

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16957

研究課題名(和文) KLF5遺伝子発現抑制機構の解明と癌細胞分化との関連性の探究

研究課題名(英文) The mechanism of KLF5 gene suppression and the relationship exploration between the suppression and cell differentiation

研究代表者

美原 希美 (Mihara, Nozomi)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：00803264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：KLF5は上皮細胞の分化抑制に重要な転写因子であり、癌進行に大きく関わると考えられるが、その発現制御機構と細胞分化との関連性については明らかになっていない。本研究では、KLF5遺伝子の基本的発現に不可欠な最小必要領域(MER)とその上流に存在するサイレンサー領域のインタラクトにはCREBが介在しており、MERに結合するSp3以外の因子と複合体を形成することが示唆された。また、ヒトケラチノサイト由来細胞株HaCaTにCaによる分化、脱分化誘導を行ったところ、KLF5とその発現抑制に関わるCREBの発現はCa誘導性分化の影響を受け、細胞内Ca濃度がその発現制御に関わる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌はDNA-based diseaseであり、癌発生の要因は遺伝子変異だけではなく、他の要因による影響を受けて複雑に絡み合っている。癌の発生や進行に関わる遺伝子の促進的な発現制御機構については多くの報告がある中、抑制的な発現制御機構についての報告は極めて少ない。本研究は、癌の悪性形質獲得に関わるKLF5遺伝子の全体的な発現制御機構の解明に繋がり、癌進行における新たな分子学的背景を明示し、新規の癌治療法が必要な疾患に対する社会的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)：KLF5 is an important transcription factor for inhibition of epithelial cell differentiation and involved in cancer progression. However, the association of KLF5 expression regulatory mechanism with cell differentiation remains largely unknown. We previously demonstrated that the minimal essential region (MER) required for KLF5 basal expression and Sp3 binding to the MER was essential to the expression. In this study, we identified CREB-mediated interaction between the MER and a silencer region of KLF5 located upstream the MER. CREB mediated the MER-the silencer region interaction could complex with the MER binding factor(s) other than Sp3. Calcium-induced keratinocyte differentiation altered the expression of KLF5 and CREB, suggesting that intracellular calcium concentration may be involved in the regulation of the expressions.

研究分野：細胞生物学、分子生物学

キーワード：口腔癌 KLF5 細胞分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌の発生・進行には様々な要因が複雑に絡み合っており、その根本として DNA の変異、化学的修飾によるクロマチン構造の変化、シグナル伝達経路の変化などが関与し癌形質獲得に寄与するといわれているが、その分子学的背景は複雑である。悪性度の高い癌細胞では持続的な増殖と分化阻害が生じており、その中でも、KLF5 は分化誘導因子の発現や機能を阻害することで上皮細胞分化形質を阻害すると考えられている。癌細胞の分化形質阻害は癌浸潤を助長させる要因のひとつであり、それに関与すると考えられる KLF5 遺伝子の発現制御機構と細胞分化との関連性については不明な点が多い。

これまでに KLF5 遺伝子発現における必要最小領域 (minimal essential region、MER) とそこに優位に結合する転写因子が Sp3 であることが明らかになっている。また、CREB が MER の上流に存在するサイレンサー領域に結合することで KLF5 遺伝子発現が抑制的に制御されることもわかっている (図 1)。ゲノムにおけるシス/トランスエレメントの変異が結果として癌を引き起こすことが判明しているが、癌発生や進行に関わる遺伝子の促進的な発現制御機構については多くの報告があるなか、抑制的な発現制御機構についての報告はほとんどない。

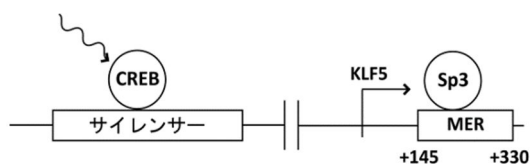


図 1 KLF5 遺伝子の基本的発現と発現制御の概要

2. 研究の目的

本研究では癌の悪性形質獲得に関わる KLF5 遺伝子の抑制的な発現制御機構と細胞分化との関連性に着目し、

- (1) KLF5 遺伝子の CREB による発現抑制機構
- (2) 細胞分化と CREB による KLF5 発現制御機構との関連性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) KLF5 遺伝子の MER とサイレンサー領域の相互作用の解析

KLF5 遺伝子の MER と MER 上流に存在するサイレンサー領域がインタラクトしているかを、3C アッセイを用いて解析した。また、MER-サイレンサー領域間に CREB が介在しているか、CREB が介在している場合、Sp3 と複合体を形成しているかを 3C on ChIP アッセイで解析した。

(2) ヒトケラチノサイト由来細胞株 HaCaT を用いての細胞分化と KLF5 発現制御との関連性の解析

Ca 誘導性ケラチノサイト分化における内在性 KLF5、内在性 CREB の発現動態の解析

HaCaT を最終カルシウム濃度 0.03 mM または 0.15mM で培養し、カルシウムスイッチ (最終カルシウム濃度 1.6 mM または 0.03 mM) により最終分化誘導、脱分化誘導を行い、誘導前後での内在性 KLF5、内在性 CREB の発現を解析した。

CREB ノックアウトクローンを用いての Ca 誘導性ケラチノサイト分化における内在性 KLF5 の発現動態の解析

CRISPR/Cas9 システムを用いて内在性 CREB ノックアウトクローンを作製した。作成した CREB ノックアウトクローンを用いて (2) と同様の条件で分化誘導もしくは脱分化誘導を行い、内在性 KLF5 の発現を解析した。

CREB 過剰発現下での Ca 誘導性ケラチノサイト分化における内在性 KLF5 の発現動態の解析

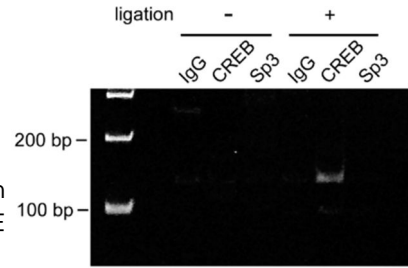
CREB cDNA に Myc tag を付加した発現プラスミドを HaCaT に導入し、(2) と同様の条件で分化誘導もしくは脱分化誘導を行い、内在性 KLF5 の発現を解析した。

4. 研究成果

(1) KLF5 遺伝子の MER とサイレンサー領域の相互作用の解析

MER とサイレンサー領域間はインタラクトしており、MER-サイレンサー領域間には CREB の介在が検出されたが、MER に結合することで KLF5 発現に大きく寄与する Sp3 の介在は検出されなかった (図 2)。

図 2 anti-CREB 抗体と anti-Sp3 抗体を用いた 3C on ChIP アッセイによる MER-サイレンサー領域間の介在タンパク解析



(2) ヒトケラチノサイト由来細胞株 HaCaT を用いての細胞分化と KLF5 発現制御との関連性の解析

分化誘導、脱分化誘導のいずれにおいても内在性 KLF5 の発現は増加した (図 3 A)。一方、内在性 CREB の発現は分化誘導で増加傾向にあったが、分化誘導、脱分化誘導のいずれにおいても有意な変化は見られなかった (図 3 B)。

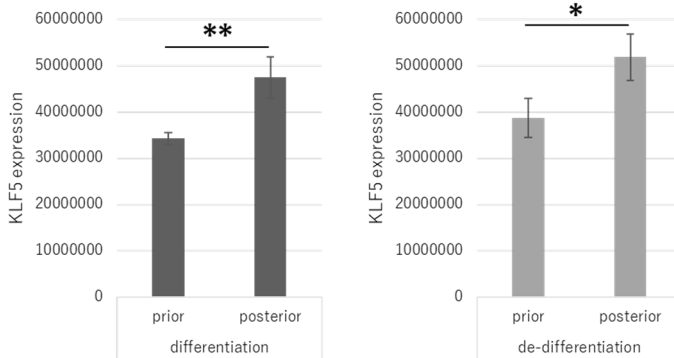


図 3 A Ca 誘導性ケラチノサイト分化・脱分化における内在性 KLF5 発現の変動

左: 分化誘導前後における内在性 KLF5 発現

右: 脱分化誘導前後における内在性 KLF5 発現

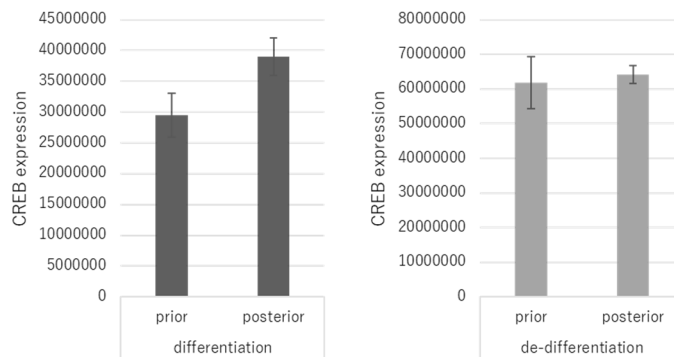


図 3 B Ca 誘導性ケラチノサイト分化・脱分化における内在性 CREB 発現の変動

左: 分化誘導前後における内在性 CREB 発現

右: 脱分化誘導前後における内在性 CREB 発現

CREB ノックアウトクローンにおいて、分化誘導、脱分化誘導前後いずれにおいても内在性 KLF5 の発現に有意な差はなかったが、分化誘導前の内在性 KLF5 の発現は増加傾向にあった (図 4)。

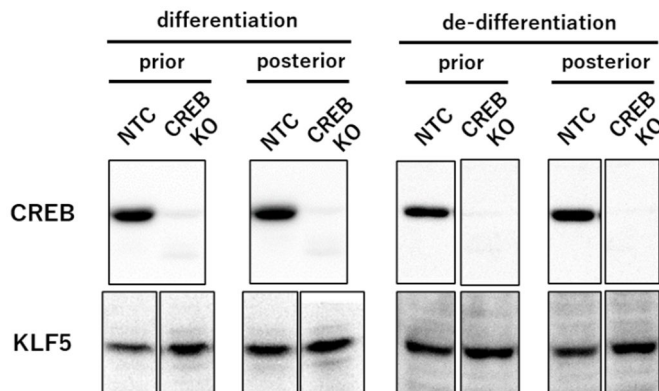


図 4 CREB ノックアウトクローンを用いた Ca 誘導性ケラチノサイト分化・脱分化誘導における内在性 KLF5 発現の変動

左: 分化誘導前後における内在性 KLF5 発現

右: 脱分化誘導前後における内在性 KLF5 発現

CREB を過剰発現させることで、分化誘導前後いずれにおいても内在性 KLF5 の発現は増加した (図 5 左)。一方、脱分化誘導においては誘導前後いずれにおいても内在性 KLF5 の発現は減少した (図 5 右)。

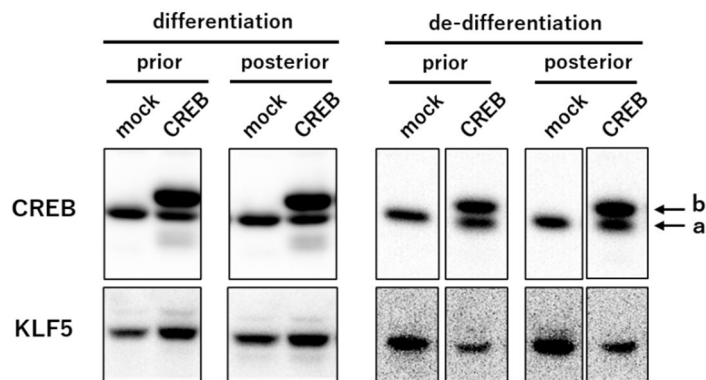


図 5 CREB 過剰発現下での Ca 誘導性ケラチノサイト分化・脱分化における内在性 KLF5 発現の変動

左：分化誘導前後における内在性 KLF5 発現
 右：脱分化誘導前後における内在性 KLF5 発現
 (a, 内在性 CREB b, 外因性 CREB)

分化誘導、脱分化誘導いずれにおいても内在性 KLF5 発現は増加したが、KLF5 の発現抑制に関わる CREB の内在性の発現については分化誘導を行うことで増加傾向にあったものの有意差はなかった。分化・脱分化誘導における内在性 KLF5 発現増加には、CREB の実質的な発現量の変動による発現制御機構とは別のメカニズムが働いていることが考えられる。これは、CREB をノックアウトしても分化・脱分化誘導の前後いずれにおいても内在性 KLF5 の発現に差が見られなかったことから示唆される。一方、CREB を過剰発現させると分化誘導、脱分化誘導それぞれにおいてその前後で内在性 KLF5 発現が増加もしくは減少するという、逆の挙動を示した。このことから、CREB は分化、脱分化過程でその機能が変化することが示唆された。また、Ca 濃度依存性の分化誘導、脱分化誘導であることから、細胞内 Ca 濃度の変化が CREB の機能、内在性 KLF5 発現の変転に寄与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 美原希美、今井一志
2. 発表標題 KLF5遺伝子におけるサイレンサー領域とCREBの関与
3. 学会等名 日本分子生物学会
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
---------	---------