



Title	A stem cell marker KLF5 regulates CCAT1 via three-dimensional genome structure in colorectal cancer cells
Author(s)	武田, 和
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/91792
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	武田 和
論文題名 Title	A stem cell marker KLF5 regulates <i>CCAT1</i> via three-dimensional genome structure in colorectal cancer cells (幹細胞マーカーKLF5は大腸癌細胞において三次元ゲノム構造を介してCCAT1発現を調整する)
論文内容の要旨	
〔目 的(Purpose)〕	
KLF5遺伝子はKLF (Krüppel-like factors) ファミリーに属する転写因子で、消化器腺癌や扁平上皮癌などの特定の癌種で発現が亢進している。また、大腸癌においては幹細胞性との関連が報告されている。我々も先行研究において、KLF5遺伝子の3' -UTR領域に結合し、発現を低下させるmiR-4711-5pが大腸癌細胞株の幹細胞性を抑制することを報告した。近年、幹細胞遺伝子など各分化段階で特異的に発現する遺伝子の発現制御に三次元ゲノム構造が関与していることが報告されている。そこで本研究では、KLF5遺伝子の三次元ゲノム構造を介した発現調節機構を明らかにすることを目的とした。	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
まず、KLF5遺伝子のプロモーター領域と結合するゲノム領域を同定するために、特定のゲノム領域と相互作用するDNAを同定できるin vitro enChIP (engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation) 法を行った。大腸癌細胞株を用いてKLF5遺伝子のプロモーター領域に対する2種類のguide RNA (gRNA) とネガティブコントロールgRNAでin vitro enChIPを行い、次世代シーケンサーによる解析を行った結果、KLF5遺伝子の存在する13番染色体において、エンハンサー候補領域を複数同定することができた。その中からChIPシーケンスのパブリックデータベース解析によって、エンハンサーマーカーであるヒストンH3の27番目リジンのアセチル化 (H3K27ac) やBRD4のピークと一致する領域を絞り込んだ。この領域がエンハンサーとして機能するかを調べるため、CRISPR/Cas9システムを用いて、この領域のヘテロ欠失変異体を5つ作製した。その結果、全てのヘテロ欠失変異体においてKLF5発現が低下しており、KLF5遺伝子のエンハンサーとして機能することが証明できた。次に、転写因子結合予測ツールによる解析を行うと、KLF5タンパク自身が、KLF5遺伝子のプロモーター領域とエンハンサー領域に結合する可能性が示唆された。そこで、ChIP-qPCRを行ったところ、KLF5タンパクが三次元ゲノム構造の構築に重要であるコファクターと呼ばれる分子群 (BRD4タンパク・Mediator複合体・Cohesin複合体) とともに、KLF5遺伝子のプロモーター領域とエンハンサー領域に結合していることが明らかになった。続いて、幹細胞性に関する検討を行った結果、KLF5エンハンサー領域のヘテロ欠失変異体では5-FUおよびオキサリプラチンによる化学療法抵抗性の低下、Sphere形成能の低下、BMI1, LGR5, CD44v9といった癌幹細胞関連マーカー発現の低下が認められた。	
In vitro enChIP法のシーケンズ結果をさらに詳細に解析すると、KLF5遺伝子のプロモーター領域はKLF5遺伝子とは異なる染色体上 (8番染色体) に位置するノンコーディングRNA遺伝子CCAT1 (colon cancer associated transcript 1) の転写開始点 (TSS) 領域とも結合することが明らかとなった。そこで、CCAT1遺伝子TSS領域のヘテロ欠失変異体を10個作製したが、KLF5の発現低下は認められなかった。一方、siRNAによるKLF5のノックダウンとKLF5阻害剤ML264投与によって、CCAT1の発現は有意に抑制された。また、KLF5遺伝子エンハンサー領域のヘテロ欠失変異体においてもCCAT1発現は低下していた。さらにChIP-qPCRの結果、KLF5タンパクはコファクターとともに、CCAT1遺伝子のTSS領域にも結合していることが明らかになった。最後に、大腸癌組織標本 (27検体) を用いて、免疫組織化学的にKLF5タンパク発現を、RNAscope (in situ hybridization) によりCCAT1発現を検討したところ、正の相関を認めた。大腸癌手術検体から抽出したRNA (131症例) の検討においても、KLF5とCCAT1の発現に有意な正の相関関係が認められた。	
〔総 括(Conclusion)〕	
本研究の結果、大腸癌細胞においてKLF5タンパクはコファクターとともに三次元ゲノム構造を構築し、KLF5遺伝子発現を自己制御し、幹細胞性の維持に関与していることが示された。さらに、KLF5タンパクは異なる染色体上に位置するKLF5遺伝子とCCAT1遺伝子間の三次元ゲノム構造を介した協調的な遺伝子発現調節機構にも関与していることが明らかになった。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 武田 和			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	江口 英利 署名
	副 査	大阪大学教授	早島 晴彦 署名
	副 査	大阪大学教授	谷内田 真一 署名
論文審査の結果の要旨			
幹細胞遺伝子など各分化段階で特異的に発現する遺伝子の発現制御に三次元ゲノム構造が関与することが報告されている。本研究は三次元ゲノム構造の解析技術であるin vitro enChIP法を用いて、大腸癌において幹細胞性との関連が報告されているKLF5遺伝子の三次元ゲノム構造を介した発現調節機構を解明することを目的とした。 本研究で我々は、大腸癌細胞におけるKLF5遺伝子エンハンサー領域の同定に成功し、KLF5遺伝子エンハンサー領域の欠失変異体において、幹細胞性が低下することを明らかにした。また、KLF5遺伝子プロモーター領域がKLF5遺伝子とは異なる染色体上に位置するCCAT1遺伝子の転写開始点領域とも結合することを明らかにした。さらに、KLF5タンパクがKLF5遺伝子のプロモーター、エンハンサー、CCAT1遺伝子の転写開始点領域に結合し、遺伝子発現調節に関わることを見いだした。臨床検体においては、KLF5とCCAT1の発現に有意な正の相関関係が認められた。 以上より、KLF5タンパクによる三次元ゲノム構造を介したKLF5、CCAT1遺伝子の協調的な発現調節機構を明らかにできた。 博士（医学）の学位授与に値する。			