

教育シンポジウム 2 : 次世代を担う若手研究者の活躍—若手の交流を深める—

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

横山 雄起*[§] 松井 麻実* 幸田 志穂里*
山本 浩之* 山本 浩文*

要旨 核内三次元ゲノム構造が新たな転写調節機構として注目を集めている。私達はこれまでの研究で、異なる染色体上に存在する KLF5 遺伝子 (13 番染色体) と CCAT1 遺伝子 (8 番染色体) が大腸癌細胞の核内で三次元的に結合しており、これによって協調的に発現が制御されている可能性を示唆するデータを得てきた。本研究ではこの三次元ゲノム構造を介した遺伝子発現制御メカニズムが実際に組織レベルで存在するか、また他の癌種でも保存されているかについて検討を行った。免疫染色、*in situ* hybridization、定量 PCR などの実験を行った結果、KLF5 遺伝子と CCAT1 遺伝子の三次元ゲノム構造を介した発現制御メカニズムが大腸癌に普遍的に存在することが明らかとなり、かつ膀胱癌や胃癌といった他の癌種においても保存されている可能性が示唆された。

キーワード 三次元ゲノム構造、KLF5、CCAT1

はじめに

大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻は文部科学省【次世代のがんプロフェッショナル養成プラン】に拠点校として参画し、筆者が所属する分子病理学研究室では「がん治療を目指した分子ゲノムコース」、「地域の病理医不足を補う病理・細胞診断コース」の 2 コースを担当している。本シンポジウムでは本コースで行われている教育内容の紹介と以下に示す研究活動の一部を発表した。

I. 研究の背景と目的

細胞核内における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おり、注目を

浴びている。三次元ゲノム構造による遺伝子発現調節機構で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。一方、Li らが行なった網羅的解析の報告では、遺伝子のプロモーターは他の遺伝子のプロモーターと三次元的に結合している割合が最も高く (42%)、プロモーター・エンハンサー間の結合 (33%) を上回る割合であった¹⁾。さらに遺伝子プロモーター間の三次元的な結合は協調的な遺伝子発現に関与していることも同論文では報告されており、プロモーター・プロモーター間で形成される三次元ゲノム構造の重要性についても裏付けられた。私達はこれまでの研究において三次元ゲノム構造解析技術である *in vitro* engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation sequencing (*in vitro* enChIP-

* 大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻分子病理学研究室 yyokoyama@sahs.med.osaka-u.ac.jp

Seq) 法²⁾を用いた実験の結果、消化器癌や扁平上皮癌などの特定の癌種で発現が上昇するジンクフィンガー型転写因子 Kruppel-like factor 5 (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 long non-coding RNA (lncRNA) の Colon Cancer Associated Transcript 1 (CCAT1) 遺伝子と三次元的に結合しており、両遺伝子発現が協調的に制御されていることを明らかにした。さらにこの三次元ゲノム構造には KLF5 タンパク自身が関与し、コファクターと呼ばれる分子群 (BET タンパク、Cohesin 複合体、Mediator 複合体) と共に遺伝子発現制御に重要な役割を果たしている可能性を見いだした³⁾。本研究ではこの分子メカニズムが実際に組織レベルで存在するか、また他の癌種でも保存されているかについて明らかにするため、臨床サンプル (大腸癌組織) を用いた検討、他癌種細胞株を用いた検討を行った。

II. 方 法

大阪大学医学部附属病院で手術された大腸癌組織 27 症例を用いて、KLF5 タンパク発現は免疫染色にて、CCAT1 遺伝子発現は *in situ* hybridization (RNAscope) にて検討を行った。さらに大腸癌組織 131 症例から抽出した RNA を用いて定量 PCR を行い、KLF5 mRNA 発現と CCAT1 発現の相関関係について検討を行った。パブリックデータベースである CCLE (Cancer Cell Line Encyclopedia: <https://sites.broadinstitute.org/ccle/>) を用いて各種癌細胞株における KLF5 と CCAT1 発現レベルの相関関係について解析した。大腸癌細胞株 HT29, SK-CO-1、膵癌細胞株 BxPC-3、胃癌細胞株 MKN-45 を用いて、KLF5 遺伝子の siRNA によるノックダウン実験を行い、KLF5 のノックダウンが CCAT1 遺伝子発現にどのような影響を与えるかについて検討を行った。

III. 結果と考察

大腸癌組織を用いた KLF5 の免疫染色の結果、KLF5 は非癌部では陰窩底部の細胞において強い発現が認められた。癌部における発現強度は様々であったが、大部分の症例において非癌部に比べ、

強い発現が認められた。癌細胞の核における発現強度と発現している癌細胞の割合をもとに weak, moderate, strong の 3 群に分類すると、weak が全体の 7.4%、moderate が 37%、strong が 55.6% という結果になった。次に CCAT1 の大腸癌組織における発現レベルを RNAscope によって検討した結果、CCAT1 発現は大腸非癌部ではわずかであったが、癌部では多くの症例で発現の亢進が認められた。RNAscope の販売会社が提示しているスコアリング方法に従い、weak, moderate, strong の 3 群に分類すると、weak が 11.1%、moderate が 40.7%、strong が 48.2% となった。以上の KLF5, CCAT1 発現レベルの相関関係を統計学的に解析すると KLF5, CCAT1 の発現レベルには有意な相関関係があることが明らかとなった ($p < 0.01$)。また、大腸癌組織 131 症例から抽出した RNA を用いて定量 PCR を行い、KLF5 mRNA 発現と CCAT1 発現の相関関係について検討を行った結果、両者の発現レベルには有意な正の相関関係が認められた ($p < 0.01$)。以上の結果から、大腸癌細胞株を用いた実験で示された三次元ゲノム構造を介した KLF5 と CCAT1 の協調的な発現制御メカニズムは実際の大腸癌組織においても存在する可能性が示唆された。

次にパブリックデータベースである CCLE を用いて各種癌細胞株における KLF5 と CCAT1 発現レベルの相関関係について解析した。その結果、大腸癌細胞株以外に膵癌細胞株や胃癌細胞株において KLF5 と CCAT1 の発現レベルに正の相関関係があることが明らかとなった。そこで、大腸癌細胞株 HT29, SK-CO-1、膵癌細胞株 BxPC-3、胃癌細胞株 MKN-45 を用いて、KLF5 遺伝子の siRNA によるノックダウン実験を行った。その結果、すべての細胞株で KLF5 の発現低下に伴って、CCAT1 の発現も低下することが明らかとなった。以上の結果より、KLF5 と CCAT1 の協調的な発現制御メカニズムは大腸癌以外の消化器癌 (膵癌や胃癌など) においても存在する可能性が示唆された。今後、膵癌、胃癌臨床サンプルを用いた検討も含め、さらなる研究を行なっていく予定である。

文 献

- 1) Li G, Ruan X, Auerbach RK, Sandhu KS, Zheng M, Wang P et al. Extensive promoter-centered chromatin interactions provide a topological basis for transcription regulation. *Cell* 2012; 148: 84-98.
- 2) Fujita T, Kitaura F, Yuno M, Suzuki Y, Sugano S, Fujii H. Locus-specific ChIP combined with NGS analysis reveals genomic regulatory regions that physically interact with the Pax5 promoter in a chicken B cell line. *DNA Res* 2017; 24: 537-48.
- 3) Takeda T, Yokoyama Y, Takahashi H, Okuzaki D, Asai K, Itakura H et al. A stem cell marker KLF5 regulates CCAT1 via three-dimensional genome structure in colorectal cancer cells. *Br J Cancer* 2022; 126: 109-19.