

令和元年6月18日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19578

研究課題名(和文)新規の転写伸長制御因子Med26を標的とした腫瘍治療シード開発基盤の確立

研究課題名(英文) Establishment of a platform for development of tumor treatment seeds targeting a novel transcription elongation regulator Med26

研究代表者

高橋 秀尚 (Takahashi, Hidehisa)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：30423544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、Med26とSECとの結合を阻害する化合物を同定し、がん細胞や急性白血球細胞の増殖を抑制する抗腫瘍薬開発の基盤を確立することである。Med26は、そのN末端ドメイン(NTD)によってSEC結合し、腫瘍関連遺伝子の発現を促進する。本研究で、酵母の転写因子GAL4のDNA結合ドメインをMed26のNTDと融合させたGAL4-Med26-NTDは、SECと結合することによって、細胞内で強い転写活性を発揮することがわかった。そこで、本研究ではGAL4-Med26-NTDを安定に発現し、de novoの転写活性を検出する細胞株を製作した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転写伸長因子P-TEFbをリクルートするBRD4の阻害剤JQ1は、強い抗腫瘍効果を発揮することから世界的に注目されている。Med26の阻害剤は、SEC(2つの転写伸長因子P-TEFbとELL/EAF)のリクルートを阻害することから、得られる可能性のある化合物はJQ1よりも強い抗腫瘍効果を発揮することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to identify compounds that inhibit the binding between Med26 and SEC, and to develop anti-neoplastic drugs that suppress the growth of cancer cells and acute leukemia cells. Med26 binds SEC through its N-terminal domain (NTD) and promotes the expression of tumor-associated genes.

In this study, we found that GAL4-Med26-NTD, in which the DNA binding domain of the yeast transcription factor GAL4 was fused to the NTD of Med26, exerts intrinsic transcription activity in cells by binding to SEC. Therefore, in this study, we generated cell line that stably expresses GAL4-Med26-NTD and detects de novo transcription.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝子発現制御 転写 腫瘍性疾患

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の発現は緻密に制御されており、その制御機構の破綻は、がんや白血病などのさまざまな腫瘍を引き起こす要因となる。全てのタンパク質をコードする遺伝子は RNA ポリメラーゼ II (Pol II) によって転写発現される。興味深いことに、最近のゲノムワイドな解析によって、非常に多くの腫瘍関連遺伝子において、転写開始直後に Pol II がプロモーター近傍（転写開始点から 20~50 塩基下流）で一時的に停止（ポージング）していることが明らかとなった。そこに、転写伸長因子が腫瘍関連遺伝子領域にリクルートされ、Pol II のポージングが過剰に解除されることが腫瘍発症の引き金となることもわかってきた。

私はこれまでに、メディエーター複合体のサブユニット Med26 が、新規の転写伸長因子複合体 Super elongation complex (SEC) を c-Myc や Hsp70 などの腫瘍関連遺伝子領域にリクルートし、Pol II のポージングを解除することを発見した【Takahashi H, et al. *Cell* 2011】【Takahashi H, et al. *Nat. Commun.* 2015】【Anwar D, Takahashi H, et al. *BBA-GRM.* 2016】(図 1 参照)。

SEC は転写伸長因子の ELL/EAF、P-TEFb に加え MLL 融合パートナー因子の AF4、AFF4、AF9 や ENL をサブユニットとして有す【Lin C, Takahashi H, et al. *Mol Cell*, 2010】。興味深いことに、SEC サブユニットの ELL、AF4、AFF4、AF9、ENL 遺伝子では、MLL (Mixed Lineage Leukemia) 遺伝子と混合型急性白血病で高頻度に染色体転座がみられる。転座の結果生じる MLL 融合タンパク質は SEC を Hox などの白血病関連遺伝子領域にリクルートし、それらの遺伝子の転写を亢進することで、難治性小児白血病の混合型急性白血病を引き起こすことがわかった。Med26 を含むメディエーター-Pol II 複合体も、SEC と結合することで、白血病関連遺伝子領域に呼び寄せられ、それらの遺伝子発現を亢進させている可能性が考えられる。

このように、これまでの解析によって、Med26 は SEC を腫瘍関連遺伝子領域にリクルートすることで、Pol II のポージングを過剰に解除し、がんや白血病の発症や増殖を促進していることが考えられる。一方で、急性白血病においては、MLL 融合タンパク質が SEC を介して Med26 を含むメディエーター-Pol II 複合体を Hox などの白血病関連遺伝子領域にリクルートすることによって、白血病化を促進する可能性が考えられる。

そこで、本研究では Med26 と SEC との結合を特異的に阻害する化合物の探索を行い、Med26 を標的とした抗腫瘍薬の開発を目指す。本研究では主に、ヒット化合物をスクリーニングするための実験系の確立を目指す。ヒット化合物が得られた際には、がん細胞において、Med26 による SEC の標的遺伝子領域へのリクルートを阻害し、がん細胞の増殖を抑制するののかについて解析する。また、混合型急性白血病においても、ヒット化合物が MLL-SEC による Med26-メディエーター-Pol II 複合体の白血病関連遺伝子領域へのリクルートを阻害し、白血病細胞の増殖を抑制するののかについて検討する。

2. 研究の目的

本研究の目的は Med26 と SEC との結合を阻害する化合物を同定し、がん細胞や急性白血病細胞の増殖を抑制する抗腫瘍薬開発の基盤を確立することである。そこで、Med26 と SEC との結合を特異的に阻害する化合物の探索を行うための実験系を確立する。ヒット化合物が得られた際には、それが、がん細胞において、Med26 による SEC の標的遺伝子領域へのリクルートを阻害し、がん細胞の増殖を抑制するののかについて解析する。さらに、混合型急性白血病において、ヒット化合物が SEC による Med26-メディエーター-Pol II 複合体の白血病関連遺伝子領域へのリクルートを阻害し、白血病細胞の増殖を抑制するののかについて解析する。

3. 研究の方法

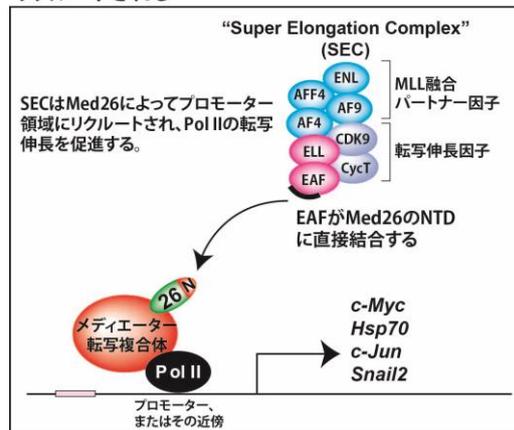
GAL4-Med26-NTD の内因性の転写活性を指標として、Med26 と SEC の結合を阻害する化合物スクリーニング系を確立する。

4. 研究成果

【GAL4-Med26-NTD のルシフェラーゼ活性を指標とした化合物スクリーニング系の確立】

Med26 の標的遺伝子を明らかにするため、RNA-seq や ChIP-seq 解析を行ったところ、Med26 は SEC と共役して、がん原遺伝子 c-Myc や c-Jun、ヒートショック遺伝子 Hsp70、がん転移に関連する Snail2、がん細胞の酸化ストレス抵抗性に寄与する xCT などの遺伝

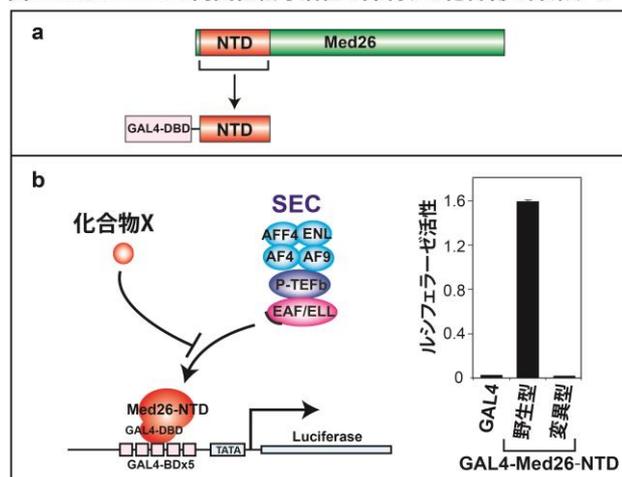
図1: Med26によってSECは腫瘍関連の遺伝子領域にリクルートされる



子の発現を促進することがわかった。

Med26 は、その N 末端ドメイン (NTD) によって、SEC のサブユニット EAF と結合し、SEC を遺伝子領域にリクルートする。本研究で、酵母の転写因子 GAL4 の DNA 結合ドメインを Med26 の NTD と融合させた GAL4-Med26-NTD は、SEC をリクルートすることによって、細胞内で強い転写活性を発揮することがわかった (図 2a 参照)。そこで、本研究では GAL4-Med26-NTD を安定に発現する細胞株を作製した。今後、Med26-NTD の転写活性を指標に、Med26-NTD と SEC の結合を阻害する化合物の探索を行う (図 2b 参照)。

図2: Med26-NTDの内因性転写活性を抑制する化合物を探索する



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Yanagi T, Watanabe M, Hata H, Kitamura S, Imafuku K, Yanagi H, Homma A, Wang L, Takahashi H, Shimizu H, Hatakeyama S.: Loss of TRIM29 alters keratin distribution to promote cell invasion in squamous cell carcinoma. *Cancer Research*, 78(24), 6795-6806, 2018, 査読有
2. Yaguchi H, Yabe I, Takahashi H, Watanabe M, Nomura T, Kano T, Watanabe M, Hatakeyama S.: Anti-Sez6l2 antibody detected in a patient with immune-mediated cerebellar ataxia inhibits complex formation of GluR1 and Sez6l2. *Journal of Neurology*, 265(4), 962-965, 2018, 査読有
3. Yabe I, Yaguchi H, Kato Y, Miki Y, Takahashi H, Tanikawa S, Shirai S, Takahashi I, Kimura M, Hama Y, Matsushima M, Fujioka S, Kano T, Watanabe M, Nakagawa S, Kunieda Y, Ikeda Y, Hasegawa M, Nishihara H, Ohtsuka T, Tanaka S, Tsuboi Y, Hatakeyama S, Wakabayashi K, Sasaki H.: Mutations in bassoon in individuals with familial and sporadic progressive supranuclear palsy-like syndrome. *Scientific Reports*, 8(1), 819, 2018, 査読有
4. Matsumoto J, Takada S, Kinugawa S, Furihata T, Nambu H, Kakutani N, Tsuda M, Fukushima A, Yokota T, Tanaka S, Takahashi H, Watanabe M, Hatakeyama S, Matsumoto M, Nakayama KI, Otsuka Y, Sabe H, Tsutsui H, Anzai T.: Brain-Derived Neurotrophic Factor Improves Limited Exercise Capacity in Mice With Heart Failure. *Circulation*, 138(18), 2064-2066, 2018, 査読有
5. Yaguchi H, Yabe I, Takahashi H, Watanabe M, Nomura T, Kano T, Matsumoto M, Nakayama KI, Watanabe M, Hatakeyama S.: Sez6l2 regulates phosphorylation of ADD and neuritogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 494(1-2), 234-241, 2017, 査読有
6. 高橋秀尚: 新規転写伸長制御因子 Med26 の腫瘍性疾患への関与, 最新医学 第 72 巻、第 3 号, 2017

[学会発表] (計 4 件)

1. Hidehisa Takahashi, Mio Shibata, Ichigaku Takigawa, Masashi Watanabe, Junichi Yamamoto, Yuki Yamaguchi, Joan W. Conaway, Ronald C. Conaway, Shigetsugu Hatakeyama.: Human Mediator subunit MED26 plays a role in 3'-end processing of replication dependent Histone mRNA through recruitment of little elongation complex, CSHL meeting on Mechanisms of Eukaryotic Transcription, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 2017
2. 高橋 秀尚, 柴田 美音, 瀧川 一学, 渡部 昌, 築山 忠維, 藤井 聡, 飯田 緑, 山本 淳一, 山口 雄輝, Amol Ranjan, Shigeo Sato, Chieri-tomomori Sato, Joan W. Conaway, Ronald C. Conaway, 畠山 鎮次, (口頭発表) メディエーター複合体による転写終結制御機構, ConBio2017

3. 高橋 秀尚, (口頭発表) メディエーター複合体のサブユニット MED26 による転写制御機構. 第 12 回日本エピジェネティクス研究会年会, 札幌, 2018, 5.
4. Takahashi H, Amol Ranjan, Shiyuan Chen, Shibata M, Takigawa I, Watanabe M, Tsukiyama T, Fujii S, Yamamoto J, Yamaguchi Y, Matsumoto M, Nakayama K, Suzuki Y, Sato C, Sato S, Ronald C. Conaway, Joan W. Conaway, Hatakeyama S: The role of Mediator in transcription termination. 第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2018, 11.

〔図書〕

該当ありません。

〔産業財産権〕

該当ありません。

〔その他〕

<https://ycu-molecularbiology.jp/>

6. 研究組織

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。