

大腸癌細胞の幹細胞性の維持におけるホメオボックス蛋白質 CDX1/CDX2 の役割の解明

研究代表者： 青木 耕史（医学部・教授）

概要	
	最近の我々の解析から、腸管上皮細胞の恒常性や分化の維持に不可欠のホメオボックス蛋白質 CDX1/CDX2 が大腸癌悪性を抑制することが分かった。その機序を解明するために、ヒト大腸癌細胞株を用いた Tet 誘導システムを用いて、CDX1/CDX2 により変動する遺伝子発現を解析した。その結果、CDX1/CDX2 が大腸癌幹細胞性の遺伝子発現プログラムを負に制御していることが分かった。そこで、腸腫瘍の幹細胞性の維持における CDX1/CDX2 の役割を明らかにするために、大腸癌幹細胞の <i>in vitro</i> 培養系の確立を進めた。L-Wnt 細胞に、R-spondin と Noggin を安定的に発現させて調製した培養上清を用いることにより、腸管の正常と腫瘍の粘膜上皮細胞の培養が可能になった。そこで今後、本実験により確立したスフェロイド培養系を用いて、CDX1/CDX2 による大腸癌幹細胞性の制御機構の解明を進める。
関連キーワード	CDX1、CDX2、大腸癌幹細胞性、大腸癌悪性化

研究の背景および目的

研究の背景) 癌は、日本人の死因の第1位となっている。また、近年大腸癌への罹患率が増加しており、大腸癌を標的にした新たな治療薬の開発が重要な課題となっている。そのためには、大腸癌の発症および悪性化進展の機序解明が不可欠である。

これまでの解析から我々は、腸管の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 が大腸腫瘍形成の初期段階を抑制することなどを見出した (Aoki K. *et al.*, *Nat. Genet.* 2003; *Cancer Res.* 2011)。さらに最近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* 両遺伝子変異を導入したところ、強い浸潤を示す悪性腫瘍に変化することを見出した。これらの実験結果から、CDX1/CDX2 は腸腫瘍の初期段階を抑制するだけでなく、腸腫瘍の悪性化進

展を抑制することが分かった。

そこで、我々は、CDX1/CDX2 の機能解明を進めることにより、大腸癌細胞悪性化の機序解明を進める。

研究の目的) CDX1/CDX2 による大腸癌悪性化の抑制機構を解明する。とくに、CDX1/CDX2 による大腸癌の幹細胞性の制御機構を解明するために、次の実験を進める。
1) ヒト大腸癌細胞株を用いて CDX1 または CDX2 の発現を制御できるテット誘導性細胞を樹立して、CDX1 または、CDX2 による遺伝子発現プログラムへの影響を解析する。
2) スフェロイド培養系を確立することにより、*Apc/Cdx1/Cdx2* 伝子変異マウスの腸管に形成された腫瘍から腸腫瘍の幹細胞を培養し、CDX1/CDX2 の幹細胞性の制御における役割とその機構を解明する。

研究の内容および成果

研究結果 1) CDX1/CDX2 による大腸癌の幹細胞性の抑制機構を解明するために、ヒト大腸癌細胞株 DLD-1 と LS174T 細胞を用いて、

テット誘導システムにより、CDX1 または CDX2 の発現を制御できる誘導性細胞を樹立した。CDX1 または、CDX2 の発現を誘導して

から12時間と24時間後にRNAを抽出して、遺伝子発現プロファイルをcDNAマイクロアレイ法を用いて解析した。その結果、ID遺伝子ファミリーに属すID1とID3の発現が顕著に減少することが分かった(図1 and data not shown)。近年の研究から、ID1とID3が大腸癌の幹細胞性の維持に主要な役割を担うことが報告されている(Cancer Cell 2012)。これらの結果から、CDX1/CDX2が大腸癌細胞の幹細胞性を抑制していると想定した。この仮説を検証するために、さらに大腸癌の幹細胞性のマーカー遺伝子として確立しているLGR5遺伝子やASCL2遺伝子の発現量をqPCRにより解析した。その結果、これらの大腸癌幹細胞のマーカー遺伝子を含む、複数の癌幹細胞のマーカー遺伝子の発現をCDX1/CDX2が顕著に抑制していることが分かった(図2 and data not shown)。これらの実験結果ら、CDX1/CDX2は、大腸癌細胞の幹細胞性を遺伝子発現制御を介して、負に制御していることが示唆された。現在、CDX1/CDX2の直接の標的遺伝子をChIP-seqにより解析を進めている。今後、これらの実験結果を解析することにより、CDX1/CDX2による大腸癌幹細胞性の遺伝子発現プログラムの制御機序を解明する。

研究結果 2) 腸管上皮細胞のスフェロイド培養系の確立。
Apc 変異マウスや *Apc/Cdx1/Cdx2* 複合変異マウスの腫瘍細胞の幹細胞性を比較するために、スフェロイド培養系の確立を進めた。L-Wnt細胞に、R-spondinとNogginを安定的に発現させた。その培養上清を用いて、conditioned培養液を作成した。また、腸管から単離した細胞(腫瘍細胞)を酵素処理により単独の細胞まで分離して培養を試

みた。その結果、これまで培養が困難であった腸上皮細胞のスフェロイド培養系が確立できた。今後、確立したスフェロイド培養系を用いて腸腫瘍細胞の幹細胞性の制御におけるCDX1とCDX2の役割の解明を進める。

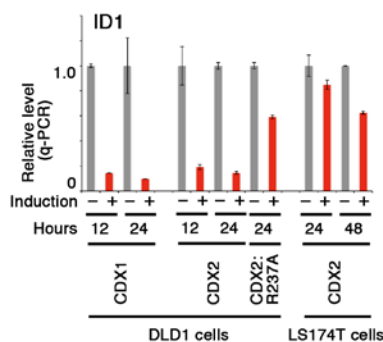


図1. CDX1/CDX2によるID1遺伝子発現の抑制

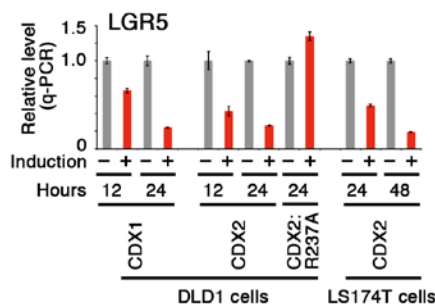


図2. CDX1/CDX2によるLGR5遺伝子発現の抑制

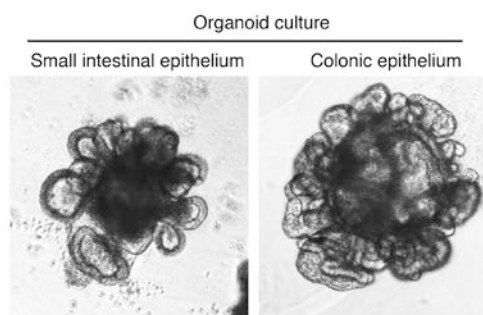


図3. 腸管細胞のSpheroid培養

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

Hori K and Aoki K (corresponding au.), et al.,
 Suppression of intestinal cancer stemness and malignant progression by intestine-specific homeoproteins CDX1 and CDX2
 (投稿準備中)

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

高松宮妃癌研究基金・研究助成金・2014年・代表・大腸癌細胞の幹細胞性の負の制御機構の解明・200万円