

令和 3 年 10 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16360

研究課題名(和文) 三次元ゲノム構造を介した幹細胞マーカー発現制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of regulation mechanism for stem cell marker gene expression via three-dimensional genome structure

研究代表者

武田 和 (Takeda, Takashi)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20781793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、enChIP (engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation) 法により大腸癌幹細胞関連遺伝子の1つであるKLF5遺伝子のエンハンサー候補領域を特定し、その後CRISPR/Cas9システムを用いて候補領域を欠失させることによって正確なエンハンサー領域を決定した。また、KLF5遺伝子のエンハンサー領域を欠失させた細胞株では幹細胞性が低下していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌幹細胞は再発や転移の根源であり、癌幹細胞を標的とした治療法開発のためには、その性質を把握することが必須である。本研究では、enChIP法を用いた解析によって、大腸癌における三次元ゲノム構造を介した幹細胞関連遺伝子の発現制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。本研究の結果、大腸癌幹細胞関連遺伝子であるKLF5遺伝子のエンハンサー領域が三次元ゲノム構造を介して遺伝子発現を制御し、幹細胞性を増強させている可能性を明らかとすることができた。この結果は、癌幹細胞を標的とした治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To identify the enhancer region of stem cell related genes in colorectal cancer (CRC), we performed enChIP (engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation) method, which can identify the DNA, RNA, and proteins binding to a specific genomic region. As a result, we identified the enhancer candidate region that binds to the promoter region of KLF5 gene in CRC. KLF5 is a transcription factor belongs to a kruppel-like factor family and the expression is specifically up-regulated in particular human tumors. KLF5 is also known as a cancer stem cell marker for CRC. Next, we generated the deletion mutants of KLF5 enhancer candidate region by CRISPR/Cas9 system and identified the accurate enhancer region at the downstream of KLF5 gene. Moreover, the deletion mutants of KLF5 enhancer region showed the decreased stem cell properties, indicating that KLF5 enhancer region is important for the augmentation of the cancer stemness in CRC.

研究分野：消化器外科学、腫瘍生物学

キーワード：エンハンサー enChIP法 三次元ゲノム構造 癌幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞 (Cancer stem cell:CSC) は自己複製能 (self-renewal) と多分化能を有する。CSC は腫瘍中に少数しか存在しないが、高い腫瘍形成能や薬剤耐性を示すことから癌再発・転移の根源となる。そのため、CSC がその幹細胞性を維持するための分子メカニズムの解明は今後のがん治療の方向性を大きく変える可能性を秘めている。

腸管における幹細胞の研究は 1974 年に Leblond らによって全ての腸管上皮細胞が幹細胞由来であるという説が提唱されたことに端を発し、今日まで盛んに行なわれている。Leblond らはこの際に腸管陰窩底部に存在する CBC 細胞 (Crypt Base Columnar) が腸管における幹細胞であるということも提唱した (Cheng H and Leblond CP. Am J Anat 1974)。その後、長きにわたる研究の結果、2007 年に Barker らによって LGR5 という Wnt 標的遺伝子陽性の CBC 細胞が腸管上皮幹細胞であることを細胞系譜の追跡実験によって証明した (Barker N et al. Nature 2007)。一方、BMI1 や LRIG1 といった遺伝子を発現している陰窩底部から 4 番目の細胞 (+4 細胞) は同様の細胞系譜追跡実験によって、通常は静止期にあるが、細胞障害などにより LGR5 陽性細胞が消失した際に新たな LGR5 陽性細胞に置き換わる Reserve Stem cell としての性質を有することが証明された (Tien H et al. Nature 2011)。大腸癌細胞の中にもこれらの遺伝子を発現している集団が存在しており、癌幹細胞であると考えられている。

近年、プロモーター・エンハンサーに代表される三次元ゲノム構造が組織特異的に、あるいは各分化段階で特異的に発現する遺伝子群の統合的な発現制御を行っていることが明らかになってきており、注目を浴びている。三次元ゲノム構造は BET ファミリータンパク質などのエピジェネティックリーダータンパク質やメディエーター複合体、コヒーシン複合体などによって構築されることがわかっており (Hnisz D et al. Cell 2013)、当グループの先行研究では、卵巣癌の幹細胞マーカーである ALDH1A1 遺伝子発現が三次元ゲノム構造を介して制御されており、BET ファミリータンパク質 BRD4 が重要な役割を果たしていることを示した (Yokoyama Y et al. Cancer Res 2016)。BRD4 による幹細胞関連遺伝子の発現制御については他癌や胚性幹細胞においても報告されており (Di Micco R et al. Cell Rep 2014, Venkataraman S et al. Oncotarget 2014)、BRD4 を始めとするタンパク質複合体が賦与する三次元ゲノム構造が癌幹細胞において幹細胞性維持の鍵となると考えられる。

## 2. 研究の目的

特定の組織において、各分化段階で特異的に発現する遺伝子発現が、三次元ゲノム構造を介して制御されていることは明らかになりつつあるが、癌における幹細胞遺伝子について三次元ゲノム構造を解明しようとした報告は他にない。そこで、本研究では最先端の三次元ゲノム構造解析技術である enChIP (engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation) 法を用いて、大腸癌における幹細胞遺伝子の三次元ゲノム構造を介した発現調節機構を分子レベルで明らかにし、新規治療法の開発へつなげることを目的とし、研究を行った。

## 3. 研究の方法

本研究では、大腸癌幹細胞関連遺伝子として報告されている遺伝子のうち、頭頸部癌においてプロモーター・エンハンサー領域の存在が報告されている KLF5 遺伝子に着目した。

大腸癌細胞株 HT29 に対し、Cas9 タンパクがガイド RNA を介して特定のゲノム領域に結合できる性質を利用して、特定のゲノム領域と相互作用をする領域を同定することができる enChIP 法を用いて、KLF5 遺伝子のプロモーター領域に結合する領域を網羅的に解析し、エンハンサー候補領域を同定した。

大腸癌細胞株 HT29 に対し、ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムを用いて、同定した領域を欠失させた変異体を作製した。そして、それらの変異体における KLF5 遺伝子発現量を検討し、正確なエンハンサー領域を決定した。

大腸癌細胞株 2 種 (HT29, SW48) に対し、ChIP (chromatin immunoprecipitation) 法を用いて、KLF5 遺伝子のプロモーター領域とエンハンサー領域に三次元ゲノム構造の構築に関わるタンパク (BET タンパク BRD4, メディエーター複合体タンパク MED1, コヒーシン複合体タンパク RAD21) が結合しているかどうかについて検討した。

パブリックデータベースを用いた解析と結合予測ソフトを用いた in silico 解析によって KLF5 遺伝子のプロモーター領域とエンハンサー領域に結合しうる分子を予測し、それらの中から実際に KLF5 遺伝子プロモーター領域とエンハンサー領域に結合している分子を同定した。

で作製した KLF5 遺伝子のエンハンサー領域を欠失した変異体における幹細胞性について検討した。

#### 4. 研究成果

大腸癌細胞株 HT29 に対し、enChIP 法を用いて、大腸癌幹細胞関連遺伝子である KLF5 遺伝子のプロモーター領域に結合する領域を網羅的に解析した結果、KLF5 遺伝子の下流にエンハンサー候補領域を同定することができた。

で同定したエンハンサー候補領域を CRISPR/Cas9 システムを用いて欠失させた細胞株を 600 クローン以上作製したところ、ヘテロ欠失変異体を数クローン得ることができた。一方、ホモ欠失変異体は得ることができなかった。ヘテロ欠失変異体において KLF5 遺伝子の発現レベルが低下していたため、この領域を KLF5 遺伝子のエンハンサー領域と決定した (図 1)。

大腸癌細胞株 2 種 (HT29, SW48) に対し、ChIP (chromatin immunoprecipitation) 法による検討を行った結果、KLF5 遺伝子プロモーター領域、エンハンサー領域、いずれにおいても三次元ゲノム構造に関わるとされるタンパク (BRD4, MED1, RAD21) が結合していた (図 2)。

パブリックデータベースを用いた解析と結合予測ソフトを用いた in silico 解析によって KLF5 遺伝子のプロモーター領域とエンハンサー領域に結合しうる分子を予測した結果、いくつかの分子が候補に挙げられた。そのうちの 1 つのタンパクに関して、大腸癌細胞株 HT29 を用いて ChIP 法によって KLF5 プロモーター領域、エンハンサー領域に結合しているかどうか検討を行った結果、いずれの領域においても結合していた。

で作製した KLF5 遺伝子エンハンサー領域ヘテロ欠失変異体において、Sphere 形成能の低下 (図 3) や化学療法抵抗性の低下 (図 4)、癌幹細胞関連遺伝子の発現低下が認められた。

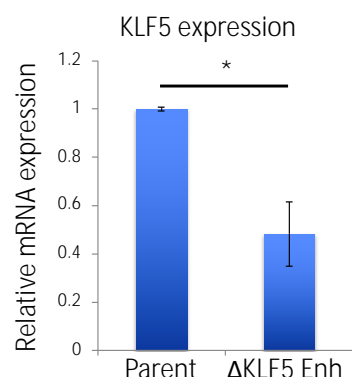


図 1 KLF5 遺伝子のエンハンサー候補領域を欠失させたヘテロ欠失変異体 ( KLF5 Enh) において KLF5 遺伝子の発現が低下していた。

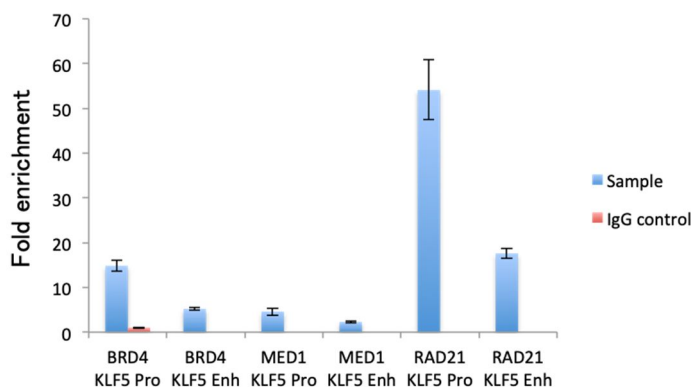


図 2 KLF5 遺伝子のプロモーター領域、エンハンサー領域に三次元ゲノム構造に関わるタンパク (BRD4, MED1, RAD21) が結合していた。

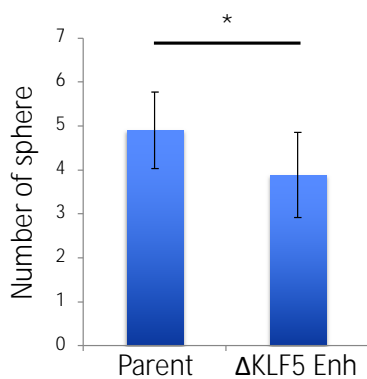


図 3 KLF5 遺伝子エンハンサー領域のヘテロ欠失変異体において Sphere 形成能が低下していた。

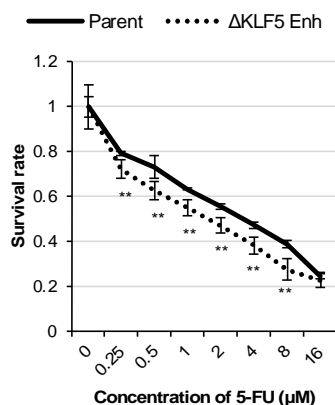
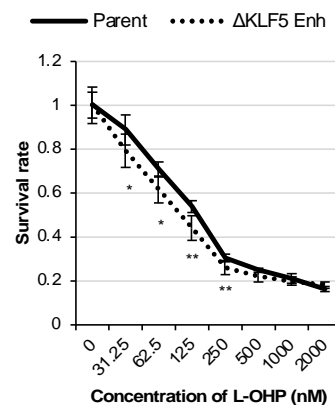


図 4 KLF5 遺伝子エンハンサー領域のヘテロ欠失変異体において化学療法抵抗性の低下が認められた。



以上の結果より、本研究で、私達は大腸癌細胞株における KLF5 遺伝子エンハンサー領域の決定に成功した。また、KLF5 遺伝子エンハンサー領域は三次元ゲノム構造を介して KLF5 遺伝子発現を制御し、癌幹細胞性を増強している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takashi Takeda, Yuhki Yokoyama, Toshitsugu Fujita, Kumi Kitagawa, Haruka Hirose, Hidekazu Takahashi, Mamoru Uemura, Chu Matsuda, Tsunekazu Mizushima, Masaki Mori, Yuichiro Doki, Hodaka Fujii, Hirofumi Yamamoto
2. 発表標題 Identification of the KLF5 enhancer region in colon cancer cell lines
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川公望、武田和、横山雄起、山本浩文
2. 発表標題 大腸癌におけるKLF5遺伝子発現制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第28回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------