

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22792041

研究課題名（和文） 上皮間葉転換に関わる転写因子発現のエピジェネティクス制御機構

研究課題名（英文） Transcriptional and epigenetic regulation of TWIST1 in EMT

研究代表者

大隈 瑞恵（OHKUMA MIZUE）

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：60456209

研究成果の概要（和文）：転写因子 TWIST1 は上皮間葉転換(EMT)において重要な役割を果たすとともに、腫瘍の悪性化や間葉系細胞の分化抑制に関わることが知られる。本研究では、EMT における TWIST1 遺伝子発現制御機構を明らかにすることを目的とし、TWIST1 発現量とプロモーターのメチル化状態の関連を検討した。さらに、間葉系細胞に限らず TWIST1 誘導における転写制御について検討を加えた結果、T 細胞での Tax1 導入による TWIST1 の発現誘導の際の転写制御機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The bHLH transcription factor TWIST1 plays a crucial role in epithelial mesenchymal transition (EMT). We previously showed a molecular basis for the transcriptional regulation of the TWIST1 gene in mesenchymal cells. In this study, we examined the relation between TWIST1 gene expression in EMT and DNA methylation states at the TWIST1 promoter. In addition, we investigated the molecular mechanism of the transcriptional induction of TWIST1 gene by Tax1 in T cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1600000	480000	2080000
2011 年度	1000000	300000	1300000
年度			
年度			
年度			
総計	2600000	780000	3380000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 矯正・小児系歯学

キーワード：間葉系細胞 転写調節 TWIST1

1. 研究開始当初の背景

頭蓋縫合早期癒合症は早期に頭蓋縫合が癒合することにより頭蓋顔面領域の形態異常とそれに伴う機能異常を生じる疾患である。顔面頭蓋の成長は脳頭蓋の影響を強く受けるため、頭蓋縫合早期癒合症患者は重度の不正咬合を呈することが多い。これまでに、頭蓋縫合早期癒合症を伴う Saethre-Chotzen syndrome の原因として TWIST1 遺伝子の変異が報告され、頭蓋縫合部における TWIST1 の発現は厳密に制御される必要があると考えられるようになった。

頭蓋顔面領域の骨格は神経堤と沿軸中胚葉から形成されるが、TWIST1 は神経堤由来細胞と中胚葉由来細胞の両者を含んだ頭部間葉組織全体に強く発現し、この間葉組織から発生する頭蓋冠および前頭鼻部の骨格形成において重要な役割を果たすことが報告されている。また、頭蓋縫合においては、TWIST1 が未分化間葉細胞に限局して発現し、縫合部における骨芽細胞の分化を抑制することが知られている。このように、頭蓋顔面の発生過程において、TWIST1 は胎生初期の骨格形成からその後の細胞分化の制御にいたるまで広範な機能を持つことが明らかにされてきた。しかし、TWIST1 自身が受ける発現制御機構についての報告は少ない。

さらに、TWIST1 は上皮細胞がその極性や細胞間結合を失い間葉系様細胞へと形態変化を起こすプロセスである上皮間葉転換 (EMT) の現象においても重要な役割を果たすことが明らかにされている。EMT は初期発生における原腸陥入、神経堤細胞の移動、口蓋形成などの器官形成のみならず、癌細胞の浸潤・転移や細胞のリプログラミングに重要な役割を果たすことが知られているが、EMT における TWIST1 発現制御機構については明らかにされていない。

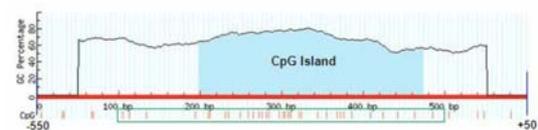
これまでに間葉系細胞における TWIST1 遺伝子プロモーター解析の結果、プロモーター内の CCT 反復配列を含む -92/-84 の領域が TWIST1 の発現維持に必須であることを明らかにし、この領域に結合する転写因子として Sp1/Sp3 および CREB を同定した。

2. 研究の目的

本研究では、EMT における TWIST1 遺伝子発現制御機構を明らかにするとともに、EMT に関連する転写因子が受けるエピジェネティクス制御の解明を図ることを当初の目的とした。

3. 研究の方法

(1) TWIST1 プロモーター上には転写開始点を含む 1.2kb ほどの CpG アイランドが存在する。TWIST1 を高発現する細胞 (ヒト骨肉腫由来細胞 MG63 など) および TWIST1 低発現の細胞 (ヒト乳癌由来細胞 MCF7 など) から DNA を抽出し Bisulfite 処理の後、転写開始点から上流 450bp までの 25 の CpG サイトについて Pyrosequencing 法を用い、DNA メチル化率を定量的に解析した。また、ヒト乳癌由来細胞 MCF7 に抗腫瘍性抗生物質による EMT 誘導の実験系確立し TWIST1 プロモーターの DNA メチル化状態の解析を行った。



TWIST1 プロモーターの DNA メチル化解析領域

(2) T細胞における HTLV-1 由来転写調節因子 Tax1 導入による TWIST1 の発現誘導の際にみられる TWIST1 転写制御機構を解析した。

① Tax1 による TWIST1 発現誘導機構を解析するため、単離した TWIST1 プロモーターをルシフェレース遺伝子に結合したレポーターアッ

セイを行った。これまでに間葉系細胞での解析に使用した種々の5'側欠損TWIST1プロモーター変異体の反応性についても同様の実験系を用い、併せて検討した。

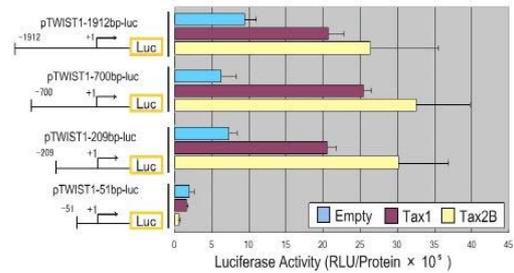
②TWIST1プロモーターの種々の置換変異体を使用し、Tax1発現プラスミドを導入したT細胞でのプロモーター活性を検討することで、Tax1の転写制御を受けるDNAエレメントの特定を試みた。

③Tax1の変異体を導入することによるTWIST1プロモーターの活性化について検討した。Tax1が直接作用する転写因子としてNF- κ B、CREB、SRFが知られるが、これらの各々について活性化能を持たない変異体を使用しTWIST1プロモーターの活性化について検討した。

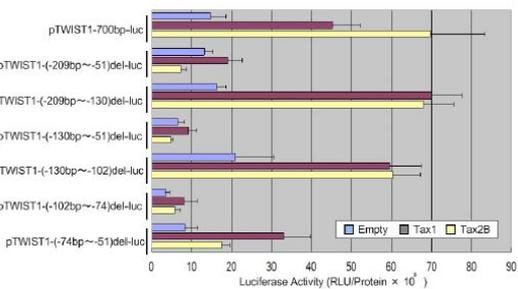
4. 研究成果

(1)転写開始点から上流450bpまでの25のCpGサイトについてPyrosequencing法を用い、DNAメチル化率を定量的に解析した。解析対象としたCGサイトのうち約65%でTWIST1低発現細胞のDNAメチル化率の方が高い値であった。しかし、EMTによるメチル化率の差は認められなかった。今回、解析領域の大幅な拡大が困難であり、サンプル数も限られたことからTWIST1発現量とプロモーターのDNAメチル化についての明らかな関連を見出すに至っていない。

(2)①TWIST1の転写開始点の上流1912bpをもつプロモーターは、Tax1に反応してルシフェラーゼ活性が上昇し、Tax1がTWIST1プロモーターを活性化することが分かった。また、5'側欠損変異体および中間欠損変異体を使用した結果からTWIST1プロモーター内でTax1に反応する配列が-102~-74bpの領域に存在することが示唆された。



②TWIST1プロモーターのNF- κ B結合様配列およびCREB結合様配列に変異を含むプロモーターで反応性の低下が認められ、これらのエレメントの関与が示唆された。



③Tax1変異体のTWIST1プロモーター活性への影響を調べた結果、用いた変異体全てでTWIST1プロモーター活性化は減少した。置換変異体を用いた結果と併せると、Tax1によるTWIST1プロモーターの活性化に少なくともNF- κ BとCREBの経路が関与することが示唆された。CREBについてはこれまでに間葉系細胞におけるTWIST1の発現においても重要な役割を示すことが示唆されており、これらの異なる背景でのTWIST1発現に共通の制御機構が存在する可能性が考えられた。

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0件)

[学会発表] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大隈 瑞恵 (OHKUMA MIZUE)

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：60456209

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし