

平成 31 年 5 月 1 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17978

研究課題名(和文) 幹細胞の上皮分化を制御する普遍的遺伝子エンハンサーの同定

研究課題名(英文) Identifying ubiquitous genomic enhancer elements required for epithelial differentiation

研究代表者

杉本 幸太郎 (Sugimoto, Kotaro)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：40791009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：CLDN6の対合に端を発するシグナルが、SFK/PI3K/AKTを介してレチノイン酸受容体(RAR)の未報告のセリン残基をリン酸化し、リガンドに対する感受性を高め、コリプレッサーの乖離を促すことで幹細胞の上皮分化を誘導していることを解明した。以上を年度末に査読付き英文論文として学術誌に投稿中である。また上記のセリン残基は脊椎動物のRARのみならず核内受容体スーパーファミリーの1/3程度に広く保存されていることから、上皮分化に加えて組織発生、がん、および臓器再生など、多細胞生物の様々な生命現象に関わる可能性が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の遺伝子発現を制御するシグナルの起点は細胞外のタンパク質や小分子がレセプターに結合することを起点とすると考えられてきた。ところが我々は細胞間接着に端を発するシグナルが、転写因子の1つである核内受容体のリン酸化を引き起こし、リガンドに対する感受性を高めることでその標的遺伝子の発現に影響することを突き止めた。この新規シグナル経路は種や細胞種を超えて様々な分子で広く保存されている可能性があり、これに着目した生命現象や病態解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：The basis of cell adhesion signaling is poorly understood. We identify a link between tight-junction molecule claudin-6 and retinoic acid receptor signaling to initiate epithelial differentiation. This signaling axis resulted in phosphorylation of RAR gamma; at S379, which was conserved across species and was indispensable for both releasing the nuclear receptor corepressor (NCoR) from retinoic acid (RA) response elements in target genes, thereby driving epithelialization. This novel crosstalk provides a new insight into the transcription regulation by cell adhesion.

研究分野：実験病理学

キーワード：核内受容体 細胞接着 シグナル伝達 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

近年 iPS 細胞の発見に端を発する再生医学の著しい進歩によって、幹細胞を用いた再生医療が現実味をおびてきた。しかしながら幹細胞治療には極めて大量の細胞が必要であり、実用化にあたって分化転換効率の飛躍的な改善が不可欠である。細胞分化の制御機構のうち転写因子については比較的理解が進んでいる一方で、転写因子が標的とする遺伝子エンハンサーについては未解明な点が多い。さらに最近では、転写因子はそれぞれ固有の古典的なプロモーター応答配列に結合して転写を直接制御するだけでなく、より遠位のシス・エレメントに結合して巨大転写因子複合体を形成することで多くの遺伝子の転写に影響を与えることが解ってきており(Vockley et al., *Cell*, 2016)、その機構を解明する鍵となるエンハンサー・エレメントの同定はより重要性を増している。申請者は以前、タイト結合分子クローディン-6(CLDN6)が幹細胞の上皮分化を誘導し(Sugimoto et al., *PLoS One*, 2013)、CLDN6 を含む細胞間接着装置複合体に端を発する細胞内シグナルが細胞の運命決定を制御するしくみを解明した(Sugimoto et al., 投稿中)。ところで CLDN6 は胎児系上皮分化の際に極めて早期かつ強力に誘導される反面、成体の正常組織では発現がほとんど見られない(Sugimoto et al., *PLoS One*, 2013; Anderson et al., *Dev Dyn*, 2008; Zhao et al., *Am J Physiol*, 2008)。言い換えれば、CLDN6 は時間的・空間的に、内胚葉系上皮組織の発生に極めて限定された発現を示す。さらに *Cldn6* の遺伝子座は隣接遺伝子の配置や転写因子応答配列の分布なども含めて哺乳類間でよく保存されている(図 2)。したがって CLDN6 の発現を制御するプロモーター領域には、内胚葉系上皮分化で広く活性化されるユビキタスな「上皮分化エンハンサー」が含まれる可能性が高いと着想するに至った。

当初の計画では上記を背景としてエンハンサーエレメント解明を目指すものであったが、パイロット実験の結果により、新規の転写因子活性化機構が同定される見通しが立ったため、まずはエンハンサーに結合する転写因子複合体の制御について取り組むこととした。

2. 研究の目的

細胞間接着装置複合体に端を発するシグナルが、1) どのような経路で、2) どのような転写因子を、3) どのように活性化することで、幹細胞を上皮分化させるのか解明する。

3. 研究の方法

以前樹立していた F9 幹細胞コンディショナルシステムを用いて、遺伝子導入、遺伝子ノックアウト、各種阻害剤により機能欠失と機能獲得を評価することで、上皮分化にかかる細胞内シグナルを探索する。

4. 研究成果

まず、CLDN6 の対合による上皮分化誘導が、レチノイン酸受容体(RARs)による上皮分化誘導と、形態学的あるいは誘導される下流遺伝子群において類似していることを端緒とし、RARs の遺伝子ノックアウトによって CLDN6 シグナルは RARs に帰結することを証明した。続いて免疫沈降法や各種阻害剤による検討により、CLDN6 対合シグナルは Src ファミリーキナーゼ、PI3 キナーゼ、AKT を介して RARs を活性化することを示した。またバイオインフォマティクスにより RARs にある潜在的な AKT リン酸化セリン/スレオニンを抽出し、これらの変異体を作製して解析することで、このシグナルはこれまでに報告されていなかった S379-RAR γ 2 という新規のセリンリン酸化に帰結することを突き止めた。このセリンリン酸化に依存して RARs 複合体からコリプレッサーが乖離することにより、下流遺伝子群の転写が制御されていた。またこのセリンリン酸化は RARs のレチノイン酸に対する感受性(結合性)を 100-1,000 倍に高めることで転写活性を増幅することがわかった。既報の立体構造解析結果と合わせ、S379 セリンリン酸化は RARs のリガンド結合ポケットの構造に影響を与えている可能性が考えられた。

本研究により、細胞間接着に端を発するシグナルが転写因子のリン酸化に帰結し、細胞の運命決定に関与することが示された(次頁図上)。またこのセリン残基は種を超えて広く保存されており(同図左下)、また RARs の他にもヒト核内受容体の約 1/3 に分布していたことから、本研究で明らかになった細胞接着-転写因子連関による細胞制御が多細胞生物の様々な生命現象に関与している可能性が期待される。既に我々の研究グループはがんの細胞制御に展開している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 8 件）

1. **Sugimoto K**, Hui SP, Sheng DZ, Nakayama M, Kikuchi K. Zebrafish FOXP3 is required for the maintenance of immune tolerance. *Dev Comp Immunol.* 73: 156–162. 2017
2. **Sugimoto K**, Hui SP, Sheng DZ, Kikuchi K. Dissection of zebrafish *shha* function using site-specific targeting with a Cre-dependent genetic switch. *Elife.* 6: e24635. 2017
3. Shi H, Enriquez A, ..., **Sugimoto K** (11th), ..., Kikuchi K (26th), ..., Dunwoodie SL (33rd). NAD deficiency, congenital malformations and niacin supplementation. *N Engl J Med.* 377: 544-552. 2017
4. Nishiura K, Ichikawa-Tomikawa N, **Sugimoto K**, Kunii Y, Kashiwagi K, Tanaka M, Yokoyama Y, Hino M, Sugino T, Takahashi H, Kakita A, Imura T, Chiba H. PKA activation and endothelial claudin-5 breakdown in the schizophrenic prefrontal cortex *Oncotarget.* 8: 93382-93391. 2017
5. Hui SP, Sheng DZ, **Sugimoto K** (co-first author), Gonzalez-Rajal A, Nakagawa S, Hesselson D, Kikuchi K. Zebrafish regulatory T cells mediate organ-specific regenerative programs. *Dev Cell.* 43: 659-672. 2017
6. Kashiwagi K, Matsui D, Tanaka M, **Sugimoto K**, Chen H, Ichikawa-Tomikawa N, Marubashi S, Suzuki H, Chiba H. Expression of liver X receptors in normal and refractory carcinoma tissues of the human lung and pancreas. *Histol Histopathol.* 33: 497-505. 2018
7. Okai K, Ichikawa-Tomikawa N, Saito AC, Watabe T, **Sugimoto K**, Fujita D, Ono C, Fukuhara T, Matsuura Y, Ohira H, Chiba H. A novel occludin-targeting monoclonal antibody prevents hepatitis C virus infection in vitro. *Oncotarget.* 9: 16588-16598. 2018
8. **Sugimoto K**, Tanaka M, Chiba H. Myocardial Rupture Due to Metastasis of Urothelial Carcinoma. *Circ J.* 83: 839. 2019

〔学会発表〕（計 1 件）

杉本幸太郎. 細胞接着シグナルによる正常細胞機能とがん悪性形質の新規制御機構. 日本病理学会総会. 2018. 札幌. 口演(招待講演).

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕（出願計 2 件）

特許 千葉 英樹, 杉本 幸太郎. 「細胞培養補助剤」. 特願 2018-093313.

特許 千葉 英樹, 杉本 幸太郎. 「子宮体癌患者の予後予測バイオマーカー」.
特願 2018-191286.

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。