

令和元年6月7日現在

機関番号：32667

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07147

研究課題名(和文) KLF5遺伝子発現制御機構の解析：上皮恒常性維持に関わる新たな分子的背景の解明

研究課題名(英文) Analysis of KLF5 expression and regulatory mechanisms: elucidation of the new molecular background involved in epithelium homeostasis

研究代表者

富山 希美(美原希美)(TOMIYAMA, Nozomi)

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：00803264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：上皮組織の恒常性維持には基底細胞の増殖と上皮細胞の分化のバランス保持が重要であり、中でもKLF5は上皮細胞の増殖・分化バランスを直接的に制御し、細胞分化とともに急速に発現を停止するが、そのメカニズムは明らかになっていない。KLF5遺伝子発現メカニズムを解明するにあたり、これまでに研究代表者はKLF5遺伝子の基本的な発現に關与する必要最小領域(minimal essential region、MER)ならびにそれに結合する主要転写因子を明らかにした。本研究ではKLF5遺伝子発現の制御機構としてKLF5発現を抑制的に制御するサイレンサー領域を解明し、それに関与すると考えられる転写因子を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮組織の恒常性維持には基底細胞の増殖と上皮細胞の分化のバランス保持が重要で、そこでは様々な要因が複雑に關与し増殖や分化に必要な分子を誘導・阻害する転写因子の発現が決定的な役割を担う。細胞表現型による遺伝子発現の制御メカニズムを正確に理解するためには、MERを含む基本要素の決定後に遠位DNA領域との相互作用について解明する必要があるが、KLF5遺伝子発現が細胞分化によりどのように制御されるかは全く不明である。

したがって、本研究の成果は上皮恒常性維持に関わる新たな分子学的背景を明示するとともに、新たな治療法が必要な疾患に対する社会的なニーズに大いに貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Epithelium homeostasis requires the proliferation-differentiation balance of epithelial cells. Above all, KLF5 dictates the proliferation-differentiation balance of epithelial cells, and KLF5 expression is rapidly arrested with cell differentiation, but its mechanisms is unknown. The previous study identified MER (minimal essential region) of KLF5 gene and the major transcription factor that binds to MER. In the present study, we identified the silencer region of KLF5 gene and the transcription factor relating to that region.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：KLF5 口腔癌 上皮恒常性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

上皮組織の恒常性維持には基底細胞の増殖と上皮細胞の分化のバランス保持が重要である。そこでは様々な要因が複雑に関与し、増殖や分化に必要な分子を誘導・阻害する転写因子の発現が決定的な役割を担う。中でも Krüppel-like factor 5 (KLF5) は上皮細胞の増殖・分化バランスを直接的に制御し、細胞分化とともに急速に発現を停止する(文献1)。転写因子を含む遺伝子の発現には、転写開始点近傍の必要最小領域(minimal essential region、MER)が基本要素となり、遠位にあるDNA領域(エンハンサーもしくはサイレンサー)との相互作用によって細胞の状況に応じた発現プログラムが実施される(文献2)。したがって、細胞表現型による遺伝子発現の制御メカニズムを正確に理解するためには、MERを含む基本要素の決定後に遠位DNA領域との相互作用について解明する必要があるが、KLF5遺伝子発現が細胞分化によりどのように制御されるかは全く不明である。

研究代表者は以前の研究により、KLF5のMERならびにそこに結合する主要転写因子を明らかにした(文献3)。しかしながら、MERと遠位にあるDNA領域との相互作用については依然として明らかになっていない。したがって、本研究によってKLF5発現制御機構を明らかにすることは、上皮恒常性維持に関わる新たな分子学的背景を明示するとともに、新たな治療法が必要な疾患に対する社会的なニーズに大いに貢献すると考えられる。

引用文献

- 1) McConnell and Yang, *Physiol Rev* 2010; 90: 1337-1381
- 2) Kim, *et al.*, *Cell* 2015; 162: 948-959
- 3) Mihara, *et al.*, *Gene* 2016;601: 36-43

2. 研究の目的

KLF5は上皮組織の恒常性維持に働き、口腔癌などの上皮性疾患で過剰に発現する。KLF5の発現は上皮細胞分化とともに停止するが、そのメカニズムは明らかになっていない。

本研究ではKLF5発現抑制機構を解析し、上皮組織恒常性維持と転写因子発現制御の連動性の理解と、口腔癌を含む癌の将来的な治療へ向けた可能性の探索に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) KLF5遺伝子におけるサイレンサー領域の決定

KLF5遺伝子の-1,577より上流の動物間で高く保存された領域をデータベースで検索した。同定された領域をBACクローンから単離し、ルシフェラーゼ遺伝子上流に繋いでレポーターアッセイ用プラスミドを構築した。プラスミドをヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株(HSC2細胞など)に導入し、48時間後のルシフェラーゼ発現量をルミノメーターで測定した。

-1,577までの領域を徐々に短くしたプラスミドを構築しレポーターアッセイを行い、KLF5発現抑制に関わる領域を限定化した。また、特定された領域とMERを繋いだコンストラクトを用いて、制御領域の活性を検証した。

(2) サイレンサーに結合する転写抑制因子とその結合配列の同定

特定されたサイレンサー領域のDNA塩基配列を複数のデータベースを用いて、結合が予想される転写因子を検索した。予想される転写抑制因子結合配列と転写抑制因子の結合をChIP assayにて解析し、予想される転写因子のsiRNAならびにcDNAを導入した細胞で転写活性を解析した。

4. 研究成果

(1) KLF5遺伝子におけるサイレンサー領域の決定

-2,897~+424を全長のクローンとし、-2,673、-2,415、-2,001、-1,576と徐々に短くしたクローンをHSC2ならびに293Tに導入しレポーターアッセイを行った結果、-2,001~-1,577間で活性値が上昇した(図1)。他の口腔癌細胞株(Ho-1-u-1、HSC3、KOSC2、Ca9-22)、他の悪性腫瘍由来細胞株(DLD1; 大腸癌由来細胞、MCF7; 乳癌由来細胞、T24; 膀胱癌由来細胞、HT1080; 線維肉腫由来)でも同様の結果が得られた。

また、全長クローンの-1,576~+144を欠失させてサイレンサー領域とMERを繋げたdelta(-1,576~+144)を作成しレポーターアッセイにて解析したところ、MERを含むクローン(+144~+424)よりも約60%活性値が減少した(図2)。

以上のことから、-2,001~-1,577の領域がKLF5遺伝子発現制御機構におけるサイレンサーの役割を果たすと考えられる。

(2) サイレンサーに結合する転写抑制因子とその結合配列の同定

-2,001~-1,577のDNA塩基配列を複数のデータベースで解析したところ、結合が予想される転写抑制因子としてCREBが存在した。ChIPアッセイにて-2,001~-1,577とCREBの結合を確認

したところ、-2,001~-1,577 の領域と CREB 抗体が濃度依存的に結合することが確認できた。

また、siRNA を用いて内在性 CREB をノックダウンさせた HSC2 にクローン-2,001 を導入しレポーターアッセイを行ったところ活性値は有意に上昇し、同様に CREB cDNA を導入しレポーターアッセイを行ったところ活性値はベースラインまで減少した (図 3)。

また、siRNA を用いて内在性 CREB をノックダウンさせたところ、内在性 KLF5 の発現量が上昇し、CREB cDNA を導入したところ内在性 KLF5 の発現量が減少した。

さらに、サイレンサーには複数の CREB の結合が予想されるサイトがあり、クローン delta(-1,576-+144)の CREB の結合が予想される各サイトに変異を導入しレポーターアッセイを行ったところ CREB site-2 mut、CREB site-3 mut で活性値が上昇し、どちらにも変異を導入した CREB site-(2+3) mut ではさらに活性値が上昇した (図 4)。加えて、定量的 ChIP にて変異を導入した各サイトへの CREB の結合量を解析したところ、CREB site-(2+3) mut で有意に CREB の結合量が減少した。

以上より、KLF5 遺伝子のサイレンサー上の CREB site-2 と CREB site-3 が KLF5 発現抑制制御に関与することが示唆された。

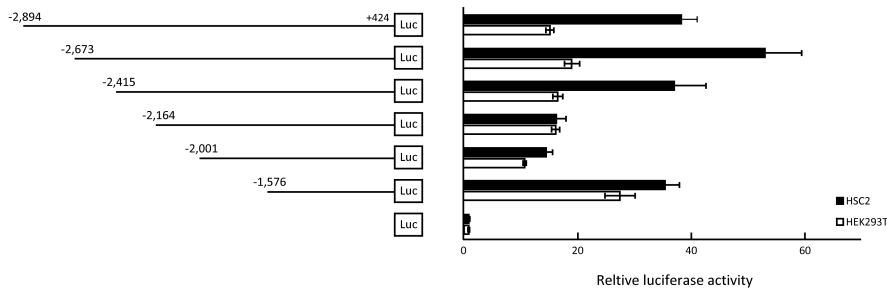


図 1

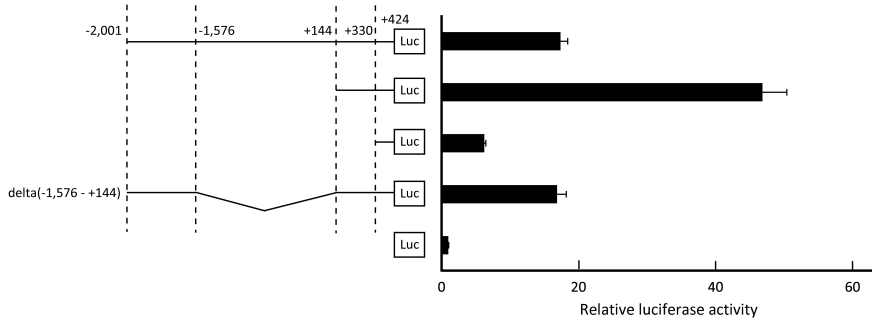


図 2

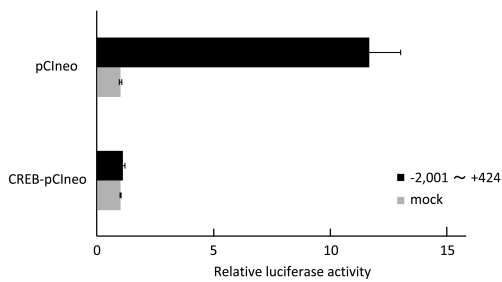


図 3

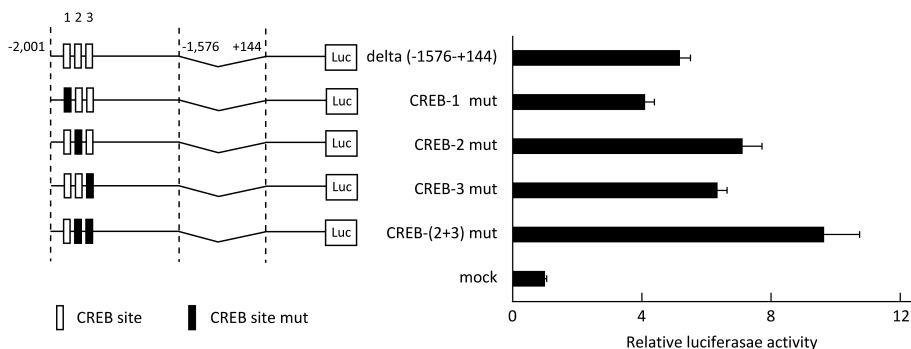


図 4

5. 主な発表論文等
現在投稿準備中である。

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。