

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18415

研究課題名(和文)大腸癌細胞におけるCDX1とCDX2によるNotchシグナルの抑制機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of suppression of Notch signaling by CDX1 and CDX2 in colon cancer cells

研究代表者

堀 一也 (Hori, Kazuya)

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、腸上皮細胞に特異的に発現しているホメオボックス転写因子CDX1とCDX2が、大腸癌細胞において、Notchシグナルのエフェクター因子RBP-Jを介して、直接的にNotchシグナルを制御することを明らかにした。また、CDX1またはCDX2と複合体を形成するタンパク質の一つとして、NAD-dependent deacetylase活性をもつSirtuin1を同定した。さらにその機能解析により、大腸癌の癌化過程において、CDX2とSirtuin1は拮抗的にNotchシグナルの活性を制御している可能性を新たに示唆できた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that CDX1 and CDX2, which are homeobox transcription factors expressed in intestinal epithelial cells, directly regulate Notch signaling via RBP-J, an effector of Notch signaling. In addition, through mass spectrometry analysis of CDX2, we identified a NAD-dependent deacetylase Sirtuin1, which has been reported to regulate the Notch signaling in several cancers. We showed that, in HCT116 cells, CDX2 strongly suppresses the Notch activity, while Sirtuin1 inhibits the suppression of Notch by CDX2. These results suggest that CDX1 and CDX2 at least partially compete Sirtuin1 to regulate the activity of Notch signaling in colon cancer cells.

研究分野：腫瘍学

キーワード：大腸癌 CDX1 CDX2 Notchシグナル

1. 研究開始当初の背景

(1) 代表者らの研究背景: CDX1 と CDX2 は大腸癌悪性化の抑制因子である

腸上皮細胞に特異的に発現しているホメオボックス転写因子 CDX1 と CDX2 (Caudal-related homeobox 1 and 2) は、腸上皮細胞の増殖や分化、生理的機能を制御する。一方で、代表者らはこれまでに、CDX2 が大腸腫瘍形成の抑制因子として働くことを報告してきた (Aoki et al., Nat Genet 2003; Cancer Res 2011 など)、さらにその作用機序の解析から、良性の腸腺腫モデルである *Apc* 変異マウスに *Cdx1* または *Cdx1/Cdx2* 遺伝子変異を導入すると、強い浸潤を示す悪性腫瘍に進展することが分かった。すなわち、「CDX1 と CDX2 が大腸癌悪性化の抑制因子である」ことを発見した。

(2) 代表者らの研究結果: CDX1 と CDX2 は Notch シグナル経路の抑制因子である

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、CDX1 または CDX2 の発現を誘導した大腸癌細胞において、cDNA マイクロアレイ法により遺伝子発現解析を行った。その結果、CDX1 または CDX2 によって発現が低下した遺伝子の一つとして、Notch シグナルの標的遺伝子である HES1 を同定した。さらに、レポーター解析から、CDX1 と CDX2 が Notch シグナル活性を顕著に抑制することも分かった。これらの結果から、大腸癌細胞において、CDX1 と CDX2 は、Notch シグナル経路の負の制御因子として働くと考えられた。そこで、代表者らは、仮説「CDX1 と CDX2 は、Notch シグナル経路を抑制することにより、大腸癌悪性化を阻止している」を想起した。

(3) 国内外の研究: Notch シグナルを標的とした癌治療の可能性が注目されている

Notch シグナルは、ショウジョウバエからヒトまで進化的に保存されたシグナル経路であり、様々な組織の発生や恒常性維持に重要な役割を果たしている。Notch シグナルの異常な活性化は、大腸を含めた複数の臓器の癌化を促進することが知られている (Louvi and Artavanis-Tsakonas, Semin Cell Dev Biol 2012 など)、とくに、大腸癌では、Notch シグナルが癌幹細胞性の維持に働くことや (Lu et al., Cancer Cell 2013; Fre et al., Nature 2005 など) 転移の過程における大腸癌細胞の血管内浸潤を促進することが報告されている (Sonoshita et al., Cancer Cell 2011)、これらの研究結果から、Notch シグナルの活性化

が大腸癌の悪性化を促進することが明らかとなっている。

Notch シグナルが大腸癌を含めた複数の癌化を促進することから、分子標的治療のターゲットとして Notch シグナルの研究が進められている (Takebe et al., Nat Rev Clin Oncol 2011)。しかし、代表的 Notch 阻害薬である -セクレターゼ阻害剤は、腸管障害などの副作用が報告されていることから、長期投与が困難となっている。そこで、癌細胞に特異的かつ効果的に作用する、新たな Notch 阻害薬の開発が期待されている。新規 Notch 阻害薬の開発のための手段として、癌細胞における Notch シグナルの活性制御機構の解明が不可欠であるが、未解明の機序が多く残されている。

2. 研究の目的

Notch シグナルは、大腸癌を含む消化器癌において、癌幹細胞性の維持や悪性化進展に関与することが示唆されており、抗癌剤の標的として注目されている。しかし、Notch シグナルの転写活性化を制御する機構は不明である。また、既存の Notch シグナルの阻害薬は正常細胞にも作用することから、腸管障害などの副作用の発現が問題となっている。そこで本研究課題では、腸管上皮細胞に限局して発現している CDX1 と CDX2 に着目する。CDX1 と CDX2 による Notch シグナル経路の活性制御メカニズムを解明することによって、大腸癌細胞に、より特異的かつ効率的に作用する、分子標的治療のターゲットの同定を目指す。

3. 研究の方法

(1) タンパク質複合体の解析

Flag タグを融合した CDX1 または CDX2 の発現を、Tet-off システムにより誘導する大腸癌細胞株 (DLD1-fCDX1 または DLD1-fCDX2) を用い、CDX1 または CDX2 と RBP-J のタンパク質間相互作用を、免疫沈降法により解析した。

(2) ChIP-seq 解析

上述の DLD1-fCDX1 または DLD1-fCDX2 細胞株を用いて、次世代シーケンサーを使用したクロマチン免疫沈降法 (ChIP-seq 法) による解析を行った。

(3) 網羅的質量分析

DLD1-fCDX1 または DLD1-fCDX2 細胞株を用いて、CDX1 または CDX2 と複合体を形成するタンパク質を、ショットガン質量分析法 (LC-MS/MS) により網羅的に解析した。さらに、得られた因子と、CDX1 または CDX2 のタンパク質間相互作用を、免疫沈降法により解析した。

(4) レポーター解析

大腸癌細胞 HCT116 細胞において、CDX1 または CDX2、Sirtuin1 の発現を Tet システムにより誘導させた。Notch シグナルの活性の変化を調べるために、レポーター-pGa981-6 を用いたルシフェラーゼレポーター解析を行った。

4. 研究成果

(1) 大腸癌細胞において、CDX1 と CDX2 は直接的に Notch シグナルを制御する

Notch シグナルの下流標的遺伝子の転写活性化は、DNA 結合タンパク質である RBP-J を介して起こることが知られている。そこで、ホメオボックス転写因子である CDX1 と CDX2 が、Notch シグナルのエフェクター分子である RBP-J を介した遺伝子発現を制御する可能性を検証した。最初に、Flag-CDX1 または Flag-CDX2 の発現を Tet システムにより誘導する大腸癌細胞株を用いて、CDX1 または CDX2 と RBP-J のタンパク質間相互作用を、共免疫沈降法により解析した。その結果、CDX1 と CDX2 が、RBP-J と複合体を形成することが分かった。したがって、大腸癌細胞において、CDX1 と CDX2 は、直接的に Notch シグナルを制御していると考えられた。

次に、CDX1 と CDX2 による Notch 標的遺伝子の発現量の調節機構を解明するため、上述の Flag-CDX1 または Flag-CDX2 誘導大腸癌細胞株を用いて、次世代シーケンサーを使用したクロマチン免疫沈降法 (ChIP-seq 法) による解析を行った。その結果、Notch 標的遺伝子 (HES1 など) の発現調節に関与すると思われるゲノム領域において、CDX1 または CDX2 が結合する新規のゲノム領域を同定した。同定したゲノム領域は、ChIP-qPCR 法により、内在性の CDX1 または CDX2 が結合することも確認した。これらの結果から、CDX1 と CDX2

は、本研究により同定したゲノム領域を介して、直接的に Notch 標的遺伝子の発現を制御していると考えられた。

(2) Sirtuin1 は、CDX1 と CDX2 による Notch シグナルの抑制制御に拮抗的に働く

CDX1 と CDX2 はホメオボックス転写因子である。既知の転写因子は単独では機能せず、多数の転写因子と複合体を形成し、標的遺伝子の転写を活性化することが報告されている。そこで、CDX1 または CDX2 と複合体を形成するタンパク質を、ショットガン質量分析法 (LC-MS/MS) により網羅的に解析した。その結果、CDX1 または CDX2 と複合体を形成する、複数のタンパク質を同定した。それらの中から Notch シグナルの制御に關与する可能性のある分子として Sirtuin1 を見出した。実際に、CDX2 が Sirtuin1 とタンパク質複合体を形成することを共免疫沈降法により確認した。

Sirtuin1 は、NAD-dependent deacetylase 活性をもち、Notch の転写不活性型の構成因子のひとつであることが知られている。そこで次に、Notch シグナル活性の制御における CDX2 と Sirtuin1 の機能的な相互作用を解析した。この目的のために、大腸癌細胞 HCT116 細胞において、CDX2 または Sirtuin1 の発現を Tet システムにより誘導させ、Notch シグナルの活性をレポーター-pGa981-6 で測定した。その結果、CDX2 の発現を誘導させた細胞では、活性化型 Notch により誘発された Notch シグナルの活性が顕著に抑制された。一方で、CDX2 と Sirtuin1 を同時に発現させた細胞では、CDX2 による Notch シグナル活性の抑制が解除された。

以上の解析から、CDX1 と CDX2 による大腸癌の癌化抑制が Notch シグナル経路の抑制を介していることや、その抑制は RBP-J との相互作用による可能性を示唆できた。さらに、大腸癌の癌化過程において、CDX2 と Sirtuin1 が、Notch シグナル経路の活性制御において拮抗的に相互作用している可能性を新たに示唆できた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Xu T, Park SS, Giaimo BD, Hall D,

Ferrante F, Ho DM, Hori K, Anhezini L, Ertl I, Bartkuhn M, Zhang H, Milon E, Ha K, Conlon KP, Kuick R, Govindarajoo B, Zhang Y, Sun Y, Dou Y, Basrur V, Elenitoba-Johnson KS, Nesvizhskii AI, Ceron J, Lee CY, Borggreffe T, Kovall RA, Rual JF. The CBF1/L3MBTL3 axis promotes the repression of Notch signaling by the histone demethylase KDM1A. EMBO J, 査読有, 2017, 36(21), 3232-3249.
doi: 10.15252/embj.201796525

〔学会発表〕(計 4 件)

Aoki K, Hori K. Suppression of intestinal cancer stemness and malignant progression by homeoproteins CDX1 and CDX2. 日本薬学会北陸支部第 129 回例会 (口頭発表), 金沢, 2017

Aoki K, Hori K. Blocking intestinal cancer stemness and malignant progression by intestine-specific homeoproteins CDX1 and CDX2. 第 3 回北陸エピジェネティクス研究会 (口頭発表), 福井, 2016

Hori K, Nakaya M, Goi T, Yamaguchi A, Iemura S, Natsume T, Taketo MM, Sugai M, Aoki K. Suppression of intestinal cancer stemness and malignant progression by intestine-specific homeoproteins CDX1 and CDX2. 第 39 回日本分子生物学会年会 (ポスター発表), 神奈川, 2016

Aoki K, Nakaya M, Hori K, Okawa K, Tanida I, Kobayashi T, Mimuro H, Sanada T, Sasakawa C, Taketo MM, Sugai M. Enhanced intestinal mucosal barrier function by homeoprotein CDX2 through autophagy activation. 第 39 回日本分子生物学会年会 (ポスター発表), 神奈川, 2016, (優秀ポスター賞 受賞)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-n.med.u-fukui.ac.jp/laboratory/pharmacology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 一也 (HORI, Kazuya)
福井大学・学術研究院医学系部門・助教
研究者番号: 50749059

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし