

機関番号：83901

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390110

研究課題名（和文） Cdx1・2の新規標的遺伝子による腸上皮細胞の分化・癌化の制御

研究課題名（英文） Roles of novel target genes of Cdx1/2 in differentiation and transformation of intestinal epithelial cells.

研究代表者

青木 正博（AOKI MASAHIRO）

愛知県がんセンター（研究所）・分子病態学部・部長

研究者番号：60362464

研究成果の概要（和文）：

短鎖脂肪酸のトランスポーターをコードする *Slc5a8* は生体においても Cdx1・2 による発現制御を受け、*Apc* 変異マウスの大腸腺腫では Cdx2 の発現低下に伴い *Slc5a8* の発現も低下していた。また、*Plekhg1* が CDX1・2 の直接の標的遺伝子であり、そのコードするタンパクは E-cadherin を介した細胞間接着に関与し、Ser611 のリン酸化に依存して 14-3-3 に結合することを示した。

研究成果の概要（英文）：

Expression of the *Slc5a8* gene encoding a short-chain fatty acid transporter was positively regulated by Cdx1/2 *in vivo*, and its level was reduced in the colonic polyps of *Apc* mutant mice, accompanied by decreased expression of Cdx2. *Plekhg1* was shown to be a direct target gene of Cdx1/2. *Plekhg1* was involved in E-cadherin-mediated cell-cell adhesion, and bound to 14-3-3 only when phosphorylated at serine 611.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 5,400,000 | 1,620,000 | 7,020,000 |
| 2009年度 | 4,900,000 | 1,470,000 | 6,370,000 |
| 2010年度 | 4,800,000 | 1,440,000 | 6,240,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 15,100,000 | 4,530,000 | 19,630,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：大腸癌・転写因子・短鎖脂肪酸・GEF

1. 研究開始当初の背景

CDX2 (Caudal-type homeobox gene 2) 及び CDX1 は、ホメオドメイン転写因子であり、消化管の発生、消化管上皮細胞の分化及分化形質の維持に深く関わっていることが分かっていた。また、ヒト大腸癌では CDX1・2 の発現は顕著に低下しており、大腸癌細胞株に強制発現させると細胞増殖を抑制すること、*Cdx2* 変異マウスは腸に過誤腫を形成すること、*Apc* 変異マウスと *Cdx2* のヘテロ接

合変異マウスを交配すると、大腸腺腫の数が増加することから大腸癌の癌抑制遺伝子の候補とされていた。我々は、クロマチン免疫沈降 Chromatin immunoprecipitation (ChIP) によるスクリーニング法を用いて、CDX1 及び CDX2 の新規標的遺伝子の候補として、*SLC5A8* (Solute carrier family 5, member 8) 及び *PLEKHG1* (pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain), member 1) を同定していた。*SLC5A8* のコー

ドするタンパクは、酪酸・プロピオン酸・酢酸などの短鎖脂肪酸を細胞内に取り込む Na⁺ 共役型トランスポーターであり、大腸癌においてその発現が低下しその発現は予後と相関すること、強制発現により大腸癌細胞株の増殖を抑制することから、やはり癌抑制遺伝子の候補として報告されていた。

一方、*PLEKHG1* がコードするタンパクは、そのアミノ酸配列から、Rho/Rac/Cdc42 ファミリーの低分子量 GTP 結合タンパクに対する GEF 活性を持つことが知られる Dbl ファミリーに属すると考えられ、Dbl homology (DH) domain、及び phosphoinositides との結合に関与する Pleckstrin homology (PH) domain を持つが、この分子に関する研究報告は一報も存在しなかった。

2. 研究の目的

本研究計画では、転写因子 CDX1・CDX2 の新規標的遺伝子候補である *SLC5A8* (Solute carrier family 5, member 8) 及び *PLEKHG1* が腸上皮細胞の分化、腸管腫瘍発生において果たす役割を解明し、腸癌の新たな治療法開発の手がかりを見出すことを目指して、以下の二つを具体的な目的とした。

(1) *SLC5A8* の CDX 標的遺伝子としての役割を解明すると共に、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害活性を持つ酪酸 (butyric acid) とそのトランスポーターである *SLC5A8*、その発現を制御する CDX の間の相互作用が大腸上皮細胞の分化、癌化に関与する可能性について検証する。

(2) *PLEKHG1* の CDX 標的遺伝子としての役割を明らかにし、腸上皮細胞における *PLEKHG1* の生理的機能及び癌化への寄与について、タンパク・細胞・個体レベルにおいて解明する。

3. 研究の方法

(1) [¹⁴C]ニコチン酸の Na⁺ 依存的な取り込みは、HCT116 細胞株を 50 μmol/L の [¹⁴C]ニコチン酸を含む Hank's balanced salt solution 中で培養し、Na⁺ 存在下での取り込みから Na⁺ 非存在下 (K⁺ 使用) での取り込みを差し引いて算出した。

(2) *Cdx1*^{-/-} マウス、*Cdx2*^{+/-} マウスの大腸における *Slc5a8* の発現は、ABI PRISM7700 sequence detection system を用いた real time PCR によって計測した。

(3) ChIP スクリーニングで同定されたヒト *PLEKHG1* 遺伝子上流領域を PCR クローニングし、欠失変異を導入して CMV minimal promoter を持った pGL4 ルシフェラーゼレポーターベクターに挿入、HCT116 細胞を用いてレポータージーンアッセイを行った。

(4) ラット正常腸上皮細胞株 IEC6 に tet-on システムを導入して *Cdx1*、*Cdx2* を誘導発現

できる系を構築、*Plekhhg1* の発現変化を real time PCR によって測定した。

(5) レンチウイルス shRNA ベクターを用いて HCT116 細胞で *PLEKHG1* をノックダウン、E-cadherin の発現を蛍光免疫抗体法で調べた。

(6) 3xFlag タグを付加した *PLEKHG1* を 293T 細胞で強制発現させ、Flag 抗体で免疫沈降したものを SDS-PAGE で分離、銀染色により得られたバンドを切り出して質量分析により共沈したタンパクを同定した。

(7) マウス *Plekhhg1* 遺伝子の第 3 エクソンを loxP サイトで挟むようなターゲティングベクターをリコンビニアリング法で構築し、ES 細胞(D3a2)に導入、発生工学会に委託して正常な核型を持つクローンからキメラマウスを作成、その後、C57BL6N との交配により生殖細胞系列への導入を確認した。更に、CAG-cre マウスとの交配によって *Plekhhg1* のヘテロ接合ノックアウトマウスを、flippase 発現マウスとの交配によって *Plekhhg1* の flox アレルを持つマウスをそれぞれ作出し、それらが設計した通りの genotype になっていることを確認した。

4. 研究成果

(1) *SLC5A8*・CDX・短鎖脂肪酸の相互作用
ヒト大腸癌細胞株 HCT116 に CDX1 や CDX2 を強制発現させると *SLC5A8* の発現が上昇するが、そのような細胞では *SLC5A8* の基質の一つである ¹⁴C-ニコチン酸のナトリウム依存性の取り込みが有意に増加することを見出した (図 1)。

また、逆に内在性 *SLC5A8* を高発現する大腸癌細胞株 T84 において CDX1、CDX2 をノックダウンしたところ *SLC5A8* の発現低下に伴って ¹⁴C-ニコチン酸のナトリウム依存性の取り込みは有意に減少した (図 2)。

一方、*SLC5A8* プロモーターに結合する CDX1、CDX2 の量が酪酸投与により顕著に上昇したことから、この *SLC5A8* の発現上昇は、酪酸の HDAC 阻害活性により *SLC5A8* プロモーター領域でヒストンのアセチル化が起こり、CDX1、CDX2 が結合しやすくなったためと考えられた。また、*Cdx1* 変異マウス及び *Cdx2* 変異マウスの大腸における *Slc5a8* の発現を、定量的 RT-PCR 法によって野生型マウスの大腸での発現と比較したところ、両変異マウスでは発現レベルが有意に低下していたことから、*Slc5a8* は生体内においても *Cdx1*、*Cdx2* の標的遺伝子であることが示唆された (図 3)。

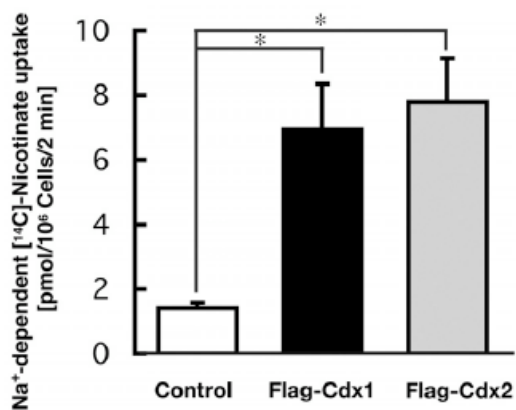


図1 Cdx1、Cdx2の高発現によるNa⁺依存的なニコチン酸の取り込みの変化

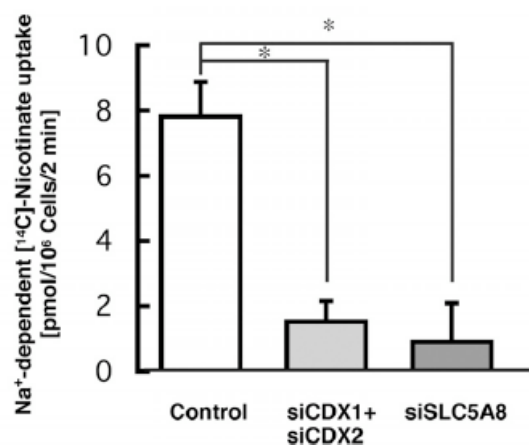


図2 CDX1、CDX2のノックダウンによるNa⁺依存的なニコチン酸の取り込みの変化

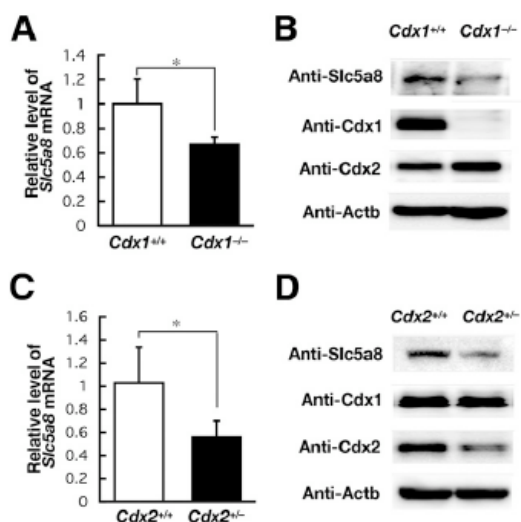


図3 Cdx1変異マウス、Cdx2変異マウスの大腸におけるSlc5a8の発現 (左: qRT-PCR, 右: ウェスタンブロット)

これらの結果から、大腸上皮細胞が酪酸等の短鎖脂肪酸を取り込むと、そのHDAC阻害活性によってCDX1、CDX2の発現が上昇し、その結果としてCDXの標的遺伝子であるSLC5A8の発現が上昇して短鎖脂肪酸の取り込みがさらに増加する、というpositive feedback機構が存在する可能性を示唆された。

また、家族性大腸腺腫症のマウスモデルで腺腫を自然発症するApc^{Δ716}マウス、及び過誤腫を発症するCdx2ヘテロ接合変異マウスの大腸腫瘍におけるSLC5A8の発現をqRT-PCR、Western blot、免疫組織化学により解析したところ、いずれの腫瘍においてもSLC5A8の発現が正常部位に比べて有意に低下していた(図4)。

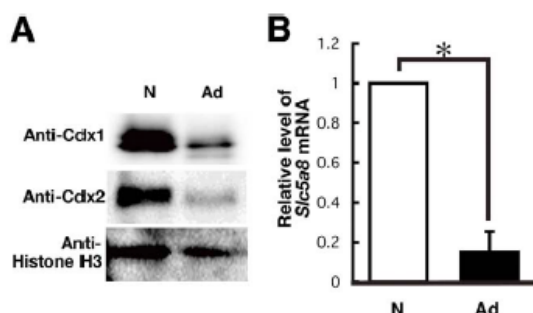


図4 Apc^{Δ716}マウスの大腸ポリープにおけるCdx1、Cdx2とSlc5a8の発現 (左: ウェスタンブロット, 右: qRT-PCR)

この結果から、CDX2の発現低下に伴うSLC5A8の発現低下が大腸の腫瘍発生に寄与する可能性が示唆された。

(2) PLEKHG1の発現及び機能の解析

PLEKHG1がCDX転写因子の直接的標的遺伝子かどうかを明らかにするため、CDX2又はCDX1を強制発現させた大腸癌細胞株を用いてChIP-PCR解析を行ったところ、CDX2、CDX1共に、ヒトPLEKHG1遺伝子上流約30 kbの領域に結合することが分かった(図5)。

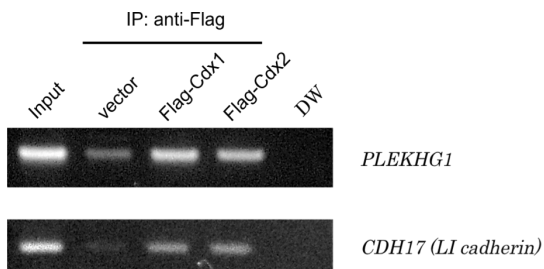


図5 CdxはPLEKHG1上流領域に結合する(ChIP-PCR)

また、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイにより、CDX1、2がこの領域を介してレポーター遺伝子の転写を活性化すること、その活性化には約 300 bp の領域が必要であることが分かった (図 6)。

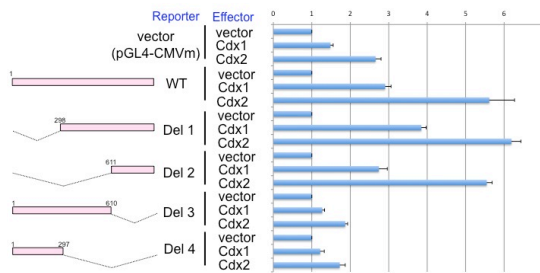


図 6 PLEKHG1 上流領域は Cdx 依存的エンハンサー活性をもつ

さらに、ラットの正常腸上皮由来細胞株 IEC-6 で tet-on システムにより CDX2、CDX1 を誘導的に発現させると、Plekhg1 の発現が誘導され (図 7)、ヒト大腸癌細胞株 DLD-1 で shRNA 発現ベクターを用いて CDX2 をノックダウンしたところ、PLEKHG1 の発現は低下した (図 8)。

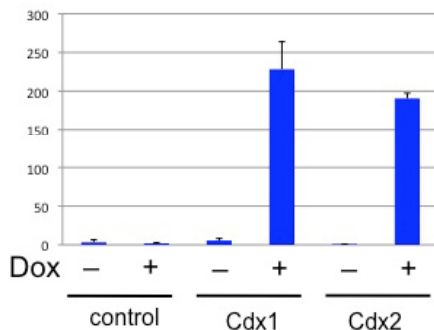


図 7 Cdx1/Cdx2 による PLEKHG1 の発現誘導

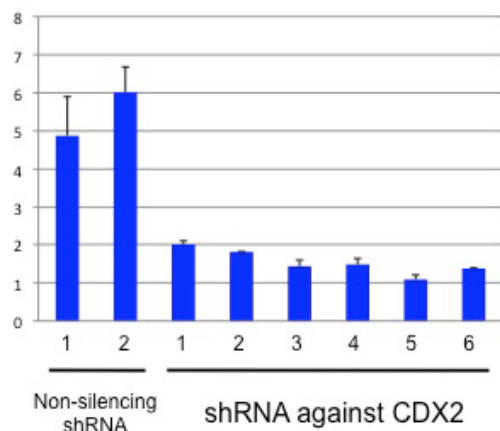


図 8 CDX2 ノックダウンによる PLEKHG1 の発現低下

これらの結果から、PLEKHG1 は CDX 転写因子の直接の標的遺伝子であると結論づけることができた。

PLEKHG1 の機能を解明するため、レンチウイルスベクターを用いて shRNA により HCT116 大腸癌細胞株で PLEKHG1 をノックダウンしたところ、対照細胞と比較して細胞間の接着が疎になっていた。また、蛍光抗体法で E-cadherin の局在を調べたところ、PLEKHG1 をノックダウンした細胞では細胞間に局在する E-cadherin が疎になっていた (図 9)。CDX2、CDX1 は E-cadherin を介して大腸癌細胞の細胞間接着を亢進させることが報告されているが、その機序は不明である。この結果から、CDX による細胞間接着の制御に PLEKHG1 が寄与する可能性が示唆された。

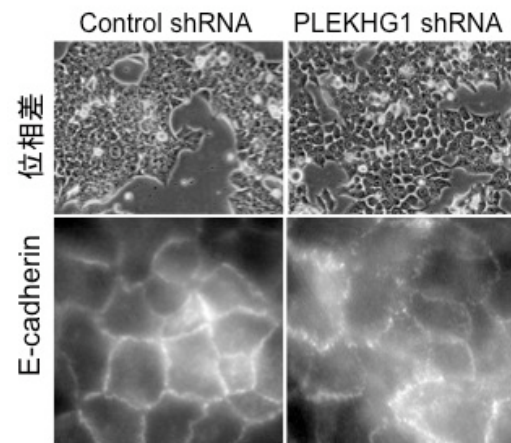


図 9 PLEKHG1 ノックダウンの影響

3xFlag-PLEKHG1 を強制発現させた細胞の抽出液から 3xFlag-PLEKHG1 を免疫沈降し、共沈してくるタンパクを質量分析で解析することにより、PLEKHG1 結合タンパクとして 14-3-3 $\zeta/\delta/\epsilon$ を同定した。これら 14-3-3 と PLEKHG1 との結合を免疫沈降/ウェスタンブロット法で確認し、更に PLEKHG1 に欠失変異、アミノ酸置換を導入することにより、両者の結合が PLEKHG1 の 611 番目のセリン残基のリン酸化に依存することを見出した。

さらに、Plekhg1 の生体内での役割を解明するため、マウス *Plekhg1* 遺伝子の第 3 エクソンを Cre で誘導的に欠失させるようなコンディショナル・ターゲティングベクターをマウス ES 細胞株に導入し、相同組換えを起こしたクローンを複数確立した。キメラマウスを作成し、C57BL6 マウスと交配させ、生殖細胞系列へのトランスミSSIONに成功した。Plekhg1^{fllox/+} マウスと CAG-cre トランスジェニックマウスとの交配によって得られた Plekhg1 ヘテロ接合ノックアウトマウス同士を交配したところ、野生型、ヘテロ接合ノックアウトマウス、ホモ接合ノックアウトマウスがほぼ 1:2:1 の確率で生まれ、Plekhg1 のホモ接合変異が胎生致死ではないことが分かった。

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)

Kitamura T, Fujishita T, Loetscher P, Revesz L, Hashida H, Kizaka-Kndoh S, Aoki M, Taketo, MM: Inactivation of chemokine (C-C motif) receptor 1 (CCR1) suppresses colon cancer liver metastasis by blocking accumulation of immature myeloid cells in a mouse model. Proc Natl Acad Sci USA, 107: 13063-13068, 2010. (査読有)

Deguchi A, Miyoshi H, Kojima Y, Okawa K, Aoki M, Taketo, M.M. LKB1 suppresses p21-activated kinase-1 (PAK1) by phosphorylation of Thr109 in the p21-binding domain. J Biol Chem, 285, 18282-18290, 2010. (査読有)

Kakizaki F, Aoki K, Miyoshi H, Carrasco N, Aoki M, Taketo MM: CDX Transcription Factors Positively Regulate Expression of Solute Carrier Family 5, Member 8 in the Colonic Epithelium. Gastroenterology, 138: 627-635, 2010. (査読有)

Arimura S, Matsunaga A, Kitamura T, Aoki K, Aoki M, Taketo MM: Reduced Level of Smoothened Suppresses Intestinal Tumorigenesis by Down-Regulation of Wnt Signaling. Gastroenterology, 137: 629-638, 2009. (査読有)

Miyoshi H, Deguchi A, Nakau M, Kojima Y, Mori A, Oshima M, Aoki M, Taketo MM: Hepatocellular carcinoma development induced by conditional beta-catenin activation in Lkb1 mice. Cancer Sci, 100: 2046-2053, 2009. (査読有)

Kitamura T, Biyajima K, Aoki M, Oshima M, Taketo MM: Matrix metalloproteinase 7 is required for tumor formation, but dispensable for invasion and fibrosis in SMAD4-deficient intestinal adenocarcinomas. Lab Invest, 89: 98-105, 2009. (査読有)

Fujishita T, Aoki K, Lane HA, Aoki M, Taketo MM: Inhibition of the mTORC1 pathway suppresses intestinal polyp formation and reduces mortality in ApcDelta716 mice. Proc Natl Acad Sci USA, 105: 13544-13559, 2008. (査読有)

Oguma K, Oshima H, Aoki M, Uchio R, Naka K, Nakamura S, Hirao A., Saya H, Taketo MM, Oshima M: Activated macrophages promote Wnt signalling through tumour necrosis factor-alpha in gastric tumour cells. Embo J, 27: 1671-1681, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 11 件)
藤下晃章、JNK signaling promotes intestinal tumorigenesis through mTORC1 pathway activation in ApcΔ716 mice. BMB2010、平成 22 年 12 月 8 日、神戸ポートアイランド (神戸)

園下将大、Critical roles of Notch signaling in colon cancer metastasis. BMB2010、平成 22 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド (神戸)

出口敦子、LKB1 は PAK1 の p21 結合ドメイン内の Thr109 をリン酸化することによりそのキナーゼ活性を抑制する、第 69 回日本癌学会学術総会、平成 22 年 9 月 23 日、大阪国際会議場 (大阪)

柿崎文彦、転写因子 CDX は大腸上皮において SLC5A8 遺伝子の発現を正に制御する、第 69 回日本癌学会学術総会、平成 22 年 9 月 23 日、大阪国際会議場 (大阪)

藤下晃章、JNK シグナルは mTORC1 経路活性化を介して Apc 変異マウスにおける腸管腫瘍形成を促進する、第 69 回日本癌学会学術総会、平成 22 年 9 月 22 日、大阪国際会議場 (大阪)

青木正博、消化管腫瘍形成における Smoothened 及び mTORC1 の役割、第 68 回日本癌学会学術総会、平成 21 年 10 月 2 日、パシフィコ横浜 (横浜)

有村純暢、ヘッジホッグ経路シグナル伝達分子 Smoothened による Wnt シグナル伝達経路を介した腸管腫瘍形成の促進、日本薬学会第 129 年会、平成 21 年 3 月 28 日、京都国際会議場 (京都)

柿崎文彦、転写因子 CDX は癌抑制遺伝子の候補 solute carrier family 5, member 8 (SLC5A8) の発現を制御する、第 29 回日本分子生物学会年会、平成 20 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド (神戸)

有村純暢、ヘッジホッグ経路シグナル伝達分子 Smoothened による Wnt シグナル伝達経路を介した腸管腫瘍形成の促進、第 67 回日本癌学会学術総会、平成 20 年 10 月 28 日、名古屋国際会議場 (名古屋)

藤下晃章、mTOR 経路の活性化は Apc マウスの腫瘍形成を促進する、第 67 回 日本癌学会 学術総会、平成 20 年 10 月 28 日、名古屋国際会議場（名古屋）

青木正博、Roles of Smoothened (Smo), the major signal transducer of the hedgehog pathway, in the development of intestinal tumors. 、2008 American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting、平成 20 年 4 月 15 日、San Diego, CA (USA)

〔図書〕（計 1 件）

青木正博、羊土社、マウス・ラット疾患モデル活用ハンドブック、2010、42-58

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 正博 (AOKI MASAHIRO)

愛知県がんセンター（研究所）・分子病態
学部・部長

研究者番号：60362464

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：