

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590736  
 研究課題名（和文） 低分化型大腸癌由来細胞株の分化誘導による腸管上皮発生と癌転移メカニズムの解析  
 研究課題名（英文） Analysis of intestinal epithelial differentiation and mechanisms of colon cancer metastasis in Cdx -induced human Colo 205 cells.  
 研究代表者  
 江崎 俊彦 (EZAKI TOSHIHIKO)  
 慶應義塾大学・医学部・講師  
 研究者番号：20255425

研究成果の概要：Cdx1 および Cdx2 遺伝子を低分化型大腸癌由来のヒト大腸癌細胞株 Colo205 に導入することにより得られた細胞接着能の獲得ならびに正常腸管上皮細胞への分化の過程において、Desmosomal junctionの構成分子である Desmocollin -2の発現上昇と Adherens junctionの構成分子である E-cadherin と p120-catenin の結合の減弱が重要であることが確認された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
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：消化器学（食道、胃、小腸、大腸）

## 1. 研究開始当初の背景

(1)ヒト腸管上皮は単なるバリアーとしての役割だけでなく、栄養、水分、塩類等の吸収も行っている(Kraehenbuhl J et al, Aliment Pharmacol Ther 1997)。そして継続的にも数日のうちに脱落と再生を繰り返している。腸管円柱上皮は細胞内において極性をもち、腸管内腔側は微絨毛を形成することで、吸収面積を広げ、また細胞間は種々の細胞接着因子で強固に結合することで外部（腸管内腔）からの異物の進入を妨げている。このように、腸管上皮の分化・増殖の事実は以前より報告(Korinec V et al, Nat Genet 1998,

Clatworthy J et al, Mech Dev 2001)されているが、どのようにして腸管上皮の極性や細胞接着の構築が制御されているかは明らかでない。

(2)Homeodomain transcription factorであるCdx1およびCdx2遺伝子は、胎生初期における腸管の形成(Freund j et al, Biochem Cell Biol 1998)と腸管上皮に特異的な遺伝子であるsucrase-isomaltase, alkaline phosphataseなどの発現を制御していることが知られている(Guo R et al, Cancer Biol Ther, 2004)。また、腸管上皮の分化において細胞接着

は重要な役割をもち、E-cadherinに代表されるAdherens junction、desmosomeによるdesmosomal junction、claudinやZO-1に代表されるtight junctionは腸管上皮細胞においてその発現を認め、腸管粘膜の恒常性を保っている。中でもE-cadherin-catenin complexは細胞内actinと結合することにより、腸管上皮細胞の形態維持に中心的な役割を果たしており、E-cadherinの過剰発現は細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導し、細胞のmigrationを遅らせ、その発現抑制は腸管上皮細胞の極性を失わせ、細胞の形態変化ももたらすことが報告されている(Hermiston M et al, J Cell Biol 1995, Hermiston M et al, Genes Dev 1996)。

(3) Homeodomain transcription factorであるCdx1およびCdx2遺伝子を低分化型大腸癌由来のヒト大腸癌細胞株Colo205に導入すると、細胞接着をおこすことのなかったColo205細胞の細胞接着が促進され、細胞の円柱化、核の基底層への偏在、微絨毛の出現、Adherens junction, desmosome junction, tight junctionの形成と、あたかも正常腸管上皮細胞に変化していることを我々は報告した(Keller M and Ezaki T et al, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2004)。

## 2. 研究の目的

我々は、腸管上皮の分化がどのように制御されているか解明するために、低分化型大腸癌由来のヒト大腸癌細胞株Colo205に着目した。Colo205細胞は浮遊細胞ではないが、細胞同士の接着能が非常に弱く、細胞塊を形成することがないにもかかわらず、E-cadherin-catenin complexの構成因子(E-cadherin, beta-catenin, p120-catenin, gamma-catenin, alpha-catenin)すべての発現を認め、かつ、Cdx遺伝子を発現していない細胞株である。1999年AonoらはColo205細胞にトリプシン処理を施すとE-cadherin-catenin complex依存性の細胞接着をきたすことを報告している。このことから我々は、腸管の発生・分化のkey regulatorであるCdx遺伝子がE-cadherin-catenin complexの活性化、ひいてはColo205細胞の細胞接着能獲得に寄与している可能性が高いと考えた。

## 3. 研究の方法

(1)レトロウイルスベクターにクローニングされたCdx遺伝子をColo205細胞に導入した。このベクターはgreen fluorescent protein

(GFP)を有しており、Cdx遺伝子の発現をGFPの有無で識別できるという利点を持ち、Cdx遺伝子強発現しているColo205細胞をflow cytometryを用いて効率よく回収できる。

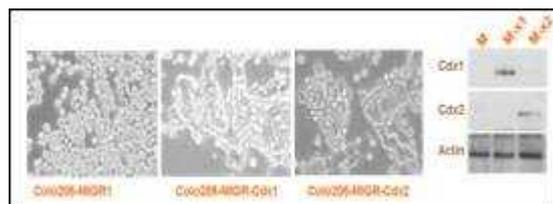
(2) microarrayを用いて、Cdx遺伝子導入によりもたらされた遺伝子レベルの変化を検索し、Western blotならびにReal-Time PCRで発現量を確認する。

(3) Cdxにより誘導された遺伝子のピックアップを行い、reporter assay等によりCdxと候補遺伝子の関係を明らかにする。

(4) E-cadherin-catenin complexの活性化機序の解明のため、構成因子の発現レベルに違いがないことを再確認した上で、各因子のinteractionをimmunoprecipitation等を用いて検討する。

## 4. 研究成果

(1)microarrayの結果をもとに、Cdx遺伝子の導入によりその発現が上昇している細胞接着に關与する遺伝子として、Claudin-2, L1-cadherin, Desmocollin-2, Caveolin-1に着目した。Claudin-2はtight junction構成因子で、Cdx遺伝子によりその発現が誘導されることが既に報告されている。また、L1-cadherinもCdxにより誘導される遺伝子として報告されている。Desmocollin-2は、Desmosome junctionの構成因子で、そのpromoter regionはすでにクローニングされている。Caveolin-1は、Caveolar membraneの構成因子で、Caveolin-1のdownregulationが、E-cadherinのdownregulationをもたらす、細胞接着が妨げられることが報告されている。Western BlotならびにReal-Time PCRでこれら遺伝子の発現量を確認したところ、いずれの遺伝子も、Western blotとReal-Time PCRで発現量が増していた。すなわち、Cdx遺伝子によりClaudin-2, L1-cadherin, Desmocollin-2, Caveolin-1の発現の誘導が、蛋白レベル、mRNAレベルで確認された。





〔雜誌論文〕(計 0 件)

〔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)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

江崎 俊彦 (EZAKI TOSHIHIKO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号: 20255425

### (2) 研究分担者

日比 紀文 (HIBI TOSHIFUMI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号: 50129623

### (3) 連携研究者