

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460427

研究課題名(和文) 子宮癌肉腫由来の癌幹細胞の分子制御機構の解明：病理組織での可視化とその臨床応用

研究課題名(英文) Molecular analysis of cancer stem cells driven from uterine carcinosarcoma

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜癌細胞を間葉系幹細胞培養液で処理することで上皮間葉転換(EMT)/がん幹細胞(CSC)化が誘導され、この分子過程にSox4, Sox7, Sox9, β -catenin, Slugが大きく寄与した。EMT誘導のkey分子であるSlug発現は、Sox4と β -catenin/p300による転写複合体により転写レベルで制御された。臨床検体で、 β -cateninとSlug発現は肉腫部で有意に高く、Sox4, Sox7, 及びSox9と正の相関を示した。Soxファミリーは β -catenin/p300シグナル系と協調して癌肉腫の肉腫成分の派生過程において重要な役割を演じる。

研究成果の概要(英文)：Uterine carcinosarcoma (UCS) represents an example of cancer associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT), which exhibits cancer stem cell (CSC)-like traits. In this study, Em Ca cells cultured in serum-free medium for mesenchymal stem cells underwent EMT through downregulation of E-cadherin and upregulation of Slug. The cells also showed CSC properties. Overexpression of Sox4 led to transactivation of the Slug promoter, enhancing β -catenin/p300-mediated transcription of the Slug gene. In clinical samples, both β -catenin and Slug scores were significantly higher in the sarcomatous as compared to carcinomatous components in UCSs, and were positively correlated with Sox4, Sox7, and Sox9 scores. In conclusion, Sox4, as well as Sox7 and Sox9, may contribute to regulation of EMT/CSC properties to promote development of sarcomatous components in UCSs through transcriptional regulation of the Slug gene by cooperating with the β -catenin/p300 signal pathway.

研究分野：分子病理学

キーワード：子宮癌肉腫 β -catenin Sox 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 子宮癌肉腫(以下、UCS)は、以前は悪性ミュー管混合腫瘍と言われていた高悪性度の腫瘍で、癌成分と肉腫成分の両者が混在する組織型であり、子宮癌全体の2-5%を占める。臨床的に、UCS患者の40%以上が進行したステージにあり、半数以上の症例で再発を認める。組織学的には、癌成分としては類内膜腺癌に続いて漿液性腺癌が多く、肉腫成分は同所性組織(通常の子宮組織にみられる間質成分由来のもの)、あるいは異所性組織(通常の子宮組織にはみられない組織で、軟骨や骨格筋由来の悪性成分が最も多い)を認める。

(2) 上皮間葉転換(以下、EMT)は、正常あるいは腫瘍性の上皮細胞が間葉系の形態へと変化する現象で、その特徴として、細胞接着性分子の消失、上皮系分化のマーカーの発現低下、及び間葉系マーカーの転写の導入があり、これに伴って β -catenin の核内発現が生じる。*E-cadherin* 遺伝子を抑制するはたらきをもつ Snail、Slug 及び Twist も、EMT の過程に関与する。UCS は癌成分から派生して肉腫成分が生じる、化生性の癌と考えられていることから、UCS の腫瘍形成において EMT が重要な役割をもつ可能性がある。

(3) 腫瘍には、がん幹細胞(CSC)あるいは腫瘍発生の源となる細胞が少量含まれている。がん幹細胞は体細胞の幹細胞と類似しており、自己再生能を有し、腫瘍を構成するがん細胞として heterogeneous な分化が行われる細胞、と定義される。興味深いことに、EMT 細胞はがん幹細胞様の形態を有し、がん幹細胞は間葉系様の性格を獲得するとのエビデンスがあり、EMT とがん幹細胞との関連が示唆されることから、癌細胞から派生した肉腫幹細胞様細胞が存在し、肉腫への分化を示す前駆細胞となりうる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

様々な細胞における EMT/CSC の調節機構では、Sox と β -catenin のシグナル導入により多様な生物学的機能を示す。そこで、我々は、EMT/CSC シグナル経路の調節機構によって UCS としての表現型の決定に寄与している可能性を考え、子宮内膜癌細胞と UCS の臨床検体を用いて、複数の Sox 因子、 β -catenin 及び Slug の発現を検索した。

3. 研究の方法

(1) プラスミドと細胞培養

-2125/-235 bp、-1859/-235 bp、-1587/-235 bp、-813/-235 bp を含む pGL3B-Slug luc、pcDNA3.1-HA- β -catenin Δ S45、pcDNA3.1-Sox4、pcDNA3.1-Sox7、pcDNA3.1-Sox9、pcDNA3.1-HA-Slug、PCI-Flag-p300、pcDNA3.1-TCF4 Δ N30、pG5 luc 及び pM- β -catenin Δ S45。pM-Sox4 は Sox4 cDNA fragment に pM DNAB-D vector (BD Biosciences Clontech) を挿入し作製した。また、PrimeSTAR Mutagenesis Basal kit (Takara Bio) で、Sox4 の結合領域と推定される領域に直接的な変異を作製した。

子宮内膜癌細胞には Ishikawa、Hec251、Hec6 細胞を用いた。HA-Slug を恒常的に過剰発現細胞を Hec6 細胞で作製した。

(2) 抗体と試薬

抗 β -catenin、抗 p27^{kip1}、抗 Sox4、抗 Sox6、抗 Sox7、抗 Sox9、抗 Sox11、抗 β -actin、抗 Snail、抗 Slug、抗 p21^{waf1}、抗 cyclin D1、抗 CD44s、抗 Sox2、抗 cyclin A、抗 HA、抗 E-cadherin、抗 CD133 抗体を用いた。

間葉系幹細胞の無血清培地である STK2 は DS Pharma Biomedical 社製を用いた。

(3) トランスフェクション

LipofectAMINE PLUS を用い、ルシフェラーゼ活性を定量した。

(4) リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)

2 μ g の全量 RNA から cDNA を合成した。量的評価のために、Power SYBR Green PCR Master Mix 及び目的遺伝子に対する特異的なプライマーを用いて、RT-PCR を行った。ABI 7500 RT-PCR システムを用いて蛍光シグナルを検出し、ABI 7500 システム SDS ソフトウェア(Biosystems)を用いてデータ解析を行った。GAPDH 遺伝子を内因性コントロールとした。

(5) ウェスタンブロットアッセイと免疫沈降

RIPA 液を用いて、細胞タンパクの全量を分離した。タンパクで SDS-PAGE で分離させ、膜への転写、及び ECL 検出システムで検出を行った。

免疫沈降では、STK2 で培養した細胞を TNF 液で溶解させ、抗 Sox4 抗体とのインキュベーションを行った後、Protein G-Sepharose

で沈降した。 β -catenin と抗 Sox4 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

(6) フローサイトメトリーと Aldefluor アッセイ

細胞周期の解析を行うために、70%アルコールで細胞を固定させ、propidium iodide で染色した。生存細胞における ALDH1 酵素活性は、蛍光色素をベースとする Aldefluor assay を用いて評価した。また、BD FACS Calibur 及び CellQuest Pro software version 3.3 で解析した。

(7) スフェロイドアッセイ

STK2 あるいは 10%ウシ血清 MEM メディウム内に、各 1×10^3 個の細胞を、低接着性プレートで培養し、2週間経過した後、径 50 μ m 以上のスフェロイドの数をカウントした。

(8) クロマチン免疫沈降(ChIP アッセイ)

EpiXplore ChIP assay kit を用いて、ChIP 解析を行った。

(9) 臨床検体

1997年~2012年の北里大学病院の患者記録から、高悪性度の子宮内膜腺癌の症例をレビューし、2014年のWHO分類のcriteriaに従い、総計32例のUCS検体を対象とした。本研究は、北里大学医学部・病院の倫理委員会Bの承認を得ている(B14-35)。

(10) 免疫染色

マイクロウェーブ及びポリマー法を用いた。染色評価には、染色強度と陽性細胞の比率の二つのパラメーターの積にて評価した。

(11) 統計

得られたデータは、マン-ホイットニーのU検定、及びスピアマンの相関係数を用いて解析を行った。統計学的な有意差となるカットオフ値は $p < 0.05$ とした。

4. 研究成果

(1) 子宮内膜癌細胞の EMT の過程における Sox 因子の発現変化

子宮内膜癌細胞において EMT を誘導させるために、Ishikawa、Hec251、Hec6 細胞を用いて、間葉系幹細胞の無血清培地である STK2 で培養した細胞は 73 時間後には線維芽細胞様の形態へと著明な変化を来し、mRNA・タンパクともに E-cadherin の発現低下、Slug の発現上昇を認めた。それに対し、

Snail のタンパク発現の変化は、mRNA と同様に比較的少なかった。

次に、STK2 培養細胞において Sox 因子が EMT の調節機構に直接的に関与しているかどうかを調べた。培養した 3 種類の子宮内膜癌細胞いずれにおいても、Sox4、Sox7 及び Sox9 の発現上昇を認めたが、Sox6 と Sox11 はタンパク・mRNA とともに上昇は認めなかった。さらに、Sox4 遺伝子のプロモーター活性は Sox7 のトランスフェクションによって 20-50 倍に上昇した。一方、他の Sox 因子に対する Sox7 や Sox9 遺伝子のプロモーター活性の変化は少なかった。これらの結果から、STK2 培地による子宮内膜癌細胞の培養により EMT が誘導され、E-cadherin の発現低下と Slug の発現上昇を認めた。さらに、子宮内膜癌細胞における EMT の過程では、いくつかの Sox 因子が複合的な転写活性の恒常的なループを形成していることが明らかとなった。

(2) 子宮内膜癌細胞における EMT と CSC の関連性について

次に、EMT と CSC との関連について調べた。3 種類の子宮内膜癌細胞のうち、STK2 培養細胞で最も Slug 発現量が高かった。Hec6 細胞を用いて実験を行った。培養した Hec6 細胞は細胞増殖速度が緩徐で、特に指数的発育 phase での増殖速度が遅く、p21^{waf1} の発現上昇、細胞周期の S 期に相当する細胞の比率の減少を認めた。Ishikawa 及び Hec251 細胞においても同様の結果が得られた。Aldefluor アッセイでは、ALDH1 活性の高い細胞比率が上昇しており、径 50 μ m を超えるスフェロイドの数も増加していた。さらに、他の CSC マーカーとして、CD44s や Sox2 の発現上昇が、STK2 培養細胞で(3 種ともに)みられた。CD133 については明らかな発現上昇は認めなかった。これらの結果から、STK2 で培養した子宮内膜癌細胞は、EMT や CSC の性格を表していることが明らかとなった。

(3) 子宮内膜癌細胞において Slug は EMT/CSC と関連する

Slug が EMT/CSC と直接的に関わっているかどうかを調べるために、2 つの独立した Hec6 細胞(H6SL#8、#21)にそれぞれ Slug を恒常的過剰発現させたものを確立させた。これらの細胞は線維芽細胞様の間葉系の特徴をもった細胞形態に著明に変化し、E-cadherin の発現低下を認めたが、Snail の状態とは関係しなかった。H6SL#8 細胞では、

増殖速度が非常に緩徐で、細胞周期の中でも S 期から G2/M 期への移行が停滞していた。さらに、ALDH1 活性の高い細胞比率が上昇していた。しかしながら、Sox4、Sox7 及び Sox9 の発現の変化は、コントロール(mock) と Slug 過剰発現細胞との差は乏しかった。これらの結果から、子宮内膜癌細胞に外因性に Slug を過剰発現させると EMT/CSC が誘導されるが、Sox 因子とは独立した動態を示すことが示唆された。

(4) 子宮内膜癌細胞において Sox 因子は Slug 遺伝子の転写を調節する

Sox 因子が Slug 遺伝子の転写に直接的に関わっているかどうかを調べるために、STK2 での培養で発現増加のみられた 3 つの Sox (Sox4、7、9) を子宮内膜癌細胞にそれぞれトランスフェクトした。Sox4 の一過性のトランスフェクトにより Slug 遺伝子のプロモーター活性が上昇し、mRNA レベルでの発現が増加、Sox7 あるいは Sox9 とともにトランスフェクトすることでさらなる増加を認めた。これに対し Sox7 のみ、Sox9 のみ、あるいは両者のトランスフェクトでは Slug の変化は乏しかった。

Slug 遺伝子の転写開始地点より約 2000bp 上流までの解析により、4 ヶ所の Sox4 結合領域があることが分かった。5'側を切断した一連のプロモーター構造を用いると、-2125bp ~ -1587bp が欠失しても、Sox7 や Sox9 と同様に、Sox4 による Slug 遺伝子のプロモーター活性にはほとんど影響がなかった。それに対して、-813/-235bp の構造では、Sox 因子の結合が阻害され、プロモーター活性は非常に低い値であった。これは Sox4 が認識する塩基配列領域が -2125bp ~ -813bp に存在することを意味している。また、各結合領域に塩基変異をそれぞれ付加すると、Sox4 に対するレスポンスが低下した。さらに ChIP アッセイでは、STK2 培養による Sox4 の増加量が、プロモーター領域内の 4 つの Sox4 結合領域に寄与することが明らかとなった。これらの結果から、Slug 遺伝子は Sox4 のターゲット遺伝子であることが示唆された。

(5) 子宮内膜癌細胞では Slug 遺伝子の転写調節に β -catenin と Sox4 が関連する

β -catenin は Slug の発現を亢進させることが報告されており、Slug 遺伝子のプロモーター調節における Sox4 と β -catenin との関連について調べた。 β -catenin と Sox4 のコ

ンビネーションによりプロモーター活性が上昇した。多機能 co-activator である p300 とのトランスフェクションでさらに活性上昇を認めた。また、GFP-Sox4、HA- β -catenin S45、Flag-p300 の共発現では核内に粗大な dot 形成をみとめたが、GFP-Sox4 と HA- β -catenin S45 のみの共発現ではこのような核内 dot 形成は観察できなかった。One hybrid アッセイでは、全長 β -catenin あるいは Sox4 をそれぞれトランスフェクトした後、Sox4、7、9、p300 をトランスフェクトして pG5 luc レポーター活性を調べると、 β -catenin と p300、Sox4 と p300 の共発現で著明な上昇を認めたが、 β -catenin と Sox4、7 ないし 9 での共発現では変化が乏しかった。さらに β -catenin と Sox4 の免疫沈降を行うと、両者の関連性が低いことが分かった。これらの結果から、Sox4 は p300 を介して β -catenin と協同してはたらくことが示唆された。

(6) 臨床検体での免疫組織化学的検討

Slug、Sox4 および Sox9 は核に発現を、 β -catenin は核と細胞質/細胞膜に発現を認めた。これらは癌成分、肉腫成分いずれにも発現を認めたが、特に核 β -catenin と Slug に関しては、癌成分に比べて肉腫成分で有意に染色スコアが高かった。一方で、Sox4、Sox7、Sox9 では癌成分と肉腫成分での有意差はみられなかった。Slug の平均スコアは、核 β -catenin のスコアや 3 つの Sox 因子との正の相関を認めた。また核 β -catenin は 3 つの Sox 因子との正の相関を認めた。

< 考案 >

今回の研究では、子宮内膜癌細胞において EMT と CSC との関連があることが明確となった。STK2 で培養した子宮内膜癌細胞が EMT を引き起こしているに値する状態にあり、それは線維芽細胞様の紡錘形細胞へと形態が変化し、E-cadherin の発現低下と Slug の発現上昇によって証明された。臨床検体の免疫染色のデータにおいても、Slug のスコアは癌成分に比べて肉腫成分で有意に高いことを示した。さらに、EMT の過程では細胞増殖速度が極めて遅く、Snail 発現のある EMT を起こしている上皮細胞が細胞増殖が緩徐であるという、今回と同様の報告もある。また、STK2 で培養した細胞ががん幹細胞 (CSC) 化した状態にあり、それは ALDH1 活性の高い細胞の増加とスフェロイド形態を示す細胞の増加によって証明された。EMT

により自己再生能のある細胞が著明に増加し、幹細胞に富むスフェロイドが増えるきっかけとなるとの報告があることから、癌細胞由来の間葉系幹細胞が、子宮癌肉腫における肉腫成分の確立に必要である可能性が考えられた。

さらに、STK2 で培養した細胞は Sox4、Sox7 及び Sox9 の発現を促進することも示された。興味深いことに、Sox4 遺伝子のプロモーター活性は、Sox7 のトランスフェクトにより著明に上昇し、臨床検体の免疫染色のデータにおいて Sox4 と Sox7 に強い正の相関がみられたことも、この結果を支持している。しかし Sox7 や Sox9 遺伝子のプロモーター活性は Sox4、7 あるいは 9 のトランスフェクトでの上昇は少なく、臨床検体でも相関関係に乏しかった。Sox 遺伝子群の発現は、他の Sox タンパクによるオートレグレーションによる発現がみられることがあるという報告もあり、今回の結果においても Sox7 や Sox4 を含む様々な Sox 因子の間に、発現の調節ループを形成し活性化された可能性も考えられる。

今回予想外なことに、Slug を恒常的過剰発現させた Hec6 細胞では、EMT/CSC の状態であったものの、Sox4、Sox7 及び Sox9 の発現の変化に乏しかった。これは、Sox 因子が Slug の上流にあり、外因性に Slug を過剰発現させた状態では Sox の発現上昇が不要であったことが原因であると考えられる。加えて、免疫染色の結果において Sox 因子と Slug ないしは β -catenin との正の相関がみられたものの、癌成分と肉腫成分とは各 Sox 因子において明らかな有意差がみられなかった。現時点ではこのことを証明できないが、原因と考えられることとして、Sox タンパクは転写後に様々な活性・安定性・細胞内極性を有することが考えられる。例えば、いくつかの Sox 因子はリン酸化、SUMO 化、アセチル化、メチル化、グリコシル化といった様々な機能を有している。この点については今後の研究で明らかにする必要がある。

近年のいくつかの報告においても Sox4 が Slug 遺伝子の転写活性に関わることを支持している。STK2 で培養した子宮内膜癌細胞では Slug と Sox4 が共に過剰発現している。

Sox4 を一時的にトランスフェクトすることで Slug の mRNA 発現が増加し、プロモーター活性にも同様のことが証明された。Sox4 は Slug 遺伝子のプロモーター領域の -2125 ~ -813bp の間にある 4 つの結合領域を認識し、Slug 発現を促進させる。この 3 つの

効果は、Sox9 や Sox7 との共発現によってさらに強調される結果となった。興味深いことに、ヒトの乳腺上皮細胞に外因性に Sox4 を発現させると間葉系の形態変化を来し、幹細胞化の性格や細胞遊走能や浸潤能との関連があるとの報告もある。

一般的に、Sox タンパクはパートナーとなる転写因子と複合体を形成して初めて遺伝子調節機能を表出する、ということが言われている。また、Sox4 の転写活性や特異的なターゲット遺伝子は、明確な転写ファクターとコファクターとの相互作用によって調節されると考えられている。今回の研究では、Sox4 は β -catenin を介して Slug 遺伝子の転写活性を上昇させており、 β -catenin、Sox4 及び p300 との転写複合体を形成していた。*in vitro* における protein-binding assay で、Sox4 は HMG ドメインを介して TCF4 と直接的に相互に作用することが報告されているが、我々のデータでは Sox4 による Slug 遺伝子のプロモーター活性の上昇は、TCF4 陰性優位の状態でも棄却されなかった。このことは、このプロモーター活性に TCF4 の結合領域は必要とされないことを意味していると考えられた。

結語

今回の研究の結果から、子宮癌肉腫において EMT/CSC の過程を通して肉腫成分が派生する分子メカニズムを提唱する。 β -catenin と p300 の複合体と同様に Sox4 は Slug の発現を促進させ、EMT や CSC を誘導させる。その結果、子宮癌肉腫における同所性あるいは異所性の肉腫成分が生じると考えられる。Sox7 と Sox4 の相互作用と同様に、Sox7 と Sox9 の発現増加もこの過程に関わっていると考えられる。以上のことから、子宮癌肉腫の腫瘍形態形成には、Sox4/p300/ β -catenin による EMT/CSC 誘導がきわめて重要であることが示唆された。

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 1件)

Inoue H, Takahashi H, Hashimura M, Eshima K, Akiya M, Matsumoto T, Saegusa M. Cooperation of Sox4 with β -catenin/p300 complex in transcriptional regulation of the Slug gene during

divergent sarcomatous differentiation in
uterine carcinosarcoma. BMC Cancer.
2016 Feb 3;16:53. doi: 10.1186/s12885-
016-2090-y. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

橋村美紀、高橋博之、井上久子、三枝 信：
Sox4/β-カテニン/p300/Slug 系は上皮間葉転
換/がん幹細胞化を介して子宮癌肉腫の肉腫
成分形成に関与する。第 105 回病理学会総会、
2016 年 5 月 13 日、仙台国際センター会議
棟・展示棟 (宮城県仙台市) (日本病理学会
会誌,103:p112,2016)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

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