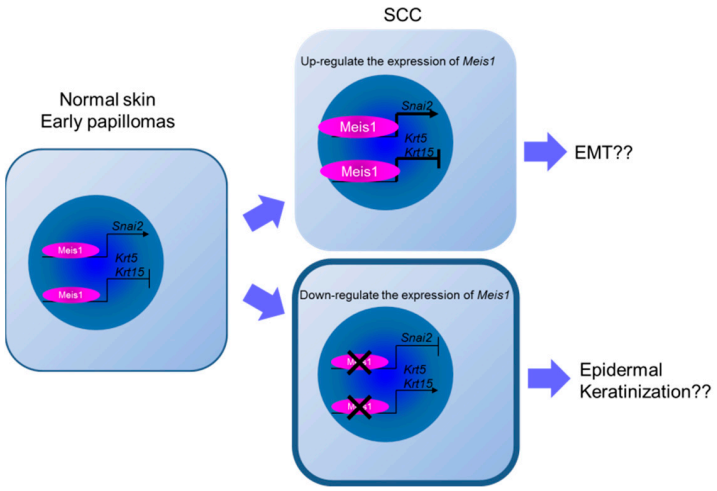
122　腫瘍悪性化機構における*Meis1*下流因子の網羅的解析	奥村　和弘

【目的】*Meis1* は転写因子であり、近年では造血器腫瘍だけでなく、固形がんにおいても *Meis1* が強発現することが報告されているが、不明な点が多い。これまでに我々は、化学発がん剤 DMBA/TPA を用いた多段階皮膚発がんマウスモデルにより *Meis1* が発がん機構に重要な役割もつことを明らかにしてきた。上皮性腫瘍における *Meis1* 下流遺伝子ネットワークの解明を目的として悪性化過程の表皮由来細胞株を用いた RNA-seq と ChIP-seq データとを統合し、*Meis1* の新規標的因子の同定を試みた。

【方法】マウス正常皮膚由来細胞株 C5N および同マウス発がんモデルの腫瘍から樹立された細胞株 B9（扁平上皮がん）、D3（スピンドル型扁平上皮がん）のそれぞれの *Meis1* ノックダウン細胞株（*Meis1* KD）を作製し、RNA-seq を実施した。

【結果】C5N、B9 および D3 の *Meis1*KD において発現量が 2 倍以上（≧FC2）変動した遺伝子の抽出に成功した。それらの中で悪性化を通して変動する遺伝子群としてサイトケラチンが認められた。特に、上皮性細胞マーカーにも用いられる高分子型の *Krt5/6a/6b/14/15* が C5N および B9-*Meis1* KD で発現上昇していた。さらに EMT 関連転写因子の *Snai1/2* や間葉系細胞マーカーの *Vim* が *Meis1* KD で発現低下する傾向が認められた。一方、すでに取得済みであった多段階悪性化過程の Meis1-ChIP-seq データと併せて解析した結果、*Krt5* および *Krt15* において正常皮膚および早期良性腫瘍で両遺伝子の上流にリードピークが検出された。一方、EMT 関連転写因子 *Snai2* においても同様に検索した結果、早期良性腫瘍においてピークが検出された。そこで *Krt5*、*Krt15* および *Snai2* の 5’ UTR 上流の配列を検索した結果、1 kb 以内に *Meis1* 結合モチーフのコンセンサス様配列がそれぞれ 1 つ以上確認できた。これらのことから、*Meis1* が直接的に *Krt5*、*Krt15* および *Snai2* の発現調節をしていることが予測され、RNA-seq のデータと照合すると *Meis1* が発がんステージの早期段階で *Krt5* や *Krt15* を発現抑制し、*Snail2* を発現亢進させることが考えられた。

多段階皮膚発がん悪性化に関与する *Meis1* 下流候補因子とその発現制御モデル



122. 腫瘍悪性化機構における *Meis1* 下流因子の網羅的解析

奥村　和弘

千葉県がんセンター がんゲノムセンター 腫瘍ゲノム研究室

Key words：DMBA/TPA，多段階皮膚発がん，Meis1，RNA-seq，ChIP-seq

緒　言

Meis1 は TALE 構造のホメオドメインを持つ転写因子であり、元々骨髄性白血病に関わるがん遺伝子あるいは他のがん遺伝子の標的遺伝子として同定され、造血幹細胞の維持に重要であることが明らかになっている。一方、近年では造血器腫瘍だけでなく、卵巣がんや腎芽腫などの固形がんにおいても *Meis1* が強発現することが報告されているが、詳細な機能についてはほとんどわかっていない状況である［1，2］。これまでに、我々の研究グループは *Meis1* の上皮性がんにおける機能に着目し、様々な臓器の上皮で遺伝子の発現を誘導することが知られている Type 14 cytokeratin プロモーターの下流に Estogen Receptor と Cre との融合タンパクを連結させ tamoxifen により Cre を誘導可能にした deleter マウス（$K14Cre^{ER}$）と *Meis1* コンディショナルノックアウトマウス（$Meis1^{fl/fl}$）とを交配し、*Meis1* 欠失の影響を検討した。その結果、正常皮膚における *Meis1* の欠失は表皮幹細胞の減少、毛形成の異常を示したことから、*Meis1* は皮膚においても血液同様に幹細胞の維持に重要であることが明らかとなった。一方、発がんにおける機能解析として化学発がん剤である DMBA/TPA による多段階皮膚発がん実験を行った［3］。その結果、発がん刺激の前後で *Meis1* を欠失させると良性腫瘍数の減少および扁平上皮がんへの悪性化率の有意な低下が認められ、特に悪性化に関しては発がん刺激後に *Meis1* を欠失させると最も扁平上皮がんを抑制した。このように、上皮性の固形腫瘍においても *Meis1* が悪性化を促進する因子であることが示された［4］。そこで、*Meis1* を中心とした腫瘍悪性化の遺伝子ネットワークを明らかにすることを目的に、悪性化過程の表皮由来細胞株を用いた RNA-seq と発がん剤により誘導した腫瘍クロマチンを用いた ChIP-seq データとを統合し、*Meis1* の新規標的因子の同定を試みた。

方　法

1. *Meis1* ノックダウン細胞株の作製

マウス正常皮膚由来細胞株 C5N および発がん剤により誘導された腫瘍から樹立された細胞株 B9（扁平上皮がん）、D3（スピンドル型扁平上皮がん）のそれぞれの *Meis1* ノックダウン細胞株（*Meis1* KD）を作製した。作製法は以前報告した手法と同様にレトロウィルスベクターコンストラクトを用いて PlatE 細胞に導入し、各細胞に感染させ作製した［5］。また *Meis1* の発現低下は qRT-PCR 法により確認し、以降の実験に用いた。

2. RNA-sequencing

それぞれの *Meis1* KD、およびベクターコントロール細胞株からトータル RNA の抽出を行った。また RNA のクオリティーチェックにはバイオアナライザーを用い、RIN が 7.0 以上のものを使用した。以降の実験はマクロジェン・ジャパンに委託して行った。ライブラリ調整は Illumina TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 を用い、次世代シークエンサーは Ilumina の HiSeq 2500 を使用した。最終的なシークエンスデータの解析については GeneSpringGX（Agilent Technologies）を用いて網羅的遺伝子発現解析を各細胞株で行った。

3. $K15Cre^{PR}$-$Meis1^{fl/fl}$ マウスの作製と表現型解析

すでに千葉県がんセンター研究所にて導入済みであった K15CrePR マウスと $Meis1^{fl/fl}$ マウスを交配させ、$K15Cre^{PR}$-$Meis1^{fl/fl}$ マウス作製した。それらのマウスに RU486 を腹腔内投与し、コンディショナルなノックアウト処理を行った後、皮膚組織を採取した。採取した皮膚組織は 4%パラフォルムアルデヒドにより固定し、パラフィン包埋

した。包埋サンプルはミクロトームを用いて薄切し、HE 染色により表現型の解析を行った。

結　果　および　考　察

1. *Meis1* ノックダウン細胞株における発現変動する遺伝子群の探索

当初、K14Cre^{ER}-*Meis1* $^{fl/fl}$マウスに DMBA/TPA により誘導した腫瘍サンプルを用いて RNA-sequencing を実施しようと試みたが、RNA-sequencing が可能な RNA クオリティーを保つことが困難であった。そこで、代替法としてマウス正常皮膚由来細胞株 C5N および発がん剤により誘導された腫瘍から樹立された細胞株 B9（扁平上皮がん）、D3（スピンドル型扁平上皮がん）のそれぞれの *Meis1* ノックダウン細胞株（*Meis1* KD）を作製し、RNA-sequencing を実施した。それらの *Meis1* KD 細胞株とベクターコントロール細胞株をそれぞれ比較し、発現量が 2 倍以上（≧FC2）変動した遺伝子を抽出した（図 1A、B および C）。C5N-*Meis1* KD において発現低下する遺伝子が 398 個、同様に B9 では 315 個、D3 では 573 個であった。それらの遺伝子群の共通性を調査した結果、C5N、B9、D3 で共通して発現量に挙動がある遺伝子は 22 個、C5N および B9 に共通する遺伝子は 62 個、B9 と D3 に共通する遺伝子は 74 個、D3 と C5N に共通する遺伝子は 62 個であった（図 2A）。それらの中で変動する遺伝子群としてサイトケラチン群が認められた。特に、上皮性細胞マーカーに用いられる高分子型の *Krt5/6a/6b/14/15* が B9-*Meis1* KD で発現上昇していた。一方で Krt *7/8/18*といった腺細胞に認められる低分子サイトケラチンは逆に発現低下がみられた（図 2B）。さらに表皮由来細胞株全体を通して、通常、悪性化に伴って発現上昇がみられる上皮間葉転換（EMT）関連転写因子の *Snai1/2* や間葉系細胞マーカーの *Vim* の発現が低下する傾向が認められた（図 2C）。

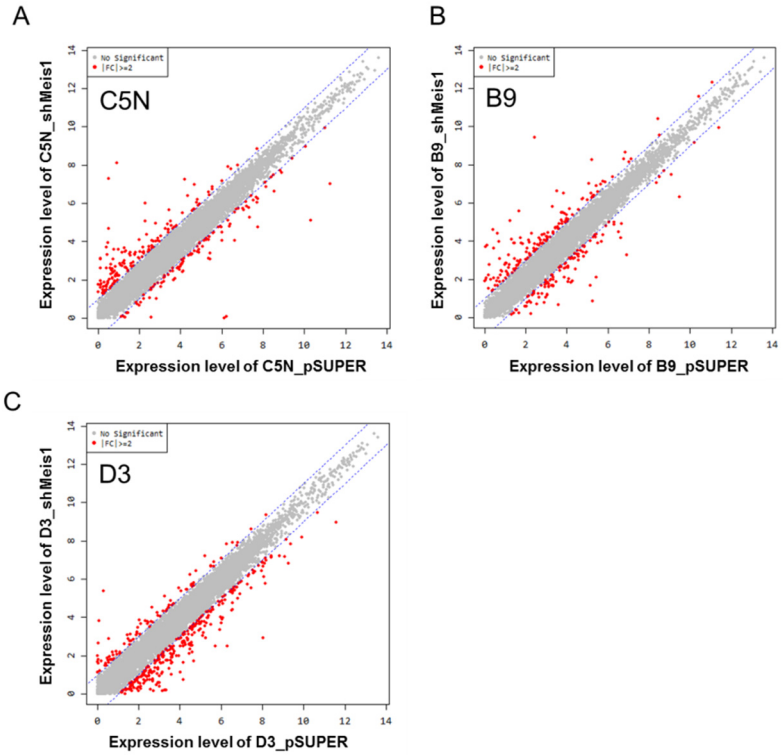


図 1. *Meis1* ノックダウン C5N、B9 および D3 細胞株における RNA-seq による網羅的遺伝子発現変動解析

A）*Meis1* ノックダウン C5N（マウス正常皮膚由来細胞株）における発現変動（FC≧2）した遺伝子プロット

B）*Meis1* ノックダウン B9（マウス扁平上皮がん由来細胞株）における発現変動（FC≧2）した遺伝子プロット

C）*Meis1* ノックダウン D3（マウス Spindle cell Carcinoma 由来細胞株）における発現変動（FC≧2）した遺伝子プロット

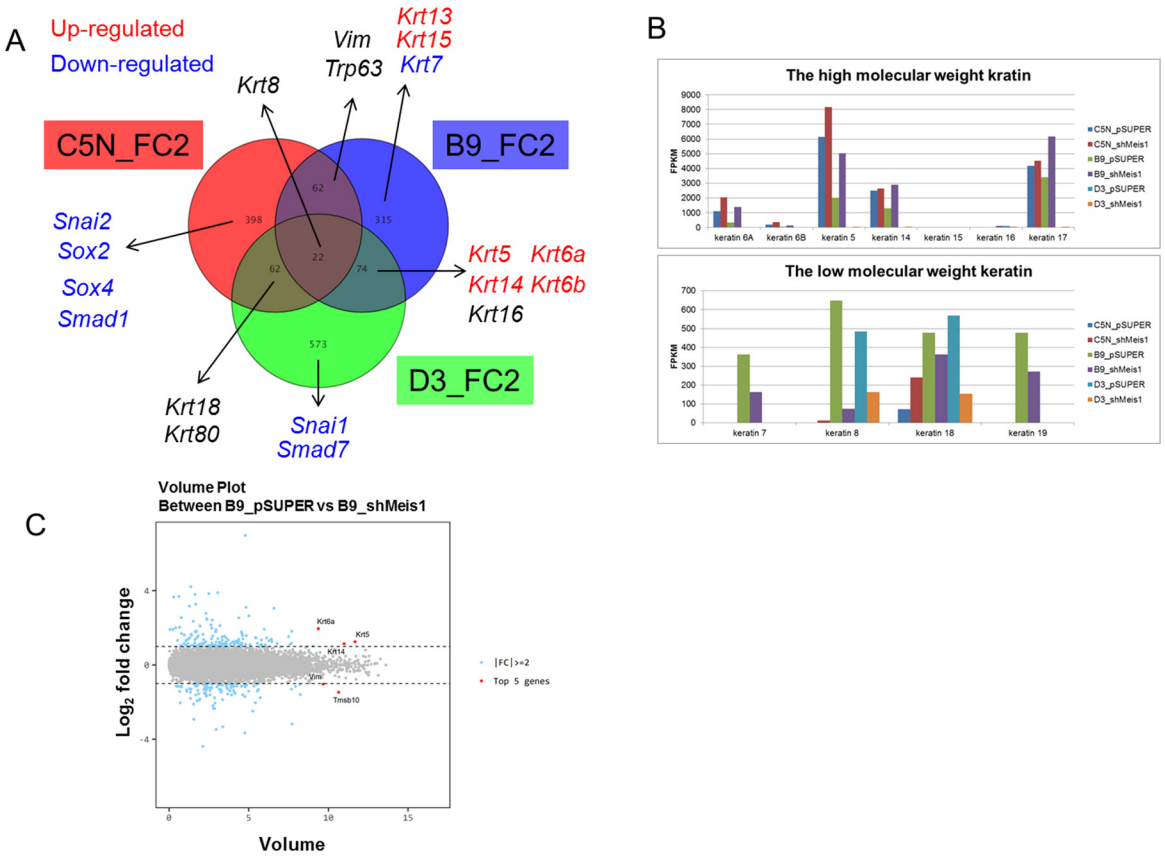


図 2. 表皮細胞株における *Meis1* の減少はサイトケラチンの発現上昇と EMT 関連遺伝子の発現減少を導く

A）3 種細胞株の *Meis1* ノックダウンにより発現変動した遺伝子群と主なサイトケラチンおよび EMT 関連遺伝子

B）3 種細胞株 *Meis1* ノックダウンにより発現変動した高分子および低分子サイトケラチンの発現変動

C）B9 細胞株における *Meis1* ノックダウンにより変動する遺伝子トップ 5 遺伝子

2. 多段階皮膚発がんモデルにおける *Meis1* 下流因子の同定

次にすでに取得済みであった多段階悪性化過程（正常皮膚、早期良性腫瘍、後期良性腫瘍および扁平上皮がん）の Meis1-ChIP-seq データと併せて解析した結果、*Krt5* および *Krt15* において正常皮膚および早期良性腫瘍で両遺伝子の上流にリードピークが検出された（図 3A および C）。一方、EMT 関連転写因子 *Snai2* においても同様に検索した結果、早期良性腫瘍においてピークが検出された（図 3E）。そこで *Krt5*、*Krt15* および *Snai2* の 5'UTR 上流の配列を検索した結果、1 kb 以内に *Meis1* 結合モチーフに対するコンセンサス様配列がそれぞれ 1 つ以上確認できた（図 3B、D および F）。これらのことから、*Meis1* が直接的に *Krt5*、*Krt15* および *Snai2* の発現調節をしている可能性が予測された。これらの結果と RNA-seq のデータと照合すると *Meis1* が発がんステージの早期の段階で *Krt5* や *Krt15* を発現抑制し、*Snail2* を発現亢進させることが考えられた。これらのことは、K14Cre^{ER}-*Meis1* $^{fl/fl}$ マウスにみられた *Meis1* 欠失に伴う正常皮膚の肥厚および悪性腫瘍の発生率低下［3］などが上皮性ケラチンの発現上昇や EMT の抑制によって誘導されている可能性を示唆する結果となった。一方、悪性腫瘍における *Meis1* の発現が *Vim* とは共局在せず、*Krt14* と共局在すること［3］から、EMT が完全に起きた細胞あるいは間葉系細胞よりは、むしろ上皮細胞からの間葉系に移行する際に *Meis1* が表皮細胞に作用することが考えれらた。つまり、正常皮膚において *Meis1* は幹細胞を含めた表皮細胞の上皮性と間葉性とのバランスを維持する重要な転写因子であり、悪性化するに従って *Meis1* の発現が高くなることによって EMT が促進され腫瘍の悪性化を導いていることが推測された。今後は、これらの仮説を証明するため更なる実験を行う必要がある。

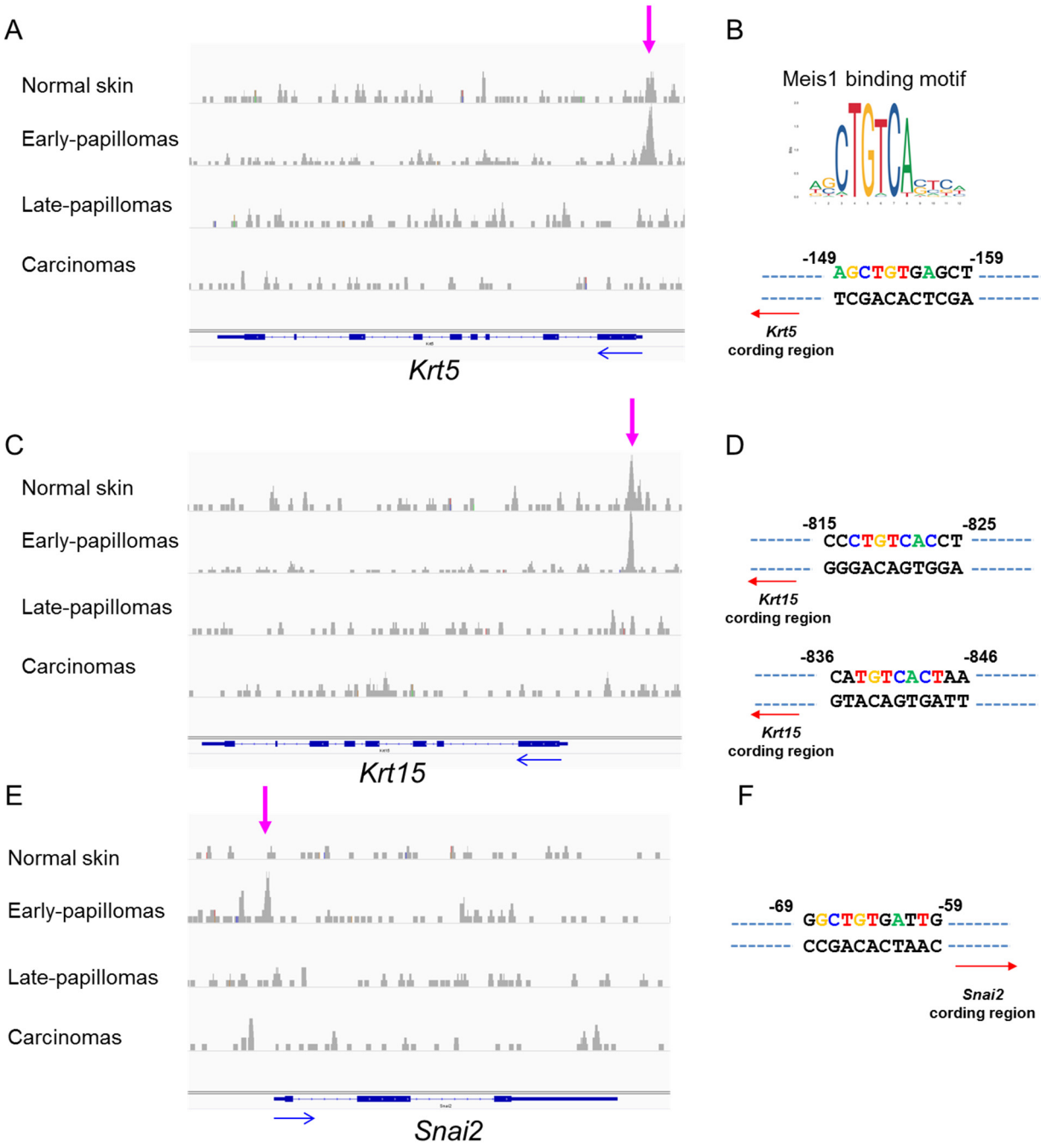


図 3. *Krt5*、*Krt15* および *Snai2* における皮膚腫瘍を用いた ChIP−seq 解析結果と Meis1 結合領域の推定

A) *Krt5* におけるマウス組織クロマチンサンプルに対する Meis1 特異抗体を用いた ChIP-seq 解析結果

B) Meis1 の DNA 結合モチーフと *Krt5* 遺伝子プロモーター領域における Meis1 結合コンセンサス様配列

C) *Krt15* におけるマウス組織クロマチンサンプルに対する Meis1 特異抗体を用いた ChIP-seq 解析結果.

D) *Krt15* 遺伝子プロモーター領域における Meis1 結合コンセンサス配列

E) *Snai2* におけるマウス組織クロマチンサンプルに対する Meis1 特異抗体を用いた ChIP-seq 解析結果

F) *Snai2* 遺伝子プロモーター領域における Meis1 結合コンセンサス様配列

ピンク矢印はシークエンスリード・ピークを示し、青矢印は転写開始方向を示す。

3. K15Cre^{PR}-*Meis1*$^{fl/fl}$マウスは毛包減少を示す

これまでに、我々の研究成果から正常皮膚の表皮幹細胞が存在する毛包バルジ領域において *Meis1* が発現し、幹細胞の維持に関与することが明らかとなっている。一方、*Krt15* は毛包バルジの表皮幹細胞マーカーの一つであり、実際に我々は免疫染色レベルで両者が共局在することを明らかにしている［3］。上述した RNA-sequencing および ChIP-sequencing 結果から、*Meis1* が直接的に *Krt15* の発現調節を行うことが示唆されたことから、*Meis1-Krt15* が幹細胞の維持に肝要である可能性も考えられた。そこで、*Krt15* のプロモーターの下流に Cre^{PR} を融合した Tg マウスとすでに我々が保有している *Meis1*$^{fl/fl}$ マウスを交配した。これらのマウスに RU486 を腹腔内投与し、*Meis1* の欠損を誘導した後に皮膚組織の表現型解析を HE 染色により実施した。その結果、K15Cre^{PR}-*Meis1*$^{fl/fl}$ マウスはコントロールマウスと比較してバルジ領域を含む毛包数の減少傾向が観察された（図 4B）。このことは、*Meis1-Krt15* が幹細胞維持に重要であることを示している。今後はこれらマウスを利用して BrdU を用いた詳細なチェイス実験および DMBA/TPA による発がん実験を実施することで *Meis1* の悪性化機構における更なる理解を深めるとともに、*Meis1* が新規がん治療標的となるか検討を継続したい。

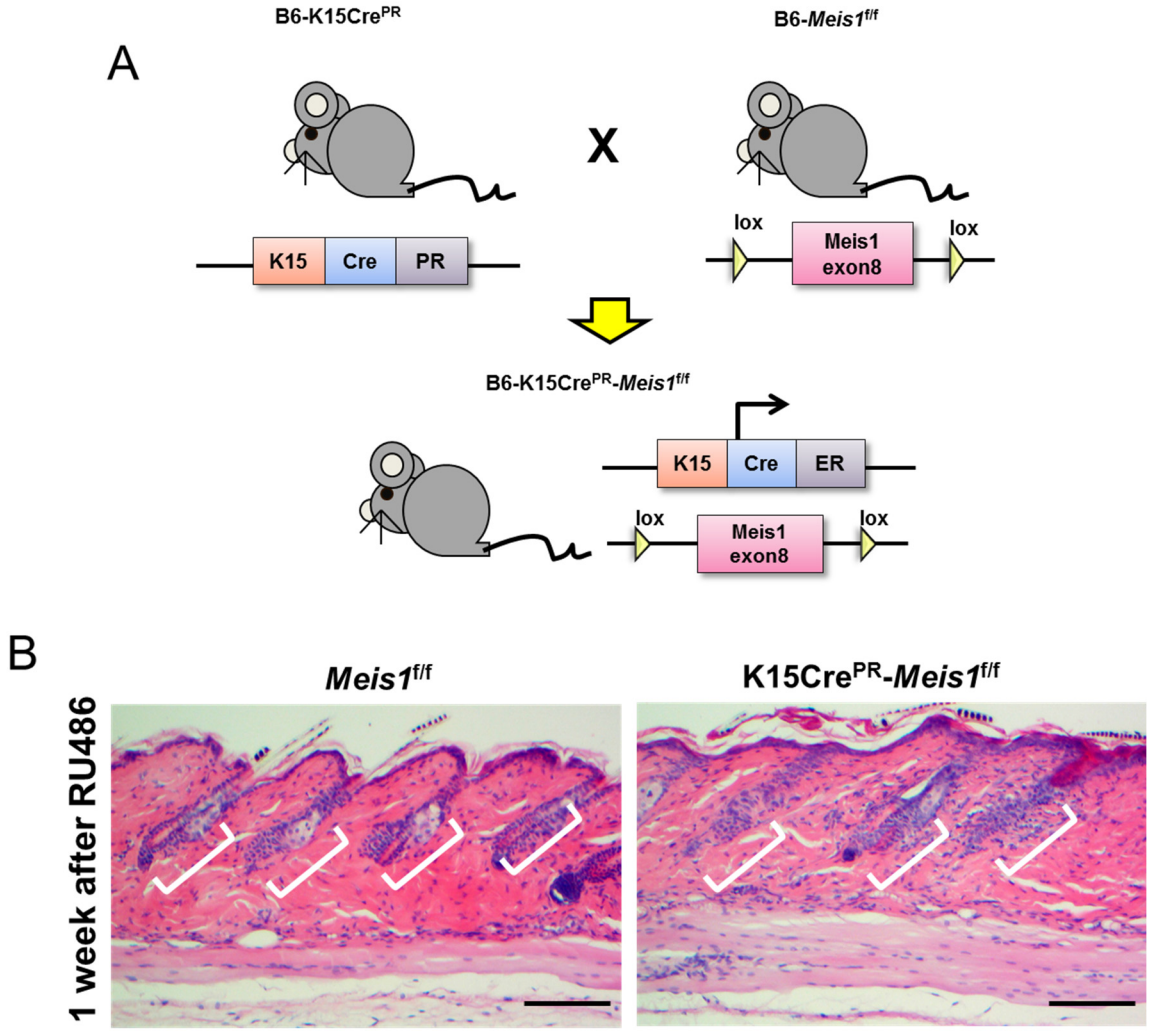


図 4. K15Cre^{PR} - *Meis1*$^{fl/fl}$ マウスの作製と表皮組織の表現型解析

A）K15 プロモーター配列の下流に Cre リコンビンナーゼとプロゲステロン受容体融合蛋白質を連結した K15Cre^{PR} マウスと DNA 結合ドメインをコードする *Meis1* の Exon8 を loxP 配列で挟んだ *Meis1*$^{fl/fl}$ マウスを交配し、K15Cre^{PR}-*Meis1*$^{fl/fl}$ マウスを作製した。

B）K15Cre^{PR}-*Meis1*$^{fl/fl}$ マウスの腹腔内に RU486 投与後、1 週間の皮膚組織像、白括弧は毛包を示す。Scale bar = 100 μm。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、千葉県がんセンター研究所・発がん研究グループ・実験動物研究室の若林雄一室長である。

文　献

1） Dekel B, Metsuyanim S, Schmidt-Ott KM, Fridman E, Jacob-Hirsch J, Simon A, Pinthus J, Mor Y, Barasch J, Amariglio N, Reisner Y, Kaminski N, Rechavi G. Multiple imprinted and stemness genes provide a link between normal and tumor progenitor cells of the developing human kidney. Cancer Res. 2006 Jun 15;66(12):6040-9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4528.

2） Crijns AP, de Graeff P, Geerts D, Ten Hoor KA, Hollema H, van der Sluis T, Hofstra RM, de Bock GH, de Jong S, van der Zee AG, de Vries EG. MEIS and PBX homeobox proteins in ovarian cancer. Eur J Cancer. 2007 Nov;43(17):2495-505. Epub 2007 Oct 18. DOI: 10.1016/j.ejca.2007.08.025.

3） Okumura K, Saito M, Yoshizawa Y, Munakata H, Isogai E, Miura I, Wakana S, Yamaguchi M, Shitara H, Taya C, Karaplis AC, Kominami R, Wakabayashi Y.　The parathyroid hormone regulates skin tumour susceptibility in mice. Sci Rep. 2017 Sep 11;7(1):11208. doi: 10.1038/s41598-017-11561-x.

4） Okumura K, Saito M, Isogai E, Aoto Y, Hachiya T, Sakakibara Y, Katsuragi Y, Hirose S, Kominami R, Goitsuka R, Nakamura T, Wakabayashi Y. Meis1 regulates epidermal stem cells and is required for skin tumorigenesis. PLoS One. 2014 Jul 11;9(7):e102111. doi: 10.1371/journal.pone.0102111. eCollection 2014.

5） Saito M, Okumura K, Yoshizawa Y, Munakata H, Isogai E, Wakabayashi Y. Meis1 Is Required for c-Met Inhibition to Suppress Cell Proliferation of Skin Squamous Cell Carcinoma Cells. JBM. 2016 Jul;4(7):13. 10.4236/jbm.2016.47007. DOI: 10.4236/jbm.2016.47007.