

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07664

研究課題名(和文) SATB1による異所的なスーパーエンハンサー形成と乳がん悪性化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of ectopic formation of super enhancers by SATB1 for breast cancer malignancy

研究代表者

富松 航佑 (Tomimatsu, Kosuke)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：00614926

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)：本研究では良性の乳がん細胞の悪性化過程で転移関連遺伝子周辺に形成されるスーパーエンハンサー(SE)とSATB1の関連性及びその作用機序を明らかにすることを目的とした。良性乳がん細胞MCF-7におけるSATB1の強制発現は一過的な悪性化の誘導しかできなかった。そこで上皮間葉転換(EMT)の安定した系を持つ肺がん細胞株A549を用いて、EMTの時間経過とSEの形成変化をBRD4のChIP-Seqで解析した。その結果、EMTに伴うSEのゲノムワイドな再構成が生じていることが確認された。またEMT時間経過によりSEにエンリッチする転写因子のモチーフが異なることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、がん細胞が転移能を獲得する過程で(EMT)、時間経過に伴いSEのゲノムワイドな分配パターンが変化することを示した。SEにエンリッチする転写因子のモチーフはEMTの時間経過に伴い変化することから、特定の転写因子の機能を阻害することでがん細胞の転移能獲得を遅延または阻害できる可能性が示された。マウスやIn vitro実験による検証は必要ではあるが、将来的ながんの治療標的となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to determine the association of SATB1 with super-enhancers (SEs) formation around metastasis-related genes during the malignant transformation of breast cancer cells. Forced expression of SATB1 in non-invasive breast cancer cell line MCF-7 transiently indicated malignant phenotypes. It was difficult to use as the cancer progression model. Therefore, we used a lung cancer cell line A549, which can be stably induced epithelial-mesenchymal transition (EMT), to analyze time-dependent SE formation by BRD4 ChIP-Seq. The results indicated that SEs were reorganized during EMT. It was also shown that the motifs of transcription factors enriched in SEs were altered during EMT.

研究分野：細胞生物学

キーワード：スーパーエンハンサー 乳がん SATB1

1. 研究開始当初の背景

組織ごとに異なる細胞の遺伝子発現パターンは、細胞種特異的なエンハンサーの形成によって制御されている。とりわけ、細胞種のアイデンティティや生物学的に重要なプロセスを決定するような遺伝子は、“スーパーエンハンサー(SE)”と呼ばれる高密度なエンハンサー集合体の形成と、そのゲノム領域の高次構造の変化によって高発現が誘導される。その一方で異所的な SE の形成は、時にその細胞系譜に不要な遺伝子の高発現を促し、細胞本来の性質を大きく変化させる。

SATB1 は、クロマチン構造を再編成して遺伝子を制御するゲノムのオーガナイザーである。上皮組織や T 細胞の分化において遺伝子の発現プロファイルを調節すると考えられており、その中でも制御性 T 細胞(Treg)特異的な SE 形成に必要であることが報告されている (Nat Immunol 2017,18:173)。一方 SATB1 は、乳がん細胞の悪性度に依存して発現の上昇が見られ、転移関連遺伝子の発現を誘導する事でがんの悪性化を促す (Nature 2008,452:187)。申請者が良性と悪性の乳がん細胞株の外部データを用いてエピゲノム解析を行なった所、SATB1 依存的に誘導される転移関連遺伝子のいくつかは SE を形成していた。しかしながら形成される SE への SATB1 の作用機構や異所的な転移関連遺伝子の発現に至るまでの過程についてはほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では良性の乳がん細胞の悪性化過程で転移関連遺伝子周辺に形成される SE と SATB1 の関連性及びその作用機序を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1. SATB1 誘導システムの作製

良性の乳がん細胞に SATB1 を発現させると転移関連遺伝子の活性化が起こり、細胞は転移能を獲得することが報告されている (Nature 2008,452:187)。そこでまず悪性度の低い MCF-7 と SKBR3 細胞株にドキサイクリン(Dox)誘導性 SATB1 のベクターを導入し、時間の経過における遺伝子発現の変化を qPCR で、非接着性増殖能の獲得をコロニーフォーメーションアッセイで評価する。その比較対象として、SATB1 を発現する悪性乳がん細胞株 MB-231 細胞を用いる。さらにこの MB-231 細胞株では、SE の構造体である BRD4 の核内凝集体が蛍光免疫染色にて頻りに観察されるため、SATB1 を誘導した MCF-7 と比較して SE 形成の影響を観察する。

2. ChIP-seq による SATB1 の結合領域の解析

乳がん及び他のがん細胞における SATB1 の機能と悪性化へのプロセスについては未解明の部分が多い。そこで SATB1 が結合する DNA 配列の情報を網羅的に取得する。まず SATB1 を誘導した MCF-7 細胞を用いて SATB1 の ChIP-seq を行うことで、SATB1 の結合する DNA 配列情報を取得する。次に BRD4 の ChIP-seq を行い、データを比較することで SATB1 の結合領域と SE 形成が関連する部位を特定する。SATB1 と BRD4 の重なる領域にエンリッチするモチーフを解析することで、SATB1 が SE 形成と関わる転写因子の候補を探索する。

3. 候補因子を標的にした表現系の解析

SE 形成に関わる転写因子の候補について、培養細胞を用いた系で阻害やノックダウンを行

い SATB1 存在下における転移能への影響について解析する。また SE が形成される領域にプローブをデザインした Immuno-FISH 法を行い、遺伝子領域周辺の SE が、SE の構造体である BRD4 の核内凝集体と共局在するか、また候補因子の阻害により局在が変化するかを検討する。以上の解析によって、SATB1 が乳がんの悪性化に関わる新規機構、共有因子、影響する表現系を明らかにする。

4 . 研究成果

SATB1発現による乳がんの悪性化モデルを構築するため、非浸潤性乳がん細胞株MCF-7にSATB1を強制発現させ、SATB1の発現上昇をqPCRで確認し、細胞の表現系変化をコロニー形成試験と遊走試験で検討した。その結果、SATB1の強制発現後1週間はコロニー形成や遊走能の上昇などががん細胞の悪性化の表現系を示すが、その後は通常のMCF-7の表現系と変わらない結果となり評価が困難であった。そこで上記した乳がん悪性化の系と併行して、上皮間葉転換(EMT)の安定した系を持つ肺がん細胞株であるA549を用いて、SATB1とSE形成変化の関連性について調べることが可能か検討を行なった。A549細胞はshRNAによるSATB1の発現抑制によって細胞の増殖能や遊走浸潤能が低下することが報告されている。まずA549細胞をTGFβ処理することでEMTを誘導する系を構築した。TGFβ処理後96時間で上皮系マーカーのE-Cadherin発現が減少し、N-Cadherin発現が上昇したことでEMTが誘導されていることが示された。またEMT誘導によるA549細胞の遊走能及び浸潤能の増加を細胞遊走または浸潤試験で確認した。EMT誘導したA549細胞について、時系列に取得された外部RNA-seqデータを解析した結果、EMT誘導後12時間で転写因子の発現が一過的に上昇し、72時間後にEMTマーカーが発現上昇する動的な変動を示した。表現系の明確な変化に付随して遺伝子発現変動が見られたことから、EMTの過程ではゲノム上エンハンサーの再分配が生じている事が考えられる。そこでSEの構成要素であるBRD4のChIP-seqをEMT誘導後0、12、96時間のサンプルを用いて行ったのちSEプロファイルを解析した。その結果EMT誘導前のSEプロファイルと比較してEMTを誘導することでSEが再分配されていることが確認された。またTGFβ処理後12時間と96時間で、SEにエンリッチする転写因子のモチーフを解析した結果、12時間と96時間で異なる転写因子のモチーフがエンリッチすることが示された。これらの結果からがん細胞の悪性化の過程における動的なSEの変化は、発現する転写因子に依存することが考えられた。今後は、候補の転写因子に対する阻害剤やロックダウンを行う検証及び、SATB1ロックダウンによるSEの変化の解析が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Qianmei Wu, Takeru Fujii, Akihito Harada, Kosuke Tomimatsu, Atsuko Miyawaki-Kuwakado, Masatoshi Fujita, Kazumitsu Maehara, Yasuyuki Ohkawa. | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Genome-wide analysis of chromatin structure changes upon MyoD binding in proliferative myoblasts during the cell cycle. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 J Biochem. | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvab001. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Nagasawa Masayuki, Tomimatsu Kosuke, Terada Koji, Kondo Kenta, Miyazaki Kazuko, Miyazaki Masaki, Motooka Daisuke, Okuzaki Daisuke, Yoshida Tetsuya, Kageyama Susumu, Kawamoto Hiroshi, Kawauchi Akihiro, Agata Yasutoshi | 4. 巻 526 |
| 2. 論文標題 Long non-coding RNA MANCR is a target of BET bromodomain protein BRD4 and plays a critical role in cellular migration and invasion abilities of prostate cancer | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 128 ~ 134 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.03.043 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Hirai Seiya, Tomimatsu Kosuke, Miyawaki-Kuwakado Atsuko, Takizawa Yoshimasa, Komatsu Tetsuro, Tachibana Taro, Fukushima Yutaro, Takeda Yasuko, Negishi Lumi, Kujirai Tomoya, Koyama Masako, Ohkawa Yasuyuki, Kurumizaka Hitoshi | 4. 巻 50 |
| 2. 論文標題 Unusual nucleosome formation and transcriptome influence by the histone H3mm18 variant | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Nucleic Acids Research | 6. 最初と最後の頁 72 ~ 91 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkab1137 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Miyawaki Kuwakado Atsuko, Wu Qianmei, Harada Akihito, Tomimatsu Kosuke, Fujii Takeru, Maehara Kazumitsu, Ohkawa Yasuyuki | 4. 巻 26 |
| 2. 論文標題 Transcriptome analysis of gene expression changes upon enzymatic dissociation in skeletal myoblasts | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Genes to Cells | 6. 最初と最後の頁 530 ~ 540 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12870 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Tomimatsu K, Bihary D, Olan I, Parry AJ, Schoenfelder S, Chan ASL, Slater Guy StC, Ito Y, Rugg-Gunn PJ, Kirschner K, Bermejo-Rodriguez C, Seko T, Kugoh H, Shiraishi K, Sayama K, Kimura H, Fraser P, Narita M, Samarajiwa SA, Narita M | 4. 巻 2 |
| 2. 論文標題 Locus-specific induction of gene expression from heterochromatin loci during cellular senescence | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Nature Aging | 6. 最初と最後の頁 31 ~ 45 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s43587-021-00147-y | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Maehara Kazumitsu, Tomimatsu Kosuke, Harada Akihito, Tanaka Kaori, Sato Shoko, Fukuoka Megumi, Okada Seiji, Handa Tetsuya, Kurumizaka Hitoshi, Saitoh Noriko, Kimura Hiroshi, Ohkawa Yasuyuki | 4. 巻 17 |
| 2. 論文標題 Modeling population size independent tissue epigenomes by ChIL seq with single thin sections | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Systems Biology | 6. 最初と最後の頁 e10323 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/msb.202110323 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 富松航佑 |
| 2. 発表標題 細胞老化における特異的ヘテロクロマチン領域からの遺伝子発現誘導 |
| 3. 学会等名 第14回日本エピジェネティクス研究会 |
| 4. 発表年 2021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 |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|