

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06955

研究課題名(和文) ホメオボックス転写因子CDXsによる大腸癌の癌幹細胞性関連遺伝子の発現抑制機構

研究課題名(英文) Suppression of colon cancer stemness by caudal-related homeobox transcription factors CDX1 and CDX2

研究代表者

堀 一也 (Kazuya, Hori)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：50749059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腸上皮細胞の発生や分化に重要な役割を担うホメオボックス転写因子CDX1とCDX2による、大腸癌悪性化の抑制機序を解析した。その結果、CDX1やCDX2が、大腸癌の腫瘍幹細胞性を抑制していることが分かった。また、その機序として、ヒストンのアセチル化などの化学修飾などを介したエピジェネティックな遺伝子発現制御とは異なる機構により、CDX1やCDX2が、大腸癌の腫瘍幹細胞性に関わる遺伝子の発現を抑制していることが分かった。これらの結果から、CDX1やCDX2は、典型的なエピジェネティックな遺伝子発現制御機構とは異なる機構により、大腸癌の悪性化や腫瘍幹細胞性を抑制していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、腸管の上皮細胞の恒常性の維持に重要な役割を担うCDX1やCDX2が、大腸癌の悪性化や腫瘍幹細胞性を抑制することを見出した。また、その機構として、CDX1やCDX2が、典型的なエピジェネティックな遺伝子発現制御とは異なる機構により、大腸癌の腫瘍幹細胞性に関わる遺伝子の発現を制御していることを見出した。すなわち、従来の研究からは分からなかった、新たな大腸癌の悪性化や腫瘍幹細胞性の制御機構が解明できる可能性があり、新たな治療標的の同定などが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Caudal-related homeobox transcription factors CDX1 and CDX2 are expressed specifically in the intestinal epithelial cells and essential for their development and homeostasis. In this study, we have investigated the mechanisms by which CDX1 and CDX2 suppressed malignant progression of colorectal tumorigenesis, and found that they suppressed cancer stemness of colon cancer cells. We have also found that CDX1 and CDX2 suppressed expression of cancer stemness-related genes directly but not through typical epigenetic mechanisms such as histone modification, suggesting a new mechanism that controls colon cancer stemness.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：大腸癌 CDX1 CDX2

1. 研究開始当初の背景

近年の研究から、大腸癌をはじめとする多くの癌において腫瘍悪性化などに関わる遺伝子の塩基配列の異常(遺伝子変異)などが明らかになった。しかし、腫瘍の悪性化が進行する機構には、多くの未解明な問題が残されており、癌の薬物治療標的を同定するためには、腫瘍の悪性化メカニズムを解明することが重要である。一方で、我々のこれまでの研究から、腸上皮細胞の恒常性の維持などに不可欠なホメオボックス転写因子 CDX1 と CDX2 (Caudal-related homeobox 1 and 2) が大腸腫瘍形成の抑制因子として働くことを見出した(Aoki et al., Nat Genet 2003; Cancer Res 2011 など)。さらに、最近の研究から、CDX1 と CDX2 が大腸腫瘍形成の悪性化を抑制することを見出した。そこで、本研究課題では、CDX1 と CDX2 による大腸癌悪性化の抑制機構の解明を進める。

2. 研究の目的

CDX1 と CDX2 による大腸癌悪性化の抑制機序を解明するために、ヒト大腸癌細胞で CDX1 または CDX2 の発現を誘導して、cDNA マイクロアレイ法による遺伝子発現解析を行った。その結果、CDX1 と CDX2 の発現誘導により、大腸癌の腫瘍幹細胞性に重要と考えられている遺伝子の発現量が低下することが分かった。腫瘍幹細胞は、腫瘍悪性化や再発の一因と考えられている。そこで本研究課題では、腫瘍幹細胞性の制御における CDX1 と CDX2 の役割を解析する。また、CDX1 と CDX2 による腫瘍幹細胞性の抑制メカニズムの解明を進める。

3. 研究の方法

ApcCdx1Cdx2 変異マウスの腸管にできた腫瘍から、オルガノイド細胞を単離して、腫瘍幹細胞性を調べる。そこで、腫瘍幹細胞性に関わる遺伝子の発現解析とそれらの細胞の増殖速度を解析する。

また、ヒト大腸癌細胞で、flag-CDX1 または flag-CDX2 の発現を誘導して、それぞれの CDX を標的としてクロマチン免疫沈降実験を行い、回収したゲノム断片をシーケンス解析することで、CDX1 や CDX2 のゲノム結合領域を解析する。また、CDX1 や CDX2 のそれらのゲノム領域への結合の意義を、ルシフェラーゼレポーターを用いて解析する。また、CDX1 や CDX2 の発現を誘導したときの、CDX1 や CDX2 のゲノム結合領域におけるエピジェネティックな変化をヒストン修飾などに注目して、クロマチン免疫沈降法や MNase 法を用いて解析する。

4. 研究成果

(1) 腫瘍幹細胞性の維持における CDX1 と CDX2 の役割

ApcCdx1Cdx2 変異マウスの腸管にできた腫瘍から、オルガノイド細胞を単離して培養した後、遺伝子発現を調べたところ、*Cdx1* や *Cdx2* の変異により、腫瘍幹細胞性に関連する遺伝子の発現量が上昇することが分かった。これらの結果は、ヒト大腸癌細胞において CDX1 や CDX2 の発現を誘導したときに、腫瘍幹細胞性に関連した遺伝子の発現量が低下することと一致する。また、それらのオルガノイド細胞の、マトリゲル中における増殖速度を調べたところ、*Cdx1* や *Cdx2* の変異により、腫瘍幹細胞の増殖速度が上昇することが分かった。これらの一連の解析から、CDX1 や CDX2 が、腫瘍の幹細胞性を抑制していることが示唆された。

(2) CDX1 や CDX2 の結合ゲノム領域の解析

ヒト大腸癌細胞で、flag-CDX1 または flag-CDX2 の発現を誘導して、それぞれの CDX を標的としてクロマチン免疫沈降実験を行い、回収したゲノム断片をシーケンス解析した。その結果、CDX1 や CDX2 が、癌幹細胞関連遺伝子のゲノム領域に結合していることなどが分かった。そこで、それらの癌幹細胞関連遺伝子の中でも重要な *LGR5* 遺伝子に注目して、解析を進めることにした。

シーケンス解析から同定した CDX1 と CDX2 が結合する *LGR5* 遺伝子のゲノム領域を組み込んだルシフェラーゼレポーター plasmid を作成した。このルシフェラーゼレポーターは、安定型 β -catenin により活性化された。一方で、CDX1 と CDX2 により、そのレポーター活性は抑制された。これらの実験結果から、CDX1 や CDX2 は、本実験で同定したゲノム領域への結合を介して、*LGR5* 遺伝子の発現を抑制していることが分かった。

(3) CDX1 や CDX2 の発現誘導時のエピジェネティックな変化

DNA の折り畳みに働くヒストンの化学修飾は、遺伝子発現制御において主要な役割を担うことが、これまでの研究から報告されている。そこで、CDX1 や CDX2 の発現を誘導したときの、*LGR5* ゲノム領域のヒストン修飾の状態を解析した。その結果、CDX1 や CDX2 が *LGR5* の遺伝子発現量を低下させているにも関わらず、例えば、H3K27ac などの量が *LGR5* 遺伝子のゲノム領域で顕著に増加していることが分かった。そこで、*LGR5* ゲノム領域のクロマチン状態を解析するために、MNase-qPCR を行った。その結果、CDX1 や CDX2 の発現を誘導したときの *LGR5* 遺伝子のゲノム領域のクロマチン状態が、Open 状態になっていることが分かった。通常、クロマチンが Open 状態となった場合、転写因子や RNA polymerase II が結合しやすくなるため、遺伝子発現は促進する。したがって、これらの結果から、CDX1 や CDX2 は、これまでに報告されている典型的なヒストンのエピジェネティックな制御とは異なる機構により、*LGR5* 遺伝子の発現を制御していることが分かった。

(4) CDX2 による *LGR5* 遺伝子発現抑制と増殖抑制の関係

CDX2 は、大腸癌細胞の増殖を強く抑制することがこれまでの解析から分かっている。そこで、腫瘍幹細胞性の抑制と腫瘍細胞の増殖抑制の関係を調べるために、CDX2 の DNA 結合ドメインであるホメオドメインに様々な変異を導入した CDX2 変異体を作成して、ヒト大腸癌細胞株で、その CDX2 変異体の発現を誘導した。その結果、腫瘍の細胞増殖を抑制できても、*LGR5* 遺伝子の発現を抑制できない CDX2 変異体があることが分かった。これらの結果と一致して、それらの CDX2 変異体は、*LGR5* 遺伝子のルシフェラーゼレポーターの活性を抑制できないことも分かった。これらの実験結果から、CDX2 による腫瘍幹細胞性の抑制と、腫瘍細胞の増殖抑制は、異なるメカニズムを介していることが分かった。すなわち、大腸癌細胞において、腫瘍幹細胞性と腫瘍細胞の増殖は、異なるメカニズムにより制御されていると考えられる。

< 引用文献 >

Aoki K, Tamai Y, Horiike S, Oshima M, Taketo MM. Colonic polyposis caused by mTOR-mediated chromosomal instability in *Apc^{+/Δ716} Cdx2^{-/-}* compound mutant mice. *Nat Genet*, 35(4), 323-30, 2003

Aoki K, Kakizaki F, Sakashita H, Manabe T, Aoki M, Taketo MM. Suppression of colonic polyposis by homeoprotein CDX2 through its nontranscriptional function that stabilizes

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akari Nitta*, Kazuya Hori*, Isei Tanida*, Ayumi Igarashi, Yasuyo Deyama, Takashi Ueno, Eiki Kominami, Manabu Sugai, Koji Aoki	4. 巻 508
2. 論文標題 Blocking LC3 lipidation and ATG12 conjugation reactions by ATG7 mutant protein containing C572S	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 521 ~ 526
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.11.158	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kazuya Hori, Mako Nakaya, Takanori Goi, Akio Yamaguchi, Shunichiro Iemura, Tohru Natsume, Makoto M. Taketo, Manabu Sugai, Koji Aoki
2. 発表標題 Suppression of intestinal cancer stemness and malignant progression by intestine-specific homeoproteins CDX1 and CDX2
3. 学会等名 Looking to the future of Developmental Cell Biology Symposium (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koji Aoki
2. 発表標題 Mechanism that controls colon cancer stemness, via PAF1 complex through a competition between β -catenin and CDX1/2.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福井大学医学部薬理学分野ホームページ
<https://www.med.u-fukui.ac.jp/laboratory/pharmacology/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	青木 耕史 (Koji Aoki) (40402862)	福井大学・学術研究院医学系部門・教授 (13401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------