

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 23 年 12 月 31 日現在

機関番号: 14301

研究種目: 若手研究(B)

研究期間: 2010～2011

課題番号: 22790380

研究課題名(和文) CDX2による細胞増殖抑制の分子機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanisms by which CDX2 suppresses colon cancer cell proliferation

研究代表者 青木 耕史(AOKI KOJI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号: 40402862

研究成果の概要(和文): CDX2は、成体では腸管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である。これまでの解析から、CDX2が大腸の腫瘍形成を抑制することが分かった。本研究課題では、CDX2がホメオボックスドメインを有する転写因子である一方で、転写標的遺伝子を介さない機能により細胞の増殖を抑制することを見出した。さらに、その細胞増殖の抑制が細胞周期抑制因子 p27 の発現の上昇を介していることを見出した。また、CDX2複合体に結合する蛋白質の質量分析の解析から、CDX2がオートファジーの必須酵素 ATG7 に結合してオートファジーを活性化することを発見した。さらに、CDX2がオートファジーの活性化を介して特定の細胞死を誘導することが分かった。これらの結果は、CDX2がオートファジーの活性化を介して大腸の腫瘍形成を抑制していることを示唆している。

研究成果の概要(英文): CDX2 is a homeobox transcription factor that is expressed specifically in the intestinal epithelial cells. We have previously shown that CDX2 suppresses colonic tumorigenesis, using a knockout mouse model. In this study, we have found that CDX2 suppresses proliferation of colon cancer cells through its non-transcriptional function, whereas it acts as a transcription factor. The block of cell proliferation caused by CDX2 is mediated partially through increased level of p27 protein, a CDK inhibitor. In addition, we have found ubiquitin E1-like enzyme ATG7 as a protein interacting with CDX2, and that CDX2 stimulates autophagy. Interestingly, CDX2 induces a kind of cell death through autophagy. These results have suggested that CDX2 suppresses colonic tumorigenesis through ATG7-mediated stimulation of autophagy.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 基礎医学・医化学一般

キーワード: CDX2, 細胞増殖、大腸癌、癌抑制遺伝子、転写

1. 研究開始当初の背景

CDX2は、成体では腸管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である。

CDX2を欠損させると、腸管上皮細胞の発生と分化がほぼ完全に抑制されることから、

CDX2が腸管上皮細胞の発生と分化に必須であることが分かっていた。また、成体においても、腸管上皮細胞の増殖や生理的機能に重要な働きをされると考えられていた。研究開始当初までの解析により、CDX2の転写標的遺伝

子として、消化酵素（スクラーゼやガラクトースなど）やトランスポーター（HEPH など）などが同定されていた。CDX2 は、これらの転写標的遺伝子の発現調節を介して、腸管上皮細胞の生理的機能に寄与していると考えられていた。

興味深いことに、90%以上の大腸癌標本において、CDX2 の発現が低下していることが報告されていたことから、CDX2 が大腸癌抑制因子として働く可能性が示唆されていた。

そこで、CDX2 の大腸がんの発症における役割を検討するために、次の実験を行った。家族性大腸腺腫症のモデルである *Apc*^{Δ716} 欠損マウス (*Apc* マウス) に *Cdx2* 遺伝子変異を導入し、*Apc/Cdx2* 複合変異マウス (*Apc/Cdx2* マウス) を作出した。 *Apc* マウスに比べて *Apc/Cdx2* マウスは、6 倍数の大腸ポリープを形成した。これらの結果により、CDX2 が大腸がん抑制因子として働くことが証明された。我々は、その機序として、*Cdx2* 遺伝子の変異により、大腸がん細胞の細胞周期の進行が加速し、染色体異常が誘導されることを見出した。しかし、腸管上皮細胞や大腸癌細胞の細胞周期を CDX2 が制御する分子機序は、分かっていなかった。

2. 研究の目的 *

本研究課題では、大腸がん抑制遺伝子 CDX2 による腸管上皮細胞の大腸がん細胞の増殖や生存の抑制機序の解明を目的にした。

まず、CDX2 の転写機能の重要性を調べた。この目的のために、CDX2 の DNA 結合領域であるホメオドメインに点変異を導入して、転写活性を欠損した変異型 CDX2 を作成した。作成した変異型 CDX2 を用いて解析したところ、転写活性欠損型の CDX2 も大腸癌細胞の増殖を抑制することが分かった。これらの結果は、CDX2 が転写因子である一方で、転写活性とは別の機能(非転写活性)を有することを示している。加えて、その非転写活性を介して大腸がん細胞の増殖と生存を負に制御することを示している。そこで本研究課題では、CDX2 の非転写機能を解析することにより、次の項目の解明を目指した。

(1) CDX2 が直接に相互作用する結合標的分子の同定。

(2) CDX2 が細胞増殖を抑制する分子機序の解明。

(3) CDX2 が細胞死を誘導する分子機序の解明。

3. 研究の方法

CDX2 の非転写活性によるがん抑制機能を解明するために、CDX2 複合体に結合する蛋白質を同定し、その蛋白質と CDX2 との相互作用の機能的な意義を次の手順により解析した。

(1) CDX2 の発現を誘導できる細胞の作成:
CDX2 の機能を詳細に解析することを目的として、doxycycline 依存的に CDX2 の発現を調節できる細胞 (Tet-inducible 細胞) を作成する。

方法: CDX2 が腸管上皮細胞に特異的に発現しているため、大腸がん細胞株 DLD-1 と LS174T を用いる。まず、これらの細胞株を親細胞として tTA 発現する安定細胞株を作成する (Tet 細胞)。次にこの Tet 細胞に、tet-反応性配列の下流に CDX2 の cDNA を組み込んだプラスミッドベクターを導入して、CDX2 の発現を誘導できる安定細胞株 (Tet-flagCDX2) を作成する。また、CDX2 の複合体の抽出を特異的で効率的に行うために、CDX2 タンパク質の N 末端に flag 標識を融合する。

(2) 転写活性欠損の変異型 CDX2 の作成:
CDX2 の転写活性に依存しない機能 (非転写活性) を解析するために、CDX2 の DNA 結合能を欠損した変異型 CDX2 を作成する。

変異型 CDX2 の作成方法: CDX2 は、ホメオボックスドメインを介して、DNA に結合することが分かっている。そこで、ホメオボックスドメインの DNA 結合能に必須であることがわかっているアミノ酸を、変異型のアミノ酸に置換する。CDX2 のアミノ酸 187 番目 (ホメオボックスドメイン中、5 番目) のアルギニンアラニンに置換、273 番目 (ホメオボックスドメイン中、53 番目) のアルギニンをアラニンまたはヒスチジンに置換した変異型 CDX2 を作成する。これらの変異型 CDX2 の DNA 結合能が欠損していることは、クロマチン免疫沈降法により確認する。さらに、これらの変異型 CDX2 の発現を誘導する DLD-1-Tet-変

異型 CDX2 細胞を作成する。

(3) CDX2 の発現誘導による細胞増殖と細胞死への影響：CDX2 の発現を誘導して、細胞の増殖と生存への影響を調べる。

方法：CDX2 の発現を誘導してから、1-6 日目において、細胞数を調べる。また、BrdU を用いてフローサイトメトリーにより細胞周期の分布と細胞死を解析する。

(4) CDX2 複合体結合因子の解析：CDX2 に結合するタンパク分子を同定する。

方法（免疫沈降法と質量分析法）：
DLD-1-Tet-CDX2 細胞において、CDX2 の発現を誘導してから 20 時間後、細胞をタンパク抽出溶液に溶解してから、抗 flag 抗体を用いて、flag-CDX2 複合体を抽出する。抽出した CDX2 複合体を SDS-PAGE により電気泳動後、銀染色することにより CDX2 に結合したタンパク質を、可視化する。銀染色により検出された CDX2 結合分子を、質量分析法により解析する（大川克也先生と共同研究、協和発酵キリン）。

(5) 質量分析により同定した分子と CDX2 と結合を、免疫沈降法により確かめる。さらに CDX2 とその結合因子との結合の機能的な意義を検討する。

CDX2 による autophagy 制御の解析：
Tet-CDX2 細胞を用いて、CDX2 が autophagy の活性を制御するかを調べる。この目的のために CDX2 を誘導したときの autophagy の活性のレベルを、autophagy 活性の指標の一つである LC3 を用いて調べる。さらに、autophagy の抑制試薬である 3-methyladenine を用いることにより、CDX2 の発現によって生じる細胞増殖の抑制や細胞生存の抑制が減弱されるかを検討する。

4. 研究成果

(1) まず、CDX2 の転写活性に依存しない機能による大腸癌細胞の増殖の抑制の結果について、実験結果をまとめて論文として報告した (Aoki K., et al., *Cancer Research*, Vol. 71(2), 593-602, 2011)。

上記の論文では、CDX2 が転写活性に依存せ

ずに大腸癌細胞の増殖を抑制することを報告した。また、その一つの機序として細胞周期抑制因子 p27 の発現が CDX2 により上昇することを示した。p27 の発現の上昇は p27 蛋白質の安定化によることを示すと同時に、p27 の発現の抑制により CDX2 による細胞周期の停止が減弱することを示した。さらにヒト大腸癌組織でも CDX2 と p27 蛋白質の発現に正の相関性があることが見出した。

(2) 一方で、上記の結果-(1)からは、CDX2 による細胞周期の停止の分子機序が解明できなかった。そこで、CDX2 の複合体を質量分析法により解析した。その結果、CDX2 の結合分子の一つに ATG7 を発見した。ATG7 はオートファジーに必須のユビキチン E1 様酵素である。オートファジーは細胞内の小器官、タンパク質、脂質などを分解する重要な装置である。近年、オートファジーは様々な生理的機能に重要な役割を果たすことが注目されている。ATG7 はオートファジーの本体であるオートファゴソームの形成に必要な分子の合成を担っている。そこで、CDX2 によるオートファジーの制御の可能性についてさらに解析を進めた。

大腸癌細胞株で CDX2 を発現するとオートファジーのマーカーである LC3B の二型が増加するが分かった。また、オートファジーの特異的基質である p62 の量が減少することも分かった。これらの結果は、CDX2 がオートファジーを活性化していることを示している。さらに、ATG7 の発現を shRNA を用いて抑制すると、CDX2 によるオートファジーの活性化が減弱することが分かった。これらの結果は、CDX2 が ATG7 に結合することでオートファジーを活性化することを示唆している。

そこで、CDX2 による細胞死の誘導におけるオートファジーの役割を調べた。その結果、CDX2 により誘導されるある種の細胞死がオートファジーの抑制剤である 3-methyladenine により減弱することが分かった。このことは、CDX2 がオートファジーの活性化を介して細胞の生存を抑制していることを示唆している。

そこで、CDX2 による ATG7 の活性化の制御機序の解析を進めている。また、CDX2 がオートファジーの活性化を介して制御している細胞内機能の探索を行うことで、CDX2 による

細胞増殖の停止と細胞死の誘導の分子機序の解明を目指している。

研究者番号：40402862

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4件)

(1) Aoki K*, Sugai M*, Osato M, Nambu Y, Ito K, Taketo MM and Shimizu A.

Runx3 is required for full activation of regulatory T cells to prevent colitis-associated tumor formation.

Journal of Immunology, Vol. 186(11), 6515-20, 2011. (査読有り)

*These authors contributed equally to this work.

(2) Sonoshita M, Aoki M, Fuwa H, Aoki K, Hosogi H, Sakai Y, Hashida H, Takabayashi A, Sasaki M, Robine S, Itoh K, Yoshioka K, Kakizaki F, Kitamura T, Oshima M, and Taketo MM.

Suppression of colon cancer metastasis by Aes through inhibition of Notch signaling.

Cancer Cell, Vol. 19(1), 125-37, 2011.

(査読有り)

(3) Aoki K, Kakizaki F, Sakashita H, Manabe T, Aoki M, and Taketo MM.

Suppression of colonic polyposis by homeoprotein CDX2 through its nontranscriptional function that stabilizes p27^{Kip1}.

Cancer Research, Vol. 71(2), 593-602, 2011. (査読有り)

(4) Kakizaki F, Aoki K, Miyoshi H, Carrasco N, Aoki M, and Taketo MM.

CDX transcription factors positively regulate expression of solute carrier family 5, member 8 in the colonic epithelium.

Gastroenterology, Vol. 138(2), 627-35, 2010. (査読有り)

6. 研究組織

(1)研究代表者 青木 耕史 (AOKI KOJI)
京都大学・医学研究科・助教