

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09065

研究課題名(和文) ゲノムワイドエンハンサー解析を用いたTWIST1の変形性関節症寄与メカニズム解明

研究課題名(英文) Elucidating the mechanism of TWIST1 contribution to OA using genome-wide enhancer analysis

研究代表者

長谷井 嬢 (Hasei, Joe)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：40636213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Twist1強制発現細胞におけるトランスクリプトーム解析、NET-CAGE解析において、Twist1の発現がID1、ID2、Bmi1等の幹細胞性/未分化性関連遺伝子の発現と相関することが明らかとなった。そこでRNAseq、マイクロアレイデータの再解析を行い、Twist1と発現相関性の高い細胞表面マーカーの同定を試みた。その結果、Twist1は細胞表面タンパク質LRRC15と強く相関することがわかった。現在、LRRC15を標的とするADC薬の開発が進められており、本研究結果はLRRC15の治療標的としての妥当性を裏付ける結果であるといえる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TWIST1は軟骨だけでなく、発生や、腫瘍などにおいて広く重要な働きをしている転写因子である。本研究結果は、TWIST1が関わる重要な転写因子として働きの新たな一部を解明する手がかりになるものであり、今後、がん研究分野においてもつながるものであった。

研究成果の概要(英文)：Transcriptome and NET-CAGE analyses of TWIST1-expressing cells revealed that TWIST1 expression correlated with the expression of stemness/undifferentiability-related genes such as ID1, ID2, and Bmi1. Therefore, we reanalyzed RNAseq and microarray data to identify cell surface markers that are highly correlated with TWIST1 expression. We found that TWIST1 strongly correlated with the cell surface protein LRRC15. Currently, development of ADC drugs targeting LRRC15 is underway, and the results of this study support the validity of LRRC15 as a therapeutic target.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：TWIST1 転写因子

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

米国スクリプス研究所と共同で変形性膝関節症における新規治療標的分子同定のために大規模な RNA シークエンスを施行し、TWIST1 が OA 軟骨で非常に高発現している事を見出した。また TWIST1 が軟骨マトリックス成分に対して分解作用を有するマトリックスメタロプロテアーゼ-3 (MMP-3) を、そのプロモーター部分における 5-ヒドロキシメチルシトシン (5hmC) ステータスを介して制御している事を見出し証明した。TWIST1 はヒトの初期発生や筋・骨組織形成と再生、腫瘍における上皮間葉転換(Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT)など重要な生命現象を制御するマスター転写因子重要である。TWIST1 本来の機能を考えると、OA における TWIST1 発現の影響はほぼ未解明である。本研究では Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) トランスクリプトーム解析により TWIST1 が制御しうるエンハンサーを網羅的に検出し、TWIST1 が OA で引き起こす遺伝子発現変化について全く新しいメカニズムを提案する。

2. 研究の目的

OA 軟骨で TWIST1 が高発現している事は、我々が世界で初めて発見した現象である。その機能はほぼ解明されておらず、新規の取り組みである。TWIST1 は抑制性転写因子として知られており、それ以外の機能はわかっていない。我々は質量分析を用いて TWIST1 がヒドロキシメチル化を制御する TET1 など様々なエピジェネティック修飾タンパク質と相互作用することを発見している。これは新規の報告となり、学術的にも重要である。検出された相互作用タンパク質のうち、TEX10 は最近、スーパーエンハンサー制御に関わることが明らかになったタンパク質である(Cell Stem Cell, 2015)。勿論、TWIST1 が TEX10 と関わることも新規の知見であり、さらに、TWIST1 がエンハンサー制御に関わっていることを示唆する極めて重要な発見であった。本研究では、TWIST1 がどのエンハンサー・スーパーエンハンサーを制御しているのかをゲノムワイドに明らかにする。その解析には最近開発された改良 CAGE 法(共同研究者の村川、寺村ら、未発表)を用いる。以上により明らかになることは、一つの転写因子が転写 + エピジェネティクス(ヒドロキシメチレーション) + エンハンサー制御というトランスクリプトミクスに関わるほぼ全ての要素に関わるという、生物学的に極めて重要な知見である。TWIST1 は癌の転移、悪性化に関わる主要分子であり、OA 以外にも波及効果は大きい。実務的には、申請者は米国スクリプス研究所の Martin Lotz 教授と共同研究を行っておりヒト軟骨細胞を使用した研究を行うことができる。また臨床的には申請者は骨肉腫を専門領域としており、TWIST1 を中心に OA、癌への横断的な解釈と発展的研究が可能である。

3. 研究の方法

1. TWIST1 と結合するタンパクの網羅的解析

不死化ヒト軟骨細胞株(TC28)、軟骨細胞において TWIST1 を強制発現させ、LC-MS で TWIST1 と結合するタンパク質を網羅的に同定する。興味深いタンパク質について cDNA 発現系を作製しタグを付加した後、TWIST1 との共発現免疫沈降にてバリデーションを行う。既に共免疫沈降で結合するタンパクが検出されおり、TWIST1 がエンハンサーへ影響を与える現象の一端を捉えている。TWIST1 過剰発現には pcDNA3.1-TWIST1-Myc tag+を用いる予定であるが、導入効率が低い場合は、piggy bac を用いた Myc-TWIST1-IRES-Puro を用いて、薬剤選択をかけて恒常発現株を樹立してから免疫沈降を行う。

2. CAGE 法による網羅的エンハンサー解析

TC28 に Ad-TWIST1-IRES-GFP を用いて TWIST1 を高発現させ、FACS aria で GFP 発現のある細胞だけをソートし、TWIST1 高発現細胞株を集め、RNA 抽出を行う。分担者である理化学研究所の村上、寺村らにより全エンハンサー解析(図 4)、転写点同定を行う。双方向性転写が生じている領域と ChIPseq によるヒストンマーク (H3K4m1、H3K27ac) を目印にエンハンサーを同定する

3. TWIST1、TEX10 を標的とした Co-ChIPseq と複合体が影響を与えるエンハンサーの確定

ヒト軟骨細胞、TC28 細胞株へ TWIST1、TEX10 をそれぞれあるいは共過剰発現を行い、抗タグタンパク質抗体を用いて ChIPseq を行う。これにより複合体の結合で直接制御される領域を確定する。また、2 つの guideRNA を用いた CRISPR-deletion によりエンハンサーの除去を行い転写への影響を観察する。

4. 臨床検体 (OA 軟骨) を用いた CAGE と OA でのエンハンサー変化

ヒト正常、OA 軟骨組織を用いて CAGE 法によりエンハンサー変化を解析する。TWIST1 過剰発現時のエンハンサー変化を比較する事で、OA への関与も解析可能である。発展研究として TWIST1

低発現、高発現の骨肉腫細胞株を用いて CAGE を行い、異なる細胞種での機能の保存性を観察する。腫瘍における TWIST1 の解析は転移メカニズム解明への発展性を有する。

4. 研究成果

不死化ヒト軟骨細胞株(TC28)において TWIST1 を強制発現させ、LC-MS で TWIST1 と結合するタンパク質を網羅的に測定した。また、TC28 に Ad-TWIST1-IRES-GFP を用いて TWIST1 を高発現させたのち、FACS aria で GFP 発現のある細胞だけをソートし、TWIST1 高発現細胞株を集めて RNA 抽出を行った。このサンプルを分担施設である理研-HMC 臨床オミックス特別ユニットへ送付し、共同研究の形で、CAGE 法によりゲノムワイドにエンハンサー領域の検出を行った。近畿大学と共同で CAGE データの解析と、インフォマテイクス解析により TWIST1 関連エンハンサー領域候補の解析を行った。また並行して、TC28 に Myc タグを付加した TWIST1 を強制発現したサンプルを用いて、Myc 抗体でクロマチン IP を行い、バリデーション作業も行ったが、その再現性には確実性が十分ではなく、データとして確固たる信頼性には満たないものであった。そのため、TWIST1 について、別途実験を行った。昨年度までに実施した Twist1 強制発現細胞におけるトランスクリプトーム解析、NETCAGE 解析において、Twist1 の発現が ID1、ID2、Bmi1 等の幹細胞性/未分化性関連遺伝子の発現と相関することが明らかとなっていた。そこで本年度は RNAseq、マイクロアレイデータの再解析を行い、Twist1 と発現相関性の高い細胞表面マーカーの同定を試みた。その結果、Twist1 は細胞表面タンパク質 LRRC15 と強く相関することがわかった。現在、LRRC15 を標的とする ADC 薬の開発が進められており、本研究結果は LRRC15 の治療標的としての妥当性を裏付ける結果であるといえる。

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 長谷井 嬢
2. 発表標題 次世代シーケンサーを用いた変形性膝関節症発症メカニズムの解明
3. 学会等名 第132回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷井 嬢
2. 発表標題 TWIST1はヒト軟骨細胞において、DNAのヒドロキシメチル化によりMMP3発現を誘導し、軟骨異化を促進する
3. 学会等名 第32回日本軟骨代謝学会
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
研究分担者	寺村 岳士 (Teramura Takeshi) (40460901)	近畿大学・大学病院・講師 (34419)	
研究分担者	村川 泰裕 (Murakami Yasuhiro) (50765469)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・ チームリーダー (82401)	

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
---------	---------