

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462859

研究課題名(和文) KLF依存性細胞分化 EMT誘導因子の同定と口腔癌進行抑制効果の解析

研究課題名(英文) KLF-dependent cell differentiation- and EMT-inducing factor and suppression of oral carcinoma progression

研究代表者

今井 一志 (Imai, Kazushi)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：10328859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Kruppel-like factor (KLF) は上皮組織の発生と恒常性維持に決定的な役割を果たし、KLF4とKLF5の発現バランスは癌細胞の表現型と、癌の進行にも深く関わりと予想されている。しかし、口腔癌においては不明な点が多く残っている。本研究課題において、KLF4とKLF5は口腔癌細胞の分化・脱分化をコントロールし、KLF4は遺伝子プロモーターの過メチル化により発現停止することが明らかになった。KLF5の発現については+145～+330の領域がminimal essential regionであり、GC boxとSP3の結合が不可欠であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Kruppel-like factor (KLF) plays a critical role in epithelial tissue development and homeostasis. Expression balance of KLF4 and KLF5 is considered to regulate carcinoma cell phenotypes and carcinoma progression. However, very little is known about a role KLF4/5 in oral carcinomas. This study demonstrated that KLF4/5 regulate differentiation and dedifferentiation of oral carcinoma cells and that expression of KLF4 are suppressed by hypermethylation of the gene promoter. In regard to KLF5 expression, a region from +145 to +330 act as a minimal essential region and Sp3 binding to GC box was a indispensable event.

研究分野：口腔生化学

キーワード：口腔癌 KLF プロモーター

1. 研究開始当初の背景

(1) 多細胞が連なる上皮組織の発生と恒常性の維持には細胞分化のコントロールが不可欠であり、遺伝子転写因子群が決定的な役割を果たす。癌細胞では転写因子の発現秩序に乱れを生じ、癌細胞の表現型に様々な変化を引き起こす。その代表的なものとして、上皮-間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) がある。癌細胞 EMT は治療抵抗性等の高度悪性形質の獲得につながることから、そのメカニズムの解明は癌治療の標的として強く期待されている。

(2) 癌細胞 EMT をコントロールする転写因子の候補として **kruppel-like factor (KLF)** が挙げられる。**KLF4** は上皮細胞の分化を促進し、**KLF5** は脱分化を誘導すると考えられている。**KLF4** と **KLF5** の口腔癌での発現と意義はほとんど不明である。

2. 研究の目的

(1) 皮膚重層扁平上皮において **KLF4** は角化傾向にある細胞、**KLF5** は低分化状態にある基底細胞に発現することが知られているが、口腔上皮組織における発現は知られていない。口腔癌組織における発現もごく限られたものであり、一定の見解を得ていない。従って、**KLF4** と **KLF5** の正常口腔上皮と癌組織における発現と局在を明示することが必要となる。

(2) 口腔癌における **KLF4** と **KLF5** 発現の意義を明らかにするためには、細胞レベルでの表現型の変化を様々な角度から解析することが重要となる。

(3) 様々な癌組織で **KLF4** の発現が停止することが知られているが、そのメカニズムは不明である。癌組織において分化誘導遺伝子の発現停止はプロモーターの過メチル化が原因する 경우가多く、**KLF4** の口腔癌細胞における発現の消長との関連を明確にすることは大きな意味をもつ。

(4) **KLF4** 発現誘導には上皮基底細胞の **KLF5** 構成的発現の停止が重要である可能性が高い。そのメカニズムを理解するためには、**KLF5** 発現の基本要素を知ることが必要であるが、それを追求した研究はなされていない。**KLF5** 発現に不可欠なプロモーターの **minimal essential region (MER)** とその制御メカニズムを明確化することで、**KLF4** と **KLF5** による正常上皮・癌組織に果たす役割の理解に根本的なルールを確立できる。

3. 研究の方法

(1) ヒト正常口腔上皮および口腔癌組織 (n=67) のパラフィン包埋切片を用いて、

KLF4 と **KLF5** の発現を免疫組織学的に検討した。

(2) 複数の口腔癌細胞に **KLF4** あるいは **KLF5** の cDNA と short interfering RNA (siRNA) を導入し、癌細胞分化マーカーの発現と増殖能に対する影響を解析した。また、形態学的な変化について透過型電子顕微鏡で観察した。

(3) 口腔癌細胞株における **KLF4** mRNA の発現レベルを定量的に測定するとともに、**KLF4** 遺伝子プロモーターの GC-rich 領域のメチル化について bisulfite-modified sequence 法により解析するとともに、5-aza 処理による脱メチル化後の発現変化について定量的に測定した。

(4) **KLF5** 遺伝子上流の約 1.5 kbps を徐々に短くしたコンストラクトをルシフェラーゼプラスミドに繋いでレポーターアッセイを行った。MER の決定後、**KLF5** の基本的発現制御に働くと予想される転写因子との関連を各種ミュータント、cDNA、siRNA 等を用いて、定量的な RT-PCR やクロマチン免疫沈降法等で解析した。

4. 研究成果

(1) 免疫組織学的に、**KLF4** は正常口腔上皮の棘細胞~角化細胞、**KLF5** は基底細胞層とその直上の細胞に局在した。口腔癌組織においては、**KLF4** は癌巣中央部の細胞、**KLF5** は辺縁部の細胞に陽性であった。しかし、低分化型癌では **KLF4** は陰性で、**KLF5** は癌巣全体に陽性反応を示した。**KLF4** 陽性反応は高度悪性型癌で低下する傾向を示した。

(2) **KLF4** と **KLF5** の免疫組織学的な発現パターンの意義を探るため、口腔癌細胞に cDNA と siRNA を導入し、細胞分化マーカーに対する影響を中心に解析した。その結果、**KLF4** は癌細胞脱分化、**KLF5** は分化に対して抑制的に働くことが示唆された。透過型電子顕微鏡で観察したところ、上皮細胞分化の指標となるデスモゾームの形成が **KLF4** で促進、**KLF5** で抑制されることが明らかとなった (図1)。

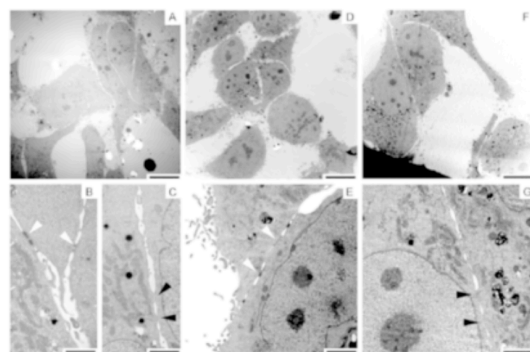


図1 Ultrastructure of KLF-transfected cells. OSC19 cells transfected with KLF4 cDNA (D, E), KLF5 cDNA (F, G) or vector alone (A-C) were observed by transmission electron microscope. KLF4-transfected cells developed desmosomes (open arrowheads), and KLF5-transfected cells had no apparent cell-cell adhesion structures (closed arrowheads). Cells transfected vector contacted with and without desmosomes. Bars = 10 μm (A, D, F) and 2 μm (B, C, E, G).

(3) KLF4 の発現停止は癌細胞分化形質成立に重要であると考えられる。我々は、これまでの研究から、癌細胞分化誘導遺伝子の多くがプロモーターの過メチル化により発現が抑制されることが明らかになっている。KLF4 に関しても、口腔癌細胞における内在性 KLF5 の発現レベルとプロモーター過メチル化が極めて密接に相関することが示され、5-aza による脱メチル化が KLF5 の発現を有意に回復することが明らかになった (図2)。これらのことから、口腔癌における KLF4 の発現停止にはプロモーターの過メチル化が関与していると考えられる。

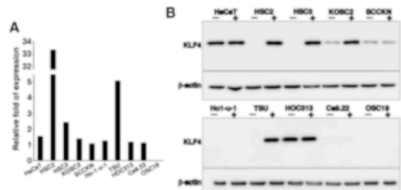


図2 Expression of KLF4 after the demethylation. A: Relative fold of KLF4 mRNA expression in cells treated with 5-aza demethylating reagent divided by the expression without 5-aza treatment (n=6). B: KLF4 protein expression in cells with (+) and without (-) 5-aza treatment were examined by immunoblot. β-actin was used as an internal control.

(4) KLF4 はプロモーター過メチル化に加えて、KLF5 によっても発現抑制を受けることが知られている。従って、KLF5 は KLF4 の上流の制御因子といえるが、その発現制御機構はほとんど不明である。遺伝子の発現には RNA ポリメラーゼをリクルートする転写複合体が形成されることが不可欠であり、その形成の場となるのが MER である。そこで、ヒト KLF5 遺伝子の一部とプロモーター領域 (-1, 576~+424 bp) を単離し、9種類の異なる長さをもつコンストラクトをルシフェラーゼレポータープラスミドにクローニングした。それらを口腔癌細胞等に導入してレポーターアッセイを行ったところ、+145~+330 に位置する 186 bp (GC1) が MER であることが明らかになった (図3)。

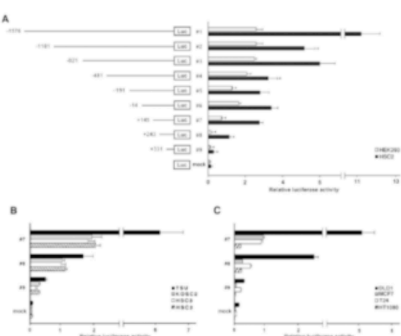


図3 Construction and expression of reporter genes. A: Luciferase reporter constructs (luciferase length of KLF5 promoter region (bp): 401, 401, 401, 401, 401, 401, 401, 401, 401) and the relative luciferase activity (fold increase) of reporter genes were measured (right panel). B: Relative luciferase activity of reporter genes was measured (left panel). C: KLF5 protein expression in cells transfected with the reporter constructs was examined by immunoblot. β-actin was used as an internal control.

MER には 6 つの GC box がクラスターを形成していたことから、これらが KLF5 の基本的発現に関わっている可能性が高い。そこで、各 GC box に変異をもつコンストラクトを作製し、レポーターアッセイを行った。その結果、+160~+174 の 1 か所の GC box がクリティカ

ルエレメントであることが確認された。GC box には転写因子である Spファミリーが結合することが知られている。重層扁平上皮細胞に発現する Sp1 と Sp3 について検討した。定量的クロマチン免疫沈降法を中心とした解析の結果、Sp3 が GC1 結合転写因子であることが判明し (図4)、Sp3 に対する siRNA と Spファミリーのインヒビターによってレポーター遺伝子と内在性 KLF5 遺伝子の発現が抑制されることが確認された。

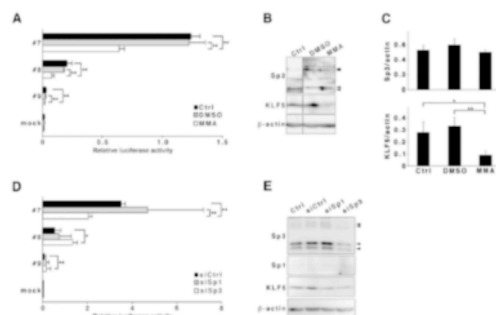


図4 Inhibition of KLF5 expression by Sp3. A: Relative luciferase activity of reporter genes (luciferase length of KLF5 promoter region (bp): 401, 401, 401, 401, 401, 401, 401, 401, 401) and the relative luciferase activity (fold increase) of reporter genes were measured (right panel). B: Relative luciferase activity of reporter genes was measured (left panel). C: KLF5 protein expression in cells transfected with the reporter constructs was examined by immunoblot. β-actin was used as an internal control. D: Relative luciferase activity of reporter genes (luciferase length of KLF5 promoter region (bp): 401, 401, 401, 401, 401, 401, 401, 401, 401) and the relative luciferase activity (fold increase) of reporter genes were measured (right panel). E: Relative luciferase activity of reporter genes was measured (left panel).

(5) 上記の研究成果から、KLF5 は口腔癌細胞の脱分化と癌の進行に密接な関連をもち、KLF5 発現には転写開始点近傍の 186 bp が MER として働くとともに、特に GC1 と Sp3 の結合が基本的発現を制御することが明らかになった。KLF5 遺伝子発現の抑制を含めた転写制御メカニズムの解明が口腔癌進行のメカニズムを理解する上で重要と考えられる。

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3件)

- ① Mihara N, Chiba T, Yamaguchi K, Sudo H, Yagishita H, Imai K. Minimal essential region for krüppel-like factor 5 expression and the regulation by specificity protein 3-GC box binding. Gene, 査読有, 601 巻, 2017, 36-43 <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2016.12.002>
- ② Yamaguchi A, Kuroyama K, Tokura A, Saito A, Arikawa F, Hasebe T, Usui D, Yamaguchi K, Chiba T, Imai K. Krüppel-like factor 4 expression in oral carcinoma cells and hypermethylation at the gene promoter. BMC Oral Health, 査読有, 16 巻, 2016, 13 DOI: 10.1186/s12903-016-0172-5
- ③ Shibata M, Chiba T, Matsuoka T, Mihara N, Kawashiri S, Imai K. Krüppel-like factors 4 and 5 expression and their involvement in differentiation of oral carcinomas. Int J Clin Exp Pathol, 査

読有, 8 卷, 2015, 3701-3709
www.ijcep.com/ISSN:1936-2625/IJCEP000
5833

[学会発表] (計 2 件)

- ① Mihara N, Chiba T, Sudo H, Imai K.
Promoter analysis of Krüppel-like
factor 5 gene. 93rd General Session &
Exhibition of the IADR, 2015
- ② 山口光祐、千葉忠重、美原希美、須藤遥、
今井一志、口腔癌細胞における
Kruppel-like factor 4 発現とプロモータ
ーのメチル化、第 57 回歯科基礎医学会学
術大会・総会、2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 一志 (IMAI, Kazushi)
日本歯科大学・生命歯学部・教授
研究者番号：10328859

(2) 研究分担者

千葉 忠成 (CHIBA, Tadashige)
日本歯科大学・生命歯学部・准教授
研究者番号：60350138

須藤 遥 (SUDO, Haruka)
日本歯科大学・生命歯学部・講師
研究者番号：20372980

(3) 連携研究者

美原 希美 (MIHARA, Nozomi)
日本歯科大学・生命歯学部・助教
研究者番号：00803264