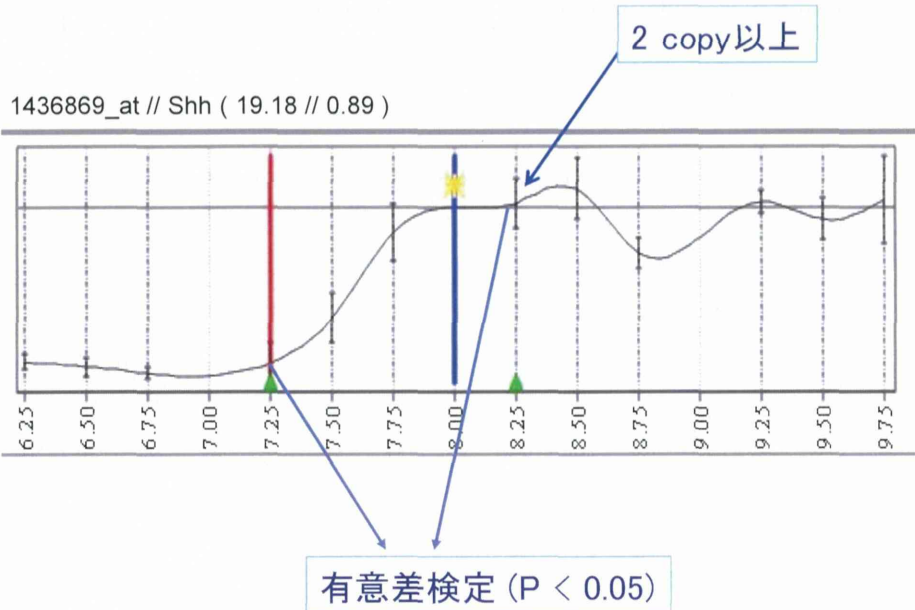


平成25年度研究

[抽出条件]

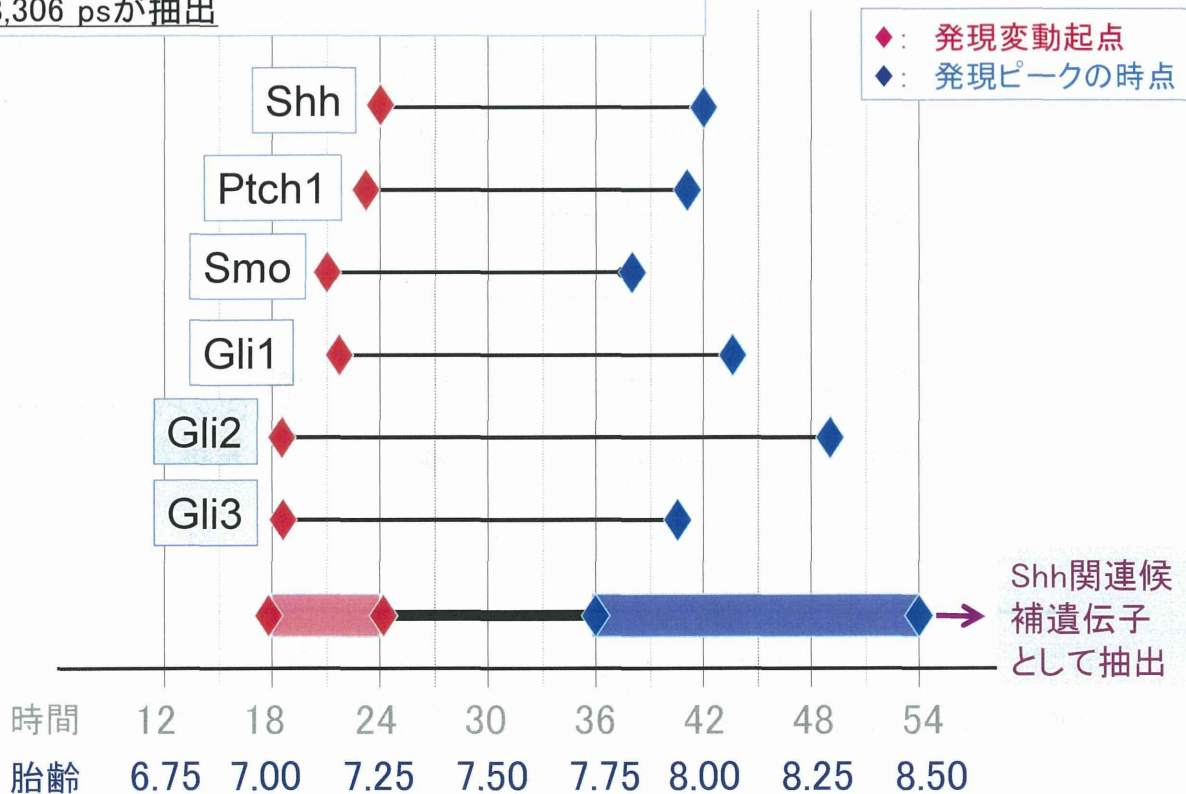
- ・発現ピークの時点の発現コピー数(平均値)が2コピー以上
 - ・発現変動起点と発現ピークの各時点にもっとも近接する実測データのある時点での発現データにつき有意差有り(P<0.05)
- 9,311 psが抽出



[抽出条件] ■ Shh関連遺伝子が存在する

発現変動起点: 18~24 (胎生7.00~7.25)
 発現ピークの時点: 36~54 (胎生7.75~8.50)

→ 8,306 psが抽出

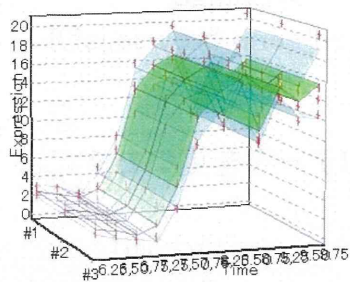


平成25年度研究

生物学的変動を示すと考えられる遺伝子数: 648 ps

Shh

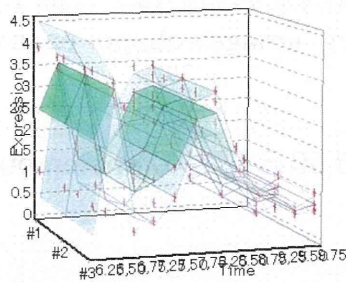
1436869_at
Shh
1436869_at
1436869_at



sonic hedgehog

Cep164

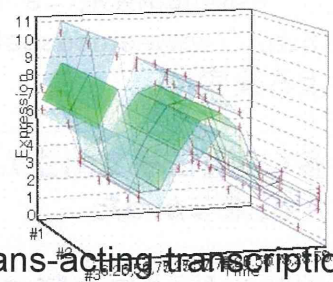
1447278_at
Cep164
1447278_at
1447278_at



centrosomal protein 164

Sp6

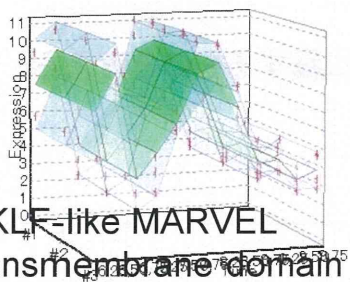
1437788_at
Sp6
1437788_at
1437788_at



trans-acting transcription factor 6

Cmtm7

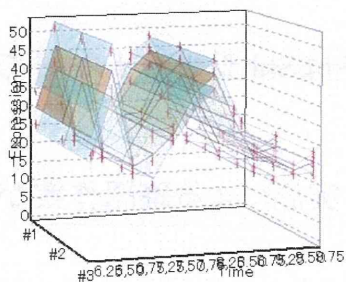
1460253_at
Cmtm7
1460253_at
1460253_at



CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 7

Flot2

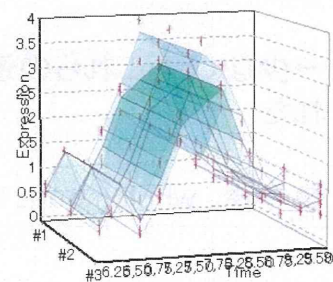
1438164_x_at
Flot2
1438164_x_at
1438164_x_at



flotillin 2

Col13a1

1422866_at
Col13a1
1422866_at
1422866_at



collagen, type XIII, alpha

平成25年度研究

抽出遺伝子(648 ps)についての転写制御の解析 (*in silico*)

—Shhシグナルの制御を受けているもの探索—

Shh関連遺伝子であるPtc1、Smo、Gli遺伝子を除くと

37遺伝子が抽出

BNC1、CCND2、COL2A1、FOXA1、FOXC2、FOXF1、
FOXM1、FZD2、HOXA5、IGF2、IGFBP5、IRS1、
LAMA4、LUM、MAN1C1、MEF2C、MEST、MET、
MMP2、MSX1、NCAM1、NKD1、NREP、NRP2、
OCLN、PDGFA、PITX2、SALL1、SFRP2、SLC2A2、
SNAI2、TAL1、TGFB2、VCAN、VEGFC、WNT5A、
ZC3HAV1L

平成25年度研究

発現の空間分布を検討する必要がある

→ Pubmed検索による文献調査あるいは、公開データベースEmage (http://www.emouseatlas.org/emagewebapp/pages/emage_gene_browse.jsf)による検索

多くの遺伝子で胎生7.00~8.50日相当のwholemout ISHデータを見いだすことが出来なかった

※胎生約9.5日の胚では、**FOXC2、FOXF1、IGFBP5、MEST、MSX1、NCAM1、SFRP2、WNT5A**遺伝子について、Shh発現部位に隣接する中胚葉に、空間的に限局する発現パターンを示す

→少なくともこれらの遺伝子はShhシグナルネットワークに属するものと考えられた。

●今後、wholemout ISHの実施による確認作業が必要

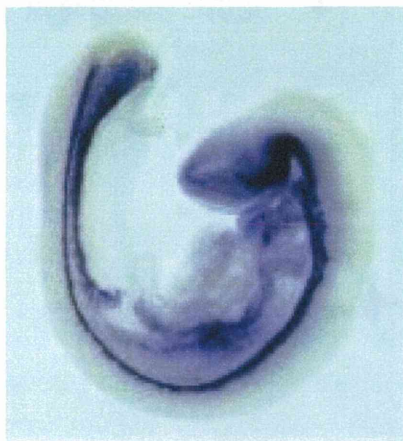
マウス胚でのISHの公開データベース

Emage (http://www.emouseatlas.org/emagewebapp/pages/emage_gene_browse.jsf)

例: Shh

The screenshot displays the Emage database interface for the Shh gene. The page title is "Expression Image Summary". At the top right, there are options for "Add/Remove Columns", "Display 5 entries per page", and "Flexible Scroll". The main content area shows a table of results for the Shh gene. The table has the following columns: Gene/Protein (1), Theliler Stage (12), Structure (82), Find Similar (4), 3D Expression (1), 2D Expression (10), and Data Image (44). The Shh gene is listed in the table with its corresponding Theliler Stage (TS12, TS13, TS14, TS15) and Structure (foregut diverticulum, hindgut diverticulum, endoderm, notochord, diencephalon, floorplate, embryo, future midbrain, floorplate, 1st arch mandibular part). The table also includes icons for "Find Similar", "3D View", and "2D View". The "Data Image" column shows various ISH images of mouse embryos at different stages, illustrating the spatial expression pattern of Shh.

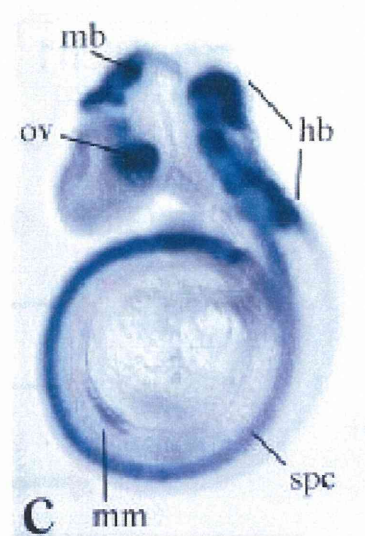
Shh sonic hedgehog



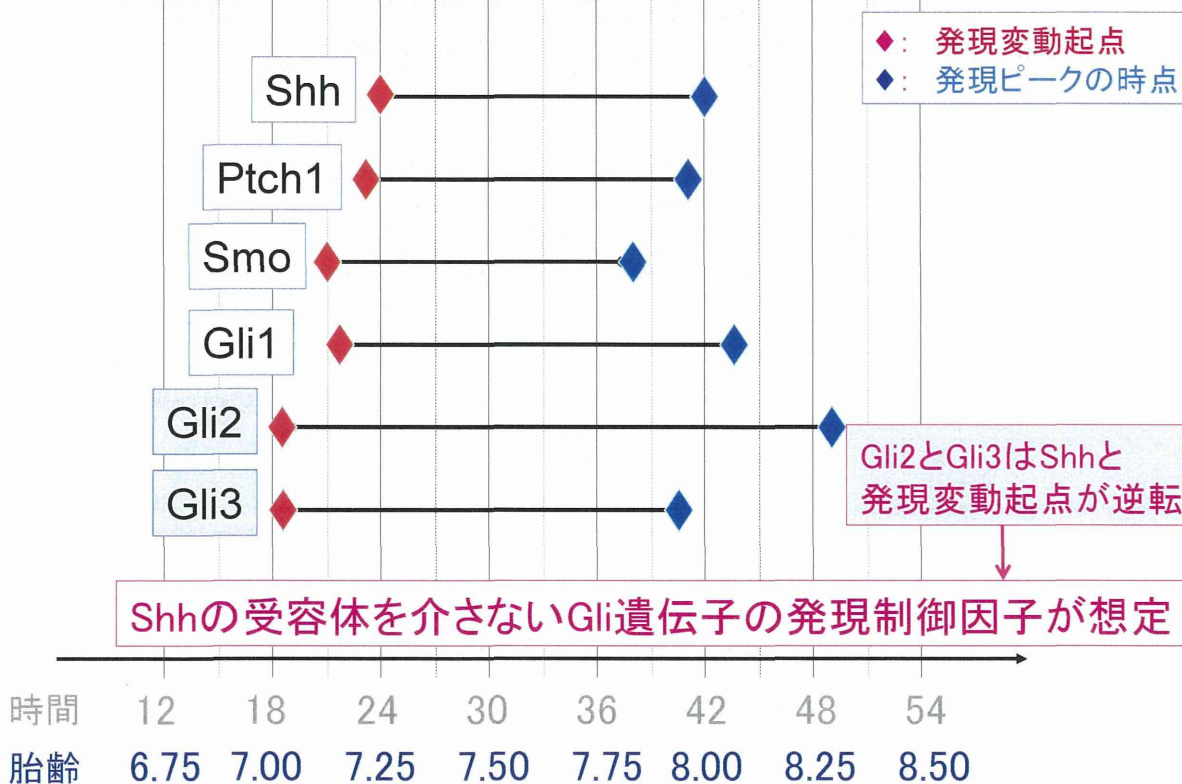
Cadm1
cell adhesion molecule 1



Sfrp2
secreted frizzled-related protein 2



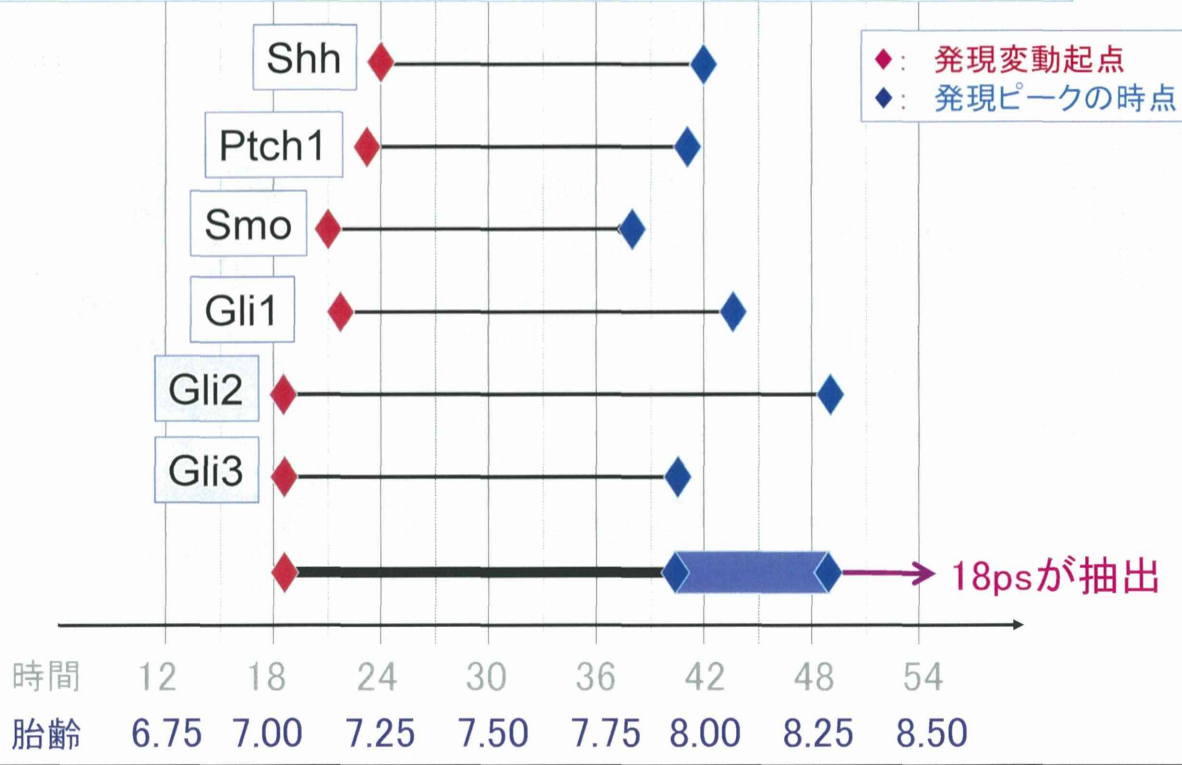
Shh関連遺伝子の発現変動起点及び発現ピークの時点



Shhの受容体を介さないGli遺伝子の発現制御因子の探索

Gli2及びGli3と似た発現を示す遺伝子:

- ・発現変動起点: 19 (胎生7.00~7.25)
- ・発現ピークの時点: 40~49 (胎生7.75~8.50)

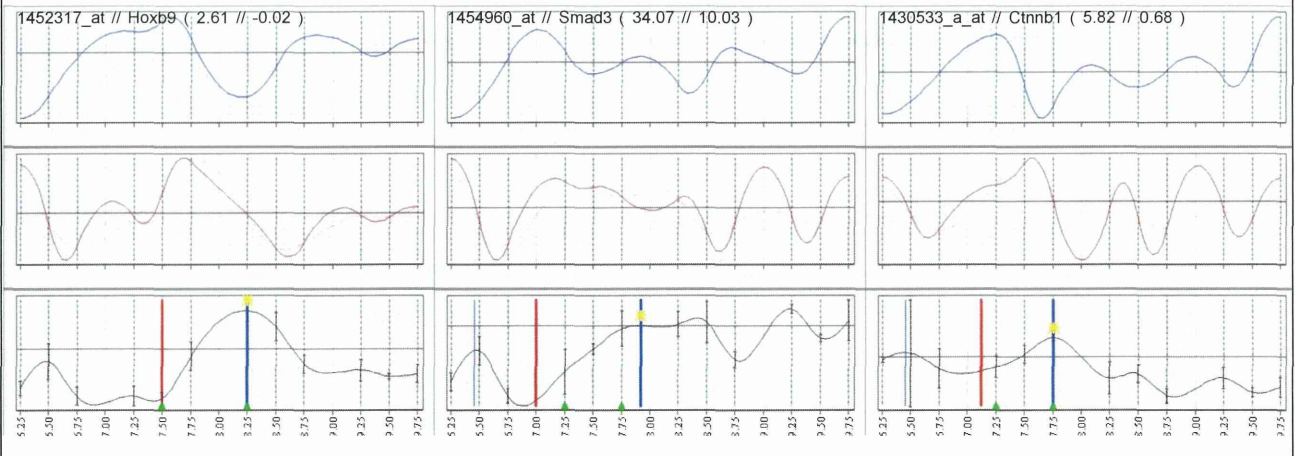


平成25年度研究

この18psについての転写制御の解析 (*in silico*)
 —Shhの受容体を介さないGli遺伝子の発現制御因子の探索—

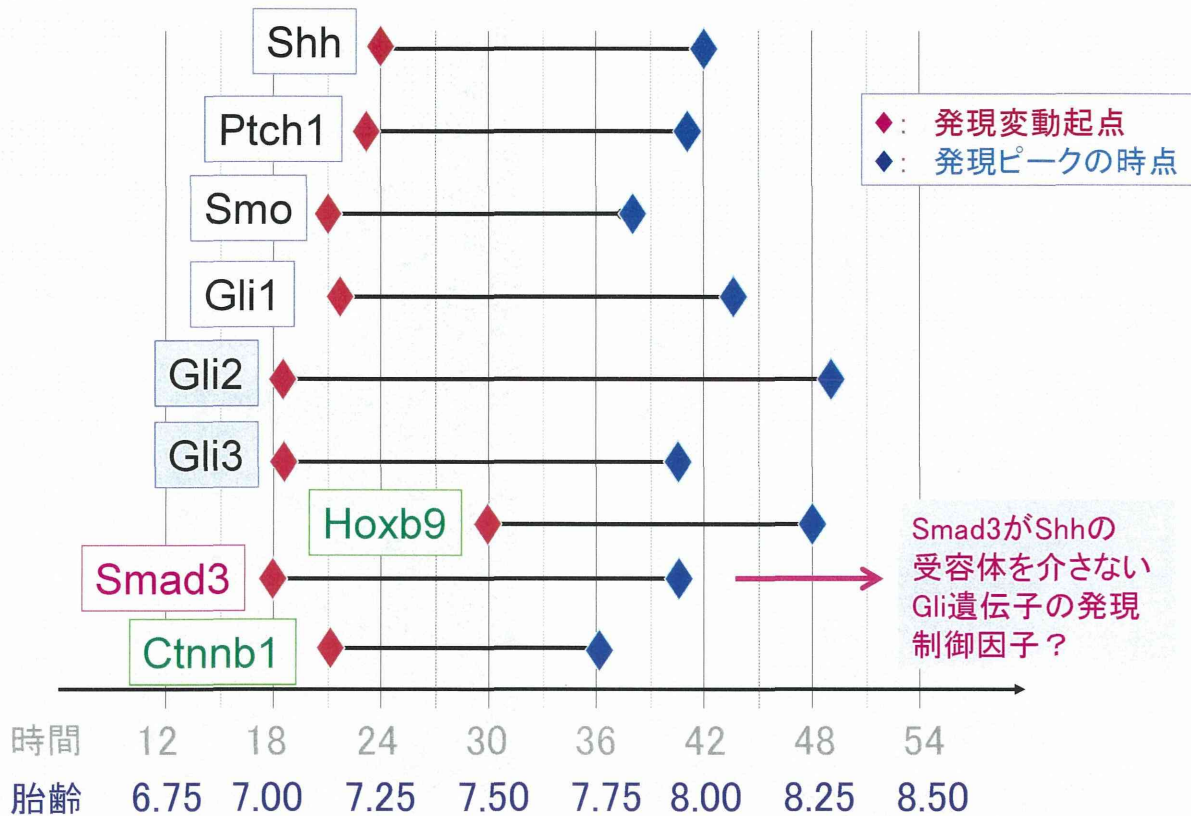
3つの転写因子が抽出

HOXB9、SMAD3、CTNNB1



Shhの受容体を介さないGli遺伝子の発現制御因子の探索(*in silico*)

→ HOXB9、SMAD3、CTNNB1 が候補



Shhの受容体を介さないGli遺伝子の発現制御因子の探索(*in silico*)

→ SMAD3 : 胎児期での検討ではないが、発現制御を示唆する報告有り

Induction of Sonic Hedgehog Mediators by Transforming Growth Factor- β : Smad3-Dependent Activation of *Gli2* and *Gli1* Expression *In vitro* and *In vivo*

Sylviane Dennler,¹ Jocelyne André,¹ Ismini Alexaki,¹ Allen Li,² Thierry Magnaldo,³ Peter ten Dijke,⁴ Xiao-Jing Wang,² Franck Verrecchia,¹ and Alain Mauviel¹

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U997, Paris, France; ²Department of Otolaryngology, Oregon Health and Science University, Portland, Oregon; ³Centre National de la Recherche Scientifique UPR 2169, Institut Gustave-Roussy, Villejuif, France; and ⁴Department of Molecular Cell Biology, Leiden University Medical Center, Leiden, the Netherlands

Abstract

Hedgehog (Hh) and transforming growth factor- β (TGF- β) family members are involved in numerous overlapping processes during embryonic development, hair cycle, and cancer. Herein, we show that TGF- β induces the expression of the Hh signaling molecules *Gli1* and *Gli2* in various human cell types, including normal fibroblasts and keratinocytes, as well as various cancer cell lines. *Gli2* induction by TGF- β is rapid, independent from Hh receptor signaling, and requires a functional Smad pathway. *Gli1* expression is subsequently activated in a *Gli2*-dependent manner. In transgenic mice overexpressing TGF- β 1 in the skin, *Gli1* and *Gli2* expression is also elevated and depends on Smad3. In pancreatic adenocarcinoma cell lines resistant to Hh inhibition, pharmacologic blockade of TGF- β signaling leads to repression of cell proliferation accompanied with a reduction in *Gli2* expression. We thus identify TGF- β as a potent transcriptional inducer of Gli transcription factors. Targeting the cooperation of Hh and TGF- β signaling may provide new therapeutic opportunities for cancer treatment. [Cancer Res 2007;67(14):6981-6]

[Cell Cycle 6:20, 2498-2495, 1st October 2007], ©2007 Landes Bioscience

Perspective

Non-Canonical Activation of GLI Transcription Factors Implications for Targeted Anti-Cancer Therapy

Matthias Lauth
Rune Toftgård*

Kerolinska Institute, Center for Biomimetics, Department of Biomimetics and Nutrition, Novum Research Park, Huddinge, Sweden

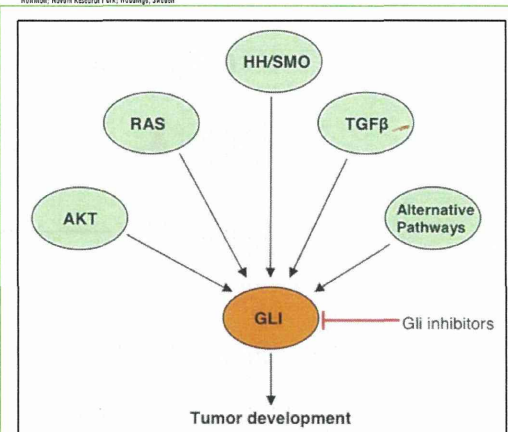


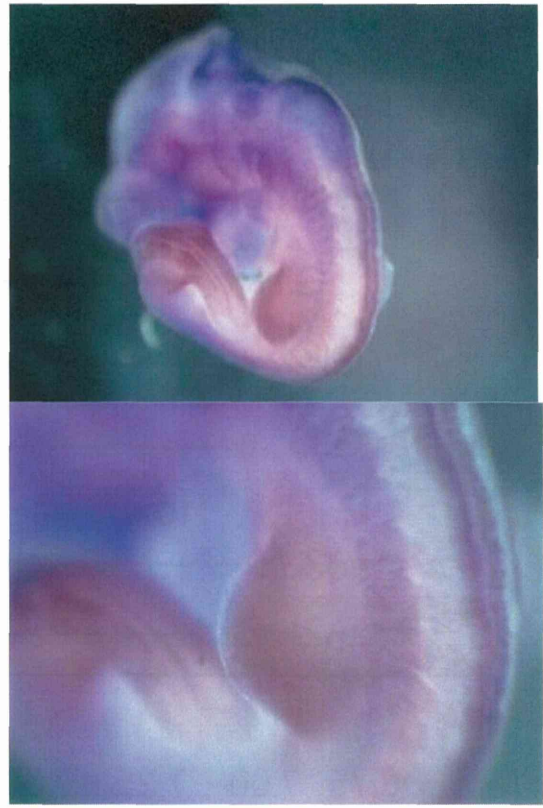
Figure 2. Many signaling pathways converge on GLI. The HH/SMO pathway (canonical HH signaling) might be just one of many ways to activate GLI transcription. All non-canonical activation mechanisms identified so far interact with the HH pathway downstream of SMO. Hence, a GLI inhibitor is well suited for targeted therapeutic approaches in numerous malignancies characterized by elevated GLI activity. 'Alternative pathways' indicates signaling pathways, yet to be identified, interacting with HH/GLI.

Emage検索によるISHデータ

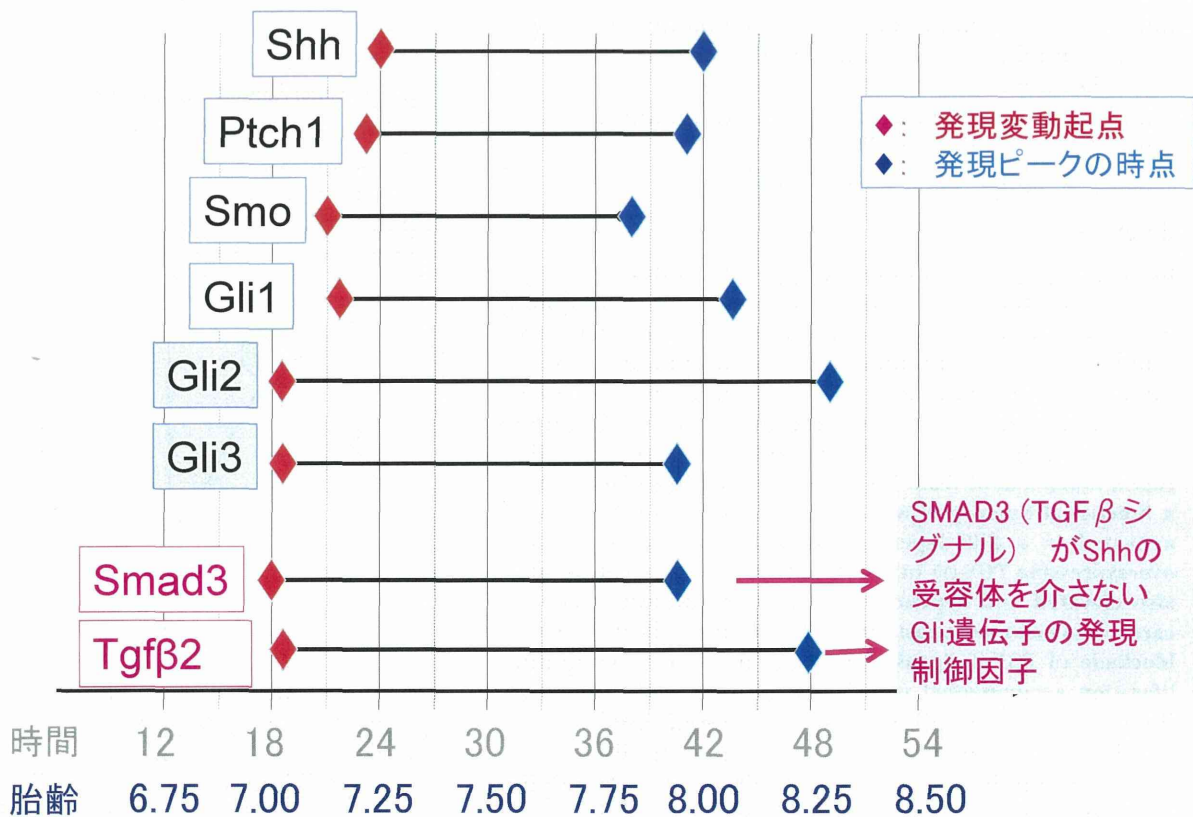
Gli3 GLI-Kruppel family member GLI3



Smad3 MAD homolog 3 (Drosophila)



Shhの受容体を介さないGli遺伝子の発現制御因子の探索(*in silico*)
= SMAD3 (TGF β シグナル)



平成25年度:

マスター遺伝子を基軸とした関連遺伝子の連鎖的捕捉

← 3次元Spline補間とその微分関数を利用し、遺伝子毎に発現変動起点候補と発現ピークの時点を抽出する技術を開発し解析を行う

■ Shh関連遺伝子が存在する

発現変動起点: 18~24 (胎生7.00~7.25)

発現ピークの時点: 36~54 (胎生7.75~8.50)

→ 8,306 psが抽出

→ 目視により生物学的変動を示すと考えられる遺伝子数:

648 ps (Shh関連遺伝子を含む)

→ 抽出遺伝子(648 ps)についての転写制御の解析(in silico):

37遺伝子が抽出

→ 発現の空間分布を検討(whole mount ISH データベース) (in silico):

8遺伝子については、Shh発現部位に隣接する中胚葉に局限する発現パターンが報告

※Shh受容体を介さずにGli遺伝子の発現を制御する因子の存在が想定された:

→ Tgfβシグナルである可能性を示唆 []

Shhシグナルネットワークをモデルに、本解析手法の性能評価をしたところ、機能が既知の関連遺伝子だけではなく未知のものも抽出できた→網羅的な検索へ

目的

胎児発生過程におけるマスター遺伝子を基軸とした 遺伝子発現ネットワークの網羅的解析

— 自律的な遺伝子発現に着目し、これが多く認められる発生過程に焦点をあて、この過程でのマスター遺伝子を基軸とした遺伝子発現ネットワークの網羅的解析—

・胎児発生過程: 自律的な遺伝子発現が多い

連続性のある遺伝子発現変動現象として長時間にわたるものであり、
遺伝子発現シグナルの流れを解析するのに適している

→ 活発な細胞増殖や多様な細胞分化が同時並行で起こるため、
要素分析が困難

平成24年度:

胎児発生過程における複雑なトランスクリプトームからのマスター遺伝子の網羅的抽出

平成25年度:

マスター遺伝子を基軸とした関連遺伝子の連鎖的捕捉

平成26年度:

胎児発生過程に関与する遺伝子発現ネットワーク情報の網羅的導出

方法

平成25年度の成果を踏まえ、この発現変動起点を同定する技術を利用

無処置野生型マウス・全胚遺伝子発現経時データベース(12時点):
 サンプル期間: 胎生6.25日から9.75日(3.5日間=84時間);

3次元Spline補間とその微分関数を利用

← 解析ソフトSeekESP_s.exeを用いて検討 (Spline補間し1時間毎の補間値を得た)

■ 全ての遺伝子について、発現変動起点(と発現ピークの時点)ごとに抽出

← 発現変動起点での発現コピー数が0.3以上のものを選択: 4,395 psを抽出

・目視により生物学的変動と考えられる2,218 psを抽出

→ 発現変動起点別に分類

→ 発現変動起点毎に、遺伝子の発現パターン毎に分類

→ それぞれについて、

・プロモーター解析(*in silico*)

・wholemout ISHによる発現の空間局在を検討

胎児発生過程に関与する遺伝子発現ネットワーク情報の網羅的導出

全ての遺伝子について、発現変動起点ごとに抽出

・発現変動起点での発現コピー数が0.3以上のものを選択: 4,395 psを抽出

→ 目視による生物学的変動と考えられる遺伝子の抽出

VS: Visual Selection (=MOKUSHI)

1=6.25 2=6.50 3=6.75 4=7.25 5=7.50 6=7.75
 7=8.25 8=8.50 9=8.75 10=9.25 11=9.50 12=9.75

baseline 0= no signal at 6.25

baseline 1= some signal at 6.25

init = ESPの一つあとの時点(明らかに発現増加が起こった点)

;		baseline	init 1	peak 1	init 2	peak 2
1418971_x_at	Bcl10		1	1	1	4
1420086_x_at	Fgf4		1	1	1	4
1435228_at	BC023829		1	1	1	4
1436992_x_at	Vdac1		1	1	1	4
1442865_at	Dgkk		1	1	1	4
1416883_at	Clptm1		1	1	1	4

⋮

1437528_x_at	A730017C20Ri		1	7	12	
1416464_at	Slc4a1		0	7	12	
1418157_at	Nr2f1		0	7	12	
1434502_x_at	Slc4a1		0	7	12	
1435670_at	Tfap2b		0	7	12	
1450621_a_at	Hbb-y		0	7	12	