

令和元年6月4日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15618

研究課題名(和文) 癌幹細胞性を賦与するBrd4による三次元ゲノム収束の解明

研究課題名(英文) Elucidation of three dimensional genome organization by Brd4 that confers cancer stemness

研究代表者

横山 雄起 (Yokoyama, Yuhki)

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)：卵巣癌細胞株を用いた研究を中心に計画していたが、大腸癌細胞株を用いた検討が順調に進捗したため、大腸癌に注力して研究を進めた。初年度の検討の結果、大腸癌においてもBETファミリータンパク阻害剤JQ1によって癌幹細胞関連遺伝子の発現が抑制されることを明らかにすることができた。そして、enChIP法による三次元ゲノム構造解析の結果、癌幹細胞関連遺伝子の一つであるKLF5遺伝子のエンハンサー候補領域を同定することができた。2年目はIn situ Hi-C実験を行い、KLF5遺伝子のエンハンサー領域がプロモーター領域と同じTAD内に含まれる可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌幹細胞は腫瘍組織内に少数存在し、抗がん剤耐性や自己複製能、高い腫瘍形成能を持つことから、再発や転移の原因として考えられている。そのため、癌幹細胞を標的とした治療法の開発が望まれている。本研究の成果はKLF5遺伝子をはじめとした大腸癌の幹細胞関連遺伝子がBETファミリータンパクによって構築される三次元ゲノム構造を介して制御されている可能性を示すものであり、癌幹細胞を標的とした治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We initially planned to conduct study mainly using ovarian cancer cell lines, but the study using colorectal cancer cell lines progressed smoothly. Therefore, we focused on the study for colorectal cancer. In the first year, we found that the expression of cancer stem cell related genes were suppressed by the BET family protein inhibitor JQ1 in colorectal cancer as reported in ovarian cancer. We focused on the KLF5 gene, which has been reported as one of the cancer stem cell related gene, and preceded the study. As a result of analysis by the enChIP method, the enhancer candidate regions of the KLF5 gene were identified. In the second year, in situ Hi-C experiment was performed, and we found that the enhancer regions of the KLF5 gene may be located in the same TAD (topologically associating domain) as the KLF5 gene promoter region.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：三次元ゲノム構造 エピジェネティクス 大腸癌 癌幹細胞

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

1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞 (Cancer stem cell:CSC) は自己複製能 (self-renewal) と多分化能を有する。CSC は腫瘍中に少数しか存在しないが、高い腫瘍形成能や薬剤耐性を示すことから癌再発・転移の根源となる。そのため、CSC がその幹細胞性を維持するための分子メカニズムの解明は今後のがん治療の方向性を大きく変える可能性を秘めている。

私たちは癌幹細胞性の維持はエピジェネティックな制御であると着想し、卵巣癌細胞株を用いた先行研究にて、エピジェネティクス阻害薬を用いたスクリーニング実験を行った。その結果、タンパク質のアセチル化などを認識する「エピジェネティックリーダー」に属する BET (Bromodomain and Extraterminal domain) タンパク質阻害剤が癌幹細胞分画を減らすことが分かり、この阻害剤が CSC に対する新規治療薬となる可能性が示唆された。

さらに私たちは卵巣癌の幹細胞関連遺伝子の一つである ALDH1A1 遺伝子が BET ファミリータンパクである BRD4 が形成する三次元ゲノム構造 (プロモーター・エンハンサーループ) によって発現制御されている可能性を示した。

2. 研究の目的

癌幹細胞関連遺伝子の発現調節機構を明らかにすることで、癌幹細胞を標的とした治療法の開発につながることを期待できる。組織特異的な遺伝子発現や、分化過程における各分化段階での lineage-specific な遺伝子発現の制御は厳密に行われており、それらがプロモーター・エンハンサー結合をはじめとした、三次元ゲノム構造によって調節されていることが明らかになってきている。私たちの先行研究から癌幹細胞関連遺伝子も三次元ゲノム構造を介して発現調節されている可能性が示唆された。したがって、本研究計画では、卵巣癌細胞株、大腸癌細胞株を用いて BRD4 タンパクによって形成される癌幹細胞特異的な三次元ゲノム構造を明らかにすることを目的とした。そのうち大腸癌細胞株を用いた検討が順調に進捗したため、大腸癌における癌幹細胞関連遺伝子の三次元ゲノム構造を介した発現調節機構の解明に注力し、研究を行なった。

3. 研究の方法

大腸癌細胞株 3 種 (HCT116, DLD-1, HT29) に対し、BET タンパク阻害剤である JQ1 を投与し、細胞増殖能への影響を検討した。

大腸癌細胞株 3 種 (HCT116, DLD-1, HT29) に対し、BET タンパク阻害剤である JQ1 を投与し、幹細胞関連遺伝子発現への影響を定量 PCR によって検討した。

癌幹細胞関連遺伝子の一つである KLF5 遺伝子のプロモーター領域に結合するゲノム領域 (エンハンサー領域) を同定するために Cas9 タンパクがガイド RNA (gRNA) を介して特定のゲノム領域に結合できる性質を利用して、特定のゲノム領域と結合する DNA、RNA、タンパク質を網羅的に同定することが出来る enChIP (engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation) 法による解析を行なった。

In situ Hi-C 法による三次元ゲノム構造の網羅的解析によって、enChIP 法で同定したエンハンサー候補領域とプロモーター領域が同じ TAD (Topologically associating domain) 内に存在するかどうかについて検討した。

大腸癌細胞株に BRD4 に特異的な阻害剤や BET ファミリータンパク BRD2, BRD3, BRD4 に対する siRNA を投与し、KLF5 遺伝子発現に与える影響について定量 PCR によって検討した。

4. 研究成果

大腸癌細胞株 3 種 (HCT116, DLD-1, HT29) に対し、BET タンパク阻害剤である JQ1 を投与した結果、すべての細胞株に対し濃度依存的に抗腫瘍効果を示した。

大腸癌細胞株 3 種 (HCT116, DLD-1, HT29) に対し、BET タンパク阻害剤である JQ1 を投与した結果、大腸癌の幹細胞関連遺伝子 (LGR5, LRIG1, BMI1, KLF5, ALDH1A1 など) の発現が低下した。

JQ1 投与により発現が低下した遺伝子の中から、三次元ゲノム構造による発現調節機構の存在が示唆されている KLF5 遺伝子に着目し、enChIP 法によって KLF5 遺伝子プロモーター領域に結合するエンハンサー候補領域の同定に取り組んだ。その結果、いくつかのエンハンサー候補領域を同定することができた。

In situ Hi-C 法による網羅的な三次元ゲノム構造解析の結果、KLF5 遺伝子のプロモーター領域と enChIP 法で同定したエンハンサー候補領域が同じ TAD 内に存在する可能性を示唆するデータを得た。

JQ1 は pan-BET タンパク質阻害剤であるため、どの BET ファミリータンパク質が KLF5 遺伝子の発現に重要であるかについて、BRD4 に特異的な阻害剤や siRNA を用いて検討を行ったところ、BRD4 が KLF5 遺伝子の発現に最も関わっており、他の BET ファミリータンパク質である BRD2 や BRD3 による影響は少ないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1.

学会名等：KEYSTONE SYMPOSIA 3D Genome:Gene Regulation and Disease

発表者名：Yuhki Yokoyama, Takashi Takeda, Kumi Kitagawa, Daisuke Okuzaki,
Toshitsugu Fujita, Hodaka Fujii, Hirofumi Yamamoto

発表標題：The identification of KLF5 enhancer region in colorectal cancer

発表年：2019 年

2.

学会名等：第 77 回日本癌学会学術総会

発表者名：横山雄起、武田和、北川公望、森誠司、水島恒和、森正樹、松浦成昭、山本浩文
発表標題：BET 阻害剤は ALDH1A1 遺伝子のスーパーエンハンサーを標的として卵巣癌の
ALDH 活性を抑制する

発表年：2018 年

3.

学会名等：第 77 回日本癌学会学術総会

発表者名：武田和、横山雄起、北川公望、三吉範克、高橋秀和、原口直紹、西田尚弘、畑泰司、
松田宙、水島恒和、土岐祐一郎、森正樹、山本浩文

発表標題：大腸癌細胞株における BET 阻害剤 JQ1 の効果

発表年：2018 年

〔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。