

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500996

研究課題名（和文） SOX17 の発現変化による Wnt 活性制御が消化管腫瘍悪性化に及ぼす影響

研究課題名（英文） Regulation of Wnt activity by SOX17 in gastrointestinal tumorigenesis

研究代表者

大島 浩子（OSHIMA HIROKO）

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：80362515

研究成果の概要（和文）：転写因子である SOX17 は、消化管腫瘍の発生に対して「発がん促進」に作用する可能性と、「発がん抑制」に作用する可能性が指摘されており、その役割は未だ不明である。本研究では、マウスモデルを用いた遺伝学的解析により、腸管腫瘍発生における SOX17 の役割を解析した。その結果、SOX17 遺伝子を欠損させた *Apc<sup>Δ716</sup>* マウスでは腸粘膜が肥厚し、腸管腫瘍数の有意な増加を認めたことから、SOX17 は大腸がん発生に関して抑制的に作用すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Transcription factor SOX17 has 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 role of SOX17 in intestinal tumorigenesis has been examined by genetic studies. Disruption of SOX17 in *Apc<sup>Δ716</sup>* mouse model resulted in thickened gastric mucosa and significant increase of colonic polyps. These results indicate that SOX17 functions as tumor suppressor in colon cancer development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総 計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子病理学

科研費の分科・細目：腫瘍学分野・発がん

キーワード：大腸がん、胃がん、SOX17、マウスモデル、Wnt

## 1. 研究開始当初の背景

SOX17 は SOX ファミリーに属する転写因子であり、SOX17 は  $\beta$ -catenin や TCF と複合体を形成することや、それによる Wnt シグナル抑制作用が報告されている。SOX17 発現は、胎仔の内胚葉系の器官形成に重要であることから、未分化上皮細胞の増殖亢進に作用す

る可能性が考えられた。一方で、多くの大腸がん細胞では DNA メチル化により SOX17 発現が抑制されており、また、培養大腸がん細胞への SOX17 強制発現により、Wnt シグナル活性の低下をともなう、腫瘍原性の抑制が報告されていることから、SOX17 はがん抑制遺伝子である可能性も指摘されている。

申請者はこれまでに、胃がん発生モデルである *K19-Wnt1/C2mE* マウス (*Gan* マウス)、および腸管腫瘍発生モデルである *Apc*<sup>A716</sup> マウスの胃および腸管腫瘍組織を用いて、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を実施した結果、双方の腫瘍組織に共通して *SOX17* が強く発現誘導されることを明らかにした。さらに、浸潤性の悪性化腸がんを発生する、*Apc* と *Smad4* 両遺伝子の双方を欠損した *cis-Apc*<sup>A716</sup>; *Smad4*(-/-) 複合変異マウスを用いた解析の結果、浸潤部位のがん細胞では *SOX17* 発現が消失していた。すなわち、*SOX17* は発がんの初期過程では発現誘導され、腫瘍の悪性化に伴って発現低下する。これらのマウスモデルの解析結果と一致して、ヒトの胃および大腸に発生した良性腫瘍組織(胃腺管腺腫、大腸ポリープ)では、70%以上で *SOX17* の発現が認められたのに対して、悪性の胃がん・大腸がんで *SOX17* 発現を認めたのは 3%以下だった。以上の研究報告と代表者が行なった研究から、*SOX17* には発がんの促進と抑制の両面の機能が想定された。しかし、*SOX17* の腫瘍形成における作用について、遺伝学的な解析はなされていなかった。

## 2. 研究の目的

上記の研究成果を受けて、本研究ではマウスモデルを用いた遺伝学的な解析により、腸管腫瘍発生における *SOX17* 遺伝子発現の役割を明らかにすることを目的として実施する。すなわち、申請者がこれまでに作製した胃および腸管腫瘍自然発生マウスモデル *Apc*<sup>A716</sup> マウスと、*SOX17* 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスとの交配実験を行ない、腸管粘膜上皮細胞への影響や、腸管腫瘍発生への影響を病理学的に解析する。*Apc*<sup>A716</sup> マウスは、*Apc* 遺伝子変異による Wnt シグナル活性化に起因して、腸管に腫瘍を自然発生する。約 80%のヒト大腸がんでも同様の分子機序により腸管腫瘍が発生する。したがって、本研究により *SOX17* 遺伝子による腸管腫瘍発生への影響を明らかに出来れば、ヒト大腸がん発生過程でも同様の分子機構が働いていると考えられ、大腸がん発生分子機構の理解に貢献出来る。

## 3. 研究の方法

腸管腫瘍発生モデルとして、*Apc*<sup>A716</sup> マウス

を使用する。*Apc*<sup>A716</sup> マウスは、ヘテロで *Apc* 遺伝子変異 (716 番コドンの蛋白翻訳終止変異) を持っており、腸管上皮細胞で正常 *Apc* 遺伝子が LOH により欠損すると、Wnt シグナルが活性化して腫瘍を発生する。*SOX17* 遺伝子はホモで欠損すると胎性致死なので、米国ミシガン大学から、コンディショナルに *SOX17* 遺伝子を欠損させる *SOX17*<sup>(flox/flox)</sup> マウスを導入した。また、腸管特異的に *SOX17* 遺伝子を欠損させるために、*villin-Cre* マウスを米国 Jackson 研究所から導入した。研究実施中に、*Cre* の発現も誘導型である必要性が出たため、タモキシフェン (Tmx) 投与により *Cre* を活性化させる *villin-CreER* マウスをフランス IGBMC から導入した。さらに *SOX17* 遺伝子欠損した細胞を特定するために、*Cre* 依存的に *LacZ* を発現する *ROSA26-LSL-LacZ* (*R26LacZ*) を Jackson 研究所から導入した。これらのマウスを交配して、以下の2種類のモデルを作製した。

- ・ *Apc*<sup>A716</sup> *SOX17*<sup>(flox/flox)</sup> *villin-Cre* *R26-LacZ*
- ・ *Apc*<sup>A716</sup> *SOX17*<sup>(flox/flox)</sup> *villin-CreER* *R26-LacZ*

これらのマウスと、それぞれ *villin-Cre* または *villin-CreER* を持たない対照群マウスを、10 週齢～15 週齢に解剖し、腸管粘膜上皮の分化、増殖、および腫瘍数等について、病理学的に解析した。*Apc*<sup>A716</sup> マウスでは、この週齢で腸管に腫瘍が多発する事は確認している。*Cre* により *SOX17* 遺伝子が欠損しているかについては、組織から調製したゲノム DNA を用いた PCR によって確認した。

## 4. 研究成果

(1) *Apc*<sup>A716</sup> *SOX17*<sup>(flox/flox)</sup> *villin-Cre* *R26-LacZ* マウスの解析：

4 系統のマウスの交配により、上記遺伝子型のマウス作製を試みたが、*SOX17*<sup>(flox/flox)</sup> *villin-Cre* マウスの生まれる個体数は極端に少なく、メンデルの法則にしたがっていなかった。生まれた *SOX17*<sup>(flox/flox)</sup> *villin-Cre* マウスの体のサイズも小さいため、胎仔期の *SOX17* 遺伝子欠損が、部分的致死に至ると考えられた。また、腸管以外の尾部においても *SOX17* 遺伝子欠損が認められたことから、*villin* プロモーターは、胎仔期に一過性に腸上皮以外の組織でも発現があると考えられた。

得られた、*Apc*<sup>A716</sup> *SOX17*<sup>(flox/flox)</sup> *villin-Cre* *R26-LacZ* マウス 3 匹について、ゲノム PCR および *LacZ* 免疫染色により、腸管全域にお

ける SOX17 遺伝子欠損を確認した。これらのマウスを、対照群マウスと同週齢で病理解剖した。その結果、小腸粘膜および腫瘍発生数、腫瘍の大きさには変化が認められなかった。一方で、結腸では SOX17 遺伝子欠損により、粘膜の厚さが対照群に比較して 1.7 倍に肥厚が認められ、発生したポリープ数も約 7 倍へと有意に増加が認められた。Apc 遺伝子に変異のない SOX17 (flox/flox) villin-Cre マウスでは粘膜肥厚は見られないので、結腸においては、Apc 遺伝子がヘテロで変異していることが、粘膜肥厚に関与すると考えられた。Apc 遺伝子ヘテロの状態では、未だ議論があるが、Apc 遺伝子正常の上皮に比較して Wnt シグナルが少し活性化している可能性が指摘されている。SOX17 には Wnt シグナル抑制作用が知られているので、Apc 遺伝子ヘテロ変異と SOX17 の双方が Wnt シグナル活性化に作用して、粘膜肥厚と腫瘍数の増加を誘導した可能性が考えられた。

( 2 ) Apc<sup>A716</sup> SOX17<sup>(flox/flox)</sup> villin-CreER R26-LacZ マウスの解析 :

SOX17 遺伝子欠損による胎性致死を回避するため、Tmx 投与により腸上皮細胞で Cre の活性を誘導できる、villin-CreER マウスを導入し、上記の遺伝子型マウスを作製した。このマウスに、Tmx を 5 日間連投した直後に病理解剖を行ない、SOX17 遺伝子が効率よく欠損することをゲノム PCR と LacZ 免疫染色により確認した。

交配により得られた複合マウスに Tmx の 5 日間連投を 3 週間続けて、10~15 週齢で病理解剖した結果、小腸、結腸とも正常粘膜組織に肥厚のような形態異常は認められず、さらに腸管腫瘍の平均発生数に差は認められなかった。すなわち、成熟マウスの腸管で SOX17 遺伝子発現が抑制されても、粘膜肥厚には至らず、胎仔期の SOX17 発現抑制が腸上皮の過形成変化を誘導したと考えられた。

以上の (1) (2) の実験から、発がん初期過程において上皮細胞で発現誘導される SOX17 は、腫瘍腫細の成長や形成に SOX17 は影響を及ぼしていないと考えられた。すなわち、発がんを促進にも抑制にも働きかけていないと考えられる。一方で、胎仔の器官形成期で SOX17 発現が抑制されると、Wnt シグナル活性が上昇し、未分化な上皮細胞の増

殖を誘導して、結果的に結腸粘膜が肥厚する可能性が考えられる。肥厚した粘膜では、分裂中の娘細胞など、未分化な細胞数が相対的に多いため、体細胞での遺伝子変異頻度が高くなり、結腸のポリープ数が多くなった可能性が考えられた。

一方で、ヒトの悪性化した大腸がんでは SOX17 ががん抑制遺伝子として働く可能性が報告されている。すなわち、発がん過程で重要な役割を果たしていないが、その発現が低下することが、悪性化誘導に関わっている可能性は未だ考えられる。今後は、浸潤や転移などの悪性化進展過程を再現するマウスモデルにおいて、SOX17 遺伝子を欠損させて、その影響を観察する事が重要と考えられた。

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 8 件)

1. Kong D, Piao YS, Yamashita S, Oshima H, Oguma K, Fushida S, Fujimura T, Minamoto T, Seno H, Yamada Y, Satou K, Ushijima T, Ishikawa T, and Oshima M. Inflammation-induced repression of tumor suppressor miR-7 in gastric tumor cells. *Oncogene*, 31: 3949-3960, 2012 (DOI: 10.1038/onc.2011.558)
2. Tye H, Kennedy CL, Najdovska M, McLeod L, McCormach W, Hughes N, Dev A, Sievert W, Ooi CH, Ishikawa TO, Oshima H, Bhathal PS, Parker A, Oshima M, Tan P, and Jenkins B. STAT3-driven upregulation of TLR2 promotes gastric tumorigenesis independent of tumor inflammation. *Cancer Cell*, 22: 466-478, 2012. (DOI: 10.1016/j.ccr.2012.08.010)
3. Oshima H and Oshima M. The inflammatory network in the gastrointestinal tumor microenvironment: lessons from mouse models. *J Gastroenterol*, 47: 97-106, 2012. (DOI: 10.1007/s00535-011-0523-6)
4. Oshima H and Oshima M. The role of PGE<sub>2</sub>-associated inflammatory responses in gastric cancer development. *Semin Immunopathol*, 35: 139-150, 2013 (DOI: 10.1007/s00281-012-0353-5)
5. Oshima H, Popivanova BK, Oguma K, Kong D, Ishikawa T, and Oshima M. Activation of

epidermal growth factor receptor signaling by the prostaglandin E<sub>2</sub> receptor EP4 pathway during gastric tumorigenesis. *Cancer Sci*, 102: 713-719, 2011.

(DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.01847.x.)

6. Oshima H, Hioki K, Popivanova BK, Oguma K, van Rooijen N, Ishikawa T, and Oshima M. Prostaglandin E<sub>2</sub> signaling and bacterial infection recruit tumor-promoting macrophages to mouse gastric tumors. *Gastroenterology*, 140: 596-607, 2011.

(DOI: 10.1053/j.gastro.2010.11.007.)

7. Oshima H, and Oshima M. Gastric tumor mouse models: Wnt activation and PGE<sub>2</sub> induction. *Pathology Int*, 60: 599-607, 2010.

(DOI: 10.1111/j.1440-1827.2010.02567.x.)

8. Oguma K, Oshima H, and Oshima M. Inflammation, tumor necrosis factor and Wnt promotion in gastric cancer development. *Future Oncology*, 6: 515-526, 2010.

(DOI: 10.2217/fon.10.13.)

〔学会発表〕（計 8 件）

1. 大島 浩子, 大島正伸. The role of inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  and microenvironment in mouse gastric tumorigenesis, 第 86 回日本薬理学会学術総会, 2013 年 3 月 21 日, 福岡国際会議場（福岡県）
2. Oshima H, Yoshida GH, Ishikawa T, Saya H, and Oshima M. The role of inflammatory cytokine TNF in CD44 expression-associated mouse gastric tumorigenesis, 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19 日, ロイトン札幌（北海道）
3. Oshima H, Ishikawa T, and Oshima M. The role of TNF- $\alpha$  in PGE<sub>2</sub>-induced tumorigenesis in gastric cancer mouse model, 2012 年 4 月 2 日, McCormick Place (USA)
4. Oshima H, and Oshima M. Inflammatory responses and TNF- $\alpha$  in mouse gastric tumorigenesis. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月 4 日, 名古屋国際会議場（愛知県）
5. Oshima H, Kong D, Ju XiaoLi, and Oshima M. Inflammatory microenvironment by cooperation of PGE<sub>2</sub> and bacterial infection in mouse gastric tumors, 日本分子生物学会第 11 回春季シンポジウム/金沢国際がん生物

学シンポジウム, 2011 年 5 月 25 日, 石川県立音楽堂（石川県）

6. Oshima H, Kong D, Ishikawa T, and Oshima M. Downregulation of tumor suppressor microRNA in inflammatory microenvironment. 第 1 回発がんスパイラル国際シンポジウム, 2011 年 2 月 1 日, 東京大学（東京都）

7. Oshima H, and Oshima M. Inflammatory microenvironment by cooperation of PGE<sub>2</sub> and bacterial infection in mouse gastric tumors, 2010 年 12 月 22 日, Incheon Sheraton Hotel (韓国)

8. 大島浩子, 大島正伸. Gastric tumorigenesis through bacterial infection and COX-2/PGE<sub>2</sub> signaling pathway. 第 69 回日本癌学会学術集会, 大阪国際コンベンションセンター（大阪府）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：がんの予防用または治療用物質のスクリーニング方法

発明者：大島正伸、石川智夫、大島浩子

権利者：

種類：特許出願

番号：特願 2013-30503

出願年月日：平成 25 年 2 月 20 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ：

<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・助教

研究者番号：80362515

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし