

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2016

課題番号：24680091

研究課題名(和文) ホメオボックス蛋白質CDX2による大腸癌細胞の増殖と生存の抑制機序の解析

研究課題名(英文) Block of proliferation and survival of colon cancer cells by intestine-specific homeoprotein CDX2

研究代表者

青木 耕史 (Aoki, Koji)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：40402862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、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CDX2が、DNA結合領域であるホメオドメインを介して、オートファジーの必須酵素であるATG7と直接に結合して、オートファジーを活性化することや、オートファジー活性化を介して大腸癌細胞の増殖と生存を抑制することが分かった。その機序として、CDX2によるオートファジーの活性化により、活性酸素(ROS)を産生することにより細胞障害を発生することが分かった。とくに、大腸癌細胞が浮遊したときに、これらの機構が強く働くことから、CDX2が大腸癌細胞の腫瘍の成長過程だけではなく、転移などの悪性化過程を抑制することが分かった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have found that intestine-specific homeoprotein CDX2 bound to ATG7, an essential enzyme for autophagy, directly via its homeodomain and that CDX2 stimulated autophagy in colon cancer cells. We have also found that CDX2 strongly suppressed proliferation and survival of colon cancer cells through autophagy activation. Notably, inhibition of cancer cell proliferation and survival by CDX2 were mediated by increased levels of reactive oxygen species (ROS) caused through autophagy activation. Interestingly, CDX2 increased levels of ROS and suppressed cancer cell survival upon its detachment more strongly than attachment. These results have suggested that CDX2 blocked malignant progression of colon cancer cells including metastasis as well as tumor development.

研究分野：薬理学

キーワード：CDX2 大腸癌 オートファジー ATG7 ROS

### 1. 研究開始当初の背景

(1) CDX2 は、腸管上皮細胞に特異的に発現するホメオボックス転写因子である。また、ヒト大腸癌で CDX2 の発現が低下していることから、大腸癌の抑制因子であることが示唆されていた。

(2) この結果と一致して、代表者ら以前の研究から、CDX2 が大腸の腫瘍形成を抑制することが遺伝子変異マウスを用いた解析などから明らかになっていた。しかし、CDX2 が、大腸癌細胞の細胞周期を抑制することが分かっていたが、その機序が不明であった。そこで、CDX2 による大腸癌細胞の増殖および生存の制御機構の解明を行った。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究課題では、CDX2 による大腸癌細胞の増殖と生存の制御機構の解明を進めることを目的とした。

(2) 大腸癌細胞の増殖や生存を抑制する CDX2 の機能における、CDX2 の転写に依存しない機能の役割を明らかにすることにした。この目的のために、とくに CDX2 の結合タンパク質を網羅的に明らかにすることにした。

(3) 大腸癌細胞の増殖や生存を抑制する CDX2 の機能における、CDX2 の転写機能の役割を明らかにすることにした。とくに、cDNA マイクロアレイ法を用いて、CDX2 により発現を制御される遺伝子群を網羅的に解析することにした。

### 3. 研究の方法

(1) 代表的なヒト大腸癌細胞株である DLD1 細胞を用いて、flag タグを融合した CDX2 を発現する Tet-Off 細胞を作成した。この細胞を用いて、flag-CDX2 を免疫沈降後、CDX2 結合分子を電気泳動し、銀染色を行った後に、特異的な分子を質量分析法により解析した。

(2) flag-CDX2 の発現を誘導できる Tet-Off 細胞で、CDX2 の発現を誘導後に、RNA を回収して、cDNA を合成し、cDNA マイクロアレイ法によりその発現を解析した。

(3) flag-CDX2 の発現を誘導できる Tet-Off 細胞において CDX2 の発現を誘導後に、異なる複数の ROS プローブで細胞を染色して、フローサイトメトリーにより解析を行った。

(4) cDNA マイクロアレイ解析により抽出した候補遺伝子の発現は、同様の細胞などで real-time PCR を用いて確認した。

(5) ATG7 と CDX2 の直接の結合を解析するために、大腸菌を用いてそれぞれの

recombinant タンパク質を合成後、分離精製して、GST-pull down 解析などを行った。

### 4. 研究成果

(1) CDX2 の結合タンパク質として ATG7 を同定した。

flag 融合の CDX2 を大腸癌細胞株 DLD1 で発現誘導して、anti-flag M2 抗体により免疫沈降し、3xflag peptide を用いて、flag-CDX2 複合体を溶出した。その溶出液を SDS-PAGE により電気泳動して、特異的と思われる分子を質量分析法により解析した。その結果、約 70 キロダルトン付近の分子として ATG7 を同定した。実際に、免疫沈降した複合体を Western blotting により解析したところ、CDX2 の複合体に ATG7 が含まれていることが確認できた。

さらに、内在の CDX2 と内在性の ATG7 の結合についても検出することができた。重要なこととして、CDX2 は DNA 結合タンパク質であるが、ATG7 との結合は細胞質でより顕著に検出された。

そこで、次に、CDX2 のどのタンパク質領域が ATG7 との結合に関与しているかを解析するために、CDX2 の deletion 変異体を作成して解析を行った。興味深いことに、CDX2 は、ホメオドメインを介して、ATG7 と結合していることが分かった。

また、CDX2 と ATG7 の結合が直接かどうかを解析するために、それぞれの recombinant タンパク質を大腸菌で作成して、GST-pull down 解析を行った。その結果、CDX2 と ATG7 の結合が直接であることも分かった。

(2) CDX2 はオートファジーを活性化する。

CDX2 が ATG7 に結合することから、CDX2 によるオートファジーの活性への影響を解析した。なぜならば、ATG7 はオートファジーの必須酵素であるためである。その結果、CDX2 の過剰発現は、オートファジーの活性を顕著に上昇することが、大腸癌細胞株の過剰発現系で確認できた。一方で、CDX2 のノックダウンにより、オートファジーの活性が低下することも分かった。これらの結果と一致して、Cdx1 と Cdx2 の複合変異マウスの腸上皮細胞由来のオルガノイド培養で解析を行ったところ、Cdx の機能が低下すると、オートファジーの活性化が低下することが分かった。これらの結果から、Cdx2 は、ATG7 との結合を介して、オートファジーの活性を上昇することが分かった。

また、CDX2 のホメオドメインのアミノ酸を置換して、DNA 結合能を描いた CDX を作成して、同様の解析を行った。その結果、CDNA 結合能および転写活性化能を欠損した CDX2 によっても、大腸癌細胞株の増殖や生存が抑制されることが分かった。

(3) CDX2 はオートファジーの活性化を介し

#### て大腸癌細胞の増殖や生存を抑制する。

そこで、つぎに CDX2 誘導時のオートファジーの役割について解析を進めた。DLD1-TetOff 細胞にて、ATG7 の発現を shRNA を用いてノックダウンした細胞と、ATG7 の機能を抑制する dominant-negative 型の ATG7 を発現する細胞株を作成した。これらの細胞で、CDX2 の発現を誘導して解析を行った。その結果、CDX2 の発現を誘導しても、ATG7 の発現をノックダウンしていると、細胞の増殖の抑制や生存の抑制が生じなかった。同様に、dominant-negative 型の ATG7 を発現した細胞でも、CDX2 の発現を誘導しても、大腸癌細胞の増殖や生存の抑制が促されなかった。これらの結果は、CDX2 による大腸癌細胞の増殖や生存の抑制が、オートファジーの活性化を介していることを示している。

#### (4) CDX2 は ROS の産生を促す。

CDX2 がオートファジーの活性化を介して、大腸癌細胞の増殖や生存を抑制する機序の解析を進めた。フローサイトメトリーを用いた解析の結果、CDX2 の発現の誘導により、ROS が増加することが分かった。また、DNA 結合能を欠いた CDX2 によっても同様の結果が得られた。一方で、オートファジーの抑制薬を加えると、CDX2 誘導時の ROS レベルの上昇が解除された。これらの結果から、CDX2 がオートファジーの活性化を介して、ROS レベルの上昇を促すことが分かった。

#### (5) CDX2 は浮遊した大腸癌細胞の増殖を顕著に抑制する。

近年の研究から、浮遊した癌細胞では、細胞内代謝経路に変化があり、とくに ROS のレベルに変化があることが分かっている。そこで、まず、大腸癌細胞株で、CDX2 の発現を誘導してから、細胞を浮遊させた。その結果、興味深いことに、CDX2 の発現を誘導すると、顕著に細胞の生存の抑制が促されて、細胞死が促進することが分かった。さらに、浮遊した細胞で、オートファジーが活性化されることや、ROS レベルが上昇することが分かった。そこで、これらの細胞をオートファジー抑制薬である 3MA で処理した。その結果、CDX2 の発現誘導によって生じる細胞死の誘導が抑制されることが分かった。これらの結果から、CDX2 は、癌細胞の悪性化の一過程である転移などを、オートファジーの活性を介して抑制することが分かった。すなわち、CDX2 の発現低下は、大腸癌細胞の転移を促進すると考えられる。

#### (6) CDX2 は ROS の産生を促す複数の遺伝子の発現を抑制する。

cDNA マイクロアレイ解析から、CDX2 の発現誘導時に活性酸素量を低下させる遺伝子群の発現が抑制されることが分かった。すなわち、この結果から、CDX2 はオートファジーの活性化を介した経路により活性酸素の発生

を促し、遺伝子発現制御を介して、活性酸素の発生を抑制する遺伝子の発現レベルを低下させることで、発生する活性酸素量を増加させていると思われる。

#### 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3件)

1. Hatano Y, Semi K, Hashimoto K, Lee MS, Hirata A, Tomita H, Kuno T, Takamatsu M, Aoki K, Taketo MM, Kim YJ, Hara A, Yamada Y Reducing DNA methylation suppresses colon carcinogenesis by inducing tumor cell differentiation. *Carcinogenesis*, Vol. 36(7), 719-729 2015 doi: 10.1093/carcin/bgv060. 査読有

2. Jang KJ, Mano H, Aoki K, Hayashi T, Muto A, Nambu Y, Takahashi K, Itoh K, Taketani S, Nutt SL, Igarashi K, Shimizu A, Sugai M. Mitochondrial function provides instructive signals for activation-induced B-cell fates. *Nature Communications*, Vol. 10, 6750 2015 doi: 10.1038/ncomms7750. 査読有

3. Nanbu Y, Hayashi T, Jang KJ, Aoki K, Mano H, Nakano K, Osato M, Takahashi K, Itoh K, Teramukai S, Komori T, Fujita J, Ito Y, Shimizu A, Sugai M. In situ differentiation of CD8 cells from CD4 T cells in peripheral lymphoid tissues. *Scientific Reports*, Vol. 2, 642 2012 査読有

[学会発表](計8件)

1. Nakaya M and Aoki K: Enhanced intestinal mucosal barrier function by homeoprotein CDX2 through autophagy activation 第45回日本免疫学会(ポスター発表)2016年12月5-7日沖縄コンベンションセンター

2. Aoki K., (1/12) et al., Enhanced intestinal mucosal barrier function by homeoprotein CDX2 through autophagy activation 第39回日本分子生物学会(ポスター発表)2016年11月30日-12月2日パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

3. Hori K and Aoki K (9/9) et al.: 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(ポスター発表)2016年11月30日-12月2日パシフィコ

横浜（神奈川県横浜市）

4. Aoki K and Hori K: Blocking intestinal cancer stemness and malignant progression by intestine-specific homeoproteins CDX1 and CDX2 北陸エピジェネティクス（口頭発表）2016年11月21-22日 AOSSA（福井県福井市）

5. Aoki K: Suppression of intestinal cancer stemness and malignant progression by intestine-specific homeoproteins CDX1 and CDX2 第75回日本癌学会学術総会（口頭発表）2016年10月6-8日パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

6. Aoki K, Hori K, Goi T, Yamaguchi A, Taketo MM and Sugai M. Suppression of intestinal cancer stemness and malignant progression by intestine-specific homeoproteins CDX1 and CDX2 日本癌学会シンポジウム・癌幹細胞・微小環境・分子標的 2015年1月21-22日石川県立音楽堂交流ホール（石川県金沢市）（ポスター発表）

7. Aoki K, Iemura S, Okawa K, Tanida I, Kobayashi T, Mimuro H, Takahito S, Sasakawa C, Natume T, Taketo MM and Sugai M. Roles of intestine-specific homeoprotein CDX2 in the intestinal epithelial barrier 日本分子生物学会 2014年11月25-27日パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）（ポスター発表）

8. Aoki K, Iemura S, Okawa K, Tanida I, Kobayashi T, Mimuro H, Takahito S, Sasakawa C, Natsume T, Sugai M, Taketo MM. Roles of intestine-specific homeoprotein CDX2 in the intestinal epithelial barrier. ST-CREST International Symposium, Frontiers in Immunology and Inflammation: From Molecules to Disease 2013-02-13.（東京）（ポスター発表）

〔図書〕（計1件）

1. Aoki K\* and Sugai M. Roles of the epithelial autophagy in the intestinal mucosal barrier. Springer Press (Chronic inflammation: Elucidation and Control of the mechanisms). 2016

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：A  
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1件）

1. 名称：ATG7 変異体を用いたオートジファ  
ーの抑制方法  
発明者：青木耕史 谷田以誠  
権利者：青木耕史 谷田以誠  
種類：特許  
番号：6052510  
取得年月日：2016年12月9日  
国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
青木耕史 (Aoki, Koji)  
福井大学・学術研究院医学系部門・教授  
研究者番号：40402862

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし