

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293161

研究課題名(和文) iPS細胞を用いたABO遺伝子の発現調節機構の統合的な理解の深化

研究課題名(英文) Integrated elucidation of the transcriptional regulatory mechanisms of human ABO blood group gene using iPS cells

研究代表者

小湊 慶彦 (Kominato, Yosihiko)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30205512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,300,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムアノテーションデータを利用し、遺伝子下流約2.6-kb(+22.6-kb site)を転写活性化領域と想定し、ルシフェラーゼアッセイにより転写活性を測定し、ゲノム編集技術を用いて+22.6-kb site欠損胃癌培養細胞を作製し、遺伝子発現が約半分に低下することを観察した。+22.6-kb siteに上皮細胞特異的転写因子ELF5が結合することをゲルシフトアッセイ、ChIPアッセイ等を用いて証明し、ルシフェラーゼアッセイやshRNAを用いたノックダウン実験により、ELF5が+22.6-kb siteにおいて機能することを示した。以上より、ABO遺伝子上皮細胞特異的エンハンサーを同定した。

研究成果の概要(英文)：The human ABO blood group system is important in blood transfusion. However, the mechanisms regulating ABO gene expression remain obscure in epithelial cells. On the basis of DNase I-hypersensitive sites and histone modifications in and around ABO in epithelial cells, we prepared reporter plasmids including a putative enhancer downstream from ABO. Subsequent luciferase assays indicated a novel positive regulatory element (+22.6-kb site) in an epithelial cell-specific manner. Expression of ABO and B-antigen was reduced in gastric cancer KATOIII cells by biallelic deletion of the site using the CRISPR/Cas9 system. Electrophoretic mobility shift assay and chromatin immunoprecipitation assay demonstrated that the site bound to an epithelial cell-specific transcription factor Elf5. ELF5 knockdown with shRNA reduced both endogenous transcription from ABO and B-antigen expression in the cells. ABO expression seems to be dependent upon an enhancer bound by Elf5 in epithelial cells.

研究分野：法医学

キーワード：ABO式血液型

1. 研究開始当初の背景

ABO 式血液型は個人識別に重要な指標として法医学、犯罪鑑識において利用されてきた。ABO 式血液型は、20 世紀初頭に発見され、1960 年代に抗原構造の解析、1980 年代後半から 1990 年代にかけて、ABH 抗原合成にかかわる糖転移酵素の cDNA の構造が明らかにされた。我々は、ABO 式血液型抗原の組織特異的発現、細胞分化に伴う発現、癌細胞での抗原の欠落、血液型抗原の発現が弱い変異型の現象を分子レベルで解明するために、ABO 式血液型遺伝子の発現制御機構の研究を進めてきた。

これまで、ABO 式血液型遺伝子の細胞非特異的プロモーターと血球細胞特異的エンハンサー (+5.8-kb site) を実験的に特定し、変異型においてそれらの領域に塩基欠失や置換が見出されたことから、それらが重要な転写調節領域であることが判ってきた。

上記の研究結果から、ABO 式血液型抗原の組織特異的発現や細胞分化に伴う発現は、+5.8-kb site に結合する細胞特異的転写因子 GATA-1/2 や RUNX1 発現に依存するものであり、変異型にはそれらの転写因子認識サイトの塩基欠失や置換によるものがあり、癌細胞での抗原の欠落は遺伝子欠損やプロモーターのメチル化であることが判ってきた。

しかし、未だに原因となる突然変異が同定されない変異型が存在することから、さらなる転写調節機構の解明が求められており、また、上皮細胞における転写制御機構は未解明であった。

2. 研究の目的

上皮細胞における ABO 式血液型遺伝子の転写調節機序を明らかにして、高次の、統合的な転写制御機構の解明が目的である。

3. 研究の方法

高次の、統合的な転写制御機構の解明のために、iPS 細胞を用いた遺伝子発現解析を試みることにしたが、iPS 細胞から分化させた赤血球細胞においては ABO 式血液型抗原の発現が見られず (未公表)、ABO 式血液型遺伝子の転写調節機序を研究することはできなかった。

ところで、転写調節領域を示唆する

DNase I hypersensitive site(DHS)やクロマチン修飾状況等のゲノムアノテーションデータが公表されており、ABO 遺伝子周辺にいくつかのエンハンサー候補が示唆された。我々は、上皮細胞の情報を用いて、ABO 遺伝子の周辺約 100-kb について、DHS やクロマチン修飾を基に検索を行い、遺伝子下流 2.6-kb (+22.6-kb site) に上皮細胞特異的な転写活性化領域を見出した。その領域を含むルシフェラーゼプラスミドを準備し、レポーターアッセイを行った。また、CRISPR/Cas9 システムを利用し、+22.6-kb site を欠失した胃癌培養細胞を作製し、遺伝子発現や抗原発現を定量 PCR やフローサイトメトリーを用いて調べた。また、+22.6-kb site に結合する転写因子として、上皮細胞特異的転写因子 E1f5 を想定し、ゲルシフトアッセイ、ChIP アッセイを行った。shRNA を用いて E1f5 をノックダウンし、遺伝子発現や抗原発現を定量 PCR やフローサイトメトリーを用いて調べた。

4. 研究成果

レポーターアッセイの結果から +22.6-kb site には上皮細胞特異的転写活性を有することが判った。+22.6-kb site を欠失した胃癌培養細胞では遺伝子発現量の減少と抗原量減少が認められた。ゲルシフトアッセイ、ChIP アッセイから +22.6-kb site に E1f5 が結合することが判った。E1f5 をノックダウンすると胃癌培養細胞では遺伝子発現量の減少と抗原量減少が認められた。

以上から、上皮細胞における ABO 式血液型遺伝子は、+22.6-kb site に上皮細胞特異的転写因子 E1f5 が作用し、発現調節が行われていることが判った。

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 24 件)

1. Sano R, Nakajima T, Takahashi Y, Kubo R, Kobayashi M, Takahashi K, Takeshita H, Ogasawara K, Kominato Y. Epithelial expression of human ABO blood group gene is dependent upon a downstream

- regulatory element functioning through an epithelial cell-specific transcription factor, Elf5. *J Biol Chem*. 査読有 291. 2016.22594–22606. **doi: 10.1074/jbc.M116.730655**
2. Nakajima T, Sano R, Takahashi Y, Watanabe K, Kubo R, Kobayashi M, Takahashi K, Takeshita H, Kominato Y. ABO alleles are linked with haplotypes of an erythroid cell-specific regulatory element in intron 1 with a few exceptions attributable to genetic recombination. *Vox Sang*. 査読有 110. 2016. 90–92. **doi: 10.1111/vox.12312**
 3. Isa K, Yamamuro Y, Ogasawara K, Yabe R, Ogiyama Y, Ito S, Takahashi Y, Kominato Y, Sano R, Uchikawa M. Presence of nucleotide substitutions in the ABO promoter in individuals with phenotypes A₃ and B₃. *Vox Sang*. 査読有 110. 2016. 285–287. **doi: 10.1111/vox.12363**
 4. Yazawa S, Takahashi R, Sano R, Mogi A, Saniabadi AR, Kuwano H, Asao T. Fucosylated Glycans in α 1-Acid Glycoprotein for Monitoring Treatment Outcomes and Prognosis of Cancer Patients. *PLoS One*. 査読有 2016. 11. e0156277. **doi: 10.1371/journal.pone.0156277**
 5. Fujihara J, Kimura-Kataoka K, Sano R, Kominato Y, Takeshita H. Association of a single-nucleotide polymorphism (rs6180) in GHR gene with plural tissue weight. *J Genet*. 査読有 95. 2016. 189–92. **Doi 無**
 6. Takahashi Y, Sano R, Takahashi K, Kominato Y, Takei H, Kobayashi S, Shimada T, Tokue H, Awata S, Hirasawa S. Use of postmortem coronary computed tomography angiography with water-insoluble contrast medium to detect stenosis of the left anterior descending artery in a case of sudden death. *Leg Med*. 査読有 19. 2016. 47–51. **doi: 10.1016/j.legalmed.2016.02.003**
 7. Takahashi Y, Sano R, Kominato Y, Kubo R, Takahashi K, Nakajima T, Takeshita H, Ishige T. A case of sudden unexpected infant death involving a homozygotic twin with the thermolabile *CPT2* variant, accompanied by rotavirus infection and treatment with an antibiotic containing pivalic acid. *Leg Med*. 査読有 22. 2016. 13–17. **doi: 10.1016/j.legalmed.2016.07.005**
 8. Kuninaka H, Takahashi Y, Sano R, Takahashi K, Kubo R, Kominato Y, Takei H, Kobayashi S, Shimada T, Tokue H, Awata S, Hirasawa S. Use of postmortem computed tomography angiography to detect vascular injuries accompanying skull base fracture. *Leg Med*. 査読有 23. 2016. 55–58. **doi: 10.1016/j.legalmed.2016.09.008**
 9. Murayama M, Takahashi Y, Sano R, Watanabe K, Takahashi K, Kubo R, Kuninaka H, Kominato Y. Characterization of five cases of suspected bathtub suicide. *Legal Medicine*. 査読有 13. 2015. 576-578. **doi:10.1016/j.legalmed.2015.07.005**
 10. Tokue H, Takahashi Y, Hirasawa S, Awata S, Kobayashi S, Shimada T, Tokue A, Sano R, Kominato Y, Tsushima Y. Intestinal obstruction in a mentally retarded patient due to pica. *Ann Gen Psychiatry*. 査読有 14.2015.22. **doi: 10.1186/s12991-015-0060-4**
 11. Fujihara J, Yasuda T, Iida R, Ueki M, Sano R, Kominato Y, Inoue K, Kimura-Kataoka K, Takeshita H. Global analysis of genetic variations in a 56-bp

- variable number of tandem repeat polymorphisms within the human deoxyribonuclease I gene. *Legal Medicine*. 査読有 17. 2015. 283–286. doi:10.1016/j.legalmed.2015.01.005
12. Watanabe K, Takahashi Y, Sano R, Nakajima T, Kominato Y, Kobayashi S, Shimada T, Takei H, Awata S, Hirasawa S. Brain fragility can be estimated by its putative signs on postmortem computed tomography. *Legal Medicine*. 査読有 17.2015.98–101. doi:10.1016/j.legalmed.2014.10.008
 13. Sano R, Kuboya E, Nakajima T, Takahashi Y, Takahashi K, Kubo R, Kominato Y, Takeshita H, Yamao H, Kishida T, Isa K, Ogasawara K, Uchikawa M. A 3.0-kb deletion including an erythroid cell-specific regulatory element in intron 1 of the ABO blood group gene in an individual with the B_m phenotype. *Vox Sanguinis*. 査読有 108. 2015.310–313. doi: 10.1111/vox.12216
 14. Sano R, Nogawa M, Nakajima T, Takahashi Y, Takahashi K, Kubo R, Kominato Y, Yokohama A, Tsukada J, Yamao H, Kishida T, Ogasawara K, Uchikawa M. Blood group B gene is barely expressed in in vitro erythroid culture of B_m-derived CD34⁺ cells without an erythroid cell-specific regulatory element. *Vox Sanguinis*. 査読有 108.2015. 302–309. doi: 10.1111/vox.12220
 15. 高橋遥一郎, 佐野利恵, 中島たみ子, 小湊慶彦. ABO 遺伝子の転写調節領域の変異により血液型亜型 Am 型、A3 型、B3 型が生じる. *DNA 多型*. 査読有 23.2015.103–107.
 16. Sano R, Takahashi Y, Nakajima T, Yoshii M, Kubo R, Takahashi K, Kominato Y, Takeshita H, Yasuda T, Tsuneyama H, Uchikawa M, Isa K, Ogasawara K: ABO chimerism with a minor allele detected by the PNA-mediated PCR clamping method. *Blood Transfusion*. 査読有 12. 2014. 431–434. doi: 10.2450/2014.0162-13
 17. Takahashi Y, Isa K, Sano R, Nakajima T, Kubo R, Takahashi K, Kominato Y, Michino J, Masuno A, Tsuneyama H, Ito S, Ogasawara K, Uchikawa M: Presence of nucleotide substitutions in transcriptional regulatory elements such as the erythroid cell-specific enhancer-like element and the ABO promoter in individuals with phenotypes A₃ and B₃, respectively. *Vox Sanguinis*. 査読有 107.2014.171–180. doi: 10.1111/vox.12136
 18. Takahashi Y, Isa K, Sano R, Nakajima T, Kubo R, Takahashi K, Kominato Y, Tsuneyama H, Ogasawara K, Uchikawa M: Deletion of the RUNX1 binding site in the erythroid cell-specific regulatory element of the ABO gene in two individuals with the A_m phenotype. *Vox Sanguinis*. 査読有 106.2014.167–175. doi: 10.1111/vox.12077
 19. Takahashi Y, Sano R, Nakajima T, Kominato Y, Kubo R, Takahashi K, Ohshima N, Hirano T, Kobayashi S, Shimada T, Tokue H, Awata S, Hirasawa S, Ishige T: Combination of postmortem mass spectrometry imaging and genetic analysis reveals very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in a case of infant death with liver steatosis. *Forensic Science International*. 査読有 244. 2014. e34–e37. doi:10.1016/j.forsciint.2014.08.031
 20. Yazawa S, Yokobori T, Ueta G, Ide M, Altan B, Thongprachum A, Nishimura T,

- Nakajima T, Kominato Y, Asao T, Saniabadi AR, Furukawa K, Kuwano H, Le Pendu J, Ushijima H: Blood group substances as potential therapeutic agents for the prevention and treatment of infection with noroviruses proving novel binding patterns in human tissues. *PLoS ONE*. 査読有 9.2014. e89071. doi: **10.1371/journal.pone.0089071**
21. Ueki M, Kimura-Kataoka K, Takeshita H, Fujihara J, Iida R, Sano R, Nakajima T, Kominato Y, Kawai Y, Yasuda T. Evaluation of all non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes encoding human deoxyribonuclease I and I-like 3 as a functional SNP potentially implicated in autoimmunity. *FEBS Journal*. 査読有 281.2014.376–390. doi: **10.1111/febs.12608**
22. Hata Y, Mori H, Tanaka A, Fujita Y, Shimomura T, Tabata T, Kinoshita K, Yamaguchi Y, Ichida F, Kominato Y, Ikeda N, Nishida N. Identification and characterization of a novel genetic mutation with prolonged QT syndrome in an unexplained postoperative death. *International Journal of Legal Medicine*. 査読有 128.2014.105–115. doi: **10.1007/s00414-013-0853-4**
23. Murakami T, Tajika Y, Ueno H, Awata S, Hirasawa S, Sugimoto M, Kominato Y, Tsushima Y, Endo K, Yorifuji H: An integrated teaching method of gross anatomy and computed tomography radiology. *Anatomical Science and Education*. 査読有 7.2014.438–449. doi: **10.1002/ase.1430**
24. 佐野利恵, 中島たみ子, 高橋遥一郎, 高橋圭子, 久保谷江里, 小湊慶彦, 藤原純子, 竹下治男, 安田年博, 岸田哲子. ABO 式遺伝子血球系特異的エンハンサー内 GATA サイトの一塩基置換が B 抗原量の低下をもたらした B_m 型一症例. *DNA 多型*. 査読有 22. 2014. 109–113.
- [学会発表](計 32 件)
1. 佐野利恵, 高橋遥一郎, 窪理英子, 福田治紀, 竹下治男, 藤原純子, 小湊慶彦. ABO 式血液型遺伝子とそのパラログ、オーソログの遺伝子解析による種判別法. 日本 DNA 多型学会第 25 回学術集会. 2016.12.2 千葉.
 2. 國中光, 高橋遥一郎, 佐野利恵, 窪理英子, 高橋圭子, 小湊慶彦. 頭蓋底骨折に伴う血管損傷の検索に死後 CT 血管造影検査が有用であった一例. 第 85 回日本法医学会学術関東地方集会. 2016.10.29 神奈川.
 3. 高橋遥一郎, 佐野利恵, 高橋圭子, 窪理英子, 中島たみ子, 小湊慶彦. ABO 遺伝子の発現量変動の機序解明と、薬剤刺激による血液型抗原量の制御. 第 100 次日本法医学会学術全国集会. 2016.6.17 東京.
 4. 高橋遥一郎, 佐野利恵, 小湊慶彦. 死後冠動脈 CT 造影検査が冠動脈血栓の組織学的検索に有効であった急死例. 第 100 次日本法医学会学術全国集会. 2016.6.17 東京.
 5. 中島たみ子, 佐野利恵, 高橋遥一郎, 竹下治男, 安田年博, 小湊慶彦. ABO 式血液型遺伝子エンハンサーのハプロタイプは ABO 遺伝子型とリンクしている. 第 100 次日本法医学会学術全国集会. 2016.6.17 東京.
 6. 佐野利恵, 中島たみ子, 高橋遥一郎, 小湊慶彦. ABO 式血液型遺伝子エンハンサーハプロタイプの型特異性. 第 64 回日本輸血・細胞治療学会総会. 2016.4.29 京都.

7. 伊藤正一, 荻山佳子, 鈴木光, 峯岸正好, 清水博, 伊佐和美, 小笠原健一, 内川誠, 高橋遥一郎, 佐野利恵, 中島たみ子, 小湊慶彦. ABO 遺伝子のプロモーター領域の一塩基置換によって生じた B₃ 型の一例. 第 64 回日本輸血・細胞治療学会総会. 2016.4.29 京都.
8. 高橋遥一郎, 佐野利恵, 村山真之, 小湊慶彦. 死後冠動脈造影に関する症例報告と今後の展開について. 第 10 回法医学画像勉強会. 2016.3.12 東京.
9. 村山真之, 高橋遥一郎, 佐野利恵, 小湊慶彦: 浴槽内での自殺が疑われた 5 症例の検討. 第 84 回日本法医学会学術関東地方集会. 2015.10.24 東京.
10. 佐野利恵, 中島たみ子, 高橋遥一郎, 小湊慶彦: Bm 型では赤血球系細胞において B 遺伝子の発現が極めて低下している - CD34 陽性細胞を用いた赤血球系細胞への分化培養実験 -. 日本 DNA 多型学会第 24 回学術集会. 2015.11. 20 岡山.
11. 中島たみ子, 佐野利恵, 高橋遥一郎, 窪理英子, 高橋圭子, 小林もも子, 渡邊華帆, 小湊慶彦, 竹下治男, 安田年博: ABO 式血液型遺伝子エンハンサー八プロタイプの型特異性. 日本 DNA 多型学会第 24 回学術集会. 2015.11. 20 岡山.

他 21 件

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小湊 慶彦 (KOMINATO YOSHIHIKO)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 30205512

(2) 研究分担者

佐野 利恵 (SANO RIE)
群馬大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 70455955
高橋 遥一郎 (YOICHIRO TAKAHASHI)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 50640538

(3) 連携研究者

無

研究者番号: