

T-box転写因子BRACHYURYによる口腔癌細胞における 癌幹細胞形質の制御機構：転写因子SOX2の関与

秋本，直柔

<https://hdl.handle.net/2324/1441154>

出版情報：九州大学，2013，博士（歯学），課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（2）

区分	甲	乙
----	---	---

論文題目 T-box 転写因子 *BRACHYURY* による口腔癌細胞における

癌幹細胞形質の制御機構—転写因子 *SOX2* の関与—

氏名 秋本 直柔

論文内容の要旨

悪性腫瘍において、転移は腫瘍からの離脱、免疫機構からの回避、他臓器への播種、転移巣としての増殖といった、いくつかの段階を経て進行する。近年、腫瘍細胞の上皮間葉移行 (EMT) が腫瘍の浸潤・転移に関与していることが数多く報告されている。EMT により原発巣から離脱した細胞は、転移巣を形成するために、幹細胞の特性である自己複製能を有しているという可能性が示唆されており、実際に近年では EMT と癌幹細胞の直接の関連を示す結果が報告されている。癌幹細胞は化学療法や放射線療法への抵抗性も持ち併せており、新しい治療標的として注目されている。当分野ではこれまでに、培養ヒト腺様嚢胞癌細胞株 ACCS-GFP から *in vivo* selection によって分離した造腫瘍性・高転移性・癌幹細胞様細胞株 ACCSM-GFP において、T-box 転写因子 *BRACHYURY* をノックダウンすることによって、ACCSM-GFP がもつ EMT 形質、癌幹細胞形質が著明に抑制されることを報告した。さらに *BRACHYURY* ノックダウンが *in vitro* での遊走能、浸潤能、抗癌剤抵抗性、放射線治療抵抗性、および *in vivo* での造腫瘍性、転移能を抑制することを明らかにしている。これらの結果より、*BRACHYURY* が癌幹細胞の中心的な制御因子であり、癌治療の標的因子になり得ることが示唆されている。しかし *BRACHYURY* がどのようなメカニズムで癌幹細胞形質発現に寄与しているか未だ明らかになっていない。そこで本研究では培養癌細胞株において、*BRACHYURY* 強制発現が癌幹細胞形質を誘導しうるかに注目して検討を行なった。

まず、培養ヒト腺様嚢胞癌細胞株 ACCS-GFP および培養ヒト扁平上皮癌細胞株 TF-GFP に対して、遺伝子導入による *BRACHYURY* 強制発現を行った。導入した細胞株を用いて、リアルタイム RT-PCR による幹細胞マーカーおよび EMT 関連マーカーの mRNA 発現量の解析、sphere forming assay によるスフェア形成能の解析を行った。その結果、*BRACHYURY* の単独強制発現により幹細胞マーカー、EMT 関連マーカー、スフェア形成能の亢進を認めたものの、その差は僅かであり、癌幹細胞様細胞株である ACCSM-GFP と同等の性質まで誘導するには至らなかった。このことから腫瘍細胞において癌幹細胞形質を誘導するには、*BRACHYURY* の強制発現のみではなく、複数の制御因子の発現が必要であると考えた。

SOX2 は Sry 関連 HMG ボックスドメインを持つ転写因子であり、当分野の下田らは、*SOX2* ノックダウンによっても癌幹細胞形質、EMT 形質がある程度抑制されていることを明らかにしてきた。そこでこの *SOX2* の単独強制発現および *BRACHYURY* と *SOX2* の同時強制発現を行った。*SOX2*

単独の強制発現によっても幹細胞マーカー、EMT 関連マーカー、スフェア形成能は亢進したが、ACCSM-GFP には及ばない結果であった。一方、*BRACHYURY* と *SOX2* の同時強制発現では、*FIBRONECTIN* と *TGFβ2* の発現が著明に亢進し、スフェア形成能にも著明な亢進が認められ、ACCSM-GFP に近似する結果となった。さらに、*in vitro* における細胞の遊走能、浸潤能を wound healing assay および仮想原発巣離脱モデルにて解析した。その結果、どちらにおいても、*BRACHYURY* と *SOX2* 各々の単独強制発現で亢進していたが、同時強制発現でより著明な亢進を認めた。

今回の結果から、*BRACHYURY*, *SOX2*, *TGFβ2*, Fibronectin が蛋白、もしくは遺伝子の同一ネットワーク上に存在している可能性が示唆された。これまでの報告と併せると、*BRACHYURY* は Vimentin を誘導し、*TGFβ* とは互いに正のフィードバックが生じていると言われており、EMT を誘導する。*TGFβ* は *SOX4* を介して *SOX2* を誘導し、*SOX2* は Wnt/ β -catenin 経路に作用して β -catenin を活性化し、活性化された β -catenin は転写因子 *TCF/LEF* と複合体を形成し、*BRACHYURY* を誘導すると報告されている。また、*SOX2* は Fibronectin の発現も誘導すると言われている。つまり、*BRACHYURY* は EMT に重要な Vimentin や、自己複製能発現に必要な *TGFβ* を供給し、*SOX2* は自己複製能や幹細胞の維持に必要な Fibronectin を供給することで、相補的に癌幹細胞形質を誘導する。そして、*BRACHYURY*, *SOX2*, *TGFβ*, Fibronectin の間で際限なくループが繰り返されることによって自己複製能および EMT 形質が誘導され、ループの中心を断ち切ることが癌幹細胞の制御に有効であるということが考えられた。それ故、*BRACHYURY* 単独のノックダウンで癌幹細胞形質が抑制されたのに対し、今回の研究において、*BRACHYURY* 単独の強制発現では癌幹細胞の誘導は僅かであり、*SOX2* と同時に強制発現させることで初めて癌幹細胞形質が誘導されたという事実が説明できると考えた。

