

原 著

胃粘膜上皮細胞のトレフォイルファクター (TFF) および ムチンコア蛋白 (MUC) 発現に対する SOX2 の影響

獨協医科大学 内科学 (消化器)

鈴木 真琴 島田 忠人

要 旨 SOX2は SRY-related HMG box ファミリーに属する転写因子であり, SOX2の胃粘膜上皮細胞における発現は以前より報告されているが, 胃特異的遺伝子発現へのSOX2の影響は十分には解明されていない. 本研究では胃癌由来細胞株 (MKN45細胞, AGS細胞) を用い, 胃粘膜上皮細胞におけるTFFおよびMUCの発現に対するSOX2の影響について検討を行った. 両細胞株においてSOX2蛋白の発現をウエスタンブロット法で確認し, TFF (TFF1, TFF2, TFF3) およびMUC (MUC2, MUC5AC, MUC6) それぞれのレポーター遺伝子を用いた解析を行った. SOX2の過剰発現で影響を受けたのはTFF1とMUC6であり, TFF1発現は有意に低下, 逆にMUC6発現は有意に増加することが認められた. リアルタイム定量的RT-PCRにより, 内因性のTFF1およびMUC6 mRNAもSOX2過剰発現により同様の効果を受けることを確認した. 本研究の結果は, SOX2が消化管において胃粘膜に特異的に発現しているTFF (TFF1, TFF2) およびMUC (MUC5AC, MUC6) の発現を一様に誘導しているのではなく, 異なった影響を与えていること, また, 本来, 消化管において腸粘膜に特異的に発現しているTFF3, MUC2の胃粘膜における発現の抑制に機能しているのではないことを示唆している. 今後, 他の様々な因子との相互作用を念頭に置いた上で, 胃粘膜上皮におけるSOX2の機能をさらに解明していく必要があると考えられる.

Key Words : 胃粘膜上皮細胞, trefoil factor family, ムチンコア蛋白, SOX2

緒 言

SOX2はSRY-related HMG box ファミリーに属する転写因子であり, 各種の細胞で器官形成や細胞分化に重要な役割を担っている^{1~6}. 消化管においてもSOX2は発生過程の前腸の内胚葉に高発現しており, 特に食道や胃の発生と密接に関連していることが報告されている⁷. また, 成人消化管粘膜においても, 十二指腸以下の下部消化管粘膜上皮にCDX1/CDX2が高発現しているのとは対照的に, 正常胃粘膜上皮ではSOX2が発現している^{8,9}. さらに興味深いことに, 腸上皮化生胃粘膜上皮ではSOX2の発現が低下し, CDX2の発現レベルが上昇するとともに, 腸上皮マーカーであるMUC2などの発現が誘導される⁹. またSOX2は胃癌細胞において発現が低下している場合が多いことが報告されているが,

SOX2の発現低下はアポトーシスの抑制などを介して腫瘍の増殖を促進する可能性が示唆されている¹⁰. これらの報告から, SOX2が成人の胃粘膜上皮細胞においても胃上皮特異的な因子の発現調節に関わっていることが予想されるが, 胃粘膜上皮細胞におけるSOX2ターゲット遺伝子に関する報告は少ない.

消化管上皮細胞より多量に分泌されているTrefoil factor family (TFF)ペプチドおよびムチンコア蛋白(MUC)は, 消化管粘膜表層の粘液ゲル層を構成する主要成分であるとともに, 消化管粘膜防御機構において中心的な役割を果たしている^{11,12}. TFFペプチドはこれまでに3種が知られており, それぞれTFF1 (pS2), TFF2 (spasmodic polypeptide, SP), TFF3 (intestinal trefoil factor, ITF) と呼称されているが¹³, TFF1およびTFF2が胃粘膜上皮細胞に特異的に発現しているのに対し, TFF3は下部消化管, 特に杯細胞に高発現している^{11,12}. ムチンコア蛋白は20種類程度のものであることが知られているが, 臓器によって発現しているムチンコア蛋白の種類に違いがみられる¹⁴. 消化管粘膜では, 胃粘膜上皮細胞でMUC5ACおよびMUC6が発現しているのに対し, 下部消化管では

平成20年10月31日受付, 平成20年12月8日受理
別刷請求先: 鈴木真琴

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林880
獨協医科大学 内科学 (消化器)

杯細胞を中心にMUC2の発現が主体である^{15,16)}。また、上記のように腸上皮化生胃粘膜ではMUC2の発現が目立ってくる。

これらのTFF, MUC (特にTFF1, TFF2, MUC5AC, MUC6) は、胃粘膜上皮細胞特異的な因子として、その遺伝子発現がSOX2により影響を受ける可能性が考えられるが、この問題に関する体系的な報告はない。そこで本研究では胃癌由来細胞株であるMKN45細胞およびAGS細胞において、各TFF (TFF1, TFF2, TFF3), 各MUC (MUC2, MUC5AC, MUC6) のレポーター遺伝子を用いた解析を行い、SOX2がこれらのTFF, MUC遺伝子の発現に対してどのような影響を与えているかについて検討を行った。

方 法

1. 細胞培養

胃粘膜上皮細胞のモデル系としてヒト胃癌由来細胞株であるMKN45細胞とAGS細胞を用いた。MKN45細胞およびAGS細胞はそれぞれヒューマンサイエンス研究資源バンク (大阪), DSファーマバイオメディカル (大阪) より購入した。COS-7細胞もヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入した。MKN45細胞およびAGS細胞は10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA) を添加したHam's F-12 culture medium (Invitrogen) で、37°C, 5% CO₂存在下で培養した。COS-7細胞は10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen) を添加したDulbecco's modified eagle medium (Invitrogen) で同様の環境下で培養した。

2. ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングは既報のごとく行った¹⁷⁾。一次抗体として抗SOX2ポリクローナル抗体 (CHEMI-CON international, Temecula, CA) を反応させ、さらにHRPを結合した二次抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) と反応させた後、LumiGLO化学発光試薬 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) によりバンドを検出した。

3. RNA抽出およびpolymerase chain reaction (PCR)

培養細胞よりTRIZOL試薬 (Invitrogen) を用いてtotal RNAを抽出した。Ready-To-Go You- prime First Strand Beads (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), oligo (dT) primer (Invitrogen) を用いて、逆転写反応によりcDNAを作製した。PCR用のプライマーは表1に示した通りである。通常のPCR反応はHotStar Taq poly-

表1 使用したプライマー

Human TFF1 (GenBank No. NM_003225)
Sense 5'-CAATGGCCACCATGGAGAAC-3'
Antisense 5'-AACGGTGTCTCGTAAACAGC-3'
PCR産物 188 bp
Human TFF2 (GenBank No. NM_005423)
Sense 5'-CCAAAGCAAGACTCGGATCAGC-3'
Antisense 5'-CAGTCTTCCACAGACTTCGGG-3'
PCR産物 161 bp
Human TFF3 (GenBank No. NM_003226)
Sense 5'-TGTCTGCAAACCAGTGTGCC-3'
Antisense 5'-GCAAGGACTGAACAAAGACTC-3'
PCR産物 336 bp
Human MUC2 (GenBank No. NM_002457)
Sense 5'-GACATTTGTCATGTACTC-3'
Antisense 5'-CGATGTGGGTGTAGGTGTGTG-3'
PCR産物 117 bp
Human MUC5AC (GenBank No. NM_017511)
Sense 5'-AGTCCAAGGACTGCAACCAC-3'
Antisense 5'-GTCAGCACTGTGGAGGTGTG-3'
PCR産物 200 bp
Human MUC6 (GenBank No. NM_005961)
Sense 5'-CAGCCACAGAGACCACTCAA-3'
Antisense 5'-GTGGAACGTGAGTGGGAAGT-3'
PCR産物 195 bp
Human GAPDH (GenBank No. NM_002046)
Sense 5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3'
Antisense 5'-TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT-3'
PCR産物 240 bp

merase (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて行った。PCR産物は2%アガロースゲル上で電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色で確認した。

リアルタイム定量的reverse-transcription PCR (RT-PCR) は、SYBR Premix Ex Taq (Takara, 滋賀) を用いて、Opticon2リアルタイムPCR解析システム (BIORAD, Hercules, CA) にて行った。定量的PCRのスタンダードは、通常のRT-PCRにて増幅したPCR産物をQiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) にて精製し定量の後、段階的に希釈して作製した。実験ごとに標準曲線を作成し、試料中に含まれるターゲット遺伝子mRNAのコピー数を算出するとともに、同一試料中のGlyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA発現も測定し、結果の標準化を行った。

4. ベクター構築およびレポーター遺伝子解析

SOX2発現ベクターは、ヒトSOX2遺伝子 (GenBank No.NM_003106) のコード領域全体をPCRにより増幅し、その産物を精製した後、pcDNA3.1/V5/Hisベクター

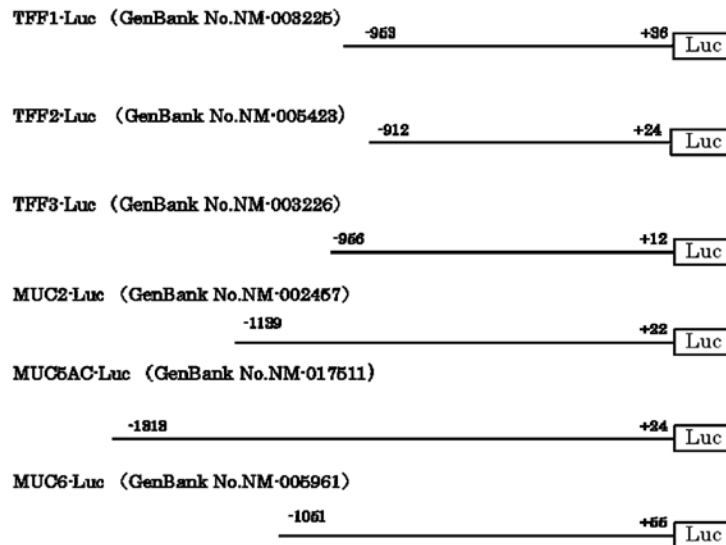


図1 作製したレポーター遺伝子

(Invitrogen) にクローニングすることにより作製した。ヒトTFF1, TFF2, TFF3, MUC2, MUC5AC, MUC6レポーター遺伝子は、それぞれ遺伝子のプロモーター領域をPCRにより増幅し、pGL3-basicベクター (Promega, Madison, WI) に各クローニングすることにより作製した (図1) (以下TFF1-Luc, TFF1-Luc, TFF1-Luc, MUC2-Luc, MUC5AC-Luc, MUC6-Lucと呼称する)。これらのベクターに挿入した配列はシーケンシングにより確認した。TFF1-Lucについては、GenEditor in vitro Site-Directed Mutagenesis System (Promega) により、挿入配列をさらに段階的に欠失させたレポーターを作製し検討を行った。

培養細胞を24穴プレートに培養し、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて、SOX2発現ベクター (0.4 $\mu\text{g}/\text{well}$) といずれかのレポーター遺伝子 (0.6 $\mu\text{g}/\text{well}$) をトランスフェクションし、empty pcDNA3.1/V5/Hisベクター (0.4 $\mu\text{g}/\text{well}$) をそれぞれのレポーター遺伝子 (0.6 $\mu\text{g}/\text{well}$) とともにトランスフェクションしたものをコントロールとして比較した。結果の標準化のためにpRL-SV40ベクター (0.001 $\mu\text{g}/\text{well}$) も同時にトランスフェクションした。トランスフェクション48時間後に細胞を回収し、LB96V型ルミノメーター (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) を用いてDual-Luciferase Reporter Assay (Promega) を行った。

結 果

1. MKN45細胞およびAGS細胞におけるSOX2蛋白の発現

図2AはMKN45細胞およびAGS細胞におけるSOX2

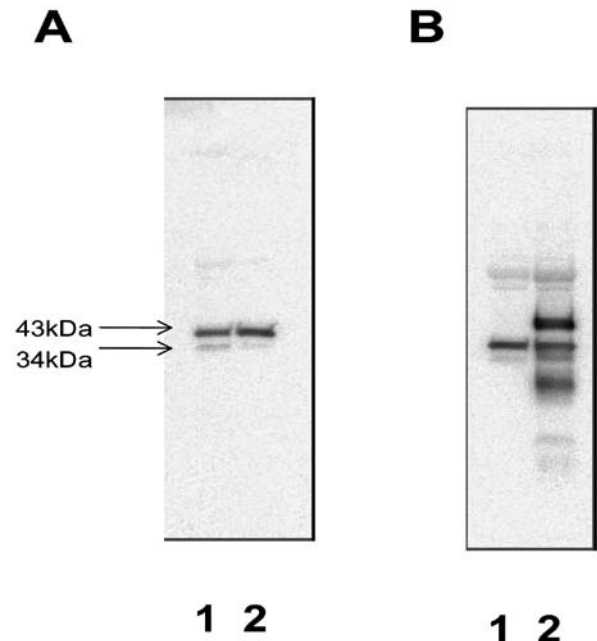


図2 SOX2蛋白の発現。(A) MKN45細胞 (lane 1), AGS細胞 (lane 2) における内因性SOX2蛋白の発現。(B) SOX2発現ベクターによるSOX2の強制発現 (MKN45細胞)。Lane 1: コントロール細胞 (empty pcDNA 3.1/V5/Hisベクター導入細胞) における内因性SOX2蛋白発現。Lane 2: SOX2発現ベクター導入細胞における内因性SOX2蛋白発現とタグ付きSOX2蛋白の過剰発現 (矢印)。

蛋白の発現をウエスタンブロット解析によりみたものである。この図に示されるように、どちらの細胞株においても内因性のSOX2蛋白の発現が認められた。図2BにはMKN45細胞にempty pcDNA3.1/V5/Hisベクター

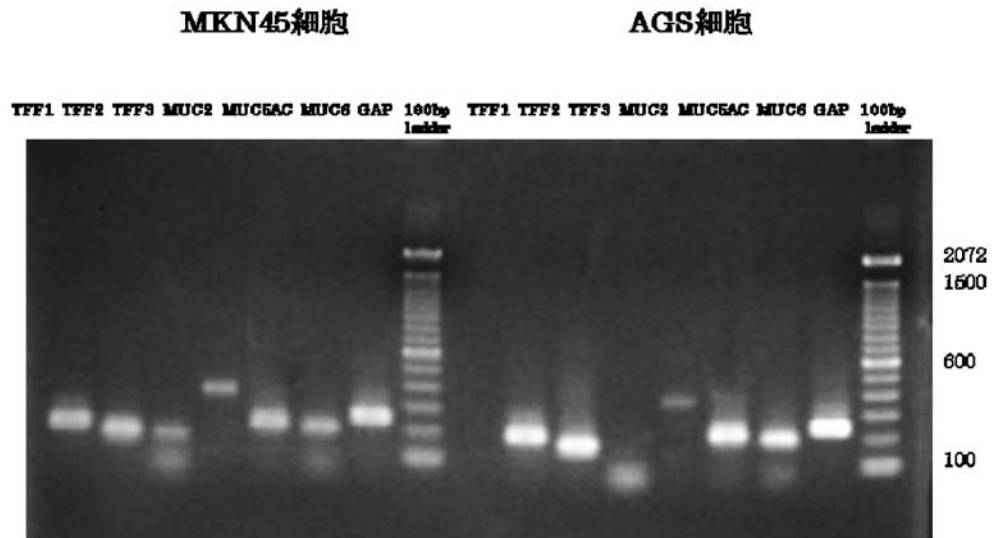
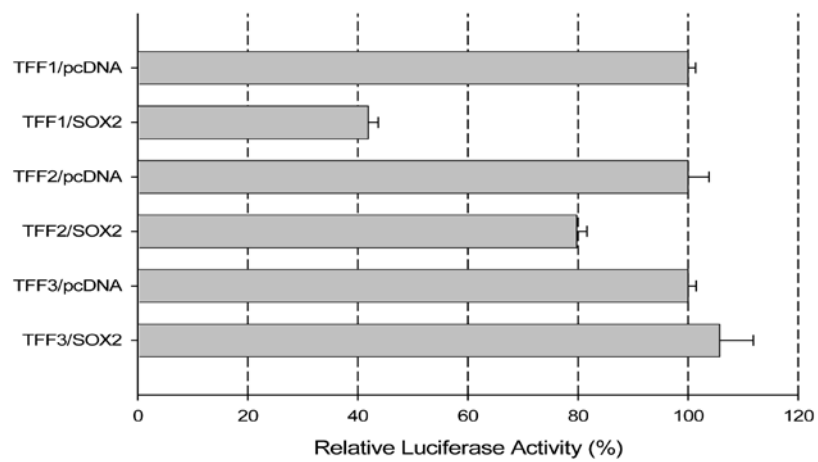


図 3 MKN45細胞およびAGS細胞における内因性TFF, MUC mRNAの発現 (RT-PCR).

(A) MKN45細胞



(B) AGS細胞

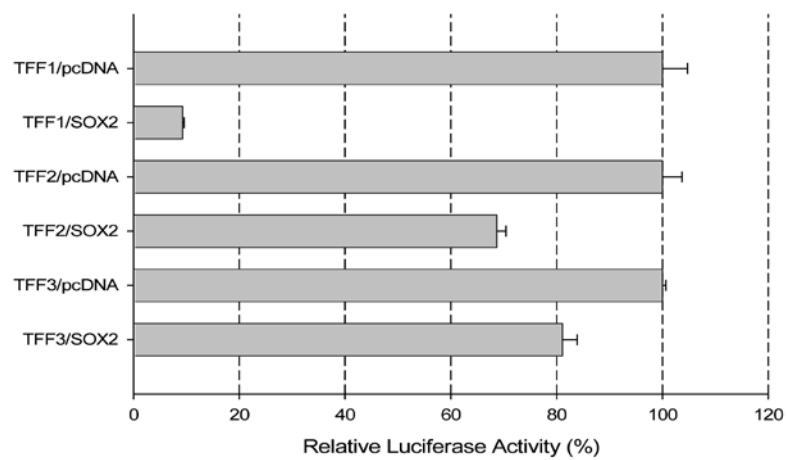


図 4 SOX2過剰発現のTFFレポーター遺伝子発現に対する影響. (A) MKN45細胞 (mean ± SD, n=3), (B) AGS細胞 (mean ± SD, n=3).

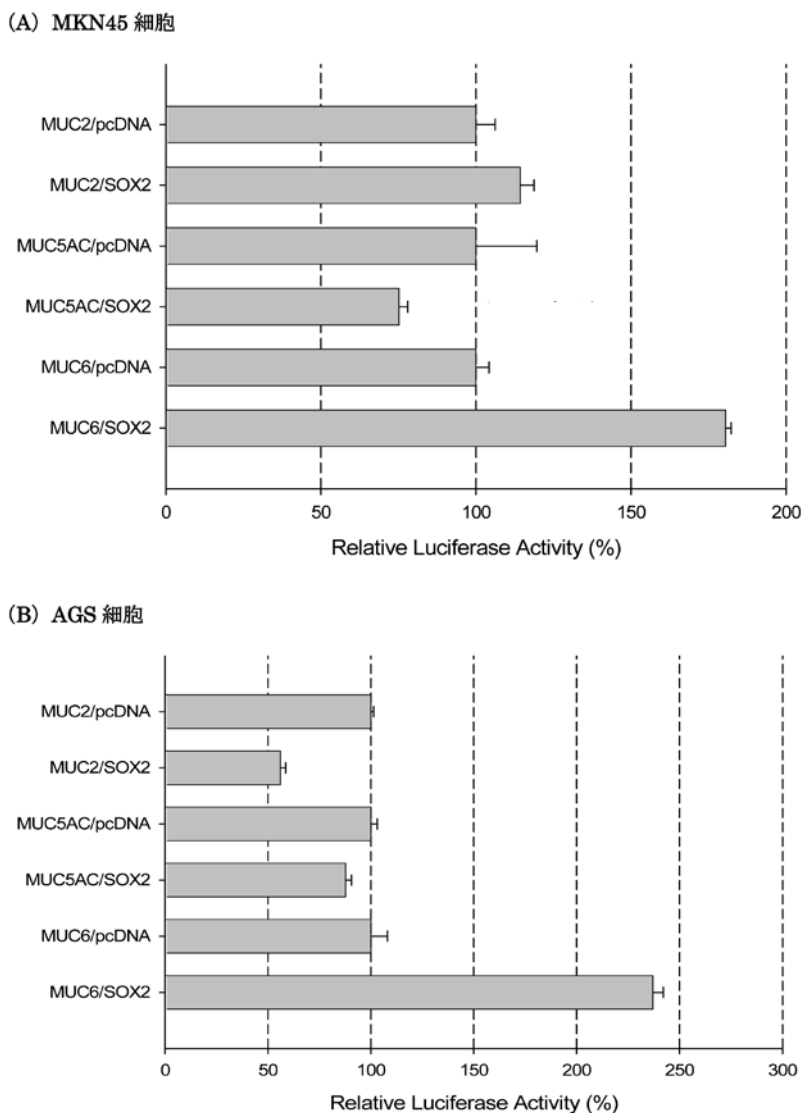


図5 SOX2過剰発現のMUCレポーター遺伝子発現に対する影響. (A) MKN45細胞 (mean \pm SD, n=3), (B) AGS細胞 (mean \pm SD, n=3).

(Lane 1), SOX2発現ベクター (Lane 2) をそれぞれトランスフェクションし, 48時間後に細胞を回収してSOX2蛋白の発現をみたものである. SOX2発現ベクターを強制発現した細胞では, やや高分子側にタグの付着したSOX2蛋白が過剰発現していることが確認された.

2. MKN45細胞およびAGS細胞における各TFF, 各MUC mRNAの発現

これらの細胞株において, 今回検討対象としたTFF (TFF1, TFF2, TFF3) およびMUC (MUC2, MUC5AC, MUC6) の内因性mRNAの発現の有無を確認するために, スクリーニングとしてRT-PCR法による検討を行った. 図3に示したようにRT-PCRレベルでは, TFF1, TFF2, MUC5AC, MUC6の発現はいずれの細胞株でも

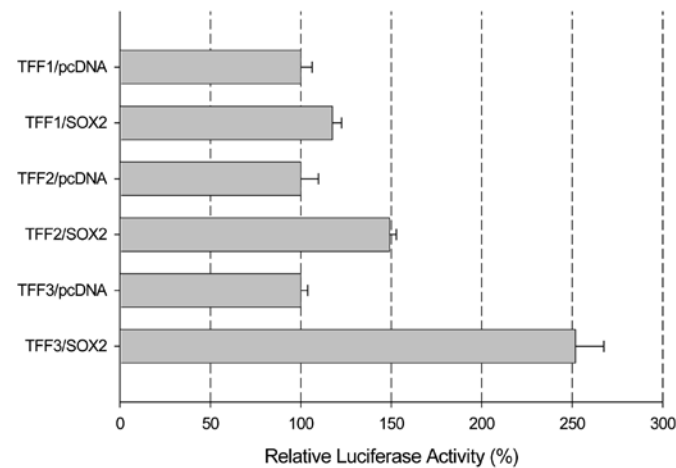
認めることができたが, TFF3の発現はMKN45細胞でやや低めであり, AGS細胞ではほとんどみられなかった. また, MUC2の発現はいずれの細胞においても低めであった.

3. SOX2過剰発現のTFF発現に対する影響

SOX2の過剰発現が各TFFの発現にどのような影響を与えるかを検討するため, MKN45細胞 (図4A), AGS細胞 (図4B) それぞれについてレポーター遺伝子解析を行った.

TFF1の発現は, MKN45細胞においてはコントロールの40%程度に低下し, AGS細胞ではコントロールの10%程度にまで低下した. TFF2も両細胞株において, SOX2過剰発現細胞では発現量が20~25%程度低下し

(A) TFF 発現



(B) MUC 発現

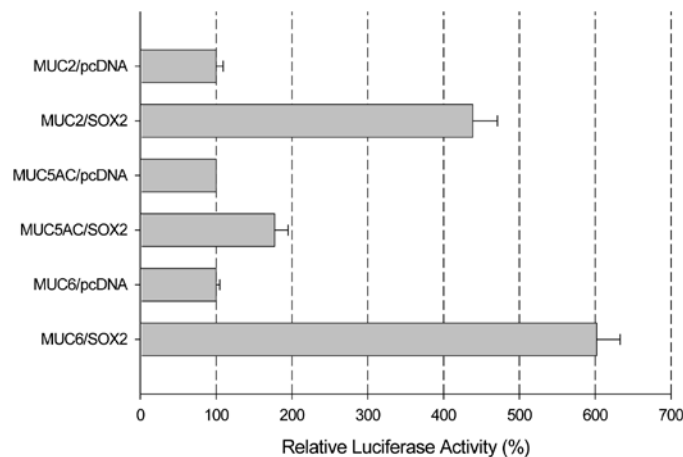


図 6 COS7細胞におけるSOX2過剰発現の影響. (A) TFF発現 (mean \pm SD, n=3), (B) MUC発現 (mean \pm SD, n=3).

た. TFF3発現については一定の傾向が認められず, MKN45細胞ではやや増加傾向, AGS細胞では低下傾向であった.

4. SOX2過剰発現のMUC発現に対する影響

次に, SOX2過剰発現がMUC発現に与える影響をレポーター遺伝子解析により検討した (図5). MUC2発現はMKN45細胞ではやや増加, AGS細胞では低下しており, 一定の傾向はみられなかった. MUC5AC発現はMKN45細胞ではコントロールの75%程度, AGS細胞ではコントロールの90%程度と若干低下傾向であった. 一方, MUC6発現については両細胞株において増加が認められ, MKN45細胞ではコントロールの約180%, AGS細胞ではコントロールの約240%の発現量となった.

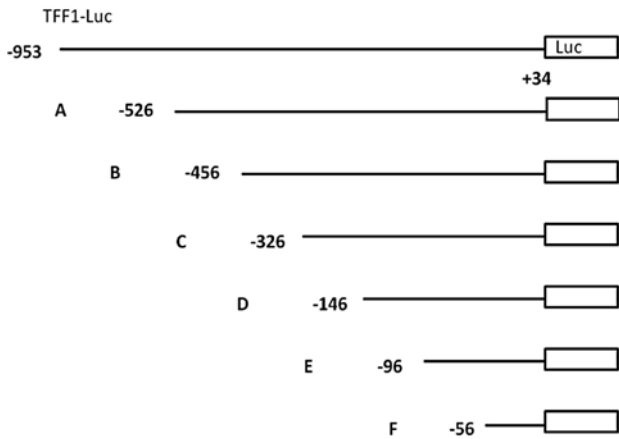
5. COS-7細胞での検討

図4, 図5の結果を他組織由来細胞と比較するため, COS-7細胞を用いてSOX2過剰発現の影響を検討した. 図6A, 図6Bに示すように, SOX2過剰発現がTFF発現およびMUC発現に与える影響は, COS-7細胞では上記の胃由来細胞とかなり異なっており, TFF1発現の抑制は認められなかった. TFF2, TFF3の発現も増加傾向であり, 特にTFF3の発現は2.5倍程度増加していた. また, MUCの発現もSOX2により増加しており, 特にMUC2, MUC6の発現増加が目立った.

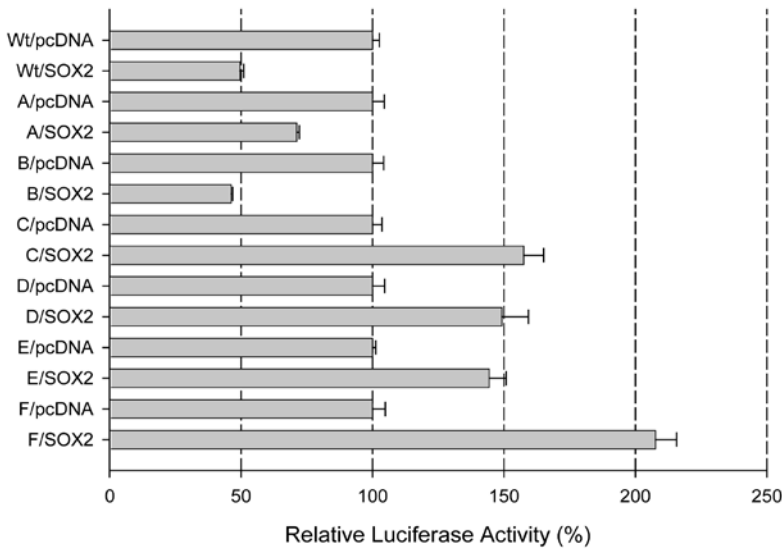
6. TFF1遺伝子プロモーター上のSOX2応答領域についての解析

MKN45, AGSの両細胞株において, SOX2過剰発現に

(A)



(B) MKN45 細胞



(C) AGS 細胞

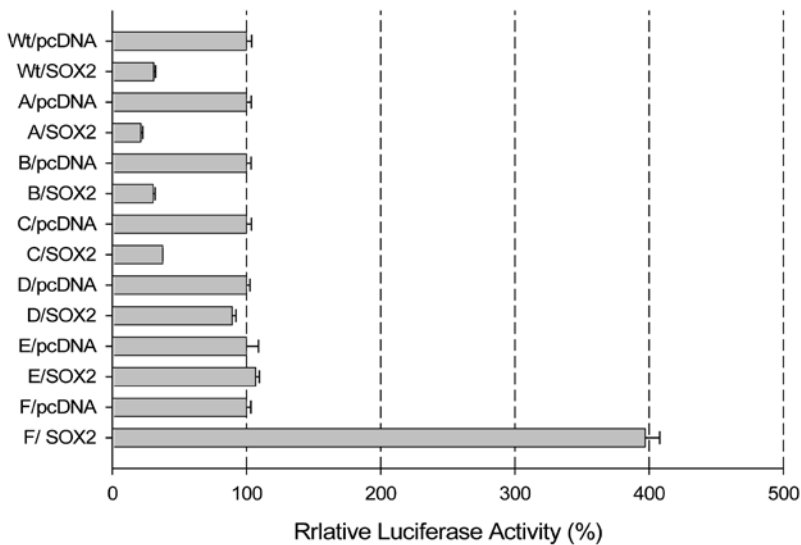


図 7 (A) TFF1-Luc により段階的に 5' 側配列を欠失させて作製したレポーター遺伝子の構造。
 (B) SOX2 過剰発現の影響 (MKN45 細胞) (mean ± SD, n = 3).
 (C) SOX2 過剰発現の影響 (AGS 細胞) (mean ± SD, n = 3).

より TFF1 発現の有意な抑制を認めたので、SOX2 に対する TFF1 遺伝子プロモーター上の応答領域を特定する目的で、TFF1-Luc より段階的に 5' 側配列を欠失させたレポーター遺伝子 (A-F) を作製し (図 7A), 解析を行った。図 7B, 図 7C はそれぞれ MKN45 細胞, AGS 細胞において SOX2 過剰発現の影響をみたものであるが, 各レポーターのコントロールの発現量を 100% としたときの相対的な変化で表示している。MKN45 細胞では, レポーター B までは SOX2 過剰発現により TFF1 発現は低下しているが, レポーター C 以降は, 逆に SOX2 過剰発現により TFF1 発現が増加していることが認められる。AGS 細胞でも同様にレポーター遺伝子に挿入された 5' 側配列が短くなると, SOX2 過剰発現による TFF1 発現抑制が目立たなくなるが, MKN45 細胞とはパターンが少し異なり, レポーター D でわずかな発現低下, レポーター E で有意な影響がなくなり, レポーター F で著明な発現増加となった。

7. SOX2 過剰発現の内因性 TFF1, MUC6 mRNA 発現に対する影響

外来性のレポーター遺伝子を用いた以上の成績から, SOX2 の過剰発現は TFF1 と MUC6 の発現に対して有意な影響を与えていると考えられたので, 内因性の TFF1, MUC mRNA 発現も SOX2 により同様の影響を受けているかどうかをみるため, リアルタイム定量的 RT-PCR 法による検討を MKN45 細胞を用いて行った。レポーター遺伝子解析と同様に, SOX2 発現ベクターをトランスフェクションした細胞と empty pcDNA3.1/V5/His ベクターをトランスフェクションしたコントロール細胞を 48 時間後に回収し, 抽出した total RNA から cDNA を作製してリアルタイム定量的 RT-PCR を行った。図 8A に示すように, TFF1 mRNA の発現レベルは SOX2 過剰発現により抑制されており, レポーター遺伝子解析と同様の作用が認められた。一方, 図 8B のように, MUC6 mRNA 発現レベルは SOX2 過剰発現により著明に増加していることが認められた。

考 察

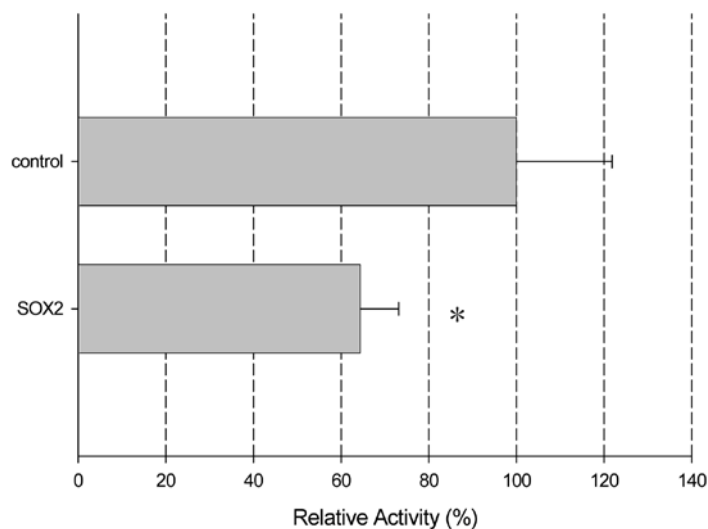
本研究において我々は, 胃粘膜上皮細胞に発現している SRY-related HMG box ファミリーに属する転写因子の SOX2 が, TFF および MUC の発現にどのような影響を与えているかについて検討を行った。解析の対象とした 3 種類の TFF のうち, TFF1 と TFF2 は消化管においては胃粘膜に特異的に発現しており, TFF1 は特に粘膜表層の被蓋上皮細胞での発現レベルが高く, TFF2 は粘膜頸細胞, 幽門腺での発現レベルが高いことが知られて

いる¹²⁾。また, 正常胃粘膜で発現している MUC のうち, MUC5AC の発現は TFF1 の発現部位とオーバーラップしており, 被蓋上皮細胞で高レベルであり, MUC6 は TFF2 との相関が認められ, 頸細胞, 幽門腺での発現レベルが高い¹²⁾。一方, TFF3 と MUC2 は下部消化管上皮 (特に杯細胞) で高発現している TFF および MUC であり, 正常胃粘膜ではその発現レベルは非常に低い, 胃粘膜が腸上皮化生を起こしてくるとその部位では胃型の TFF, MUC の発現が低下するとともに, TFF3, MUC2 の発現が誘導されてくる¹²⁾。緒言でも記したように, 十二指腸以下の下部消化管粘膜上皮では SOX2 の発現は認められず, かわりに CDX1/CDX2 が発現している^{8,9)}。そして, 腸型の TFF, MUC である TFF3, MUC2 の発現は, CDX, 特に CDX2 により制御されていることを我々も報告している¹⁸⁾。このような背景から今回の研究を行ったわけであるが, 予想に反して, SOX2 は胃型の TFF, MUC に対して同一の影響を与えているのではないことが明らかになった。

本研究で用いた 2 種類の胃癌由来細胞株において, SOX2 は TFF1 の発現を抑制し, MUC6 の発現を増加させることが示された。今回の検討の範囲では, TFF1 と発現部位がオーバーラップしている MUC5AC の発現も SOX2 により若干低下傾向となったが, TFF1 ほど著明な低下ではなかった。MUC6 と発現部位がオーバーラップしている TFF2 は MUC6 とは逆に SOX2 により発現レベルが軽度低下しており, その影響の方向は同一ではなかった。TFF3, MUC2 の発現に対しては, SOX2 は 2 つの細胞株でやや異なった効果を与えており, この結果からは, 胃で発現している SOX2 が腸型の TFF, MUC である TFF3, MUC2 の発現を必ずしも抑制しているのではないことが示唆される。しかしながら, COS-7 細胞では, SOX2 の効果は胃癌由来細胞株と大幅に異なっており, いずれの TFF, MUC においても, それらの発現は SOX2 によりあまり影響を受けないか, あるいは増加することが観察された。Li ら⁸⁾ は SOX2 の過剰発現により COS-7 細胞で MUC5AC の発現が増加することを示しており, Park ら¹⁹⁾ は大腸癌由来細胞株で SOX2 の過剰発現により MUC5AC の発現が増加することを報告している。また, Tani ら²⁰⁾ は胃特異的な pepsinogen A の発現が SOX2 により増加することを主としてヒト胎児腎由来の 293T 細胞を用いて示している。しかしながら, 本研究の結果からは, 胃における SOX2 の作用という観点からの結果の解釈は慎重であるべきと思われる。様々な材料を用いて今後も検討を重ねていくことが必要と考えられる。

TFF1, MUC6 について今回用いたレポーター遺伝子

(A) TFF1 mRNA 発現



(B) MUC6 mRNA 発現

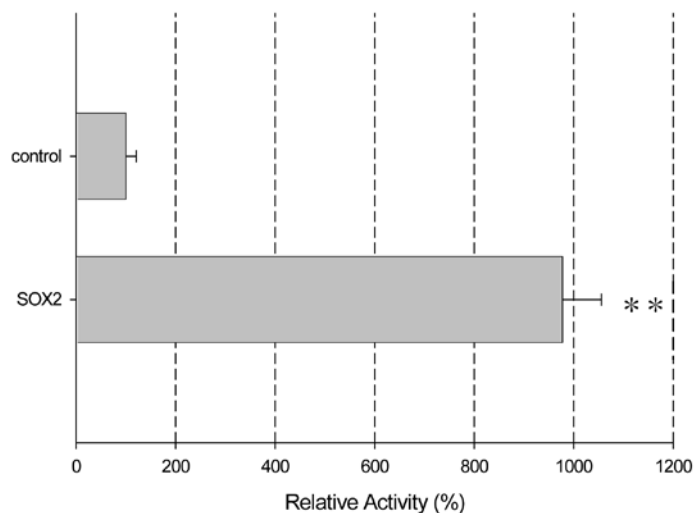


図8 SOX2過剰発現の内因性TFF1, MUC6 mRNA発現に対する影響 (MKN45細胞). (A) TFF1 mRNA発現 (mean ± SD, n=3), *P<0.05 vs.control (unpaired t-test). (B) MUC6 mRNA発現 (mean ± SD, n=3). **P<0.01 vs.control (unpaired t-test).

に挿入した塩基配列の範囲では、少なくとも TESS (<http://www.cbil.upenn.edu/teess>) で検索した限り明らかな SOX2 結合配列は見いだせなかったため、SOX2 の TFF1, MUC6 遺伝子転写活性に与える影響が直接的であるという証拠はない。そこで TFF1 については、SOX2 に対する応答部位を推定する目的で、段階的に挿入配列を短くしたレポーター遺伝子で検討を行った。図7に示した結果からは、特定の応答領域は同定できず、挿入配列が短くなるとともに転写抑制効果が低下していく傾向であった。各 TFF1 レポーター遺伝子自体の発現レベル

は以前報告したように²¹⁾レポーターCで急激に下がるので、特にその周辺の配列が TFF1 遺伝子の発現調節に重要であると考えられる。SOX2 はそのような TFF1 遺伝子の発現調節に関与している他の転写因子等との相互作用を介して、間接的に TFF1 の発現に影響を与えている可能性も考えられる。

SOX2 の TFF1 発現抑制、MUC6 の発現誘導がどのような生理的意義を有しているかは現時点では明らかでない部分が多いが、胃特異的遺伝子の発現は、SOX2 のみでなく他の多様な因子がネットワークを組んで複雑に制

御していると予想される。従って、そのような他の因子を含めて今後さらに検討を進めていく必要があると考えられる。また、胃粘膜上皮におけるSOX2の動態は、癌化との関連からも注目されているので^{9,10)}、病態生理学的な観点からのSOX2の検討も今後必要であると考えられる。

結 論

胃癌由来細胞株であるMKN45細胞とAGS細胞を用い、胃粘膜上皮細胞に発現している転写因子、SOX2が、TFF (TFF1, TFF2, TFF3) 発現およびMUC (MUC2, MUC5AC, MUC6) 発現に与える影響について検討を行った。SOX2過剰発現により特に大きな影響を受けたのはTFF1とMUC6であり、TFF1発現はSOX2により有意に抑制され、MUC6発現は逆に有意に増加した。また、SOX2の作用は、他組織由来の細胞株 (COS-7) では異なっていた。本研究の結果は、SOX2が、胃粘膜特異的なTFF (TFF1, TFF2) およびMUC (MUC5AC, MUC6) の発現を一様に誘導しているのではないこと、また、腸型のTFF (TFF3)、MUC (MUC2) の胃粘膜における発現を抑制するために機能しているのではないことを示唆している。今後、他の様々な因子との相互作用を考慮に入れつつ、胃粘膜上皮におけるSOX2の機能と意義についてさらに理解を深めていく必要があると考えられる。

文 献

- 1) Wegner M : From head to toes : multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res* **27** : 1409-1420, 1999.
- 2) Ferri ALM, Cavallaro M, Braida D, et al : Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development* **131** : 3805-3819, 2004.
- 3) Kelberman DK, de Castro SCP, Huang S, et al : Sox2 plays a critical role in the pituitary, forebrain and eye during human embryonic development. *J Clin Endocrinol Metab* **93** : 1865-1873, 2008.
- 4) Fantès J, Ragge NK, Lynch SA, et al : Mutations in SOX2 causes anophthalmia. *Nature Genetics* **33** : 461-463, 2003.
- 5) Okubo T, Pevny LH and Hogan BLM : Sox2 is required for Development of taste bud sensory cells. *Genes & Dev* **20** : 2654-2659, 2006.
- 6) Klernan AE, Pelling A, Leung KKH, et al : Sox2 is required for sensory organ development in the mammalian inner ear. *Nature* **434** : 1031-1035, 2005.
- 7) Que J, Okubo T, Goldenring JR, et al : Multiple dose-dependent roles for Sox2 in the patterning and differentiation of anterior foregut endoderm. *Development* **134** : 2521-2531, 2007.
- 8) Li XL, Eishi Y, Bai YQ, et al : Expression of the SRY-related HMG box protein SOX2 in human gastric carcinoma. *Int J Oncol* **24** : 257-263, 2004.
- 9) Tsukamoto T, Inada K, Tanaka H, et al : Down-regulation of a gastric transcription factor, Sox2, and ectopic expression of intestinal homeobox gene, Cdx1 and Cdx2 : inverse correlation during progression from gastric/intestinal-mixed to complete intestinal metaplasia. *J Cancer Res Clin Oncol* **130** : 135-145, 2004.
- 10) Otsubo T, Akiyama Y, Yanagihara K, et al : SOX2 is frequently downregulated in gastric cancers and inhibits cell growth through cell-cycle arrest and apoptosis. *Br J Cancer* **98** : 824-831, 2008.
- 11) Taupin D and Podolsky : Trefoil factors : initiators of mucosal healing. *Mol Cell Biol* **4** : 721-734, 2003.
- 12) Hoffmann W, Jagla W : Cell type specific expression of secretory TFF peptides : colocalization with mucins and synthesis in the brain. *Int Rev Cytol* **213** : 147-181, 2002.
- 13) Wright NA, Hoffmann W, Otto WR, et al : Rolling in the clover : trefoil factor family (TFF)-domain peptides, cell migration and cancer. *FEBS Lett* **408** : 121-123, 1997.
- 14) Rose MC, Voynow JA : Respiratory tract and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiol Rev* **86** : 245-278, 2006.
- 15) Chang SK, Dohrman AF, Basbaum CB, et al : Localization of mucin (MUC2 and MUC3) messenger RNA and peptide expression in human normal intestine and colon cancer. *Gastroenterology* **107** : 28-36, 1994.
- 16) Machao JC, Nogueira AMMF, Carneiro F, et al : Gastric carcinoma exhibits distinct types of cell differentiation : an immunohistochemical study of trefoil peptide (TFF1 and TFF2) and mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6). *J pathol* **190** : 437-443, 2000.
- 17) Kojima K, Shimada T, Mitobe Y, et al : Effect of PPAR gamma ligands on the viability of gastric epithelial cells. *Aliment Pharmacol Ther* **16** : 67-73, 2002.
- 18) Shimada T, Koike T, Yamagata M, et al : Regulation of TFF3 expression by homeodomain protein CDX2. *Regul Pept* **140** : 81-87, 2007.
- 19) Park ET, Gum JR, Kakar S, et al : Aberrant expression

- of SOX2 upregulates MUC5AC gastric foveolar mucin in mucinous cancers of the colorectum and related lesions. *Int J Cancer* **122** : 1253-1260, 2008.
- 20) Tani Y, Akiyama Y, Fukamachi H, et al : Transcription factor SOX2 up-regulates stomach-specific pepsinogen A gene expression. *J Cancer Res Clin Oncol* **133** : 263-269, 2007.
- 21) 藤井陽一朗, 島田忠人 : 胃粘膜上皮細胞における trefoil factor family 1 (TFF1) 発現に影響を与える因子に関する検討. *Dokkyo Journal of Medical Sciences* **32** : 29-37, 2005.

SOX2 Down-regulates TFF1 Expression and UP-regulates MUC6 Expression in Gastric Epithelial Cells

Makoto Suzuki and Tadahito Shimada

Department of Gastroenterology, Dokkyo Medical University School of Medicine, Mibu, Tochigi 321-0293, Japan

Although previous studies showed the expression of SOX2, a SRY-related HMG box family transcription factor, in gastric epithelial cells, little is known about the regulation of stomach-specific gene expression by SOX2. In this study, by using gastric cancer cell lines (MKN45 and AGS) as a model system, we examined the effects of SOX2 on the expression of trefoil factor family peptides (TFF1, TFF2, and TFF3) and mucin core proteins (MUC2, MUC5AC, and MUC6). Reporter gene analyses showed that forced overexpression of SOX2 proteins significantly down-regulates the transcription of TFF1 and up-regulates the transcription of MUC6. TFF2 and MUC5AC transcription was slightly repressed by SOX2. TFF3 and MUC2 transcription was slightly up-regulated by SOX2 in MKN45 cells but

slightly down-regulated in AGS cells. Real-time quantitative RT-PCR also confirmed the down-regulation of endogenous TFF1 mRNA expression and up-regulation of MUC6 mRNA expression by SOX2 overexpression. These results suggest that SOX2 differentially affects the expression of stomach-specific TFFs (TFF1 and TFF2) and MUCs (MUC5AC and MUC6), and that SOX2 may not be a key factor for the repression of the expression of intestine-specific TFF (TFF3) and MUC (MUC2) in gastric epithelial cells.

Key words : gastric epithelial cells, trefoil factor family, mucin core protein, SOX2