

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09077

研究課題名(和文) KLF5が形づくる三次元ゲノム構造の解明

研究課題名(英文) Identification of KLF5 related three-dimensional genome structure

研究代表者

大塚 正久 (Otsuka, Masahisa)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：20597455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、転写因子KLF5タンパクによって形成される三次元ゲノム構造を標的とした新たな癌治療法の開発に繋げることを目的として、in vitro enChIP法などのゲノム解析技術を用いた詳細な検討を行った。その結果、癌の悪性化や幹細胞性に関与するとされる遺伝子Aのプロモーター領域が様々な癌で高発現が報告されているNR2F2遺伝子プロモーター領域と三次元的に結合しており、両遺伝子の発現が協調的に制御されている可能性を示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

三次元ゲノム構造を介した遺伝子発現制御メカニズムは近年着目されており、三次元ゲノム構造を標的とした癌治療法は新たなアプローチとなりうる。KLF5タンパクは消化器癌や扁平上皮癌などの種々の癌種で発現が亢進しており、幹細胞性との関連も報告されていることから有望な治療標的であり、本研究で取り組んだKLF5タンパクによって形作られる三次元ゲノム構造を介した遺伝子発現制御メカニズムの解明は新たな治療法の開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：KLF5 is a transcription factor which is reported to be up-regulated in certain cancer types such as gastrointestinal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. In our previous studies, we showed that KLF5 protein was involved in the establishment and maintenance of three-dimensional genome structure.

In this study, we investigated the three-dimensional genome structure engaged by a transcription factor KLF5 protein using genome analysis techniques such as in vitro enChIP method to develop a new cancer therapy. Based on our results of KLF5 ChIP-sequencing and database analysis, we focused on gene A, which is associated with the malignancy and stemness of cancer. We found that the promoter region of gene A interacted with the promoter region of NR2F2 gene, which is reported to be highly expressed in various cancers. Our data also suggest that the expression of gene A and NR2F2 is coordinately regulated through the three-dimensional genome structure.

研究分野：消化器外科、腫瘍生物学

キーワード：KLF5 三次元ゲノム構造

1. 研究開始当初の背景

細胞核内の DNA (ゲノム) は三次元構造をとっており、近年の研究でこの三次元ゲノム構造が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 な遺伝子発現などを厳密に制御していることが明らかとなってきている。三次元ゲノム構造による遺伝子発現制御機構として最も研究が進んでいるのはプロモーターとエンハンサーの間で形成されるループ構造である。エンハンサーは遺伝子発現制御に関わる DNA 領域の一つであり、標的とする遺伝子領域から離れた上流ないしは下流に存在し、標的遺伝子近傍に位置するプロモーターとループ構造 (三次元構造) を形成することで転写を促す。

KLF5 は KLF (Kruppel-like factors) ファミリーに属するジンクフィンガー転写因子であり、消化器腺癌や扁平上皮癌といった特定の癌種において発現が亢進していることが報告されている。正常腸管では陰窩底において活発に分裂している細胞で高く発現している。大腸癌では発癌に重要な癌幹細胞マーカーとしての報告もあり、治療標的としても有望である。2018 年に Zhang らにより頭頸部癌細胞、2022 年に当グループにより大腸癌細胞における KLF5 のエンハンサー領域が同定され、KLF5 遺伝子が三次元ゲノム構造による発現制御機構を有することが明らかとなった。

さらに私たちは、*in vitro* enChIP-seq (engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation sequencing) 法によるゲノム解析によって、KLF5 遺伝子のプロモーター領域が異なる染色体上に存在する CCAT1 (Colon Cancer Associated Transcript) の遺伝子領域と結合していることを明らかとし、KLF5 遺伝子と CCAT1 遺伝子の三次元的ゲノム結合領域に KLF5 タンパクが存在していることについても報告した。これらの結果は KLF5 が三次元ゲノム構造を構成する上での key 蛋白であり、種々の癌幹細胞関連遺伝子発現の調整因子としても働く可能性を示唆している。

2. 研究の目的

KLF5 タンパクは転写因子であるため、標的遺伝子のプロモーター領域に結合し、遺伝子発現を制御していると考えるのが一般的であるが、私たちは KLF5 タンパクが三次元的にゲノム結合している領域にも存在していることを見いだした。三次元ゲノム構造の構築に関わるタンパクとしてはメディエーター複合体やコヒーシ複合体、BET ファミリータンパクなどが知られているが、転写因子である KLF5 が三次元ゲノム構造の構築に関わっているという報告はこれまでなかった。そこで本研究では、KLF5 によって構築される三次元ゲノム構造を ChIP-seq, RNA-seq, *in vitro* enChIP-seq 法などの遺伝子発現、ゲノム解析技術を用いることによって同定し、癌細胞において重要な三次元ゲノム構造を標的とした新たな治療法の開発につなげることを目的として研究を行なった。

3. 研究の方法

1. ChIP-seq 解析による KLF5 タンパク結合領域の同定

大腸癌細胞株に対し、抗 KLF5 抗体を用いた ChIP-seq (Chromatin Immunoprecipitation sequencing) 解析を行い、KLF5 タンパクがゲノム上のどの領域に存在するかを検討する。また、パブリックデータベース (ChIP Atlas: <https://chip-atlas.org/>等) を用いた *in silico* 解析も並行して行なった。

2. KLF5 タンパクが形成する三次元ゲノム構造によって発現が制御されている可能性がある遺伝子の選定

大腸癌細胞株に KLF5 の siRNA を投与し、発現が変化する遺伝子を RNA-seq 解析で同定した。その中から ChIP-seq で得られた結果をもとに KLF5 タンパクが形成する三次元ゲノム構造を介して発現が制御されている可能性がある遺伝子を絞り込んだ。

3. *In vitro* enChIP-seq 法による三次元ゲノム構造の網羅的解析

上記 2 で絞り込んだ遺伝子のプロモーター領域と三次元的に結合するゲノム領域を大腸癌細胞株を用いて、*in vitro* enChIP-seq 法にて網羅的に検討を行なった。このようにして同定した三次元ゲノム構造のうち、特定のプロモーター・プロモーター間で構築される三次元ゲノム構造に着目し、この三次元的結合が両遺伝子発現に与える影響について、片方の遺伝子のプロモーター

活性を変化させた際に対となる遺伝子の発現にどのような影響が生じるかについて CRISPR/Cas9 システムを応用した技術である CRISPRa 法を用いて検討を行なった。

4. 研究成果

まず始めに、大腸癌細胞株に対し、抗 KLF5 抗体を用いた ChIP-seq (Chromatin Immunoprecipitation sequencing) 解析とパブリックデータベース (ChIP Atlas: <https://chip-atlas.org/>等) を用いた *in silico* 解析を行い、KLF5 タンパクがゲノム上のどの領域に存在するかについて網羅的に解析を行なった。続いて、大腸癌細胞株に KLF5 の siRNA を投与し、発現が変化する遺伝子を RNA-seq 解析で同定した。これらの実験の結果から、KLF5 タンパクによって遺伝子周辺に三次元ゲノム構造が構築され、発現が制御されている可能性がある遺伝子を複数同定することができた。その中には大腸癌の幹細胞性や悪性度に関わる遺伝子も含まれており、私たちは遺伝子 A に着目して実験を進めることとした。

遺伝子 A のプロモーター領域には KLF5 タンパクに加え、三次元ゲノム構造の構築に重要な役割を果たすとされる Co-factor (BRD4, コヒーシン複合体、メディエーター複合体など) も結合しており (図 1)、さらに KLF5 阻害剤 ML264 を大腸癌細胞株に投与した実験の結果、KLF5 阻害剤により遺伝子 A の mRNA 発現が低下したことから (図 2)、KLF5 タンパクによって構築される三次元ゲノム構造が遺伝子 A の発現制御に関わっている可能性が示唆された。

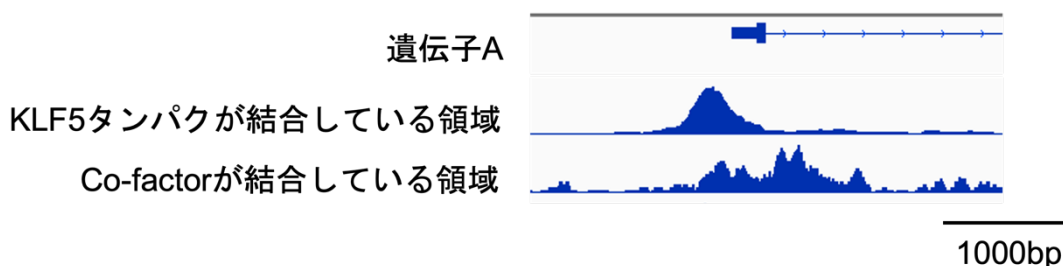


図 1. 大腸癌細胞株を用いた ChIP-seq、ChIP Atlas による *in silico* 解析の結果、遺伝子 A のプロモーター領域に KLF5 タンパクと三次元ゲノム構造構築に重要な役割を果たすことが知られている Co-factor が結合していることが明らかとなった。

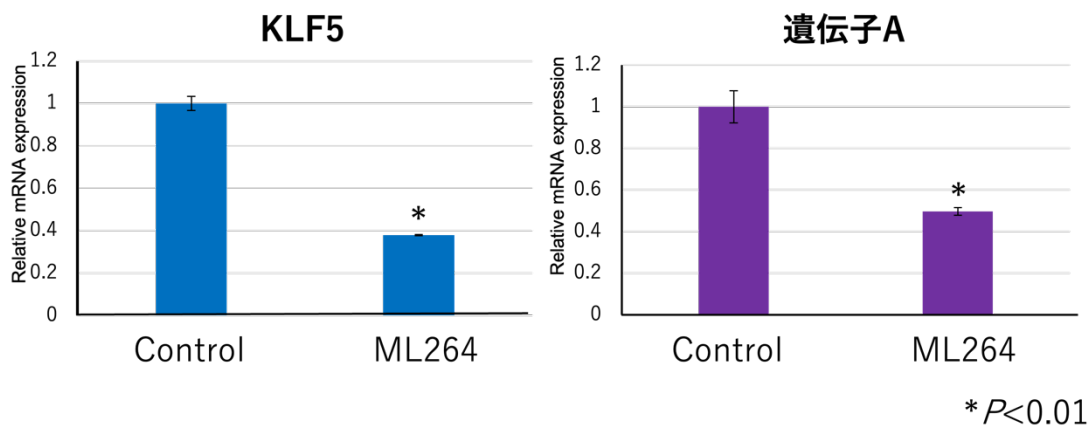


図 2. 大腸癌細胞株 KLF5 阻害剤である ML264 を投与すると、KLF5 遺伝子発現の低下と共に、遺伝子 A の発現も低下した。

続いて、遺伝子 A のプロモーター領域と三次元的に結合するゲノム領域を大腸癌細胞株を用いて、*in vitro* enChIP-seq 法にて網羅的に検討を行なった。*In vitro* enChIP-seq、ChIP-seq、ChIP-Atlas による解析の結果、遺伝子 A のプロモーター領域と結合しているエンハンサー候補領域を複数同定することが出来た。さらに遺伝子 A とプロモーター・プロモーター結合をしている複数の遺伝子の同定にも成功した。私たちはこれらの三次元的ゲノム結合の中から、遺伝子 A と NR2F2 遺伝子のプロモーター・プロモーター間結合に着目し、さらなる検討を行なった。NR2F2 はリガンドが同定されていない orphan nuclear receptor family に属し、血管や神経などをはじめとする細胞の分化や代謝経路に重要な役割を果たすことが報告されているが、癌においては大腸癌、膵癌、乳癌、前立腺癌、卵巣癌などの様々な癌での高発現が報告されている。*In vitro* enChIP-seq 法による解析の結果、NR2F2 遺伝子のプロモーター領域は遺伝子 A のプロモーター領域と三次元的に結合しており、さらに ChIP-seq、ChIP-Atlas による *in silico* 解析の結果、その結合ポイントには KLF5 タンパクが結合していることが明らかとなった (図 3)。

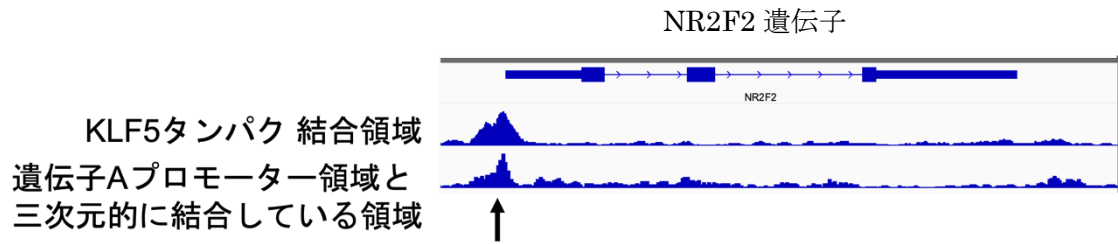


図3. In vitro enChIP-seq 法による解析の結果、NR2F2 遺伝子のプロモーター領域は遺伝子 A のプロモーター領域と三次元的に結合しており、さらにそこには KLF5 タンパクが結合していることが明らかとなった。

そこで、CRISPR/Cas9 システムを応用した技術である CRISPRa 法を用いて、遺伝子 A のプロモーター活性を上昇させた際に NR2F2 遺伝子発現にどのような影響が生じるかについて検討を行なった結果、遺伝子 A のプロモーター活性上昇（遺伝子発現増加）に伴って、NR2F2 遺伝子の発現も増加した（図4）。

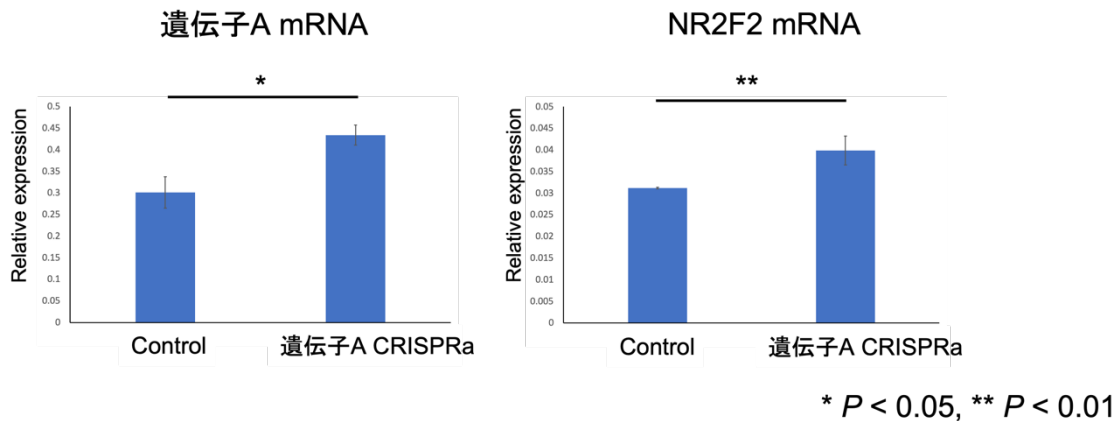


図4. CRISPRa 法によって遺伝子 A のプロモーター活性を上昇させると、遺伝子 A の発現上昇と共に、NR2F2 の遺伝子発現も増加した。

この結果は遺伝子 A と NR2F2 遺伝子の発現が三次元的なプロモーター・プロモーター結合を介して KLF5 と関連して協調的に制御されている可能性を示唆している。今後はこの三次元結合と KLF5 タンパクとの関連も含め、より詳細な検討を進めていく予定である。

さらに私達は NR2F2 以外にもプロモーター・プロモーター結合している遺伝子を複数同定しており、今後他の候補についても順次検討していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	山本 浩文 (Yamamoto Hirofumi) (30322184)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授 (14401)	
研究分担者	横山 雄起 (Yokoyama Yuki) (60615714)	大阪大学・大学院医学系研究科・助教 (14401)	

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