

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430107

研究課題名(和文) SOX17発現抑制と炎症反応の相互作用によるがん悪性化機構の研究

研究課題名(英文) SOX17 suppression and inflammation in malignant cancer progression

研究代表者

大島 浩子(Oshima, Hiroko)

金沢大学・がん進展制御研究所・准教授

研究者番号：80362515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：SOX17遺伝子はSOXファミリーに属する転写因子で、腫瘍形成に関与すると考えられている。また、SOX17はWntシグナル標的因子として報告されているが、大腸がん細胞ではSOX17の発現低下が報告され、がん抑制遺伝子としての可能性も示唆されている。よって、SOX17が、向腫瘍性か抗腫瘍性に作用するのかは未だ明らかとされていない。本研究では、各種マウスモデルを用いて遺伝学的解析により、腫瘍の悪性化過程におけるSOX17の役割について解析した。本研究により、SOX17は腫瘍発生初期からWntシグナル依存的に発現誘導されるが、腫瘍発生過程と粘膜下浸潤過程のどちらにも関わっていない可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Transcription factor SOX17 has been shown to function as “tumor promoter” and also “tumor suppressor”, and the role of SOX17 in tumorigenesis has not yet been elucidated. In this project, the roles of SOX17 in intestinal tumor development and malignant progression with submucosal invasion have been examined by mouse genetic studies. We found that SOX17 expression is induced by Wnt signaling-dependent manner in tumor cells. However, disruption of SOX17 gene did not cause any morphological change of intestinal tumors. Moreover, the number, size, and invasion status of intestinal tumors were not changed by SOX17 disruption. These results indicate that SOX17 is dispensable for intestinal tumor development and malignant progression.

研究分野：分子病理学

キーワード：SOX17 マウスモデル 大腸がん

1. 研究開始当初の背景

SOX17 遺伝子は、SOX ファミリーに属する重要な転写因子である。また、SOX17 は、Wnt シグナルによってその発現が制御される、Wnt シグナル標的遺伝子でもある。以上の結果から、SOX17 が Wnt シグナルの下流で、腫瘍促進に働くのではないかと想定される。一方で、SOX17 はヒトの大腸がん細胞では、プロモーターのメチル化により発現抑制されることが報告されていることから、がん抑制遺伝子の可能性も考えられている。したがって、SOX17 遺伝子が「がん遺伝子」として働くのか、「がん抑制遺伝子」として作用するのかについては、未だ明らかにされていない。我々のこれまでの研究結果から、大腸がん発生の初期では、SOX17 は Wnt シグナルを抑制する作用によって、がん抑制遺伝子として働いており、腫瘍の悪性化過程では、SOX17 遺伝子発現の抑制により、がん促進に働く可能性が示唆された。しかし、その詳しいメカニズムについては明らかとされていなかった。また、SOX17 の腫瘍形成における作用についての個体レベルでの解析から、初期の大腸がん発生過程には、SOX17 遺伝子は関与していない可能性が示唆されているが、その後の腫瘍の悪性化や浸潤過程での SOX17 遺伝子の関与に関しても明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

これまでの研究成果を基盤として、本研究は浸潤を伴う大腸がん悪性化に SOX17 が関わっているかを明らかにすることを目的として実施した。この目的を達成するため、これまでに申請者らが作製した、浸潤を伴う腸管腫瘍発生マウスモデルとして、*Apc^{A716}/Tgfr2^{AIEC}* 複合マウスを使用し、このマウスで SOX17 を欠損させることによる腫瘍発生への影響について組織病理学的に解析した。また、*Apc^{A716}/Tgfr2^{AIEC}* 複合マウスに発症する腫瘍は主に小腸であり、大腸の腫瘍形成の解析が難しい。そこで、一般的によく用いられる炎症依存的に大腸がんを発生する AOM/DSS 投与の系を用いて大腸がん形成における SOX17 の役割について検討した。

本研究により SOX17 が、浸潤を伴うより悪性化した腫瘍形成にどのように関与しているか、また、炎症依存的な大腸腫瘍形成にも関与しているかについて検討を行った。

3. 研究の方法

浸潤を伴う腫瘍発生マウスモデルとして、*Apc^{A716}/Tgfr2^{AIEC}* 複合マウスを使用した。*Apc^{A716}* マウスは、腸管上皮細胞での正常 *Apc* 遺伝子の LOH による欠損により、Wnt シグナルが活性化して浸潤を伴わない良性腫瘍を発生する。また、*Tgfr2* (TGFβ2 型受容体) 遺伝子を正常腸上皮細胞で特異的に欠損させても、上皮細胞の形態変化がおこらない。一方、*Apc^{A716}/Tgfr2^{AIEC}* 複合マウスに発症する腸管腫瘍は、粘膜下浸潤する悪性腫瘍である。SOX17 遺伝子はホモ欠損で胎生致死となるため、SOX17 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウス *SOX17^{flox/flox}* マウスを導入して用いた。タモキシフェン投与により腸管特異的に、SOX17 を欠損させるため、*Villin-CreERT2* マウスを用いた。これらのマウスを交配し、*Apc^{A716}/Tgfr2^{flox/flox}/SOX17^{flox/flox}/Villin-CreERT2* を作製した。このマウスに、離乳後の 4 週齢から、1 週間に 1 回、腹腔投与でタモキシフェンを 4mg ずつ投与した。こ実験の対照群として、*Apc^{A716}/Tgfr2^{flox/flox}/Villin-CreERT2* マウスを準備した。約 15 週齢から 20 週齢の間に病理解剖を行い、腸管腫瘍発生の頻度、浸潤腫瘍の発生率などについて、組織病理学的に解析した。

また、炎症依存的に発症する大腸腫瘍発生の变化について解析するため、*SOX17^{flox/flox}/Villin-CreERT2* マウスを作製し、対照群として、Cre マウスの入っていない、*SOX17^{flox/flox}* マウス、あるいは *SOX17^{flox/+}/Villin-CreERT2* マウスを準備した。これらのマウスにアゾキシメタン(AOM)投与、およびデキストラン硫酸(DSS)投与による AOM/DSS 処理を行った。AOM 投与後 15 週間後に病理解剖を行い、腫瘍症状の解析を行った。

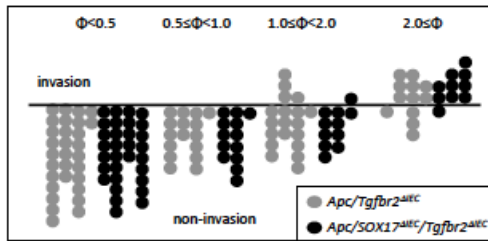
また、SOX17 遺伝子が欠損していることについては、それぞれサンプルからゲノム DNA を調整し、PCR によって確認するとともに、SOX17 抗体による免疫染色法によって確認した。

4. 研究成果

(1) 腸管浸潤腫瘍発生マウスモデルの解析：
Apc^{A716}/Tgfr2^{flox/flox} / SOX17^{flox/flox}/Villin-CreERT2 複合マウスと対照群の、*Apc^{A716}/Tgfr2^{flox/flox}/Villin-CreERT2* マウスに、タモキシフェンを毎週 1 回連投した。病理解剖後、腸管スライスロールを作製し、切片

上で腸管腫瘍の数、大きさについて検討した。この結果、*SOX17* 遺伝子が欠損しても浸潤を伴う腸管腫瘍の発生は認められ、その発生

図1



頻度にも、有意な差は認められなかった(図1)。

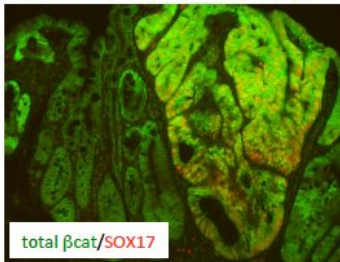
また、組織切片による組織病理学的な比較解析においても、腸管上皮細胞の形態学的変化や増殖率の変化は認められなかった。このとき、*SOX17* 遺伝子がタモキシフェン投与によって欠損していることを、ゲノム PCR 法と *SOX17* 抗体による免疫染色法によって確認した(data not shown)。

これらの結果から、*SOX17* は腫瘍発生頻度や、粘膜下浸潤の誘導に必要ではないと考えられた。

(2) 炎症に起因した大腸がん形成における *SOX17* の影響：

SOX17^{flx/flx}/Villin-CreERT2 マウスと対照群に、タモキシフェンを3日間連投し、翌日に AOM を腹腔投与した。その後、2.0%DSS

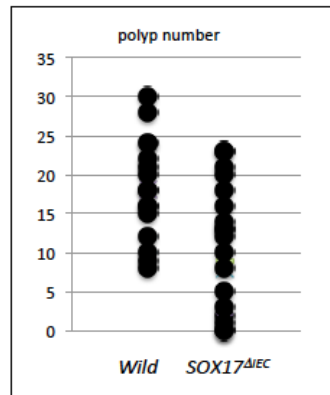
図2 Wild (AOM/DSS)に発症するpolyp



を1週間飲水により与え、2週間通常の飲み水に変更し、そのサイクルを3回行った。最終 DSS 投与から8週間後にすべてのマウスの病理解剖を行った。

最初に、正常マウスに AOM/DSS で発症する腫瘍における *SOX17* 発現について検討した結果、ほとんどの腫瘍細胞で Wnt シグナルの亢進を示す β-catenin の安定化が認められ、同時に *SOX17* の

図3



を1週間飲水により与え、2週間通常の飲み水に変更し、そのサイクルを3回

た結果、ほとんどの腫瘍細胞で Wnt シグナルの亢進を示す β-catenin の安定化が認められ、同時に *SOX17* の

高い発現が核内に認められた(図2)。

次に、*SOX17* 遺伝子欠損マウス群と対照群、それぞれに発症した結腸の腫瘍を病理組織学的に比較解析した結果、その数、大きさ共に有意な差は認められなかった(図3)。

さらに、腫瘍上皮細胞で *SOX17* 遺伝子が欠損しても、腫瘍細胞の増殖率や、アポトーシスの割合などに変化は認められず、*SOX17* は、腫瘍細胞の増殖や生存に影響を及ぼさないと考えられた。また、*SOX17* 遺伝子発現が Wnt シグナル強度を抑制的に制御する *in vitro* 実験の結果を得ていることから、Wnt ターゲット遺伝子である、*CD44*、*EphB3*、*SOX9* の発現量を RT-PCR で検討したが、腫瘍組織でこれらの遺伝子の発現量に有意な差は認められなかった。また、この系では腫瘍は炎症依存的に発症するが、炎症細胞の腫瘍細胞への浸潤にも *SOX17* 遺伝子の有無による変化は認められなかった。

これらの結果から、マウス個体レベルにおいて、*SOX17* 遺伝子は、Wnt シグナル亢進により発現が誘導されるが、良性腫瘍の発生、浸潤を伴う悪性化腫瘍発生、また炎症に起因した大腸腫瘍発生の各過程で、機能的には関与していないと考えられた。

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6件)

1. Maeda Y, Echizen K, Oshima H, Yu L, Sakulsak N, Hirose O, Yamada Y, Taniguchi T, Jenkins BJ, Saya H, and Oshima M. Myeroid differentiation factor 88 signaling in bone marrow-derived cells promotes gastric tumorigenesis by generation of inflammatory microenvironment. *Cancer Prev Res(Phila)*, 9: 253-263, 2016. [査読有り] (DOI:10.1158/1940/1940-6207.CAPR-15-0315)
2. Oshima H, Nakayama M, Han TS, Naoi K, Ju X, Maeda Y, Robine S, Tsuchiya K, Sato T, Taketo MM, and Oshima M. Suppressing TGFβ signaling in regenerating epithelia in an inflammatory microenvironment is sufficient to cause invasive intestinal cancer. *Cancer Res*, 75: 766-776, 2015. [査読有り]

- (DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2036)
3. Naka K, Jomen Y, Ishihara K, Kim J, Ishimoto T, Bae EJ, Mohny RP, Stirdivant SM, Oshima H, Oshima M, Kim DW, Nakauchi H, Takihara Y, Kato Y, Ooshima A, and Kim SJ. Dipeptide species regulate p38MAPK-Smad3 signaling to maintain chronic myelogenous leukemia stem cells. *Nat Commun*, 2015. [査読有り] (DOI: 10.1038/ncomms9039.)
 4. Seishima R, Wada T, Tsuchihashi K, Okazaki S, Yoshikawa M, Oshima H, Oshima M, Sato T, Hasegawa H, Kitagawa Y, Goldenring JR, Saya H and Nagano O. Ink4a/Arf-Dependent Loss of Parietal Cells induces by Oxidative Stress Promotes CD44-Dependent Gastric Tumorigenesis. *Cancer Prev Res*, 8: 492-501, 2015. [査読有り] (DOI:10.1158/1940/1940-6207.CAPR-15-0025-T)
 5. Han TS, Hur K, Xu G, Choi B, Okugawa Y, Toiyama Y, Oshima H, Oshima M, Lee HJ, Kim VN, Chang AN, Goel A, and Yang HK. MicroRNA-29c mediates initiation of gastric carcinogenesis by directly targeting ITGB1. *Gut*, 64: 203-214, 2015. [査読有り] (DOI: 10.1136/gutjnl-2013-306640.)
 6. Oshima H, Ishikawa T, Yoshida GJ, Naoi K, Maeda Y, Naka K, Ju X, Yamada Y, Minamoto T, Mukaida N, Saya H and Oshima M. TNF- α /TNFR1 signaling promotes gastric tumorigenesis through induction of NOX1 and Gna14 in tumor cells. *Oncogene*, 33: 3820-3829, 2014. [査読有り] (DOI: 10.1038/onc.2013.356.)

[学会発表] (計 6 件)

1. Oshima H, Nakayama M, Sato H, Taketo MM, Oshima M. Cooperation of TGF- β suppression and inflammation in malignant progression invasion of intestinal tumors. 第 74 回日本癌学会学術総会 (2015 年 10 月 8 日, 名古屋)
2. 大島浩子, 中山瑞穂, 佐藤博, 大島正伸. TGF- β シグナル抑制による大腸がん浸潤. 平成 26 年度「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム (2015

年 1 月 27 日, 東京)

3. 大島浩子, 中山瑞穂, 佐藤博, 武藤誠, 大島正伸. 慢性炎症と TGF β シグナル抑制による消化管腫瘍の浸潤誘導. 第 73 回日本癌学会学術総会 (2014 年 9 月 25 日, 横浜) [招待講演]
4. 大島浩子, 中山瑞穂, 大島正伸. TGF- β シグナル抑制と慢性炎症反応による大腸がん浸潤機構. 平成 25 年度文部科学省新学術領域「がん支援」公開シンポジウム (2014 年 1 月 31 日, 東京)
5. Oshima H, Naka K, Oshima M. TNF- α signaling in bone marrow-derived cells promotes gastric tumorigenesis through Nox1 expression. 4th JCA-AACR Special Joint Conference: The Latest Advances In Gastric Cancer Research (2013 年 12 月 17 日, 千葉)
6. Oshima H, Nakayama M, Taketo MM, Oshima M. The role of inflammation in development of invasive intestinal adenocarcinoma. 第 72 回日本癌学会学術総会 (2013 年 10 月 4 日, 横浜)

[図書] (計 1 件)

1. Oshima H, and Oshima M. PGE₂-associated inflammation and gastrointestinal tumorigenesis. In. *Inflammation and Immunity in Cancer*, Springer, 13-23, 2015. [査読有り]

[産業財産権]

なし

[その他]

ホームページ等

<http://genetics.w3.kanazawa-u.ac.jp>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大島 浩子 (Oshima Hiroko)

金沢大学・がん進展制御研究所・准教授

研究者番号 : 80362515

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし