

学位論文

「Cooperation of Sox4 with β -catenin /p300 complex in
transcriptional regulation of the *Slug* gene during
divergent sarcomatous differentiation in uterine
carcinosarcoma」

(子宮癌肉腫において、Sox4/ β -catenin/p300 複合体による *Slug* 遺
伝子発現誘導は、上皮間葉転換/がん幹細胞化機構を介して肉腫成分
の派生に関与する)

DM13008 井上 久子

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程
生体構造医科学群 分子病理学
指導教授 三枝 信

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要旨

【背景】子宮癌肉腫は上皮間葉転換(EMT)との関連がある典型的な組織型であり、EMT はがん幹細胞(CSC)の性格を表すことが知られている。Sox と β -catenin は EMT/CSC を誘導する際に重要な役割を果たす分子であるが、子宮癌肉腫の腫瘍発生との関わりについてはほとんど解明されていない。そこで我々は、子宮癌肉腫における Sox/ β -catenin シグナル経路の機能解析に焦点を当て、以下の検討を行った。

【方法】3 種類の子宮内膜癌培養細胞を用いて、EMT/CSC に関する実証試験やトランスフェクションによる実験を行った。免疫組織化学的検討は計 32 例の臨床検体を用いて行った。

【結果】子宮内膜癌細胞は、間葉系幹細胞の無血清培地である STK2 で培養すると間葉系の細胞形態へ変化し、E-cadherin の発現低下および Slug の発現上昇を認めた。Slug 遺伝子は β -catenin のターゲット遺伝子としても知られている。また、これらの細胞は、Sox4、Sox7 及び Sox9 の発現上昇、ALDH1 の活性上昇とスフェロイドの形態を呈することから、がん幹細胞の性格を有することが示された。Sox family のうち、Sox4 の過剰発現により Slug 遺伝子のプロモーター活性が著明に上昇し、Sox7 や Sox9 とともにトランスフェクションすることによりその活性はさらに上昇した。さらに Sox4 は β -catenin/p300 との転写複合体を形成することで Slug 遺伝子の転写活性を促進させることも明らかとなったが、TCF4 とは独立した動態を示していた。臨床検体では、核 β -catenin と Slug の染色スコアが、癌肉腫の癌成分に比べて肉腫成分において有意に高く、Sox4、Sox7 及び Sox9 との正の相関が得られた。

【結語】以上の結果から、子宮癌肉腫の肉腫成分の派生を促進させる過程では、Sox7 や Sox9 と同様に、Sox4 が β -catenin/p300 シグナル経路と協同して Slug 遺伝子の転写活性を上昇させることで、EMT/CSC を誘導させる重要な役割を果たしていることが示唆された。

目次

	頁
1. 序論	1
2. 方法	
2-1. プラスミドと細胞培養	1
2-2. 抗体及び試薬	2
2-3. トランスフェクション	2
2-4. リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)	2
2-5. ウェスタンブロットアッセイと免疫沈降	3
2-6. フローサイトメトリーと Aldefluor アッセイ	3
2-7. スフェロイドアッセイ	3
2-8. クロマチン免疫沈降(ChIP アッセイ)	3
2-9. 臨床検体	3
2-10. 免疫染色	4
2-11. 統計	4
3. 結果	
3-1. 子宮内膜癌細胞の EMT の過程における Sox 因子の発現変化	4
3-2. 子宮内膜癌細胞における EMT と CSC の関連性について	5
3-3. 子宮内膜癌細胞において Slug は EMT/CSC と関連する	5
3-4. 子宮内膜癌細胞において Sox 因子は <i>Slug</i> 遺伝子の転写を調節する	5
3-5. 子宮内膜癌細胞では <i>Slug</i> 遺伝子の転写調節に β -catenin と Sox4 が関連する	6
3-6. 臨床検体での免疫組織化学的検討	6
4. 考察	7
5. 結語	8
6. 謝辞	9
7. 引用文献	9
8. 業績目録	12
9. 図表	13

1. 序論

子宮癌肉腫(UCS)は、以前は悪性ミューラ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、子宮がん全体の2-5%を占める[1, 2]。臨床的には 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[3]。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[4, 5]。

上皮間葉転換(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のを誘導する役割をもつ[6, 7]。EMT 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[8]。*E-cadherin* 遺伝子を抑制するはたらきをもつ Snail、Slug 及び Twist もまた、EMT の過程に関与する[9-12]。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。

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との報告がある[13]。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[14]。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報告がある[14]。このことから、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。

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ことが知られている[15-17]。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のではないかと仮定した。これを実証するために、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 の発現を調べることにした。

2. 方法

2-1. プラスミドと細胞培養

-2125/-235 bp、-1859/-235 bp、-1587/-235 bp、あるいは-813/-235 bpを含む pGL3B-Slug luc構造、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 (TCF4は陰性優位)、pG5 luc及びpM- β -catenin Δ S45を先の論文の記述のとおり用いた[18–21]。pM-Sox4はSox4 cDNA fragmentにpM DNAB-D vector (BD Biosciences Clontech, Worcester, MA, USA)を挿入し作製した。また、PrimeSTAR Mutagenesis Basal kit (Takara Bio, Shiga, Japan)を用いて、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、10%ウシ血清を含む Eagle's MEM メディウムを用いて培養を行った。HA-Slug を恒常的に過剰発現させるために Hec6 細胞にプラスミドあるいは空ベクターをトランスフェクトさせ、先の論文の記述のとおり安定したクローンを作製した[20]。

2-2. 抗体及び試薬

抗 β -catenin及び抗p27^{kip1}抗体はBD biosciences (San Jose, CA, アメリカ)社製、抗 Sox4、抗 Sox6、抗 Sox7、抗 Sox9、抗 Sox11 及び β -actin 抗体は Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis, MO, アメリカ)社製、抗 Snail 及び抗 Slug 抗体は Cell Signaling (Danvers, MA, アメリカ)社製、抗 p21^{waf1}、抗 cyclin D1 及び抗 CD44s 抗体は Dako (Copenhagen, デンマーク)社製、抗 Sox2 及び抗 cyclin A 抗体は Abcam (Cambridge, MA, アメリカ)社製及び Novocasta (Newcastle, イギリス)社製をそれぞれ用いた。抗 HA 及び抗 E-cadherin 抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, アメリカ)社製及び Takara (滋賀、日本)をそれぞれ用いた。抗 CD133抗体は Miltenyi Biotechnology (Bergisch Gladbach, ドイツ)社製を用いた。

間葉系幹細胞の無血清培地である STK2 は[22]、DS Pharma Biomedical (大阪、日本)社製を用いた。

2-3. トランスフェクション

LipofectAMINE PLUS (Invitrogen, Carlsbad, CA, アメリカ)社製を用い、先の論文の記述のとおり、再現性を図るために二度あるいは三度トランスフェクションを施行した[18–21]。ルシフェラーゼ活性は先の論文のとおり定量を行なった[18–21]。

2-4. 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 (Applied Biosystems, Foster City, CA, アメリカ製)及び特異的なプライマー(Table 1)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* 遺伝子のプライマーは先の論文の記述のとおり使用した[18–21]。

2-5. ウェスタンブロットアッセイと免疫沈降

RIPA buffer[20 mM Tris-HCl (pH7.2), 1 % Nonidet P-40, 0.5 % sodium deoxycholate, 0.1 % sodium dodecyl sulfate]を用いて、細胞タンパクの全量を分離した。タンパクを等分し、SDS-PAGE で溶解させ、膜への転写、及び ECL 検出システム(Amersham Pharmacia Biotechnology, Tokyo, Japan)を用いて一次抗体を使った検出を行った。

免疫沈降では、STK2 で培養した細胞を TNF 緩衝液[10 mM Tris-HCl (pH7.6), 150 mM, NaCl, 1 % NP-40, 1 mM EDTA]で溶解させた。細胞溶解液から不純物を取り除き、Protein G-Sepharose (Amersham Pharmacia, Biotechnology)とインキュベートした後、抗 Sox4 抗体とのインキュベートを行った。続けて、 β -catenin と抗 Sox4 抗体を用いてウェスタンブロットアッセイを行った。

2-6. 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 (Sigma)を用いて染色した。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(Stem Cell Technologies, Grenoble, France)を用いて、説明書に従って評価した。また、BD FACS Calibur (BD Biosciences)及び CellQuest Pro software version 3.3 (BD Biosciences)を用いて、フローサイトメトリーによる細胞の解析を行った。

2-7. 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、連結プレート(Thermo Fisher Scientific, Yokohama, 日本)を用いて播種した。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。

2-8. クロマチン免疫沈降(ChIP アッセイ)

EpiXplore ChIP assay kit (Clontech Laboratory, Mountain View, CA,アメリカ)を用いて、ChIP 解析を行った。STK2 培地で 1 週間培養した後、細胞をホルマリンにクロスリンクさせた。200~1000bp の DNA 断片に切断するために細胞溶解液に超音波処理を行い、抗 Sox4 抗体あるいは陰性コントロールとしてウサギ IgG を用いてオーバーナイト処理を行った。プロテナーゼ K による消化を行い、DNA を抽出し PCR を行った。ChIP 解析は 4 つの特異的プライマーのセットを用いて 30~25 サイクルにて行った。

2-9. 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た。2014 年の WHO 分類の criteria に従い、悪性の上皮系成分(類内膜腺癌、漿液性腺癌、あるいは淡明細胞癌)及び間葉系成分(同所性あるいは異所

性成分)がともに確認できるものを子宮癌肉腫(UCS)とした。なお、紡錘形成分や硝子化した間質を含む類内膜腺癌については除外した。最終的に、計 32 例の UCS 検体を対象とした。このうち 9 例は類内膜腺癌の成分を有しており、23 例はそれ以外の上皮系成分を有していた。また 25 例は同所性の間葉系成分、8 例は異所性成分を有していた。32 例全例で 10%ホルマリン固定、パラフィンワックスによる包埋を行った。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)。また、本研究は後ろ向き研究であるため、被験者からのインフォームドコンセントの書面は不要であった。

2-10. 免疫染色

免疫組織化学的検討は、マイクロウェーブ及びポリマー法を用いて、以前の論文の記述のとおり行った[18-21]。免疫反応は DAB(3,3' diaminobenzidine)により可視化させ、核はメチルグリーンを用いて染色した。

免疫染色の評価には、以前の論文の記述のとおり、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[18-21]。

2-11. 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。

3. 結果

3-1. 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 培地で培養を行った[22]。Fig. 1a に示すように、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(Fig. 1b, 1c)。それに対し、Snail のタンパク発現の変化は(Fig. 1b)、mRNA と同様に比較的少なかった(データ未記載)。

次に、Sox 因子の中には EMT の促進に関与するものがあるとの報告があることから[15]、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 ともに上昇は認めなかった(Fig. 1d, 1e)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(Fig. 1f、

FigureS1A)。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。

3-2. 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(Fig.1b)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(Fig. 2a)。Ishikawa 及び Hec251 細胞においても同様の結果が得られた(データ未記載)。Aldefluor アッセイでは、ALDH1 活性の高い細胞比率が上昇しており(Fig. 2b)、径 50 μ m を超えるスフェロイドの数も増加していた(Fig. 2c)。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(Fig. S1B)。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。

3-3. 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(Fig. 2d)。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(Fig. 2e)。さらに、ALDH1 活性の高い細胞比率が上昇していた(Fig. 2f)。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(Fig. S1C)。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。

3-4. 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(Fig. 3a、FigS2A、S2B)。

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(Fig.3b)。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(Fig.3c、Fig.S2C)。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(Fig.3b)、Sox4 に対するレスポンスが低下した(Fig.3d)。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(Fig. 3e)。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。

3-5. 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[18]、*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(Fig.4a、Fig.S3A)。また、GFP-Sox4、HA- β -catenin Δ S45、Flag-p300 の共発現では核内に粗大な dot 形成をみとめたが(Fig. 4b)、GFP-Sox4 と HA- β -catenin Δ 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(Fig. S3B)。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。(Fig. 4c、Fig. S3C,D)。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。

3-6. 臨床検体での免疫組織化学的検討

Fig. 5a に *Slug*、 β -catenin、Sox 因子の免疫染色の組織像を示す。*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(Fig. 5b)。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(Table 2)。

4. 考察

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[24]。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[14]、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[25]、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える。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では各 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[26-31]。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。①STK2 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。②Sox4 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。③Sox4 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[32]。

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[25]。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[33]。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[34]、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。

5. 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考えた(Fig. 6)。 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。

6. 謝辞

本研究をご指導下さいました病理学三枝信教授、免疫学江島耕二准教授、病理学橋村美紀技術員をはじめ、教室のスタッフの方々に、この場を借りて厚く御礼申し上げます。

7. 引用文献

1. Amant F, Cadron I, Fuso L, Berteloot P, de Jonge E, Jacomen G, et al. Endometrial carcinosarcomas have a different prognosis and pattern of spread compared to high-risk epithelial endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2005;98:274-80.
2. Nam JH, Park JY. Update on treatment of uterine sarcoma. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2010;22:36-42.
3. Zelmanowicz A, Hildesheim A, Sherman ME, Sturgeon SR, Kurman RJ, Barrett RJ, et al. Evidence for a common etiology for endometrial carcinomas and malignant mixed mullerian tumors. *Gynecol Oncol.* 1998;69:253-7.
4. McCluggage WG. Malignant biphasic uterine tumours: carcinosarcomas or metaplastic carcinomas? *J Clin Pathol.* 2002;55:321-5.
5. D'Angelo E, Prat J. Uterine sarcomas: a review. *Gynecol Oncol.* 2010; 23:694-702.
6. Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol.* 2005;17:548-58.
7. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009;139:871-90.
8. Casas E, Kim J, Bendesky A, Ohno-Machado L, Wolfe CJ, Yang J. Snail2 is an essential mediator of twist-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Res.* 2011;71:245-54.
9. Savagner P, Yamada KM, Thiery JP. The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol.* 1997; 137:1403-19.
10. Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol.* 2000;2:84-9.
11. Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci.* 2003;116:499-511.

12. Li J, Zhou BP. Activation of β -catenin and Akt pathways by Twist are critical for the maintenance of EMT associated cancer stem cell like characters. *BMC Cancer*. 2011;11:49
13. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414:105-11.
14. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133:704-15.
15. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119:1420-8.
16. Kanwar SS, Yu Y, Nautiyal J, Patel BB, Majumdar APN. The Wnt/ β -catenin pathway regulates growth and maintenance of colonospheres. *Mol Cancer*. 2010;9:212.
17. Wang H, Zhang G, Zhang H, Zhang F, Zhou B, Ning F, et al. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype and cancer stem cell-like properties in cisplatin-resistant lung cancer cells through AKT/ β -catenin/Snail signaling pathway. *Eur J Pharmacol*. 2014;723:156-66.
18. Saegusa M, Hashimura M, Kuwata T, Okayasu I. Requirement of the Akt/ β -catenin pathway for uterine carcinosarcoma genesis, modulating E-cadherin expression through the transactivation of Slug. *Am J Pathol*. 2009;174:2107-15.
19. Saegusa M, Hashimura M, Kuwata T, Hamano M, Okayasu I. Upregulation of TCF4 expression as a transcriptional target of β -catenin/p300 complexes during trans-differentiation of endometrial carcinoma cells. *Lab Invest*. 2005; 85:768-79.
20. Saegusa M, Hashimura M, Kuwata T. Sox4 functions as a positive regulator of β -catenin signaling through upregulation of TCF4 during morular differentiation of endometrial carcinomas. *Lab Invest*. 2012;93:511-21.
21. Saegusa M, Hashimura M, Suzuki E, Yoshida T, Kuwata T. Transcriptional up-regulation of Sox9 by NF- κ B in endometrial carcinoma cells, modulating cell proliferation through alteration in the p14ARF/p53/p21WAF1 pathway. *Am J Pathol*. 2012;181:684-92.
22. Tsugeno Y, Sato F, Muragaki Y, Kato Y. Cell culture of human gingival fibroblasts, oral cancer cells and mesothelioma cells with serum-free media, STK1 and STK2. *Biomed Rep*. 2014;2:644-8.
23. Zaino R, Carinelli SG, Ellenson LH, Eng C, Katabuchi H, Konishi I, et al. Tumours of the uterine corpus. In: Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH, editors. WHO classification of tumours of female reproductive organs. Lyon: IARC; 2014. p. 121-154.

24. Zhu L-F, Hu Y, Yang C-C, Xu X-H, Ning T-Y, Wang Z-L, et al. Snail overexpression induces an epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties in SCC9 cells. *Lab Invest.* 2012;92:744-52.
25. Kamachi Y, Kondoh H. Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development.* 2013;140:4129-44.
26. Jeong CH, Cho YY, Kim MO, Kim SH, Cho EJ, Lee SY, et al. Phosphorylation of Sox2 cooperates in reprogramming to pluripotent stem cells. *Stem Cells.* 2010;28:2141-50.
27. Van Hoof D, Munoz J, Braam SR, Pinkse MW, Linding R, Heck AJ, et al. Phosphorylation dynamics during early differentiation of human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2009;5:214-26.
28. Tsuruzoe S, Ishihara K, Uchimura Y, Watanabe S, Sekita Y, Aoto T, et al. Inhibition of DNA binding of Sox2 by the SUMO conjugation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;351:920-6.
29. Baltus GA, Kowalski MP, Zhai H, Tutter AV, Quinn D, Wall D, et al. Acetylation of Sox2 induces its nuclear export in embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2009;27:2175-84.
30. Zhao HY, Zhang YJ, Dai H, Zhang Y, Shen YF. CARM1 mediates modulation of Sox2. *PLoS ONE.* 2011;6:e27026.
31. Jang H, Kim TW, Yoon S, Choi SY, Kang TW, Kim SY, et al. O-GlcNAc regulates pluripotency and reprogramming by directly acting on core components of the pluripotency network. *Cell Stem Cell.* 2012;11:62-74.
32. Zhang J, Liang Q, Lei Y, Yao M, Li L, Gao E, et al. SOX4 indices epithelial-mesenchymal transition and contributes to breast cancer progression. *Cancer Res.* 2012;72:4597-608.
33. Vervoort SJ, van Boxtel R, Coffey PJ. The role of SRY-related HMG box transcription factor (SOX4) in tumorigenesis and metastasis: friend or foe? *Oncogene.* 2013;32:3397-409.
34. Sinner D, Kordich JJ, Spence JR, Opoka R, Rankin S, Lin SC, et al. Sox17 and Sox4 differentially regulate beta-catenin/T-cell factor activity and proliferation of colon carcinoma cells. *Mol Cell Biol.* 2007;27:7802-15.

8. 業績目録

原著

1. 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, 16:53, 2016.
2. Takahashi H, Yoshida T, Matsumoto T, Kameda Y, Takano Y, Tazo Y, Inoue H, Saegusa M : Frequent β -catenin gene mutations in atypical polypoid adenomyoma of the uterus. Human Pathology, 45:33-40, 2014.
3. Yoshida T, Hashimura M, Mastumoto T, Tazo Y, Inoue H, Kuwata T, Saegusa M : Transcriptional upregulation of HIF-1 α by NF- κ B/p65 and its associations with β -catenin/p300 complexes in endometrial carcinoma cells. Laboratory Investigation, 93(11):1184-93, 2013.

学会発表

1. 井上久子、梶田咲美乃、橋村美紀、三枝信：卵巣・子宮原発癌肉腫の ALK 依存性上皮間葉転換（EMT）・細胞増殖制御シグナル経路の証明。第 105 回、日本病理学会総会（2016 年 5 月、仙台）
2. 井上久子、梶田咲美乃、橋村美紀、三枝信：ALK 陽性卵巣・子宮原発癌肉腫は漿液性腺癌の成分を有する。第 104 回日本病理学会総会（2015 年 4 月、名古屋）
3. 井上久子、梶田咲美乃、橋村美紀、三枝信：卵巣・子宮原発癌肉腫では全長 ALK タンパクが高発現する。第 103 回日本病理学会総会（2014 年 4 月、広島）

9. 図表

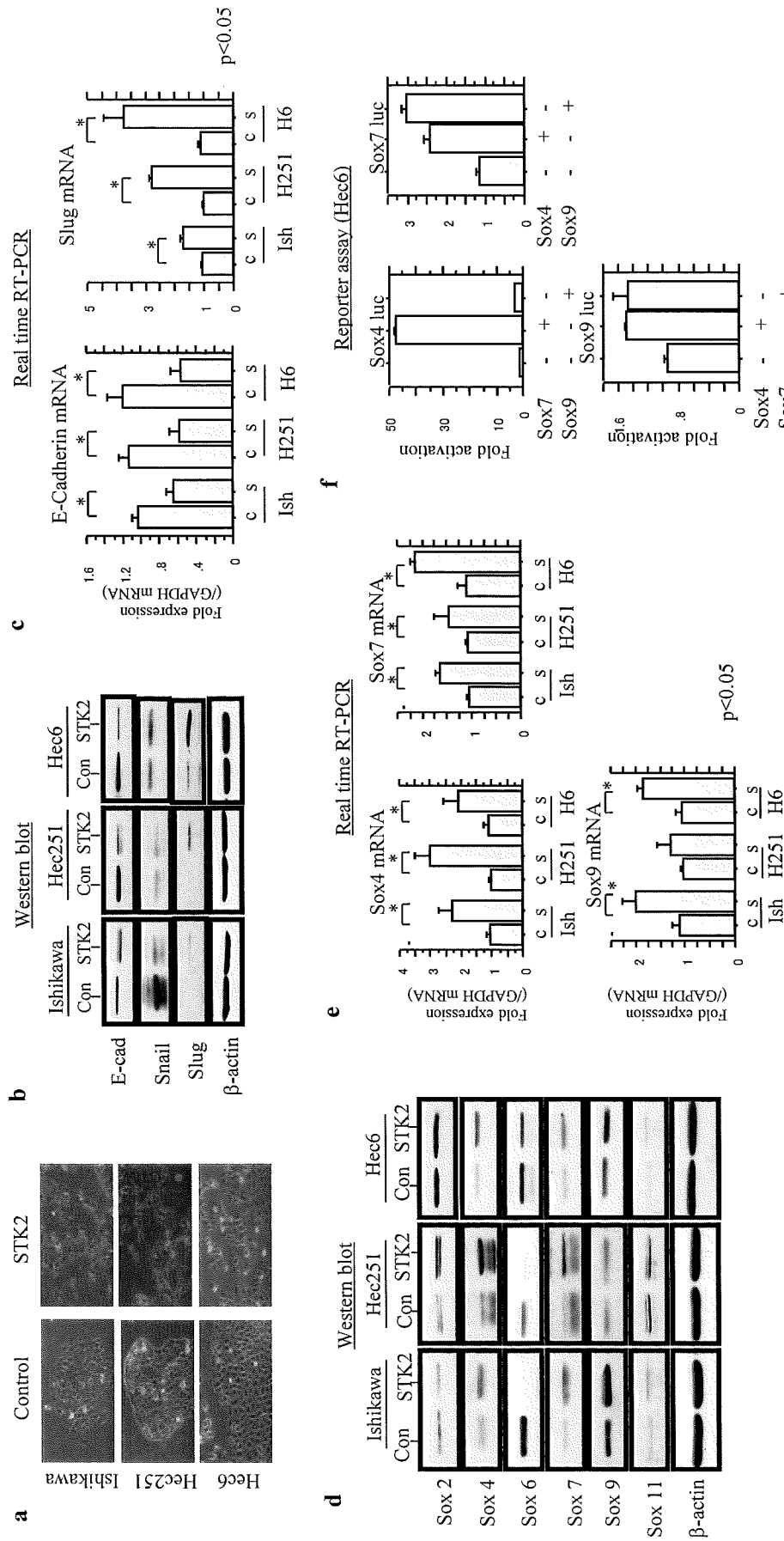


Figure.1 a Ishikawa、Hec251、Hec6細胞のSTK2での培養5日目の細胞像。各細胞のウエスタンブロット解析 (b) とRT-PCR (c) の結果。Con, c:コントロール、s:STK2、Ish: Ishikawa細胞。d STK2で培養した子宮内膜癌細胞のウエスタンブロット解析。e:コントロール。e STK2で培養した子宮内膜癌細胞のRT-PCR。c: コントロール、s:STK2。f Hec6細胞にSox4、7、9のレポーター構造をトランスフェクトさせ、さらにSox4、7、9のいずれかを発現させた。活性は空ベクターに対する相対比で平均±SD(標準偏差)にて示す。この実験は2度施行した。

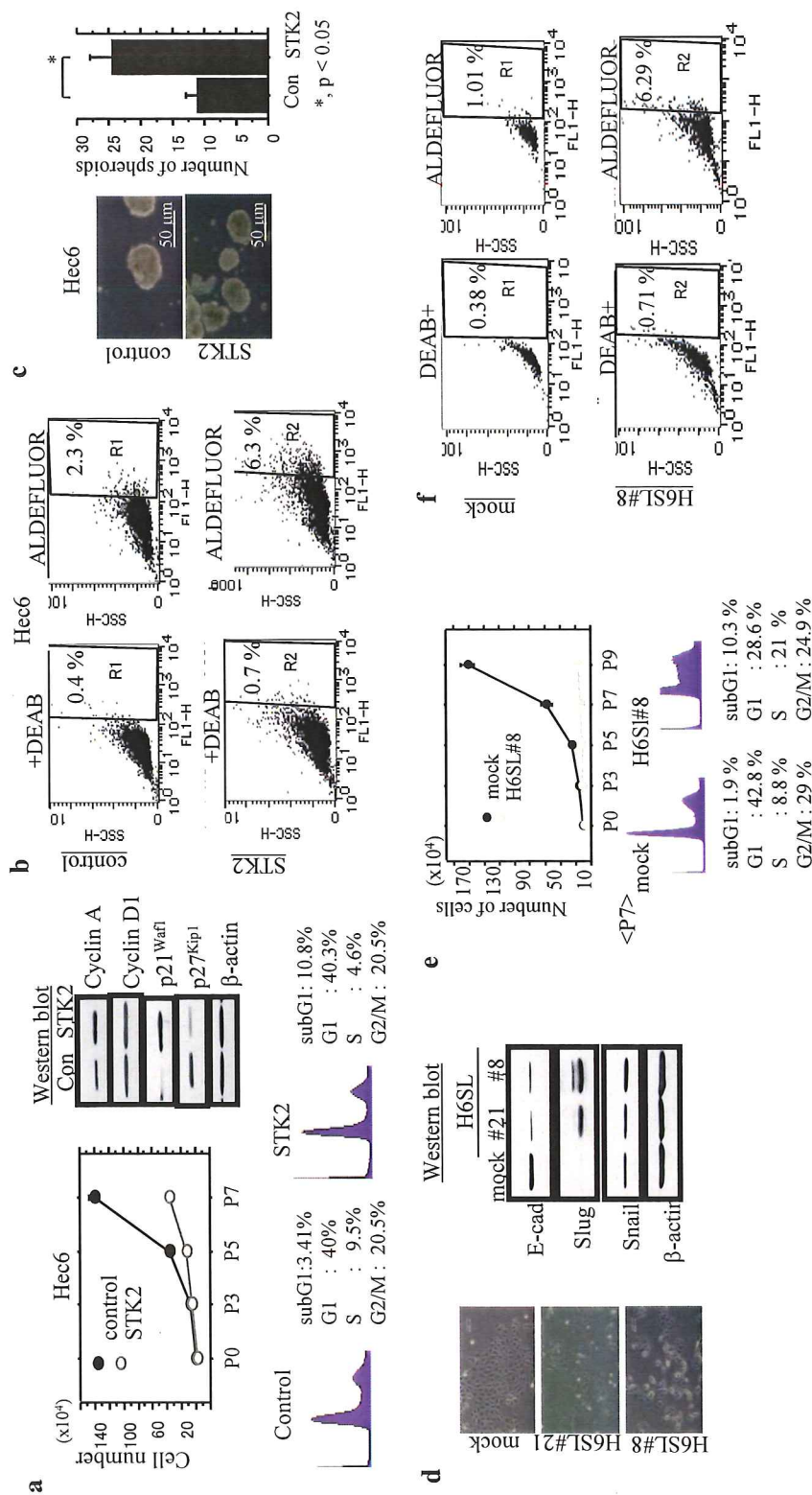


Figure.2 a (上段左)Hec6細胞をコントロール又はSTK2培地に播種し、0、3、5、7日目の細胞数をカウントした。(上段右)STK2で培養したHec6細胞のウェスタンブロット解析。(下段)コントロール又はSTK2で培養したHec6細胞のフローサイトメリーによる細胞周期解析。b コントロール(上段)とSTK2(下段)で培養したHec6細胞のAldefluor解析を5日間行った。ALDH活性のない細胞は各表のバーより左側にプロット、活性のある細胞は右側(R1あるいはR2のエリア)にプロットされている。パーセンテージはALDH活性のある生存細胞の比率。DEAB: diethylaminobenzaldehyde. c (左)Hec6細胞をSTK2で培養し、2週間経過したスフェロイドの細胞像。(右)スフェロイド細胞数を平均±SDと比較。Con:コントロール。d 2つの独立したHec6細胞株にSlugを過剰発現させたもの(H6SL#8, #21)とmockの細胞像(左)、及びウェスタンブロット解析(右)。e (上段)H6SL#8細胞とmock細胞を播種し、0、3、5、7、9日目の細胞数をカウント。(下段)7日目の細胞を用いたフローサイトメリーによる細胞周期解析。f mock細胞(上段)とH6SL#8細胞(下段)のAldefluor解析。

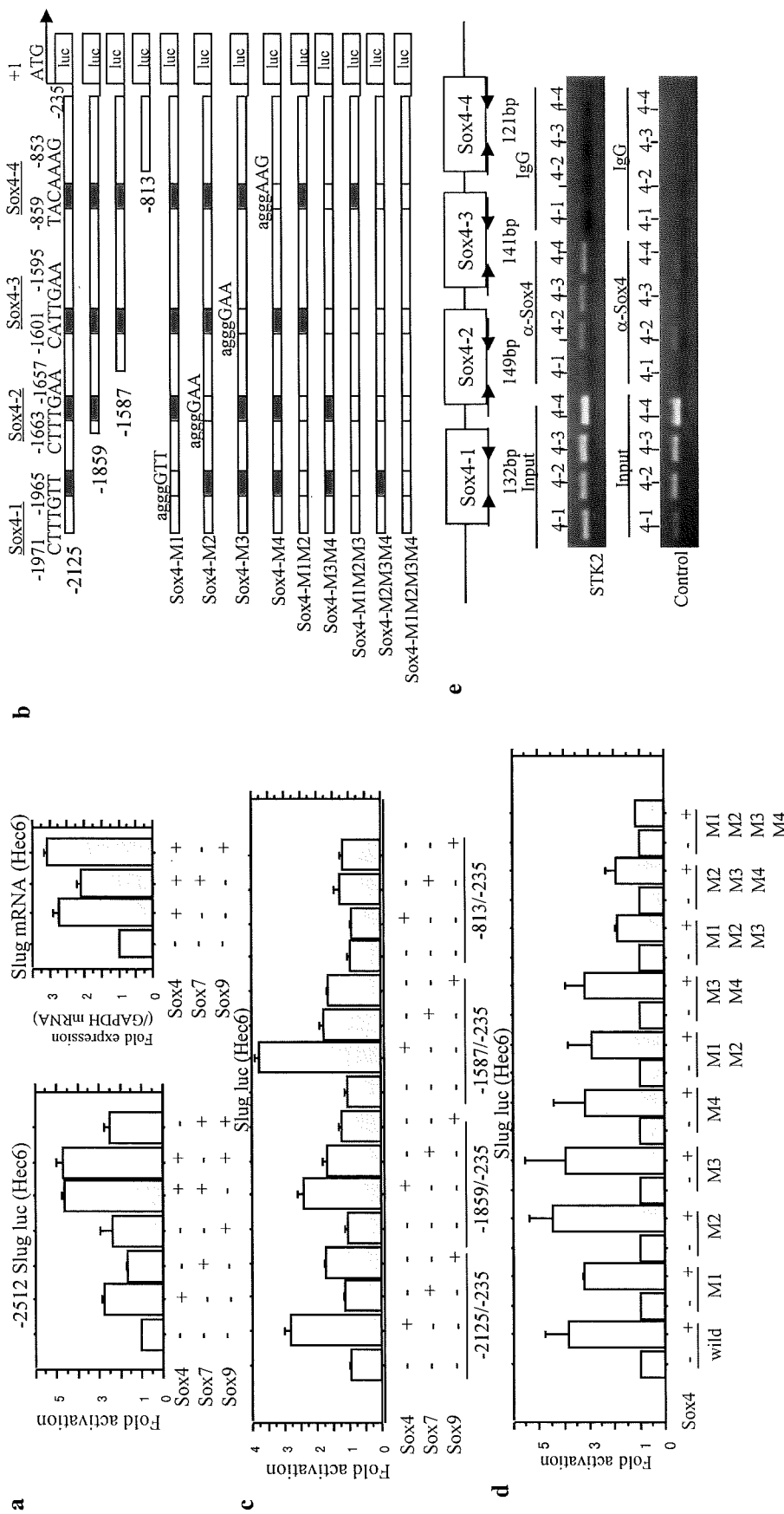


Figure. 3 a (左)Hec6細胞にSlugのレポーター構造をトランスフェクトした後、Sox4、Sox7、Sox9をそれぞれトランスフェクトさせた。b *Slug*遺伝子のプロモーター領域の4ヶ所のSox4結合領域の模式図。c、d 種々のプロモーター構造を用いた*Slug*遺伝子のプロモーター活性の比較。この実験は3度施行した。e ChIPアッセイでは、STK2培養3日目において、Sox4は*Slug*遺伝子のプロモーター領域の結合領域を認識した。

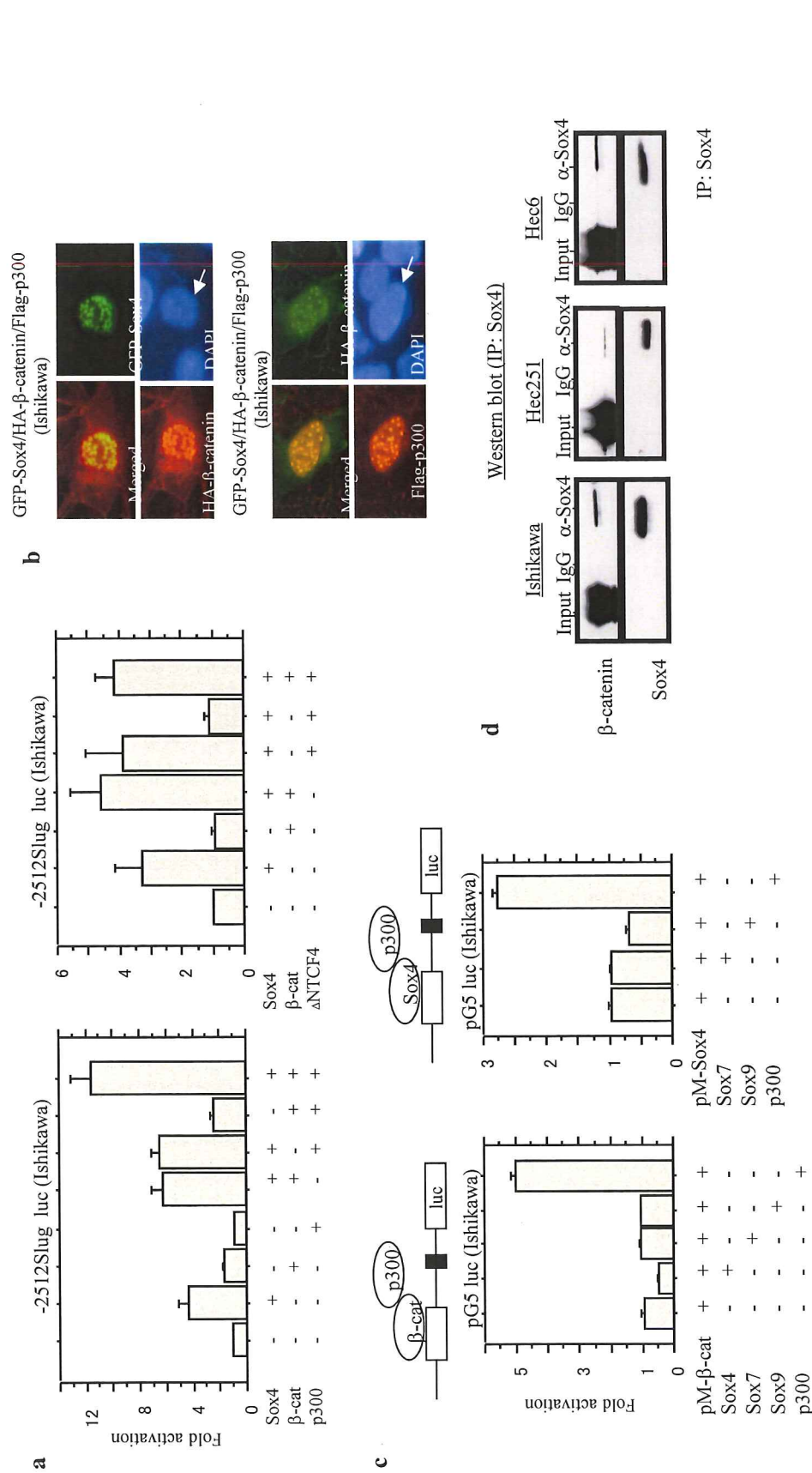


Figure. 4 a Ishikawa細胞にSlugのレポーター構造をトランスフェクトさせた後、β-catenin/ΔS45(β-ca)、Sox4、p300、dominant-negative TCF4(ΔNTCF4)をトランスフェクトさせ、活性を比較した。この実験は2度施行した。b HA-β-catenin/ΔS45、GFP-Sox4、Flag-p300をトランスフェクトさせた後、Ishikawa細胞に抗HA抗体(上段)あるいは抗Flag抗体(下段)を行った。DAPI染色の矢印は核に発現がある部分を指す。この実験は2度施行した。c Ishikawa細胞にpM-β-catenin(左)あるいはpM-Sox4(右)をトランスフェクトした後、pGL5 luc、Sox4、Sox7、Sox9、p300をそれぞれトランスフェクトさせ、活性を比較した。この実験は2度施行した。d Ishikawa、Hec251、Hec6細胞をSTK2で培養5日目に、β-cateninおよびSox4での免疫沈降を行った。IP: immunoprecipitation.

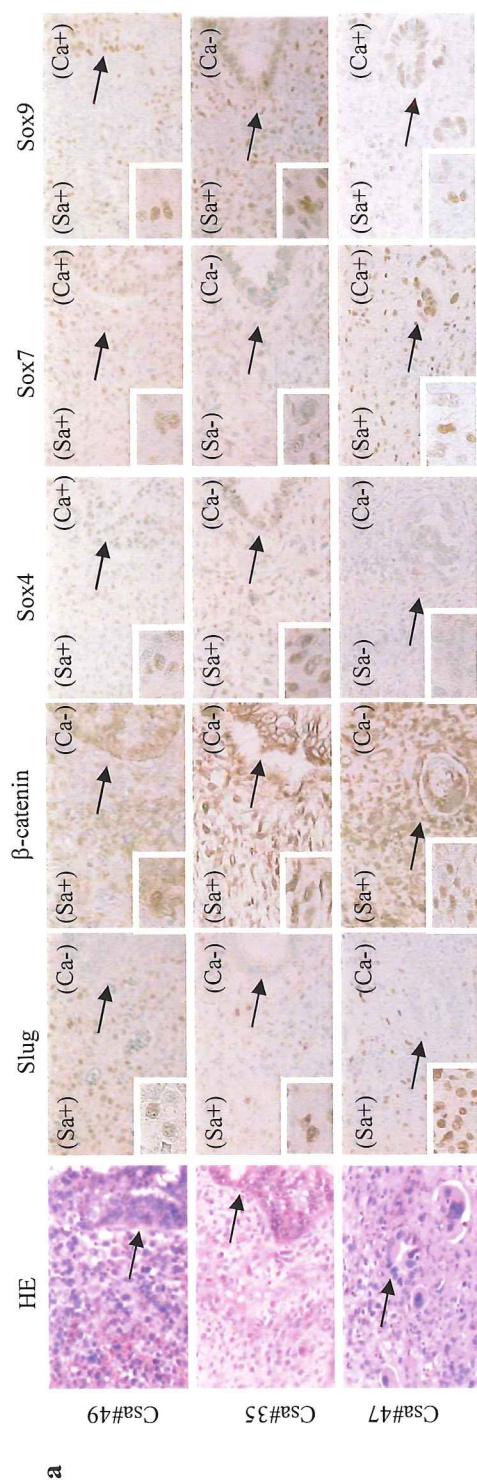


Figure.5 a 臨床検体におけるHE染色および免疫染色の組織像。Slugと β -cateninは肉腫成分では核優位の発現を認めたが、癌成分では明らかな核優位の発現は認めなかった。Sox4、7、9は肉腫成分、癌成分ともに様々な比率で核発現を認めた。癌成分は矢印で示す。倍率は200倍および400倍。Sa+/+は肉腫成分において発現の有無を表す。b 癌成分(Ca)及び肉腫成分(Sa)における免疫染色スコアを平均 \pm SDと比較。

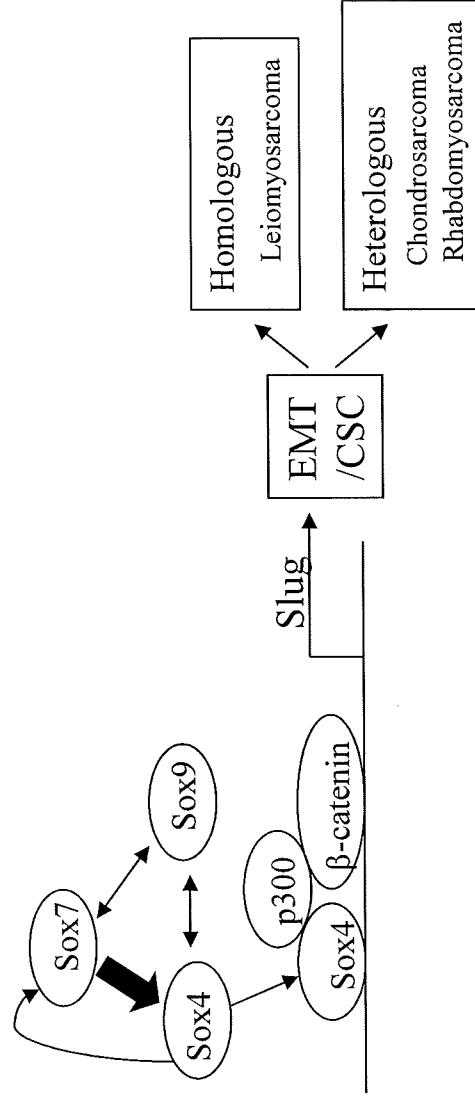


Figure.6 子宮癌肉腫における肉腫成分の派生の過程でEMT/CSCが誘導されるまでの各分子の模式図。

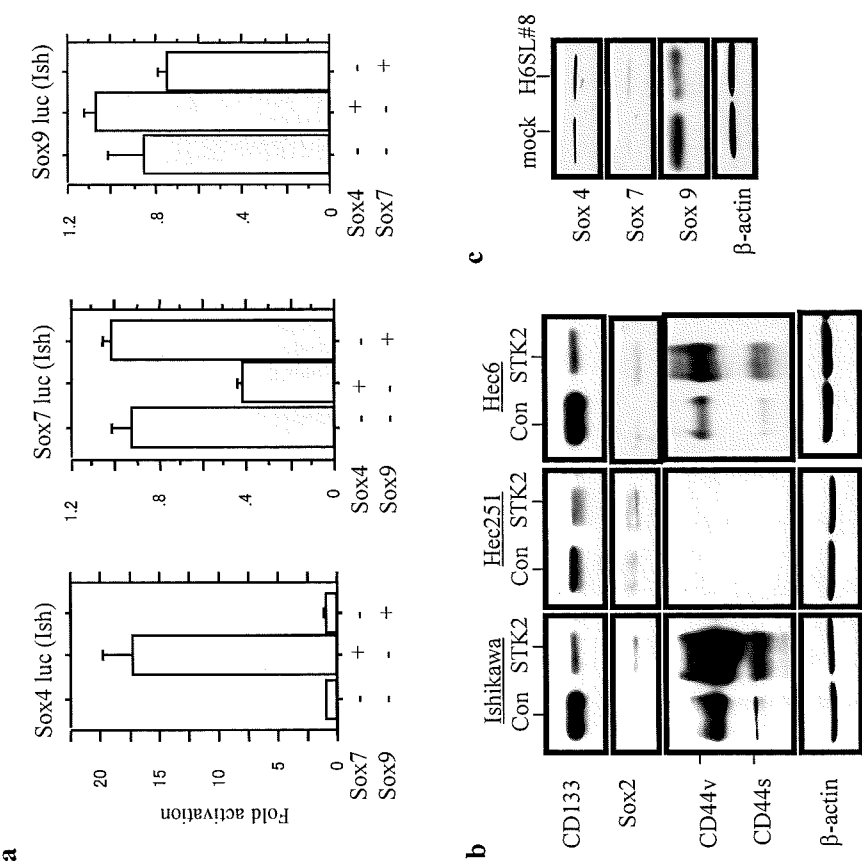
Table 1 Primer sequences used in the study

Assay	Gene/region	Sequence	Size
Mutagenesis	Slug/Sox4-M1	Forward	5'-ACTTTTAGGGGTTGTGGATAGACTGTGT-3'
		Reverse	5'-ACAACCCCTAAAAGTTAGACAAATGT-3'
	Slug/Sox4-M2	Forward	5'-AGGATTAGGGTGAATTATTTCTCTGT-3'
		Reverse	5'-AATTCACCCCTAATCCTTATGCTAATGGA-3'
ChIP	Slug/Sox4-M3	Forward	5'-AATAATAGGGGAAATTAGCTTAGGAAAT-3'
		Reverse	5'-ATTCCCTATTATCTTATTCTTCC-3'
	Slug/Sox4-M4	Forward	5'-GAGGCGAGGGAGGCAATTTCTTTCAAGCC-3'
		Reverse	5'-TGCTTCCTGCCCTCTAAAGGCAGGCT-3'
mRNA	Slug/Sox4-1	Forward	5'-GTGTTATAACTACGAGCAA-3'
		Reverse	5'-ACAAATATAGCACAGTTGAG-3'
	Slug/Sox4-2	Forward	5'-TCTCTGCAAGTACAGTTCC-3'
		Reverse	5'-TGTTGGAGGTGAGGTGG-3'
mRNA	Slug/Sox4-3	Forward	5'-AGTGACTGTTGGAAGAAATA-3'
		Reverse	5'-AAAGTCATTGTCAGGTTG-3'
	Slug/Sox4-4	Forward	5'-TCAGCCTGCCCTTAGAGGGC-3'
		Reverse	5'-GCTACTCAGGGCTTCCGGG-3'
mRNA	Slug	Forward	5'-ACGCAATCAATGTTTACTCG-3'
		Reverse	5'-TGAAGAGAAAGGTTACTGTC-3'
	E-Cadherin	Forward	5'-CAACATGGGAGGTGAGAGTTT-3'
		Reverse	5'-CGAAGAAACAGCAAGAGCAGCAGAAATCAGA-3'
mRNA	Sox4	Forward	5'-GTTGCGGTGTGCTTGGC-3'
		Reverse	5'-GTCCTTGACCAAGCTCGGG-3'
	Sox7	Forward	5'-AAGCCCTCTCCACTGTAGCC-3'
		Reverse	5'-TTGCGATGCATGTCCCCCAG-3'
mRNA	Sox9	Forward	5'-CAGCAAGAAACAAGCGGACG-3'
		Reverse	5'-GTAATCGGGTGGTCTTCTT-3'

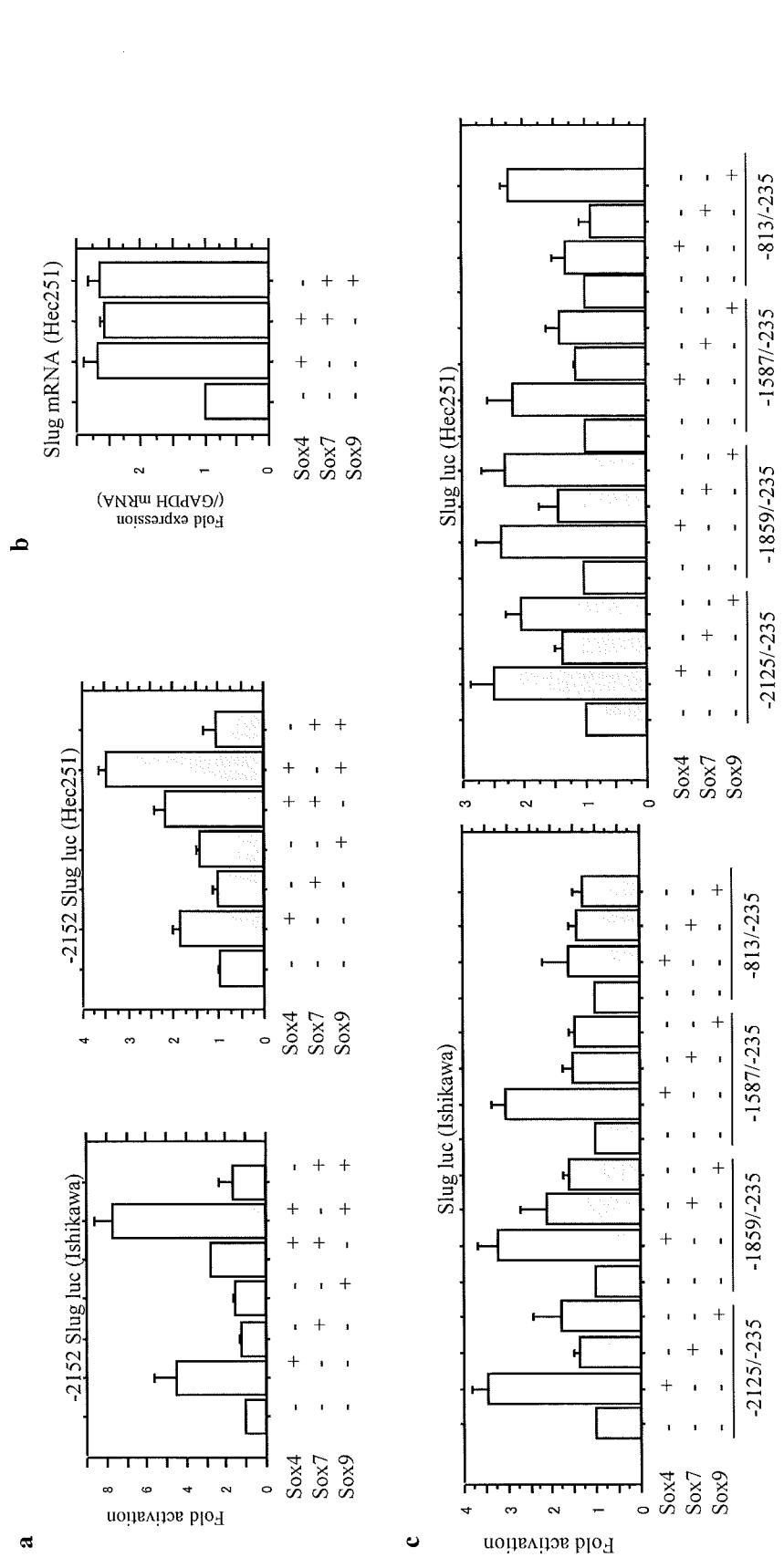
Table 2 Correlations among IHC markers investigated in uterine carcinosarcomas

	Slug ρ (p)	N- β -catenin ρ (p)	Sox4 ρ (p)	Sox7 ρ (p)	Sox9 ρ (p)	Sox4+Sox7 ρ (p)	Sox4+Sox9 ρ (p)	Sox7+Sox9 ρ (p)
N- β -catenin	0.59 (<0.0001)	*	*	*	*	*	*	*
Sox4	0.27 (0.08)	0.25 (0.1)	*	*	*	*	*	*
Sox7	0.3 (0.06)	0.46 (0.004)	0.42 (0.006)	*	*	*	*	*
Sox9	0.26 (0.22)	0.21 (0.07)	0.15 (0.48)	0.32 (0.14)	*	*	*	*
Sox4+Sox7	0.3 (0.05)	0.32 (0.04)	0.87 (<0.0001)	0.78 (<0.0001)	0.3 (0.18)	*	*	*
Sox4+Sox9	0.49 (0.03)	0.57 (0.009)	0.84 (<0.0001)	0.43 (0.04)	0.59 (0.004)	0.79 (0.0003)	*	*
Sox7+Sox9	0.47 (0.05)	0.65 (0.005)	0.44 (0.04)	0.9 (<0.0001)	0.64 (0.003)	0.76 (0.0005)	0.58 (0.008)	*
Sox4+Sox7+Sox9	0.59 (0.01)	0.71 (0.001)	0.8 (0.0002)	0.82 (0.0002)	0.5 (0.02)	0.95 (<0.0001)	0.85 (0.0001)	0.87 (<0.0001)

ρ , Spearman's correlation coefficient; N, nuclear

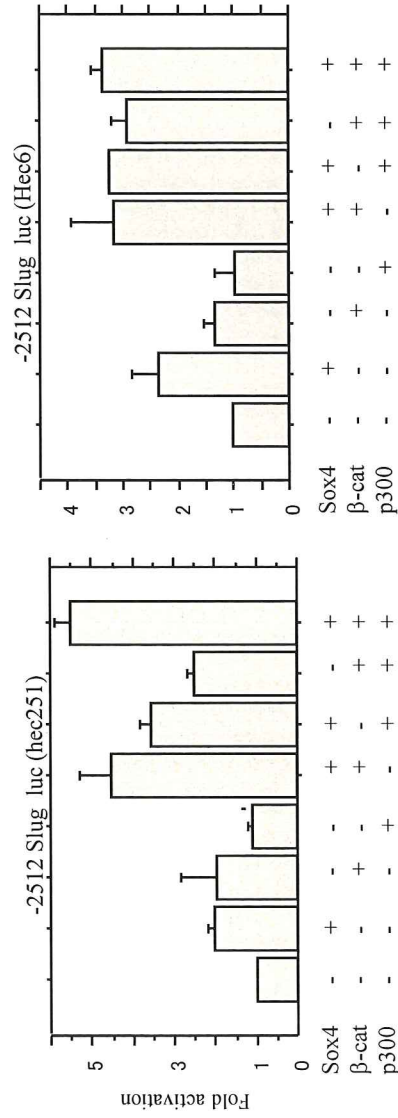


Supplementary Figure. S1 a Ishikawa細胞にSox4、Sox7、Sox9をトランスフェクトさせた後、Sox4、7あるいは9をトランスフェクトさせて活性を比較。この実験は2度施行した。b STK2で培養したIshikawa、Hec251、Hec6細胞のウェスタンブロット解析。c H6SL#8とmock細胞のウェスタンブロット解析。

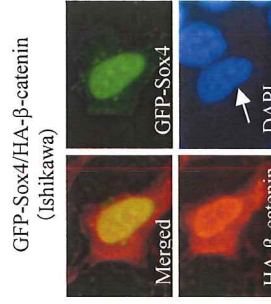


Supplementary Figure. S2 a Ishikawa細胞(左)、Hec251細胞(右)にSlugのレポーター構造をトランスフェクトした後、Sox4、Sox7、Sox9をそれぞれトランスフェクトして活性を比較。b RT-PCRを用いて、Hec251細胞にSox4、7、9をトランスフェクトした後の*Slug*遺伝子のmRNAレベルを解析した。この実験は3度施行した。c 様々なプロモーター構造を用いてIshikawa細胞(左)及びHec251細胞(右)にSox4、7、9による*Slug*遺伝子のプロモーター活性を比較。この実験は3度施行した。

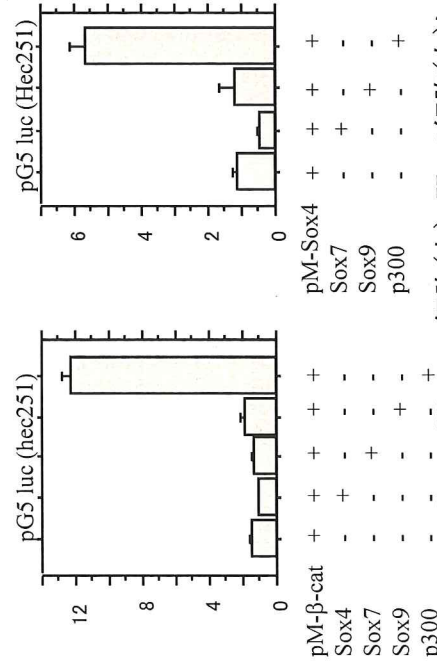
A



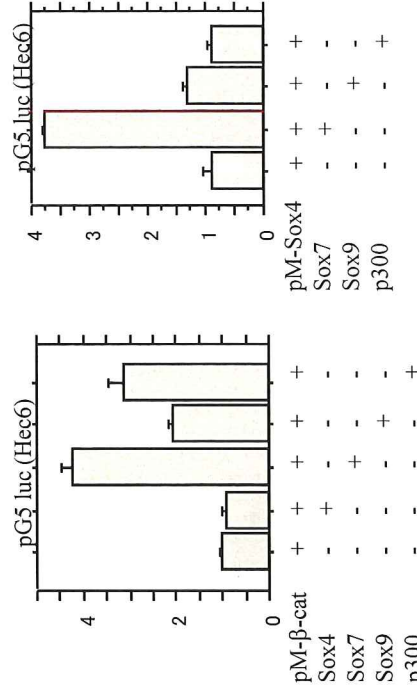
B



C



D



Supplementary Figure S3 a Hec251細胞(左)、Hec6細胞(右)にSlugのレポーター構造と、 β -catenin(β ca)、Sox4、p300をトランスフェクトし、活性を比較。この実験は2度施行した。b HA- β -catenin/S45とGFP-Sox4をトランスフェクトした後、抗HA抗体で細胞を染色した。核はDAPIで染色。矢印は発現のある細胞を示す。c、d Hec251細胞(c)およびHec6細胞(d)にpM- β -catenin(左)あるいはpM-Sox4(右)をトランスフェクトし、併せてpG5 luc、Sox4、Sox7、Sox9、p300をトランスフェクトさせ、活性を比較。この実験は2度施行した。