

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462141

研究課題名(和文)人工転写因子を用いた肺および食道扁平上皮癌に対する新規標的治療法の開発

研究課題名(英文) Development of artificial transcription factors for the treatment of lung and esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

猶本 良夫 (Naomoto, Yoshio)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：00237190

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)：我々は、肺および食道の系統維持型癌遺伝子であるSox2のpromoterに結合し、発現を抑制できるZinc finger型人工転写因子：ATF/Sox2を開発した。当該転写因子は、肺・食道扁平上皮癌においてSox2の転写活性を抑制した。ATF/Sox2を発現するrecombinant adeno vital vectorは、mRNAおよび蛋白レベルでSox2発現を抑制し、肺および食道扁平上皮癌の増殖とコロニー形成を阻害した。さらにヌードマウスにおける肺扁平上皮癌xenograftの増殖を抑制した。これより、ATF/Sox2による肺・食道扁平上皮癌へのSox2標的治療法の有効性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sox2 was identified as a lineage specific oncogene, recurrently amplified in lung and esophageal squamous cell carcinoma (SCC). In this study, we have developed a zinc finger based artificial transcription factor (ATF) to suppress Sox2 expression in cancer cells and termed the system ATF/Sox2. A transient transfection reporter assay demonstrated that ATF/Sox2 repressed Sox2 transcriptional activity in Sox2 expressing lung and esophageal SCC cells. A recombinant adenoviral vector: Ad-ATF/Sox2 that expresses ATF/Sox2 suppressed Sox2 at the mRNA and protein levels in lung and esophageal SCC cells. Importantly, in these cells, Ad-ATF/Sox2 decreased cell proliferation and colony formation. Moreover, Ad-ATF/SOX2 significantly inhibited tumor growth in a lung SCC xenograft mouse model. These results indicate that Sox2 silencing by ATF/ Sox2 could lead to the development of effective molecular-targeted therapies for lung and esophageal SCC.

研究分野：医歯薬学、外科系臨床医学、呼吸器外科学

キーワード：肺扁平上皮癌

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、ヒトゲノム上の特定の DNA 配列を認識できる人工 DNA 結合タンパク質のデザイン・創出法を開発し、さらにこれに基づき、標的遺伝子の発現を自在にコントロールできる人工転写因子 (artificial transcription factor: ATF) を開発した (Sera T et al. Adv Drug Deliv. 61:513-26. 2009)。この人工転写因子は、標的遺伝子のプロモーター領域を特異的に認識できる人工 DNA 結合タンパク質、転写調節ドメイン、および核移行シグナルの3つのドメインから構成されている。転写調節ドメインとして、活性化あるいは転写抑制ドメインを選択することにより、それぞれ標的遺伝子発現の on/off が可能となる。この方法を応用し、我々は低酸素特異的な血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現抑制系を構築し、副作用なく癌組織でのみ血管新生を抑制することに成功している (Sera T et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 101:15225-30. 2004)。

癌における分子機構解明により、多くの癌遺伝子依存性が明らかとなり、Gastrointestinal stromal tumor (GIST) における c-KIT 変異、肺腺癌における EGFR 変異や EML4-ALK 融合遺伝子に対する分子標的療法の有効性が確認されてきた。近年、高速シーケンシング技術の急速な進歩の結果、全ゲノム・エクソン・トランスクリプトーム解析が可能となり、国際がんゲノムコンソーシアム (International Cancer Genome Consortium: ICGC) や米国癌ゲノムアトラス研究ネットワーク (The Cancer Genome Atlas Research Network) により、50 種類以上の癌において、新規癌関連遺伝子の発見が進んできている。特に肺扁平上皮癌・食道癌においては、Sox2, FGFR, PI3CA 等の遺伝子の増幅および変異が明らかになり標的遺伝子として新たに報告された (Bass AJ et al. Nat Genet. 41:1238-42. 2009, Hammerman PS et al. Nature. 489: 519-25. 2012, Zhang et al. Cell Reports 5: 1-13 2013.)。しかし、肺腺癌に比べ、肺扁平上皮癌に対する有効な分子標的治療は確立されていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

我々は、扁平上皮癌の driver oncogene であるヒト Sox2 遺伝子プロモーター領域をそれぞれ、特異的に認識できる zinc-finger

based DNA 結合蛋白および、Kruppel Associated Box (SKD) 転写抑制ドメイン、核内移行ドメインを繋いだ標的抑制型 zinc finger based artificial transcription factor (ATF): Ad-ATF/Sox を作製した。当該転写因子を癌に対し recombinant adenoviral vector を用い肺扁平上皮癌に対する新しい標的治療法確立のための基礎的検討を行う。

## 3. 研究の方法

- (1) ATF/Sox2 発現型 plasmid vector による肺および食道扁平上皮癌における Sox2 転写活性抑制効果の確認。
- (2) SOX2 を発現する肺・食道扁平上皮癌細胞株に Ad-ATF/Sox を感染後、細胞増殖および colony 形成能を測定し、control virus 感染群と比較する。
- (3) ATF/Sox2 導入後の表標的遺伝子の発現変化と下流遺伝子およびシグナル解析による抗腫瘍効果誘導機序の解析。
- (4) Xenograft を用いた *in vivo* における抗腫瘍効果の検討。
- (5) 人工転写因子の持つ Off-target 効果の解析。

## 4. 研究成果

検討項目 1: 肺および食道扁平上皮癌における Sox2 転写活性の測定

Sox2 抑制型 ATF を発現する plasmid vector: pcDNA3.1ATF/Sox2 を作製し、Sox2 promoter を有する luciferase construct: 用いた luciferase assay を行った。肺扁平上皮癌細胞 EBC2、LK2、H520 および食道扁平上皮癌細胞 TE1、TE4、TE10 は有意な Sox2 転写活性を示した。pcDNA3.1ATF/Sox2 transfection 後これらの全ての細胞において Sox2 転写活性は control plasmid: pcDNA3.1 に比べ抑制されていた。これより人工転写因子の plasmid での動作確認を成し得た。

検討項目 2: SOX2 を発現する肺・食道扁平上皮癌細胞株における Ad-ATF/Sox2 感染後の細胞増殖および colony 形成能の解析

CAG promoter 下に ATF/Sox2 を発現する recombinant adenoviral vector を Sox2 発現型肺扁平上皮癌株: EBC2 および食道扁平上皮癌株 TE1、TE4、TE10 に感染し、3 日後に細胞数測定を行った。全ての細胞株において Ad-ATF/Sox2 感染後、control vector 感染群に比し、有意な細胞増殖の抑制効果が見られた。さらに colony formation assay を施行したところ、上記細胞の colony 増殖は Ad-ATF/Sox2 により有意に抑制される結果となった。

検討項目 3: ATF/Sox2 導入後の標的遺伝子の発現変化と下流遺伝子およびシグナル解析

## による抗腫瘍効果誘導機序の解析

肺扁平上皮癌株：EBC2 および食道扁平上皮癌株 TE1、TE4、TE10 に対し、Ad-ATF/Sox2 を至適濃度にて感染し、3 日後に RNA ならびに蛋白を回収し、Sox2 発現、またその下流遺伝子で Sox2 に抑制され腫瘍増殖を維持していることを我々が報告している CDKN1A 遺伝子の発現を( Sci Rep. 2016 Feb 5;6:20113. ) qPCR 法、Immunoblot 法にて調べた。4 種全ての細胞において Sox2 の mRNA の発現は control virus 感染細胞に比し、Ad-ATF/Sox2 後に有意に抑制される結果となった。また Immunoblot 解析にて蛋白レベルでも Sox2 の発現には Ad-ATF/Sox2 投与後に明らかな減弱が認められた。4 種細胞においてまた mRNA および蛋白レベル双方で、CDKN1A は ATF/Sox2 により増強が認められ、また PI 染色後の Flow cytometry による細胞周期解析から G1 期の増加が観察された。

### 検討項目 4: Xenograft を用いた *in vivo* における抗腫瘍効果の検討

Ad-ATF/Sox2 の *in vitro* における抗腫瘍効果の解析を行うため、肺扁平上皮癌細胞株 EBC2 に対し、当該 virus または control virus を感染させヌードマウス dorsal flank へそれぞれ皮下接種を行った。週 2 回の腫瘍径測定を行い、経時的に腫瘍体積を測定したところ Ad-ATF/Sox2 感染 EBC2 接種群は control virus 感染 EBC2 接種群に比べて、著しい腫瘍増殖抑制が観察された。

これらの結果から Ad-ATF/Sox2 は下流遺伝子 CDKN1A を誘導し *in vitro*、*in vivo* 双方で肺扁平上皮癌の増殖を抑制できることが示唆された。

### 検討項目 5: 人工転写因子の持つ Off-target 効果の解析

ZFN 型蛋白や TALEN、CRISPR/Cas9 には、本来の標的 (on-target) とは異なる別の分子 (off-target) を阻害、あるいは活性化してしまう好ましくない効果が見いだされることがある。本研究において、ATF/Sox2 の発現が on target 効果として CDKN1A を増強させていることを確認するため、Sox2 発現の無い扁平上皮癌株に人工転写因子を発現させ、CDKN1A 発現が変化するかどうかを Immunoblot 法で解析した。Sox2 陰性肺癌細胞株である EBC1、H226、SQ5 に加え Sox2 陰性である肺扁平上皮癌株 NHLF、血管内皮細胞株 HUVEC に対し、Ad-ATF/Sox2 を至適濃度で感染後、3 日後に蛋白を回収し immunoblot 解析を施行した。検討項目 3 とは対照的に全ての Sox2 発現陰性株において CDKN1A 発現の増加は認められなかった。このことから、CDKN1A の発現増強は Sox2 依存性に、ATF/Sox2 の on-target 効果にてもたら

されるものと考えられた。

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 0 件)

現在投稿準備中

〔学会発表〕(計 1 件)

人工転写因子を用いた肺扁平上皮癌に対する新規標的療法の開発

横田悦子<sup>1</sup>、深澤拓也<sup>1</sup>、山辻知樹<sup>1</sup>、高岡宗徳<sup>1</sup>、羽井佐実<sup>1</sup>、三宅規子<sup>2</sup>、池田智子<sup>2</sup>、石田尚正<sup>1</sup>、吉田将和<sup>1</sup>、瀧川奈義夫<sup>3</sup>、世良貴史<sup>4</sup>、猶本良夫<sup>1</sup> (1 川崎医科大学・総合外科、2 川崎病院研究センター、3 川崎医科大学・総合内科 4、4 岡山大学・生命工学・生体機能分子設計) 第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 10 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 1 件)

名称：扁平上皮癌に対する抗腫瘍剤  
発明者：猶本良夫、深澤拓也、世良貴史  
権利者：学校法人 川崎学園  
種類：特許権  
番号：特願 2017-038047  
出願年月日：2017 年 3 月 1 日  
国内外の別：国内

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

5. 研究組織  
(1) 研究代表者  
猶本良夫 (NAOMOTO YOSHIO)  
川崎医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00237190

(2) 研究分担者

世良 貴史 (SERA TAKASHI)  
岡山大学・自然科学研究科・教授  
研究者番号：10362443

羽井佐 実 (HAISA MINORU)  
川崎医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：40379730

山辻 知樹 (YAMATSUJI TOMOKI)  
川崎医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：70322229

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

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