

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K16777

研究課題名（和文）大腸癌における転写因子KLF5蛋白複合体の機能解明と創薬応用

研究課題名（英文）Functional analysis of Kruppel-like factor 5 (KLF5) protein complex in colorectal cancer and its application to drug discovery

研究代表者

辻 賢太郎 (Tsuji, Kentaro)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：00835712

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：KLF5は大腸癌の発生において重要な役割を担う転写因子である。KLF5が生体内でどのような分子と相互作用して腸粘膜上皮の腫瘍化をもたらすのかが明らかになれば、創薬の標的となりうる新たな分子経路の特定に繋がる。本研究では、多くの夾雑物を含む生体組織由来の蛋白抽出液からKLF5とその結合分子からなる蛋白複合体を精度高く分離する方法を開発すべく、目印となるタグ蛋白を2種類結合させたKLF5蛋白を発現する大腸癌モデルマウスを作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特定の蛋白を精製するために一般に用いられる免疫沈降法では、目的とする蛋白以外の分子が反応に用いる抗体に非特異的に結合することが精製物の純度を下げる原因となる。特に、多彩な細胞や細胞外基質からなる生体組織に由来する蛋白粗抽出液は、とりわけ夾雑物の多さが蛋白精製の阻害要因となっていた。本研究で作製した大腸癌モデルマウスでは、精製の際の目印となるタグ蛋白がKLF5蛋白に2種類付加されている。このマウスの組織から蛋白を抽出し、各タグ蛋白に結合する2種類の抗体を用いた免疫沈降法を順次行うことで、より高い純度でのKLF5蛋白複合体精製が可能になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：KLF5 is a transcription factor that plays an important role in the development of colorectal cancer. The better understanding of how KLF5 interacts with co-transcription factors or other molecules during the tumorigenesis of colorectal cancer could lead to the identification of novel druggable molecular pathways. In this study, we generated a mouse model of colorectal cancer expressing double-tagged KLF5 protein, which enable us to purify KLF5 protein complexes with higher specificity from tumor tissue-derived crude protein extracts.

研究分野：病理学

キーワード：KLF5 大腸癌 モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は本邦のがん死亡の2位を占める重要な疾患である。中でも遠隔転移を有する期の進行大腸癌は、5年生存率19%と依然予後不良である(がん診療連携拠点病院等院内がん登録生存率集計2012-2013年)。大腸癌に適応のある分子標的薬として抗EGFR抗体薬や免疫チェックポイント阻害薬が挙げられるが、RAS遺伝子変異やマイクロサテライト不安定性などの条件により適応症例が限定されるため、これらの治療薬の恩恵を受けられない進行大腸癌患者も少なからず存在する。そのため、より高い抗腫瘍効果を持ち、かつ広い症例に適応可能な新規治療薬の開発が必要である。

Wnt/ β -cateninシグナル経路の異常は大腸癌の90%以上で見出される重要な遺伝子変異である。 β -cateninはWntシグナルのメディエーターとして転写因子TCF/LEFと結合し、Cyclin D1やc-Mycなどの遺伝子の発現を促進して細胞の増殖や分化を制御する。Wntシグナルが活性化した状態では β -cateninの分解が阻害されて核内移行が促進され、発癌に関与すると考えられている。これらの知見から、以前よりWntシグナル経路を標的とした癌治療薬の開発が試みられてきた。しかし、Wntシグナル経路は正常組織の恒常性維持にも重要な役割を担っているため、副作用等の問題がありいまだ臨床応用には至っていない。そのため、創薬標的となりうる新たなWnt関連分子の同定が望まれてきた。

KLF5はKruppel-like factorファミリーに属するzincフィンガー型転写因子である。本分子は心血管病において胎児型平滑筋ミオシン重鎖の発現を誘導する転写因子として見出され、その後種々の臓器での発生分化、幹細胞維持、癌の発生など多彩な機能を有することが明らかになっている。大腸癌との関連では、腸上皮幹細胞に β -catenin活性化変異を誘導すると腫瘍化が生じるが、 β -catenin活性化と同時にKLF5をロックアウトすると腫瘍形成がほぼ完全に抑制されることが報告されている[1]。大腸癌におけるKLF5の機能の重要性についてはこの他にも種々の報告がなされている。ただしその分子機構の全貌はほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究は、正常腸組織と腸腫瘍組織それぞれにおけるKLF5蛋白複合体を比較解析することで、腫瘍組織で特異的に見出されるKLF5と他分子との相互作用を明らかにし、大腸癌治療のための新たな創薬標的を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) タグ蛋白付きKLF5発現大腸癌モデルマウスの作製

KLF5蛋白が生体組織内で他のどのような分子と相互作用して機能を果たしているのかを明らかにするため、KLF5と結合する蛋白を質量分析法により網羅的に同定することを本研究の第一の課題とした。

質量分析で精度の高い分析結果を得るためには、KLF5が他の蛋白と結合して蛋白複合体を形成した状態を保ったまま高純度でKLF5蛋白を精製する必要がある。特定の蛋白を精製するために一般に用いられる免疫沈降法では、目的とする蛋白に対する抗体を結合させた磁気ビーズを蛋白の粗抽出液に添加して反応させ、反応後に磁石でビーズを回収することにより抗体に結合した蛋白を精製・濃縮する。しかし、この過程で目的とする蛋白以外の分子が抗体結合ビーズに非特異的に結合する場合があります。この現象が蛋白複合体の純度を下げ原因となっている。特に、多彩な細胞や細胞外基質からなる生体組織由来する蛋白粗抽出液は、培養細胞由来抽出物と比較してもとりわけ夾雑物が多いことが問題であった。

この問題を克服するための方法として、タグと呼ばれる小さな蛋白を2種類人工的に付加したKLF5蛋白が発現する大腸癌モデルマウスを作製した。このマウスの腸に発生した腫瘍組織と正常腸組織とを採取し、それぞれから蛋白を抽出して、各タグを特異的に認識する抗体を用いた免疫沈降法を順次行うことで、KLF5蛋白複合体の分離精製を試みた。

(2) KLF5非アセチル化変異大腸癌モデルマウスの作製

KLF5アセチル化は転写活性を亢進させ、細胞増殖を促進することが報告されている[2]。転写コアクチベーターとして知られるp300はKLF5をアセチル化する一方、ヒストンシャペロンとして知られるSETはp300によるKLF5アセチル化を阻害するとされる。しかしこれらの知見は細胞レベルでの研究によるものであり、個体レベルでのKLF5アセチル化と細胞増殖や腫瘍形成に関する知見は乏しい。

そこで、KLF5を介した大腸癌発生の分子機構をKLF5アセチル化の観点からも分析するた

め、KLF5のアセチル化を阻害する遺伝子改変が施された大腸癌モデルマウスを作製した。

4. 研究成果

(1) タグ蛋白付き KLF5 発現大腸癌モデルマウスの作製

作製した大腸癌モデルマウスの腸組織には再現性高く腫瘍が発生することが確認された(図1)。また、これらの腸組織から抽出した蛋白粗抽出液中にタグ付き KLF5 蛋白が含まれることを確認した(図2)。本マウスの作製により、腸腫瘍における KLF5 蛋白複合体解析に供するための組織試料を安定的に得ることが可能になった。



図1：マウス腸組織での腫瘍形成

Aは正常腸組織。大腸癌モデルマウスの腸組織(B)は、腸上皮の腫瘍性増殖により腸管の腫大と腸粘膜の不整な肥厚を示した。

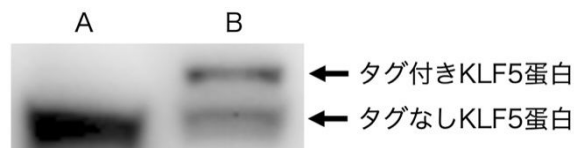


図2：抗 KLF5 抗体を用いたウェスタンブロット法

タグ付き KLF5 を片アレルに持つ大腸癌モデルマウスの腫瘍組織(B)は、分子量の異なる2種類の KLF5 蛋白(タグあり・タグなし)を発現した。タグ付き KLF5 蛋白は野生型 KLF5 蛋白と比較して分子量が大きいため、ウェスタンブロットで2本のバンドが区別される。野生型マウス腸組織(A)は野生型 KLF5 蛋白のみを発現した。

続いて、先述の方法で抗タグ抗体による免疫沈降法を行った。正常腸組織では、この方法で十分な品質および量の KLF5 蛋白複合体を精製することが可能であったが、腫瘍組織に由来する蛋白抽出液からの免疫沈降法は条件検討に難渋し、分析可能な KLF5 蛋白複合体試料の確保に至らなかった。免疫沈降法の精度と沈降効率の改善は今後の検討課題である。

(2) KLF5 非アセチル化変異大腸癌モデルマウスの作製

ゲノム DNA の PCR 法により各マウス個体の遺伝子型を判定し、大腸癌モデルマウスに KLF5 非アセチル化変異が導入されたことを確認した。本マウスの作製により、KLF5 アセチル化が腸腫瘍の発生・増殖に及ぼす影響を個体レベルで検証することが可能になった。ただし研究期間中に十分な個体数が得られなかったため、本マウスと KLF5 野生型の大腸癌モデルマウスとの詳細な比較は今後の検討課題とした。

なお、論文発表に至っていない内容を含むため、本報告書には実験手法や結果についての詳細な記載を差し控えたことを申し添える。

<引用文献>

- [1] Nakaya T, Ogawa S, Manabe I, et al. (2014). KLF5 regulates the integrity and oncogenicity of intestinal stem cells. *Cancer research*, 74(10), 2882-2891.
- [2] Miyamoto S, Suzuki T, Muto S, et al. (2003). Positive and negative regulation of the cardiovascular transcription factor KLF5 by p300 and the oncogenic regulator SET through interaction and acetylation on the DNA-binding domain. *Molecular and cellular biology*, 23(23), 8528-8541.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsuji Kentaro, Kawata Hirotooshi, Kamiakito Tomoko, Nakaya Takeo, Tanaka Akira	4. 巻 235
2. 論文標題 RNA-binding protein 14 promotes phase separation to sustain prostate specific antigen expression under androgen deprivation in human prostate cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 106407 ~ 106407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jsbmb.2023.106407	査読の有無 有
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 Takeo Nakaya, Kenichi Aizawa, Yuki Taguchi, Kentaro Tsuji, Sachi Sekine, Kazuhiro Murakami, Masaji Kasai, Hirofumi Nakano, Yasumitsu Kondoh, Shingo Dan, Atsushi Yoshimori, Hiroyuki Kouji, Dai Takehara, Toru Suzuki, Hiroyuki Osada, Masayuki Murata, Akira Tanaka, Ryoza Nagai	4. 巻 13
2. 論文標題 Development of Low-Molecular-Weight Compounds Targeting the Cancer-Associated KLF5 Transcription Factor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 687,694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.1c00721	査読の有無 有
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0件

〔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
---------	---------