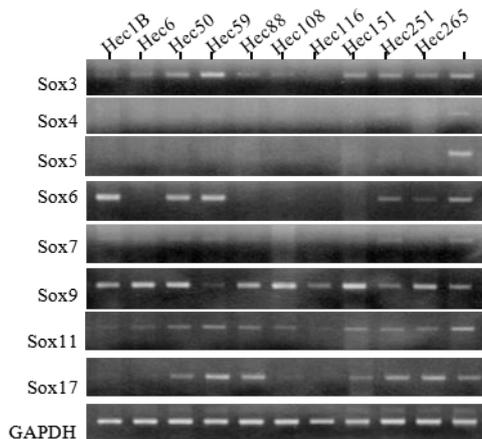


図1. 子宮内膜癌における Sox 遺伝子 mRNA 発現

次に、Sox が、 $\beta$ -カテニン/TCF4 転写に及ぼす影響を検索した。その結果、 $\beta$ -カテニン/TCF4 転写活性は、Sox4 により増強され、Sox3, Sox7, Sox17 により抑制された (図 2)。

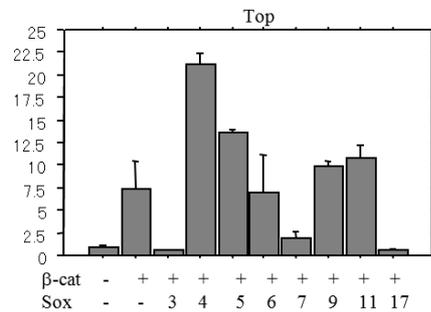


図2. Sox 遺伝子による  $\beta$ -カテニン/TCF4 転写制御

また、Sox4 による  $\beta$ -カテニン/TCF4 転写系増強作用は、Sox3, Sox7, および Sox17 の共発現により抑制された。一方、 $\beta$ -カテニンと Sox4 による one hybrid assay で、Sox4 による  $\beta$ -カテニン/TCF4 転写活性作用は、間接的作用であることが明らかになった。

(2) Sox4 遺伝子による TCF4 遺伝子の転写促進：子宮内膜癌細胞で、Sox4 を外因的に過剰発現させると内因性 TCF4 の mRNA およびタンパク質が増加した (図 3)。そこで、TCF4 遺伝子のプロモーター領域内に Sox4 結合配列を検索するために、5 種の TCF4 遺伝子のプロモーター欠失プラスミドを作製し検索したところ、TCF 遺伝子のプロモーター内の -432bp から -426bp の領域 (CTTTGAA) に Sox4 結合配列が存在した。

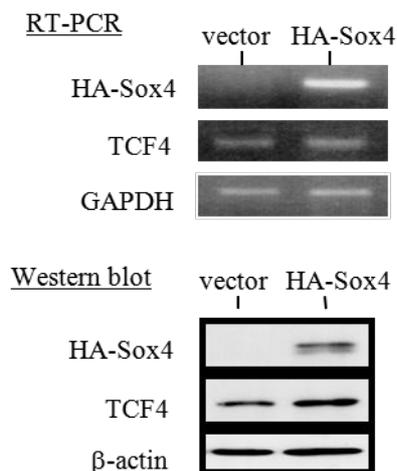


図3. Sox4による内因性TCF4発現誘導

(3) Sox4 遺伝子の子宮内膜癌細胞の増殖に及ぼす影響：

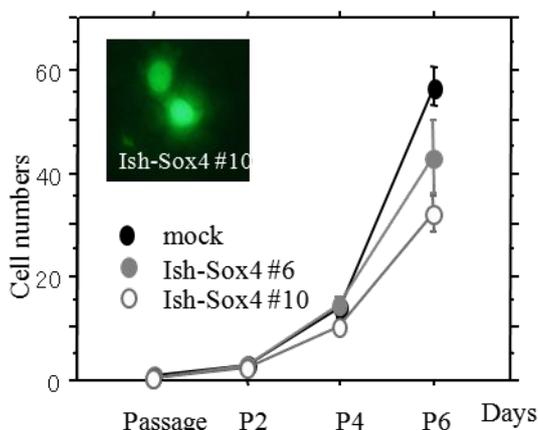


図4. Sox4過剰発現による内膜癌細胞の増殖抑制

血清除去による子宮内膜癌細胞増殖抑制過程で、Sox4、TCF4 および p21<sup>waf1</sup> の発現増加が認められた。siRNA による内因性 Sox4 のノックダウンにより子宮内膜癌細胞の増殖促進が生じ、同時に内因性 TCF4 や p21<sup>waf1</sup> の発現増加が生じた。また、Sox4 を恒常的に発現する子宮内膜癌細胞は、増殖抑制と TCF4 及び p21<sup>waf1</sup> 発現亢進が認められた (図4)。

(4) Sox7 遺伝子は Sox4 遺伝子発現を誘導する：(1)で、子宮内膜癌では様々な Sox 遺伝子が共発現することが明らかになったことから、Sox4 発現に及ぼす Sox 因子を検索した。Sox4, Sox5, Sox6, Sox7, および Sox9 のうち、Sox7 が Sox4 プロモーター活性を活性化し、同時に Sox7 過剰発現に伴う Sox4 遺伝子の mRNA およびタンパク質発現が増加した (図5)。

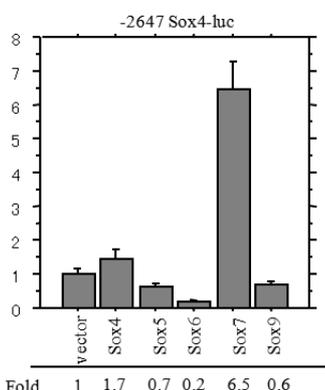


図5. Sox7によるSox4プロモーター活性亢進

Sox4 プロモーターには、4つの Sox 結合配列が存在した。そこで、段階的に Sox4 プロモーターを欠損させたプラスミドを作製し、Sox7 に対する反応性を検索したところ、段階的に Sox7 に対する Sox4 プロモーター活性が減少し、Sox4 プロモーター内には、複数の Sox7 結合配列が存在する可能性が示唆された。

(5) 正常子宮内膜および内膜癌組織での免疫組織学的検索：正常子宮内膜では、Sox4 発現は認められなかった。Sox7 は分泌期早期に子宮内膜腺に認められた。子宮内膜癌では、Sox4 と Sox7 の共陽性所見が、腫瘍内 morule 巣で認められた。同様の核内陽性染色所見が、 $\beta$ -カテニン、TCF4 および p21<sup>waf1</sup> で認められ、これらの因子は互いに正の相関を示した(図6)。一方、これらの発現は、増殖能と負の相関を示した。

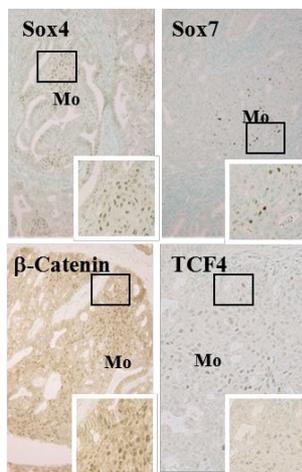


図6 子宮内膜癌におけるSox4, Sox7,  $\beta$ -カテニンおよびTCF4発現

臨床病理学的に、Sox4 と Sox7 発現は、高分化型腫瘍や軽度の筋層浸潤およびリンパ節転移の欠如と関係した。

以上から、子宮内膜癌培養細胞による検索で得られた Sox7/Sox4 系が  $\beta$ -カテニン/TCF4 シグナル系を介して子宮内膜癌細胞の増殖を抑制する所見が、臨床検体でも確認することができた。

(6) 子宮内膜癌では Sox7 遺伝子プロモーターのメチレーションが認められる：

Sox7 遺伝子プロモーターのメチレーションが、様々な腫瘍で報告されている。そ

ここで、子宮内膜癌での Sox7 遺伝子プロモーターのメチレーションの有無を Methylation specific-PCR 法で検索した。その結果、子宮内膜癌において、高分化型の 18.8%、低分化型の 35.3% に認められ、その陽性は Sox7 遺伝子発現と負の相関を示した ( 図 7 )。

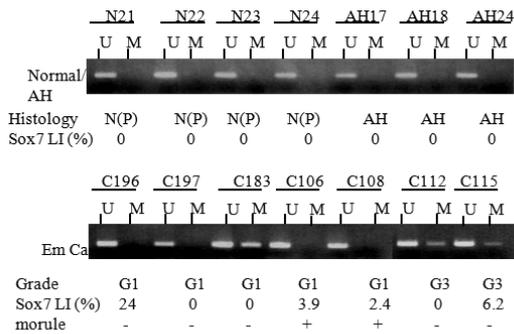


図7. 子宮内膜癌におけるSox7プロモーターのメチレーション

#### ( 7 ) まとめ

子宮内膜癌では、Sox4/Sox7 系が  $\beta$ -カテニン/TCF4 シグナル伝達系を正に制御し、その結果、p21<sup>waf1</sup> 発現を介して子宮内膜癌細胞の増殖抑制が生じることが明らかになった。今後、本研究成果を基に、子宮内膜癌の非観血的新規治療法の開発を試みたい。

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] ( 計 3 件 )

Yoshida T, Hashimura M, Kuwata T, Matsumoto T, Suzuki E, Tazo Y, Nakajima H, Inukai M, Saegusa M. Transcriptional regulation of the alpha-1 type II collagen gene by NF-  $\beta$ /p65 and Sox9 in the chondrocytic phenotype of uterine carcinosarcomas. Hum Pathol 2013;44:1780-1788 査読有、DOI: 10.1016/j.humpath.2012.12.019.

Saegusa M, Hashimura M, Suzuki E, Yoshida T, Kuwata T. Transcriptional up-regulation of Sox9 by NF-  $\beta$  in endometrial carcinoma cells, modulating cell proliferation through alteration in the p14<sup>ARF</sup>/p53/p21<sup>WAF1</sup> pathway. Am J Pathol 2012;181:684-692 査読有、

DOI:10.1016/j.ajpath.2012.05.008.

Saegusa M, Hashimura M, Kuwata T. Sox4 functions as a positive regulator of  $\beta$ -catenin signaling through upregulation of TCF4 during morular differentiation of endometrial carcinomas. Lab Invest 2012;92:511-521 査読有、DOI: 10.1038/labinvest.2011.196.

[学会発表] ( 計 3 件 )

橋村美紀、三枝 信、他. NF-  $\beta$ /Sox9 による Col2A1 遺伝子発現制御を介した子宮内膜癌肉腫細胞の軟骨分化誘導機構. 第 102 回 日本病理学会総会、2013 年 6 月 6 日、札幌

三枝 信、他. Sox4 は、 $\beta$ -カテニン/TCF4 シグナル伝達系と協調して子宮内膜癌細胞の増殖制御・転位分化を促進する. 第 101 回 日本病理学会総会 2012 年 4 月 28 日、東京

#### 6 . 研究組織

( 1 ) 研究代表者

三枝 信 ( SAEGUSA Makoto )  
北里大学・医学部・教授  
研究者番号 : 00265711

( 2 ) 研究分担者

なし

( 3 ) 連携研究者

なし