

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32645

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670197

研究課題名(和文)腸管腫瘍形成過程のKLF5/4複合体の統合的解析と核酸医薬による大腸癌治療法開発

研究課題名(英文)Analysis of KLF5/4 complex in colon cancer development

研究代表者

黒田 雅彦(Kuroda, Masahiko)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：80251304

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)：これまで、我々は正常腸管幹細胞の制御、幹細胞での腫瘍形成にKLF5が必須であることを明らかにした。KLF5やKLF4のように多くの因子と蛋白複合体を作り、生体の制御をおこなっている分子による制御機構の全貌を解明するためには、in vivoの腸管上皮組織から直接採取した検体で蛋白複合体の解析や蛋白複合体のDNA結合を解析する実験系の構築が必要である。しかし、従来の蛋白複合体解析は、技術的な問題からin vitroの培養細胞というかなり特殊な状況における分子機構の解明に留まっていた。このような背景の中、FLAG-HAタグ付き蛋白を発現するKLF5とKLF4のノックインマウスの作出に成功した。

研究成果の概要(英文)：Recently, we found that KLF5 was indispensable factor to the control of the normal intestinal stem cell and colon cancer development in vivo. To elucidate the detailed molecular mechanism of KLF4/KLF5 protein-DNA complex, we need in vivo system. However, up to now, we only have in vitro cultured cell system from a technical problem. In this project, we have succeeded development of the knock in mouse of KLF5 and KLF4 which expressed the protein with the FLAG-HA tag. We think thees mice is strong tool for analysis of physiological functions of KLF4/KLF5 protein-DNA complex in vivo.

研究分野：人体病理学

キーワード：KLF5 KLF4 colon cancer stem cell

1. 研究開始当初の背景

研究者らのグループは、正常腸管幹細胞の制御、幹細胞での腫瘍形成に KLF5 が必須であることを明らかにした。

KLF5 や KLF4 のように多くの因子と蛋白複合体を作り、生体の制御をおこなっている分子による制御機構の全貌を解明するためには、*in vivo* の腸管上皮組織から直接採取した検体で蛋白複合体の解析や蛋白複合体の DNA 結合を解析する実験系の構築が必要である。しかし、従来の蛋白複合体解析、Chromatin IP 法による転写因子の DNA 結合領域の同定は技術的な問題から *in vitro* の培養細胞系がほとんどであり、培養細胞といふかなり特殊な状況における分子機構の解明に留まっていた。

2. 研究の目的

研究者らのグループは、転写因子 KLF5 が、腸管上皮幹細胞の維持・分化、幹細胞での Wnt/ β -catenin 経路活性化による腸管腫瘍形成に必須であることを明らかにした。さらに分子レベルでの分化制御と腫瘍形成を明らかにするためには、生体での蛋白間および蛋白-DNA 相互作用を解明する必要がある。このため、FLAG-HA ダブルタグ付 KLF5/KLF4 ノックインマウスという新技術を用いて、腸管上皮組織で KLF5/4 の純度の高い蛋白複合体精製・DNA 結合領域の網羅的解析を行い、正常・腫瘍形成過程での経時的变化を統合的に解析する。その結果に、1 本鎖 RNA を用いた新規 RNAi 核酸医薬技術と、ヒト腸管上皮 3 次元培養系を融合させ、大腸癌、特に癌幹細胞を直接抑制、死滅させる新しい治療法の開発につなげることを目指す。

3. 研究の方法

FLAG-HA ダブルタグ付き KLF5、KLF4 ノックイ

ンマウスの開発と作成を行った。

KLF4 に関しては、通常のネオマイシンの薬剤耐性遺伝子を挿入したターゲティングベクターの ES 細胞への導入とセレクションという方法で FLAG-HA タグ付き KLF4 蛋白を発現するマウスが得られた。

KLF5 に関しては、通常のネオマイシンの薬剤耐性遺伝子を挿入したターゲティングベクターの ES 細胞への導入とセレクションという方法で FLAG-HA タグ付き蛋白を発現するものが得られなかった。そこで、ネオマイシン領域を削除するなどマウス作成の改良を行った。その結果、KLF5 に関してもタグ付き蛋白を発現するものが得られるようになった。

現在、それらのマウスを用いて解析を進めている。

4. 研究成果

FLAG-HA タグ付き蛋白を発現する KLF5 と KLF4 のノックインマウスを創出した。

今後これらのマウスを用いて解析を進めていく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 14 件)

1. Yoon JH, Sudo K, Kuroda M, Taniguchi T, Sumida T and Mamura M.(3rd of 18) Phosphorylation status determines the opposing functions of Smad2 and Smad3 as STAT3 cofactors in TH17 differentiation. Nature communications. 2015 in press. 査読有
2. Nakayama Y, Kuroda M. (5th of 5) Evaluation of the Human Papillomavirus mRNA Test for the detection of cervical lesions in Japan. Eur J Gynaec Oncol. 2015 36(2):192-6. 査読有

3. Toyono T, Usui T, Yokoo S, Kuroda M, Amano S. (6th of 8). Angiopoietin-like 7 is an anti-angiogenic protein required to prevent vascularization of the cornea. PLoS One. 10(1) e0116838. doi: 10.1371/journal.pone.0116838. 2015. eCollection 2015. 査読有
 4. Nakama T, Yoshida S, Ishikawa K, Kuroda M and Ishibashi T. 19th of 20. Inhibition of choroidal fibrovascular membrane formation by new class of RNA interference therapeutic agent targeting periostin. Gene Ther. 2015 22(2): 127-37. doi: 10.1038/gt.2014.112. 査読有
 5. Horita A, Kurata A, Ohno S, Kuroda M. (7th of 7). Immaturity of smooth muscle cells in the neointima is associated with acute coronary syndrome. Cardiovasc Pathol. (in press)2014. 査読有
 6. Nakaya T, Kurata A, Hashimoto H, Kuroda M. (8th of 8.) Young-age-onset pancreatoduodenal carcinoma in Shwachman-Diamond syndrome. Pathol Int. 2014 64(2):75-80. doi: 10.1111/pin.12133. 査読有
 7. Nakaya T, Morita K, Kurata A, Ushiku T, Igarashi T, Kuroda M, Fukayama M. (6th of 7). Multifocal Kaposiform Hemangioendothelioma in Multiple Visceral Organs: An Autopsy of 9-Day-Old Female Baby. Human Pathology. 2014. 45(8):1773-7. doi: 10.1016/j.humpath.2014.03.019. Epub 2014 Apr 18. 査読有
 8. Nakaya T, Ogawa S, Manabe I, Tanaka M, Sanada M, Sato T, Taketo M, Nakao K, Clevers H, Fukayama M, Kuroda M, Nagai R.(11th of 12). KLF5 regulates the integrity and oncogenicity of intestinal stem cells. Cancer Res. 2014. 74(10):2882-91. 査読有
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2574
- 〔学会発表〕(計 38 件)
1. 黒田雅彦. microRNA 生成経路を欠損する肺がん細胞株の解析. 第 104 回日本病理学会総会、名古屋国際会場(名古屋)、2015 年 4 月 30 ~ 5 月 2 日
 2. Kuroda M. Development of novel form of mimic microRNA for lung cancer therapy. AACR Annual Meeting 2015. Philadelphia, Pennsylvania (USA). April 18-22, 2015
 3. Kuroda M. The development of short form of mimic microRNA for lung cancer therapy. 26th EORTC-NCI-ACR Symposium. 18-21th Nov 2014, Barcelona (SPAIN).
 4. 黒田雅彦. 核酸医薬品の新展開 (Significance and applications of novel class of RNA for cancer therapy). 第 32 回日本ヒト細胞学会学術集会. 慈恵医大 (東京). 2014 年 8 月 30-31.
 5. 黒田雅彦. エクソソームによるドラッグデリバリーシステムの応用 (Application of drug delivery systems by exosomes). 第 6 回日本 RNAi 研究会 (JARI)、第 1 回日本細胞外小胞学会 (JSEV). グランドプリンスホテル広島(広島) 2014 年 8 月 28-30 日
 6. Kuroda M. Colon cancer stem cells and microRNA signature during colon cancer development. Immune-network Pioneer Research Center 2nd International Symposium 2014. Seoul (KOREA). Jul 7 2014
 7. 黒田雅彦. 肺がんを効果的に抑制する Mimic microRNA の新規形状の探索. 第 103 回日本病理学会総会、広島国際会議場 (広島) 2014 年 4 月 24 日 ~ 26 日

8. Kuroda M. Novel RNAi agent can control HCV replication. AACR Annual Meeting 2014, San Diego, CA, (USA) April 5-9, 2014
9. Kuroda M. Significance and applications of novel class of RNA for cancer therapy. Drug Discovery World Asia 2014 11-12th Mar. Suntec Singapore Convention & Exhibition Centre. Suntec City (Singapore).
10. Kuroda M. Novel RNAi agent can control HCV replication. RNA Silencing(A9) Keystone symposia. Seattle, Washington(USA) Jun.31-Feb. 5, 2014
11. 黒田 雅彦. マイクロ RNA のがん治療および癌診断への応用 新規の lipid conjugate RNA を用いたがん治療法の開発. 第 72 回日本癌学会学術総会、横浜国際会議場(横浜) 2013 年 10 月 5 日
12. 黒田 雅彦. Exosome によるがん特異的 miRNA デリバリー法の開発. 第 29 回日本 D D S 学会学術集会、シンポジウム、京都、2013 年 7 月 5 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

黒田 雅彦 (KURODA MASAHIKO)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 80251304

(2)研究分担者

仲矢 丈雄 (NAKAYA TAKEO)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 80512277