

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590466

研究課題名(和文) beta-Catenin/Sox2/p63シグナルの肺上皮分化・腫瘍発生制御解析

研究課題名(英文) Analysis of beta-Catenin/Sox2/p63 Signal Pathway in Lung Epithelial Differentiation and Tumorigenesis

研究代表者

橋本 修一 (Hashimoto, Shuichi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授

研究者番号：00243931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)： Wnt/ β -cateninシグナルおよび関連因子のうちSox2は小細胞癌で、Sox9は扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌において、p63は主に扁平上皮癌で、Notch1は腺癌に発現が高く、それぞれの肺癌亜型の腫瘍発生への関与が示唆された。次に、VA10の3D培養からB10が細胞極性に貢献することを示し、Wnt3a+EGFの共刺激がspheroidコロニーからの顕著な細胞伸長を誘導することから細胞の増殖・分裂を促進することが示唆された。ChIP解析において β -cateninがSox2プロモーター領域に結合せず、他の間接的機構によりSox2発現を抑制している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： We clarified the expression of Wnt/ β -catenin signaling and related factors in lung cancers and the regulatory mechanisms between β -catenin and Sox2 expression. Sox2 was highly expressed in small and squamous cell carcinomas, Sox9 in squamous but also in adeno and large cell carcinomas, p63 in squamous cell carcinomas, and Notch1 especially in adenocarcinomas. These data suggests their own functions in tumorigenesis or tumor progression in each lung cancer subtype. Next we established the 3D culture system of human bronchial basal cells (VA10). Using this system we clarified that B10 (GSK3 inhibitor) contributed to form cell polarity and co-stimulation of Wnt3a and EGF induced distinct extension of cells from the sphere colonies suggesting the function to accelerate cell cycling or cell division. ChIP analysis revealed that β -catenin might not directly bind the Sox2 promoter region and downregulate Sox2 expression in other indirect way.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：Lung Cancer Epithelium Differentiation Stem Cell β -catenin Sox2 p63

1. 研究開始当初の背景

ヒト成熟肺は気管支、細気管支からなる気道系とその末梢に連続しガス交換の機能を担う肺胞系からなる。気道系上皮は主に基底細胞、線毛細胞、無線毛円柱上皮 (Clara) 細胞、杯細胞、神経内分泌細胞からなり、肺胞系上皮は立方状の肺胞 II 型及び扁平状の I 型細胞からなりそれぞれの分化した機能を営んでいる。これら肺上皮細胞の正常な分化、成熟が阻害されると先天性嚢胞性腺腫様奇形 (Congenital cystic adenomatoid malformation; CCAM) などの先天奇形、気管支肺異型性 (Bronchopulmonary dysplasia; BPD) などの肺傷害疾患に代表される胎児・小児期肺疾患の原因や、気管支拡張症や肺気腫など成人の慢性肺疾患の誘因をなすと考えられる。また、近年においては肺における幹細胞の存在が指摘され (Kim et al., *Cell* 121,823-35, 2005)、さらには、肺癌の増殖・浸潤にいわゆる癌幹細胞の存在も重要視され (Curtis et al., *Cell Stem Cell* 7, 127-33, 2010)、肺幹細胞の維持・分化制御機構、肺癌幹細胞の維持・増殖制御機構を明らかにすることは肺再生医療の開発、肺癌の増殖特性の解明ならびに治療法の開発の上でも重要であると考えられる。

マウス成熟肺の構造はヒト成熟肺の構造と類似しマウス発達肺はヒト発達肺の研究モデルとして用いられている。マウス発達肺においてはおよそ胎齢 9.5 日 (E9.5) に前腸から内胚葉成分が周囲の間葉系成分の中に隆起突出する形で発生し左右の管状構造に分かれた後左右それぞれの分枝が、以後、内胚葉-間葉系細胞成分の複雑な相互作用の中で 2 分枝を繰り返す形で原始気道系が発達していく (branching morphogenesis) (Metzger et al., *Nature* 453, 745-50, 2008, Hashimoto et al., *Mech Dev* 119, S303-9, 2002)。この分枝形成過程において多分化能を有する上皮前駆細胞は管状構造の先端 (distal tip) に存在し、胎齢が進む中でその娘細胞が幹部管状上皮部分を構成して行き前記各気道上皮細胞成分へと分化し、先端部分の多分化能細胞は最終的に肺胞上皮へと分化していくと考えられている (Rawlings et al., *Development* 136, 3741-5, 2009, Morissey & Hogan, *Dev Cell* 18, 8-23, 2010)。また、これら肺発達初期原始気道系と原始肺胞系の系統分化のすみ分けの中で Sox2 (Sry-box 2) が原始気道系の、Sox9 が原始肺胞系の系統分化に重要であると考えられている。

Wnt/ β -catenin シグナル系は種々の臓器発達の中心的制御因子であり、細胞の増殖・分化、細胞系統分化規定など多彩な細胞機能をコントロールする (Clevers, *Cell* 127, 469-80, 2006)。Wnt リガンドは肺の分枝形成過程においては内胚葉、間葉系のいずれかあるいは両方の細胞において産生され分枝管状構造先端の内胚葉系前駆細胞の運命を規定して

いる。これまで Wnt/ β -catenin シグナル系の発達肺における機能解析として、トランスジェニックマウスを用いた解析で分枝管状構造先端の内胚葉系前駆細胞において同シグナル系の主要因子である β -catenin の発現を抑制することにより同シグナル系の機能を抑制し肺胞系発達に欠如が認められるが気道系の発達には影響を与えないことが報告されている (Mucensky et al., *J Biol Chem* 278, 40231-8, Zemke et al., *Am J Respir Cell Mol Biol* 41, 535-43, 2009)。これらの所見は脾臓の発達における β -catenin 依存性の Wnt シグナル系 (Canonical Wnt signaling) が腺房細胞の発達には重要であるが島細胞の発達には影響を与えないことと類似している (Murtaugh et al., *Development* 132, 4663-74, 2005)。また、Canonical Wnt/ β -catenin シグナル系では、Wnt リガンドがレセプターと非結合状態のときは細胞質内 β -catenin の N 末側が GSK3 と CK1 α セリン/スレオニン・キナーゼによりリン酸化を受けユビキチン-プロテアソーム系により分解され β -catenin の核内移行が阻害され転写活性が阻害される。これに対し Wnt リガンドがレセプターと結合状態のときは β -catenin N 末側のリン酸化が阻害されユビキチン-プロテアソーム系による分解から回避されることにより β -catenin は安定化し核内移行が起こり転写活性が惹起され、下流の cyclin D、c-myc などのターゲット遺伝子が活性化されシグナル系が活性状態となる。

これらの報告から私はこれまでに Wnt/ β -catenin シグナル系が発達肺において分枝管状構造の先端に位置する多分化能肺上皮前駆細胞に作用し気道系と肺胞系の系統分化に重要な役割を担っているという仮説を立て、その証明のために発達肺分枝管状構造先端の多分化能肺上皮前駆細胞内に Cre recombinase の誘導を介した β -catenin の GSK3、CK1 α によるリン酸化部位を含む N 末側の欠失を誘起し安定型 β -catenin の発現を誘導することにより Wnt シグナル系を活性化状態にするトランスジェニックマウス (*Sftpc-Cre; Ctnnb1^{(ex3)lox}*) を構築しこの系を用いた実験を行った。

これにより、安定型 β -catenin の発達肺分枝管状構造の先端多分化能肺上皮前駆細胞内の誘導発現は、細気管支の発達阻害と嚢胞変化を惹起するが肺胞形成にはほとんど影響を与えないこと、安定型 β -catenin の発現が起こった気道上皮細胞はいずれの上皮への分化も阻害されており、アポトーシスを介さない細胞分裂阻害が起こっていることを見出した。また、同細胞において安定型 β -catenin の発現は前述の気道上皮系分化に重要な Sox2 発現を阻害し、逆に肺胞上皮系分化に重要な Sox9 を誘導していた。また、私は中枢気道系の基底細胞に発現が見られる p63 が発達肺の原始気道系の末梢領域の単層原始気道上皮細胞の核内にも発現がある

ことを見出すとともに、安定型 β -catenin 発現原始末梢気道上皮未分化前駆細胞において p63 の発現が抑制されていることを見出した。さらには p63 ノックアウトマウス肺の検討から p63 未発現の原始末梢気道上皮未分化前駆細胞の無線毛円柱上皮 (Clara) 細胞への分化が抑制されていることを見出した。以上の結果より、要約すると、安定型 β -catenin は Sox2、p63 発現を抑制し、逆に Sox9 を誘導することにより多分化能気道上皮前駆細胞を肺胞上皮系へと分化する方向に機能することにより、原始気道上皮系と原始肺胞上皮系の系列分化に重要な役割を担っていることを見出した (Hashimoto et al., J. Cell Sci., 125(4); p932-42, 2012)。しかしながら、 β -catenin/Sox2/p63/Sox9 それぞれの分子間の直接的分子間相互作用およびより詳細な分子レベルでの制御機構についてはまだ明らかではない。

近年、トランスジェニックマウスを用いた Notch シグナル系の抑制実験において、Clara 細胞の分化抑制、線毛細胞および神経内分泌細胞の過分化誘導を認めている (Tsao et al., Development 136, 2297-2307, 2009)。また、Mash1/Ascl1 の高発現が神経内分泌細胞の分化を誘導し、さらには Notch のターゲット因子 Hes1 が Mash1/Ascl1 の発現を抑制することにより神経内分泌細胞分化を抑制することが示された (Ito et al., Development 127, 3913-21, 2000)。よって Notch シグナル系も気道上皮系分化誘導のバランスにおいて重要なシグナル系であることが示された。また、Notch シグナル系のリガンドである Jagged1 が p63 発現により誘導されるとする報告もあり (Sasaki et al., J Biol Chem 277, 719-724, 2002)、Wnt/ β -catenin シグナル系とのクロストークも示唆される。

2. 研究の目的

我々は *Sftpc-Cre;Cttnb1^{(ex3)lox}* トランスジェニックマウスを用いた研究で β -catenin が Sox2、p63 発現を抑制することにより β -catenin/Sox2/p63 シグナル軸が肺の末梢気道上皮細胞の分化を停止・制御することを見出し同シグナル軸が発達肺において気道上皮系と肺胞上皮系の系列分化に重要であることを見出した。また、我々の別のグループは *Sftpc-Cre;Rosa26R-Sox2-IRESGFP* トランスジェニックマウスを用い末梢気道上皮および肺胞上皮における Sox2 の高発現のみで肺癌を誘発し得ることを示し Sox2 高発現が肺において腫瘍原性であることを明らかにした。この研究では β -catenin/Sox2/p63 シグナル軸の気道、肺胞上皮系の分化制御における各因子間の直接的分子間相互作用、Notch、Shh シグナル系とのクロストークを解析し、Sox2 の肺腫瘍誘発における分子制御機構との関連についても検討する。

3. 研究の方法

1) 肺癌における肺上皮分化および肺幹細胞維持・分化関連因子発現解析。

a. 蛋白発現解析

熊本大学において肺癌の手術が行われ病理部に提出された症例計 21 例 (腺癌 10 例、扁平上皮癌 5 例、小細胞癌 3 例、大細胞神経内分泌癌 3 例) につき、肺上皮分化および肺幹細胞維持・分化関連因子として重要な Sox2/Sox9/p63/Notch1 の蛋白発現を中心に酵素抗体免疫染色法により解析を行った。また、各症例における各因子の発現解析における判定は、Distribution score:DS を 0-3 の 4 段階に、Intensity score:IS を 0-3 の 4 段階に分け、Total score:TS=DS \times IS の値をもって代表値とし各肺癌組織型 TS 間で比較検討を行った。

b. 遺伝子発現解析

各組織型肺癌細胞株 (腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、大細胞癌) における、肺上皮分化および肺幹細胞維持・分化関連因子として重要な Sox2/Sox9/p63/Notch1 の遺伝子発現解析を行った。各肺癌細胞を 48 穴プレートで培養し約 80%コンフルエントの状態に細胞を溶解し RNA を抽出した後 cDNA を作成した。これをテンプレートとして Cyber Green I 法あるいは FAM プローブ法により、本科学研究費基盤 C の予算で購入した LightCycler Nano (Roche, Penzberg, Germany) を用い Real-Time qPCR を行い各遺伝子発現の比較解析を行った。

2) ヒト気管支基底細胞株 (VA10) の 3 次元培養法の確立と肺上皮分化誘導因子刺激・阻害による分化動態の解析。

VA10 細胞を Growth Factor Reduced Matrigel (BD Biosciences, MA, USA) 中で 3 次元 (3D) 培養可能な条件設定を行った。3D 培養条件を確立した後、VA10 細胞を BIO, Wnt3a, FGF10, EGF の投与下で培養を行い、細胞分化動態の解析を行った。また、気管支基底細胞で発現する幹細胞マーカー p63 の阻害目的で p63 siRNA (Qiagen, Cambridge, MA, USA) を、本科学研究費基盤 C の予算で購入した Neon (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用い VA10 細胞内に遺伝子導入を行い、VA10 の分化動態の解析を行った。

3) β -catenin による Sox2 発現制御機構解析。

β -catenin による Sox2 発現制御機構の解析として、Sox2 プロモーター領域への β -catenin 結合により Sox2 発現が制御されているかどうかを明らかにするために、ChIP (chromatin immunoprecipitation) 法を用い解析を行った。まず、VA10 細胞を BIO (1 μ M) 投与下で 2 日間培養し、ホルマリン固定後、ChIP 解析キット (Active Motif, Carlsbad, CA, USA) を用い DNA を抽出し、酵素による DNA 断片化を行った。断片化 DNA に対し、抗 β -catenin 抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を用いた ChIP 解析を同社のプロトコールに従って行った。これら

Input DNA および ChIP DNA をもとに、Sox2 promoter 領域に対するプライマーセット (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を用い、Real-Time qPCR 解析を行った。

4. 研究成果

1) 肺癌における肺上皮分化および肺幹細胞維持・分化関連因子発現解析。

a. 蛋白発現解析

Sox2 発現は核に発現が見られ、平均 TS で腺癌(Adc) : 4.2、扁平上皮癌(Sqc) : 7.8、小細胞癌(Smc) : 9、大細胞神経内分泌癌(LCNEC) : 5.7 の結果となり、Smc (Fig1,C)、SqC で特に発現が強く見られ、LCNEC および Adc でも部分的に発現が見られた。

Sox9 発現は核に発現が見られ、平均 TS で Adc : 4、SqC : 6.2、Smc : 6、LCNEC : 6.3 (Fig1,D) であり、全例で中等度から高度の発現が見られた。

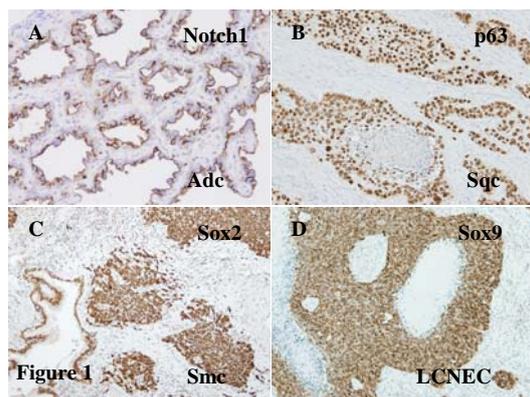
p63 発現は核に発現が見られ、平均 TS で Adc : 2.4、SqC : 9、Smc : 3.3、LCNEC : 1.7 であり、特に SqC (Fig1,B) に強い発現が見られた。

Notch1 発現は平均 TS で Adc : 7.5、SqC : 1、Smc : 0.3、LCNEC : 1.7 であり、特に Adc に強い発現が見られた (Fig1,A)。発現部位は分化の良いものでは主に膜に発現が見られたが、分化の悪いものでは膜の反応が低下し、核にも反応が見られる傾向があった。

b. 遺伝子発現解析

ヒト肺癌培養細胞株 (九州大学胸部疾患研究施設中西洋一教授および病理病態学 中川和憲講師より供与) 抽出 RNA からの Real-Time qPCR による遺伝子発現解析では、Sox2 は SBC3 (小細胞癌) に、Sox9 は EBC1 (扁平上皮癌)、PC9 (腺癌)、A549 (腺癌)、Lu99 (大細胞癌) に発現の高い傾向が見られ、SBC3、SBC5 (小細胞癌) には低い発現を認めた。Notch1 は A549、Lu99 で発現の高い傾向を認めたが、SBC3 でも高い傾向を認めた。

以上、肺癌における蛋白および遺伝子発現解析より、Sox2 は小細胞癌および扁平上皮癌で高い発現傾向が、Sox9 は扁平上皮癌で高い傾向が見られたが、腺癌、大細胞癌でも高い傾向が見られた。p63 は扁平上皮癌に特に高い傾向が見られた。Notch1 は主に腺癌、大細胞癌に高い発現が見られた。腺癌においては分化が良いものでは膜に発現が見られたが、分化が悪いものでは膜の発現が低下する傾



向が見られ、核の発現も一部に認められた。これらの結果より、Sox2、Sox9、p63、Notch1 は、それぞれに肺癌亜系の癌化・増殖などの機構に関与していることが示唆された。

2) ヒト気管支基底細胞株 (VA10) の 3 次元培養法の確立と肺上皮分化誘導因子刺激・阻害による分化動態の解析。

まず、VA10 細胞が BIO (β -catenin の N 末側リン酸化阻害剤) 投与により Wnt/ β -catenin シグナル系が実際に活性化されるかどうかを検証した。VA10 細胞は BIO 投与下培養にて、Real-Time qPCR 遺伝子発現解析から、 β -catenin 破砕複合体 Axin2、および、核内転写複合体 Lef1 の遺伝子発現が有意に亢進し、Wnt/ β -catenin シグナル系の活性化を確認した。この BIO 処理、Wnt/ β -catenin シグナル系活性下で幹細胞マーカー、p63、Sox2、Notch1 遺伝子発現は有意に減少し、逆に、Sox9 遺伝子発現は亢進した。誘導 β -catenin 発現がこれら遺伝子発現変位を誘導することから VA10 の幹細胞としての分化を制御している可能性を示した。

次に、VA10 の 3D 培養法の確立をめざし、種々の培養条件の検討を行った結果、以下の適合条件を見出した。即ち、Growth Factor Reduced Matrigel (BD Biosciences, MA, USA) : 培養液 (BEBM+supplement) = 1:1 の希釈ゲル $200 \mu\text{l/well}$ (8 ウェルガラススライド) 中に VA10 細胞 1×10^4 個を含む割合で各ウェルに分注し、ゲルが固まった後 $200 \mu\text{l}$ の培養液を上層に加え、インキュベーター中で $5\% \text{CO}_2$ 、 37°C の条件下で最大 3 週間培養することに成功した。

このシステムを用い、BIO、Wnt3a、FGF10、EGF の刺激下で VA10 を培養し分化動態の解析を行った。まず、BIO のみの処置では個々の sphere コロニーの大きさ (切片作成後の面積) が BIO 刺激群で大きい傾向が見られた (BIO(-) : $1352.2 \mu\text{m}^2$ < Bio(+) : $2628.4 \mu\text{m}^2$, $p=0.043966$, $n=5$)。また、BIO 処理群で外側 p63、内側 involucrin 発現を示す細胞極性分化に成功した (Fig. 2)。

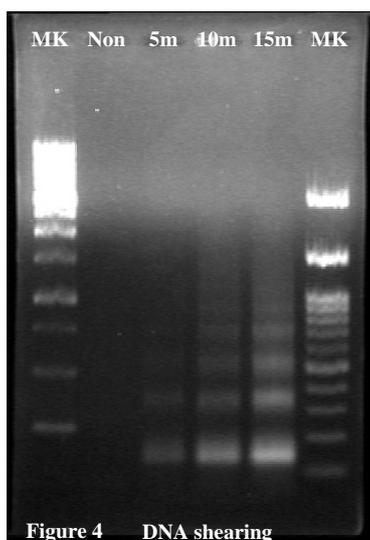
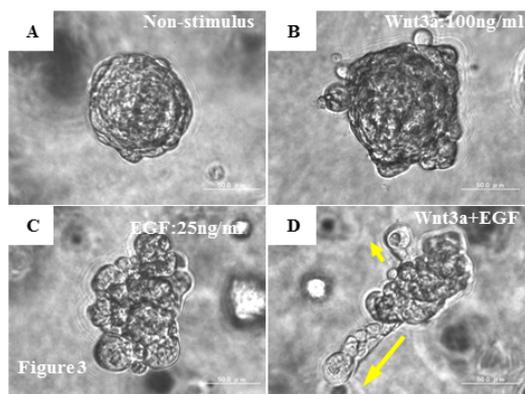


VA10 細胞の Wnt3a、FGF10 (Heparin 存在下でのみ効果あり)、EGF の処理培養においてはいずれにおいても VA10 細胞の short budding が誘発された。また、Wnt3a/EGF の共刺激で budding 長が長く顕著であり (Fig. 3, D 矢印)、走化能および分裂能に重要な影響を及ぼすことが確認できた。

3) β -catenin による Sox2 発現制御機構解析。

BIO ($1 \mu\text{M}$) 処理下、2 日培養後の固定後の VA10 細胞からの抽出 DNA に対する、抗 β -catenin 抗体を用いた ChIP 解析を行った。まず、酵素による DNA 断片化の条件設定を行い最終的に、 37°C 、15 分間の酵素処理で、DNA

は約 100～200bp 毎の断片化に成功した (Fig. 4)。



この断片化 DNA に対して、抗 β -catenin 抗体を用い ChIP 解析を行った。Input DNA, ChIP DNA をそれぞれ精製、調整し、これら DNA をもとに、Sox2 promoter 領域に対するプライマーセット (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を用いて Cyber Green I 法による Real-Time qPCR を行った。その結果、Input DNA に対しては遺伝子増幅が見られたが、ChIP DNA に対しては遺伝子増幅が見られず、 β -catenin は Sox2 promoter 領域には結合していない可能性が示唆された。即ち、 β -catenin 強発現による Sox2 発現抑制は、 β -catenin の直接的、Sox2 promoter 領域への結合による阻害ではなく、間接的機構による阻害が示唆された。

今回の一連の研究を通し、変異 β -catenin を用いた Sox2 の制御解析機構の解明、および BIO, Wnt3a/EGF 処理 VA10 細胞のマウス皮下移植法による解析の実験まで行うことが出来なかった点が反省点として考えられた。

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 2 件)

- ① 橋本修一、中川和憲、Barry R Stripp、免疫組織化学的染色法；講座 研究手法入門：生化学的・免疫学的実験法、呼吸、査読無、32 巻 12 号、2013、1162-1175
- ② 橋本修一、発達肺および傷害再生肺における肺上皮分化制御機構 - 肺幹細胞生物学の進歩と肺再生医療への礎 - 日本肺サーファクタント・界面医学会雑誌、査読無、44 巻、2013、2-15

[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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
作製なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 修一 (HASHIMOTO Shuichi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号：00243931

(2) 研究分担者

なし。 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

伊藤 隆明 (ITO Takaaki)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：70168392