

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462188

研究課題名(和文) 肺扁平上皮癌に対する新規標的療法の開発を目的としたSox2遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Sox2 is a novel target gene for the treatment of lung squamous cell carcinoma.

研究代表者

深澤 拓也 (Fukazawa, Takuya)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：20379845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子Sox2は、肺扁平上皮癌における系統維持型癌遺伝子であることが報告されている。siRNAによるSox2のsilencingは、Sox2発現型肺扁平上皮癌株EBC2およびLK2における細胞増殖抑制を誘導し、さらに肺扁平上皮癌xenograftへの抗腫瘍効果を示した。siRNA Sox2のtransfection後、上記株において細胞周期関連遺伝子：CDKN1Aの発現増強がRNAおよび蛋白レベルで確認され、またこの変化は、CDKN1Aに対するsiRNAにより阻害された。以上より、肺扁平上皮癌へのSox2の標的治療の有効性が示され、さらに抗腫瘍性へのCDKN1Aの関与が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Sox2 is a pluripotency controller that was recently identified as a novel oncogene, recurrently activated in lung squamous cell carcinoma (SCC). Inhibition of Sox2 by siRNA suppresses cell viability and colony formation of Sox2 expressing EBC2 and LK2 lung SCC cells. Moreover, Sox2 siRNA inhibits lung SCC growth in vivo in a xenograft mouse model derived from these cells. Cell cycle analysis showed that Sox2 silencing significantly increased the G1 population in the cells. We used biological studies to demonstrate that CDKN1A was suppressed by Sox2 in lung SCC cells. G1 cell cycle arrest induced by Sox2 siRNA was rescued by CDKN1A siRNA. These results indicate that targeting Sox2 is an effective strategy for the treatment of Sox2-expressing lung SCC and the tumorigenic effect of Sox2 in lung SCC cells is mediated in part by suppression of CDKN1A.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肺扁平上皮癌

1. 研究開始当初の背景

末梢組織の発生に必須な転写因子で、その発現持続が末梢組織を発生母地とする癌の生存に必須であり、時に遺伝子増幅を伴う癌遺伝子は系統維持型癌遺伝子: lineage specific oncogene と呼ばれる(Saito RA et al. Cancer Res. 69: 2783-91. 2009)。近年細胞の初期化に必要な山中遺伝子の一つである Sox2 は、肺扁平上皮癌における系統維持型癌遺伝子であることが報告された(Bass AJ, Meyerson M et al. Nat Genet. 41:1238-42. 2009)。

2. 研究の目的

肺腺癌に比べ、肺扁平上皮癌における有効な分子標的療法は確立されていない。本研究において、Sox2 遺伝子の肺扁平上皮癌における addiction 解析と標的遺伝子としての評価また、作用機序の解析を行う。

3. 研究の方法

研究初年度において、Sox2 遺伝子の肺扁平上皮癌における addiction 解析と標的遺伝子としての評価を行った。また肺癌切除標本における発現解析と臨床的意義の検討を行った。さらに肺扁平上皮癌株における Sox2 遺伝子依存の評価、および解析に必要なリコンビナント・アデノウイルスベクターの作製を行った。

A 肺扁平上皮癌における Sox2 発現の臨床的意義の解析

B-1 肺扁平上皮癌細胞株における Sox2 への addiction 解析と標的遺伝子としての評価

B-2 Sox2 および Sox2 shRNA 発現型 adenoviral vector の作製

平成 26 年度以降、肺扁平上皮癌における Sox2 の発現抑制下での抗腫瘍性および下流シグナルの解析、さらに発現調節機序を調べることで Sox2 を標的とする新規治療法開発のための基礎的検討を行った。また食道癌における標的遺伝子としての評価を行った。

B-3 Sox2 発現抑制による肺扁平上皮癌における抗腫瘍効果の解析

C-1 Sox2 遺伝子導入後の下流シグナルの解析

C-2 Sox2 発現の既存抗癌剤・分子標的薬剤の感受性に与える効果の検討

D Sox2 遺伝子プロモータにおける癌特異的転写部位の解析

E 食道扁平上皮癌、小細胞肺癌における標的遺伝子としての評価

4. 研究成果

A 肺扁平上皮癌における Sox2 発現の臨床的意義の解析

当院での肺癌切除標本における Sox2 発現を免疫組織染色にて解析した。Sox2 に対する 2 種の抗体を用いた検討で、肺扁平上皮癌における発現陰性症例はわずか 7.5% であり、高い発現が認められた。一方で肺腺癌において

は、45%の症例に Sox2 発現が見られず、扁平上皮癌に比べて高い陰性率を示した。

B-1 肺扁平上皮癌細胞株における Sox2 への addiction 解析と標的遺伝子としての評価

Sox2 を発現する肺扁平上皮癌株 EBC2 および LK2 において、Sox2 を発現抑制できる siRNA を transfection したところ、その cell viability は投与 48 時間後において、control 群に比べ優位に低下していた。また siRNA_{Sox2} 投与後に行った colony formation assay では、両細胞のコロニー形成の抑制が観察された。このことより肺扁平上皮癌細胞増殖における Sox2 癌遺伝子依存が示唆された。

B-2 Sox2 および Sox2 shRNA 発現型 adenoviral vector の作製

Sox2 また Sox2 に対する shRNA の発現カセットを recombinant adenoviral vector のゲノムに挿入し、viral vector を作製した。また細胞株を用いた Immunoblot 法によりこれらの vector による Sox2 発現の誘導、現弱を確認した。

B-3 Sox2 発現抑制による肺扁平上皮癌における抗腫瘍効果の解析

siRNA_{Sox2} の transfection 後、肺扁平上皮癌株 EBC2 および LK2 を用いて作製した肺扁平上皮癌 xenograft は、それぞれに対する control siRNA 投与群や無治療群に比べて、有意な腫瘍増殖抑制効果を示した。

これにより、Sox2 抑制による *in vivo* での抗腫瘍効果が、肺扁平上皮癌において明らかとなった。

C-1 Sox2 遺伝子導入後の下流シグナルの解析

Sox2 silencing 後に誘導される抗腫瘍効果がどのような signal によって誘導されるかを解析するために、まず apoptosis の検出を *in vitro* にて行った。Sox2 を発現する肺扁平上皮癌株 EBC2 および LK2 に対し、siRNA_{Sox2} を transfection 後 48 時間後において、PI (propidium iodide) および annexin V を用いた flow cytometry 解析を行った。両細胞において annexin V 陽性 population の明確な増加は見られず、apoptosis の誘導は認められない結果となった。一方で PI 染色後の cell cycle 解析から G1 細胞周期停止が観察され、Sox2 発現抑制から誘導される抗腫瘍効果の機序の一端と考えられた。

次に我々は、Sox2 発現抑制下での、細胞周期関連遺伝子との関連を解析した。Realtime PCR 法の結果から、Sox2 silencing 後 48 時間において CDKN1A 遺伝子 mRNA 発現の増加が EBC2 および LK2 株において認められた。また immunoblot 法から蛋白レベルでの発現増加が確認された。逆に Sox2 発現の見られない肺扁平上皮癌株: EBC 1 に Sox2 発現型 recombinant

adenoviral vector を感染したところ、48 時間後において、Sox2 の発現増加ならびに CDKN1A 遺伝子の mRNA および蛋白レベルでの発現抑制が観察された。

Sox2 silencing 後の G1 細胞周期停止における CDKN1A 遺伝子の関与を明らかにする目的で、EBC2 および LK2 株に対し、siRNA^{Sox2} および/または siRNA^{CDKN1A} を transfection し、細胞周期の再解析を行った。siRNA^{Sox2} 投与後に誘導された G1 細胞周期停止は siRNA^{CDKN1A} を併用することで、部分的に抑制された。また siRNA^{CDKN1A} 単独投与による細胞周期の変化は見られなかった。これらのことより、Sox2 発現抑制が肺扁平上皮癌に誘導する G1 細胞周期停止への CDKN1A の関与が示された。

C-2 Sox2 発現の既存抗癌剤・分子標的薬剤の感受性に与える効果の検討
肺扁平上皮癌株 EBC2 および LK2 に対し、siRNA^{Sox2} を transfection 後、抗癌剤 cisplatin または etoposide を併用後の抗腫瘍効果を cell viability 測定にて調べたが、有意な抗腫瘍効果は見られなかった。Sox2 silencing 後の下流遺伝子解析から EMT(epithelial mesenchymal transition)関連遺伝子である ZEB1 等の増強が認められており、今後これらの遺伝子と薬剤併用効果の関連を解析する予定である。

D Sox2 遺伝子プロモータにおける癌特異的転写部位の解析
Sox2 promoter における TSS (transcription start site)からおよそ上流 2k bp また 0.6 kb までの配列を cloning して作製された luciferase construct を用いて luciferase assay を行った。後者の配列を持つ construct は、Sox2 陽性肺扁平上皮癌株において高い転写活性を示しており、TSS 上流 0.6k bp までの配列に癌特異的転写部位が含まれる可能性が示された。

E 食道扁平上皮癌、小細胞肺癌における標的遺伝子としての評価
川崎医科大学附属川崎病院での食道癌切除標本における Sox2 発現を免疫組織染色で解析した結果、食道扁平上皮癌における発現陰性所症例は 7.5% であり、高い発現が認められた。また肺扁平上皮癌同様、Sox2 silencing 後、複数の食道扁平上皮癌株で cell viability の抑制が観察され、標的治療の可能性が示された。現在、小細胞癌株において同様の検討を行っている。

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1件)

SOX2 suppresses CDKN1A to sustain

growth of lung squamous cell carcinoma. Fukazawa T, Guo M, Ishida N, Yamatsuji T, Takaoka M, Yokota E, Haisa M, Miyake N, Ikeda T, Okui T, Takigawa N, Maeda Y, Naomoto Y. Sci Rep. 2016 Feb 5;6:20113. doi: 10.1038/srep20113. 査読有り

[学会発表](計1件)

深澤拓也、Bioinformatics に基づいた肺扁平上皮癌における系統維持型癌遺伝子: SOX2 の役割の解析、第 115 回日本外科学会学術総会、平成 28 年 4 月 16 日 大阪(大阪国際会議場)
深澤拓也、肺扁平上皮癌に対する Sox2 を標的とした治療法開発のための基礎的検討、第 73 回日本癌学会学術総会、平成 26 年 9 月 27 日 横浜(パシフィコ横浜)

[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

6. 研究組織

(1)研究代表者

深澤 拓也 (FUKAZAWA TAKUYA)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号: 20379845

(2)研究分担者

猶本 良夫 (NAOMOTO YOSHIO)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00237190

山辻 知樹 (YAMATSUJI TOMOKI)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40379730

高岡 宗徳 (TAKAOKA MUNENORI)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：50548568

(3)連携研究者
なし