

## 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 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590794

研究課題名（和文）胃癌の前癌病変である腸上皮化生粘膜における転写因子 Cdx2 と Cdx1 の関係

研究課題名（英文）The relationship between Cdx2 and Cdx1 in intestinal metaplastic mucosa

研究代表者

坂本 博次（SAKAMOTO HIROTSUGU）

自治医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50536175

研究成果の概要（和文）：

Cdx2 トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜には Cdx1 が発現していることが明らかになった。もちろんこの Cdx2 トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜には Cdx2 は発現していたが、発現していたのはすべてトランスジェニック Cdx2 (外因性の Cdx2)であり、内因性の Cdx2 は誘導されていなかった。この Cdx2 による Cdx1 の誘導は、メチル化されていない Cdx1 のプロモータ領域の TATAbox が Cdx2 の結合配列になっていて、ここに Cdx2 が結合することにより Cdx1 が誘導されてくることが確認された。

研究成果の概要（英文）：

Cdx1 and Cdx2, which are transcription factors regulating normal intestinal development, have been studied as potential key molecules in the pathogenesis of the precancerous intestinal metaplasia of the human stomach. However, the regulation of Cdx1 expression in the intestinal metaplasia is poorly understood. Cdx2-expressing gastric mucosa of Cdx2-transgenic mouse stomach was replaced by intestinal metaplastic mucosa. The aim of this study was to investigate the following: (a) Cdx1 expression in the intestinal metaplastic mucosa of the Cdx2-transgenic mouse stomach; and (b) the relationship between Cdx1 and Cdx2. A mouse model of intestinal metaplasia, the Cdx2-transgenic mouse, was used to investigate Cdx1 gene expression by RT-PCR. DNA methylation profile analysis was performed by bisulfite sequencing, and the interaction of Cdx2 with the Cdx1 promoter was examined by chromatin immunoprecipitation assay, electrophoretic mobility shift assay, and luciferase reporter assays. Cdx2 mRNA was expressed in the Cdx2-transgenic mouse stomach. However, endogenous Cdx2 mRNA was not expressed in the intestinal metaplasia of the Cdx2-transgenic mouse stomach. On the other hand, endogenous Cdx1 mRNA and protein were expressed in the intestinal metaplasia of the Cdx2-transgenic mouse stomach. The Cdx1 promoter was unmethylated in the intestinal metaplasia of the Cdx2-transgenic mouse stomach. Chromatin immunoprecipitation assay and electrophoretic mobility shift assay showed that Cdx2 was bound to the Cdx1 promoter region in the intestinal metaplasia and the normal intestine. Cdx2 upregulated and siRNA-Cdx2 downregulated the transcriptional activity of the Cdx1 gene in the human gastric carcinoma cell lines AGS, MKN45, and MKN74. In conclusion, transgenic Cdx2 induced endogenous Cdx1 through the binding of Cdx2 to the unmethylated Cdx1 promoter region in the intestinal metaplasia of the Cdx2-transgenic mouse stomach.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000

2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：上部消化管学（食道、胃、十二指腸）

### 1. 研究開始当初の背景

分化型胃癌の前癌病変である腸上皮化生粘膜には転写因子である Cdx2 と Cdx1 が発現していることを報告してきた(J Gastroenterol 2002;37:94-100, Helicobacter 2002;7:192-8)。そこで Cdx2 が腸上皮化生の原因遺伝子であることを確認するために Cdx2 を胃粘膜に特異的に発現させるトランスジェニックマウスを壁細胞に存在する H<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase のβ-subunit の promoter を用いて作成した。この Cdx2 トランスジェニックマウスの胃粘膜は完全に腸上皮化生粘膜によって置換され、Cdx2 が腸上皮化生の原因遺伝子であることが確認された(Biochem Biophys Res Commun 2002;294:470-9, Int J Dev Biol 2005;49:867-71)。さらにこの Cdx2 トランスジェニックマウスを *Helicobacter pylori* の感染なく飼育すると 100 週齢にはほとんどすべてのマウスの胃に隆起型の進行癌(組織は高分化型腺癌)が形成された(Cancer Res 2004;64:7740-7)。しかし、Cdx2 は本来、正常小腸の絨毛に発現しており上皮細胞の分化に関与している。大腸においても Cdx2 の低下と大腸癌との関係が報告されている。なぜ、小腸粘膜の分化に関与する転写因子である Cdx2 を胃粘膜に特異的に発現させた腸上皮化生粘膜から癌が発生してくるのかに大きな疑問を抱き、解明したいと考えた(第一番目の目的)。さらに、ヒトの腸上皮化生では Cdx1 が発現していることを報告しているが、この Cdx2 トランスジェニックマウスにおいては Cdx1 の発現があるのか否かを確認することはヒトの腸上皮化生との類似性を考える上で極めて重要である(第二番目の目的)。さらにすでに Cdx1 トランスジェニックマウスを作成しており、このマウスの胃粘膜も腸上皮化生によって完全に置換されたことを報告してきた(Gut 2004;53:1416-23)。この Cdx1 トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜は正常胃粘膜に比較し粘膜が肥厚しており、Proliferating Cell Nuclear Antigen(PCNA)陽性細胞が増加しており、胃癌の前癌病変として重要であると考えら

れた。そこで Cdx2 と Cdx1 の胃癌の前癌病変としての関係を明らかにしたいと考えた(第三番目の目的)。

### 2. 研究の目的

まず、われわれはこの研究の開始に先立ち予備実験として Cdx2 トランスジェニックマウスの胃粘膜に Cdx1 が発現していることを RT-PCR で確認している。そこで、この研究期間内に以下の点を明らかにしていきたい。(第一番目)RT-PCR にて Cdx1 の発現を確認しているのか、まず、蛋白レベルで発現しているのかを Western blotting で確認したい。さらにその発現が、Cdx2 を発現している腸上皮化生粘膜であることを免疫組織染色で明らかにする。(第二番目)Cdx2 の発現には auto-regulation があるという報告があるので、この Cdx2 トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜に内因性の Cdx2 が誘導されているかを検討する。(第三番目)近年、胃癌の発生における癌抑制遺伝子の発現低下にエピジェネティックな変化が注目されている。そこで、正常胃粘膜、腸上皮化生粘膜、正常小腸粘膜における Cdx1 の遺伝子の promoter 領域のメチル化の有無を検討する。(第四番目)Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)を正常胃粘膜、正常小腸粘膜、Cdx2 トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜で行い、*in vivo* の状態で Cdx2 が Cdx1 の promoter 領域に結合することを確認する。(第五番目)Cdx1 の promoter 領域を用いた Luciferase assay により転写活性を検討する。以上の方針により、腸上皮化生粘膜における Cdx1 の発現誘導のメカニズムに迫りたい。

### 3. 研究の方法

まず、われわれはこの研究の開始に先立ち予備実験として Cdx2 トランスジェニックマウスの胃粘膜に Cdx1 が発現していることを RT-PCR で確認している。そこで、この研究期間内に以下の点を明らかにしていきたい。

1. RT-PCRにて Cdx1 の発現を確認しているのですが、まず、蛋白レベルで発現しているのかを Western blotting で確認する。さらにその発現が、Cdx2 を発現している腸上皮化生粘膜の上皮細胞で Cdx1 が発現していることを免疫組織染色で明らかにする。
2. Cdx2 の発現には auto-regulation があるという報告がある (J Biol Chem 1999;274:34310-6)。この報告に基づくと Cdx2 トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜では transgene である Cdx2 により内因性の Cdx2 が誘導されている可能性がある。実際、この Cdx2 トランスジェニックマウスは壁細胞に存在する H+/K+-ATPase の  $\beta$ -subunit の promoter を使用しており、トランスジェニックマウスの胃粘膜が完全に腸上皮化生粘膜によって置換され壁細胞が消失しており、H+/K+-ATPase の  $\beta$ -subunit の promoter も作用しないのではないかと考えている。そこで autoregulation により内因性の Cdx2 が誘導されている可能性が考えられる。そのため、この Cdx2 トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜に内因性の Cdx2 が誘導されているかを検討する。この Cdx2 トランスジェニックマウスを作成したときに用いた Cdx2 遺伝子は coding region のみを使用した。そこで、内因性の Cdx2 の発現を検討するために、coding region の forward primer と 3' non-coding region の reverse primer を用いることにより、内因性の Cdx2 のみを検出できる。一方、coding region 中の 2 箇所でも primer を作成することにより transgene と内因性の両方の Cdx2 の発現を検出することができる。このようにして、transgene である Cdx2 と内因性の Cdx2 の発現を RT-PCR で区別することができると考えられる。
3. 近年、胃癌の発生における癌抑制遺伝子の発現低下にエピジェネティックな変化が注目されている。正常胃粘膜では Cdx1 は発現していない。Cdx1 の発現は adult では腸管のみである。そこで、正常の胃粘膜で Cdx1 が発現していない原因として Cdx1 の promoter 領域のメチル化も原因の一つとして考えられる。そこで、正常胃粘膜、腸上皮化生粘膜、正常小腸粘膜における Cdx1 の promoter 領域のメチル化の有無を検討する。正常胃粘膜、腸上皮化生粘膜、正常小腸粘膜の粘膜面をスパーテルで削り取った組織からゲノム DNA を抽出し、bisulfite 処理を行い、メチル化されていない DNA 塩基であるシトシン(C)をチミン(T)に変換する。CpG を含まない領域で primer を作成し、PCR を行い、産物を TOPO ベクターに入れて、sequence を行うことにより CpG アイランドのメチル化の有無を明らかにすることにより、正常胃粘膜、腸上皮化生粘膜、正常小腸粘膜における Cdx1 の発現とメチル化との関係を明らかにする。
4. Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) を正常胃粘膜、正常小腸粘膜、Cdx2 トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜で行い、in vivo の状態で Cdx2 が Cdx1 の promoter 領域に結合することを確認する。正常胃粘膜、腸上皮化生粘膜、正常小腸粘膜の粘膜面をスパーテルで削り取った組織をホルマリン処理し、ゲノム DNA と DNA に結合するタンパクとを固定する。その後、500bp くらいになるように sonication を行う。そして、Cdx2 に対する抗体で免疫沈降を行う。免疫沈降された DNA・タンパク複合体を proteinase K で処理し、DNA のみを抽出する。抽出された DNA を template にして Cdx2 の結合が予想される部位を挟む primer を作成し、PCR を行うことにより、Cdx1 の promoter 領域に実際に Cdx2 が結合しているか否かを明らかにすることができると考えられる。
5. Cdx1 の promoter 領域を用いた Luciferase assay により転写活性を検討する。マウスのゲノムを template にして、Cdx1 の promoter 領域を PCR を用いてクローニングする。PCR 産物をプロメガから市販されている Luciferase vector である pGL4.10 の multi-cloning site に入れる。Cdx2 が結合する cis-element は AT-rich モチーフであり、典型的な配列は C/TATAAAT/G である (Nucleic Acids Res 1993;21:4915-22)。また、小腸上皮細胞に発現している遺伝子である calbindin-D9 gene (Eur J Biochem 1996;236:778-88)、clusterin gene (Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2001;280:G149-56)、glucose-6-phosphatase gene (Nucleic Acids Res 2003;31:5238-46) はいずれも TATA box に Cdx2 が結合し、転写を活性化することが明らかにされている。そこで、Cdx1 の promoter の TATA box を中心に解析を進めていく方針である。transfection を行う細

胞としては **Cdx2** を発現していることを既に確認している胃癌の細胞株である **AGS**、**MKN45**、**MKN74** を用いる。そして、**deletion** により、**Cdx2** の結合部位が決まったら、その部位に **mutation** を入れることにより詳細に検討する方針である。

以上の方針により、腸上皮化生粘膜における **Cdx1** の発現誘導のメカニズムを明らかにする。

#### 4. 研究成果

**Cdx2** は正常腸管の絨毛上皮に発現しており正常腸管粘膜上皮細胞の分化に関与している。分化に関与すると考えられる **Cdx2** を発現している腸上皮化生が、分化型胃癌の前癌病変であることは矛盾している。この問題に対する答えの一つが **Cdx2** による **Cdx1** の発現誘導ではないかと考えている。**Cdx1** と **Cdx2** がともに腸上皮化生粘膜に発現しており、両者ともに腸上皮化生を誘導する。**Cdx1** は小腸上皮細胞の陰窩に発現しており、**Cdx2** は小腸上皮細胞の絨毛に発現していることから、**Cdx1** が増殖に関与し、**Cdx2** が分化に関与しているのではないかと推測されてきた。トランスジェニックマウスの結果を考えると、**Cdx1** も **Cdx2** もともに腸上皮化生を誘導することはできるが粘膜の厚さや増殖に大きな差が見られた。**Cdx1** トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜は **Cdx2** トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜に比較し明らかに粘膜肥厚があり増殖帯も広がっていた (*Gut* 2004;53:1416-23)。このことは **Cdx1** が増殖に関与し、**Cdx2** が分化に関与しているのではないかという考えに一致する。しかし、**Cdx2** が分化に関与しているとすると、どうして **Cdx2** トランスジェニックマウスから胃癌が発生してくるのかを説明することが不可能である (*Gut* 2004;53:1416-23)。もし、**Cdx2** が **Cdx1** を誘導しているのであれば、この2つの **Cdx1** と **Cdx2** のトランスジェニックマウスの結果をうまく説明することが可能である。実際、**Cdx2** トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜には **Cdx1** が発現していることが明らかになった 21。もちろんこの **Cdx2** トランスジェニックマウスの腸上皮化生粘膜には **Cdx2** は発現していたが、発現していたのはすべてトランスジェニック **Cdx2** (外因性の **Cdx2**) であり、内因性の **Cdx2** は誘導されていなかった。この **Cdx2** による **Cdx1** の誘導は、メチル化されていない **Cdx1** のプロモータ領域の **TATAbox** が **Cdx2** の結合配列になっていて、ここに **Cdx2** が結合することにより **Cdx1** が誘導されてくることが確認された (*FEBS J.* 2009;276:5821-31)。

#### 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 Mutoh H, Sashikawa M, Sugano K. Sox2 expression is maintained while gastric phenotype is completely lost in Cdx2-induced intestinal metaplastic mucosa. *Differentiation*. 2011;81:92-8.
- ② Sakamoto H, Mutoh H, Hayakawa H, Sashikawa M, Sugano K. Cell lineage dynamics in the process leading to intestinal metaplasia. *J Gastroenterol*. 2011;46:620-8.
- ③ Sashikawa Kimura M, Mutoh H, Sugano K. SOX9 is expressed in normal stomach, intestinal metaplasia, and gastric carcinoma in humans. *J Gastroenterol*. 2011;46:1292-9.
- ④ Mutoh H, Hayakawa H, Sashikawa M, Sakamoto H, Sugano K. Direct repression of Sonic Hedgehog expression in the stomach by Cdx2 leads to intestinal transformation. *Biochem J*. 2010;427:423-34.
- ⑤ Mutoh H, Sashikawa M, Hayakawa H, Sugano K. Monocyte chemoattractant protein-1 is generated via TGF-beta by myofibroblasts in gastric intestinal metaplasia and carcinoma without H. pylori infection. *Cancer Sci*. 2010;101:1783-9.
- ⑥ Sakamoto H, Mutoh H, Sugano K. Expression of Claudin-2 in intestinal metaplastic mucosa of Cdx2-transgenic mouse stomach. *Scand J Gastroenterol*. 2010;45:1273-80.
- ⑦ Mutoh H, Hayakawa H, Sakamoto H, Sashikawa M, Sugano K: Transgenic Cdx2 induces endogenous Cdx1 in intestinal metaplasia of Cdx2-transgenic mouse stomach. *FEBS J*. 2009;276:5821-31.
- ⑧ Sakamoto H, Mutoh H, Ido K, Satoh S, Kumagai M, Hayakawa H, Tamada K, Sugano K: Intestinal metaplasia in gallbladder correlates with high amylase levels in bile in patients with a morphologically normal pancreaticobiliary duct. *Hum Pathol*. 2009;40:1762-7.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] 無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 博次 (SAKAMOTO HIROTSUGU)

自治医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50536175

(2) 研究分担者

武藤 弘行 (MUTOH HIROYUKI)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50322392

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：