

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23790126
研究課題名（和文） プロモドメインタンパク質の制御を目的とした新しいがん治療法の開発
研究課題名（英文） Development of novel cancer therapy through the targeting bromodomain protein
研究代表者 山口 貴世志（YAMAGUCHI KIYOSHI） 東京大学・医科学研究所・助教 研究者番号：50466843

研究成果の概要（和文）：大腸癌細胞におけるプロモドメインタンパク質 BRD8 の発現亢進には、脱ユビキチン化による分解抑制機構が関与していることが明らかとなった。また、BRD8 ノックダウン細胞の遺伝子発現プロファイル解析は、BRD8 が癌の悪性化に関わっていることを示唆し、BRD8 が有望な癌治療の標的となりうる知見を得た。

研究成果の概要（英文）：Accumulation of BRD8 is frequently observed in colorectal cancer cells. We found that this accumulation resulted from deregulation of ubiquitin-proteasome system. Genome-wide gene expression profiling of BRD8-knocked down cells unveiled association of BRD8 with cancer progression. BRD8 may be an attractive therapeutic target for colorectal cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：ゲノム創薬

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は日本人の悪性新生物死亡者数中第3位（日本人女性では第1位）であり、年間約4万人の患者が大腸癌で亡くなっている。我々の研究室では大腸癌の発生や進展機序を明らかにし、新たな診断・治療法を開発するために、大腸腫瘍のゲノムワイドな遺伝子発現解析を行った。申請者らはこの解析結果を基に、腫瘍組織で高頻度に発現上昇を認める遺伝子、MRG-binding protein (MRGBP, 別名 C20orf20) を同定した。

MRGBP は、以前の研究でヒストンアセチル化酵素である Tat interacting protein (TIP60) / TRRAP を含む複合体の構成因子であることが報告されていたが (Cai Y *et al*, J Biol Chem. 2003;278(44):42733-42736)、その機能は全くわかっていなかった。申請者らはこれまでの研究で、MRGBP の発現が心臓、肺、肝臓および腎臓などの主要な正常臓器で非常に低く、

しかもその発現を siRNA にて特異的にノックダウンすると大腸癌細胞の DNA 合成を抑制し、癌細胞の増殖を阻害することを見出した (Yamaguchi K *et al*, Br J Cancer. 2010;102(2):325-331)。さらに酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより MRGBP と結合するタンパク質 bromodomain containing 8 (BRD8) を同定し、この相互作用は BRD8 の分解を阻害し、核内での BRD8 蓄積を誘導した。

近年、クロマチン構造の修飾を介したエピジェネティックな制御システムが、グローバルな転写に関与していることが明らかになってきた。この転写制御に関わる多くの過程の重要な段階の1つは、ヒストンのアセチル化である。プロモドメインはアセチル化されたヒストンを認識する多くのタンパク質に共通して見られる構造であり、BRD8 もヒストンアセチル化を認識しているものと推察される。BRD8 は甲状腺ホルモンレセプター

の転写を活性化することから(Monden T *et al*, J Biol Chem. 1997;272(47):29834-29841)、転写に関与することは明らかだが、その詳細な機能、特に癌化に関わるメカニズムは全くわかっていない。

2. 研究の目的

MRGBP による BRD8 の安定化メカニズムを解明することにより、BRD8 が大腸腫瘍で高頻度に蓄積する原因を明らかにする。MRGBP と BRD8 の機能解析を通じて、新しい癌化のメカニズムを解明する。さらに、MRGBP と BRD8 の相互作用を標的とした新しい抗癌剤開発のための基盤となる知見を得ることを目指す。

3. 研究の方法

(1)MRGBP と BRD8 の結合領域の検討

BRD8 の様々な欠失変異体発現プラスミドを作製した。HEK293 細胞にこれらの欠失変異体と MRGBP と共発現させて免疫沈降法によって、結合に必須な領域を検討した。

(2)BRD8 のタンパク質安定性と細胞内局在への影響について

BRD8 発現プラスミドを HEK293 細胞に導入した後、プロテアソーム阻害剤 MG132 を添加した。細胞内局在の決定には、細胞免疫染色や細胞質分画と核分画に分離し、BRD8 発現をウエスタンブロッティングにて検出した。

(3)ユビキチン化タンパク質の検出

His タグ付ユビキチンおよび HA タグ付 BRD8 を HEK293T 細胞に発現させ、ユビキチン化されたタンパク質をコバルトレジンを用いて精製した。Anti-HA 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行い、BRD8 のユビキチン化を検出した。

(4)網羅的な遺伝子発現解析

BRD8 に対する 3 種類の siRNA とコントロール siRNA を合成した。これら大腸癌細胞株 HCT116 に導入し、48 時間後に RNA を回収した。BRD8 ノックダウンによる特異的な遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイによって検出した。解析には GeneSpring ソフトウェアを用いた。また、生物学的な機能の解釈やパスウェイ解析については GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) や DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) プログラムを利用した (<http://www.broadinstitute.org/gsea/indin.jsp>)。

4. 研究成果

(1)MRGBP と BRD8 の結合領域の同定

癌細胞における BRD8 タンパクの蓄積は

MRGBP との相互作用によって引き起こされることがわかっている。このメカニズムを解明するために、まず BRD8 内の MRGBP との結合に重要な領域を同定することを試みた。HA タグが付いた野生型および数種類の変異型 BRD8 を発現するプラスミドを作製し、野生型 Myc タグ付き MRGBP とともに細胞に発現させた。Anti-Myc 抗体を用いて免疫沈降を行い、anti-HA 抗体でウエスタンブロットを行った。その結果、野生型 BRD8 およびプロモドメインを有する変異型 BRD8 は MRGBP と共沈するが、プロモドメインを欠失した変異型 BRD8 では共沈しないことが明らかとなった。この結果から MRGBP との結合には BRD8 のプロモドメインが重要であることが示唆された。

(2)MRGBP が及ぼす BRD8 のタンパク質安定性への影響

①BRD8 の細胞内局在

BRD8 タンパクの安定化と細胞内局在を確認するため、HA タグ付きの BRD8 または核移行シグナルを欠失した BRD8- Δ NSL を細胞に発現させ、細胞質分画と核分画を抽出して anti-HA 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。その結果、BRD8 は細胞質と核の両方に発現していたが、BRD8- Δ NSL は細胞質のみで発現していた。またこれらの細胞に MRGBP を共発現させたところ、BRD8 タンパク質の安定化が細胞質・核で共に確認できた。ところが予想に反して核移行シグナルを持たない BRD8- Δ NSL タンパクも細胞質と核に蓄積した。そこで MRGBP は BRD8 を安定化させるだけでなく、核移行にも関与している可能性を考え、核移行シグナルと、MRGBP との結合領域であるプロモドメインの両方を欠失させた変異型プラスミドを作製した。このプラスミドを単独で細胞に発現させたところ細胞質内で高度に蓄積していた。しかも、MRGBP を共発現させても核への移行が認められなかった。これらの結果から MRGBP は BRD8 に結合してタンパクを安定化しているだけでなく、核移行にも関与していることが明らかになった。

②BRD8 のユビキチン化

プロテアソーム阻害剤は BRD8 タンパクの安定化を引き起こすことが明らかとなっていたため、BRD8 のユビキチン化がそのタンパク安定性に重要な役割を演じているものと考えられる。FLAG/His タグ付ユビキチンと、HA タグ付き BRD8 を細胞に共発現させ、コバルトレジンを用いてユビキチン化タンパクを精製した。その後、レジンに結合したタンパクを anti-HA 抗体を用いてウエスタン

プロットを行った。その結果、BRD8 よりもやや大きい分子量の位置に、ユビキチン化された BRD8 に相当するブロードなバンドを認めた。次に変異型 BRD8 についてもユビキチン化の有無を検討したが、プロモドメインを欠失した BRD8 はユビキチン化を認めなかった。このことから、BRD8 はユビキチン化によりプロテアソーム系で分解されてタンパク質量が調節されており、プロモドメインはそのユビキチン化にも重要な役割を演ずることが示された。

②MRGBP による BRD8 のユビキチン化阻害

これまでの検討で BRD8 のプロモドメインはそのユビキチン化と MRGBP の結合の両方に重要であることが示された。そこで、MRGBP による BRD8 ユビキチン化の影響について検討した。野生型 BRD8 および FLAG/His タグ付ユビキチンと共に、野生型 MRGBP または BRD8 に結合できない欠失型 MRGBP を細胞に発現させて、ユビキチン化 BRD8 を検出した。MRGBP 非存在下では BRD8 のユビキチン化が認められたが、野生型 MRGBP の共発現によりユビキチン化が著明に減少した。しかし、BRD8 に結合しない変異型 MRGBP(Mut)の共発現ではユビキチン化された BRD8 が認められた(図 1)。これらの結果より、MRGBP が BRD8 に結合してユビキチン化を抑制することで、BRD8 タンパクの安定化を誘導していることが示唆された。

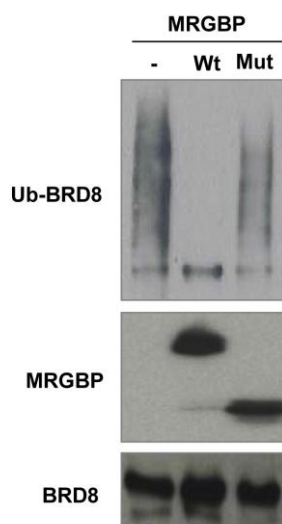


図 1. MRGBP は BRD8 のユビキチン化を阻害する。(Ub-BRD8 はユビキチン化 BRD8、MRGBP-Mut は BRD8 と結合できない欠失型 MRGBP)

(3)BRD8 標的遺伝子群の同定

HCT116 細胞に BRD8 の異なる配列をターゲットとする 3 つの siRNA を導入し、遺伝子発現プロファイルを調べた。これら siRNA 処置によって共通して発現変動する遺伝子群を抽出し、図 2 に示した。発現亢進または低下する lincRNA を含むトランスクリプトはそれぞれ 67 個および 179 個であり、計 246 個の BRD8 の標的候補遺伝子を同定した。

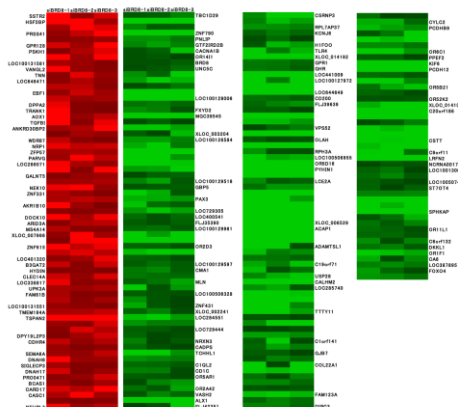


図 2. BRD8 siRNA により発現変動する遺伝子群 (赤は発現上昇した遺伝子群、緑は発現低下した遺伝子群を示す。)

次にこの遺伝子セットの生物学的な機能解釈を行った。興味深いことに、BRD8 は細胞接着に関わる結果が得られた一方で、臭覚に関わるような遺伝子群も有意にエンリッチされていた。また、発現変動した個々の遺伝子について調べてみると、BRD8 は細胞の極性に関わる分子や抗がん剤の感受性に影響を与えるような分子の発現調節を行っていることが明らかとなった。

本研究結果は、大腸癌において高頻度に蓄積が認められる BRD8 が細胞の運動や細胞死調節に関わっている可能性を示唆するものである。BRD8 と MRGBP の結合を阻害する低分子化合物、あるいは BRD8 のアセチル化リジン結合ポケットを阻害する低分子化合物が、がんの浸潤・転移の抑制や抗がん剤耐性を示すがんの治療薬開発に役立つものと期待される。

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 3 件)

- (1) Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, Nakamura K, Yamaguchi K, Ueno K, Nariain N, Mochizuki S, Yamamoto S, Nagasaki M, Furukawa Y, Tani K, Nakauchi H, Kobayashi

M, Tsuji K. Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia patient-derived pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(8):3023-3028. 査読有
DOI: 10.1073/pnas.1217039110

(2) Yamaguchi K, Sakai M, Kim J, Tsunesumi S, Fujii T, Ikenoue T, Yamada Y, Akiyama Y, Muto Y, Yamaguchi R, Miyano S, Nakamura Y, Furukawa Y. MRG-binding protein contributes to colorectal cancer development. *Cancer Sci*. 2011;102(8):1486-1492. 査読有
DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.01971

(3) Fujii T, Tsunesumi S, Yamaguchi K, Watanabe S, Furukawa Y. Smyd3 is required for the development of cardiac and skeletal muscle in zebrafish. *PLoS One*. 2011;6(8):e23491. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0023491

[学会発表] (計 5 件)

(1) Kiyoshi Yamaguchi, Rui Yamaguchi, Masaru Shinozaki, Giichiro Tsurita, Keisuke Hata, Seiya Imoto, Satoru Miyano, Yusuke Nakamura, Yoichi Furukawa. DSCC1 is a novel biomarker for chemo-resistant colorectal cancer. 9th AACR-JCA Joint Conference, February 21, 2013, Hyatt Regency Maui (Maui HI, USA)

(2) Kiyoshi Yamaguchi, Rui Yamaguchi, Masaru Shinozaki, Giichiro Tsurita, Keisuke Hata, Seiya Imoto, Satoru Miyano, Yusuke Nakamura, Yoichi Furukawa. DSCC1 promotes survival of colorectal cancer cells through the induction of BCL2 expression. 8th International Symposium on Cancer Research and Therapy 2012 年 11 月 9 日 東京会館 (東京)

(3) 山口貴世志, 池上恒雄, 宮野悟, 中村祐輔, 古川洋一. Identifying the target of histone methyltransferase SMYD3 in colorectal cancer cells. 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19 日 ロイトン札幌 (札幌)

(4) 山口貴世志, 藤井智明, 池上恒雄, 中村祐輔, 古川洋一. Defective in sister chromatid cohesion 1 homolog (DSCC1), a novel target of E2F1 is overexpressed in colorectal cancer. 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 3 日 名古屋国際会議場 (名古屋)

(5) Kiyoshi Yamaguchi, Michihiro Sakai, JooHun Kim, Yoshinao Yamada, Yoshiyuki Akiyama, Yusuke Nakamura, and Yoichi Furukawa. MRGBP (C20orf20) contributes to development of colorectal cancer. American Association for Cancer Research 102th Annual Meeting, April 2, 2011, Orange County Convention Center (Orlando FL, USA)

[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

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/furukawa/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 貴世志 (YAMAGUCHI KIYOSHI)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号 : 50466843

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :