

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06952

研究課題名(和文) 上皮間葉移行(EMT)を制御する転写因子ネットワークとクロマチン修飾機構の解明

研究課題名(英文) Analyzing transcription factor network and chromatin regulation during epithelial-to-mesenchymal transition

研究代表者

渡邊 和秀 (WATANABE, KAZUHIDE)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・上級研究員

研究者番号：40749397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、上皮間葉移行(EMT)における遺伝子発現やクロマチン状態の制御メカニズムを探索した。その結果、EMTの過程では間葉の表現型を獲得すると同時に上皮の表現型が失われるが、その制御には転写因子ZEB1が重要な役割を持つことが判明した。またその分子機構として、ZEB1は上皮系遺伝子のクロマチンを閉じて不活化すること、また間葉系遺伝子群の中にはZEB1に依存するものと依存しないものがあることを見出した。これらのデータから「EMTにおける上皮系遺伝子と一部の間葉系遺伝子の相反的变化には、ZEB1-TGFベータのポジティブフィードバック制御が存在する」という仮説を立て、数理モデルを構築した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we explored how the gene expression and chromatin status are controlled during epithelial-mesenchymal transition (EMT). In EMT, a cell loses epithelial (E) phenotype and simultaneously acquires mesenchymal (M) phenotype. Our study discovered that the transcription factor ZEB1 plays an important role in controlling reciprocal regulation of E and M phenotypes. As a molecular mechanism, ZEB1 induces closed chromatin states at major E gene loci, while M gene loci are categorized into ZEB1-dependent and independent groups. We constructed a mathematical model based on a hypothesis that "reciprocal changes in E and M genes during EMT are regulated by a ZEB1-TGFbeta positive feedback loop" and succeeded to predict gene expression changes in EMT.

研究分野：細胞生物学

キーワード：EMT TGFbeta ZEB1 CAGE ATAC-seq chromatin states transcription factor epithelial cell

1. 研究開始当初の背景

上皮間葉移行 (EMT) は上皮組織の発生や維持、また癌の病態に関わる重要な細胞系譜の制御機構である。EMT において、細胞外からのシグナルが細胞核内に伝わり染色体の構造変化などエピジェネティクス転換を引き起こすが、その過程において転写因子群は細胞外のシグナルをエピジェネティクス転換に翻訳するためのスイッチの役割を果たしている。EMT を促進する転写因子として Snail/Slug、Twist family、Zeb family などが挙げられる。また、近年 EMT を促進する転写因子として OVOL family や GRHL family が同定された。これらの転写因子群のバランス異常は癌の発生・転移の鍵となりうるが、複数の転写因子群がどのように協調あるいは競合して EMT におけるエピジェネティクス転換を制御しているのか、正確な説明はなされていない。また、これらの転写因子群は EMT を制御する上で機能的ネットワークを形成していると過程されるが、そのネットワーク内での因子が EMT の実行に必須で、どの因子が細胞形質の維持に関わっているかは明らかではない。これらを説明することは、EMT をターゲットとした治療法を確立する上で必須である。

2. 研究の目的

- 1) EMT 促進因子と抑制因子の相互抑制、また EMT 促進因子間の相互依存の関係を明らかにし、数理モデルと実験データの統合によって仮説を検証する。
- 2) EMT における遺伝子発現およびクロマチン修飾が転写因子によってどのように制御されているかを網羅的に解析する。
- 3) EMT の誘導には TGF などの細胞外シグナルが重要であるが、その下流における EMT 関連転写因子ネットワークの役割を明らかにする。

3. 研究の方法

- 1) 乳腺上皮細胞 MCF10A において EMT 促進因子と抑制因子を強制発現させ、細胞状態の変化を観察する。その結果を数理モデルによって検証する。
- 2) 乳腺上皮細胞 MCF10A において ZEB1 の欠損株を構築し、TGF に誘導される EMT において、遺伝子発現とクロマチン状態の変化がどのように影響されるかをゲノム規模で解析するため、転写開始点における遺伝子発現をみる CAGE 法およびクロマチンの開閉状態をみる ATAC-seq 法を行って野生株・ZEB1 欠損株における TGF 刺激前後の状態を比較する。
- 3) 一細胞遺伝子発現解析技術により TGF 誘導性 EMT の詳細な解析を行う。その結果をもとに一細胞遺伝子発現解析技術とゲノム編集技術を組み合わせ複数の EMT 関連因子の機能を系統的に解析する

(Perturb-seq)

4. 研究成果

1) 乳腺上皮細胞 MCF10A は EMT 抑制因子 OVOL2 を発現させると、より強く上皮の表現型・遺伝子発現を獲得した。また、EMT 促進因子である ZEB1 や SNAIL の発現によって顕著な EMT の表現型を示したが、それは高濃度の TGF や転移性乳癌細胞にみられる EMT の表現型に近いと考えられた。これらのデータを基に EMT の多段階モデルを構築して(図1および論文②)、数理モデルによって実験データの検証を行った。その結果、図1にみられるような EMT の中間状態は OVOL2 と ZEB1 の相互抑制のバランスで決定されていることが示唆された。

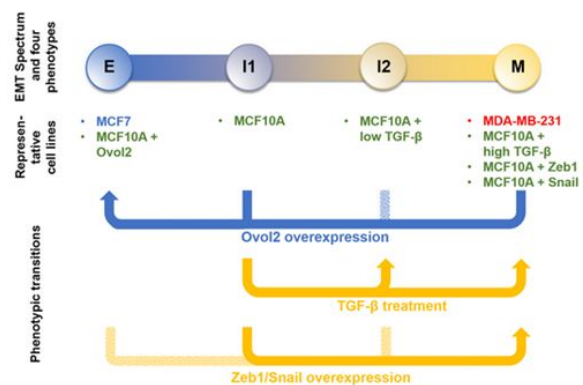


図1 EMT/METにおける多段階モデル

2) OVOL2 と ZEB1 の相互抑制のバランスがどのようなメカニズムで支配されているかを解明するため、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いて乳腺上皮細胞 MCF10A の ZEB1 欠損株を作成した。興味深いことに、ZEB1 欠損株では TGF 刺激に対して間葉の表現型は誘導されるものの、上皮の表現型の消失がみられず、部分的な EMT を起こすことがわかった。そのメカニズムを解析するため、野生株・および ZEB1 欠損株を TGF で 4 週間刺激し

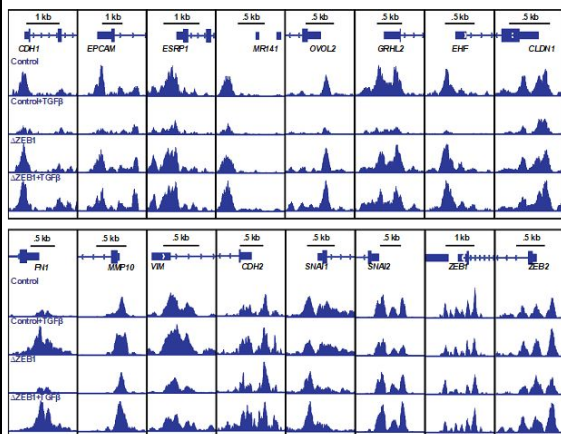


図2 主な上皮系遺伝子 (上段) と間葉系遺伝子 (下段) の転写開始領域のクロマチン状態の変化

た場合の遺伝子発現とクロマチン状態の変化を CAGE と ATAC-seq によって解析した。興味深いことに、ZEB1 欠損株では、主な上皮系因子の発現とクロマチンの変化が起こらないのに対し、間葉系遺伝子群では反応するものとしらないものに大別された(図2)。また、ZEB1 誘導における EMT は TGF β ベータシグナルの抑制によって部分的に阻害された。これらのデータから「EMT における上皮系遺伝子と一部の間葉系遺伝子の相反的变化には、ZEB1-TGF β ベータのポジティブフィードバック制御が存在する」という仮説を基にした数理モデルを構築した。そのモデルを用いて EMT における遺伝子変化を予測することに成功した。また、ATAC-seq データの更なる解析の結果、クロマチン状態の変化はゲノム上のいくつかの領域ごとにクラスターとして制御されている傾向があり、これらの領域が EMT において重要な役割を持つ可能性が示唆された。

3) MCF10A において様々な濃度の TGF β に対する反応性を一細胞遺伝子発現解析によって解析した。その結果、TGF β 刺激後に反応性の異なる複数のクラスターが出現することが判明した(図3左)。また TGF β 濃度による反応性を見ると、二相性のそれらのクラスターは二相性の分布を示した(図3右)。さらに複数の EMT 関連因子の機能を系統的に解析するため、Perturb-seq 用の gRNA 発現ライブラリを作成した。これらの機能解析は今後の課題であるが、そのための準備を行い、予備データを得ることができたことは本研究の重要な成果の一つであるため、報告としてここに追加する。

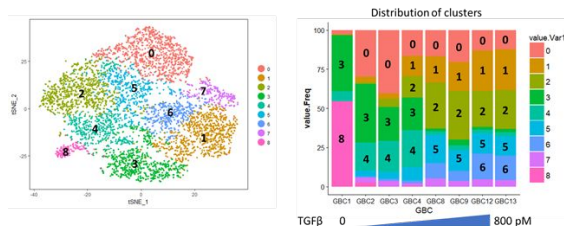


図3 single-cell RNA-seqにおけるK-meansクラスタリングと各クラスターのTGF β 濃度依存性

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 2 件)

①Lee B., Watanabe K., Haensel D., Sui JY., and Dai X., Overexpression of Transcription Factor *Ovol2* in Epidermal Progenitor Cells Results in Skin Blistering. *J Invest Dermatol*, 2017. 137(8):1805-1808. 査読あり

② Hong T.*, Watanabe K.* (*co-first author), Ha Ta C., Villarreal-Ponce A., Nie Q., and Dai X., An *Ovol2-Zeb1* mutual inhibitory circuit governs bidirectional an multi-step transition between epithelial and mesenchymal states. *PLoS Computational Biology*, 2015. 11(11):e1004569. 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

①2017年 Keystone symposia・Whistler Poster presentation

“Identification of ZEB1-dependent and -independent modes of chromatin accessibility regulation by TGF β -beta in mammary epithelial cells”

②2017年日本分子生物学会年会・神戸 Poster presentation

“Differential regulation between velocity and directionality of cellular movement during epithelial-to-mesenchymal transition”

③2016年日本分子生物学会年会・横浜 Poster presentation

“Differential regulation of epithelial and mesenchymal genes during EMT by master transcriptional regulators”

④2016年 ASCB 年会・San Francisco Poster presentation

“Differential regulation of epithelial and mesenchymal genes at transcriptional and chromatin levels during EMT”

〔図書〕(計 0 件)

〔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

渡邊 和秀 (Kazuhide Watanabe)
国立研究開発法人理化学研究所・ライフ
サイエンス技術基盤研究センター・機能
性ゲノム解析部門・上級研究員
研究者番号：40749397

(2) 研究分担者

須田 年生 (Suda Toshio)
熊本大学・国際先端医学研究機構・卓越
教授
研究者番号：60118453

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

Xing Dai, University of California,
Irvine