

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591632

研究課題名(和文)皮膚指向性成熟T細胞腫瘍においてFra-2-SOX4経路が担う発癌機構の解明

研究課題名(英文)The role of Fra-2 and SOX4 oncogene cascade in ATL and CTCLs

研究代表者

樋口 智紀(HIGUCHI, Tomonori)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：00448771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに我々は、成人T細胞白血病/リンパ腫(ATL)や皮膚T細胞リンパ腫(CTCL)でFra-2が一貫して発現し、CCR4発現誘導や細胞増殖に関与することを明らかにしてきた。本研究では、ATLとCTCL発癌におけるSOX4発現とその役割について検討した結果、ATLとCTCLにおいて、Fra-2-JunDが直接SOX4の転写活性を促進し、SOX4下流標的遺伝子として見出したGCKR、NAP1、HDAC8を発現誘導することでこれらの腫瘍の細胞増殖能を高めることを明らかにした。したがって、これらの知見からFra-2-SOX4経路はATLとCTCL発癌において重要な役割を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Previously, we have shown that Fra-2 is consistently expressed and involved in CCR4 expression as well as cell growth in CCR4+ mature T-cell leukemias/lymphomas, including adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) and cutaneous T-cell lymphomas (CTCLs). Here, we examine the expression and function of SOX4 in the oncogenesis of ATL and CTCLs. Fra-2 and SOX4 were consistently co-expressed in the clinical samples of ATL and CTCL. SOX4 promoter analysis demonstrated that Fra-2-JunD directly activates the SOX4 promoter via an AP-1 site. Furthermore, SOX4 siRNA significantly suppressed cell growth of ATL and CTCL cell lines. We found that SOX4 knockdown reduced the expression of genes such as GCKR, NAP1 and HDAC8. We also showed direct activation of the HDAC8 promoter by SOX4. Furthermore, HDAC8 knockdown significantly suppressed cell growth of ATL and CTCL cell lines. Taken together, these findings suggest that the Fra-2-SOX4 pathway has an important oncogenic role in ATL and CTCLs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、皮膚科学

キーワード：皮膚腫瘍学 SOX4 Fra-2 成人T細胞白血病/リンパ腫(ATL) 皮膚T細胞リンパ腫(CTCL)

1. 研究開始当初の背景

これまでに我々は、Th2 細胞、制御性 T 細胞、皮膚指向性 T 細胞に選択的に発現するケモカイン受容体 CCR4 が、成人 T 細胞白血病 (ATL) で高頻度かつ高レベルで発現することを明らかにし、ATL の起源となる T 細胞サブセットや皮膚浸潤機構を示した (Blood, 2002, Int J Cancer, 2007)。さらに、AP-1 ファミリーメンバーの一つである Fra-2 が ATL 細胞で構成的に発現し、Fra-2 は CCR4 の発現を誘導するとともに、ATL の細胞増殖にも関与することを明らかにした。また、Fra-2 の下流標的遺伝子として原癌遺伝子である c-Myb, MDM2, SOX4, などを同定した (Oncogene, 2008)。これらの成果は、これまで知られていなかった ATL における Fra-2 の構成的発現と、Fra-2 のヒト腫瘍での発癌作用を初めて示したものである。

皮膚 T 細胞リンパ腫 (CTCL) は、皮膚指向性成熟 T 細胞由来の腫瘍であり、ATL とは HTLV-1 非感染であることを除けば CCR4 や c-Myb が高発現していること、AP-1 が恒常的に活性化されていることなど類似する点が多い。我々の研究グループでも、ATL と同様に CTCL においても Fra-2 が発現していることを確認し、Fra-2 を上流遺伝子とした ATL と共通の発癌カスケードの存在を示唆してきた (若手 (B): 課題番号 21791103)。

ATL および CTCL は極めて予後不良であり、難治性の疾患である。これらの発癌機構の解明は、診断や治療法において有用な知見が提供されると考えられる。そこで我々は、Fra-2 下流標的遺伝子のひとつとして同定した転写因子 SOX4 に着目した。SOX4 は、これまでに肺癌、大腸癌、前立腺癌など様々な腫瘍で高頻度に発現し、癌遺伝子として、特にアポトーシス抵抗性において重要な役割をもつことが報告されている。しかしながら、成熟 T 細胞腫瘍におけるその発現と役割についてはまだ知られていない。

2. 研究の目的

本研究では、ATL および CTCL での、1) 広く臨床検体を用いた SOX4 の発現解析、2) Fra-2 による SOX4 発現誘導機構の解析、3) SOX4 の細胞増殖に関わる分子機構の解析、4) 新規 SOX4 標的遺伝子の同定を行うことによって、Fra-2-SOX4 経路の ATL および CTCL 発癌における役割を解明することが本研究の目的である。さらに、ATL および CTCL における SOX4 下流標的遺伝子を同定することによって、発癌における役割を示すとともに治療戦略や診断に有用な因子を見出すことも目的としている。

3. 研究の方法

(1) ATL および CTCL における Fra-2 と SOX4 の発現と相関の解析

ATL と CTCL 細胞株やそれらの疾患の患者末梢血または皮膚組織標本を用いて Fra-2 と

SOX4 の発現を RT-PCR や real-time PCR、免疫染色で解析した。

(2) ATL および CTCL 細胞株を用いた SOX4 のプロモーター解析

SOX4 プロモーター領域の様々なレポーターコンストラクトや Fra-2 を含めた転写因子発現プラスミドを ATL 及び CTCL 細胞株に導入し、ルシフェラーゼアッセイによって転写活性エレメントを同定した。また、ATL と CTCL 細胞株の核抽出物を用いて Chromatin immunoprecipitation (ChIP) 解析により、SOX4 プロモーターの発現エレメントへの Fra-2 を含めた転写因子の結合を解析した。

(3) SOX4 の細胞増殖に与える影響の検討

ATL および CTCL 細胞株における Fra-2 の発現抑制は有意に細胞成長を抑制していた (Oncogene, 2008) ことから、Fra-2 下流標的候補遺伝子である SOX4 の細胞増殖に与える影響について、SOX4 siRNA による発現抑制系および SOX4 強制発現細胞を用いて検討を行なった。細胞増殖能や抗アポトーシス効果の測定法はフローサイトメーターを用いた。

(4) DNA マイクロアレイを用いた ATL および CTCL 細胞株における SOX4 標的遺伝子の同定

control siRNA と SOX4 siRNA を処理した ATL と CTCL 細胞株の RNA を経時的に調整し、DNA マイクロアレイを用いて比較解析により SOX4 の発現減少と一致して発現が変化する遺伝子を SOX4 標的遺伝子の候補として同定した。また、同定された SOX4 下流標的遺伝子群について、SOX4 siRNA により発現抑制した ATL と CTCL 細胞株の mRNA を用いて real-time PCR により確認した。

(5) ATL および CTCL における SOX4 下流標的遺伝子の発現解析

ATL および CTCL 細胞株、ATLL 患者末梢血、CTCL 患者皮膚組織標本から RNA を調整し、同定した SOX4 下流標的遺伝子の mRNA 発現を real-time PCR 解析により調べた。

(6) SOX4 下流標的遺伝子のプロモーター解析

SOX4 下流標的遺伝子プロモーター領域の様々なレポーターコンストラクトや SOX4 発現プラスミドを ATL 及び CTCL 細胞株に導入し、SOX4 下流標的遺伝子のプロモーター活性に与える影響をルシフェラーゼアッセイにより検討した。

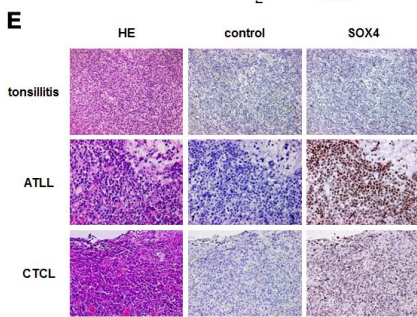
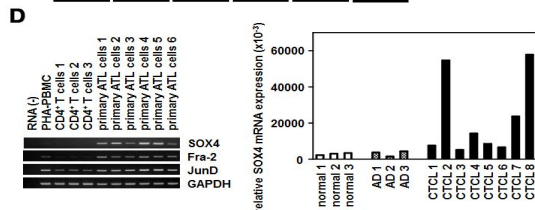
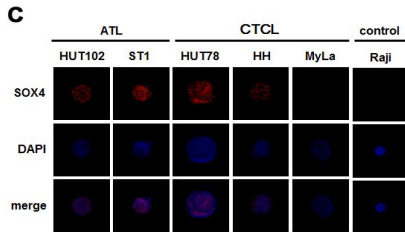
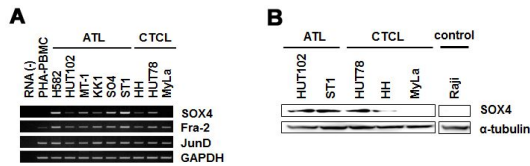
(7) SOX4 下流標的遺伝子の細胞増殖に与える影響の検討

SOX4 は転写因子であるため、siRNA による発現抑制系を用いて SOX4 下流標的遺伝子の ATL と CTCL 細胞株の細胞増殖に与える影響について検討した。

4. 研究成果

(1) ATL および CTCL における Fra-2 と SOX4 の発現と相関の解析

我々はまず、ATL および CTCL 細胞株における Fra-2 と SOX4 の発現相関について検討した。その結果、CTCL 細胞株・MyLa を除く多くの細胞株で Fra-2 と SOX4 の mRNA 発現相関がみられた (A)。また、ATL および CTCL 細胞株における SOX4 タンパク発現も確認された (B、C)。次に、臨床検体における SOX4 の発現について RT-PCR および免疫組織染色によって検討した結果、ATL および CTCL 患者で特異的に SOX4 の発現が確認され、特に ATL 臨床検体で強く発現していた (D、E)。我々はすでに ATL においてその細胞増殖に関与する Fra-2 の下流遺伝子の候補として SOX4 が存在することを報告していることから (Oncogene, 2008) これらの結果によって ATL および CTCL において Fra-2-SOX4 経路がそれらの発癌機構に関与していることが示唆された。

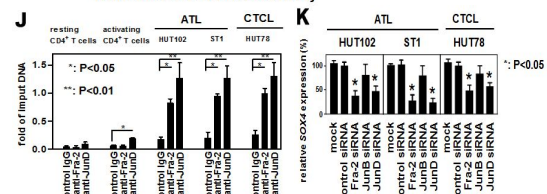
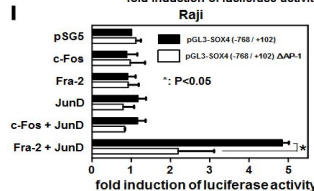
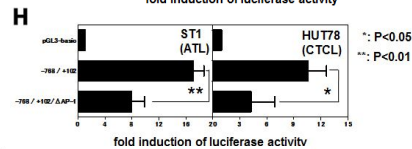
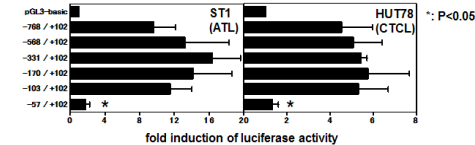
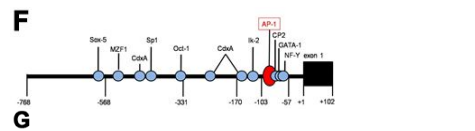


(2) ATL および CTCL 細胞株を用いた SOX4 のプロモーター解析

SOX4 が Fra-2 の直接的な下流標的遺伝子であることを明らかにするために、SOX4 のプロモーター解析を行った。その結果、1) ATL の臨床検体を用いた 5' RACE 解析によって、主な SOX4 転写開始点は 1 カ所であったこと、2) Fra-2 が結合し得る AP-1 結合部位が同定した SOX4 転写開始点の上流 -103 ~ -57 の領域に 1 カ所存在すること (F)、ATL と CTCL 細胞

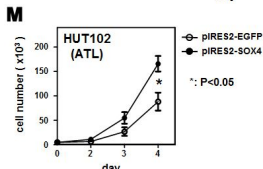
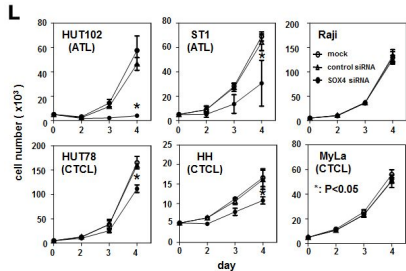
株での、3) 欠失コンストラクトを用いたルシフェーゼレポーター解析により、-103 ~ -57 の領域がその活性化に必須であること (G)、4) 点変異解析により、-103 ~ -57 の領域に存在する AP-1 結合部位が主なプロモーター活性化に関与していること (H) が明らかになった。AP-1 ファミリーには Fos と Jun のサブファミリーが存在し、Fos と Jun がヘテロ二量体を形成して AP-1 結合部位に作用する。我々は以前、Fos ファミリーの 1 つである Fra-2 と Jun ファミリーである JunD のヘテロ二量体が CCR4 転写活性に寄与することを報告していることから (Oncogene, 2008) この二量体による SOX4 のプロモーター活性化について検討した。その結果、5) Fra-2 と JunD の再構築解析により、Fra-2-JunD ヘテロ二量体によって SOX4 プロモーターは活性化され、AP-1 結合部位の点変異によってその活性化は有意に抑制されたこと (I)、6) ChIP 解析により、-103 ~ -57 の領域中の AP-1 結合部位に Fra-2 と JunD が直接的に結合していること (J) が明らかとなった。興味深いことに、Fra-2 と同様に Fos ファミリーの 1 つであり、ATL で異所性に発現する c-Fos と JunD とのヘテロ二量体では SOX4 プロモーターは活性化されなかった。また、Jun ファミリーである JunB も ATL および CTCL において高発現しているが、7) siRNA を用いた JunB の発現抑制では SOX4 の発現が抑制されなかった (K)。

以上の解析結果から、SOX4 プロモーターの -103 ~ -57 の領域中の AP-1 結合部位に Fra-2-JunD ヘテロ二量体が特異的に結合することで、SOX4 を直接的に発現誘導することが明らかとなった。



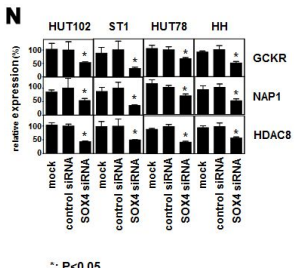
(3) SOX4 の細胞増殖に与える影響の検討

Fra-2 は ATL および CTCL において細胞増殖に關与するが (Oncogene, 2008, Anticancer Res, 2012) この細胞増殖に Fra-2 の下流標的遺伝子である SOX4 も關与していることを検討するために、ATL および CTCL 細胞株における siRNA による SOX4 発現抑制系を用いて解析を行った。その結果、SOX4 を発現している ATL および CTCL 細胞株では SOX4 発現抑制によって細胞増殖能が抑制されたが、SOX4 を発現していない MyLa および Raji 細胞には影響がみられなかった (L)。また、SOX4 低発現 ATL 細胞株である HUT102 を用いて SOX4 強制発現による解析を行った結果、HUT102 の細胞増殖が促進された (M)。これらのことから、SOX4 は ATL および CTCL の細胞増殖に寄与することが明らかとなった。



(4) DNA マイクロアレイを用いた ATLL および CTCL 細胞株における SOX4 標的遺伝子の同定

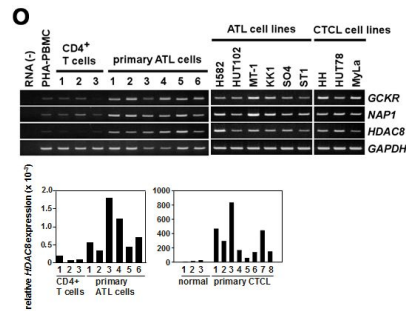
Fra-2 および SOX4 は転写因子であることから、ATL と CTCL の細胞増殖により密接な分子がこの経路のさらに下流に存在することが想定された。そこで、DNA マイクロアレイ解析によって ATL および CTCL の細胞増殖に關与する SOX4 標的遺伝子の候補について検討した。その結果、GCKR や NAP1、HDAC8 などの細胞増殖に關与する遺伝子群が SOX4 標的遺伝子の候補として同定された。また、siRNA を用いた SOX4 の発現抑制によって、これらの 3 遺伝子の mRNA 発現は特に抑制されたことから (N)、ATL および CTCL の細胞増殖に寄与する有力な遺伝子と考えられた。



(5) ATL および CTCL における SOX4 下流標的遺伝子の発現解析

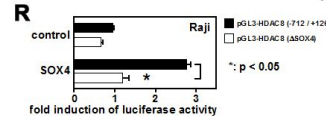
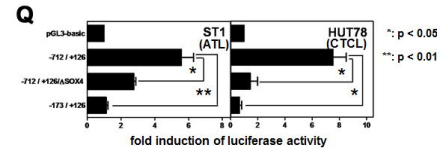
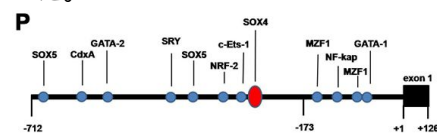
RT-PCR 解析を行った結果、ATL および CTCL の細胞株や臨床検体において SOX4 下流標的

遺伝子の候補である GCKR、NAP1、HDAC8 の mRNA 発現が確認され、正常コントロールとの mRNA 発現量の比較では、特に HDAC8 が ATL および CTCL において SOX4 との発現相関が強かった (O)。しかしながら、SOX4 非発現細胞株である MyLa においても GCKR や NAP1、HDAC8 の mRNA 発現がみられたことから、CTCL におけるこれらの遺伝子発現誘導には SOX4 以外の遺伝子による経路も存在することが示唆された。



(6) SOX4 下流標的遺伝子のプロモーター解析

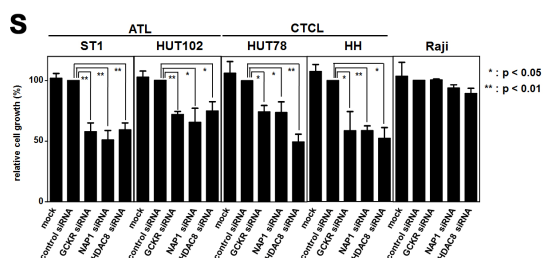
CTCL の治療標的であり、ATL でも最近注目されているヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) ファミリーのひとつ、HDAC8 に焦点を絞り、HDAC8 が SOX4 下流標的遺伝子であることを検討するため、SOX4 と同様にプロモーター解析を行った。その結果、SOX4 が結合すると予想される部位が HDAC8 プロモーターの -243 ~ -236 に存在し (P)、この部位に対する点変異によって HDAC8 プロモーター活性が顕著に低下した (Q)。また、SOX4 と同様に HDAC8 も発現していない Raji 細胞を用いて SOX4 再構築解析を行った結果、HDAC8 プロモーター活性がみられた (R)。これらの結果から、ATL および CTCL において HDAC8 は SOX4 の直接的な下流標的遺伝子であることが明らかとなった。



(7) SOX4 下流標的遺伝子の細胞増殖に与える影響の検討

Fra-2-SOX4 経路による ATL および CTCL の細胞増殖に SOX4 下流標的遺伝子である HDAC8 が關与していることを検討するために、siRNA による発現抑制系を用いて解析を行った。その結果、ATL および CTCL 細胞株において HDAC8 の発現抑制に伴い細胞増殖が抑制されたが、HDAC8 非発現細胞株 Raji ではその影

響がみられなかった (S)。さらに、GCKR や NAP1 についても siRNA を用いて解析した結果、HDAC8 と同様に、ATL および CTCL 細胞株の細胞増殖が抑制された。これらのことから、SOX4 は複数の細胞増殖関連遺伝子の発現を誘導することで ATL および CTCL の細胞増殖に寄与していることが明らかとなった。また、HDAC 阻害剤は CTCL の治療標的として臨床試験がなされていることから、特に HDAC8 は新たな ATL および CTCL の治療標的となりうることが示唆された。



(まとめ)

成熟型 T 細胞性腫瘍である ATL や CTCL は難治性疾患であることから、これらの腫瘍に対する診断・治療に有用な分子標的の探索は急務であり、成熟型 T 細胞性腫瘍の発癌機構の解明はその手掛かりとなる。最近、抗 CCR4 抗体や HDAC 阻害剤などこれらの腫瘍に有用な治療薬が開発され、治療成績も高まっているが、いまだ 5 年生存率は著しく低く、今後の課題も多い現状である。

本研究において、我々は ATL および CTCL において Fra-2-SOX4 経路が GCKR, NAP1, HDAC8 複数の細胞増殖関連遺伝子を発現誘導し、細胞増殖に関与していることを明らかにした。特に、SOX4 の直接的な下流標的遺伝子として見出した HDAC8 は、ATL および CTCL の有用な治療標的分子となる可能性を大いに秘めていると考えられる。

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 14 件)

Masahata K, Umemoto E, Kayama H, Kotani M, Nakamura S, Kurakawa T, Kikuta J, Gotoh K, Motooka D, Sato S, Higuchi T, Baba Y, Kurosaki T, Kinoshita M, Shimada Y, Kimura T, Okumura R, Takeda A, Tajima M, Yoshie O, Fukuzawa M, Kiyono H, Fagarasan S, Iida T, Ishii M, Takeda K. Generation of colonic IgA-secreting cells in the caecal patch. Nat Commun. 査読有, 2014 Apr 10;5:3704 (Accepted 21 March 2014). doi: 10.1038/ncomms4704.

Bachelier F, Ben-Baruch A, Burkhardt AM, Combadiere C, Farber JM, Graham GJ, Horuk R, Sparre-Ulrich AH, Locati M,

Luster AD, Mantovani A, Matsushima K, Murphy PM, Nibbs R, Nomiyama H, Power CA, Proudfoot AE, Rosenkilde MM, Rot A, Sozzani S, Thelen M, Yoshie O, Zlotnik A. International Union of Pharmacology. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. Pharmacol Rev. 査読有, 2013 Nov 11;66(1):1-79. doi: 10.1124/pr.113.007724.

Zhao L1, Yasumoto K, Kawashima A, Nakagawa T, Takeuchi S, Yamada T, Matsumoto K, Yonekura K, Yoshie O, Yano S. Paracrine activation of MET promotes peritoneal carcinomatosis in scirrhous gastric cancer. Cancer Sci. 査読有, 2013 Dec;104(12):1640-6. doi: 10.1111/cas.12301.

Shibata K, Nomiyama H, Yoshie O, Tanase S. Genome diversification mechanism of rodent and Lagomorpha chemokine genes. Biomed Res Int. 査読有, 2013;2013:856265. doi: 10.1155/2013/856265.

Higuchi T, Nakayama T, Arai T, Nishio K, Yoshie O. SOX4 is a direct target gene of FRA-2 and induces expression of HDAC8 in adult T-cell leukemia/lymphoma. Blood. 査読有, 2013 May 2;121(18):3640-9. doi: 10.1182/blood-2012-07-441022.

Moriguchi K1, Miyamoto K, Tanaka N, Yoshie O, Kusunoki S. The importance of CCR4 and CCR6 in experimental autoimmune encephalomyelitis. Neuroimmunol. 査読有, 2013 Apr 15;257(1-2):53-8. doi: 10.1016/j.jneuroim.2013.02.002.

Kee JY, Ito A, Hojo S, Hashimoto I, Igarashi Y, Tsukada K, Irimura T, Shibahara N, Nakayama T, Yoshie O, Sakurai H, Saiki I, Koizumi K. Chemokine CXCL16 suppresses liver metastasis of colorectal cancer via augmentation of tumor-infiltrating natural killer T cells in a murine model. Oncol Rep. 査読有, 2013 Mar;29(3):975-82. doi: 10.3892/or.2012.2185.

Nomiyama H1, Osada N, Yoshie O. Systematic classification of vertebrate chemokines based on

conserved syntenies and evolutionary history. *Genes Cells*. 査読有, 2013 Jan;18(1):1-16. doi: 10.1111/gtc.12013.

Zlotnik A1, Yoshie O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity*. 査読有, 2012 May 25;36(5):705-16. doi: 10.1016/j.immuni.2012.05.008.

Nakayama T, Higuchi T, Oiso N, Kawada A, Yoshie O. Expression and function of FRA2/JUND in cutaneous T-cell lymphomas. *Anticancer Res*. 査読有, 2012 Apr;32(4):1367-73.

Kaminuma O, Ohtomo T, Mori A, Nagakubo D, Hieshima K, Ohmachi Y, Noda Y, Katayama K, Suzuki K, Motoi Y, Kitamura N, Saeki M, Nishimura T, Yoshie O, Hiroi T. Selective down-regulation of Th2 cell-mediated airway inflammation in mice by pharmacological intervention of CCR4. *Clin Exp Allergy*. 査読有, 2012 Feb;42(2):315-25. doi: 10.1111/j.1365-2222.2011.03847.x.

Ohtani H, Nakayama T, Yoshie O. In situ expression of the CCL20-CCR6 axis in lymphocyte-rich gastric cancer and its potential role in the formation of lymphoid stroma. *Pathol Int*. 査読有, 2011 Nov;61(11):645-51. doi: 10.1111/j.1440-1827.2011.02717.x.

Nomiyama H, Osada N, Yoshie O. A family tree of vertebrate chemokine receptors for a unified nomenclature. *Dev Comp Immunol*. 査読有, 2011 Jul;35(7):705-15. doi: 10.1016/j.dci.2011.01.019.

Hieshima K, Nagakubo D, Shigeta A, Tanaka Y, Hoshino H, Tsukasaki K, Yamada Y, Yoshie O. c-Maf suppresses human T-cell leukemia virus type 1 Tax by competing for CREB-binding protein. *Cancer Sci*. 査読有, 2011 Apr;102(4):890-4. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.01873.x.

[学会発表](計 5 件)

Park AM, Yoshie O, Watanabe A, Higuchi T, Honda E, Munakata H. Attenuation of bleomycin-induced mice pulmonary fibrosis by in vivo treatment of HSP27 siRNA. SFRR12014, 2014年3月23-26日 京都国際会議場(京都府京都市)

Higuchi T, Nakayama T, Yoshie O. Fra-2-SOX4 oncogenic cascade plays a critical role in cell growth of adult T-cell leukemia/lymphoma. 第72回日本癌学会学術集会, 2013年10月3-5日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Higuchi T, Hieshima K, Nakayama T, Yoshie O. Induction of FosB by Tax induces CCL22 in HTLV-1-infected T cells, leading to HTLV-1. 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月19-21日 ロイトン札幌(北海道札幌市)

Higuchi T, Nakayama T, Shigeta A, Yoshie O. Fra-2-SOX4 oncogenic cascade plays a critical role in cell growth of CCR4+ mature T-cell malignancies. JSICR-MMCB2011, 2011年5月25日 ANA ゲートタワーホテル大阪(大阪府泉佐野市)

Nakayama T, Higuchi T, Shigeta A, Yoshie O. CCL26/eotaxin-3 attracts killer lymphocytes by interacting with CX3CR1. JSICR-MMCB2011, 2011年5月25日 ANA ゲートタワーホテル大阪(大阪府泉佐野市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 智紀 (HIGUCHI, Tomonori)
近畿大学・医学部・助教
研究者番号: 00448771

(2) 研究分担者

義江 修 (YOSHIE, Osamu)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号: 10166910

中山 隆志 (NAKAYAMA, Takashi)
近畿大学・薬学部・教授
研究者番号: 60319663