

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16541

研究課題名（和文）三次元ゲノム構造を介したKLF5、CCAT1遺伝子の発現制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）The regulation mechanism of KLF5 and CCAT1 gene expression via three-dimensional genome structure

研究代表者

横山 雄起（Yokoyama, Yuki）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60615714

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、大腸癌などで高発現していることが知られているKLF5とCCAT1遺伝子の三次元ゲノム構造を介した発現制御メカニズムの解明に取り組んだ。臨床サンプルを用いた検討の結果、KLF5とCCAT1の大腸癌サンプルにおける発現レベルは相関していた。また、大腸癌細胞株を用いた検討の結果、三次元ゲノム構造を介したKLF5、CCAT1遺伝子の協調的な発現制御において、KLF5タンパクが重要な役割を果たす可能性を示唆するデータを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で対象としたKLF5遺伝子、CCAT1遺伝子はいずれも大腸癌を始めとした特定の癌種において過剰発現が報告されており、癌幹細胞性との関連も示唆されているため、有力な治療標的である。本研究で明らかとしたKLF5タンパクが三次元ゲノム構造の構築に関与し、KLF5、CCAT1遺伝子の協調的な発現制御に関わっている可能性を示唆する結果は、三次元ゲノム構造を標的とした新たなタイプの治療薬の開発につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Kruppel-like factor 5 (KLF5) is a zinc finger transcription factor whose expression is increased in specific cancer types, such as gastrointestinal cancer and squamous carcinoma. Colon Cancer Associated Transcript 1 (CCAT1) is a long noncoding RNA that was initially found to be increased in colorectal cancer (CRC), and it is reported that high CCAT1 expression is associated with poor prognosis in CRC patients. In this study, we found that KLF5 and CCAT1 expression was correlated each other in CRC clinical samples. Furthermore, we showed that KLF5 protein bound to the KLF5 gene promoter, enhancer and CCAT1 gene transcription start site together with other co-factors. Our data propose the mechanistic insight that the KLF5 protein constructs the core regulatory circuitry with co-factors in the three-dimensional genome structure and coordinately regulates KLF5 and CCAT1 expression in CRC.

研究分野：癌、エピジェネティクス、分子生物学

キーワード：三次元ゲノム構造 KLF5 CCAT1 ノンコーディングRNA

1. 研究開始当初の背景

KLF5 は **KLF (Kruppel-like factors)** ファミリーに属するジンクフィンガー転写因子である。腸管では陰窩底において活発に分裂している細胞で高く発現しており、分化した腸管上皮細胞では発現が低いことが知られている。**KLF5** は大腸癌、膵癌、胃癌などの消化器の腺癌や食道癌や頭頸部癌、子宮頸癌などの扁平上皮癌において発現増加、遺伝子増幅がみられる **lineage-survival oncogene** としての性質を有する事が示唆されている (図 1)。また、**KLF5** は大腸癌において発癌に重要な癌幹細胞マーカーとしての報告もあり、**KLF5** が消化器癌や扁平上皮癌で発現増加するメカニズムの解明とその標的化は有望な治療法となりうる。

エンハンサーは遺伝子発現制御に関わる DNA 領域の一つであり、標的とする遺伝子領域から離れた上流ないしは下流に存在し、標的遺伝子近傍に位置するプロモーターとループ構造 (三次元構造) を形成することで転写を促す。そして、このプロモーター・エンハンサー結合に代表される三次元ゲノム構造が組織特異的、あるいは各分化段階で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いる。

様々な癌種を用いた網羅的なエンハンサー領域解析によって、食道癌、頭頸部癌において **KLF5** のエンハンサーと想定される領域の遺伝子増幅が起きていることが報告されており、**KLF5** 遺伝子周辺において三次元ゲノム構造が構築されていることが示唆されている。そこで、先行研究において私達は、大腸癌細胞株における **KLF5** 遺伝子の三次元ゲノム構造を介した発現調節機構を明らかにするため、特定のゲノム領域と相互作用する DNA、RNA、タンパク質を確実に同定できる手法 (enChIP 法: engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation 法) を用いて **KLF5** 遺伝子のプロモーター領域と結合するゲノム領域を網羅的に解析した。その結果、食道癌で報告のあった領域を含め、幾つかのエンハンサー候補領域を同定することができたが、いずれも結合の確からしさを示すスコア (P score) は低く、意外なことに異なる染色体上に存在する遺伝子領域との結合が高いスコアを示していた。そして、私達はその中の一つである **CCAT1 (Colon Cancer Associated Transcript)** 遺伝子に着目し、**KLF5** 遺伝子と **CCAT1** 遺伝子の三次元ゲノム構造を介した発現制御メカニズムについて研究を行うこととした。

2. 研究の目的

CCAT1 は大腸癌で発現が増加している long non-coding RNA (LncRNA) として報告された遺伝子であり、治療標的として有望である。また、**CCAT1** は同じ染色体上に存在する **MYC** 遺伝子と三次元ゲノム構造を構築し、**MYC** 遺伝子の発現制御に関わっていることも知られている。さらにパブリックデータベースを用いた解析の結果、**CCAT1** も **KLF5** 同様に消化器癌や扁平上皮癌で発現が増加しており、両者の発現には相関が見られることから、**KLF5** と **CCAT1** が三次元ゲノム構造を介した協調的な発現調節機構を有し、癌の悪化に関わっている可能性が高い。以上より、本研究の目的は異なる染色体に存在する **KLF5** 遺伝子と **CCAT1** 遺伝子が三次元ゲノム構造を介して協調的に発現制御されているという仮説を証明し、そこに存在する分子メカニズムを明らかにすることである (図 1)。

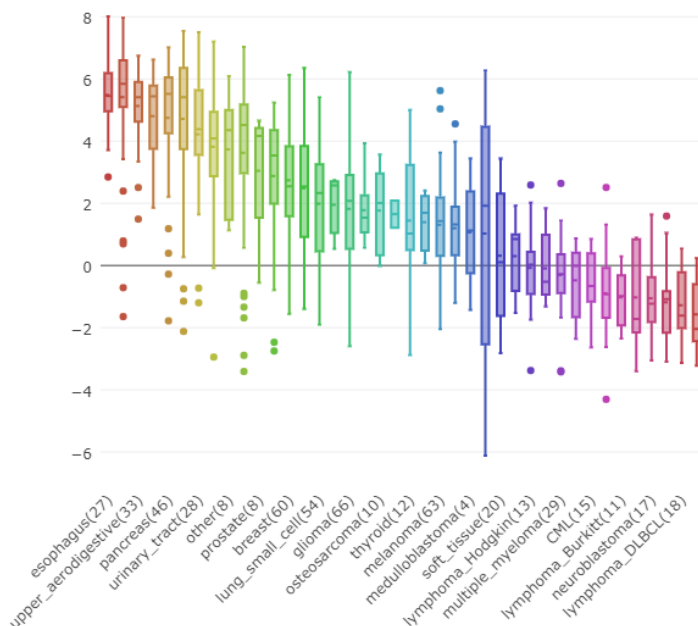


図 1. 各種癌細胞株における KLF5 遺伝子発現

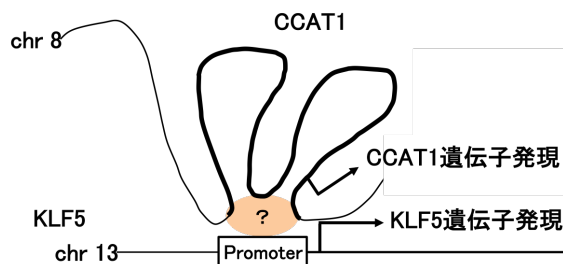


図 2. 本研究で明らかにしようとする仮説モデル

3. 研究の方法

本研究は以下の方法を用いて行った。

1. 三次元ゲノム構造を介した KLF5、CCAT1 遺伝子発現制御の分子メカニズムの解明

(1) a. 阻害剤や siRNA を用いて KLF5 や CCAT1 の発現を抑制し、抑制していない方の遺伝子発現がどうなるかを解析する。b. KLF5 遺伝子と CCAT1 遺伝子が結合している領域を CRISPR/Cas9 システムによって欠失させた場合に遺伝子発現がどのように変化するかを解析する。

(2) パブリックデータベースを用いた解析によって、KLF5 遺伝子と CCAT1 遺伝子の間で形成される三次元ゲノム構造に関わるタンパク質を同定する。

2. 臨床サンプルにおける KLF5 と CCAT1 遺伝子発現の相関関係についての検討

(1) 阪大消化器外科が所有する大腸癌組織から抽出した RNA サンプルを用いて RT-qPCR を行い、KLF5、CCAT1 の遺伝子発現レベルでの相関関係を解析する。

(2) 阪大消化器外科が所有する大腸癌組織標本を用いて KLF5 の免疫染色を行う。また、超高感度の in situ hybridization 法 (RNA scope) により CCAT1 発現レベルを検討し、組織中での局在も含めた相関関係を解析する。合わせて悪性度評価や予後解析も行う。

4. 研究成果

初年度 (2020 年度) はまず、大腸癌組織 (臨床サンプル) 131 症例から抽出した RNA を用いて qRT-PCR を行った。その結果、KLF5 と CCAT1 の発現レベルは相関していた ($P < 0.0001$)。さらにパブリックデータベースに登録されている大腸癌細胞株における発現レベルも相関関係が認められた (図 3)。続いて、複数の大腸癌細胞株に対し、KLF5 阻害剤 (ML264) や siRNA を用いて KLF5 や CCAT1 の発現を抑制し、抑制していない方の遺伝子発現がどうなるかを解析した。その結果、KLF5 の阻害剤あるいは siRNA を投与した際には CCAT1 の発現が低下するが、CCAT1 の siRNA を投与しても KLF5 の発現には影響を与えないことが明らかになった。さらに CRISPR/Cas9 システムを用いた欠失変異体を作製し、検討を行ったところ、同様の結果が得られた。

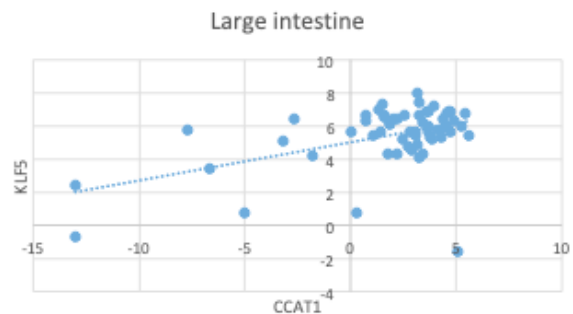


図 3 パブリックデータベース解析の結果、大腸癌細胞株において、KLF5 と CCAT1 発現レベルには相関関係があった。

2021 年度は大腸癌組織パラフィン切片 27 症例を用いて免疫染色による KLF5 タンパク発現の検討と in situ hybridization (RNAscope) による CCAT1 の RNA 発現の検討を行った。KLF5 タンパク発現、CCAT1 RNA 発現ともに、正常腸管上皮細胞に比べ、大腸癌細胞において高発現していた。そして、発現の強さと陽性細胞の割合を元にスコアリングを行った結果、大腸癌組織における KLF5 タンパク発現と CCAT1 RNA 発現にも有意な相関関係が認められた。また、予後解析の結果、KLF5 タンパクが高発現している症例では予後不良であることも明らかとなった。次に KLF5 と CCAT1 の発現制御メカニズムの解明に取り組んだ。パブリックデータベースを用いた解析を行い、KLF5 遺伝子のプロモーター領域、エンハンサー領域、CCAT1 遺伝子のプロモーター領域に結合しうる分子を探索した。その結果、いずれの領域においても KLF5 タンパク結合する可能性が示唆された。そこで、大腸癌細胞株において実際に KLF5 タンパクが上記の領域に結合しているかどうかを検討するために ChIP-qPCR (Chromatin immunoprecipitation-quantitative PCR) 法を行った。その結果、KLF5 タンパクが KLF5 遺伝子のプロモーター領域、エンハンサー領域、CCAT1 遺伝子のプロモーター領域に結合していることが明らかとなった。さらにこれらの領域には三次元ゲノム構造の構築に関わることが明らかになっているコファクター (BET (Bromodomain and extraterminal domain) ファミリータンパク、コヒーシン複合体、メディエーター複合体) も結合していることを明らかとした。

以上の結果より、KLF5 タンパクによる三次元ゲノム構造が KLF5 遺伝子と CCAT1 遺伝子の協調的な発現制御に関わっ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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横山雄起、武田和、藤田敏次、奥崎大介、杉山真美、浅井香穂、高橋秀和、藤井穂高、森正樹、山本浩文
2. 発表標題 大腸癌における三次元ゲノム構造を介したKLF5遺伝子発現制御メカニズム
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020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
---------	---------