

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19180

研究課題名(和文) 基本的転写共役因子MED1が担う乳癌の発症と特性

研究課題名(英文) The role for Mediator subunits MED1 in the property of breast carcinomas

研究代表者

長谷川 菜摘 (Hasegawa, Natsumi)

神戸大学・保健学研究科・助教

研究者番号：20708599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：私はこれまでに、基本的転写共役複合体メディエーターのサブユニット、MED1とMED24が協調し、エストロゲン受容体を介する正常マウスの乳腺の思春期発育やヒト乳癌細胞の増殖を担うことを報告した。本研究はこの成果を基盤に、MED1が乳癌の発症と特性、予後、治療反応性・抵抗性などにどのように寄与するかを個体レベル・分子レベルで明らかにするため、種々のMED1およびMED1結合蛋白の欠損マウスを用意した。既存のマウスと新規作成が完了したマウスについて順次、乳癌発症が抑制されるか検討した。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that Mediator subunits MED1 and MED24 cooperatively contribute to pubertal mammary gland development and growth of breast carcinoma cells. In order to determine the role for MED1 in the property of breast carcinomas, prognosis, and response to therapy, we have prepared, or are in the process of preparing, mice carrying various mutations in MED1 and MED1-associated factor. We have analysed these mutant mice that have been ready so far if these mice possess the ability of inhibiting breast cancer.

研究分野：腫瘍検査学

キーワード：MED1 乳癌 発癌

1. 研究開始当初の背景

MED1の乳癌における役割を研究する者は、国内では私達神戸大学のグループのみである。国外の主な研究者は、転写の権威でラスカー賞受賞者、ロックフェラー大学 Robert Roeder教授(海外研究協力者)、シンシナチ大学の Xiaoting Zhang博士(Roeder教授の弟子で伊藤教授の友人)、米国ノースウェスタン大学の Janardhan Reddy博士がいる。

MED1ノックアウト(KO)マウスは胎児致死性であるが(Ito et al. *Mol Cell* 5:683-93, 2000)、Reddy博士らにより乳腺特異的MED1 KOマウスで、思春期と妊娠中の乳腺発育や乳汁産生に異常が示された(*J Biol Chem* 280:10766-73, 2005)。一方、伊藤教授が作製したMED1の核内受容体結合部位を廃絶した遺伝子改変マウス(MED1(LX) KIマウス)の解析により、MED1の核内受容体結合能が思春期乳腺発育と腺管細胞分化に特異的に必要であり、MED1にERα結合能依存性および非依存性の両方の機序が存在することが明らかになった(*Proc Natl Acad Sci USA* 107:6765-70, 2010)。私は約3分の1の乳癌症例でMED1とMED24の遺伝子座増幅を見つけ、ERαの近傍に遺伝子座があるMED1がERαと同時に増幅して乳癌増殖を増強すると推察される(*Mol Cell Biol* 32:1483-95, 2012)。実際私やZhang博士らはMED1依存性の乳癌細胞の増殖を示し(*Mol Cell* 19:89-100, 2005; *Mol Cell Biol* 32:1483-95, 2012)、加えてごく最近、MED1のN端truncation 変異が乳癌のタモキシフェン抵抗性患者にしばしば見つかり、ヒト乳癌の特性を作るMED1の核内受容体結合能の重要性が証明された(*Nature* 497:108-12, 2013)。このように、MED1が乳腺の思春期および妊娠時の両方の発育に必須であり、乳癌の増殖をも担うことから、MED1は乳腺組織の恒常性と乳癌の病態を決める鍵であるといえる。

2. 研究の目的

私はこれまでに、基本的転写共役複合体メディエーターのサブユニット MED1 と MED24 が協調して、エストロゲン受容体を介する正常マウス乳腺の思春期発育やヒト乳癌細胞の増殖を担うことを報告した。本研究はこの成果を基盤にし、MED1 が核内受容体等様々な DNA 結合転写因子や PGC1 等アダプター分子に共役することに注目して、転写の視点から乳癌の発症機序や特性を解明する。乳癌発症モデルマウスを種々の MED1 変異マウスと交配して、乳腺細胞の MED1 と乳腺周囲の環境が乳癌の発症と特性にどう関与するかを個体および分子のレベルで解明する。こうして、乳癌の発症・増殖・転移・予後・治療反応性等を遺伝子の変化で予測可能にし、それらの検査方法を考案するための基礎データを得ることを目的とする。

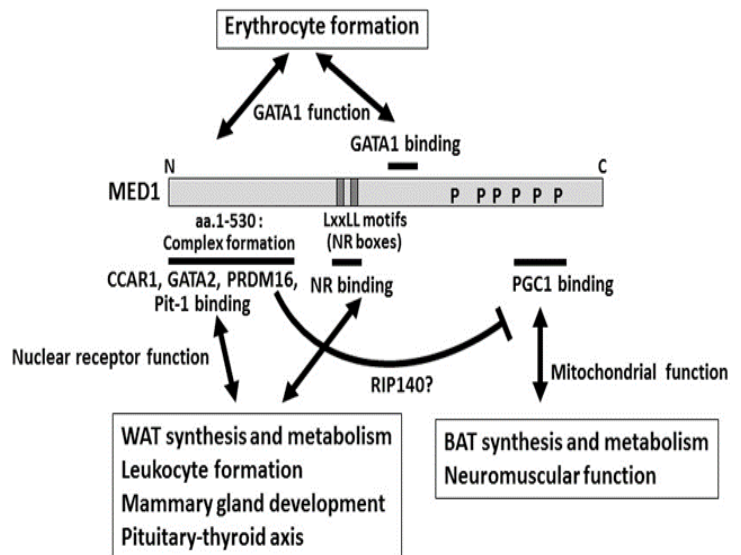
また CCAR1 は ERα と MED1 の N 端を架橋・バイパスする分子として発見されたが

(*Mol Cell* 31:510, 2008)、他の核内受容体や GATA1 と MED1 をもバイパスすることを私達は報告した(*Genes Cells* 19:28-51, 2014; 2013年 EMBO 会議基調講演等)。そこで CCAR1 KO マウスを作製し、CCAR1 の正常乳腺の発育における役割を解明するとともに、上記と同様乳癌モデルマウスと交配して CCAR1 の ERα 機能、特に乳癌の発症や特性に関わる生体内での役割を同定する。

3. 研究の方法

下に、これまでに私達が明らかにしたMED1分子の機能解剖の概要を示す。1つの分子内の各ドメインが多くのメカニズムを介して多様な機能を持つ転写因子である。それぞれのドメインの持つ乳癌の発症・特性における役割を個体レベルで検討するとともに、そのメカニズムを分子細胞生物学や生化学的手法で解明する。

一方、乳癌細胞のニッチ機能についても、私達が解明した造血ニッチや白血病幹細胞ニッチの成果を基盤にして解析を行う。



**A. MED1 の乳癌発症・増殖における役割とその分子機序**

乳癌の発症や増殖・転移に MED1 がどのように関与するかを検証するため、我々の保有する各種 MED1 変異マウスを乳癌発症モデルマウスと交配して検討した。乳癌発症モデルマウスとして、発症率が 100%近いものや悪性度が極端に高いものは MED1 の関与を override して観察できないことが予想される。そこで私達は本研究の準備のため、発症率が 50%程度で、発生した腫瘍を触診等で比較的長期間観察できるマウスモデルとして、FVB/N-Tg(MMTVneu)202Mul/J (*Proc Natl Acad Sci USA* 89:10578, 1992)を選択し、米国 Jackson Laboratory から入手した。同マウスは MMTV プロモーターの下に組み込まれた HER2/ErbB2 遺伝子が乳腺特異的に高発現

するトランスジェニックマウスであり、遺伝背景は FVB/N で維持され、既知の乳癌発症と特性もこの系統にて調べられている。従って本研究も FVB/N の遺伝背景で解析することが望ましいので、我々の持つ各種MED1 変異マウスを FVB/N にバッククロスした。私達は予備実験において、FVB/N-Tg(MMTVneu)202Mul/J の乳癌の発症には24週齢以上の観察が必要であることを確認している。そこで検証に十分な個体数を揃えられるよう、計画的に交配・観察し、MED1 が野生型の乳癌マウスと比較して、週齢別乳癌発症率、触診による乳癌の増殖速度の定量、転移の有無、生存曲線を検討した。

**B. CCAR1 KOマウス作製と解析** CCAR1はER $\alpha$ とMED1のN端を架橋・バイパスする分子として発見されたが(*Mol Cell* 31:510, 2008)、他の核内受容体やGATA1とMED1をもバイパスすることを私達は報告した(*Genes Cells* 19:28-51, 2014; 2013年EMBO会議基調講演等)。そこでCCAR1 KOマウスを作製し、その表現型を解析した。

#### 4. 研究成果

**A. MED1の乳癌発症・増殖における役割とその分子機序** MED1 に依存する乳癌の増殖が細胞レベルと同様に個体レベルで存在するのか、また存在するとすればMED1のLxドメインに依存するのか、さらにMED1のLxドメインが乳癌の発症を規定するのかを検討するため、乳腺特異的にHER2を過剰発現させたトランスジェニックマウスFVB/N-Tg(MMTVneu)202Mul/JとFVBの遺伝型にバッククロスしたMED1(Lx)ノックインマウスを交配させてMED1変異乳癌モデルマウスを作成した。この系で検討した結果、MED1野生型・HER2トランスジェニックマウスに比べ、MED1(Lx)ノックイン・HER2トランスジェニックマウスで乳癌の発症が3か月以上遅れた。また、腫瘍が発生した後の腫瘍の増大の速度は、MED1野生型・HER2トランスジェニックマウスに比べ、MED1(Lx)ノックイン・HER2トランスジェニックマウスで有意に遅かった。以上の結果は、MED1のER $\alpha$ との結合部位Lxドメインを介したリガンド依存性の転写活性化が乳癌の発症や増殖に寄与することを示唆する。本研究は、MED1が生体でリガンド依存性に乳癌の発症と増殖を担う可能性を示唆する初めての知見である。

今後はSERMに属するTamoxifen、純粋なER拮抗薬であるFulvestrant、ErbB2阻害薬であるTrastuzumabを投与し、その感受性を検討する予定である。次に、各遺伝型で典型的な動態を示す腫瘍をヌードマウスに移植し、腫瘍増殖速度の定量、転移、生存曲線、TamoxifenやFulvestrant、Trastuzumabに対する感受性について同様に比較検討し、先に得られたデータが腫瘍自体の表現型なのか、も

しくはニッチ等腫瘍を取り巻く環境によるのかを確定する。

**B. CCAR1 KOマウス作製とCCAR1の乳癌発症・特性における役割の解析** MED1結合蛋白CCAR1の欠損マウスを作製した。ターゲティングベクターを作成しマウスES細胞にトランスフェクションして相同組換え体をゲノムDNAを鋳型にPCRでスクリーニングした。陽性クローンを4個得、サザンブロットで相同組換えを確認した。そのうち2個のクローンをマウスブラストシストに注入し、キメラ雄マウスを作製した。このキメラマウスをC46BL6雌マウスと合わせてバッククロスを行い、ノックアウトマウスを完成させた。今後は表現型を形態的にスクリーニングするとともに異常の見られる臓器・組織を詳細に調べる。特に思春期乳腺の発育を解析する。さらにMED1変異マウスと同様、このマウスもFVB/Nとのバッククロスによる遺伝的背景の統一後、乳癌モデルマウスと交配した。現在は得られたCCAR1ノックアウト乳癌発症モデルマウスについて、計画的に交配・観察し、野生型の乳癌マウスと比較して、週齢別乳癌発症率、触診による乳癌の増殖速度の定量、転移の有無、生存曲線を検討中である。

#### 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)

Satowa Tanaka, Akio Maekawa, Leo Matsubara, Azusa Imanishi, Masaya Yano, Robert G. Roeder, Nastsumi Hasegawa, Shigetaka Asano, Mitsuhiro Ito. Periostin supports hematopoietic progenitor cells and niche-dependent myeloblastoma cells in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 478 1706-12, 2016

[学会発表](計24件)

- ① 福岡知也, 松尾美希, 後和佳澄, 森真洋, 河合麻美, 水田駿平, 峰松侑希, 服部美咲, 長谷川菜摘, 伊藤光宏. GATA1のN端活性化ドメインを介する転写活性化におけるメディエーターの関与の可能性. 第40回日本分子生物学会年会
- ② 物延沙耶, 平野希依, 安達枝里, 峰松侑希, 松尾美希, 後和佳澄, 服部美咲, 黒沼加菜, 長谷川菜摘, 伊藤光宏. MED1の核内受容体結合能を廃絶した変異マウスにおける脂質代謝制御因子の発現. 第40回日本分子生物学会年会
- ③ 安達枝里, 長谷川菜摘, 前川茜, 物延沙耶, 平野希依, 後藤千恵, 横井彩, 黒沼加菜, 伊藤光宏. 転写共役因子MED1によるIL-33誘導性の2型自然リンパ球の動員調節. 第40回日本分子生物学会年会
- ④ 平野希依, 物延沙耶, 長谷川菜摘, 伊藤光宏. 転写共役因子MED1の核内受容

- 体結合能は低温環境での体温維持に必須である。第 40 回日本分子生物学会年会
- ⑤ 長崎洋樹, 物延沙耶, 前川茜, 安達枝里, 高原拓, 森真洋, Roeder G. Robert, 長谷川菜摘, 伊藤光宏. PPAR  $\gamma$  結合能廃絶 MED1 を持つ変異マウスの骨格筋. 第 39 回日本分子生物学会年会
- ⑥ 河合麻美, 長谷川菜摘, 伊藤光宏. High-concentration ATRA-dependent activation of PML-RAR  $\alpha$  requires Mediator subunit MED1. 第 78 回日本血液学会学術集会
- ⑦ 森真洋, 河合麻美, 高原拓, 長谷川菜摘, 伊藤光宏. MED1-dependent and -independent coactivation mechanism of Mediator for GATA1 action. 第 78 回日本血液学会学術集会
- ⑧ 峰松有希, 井之上菜名子, 長谷川菜摘, 前川茜, 福岡知也, 越谷愛里, Roeder G. Robert, 伊藤光宏. The role of MED1 in breast carcinogenesis and progression. 第 39 回日本分子生物学会
- ⑨ 高原拓, 長谷川菜摘, 伊藤光宏. Mediator subunit MED1 is required for PML-RAR  $\alpha$  fusion protein-induced transcriptional activation in response high concentration all-trans retinoic acid. 第 39 回日本分子生物学会
- ⑩ 前川晶保, 長谷川菜摘, 伊藤光宏. Periostin supports normal and malignant hematopoietic stem/progenitor cells in vitro. 第 39 回日本分子生物学会
- ⑪ 前川晶保, 長谷川菜摘, 伊藤光宏. Periostin supports hematopoietic stem:progenitor cells and niche-dependent myeloblastoma cells in vitro. 58th ASH Annual Meeting and Exposition
- ⑫ 武元優允, 長谷川菜摘, 伊藤光宏. MED1 結合蛋白 CCAR1 と CoCoA は PPAR  $\gamma$  2 誘導性の白色脂肪細胞分化を司る. 第 38 回日本分子生物学会
- ⑬ 田中里和, 長谷川菜摘, 伊藤光宏. Periostin supports hematopoietic stem/progenitor cells and niche-dependent myeloblastoma cells. 第 38 回日本分子生物学会
- ⑭ 高原拓, 河合麻美, 森真洋, 長谷川菜摘, 伊藤光宏. RAR-binding ability of MED1 is required for high-concentration ATRA-dependent activation of PML-RAR  $\alpha$ . 第 78 回日本血液学会学術集会
- ⑮ 矢野雅也, 長谷川菜摘, 伊藤光宏. 骨髄間質細胞が産生するオステオポンチンは造血幹・前駆細胞を CD44 を介して支持する. 第 38 回日本分子生物学会
- ⑯ 井之上菜名子, 長谷川菜摘, 伊藤光宏. 乳癌発症が遺伝要因と環境要因に依存する可能性—乳癌モデルマウスの検討.

- 第 38 回日本分子生物学会
- ⑰ 田中里和, 長谷川菜摘, 伊藤光宏. Periostin supports normal and malignant hematopoietic stem/progenitor cells in vitro. International Conference on The Tumour Microenvironment in the Haematological Malignancies and its Therapeutic Targeting, European
- ⑱ 森真洋, 長谷川菜摘, 伊藤光宏. GATA1 による転写活性化における MED1 依存性と非依存性の機序. 第 38 回日本分子生物学会
- ⑲ 河合麻美, 長谷川菜摘, 伊藤光宏. High-concentration ATRA-dependent activation of PML-RAR  $\alpha$  requires Mediator subunit MED1. 第 77 回日本血液学会学術集会
- ⑳ 武元優允, 長谷川菜摘, 伊藤光宏. MED1 結合蛋白 CCAR1 と CoCoA は PPAR  $\gamma$  2 誘導性の白色脂肪細胞分化を司る. 第 38 回日本分子生物学会
- 21 高原拓, 長谷川菜摘, 伊藤光宏. Mediator subunit MED1 is required for PML-RAR  $\alpha$  fusion protein-induced transcriptional activation in response high concentration all-trans retinoic acid. 第 38 回日本分子生物学会
- 22 田中里和, 長谷川菜摘, 伊藤光宏. Periostin supports hematopoietic stem:progenitor cells and niche-dependent myeloblastoma cells. 第 38 回日本分子生物学会
- 23 矢野雅也, 長谷川菜摘, 伊藤光宏. 骨髄間質細胞が産生するオステオポンチンは造血幹・前駆細胞を CD44 を介して支持する. 第 38 回日本分子生物学会
- 24 井之上菜名子, 長谷川菜摘, 伊藤光宏. 乳癌発症が遺伝要因と環境要因に依存する可能性—乳癌モデルマウスの検討. 第 38 回日本分子生物学会

〔図書〕 (計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 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 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://www2.kobe-u.ac.jp/~itomi/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

長谷川菜摘 (HASEGAWA, Natsumi)  
神戸大学・保健学研究科・助教  
研究者番号：20708599

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

伊藤 光宏 (ITO, Mitsuhiro)  
神戸大学・保健学研究科・教授  
研究者番号：50362794

##### (4) 研究協力者

( )