

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893130

研究課題名(和文) 転写メディエーターが担う乳癌の発癌と特性

研究課題名(英文) The role for Mediator transcriptional coregulator complex 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) 2,100,000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とMED24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MED24変異マウスや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、検討を開始している。

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 and MED24 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, MED24, and MED1-associated factor. We have started analyses of 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：転写メディエーター 乳癌 MED1

## 1. 研究開始当初の背景

伊藤光宏博士(研究協力者)は約30個のサブユニットからなる約2MDaの基本的転写共役複合体メディエーターをクローニングし、同複合体がRNAポリメラーゼIIホロ酵素複合体の構成成分であり全転写に必須の基本転写因子である一方、異なるサブユニットが様々な転写因子と特異的に結合してシグナルを最終的に統合する細胞内シグナル伝達の終点であることを示し、世界的に大きく注目された(*Mol Cell* 3: 361-70, 1999; *Mol Cell* 3: 97-108, 1999; *EMBO J* 21: 3464-75, 2002 など)。またMED1サブユニットが核内受容体特異的コアクチベーターであることを示し(*Proc Natl Acad Sci USA* 95:7939-44, 1998)、MED1などいくつかのサブユニットのノックアウト(KO)マウスを作製してメディエーターの重要な生理的役割を提唱した(*Mol Cell* 5: 683-93, 2000; *Trends Endocrinol Metabolism* 12: 127-34, 2001; *Nature* 417: 563-7, 2002 など)。

最近のメディエーター研究は、真核生物の3種類のRNAポリメラーゼを発見しラスカー賞を受賞した転写研究の重鎮、ロックフェラー大学Robert Roeder教授(本研究の海外研究協力者)が、主に生化学的研究において世界を先導している。一方個体レベルの生理的研究は、私達の研究室がRoeder教授とともに、その弟子のシンシナチ大学Xiaoting Zhang博士、ノーベル賞受賞者Roger Kornberg教授の弟子であるMax-Planck研究所Tilman Borggrefe博士等と連絡を取りながら世界をリードしている。

乳腺特異的MED1ノックアウトマウスは思春期と妊娠中の乳腺発育や乳汁産生に異常を認めるが(*J Biol Chem* 280: 10766-73, 2005)、MED1の核内受容体結合能を廃絶した変異MED1のノックイン(KI)マウス(MED1(LX)ノックインマウス)が思春期乳腺発育と腺上皮分化に特異的に異常を示すことより、私達はMED1にER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を示した(*Proc Natl Acad Sci USA* 107: 6765-70, 2010)。

また、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見つかり、ヒト乳癌の特性におけるMED1の核内受容体結合能の重要性が証明された(*Nature* 497: 108-112, 2013)。

メディエーターは広範な生理機能を担うことから、腫瘍学以外にも内分泌・代謝、血液、神経など多くの分野の研究者が参集している。私は伊藤博士とともにそれらの多くに関与している。

## 2. 研究の目的

私は、私達が発見したRNAポリメラーゼIIホロ酵素の構成成分である基本的転写共役複合体メディエーターが、そのサブユニットMED1とMED24が協調して働くことにより、

エストロゲン受容体を介する正常マウスの思春期乳腺上皮細胞およびヒトの乳癌細胞の増殖を特異的に担うことを報告した(*Mol Cell Biol* 32: 1483-95, 2012)。一方、ヒト乳癌で約半数の症例にMED1やMED24遺伝子の増幅がある(*ibid*; *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 10848-53)。MED1のN端truncation変異がタモキシフェン耐性乳癌患者に検出される。同変異は末梢血中DNAで測定でき、臨床検査へ応用の可能性がある(*Nature* 497: 108-112, 2013)。しかしこれらの変異が乳癌の発症・特性にどう関与するのか、個体レベルでの検討はこれまで皆無である。それは私達が作製した種々のMED1変異マウス(MED1 KO, MED1(LX) KI, MED1(1-530) KI, MED1/MED24 double KO)の遺伝型を加えた乳癌モデルマウスで、乳癌発症率・増殖・致死率等を検討することで可能である。

本研究は、乳癌モデルマウスと種々のMED1およびMED24変異マウスを用いて、MED1とMED24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し、乳癌の予後・治療反応性等を予測する検査方法を樹立するための基礎的研究を構成すると共に、乳癌治療の新たな分子標的を探索することを目的とする。

また研究範囲を広げて、同様の生物学的特性が、核内受容体やGATA1の特異的コアクチベーターであるMED1等の関与が示唆される前立腺癌や白血病など、別のがんにも成立するのか解析し、腫瘍学の基礎と臨床にユニークな貢献を果たすことを目的とする。

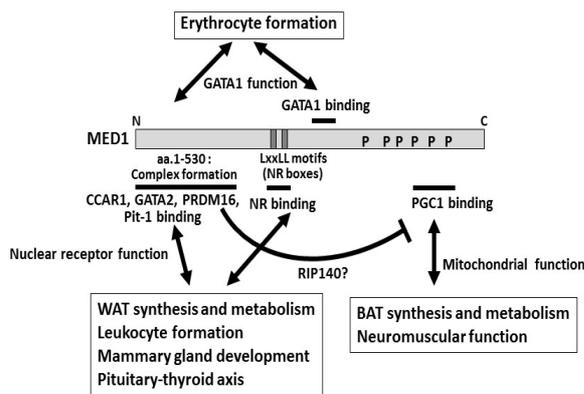
## 3. 研究の方法

種々のMED1変異マウス[MED1 KO, MED1(LX) KI, MED1(1-530) KI, MED1/MED24 double KO]およびCCAR1 KOマウスを乳癌モデルマウス(FVB/N-Tg(MMTVneu)202Mul/J)と交配し、乳癌の発症率、乳癌の増殖速度や転移、致死率、治療への反応性を検討した。ただし、ここで、CCAR1ノックアウトマウスは新たに作製しているところであり、実際の実験はまだである。

これらの方法でMED1分子内で乳癌の発症・特性に関わるドメインが同定した後は、そのドメインの乳癌特性における機序について、分子細胞生物学的・生化学的方法で詳細に詰める予定である。

MED1自体は乳腺の思春期および妊娠時の両方の発育に必須であるが、伊藤らによるMED1(LX)ノックインマウスの解析によりMED1の核内受容体結合能の必要性は思春期乳腺発育と腺管細胞分化に特異的に必要であることがわかっている(*Proc Natl Acad Sci USA* 107: 6765-70, 2010)。私はこれまでにMED1やMED24のsingle heterozygousノック

アウトマウスは正常であるがMED1/MED24 double heterozygous ノックアウトマウスがMED1(LX)ノックインマウスに似た表現型を呈することを見出し、MED1 がエストロゲン受容体(ER)特異的コアクチベーターとしてMED24/MED24/MED16 サブモジュールと協調してマウス思春期乳腺の腺管上皮の正常な伸長に特異的に必須であることを示した。さらに細胞培養系において、MED1 とMED24/MED23/MED16 サブモジュールが協調して乳癌のER 非依存性の増殖をも担うことを示した(*Mol Cell Biol* 32:1483-95, 2012)。MED1 は1581 個のアミノ酸残基から成り、MED1(1-530)が複合体形成に必須である。私達は、そのaa1 ~ 530 にCCAR1 とGATA2 の結合部位が、aa604 ~ 649 に2 か所の核内受容体結合部位が、C 端にミトコンドリア機能に重要なPGC1 結合部位が、それぞれ存在するなどし、生体内で様々な生理機能を持つことの証拠を既に掴んでいる(下図、未発表データを含む)。私達はMED1 ノックアウトマウス (*Mol Cell* 5: 683, 2000) のほか、MED1 のN 端 530 アミノ酸のみを発現するMED1(1-530)ノックインマウス(未発表)、2 つの核内受容体結合モチーフLxxLL をLxxAA に変異を加えたMED1(LX)ノックインマウス (*Proc Natl Acad Sci USA* 107: 6765, 2010)、およびMED1/MED24 ダブルノックアウトマウス (*Mol Cell Biol* 32: 1483, 2012) を作製した。以上を基盤にして、以下の計画を立てた。



#### (1) 乳癌の発症・増殖・悪性度とMED1 の分子解剖

MED1 が乳癌の発症とその特性にどのように寄与するかを検証するため、各種MED1 変異マウスを乳癌発症モデルマウスと交配した。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非常に高いものはMED1 の関与をoverride してしまって観察できないことが予想される。そこで、発症がやや遅く、発症率が50%程度であり、また発生した腫瘍を触診等で比較的長い期間観察できるマウスモデルとして、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FVB/N-Tg(MMTVneu)202Mul/J (*Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10578, 1992) を選択した。同マウスはJackson Laboratory から入手した。同マウスはFVB/Nで維持され既知の乳癌発症と特性はこのStrain にて調べられているので、本研究もFVB/N の遺伝背景で解析するのが望ましい。そこでまず私達の持つMED1 変異マウス [MED1(1-530) KI, MED1(LX) KI, MED1/MED24double KO] をFVB/N にバッククロスする。少なくとも4 回バッククロスして遺伝学的背景を統一した後にFVB/N-Tg(MMTVneu)202Mul/J と交配し、MED1 変異乳癌マウスモデルを作製した。今後さらに、これらのマウスについて、MED1 が野生型の乳癌マウスと、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、致死率について比較する予定である。

#### (2) CCAR1 ノックアウトマウスの作製

ER とMED1(1-530)をバイパスするCCAR1 の正常乳腺発育および乳癌発症と特性における役割を確認するため、CCAR1 ノックアウトマウスの作製を開始した。これらのマウス作製は理研神戸CDBの相澤慎一博士との共同研究により行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 乳癌の発症・増殖・悪性度とMED1 の分子解剖

まず、種々の MED1 およびMED24 変異マウスと乳癌発症モデルマウスを交配し、MED1 変異乳癌マウスモデルを作成した。具体的には、MED1 変異マウス[MED1(LX) KI, MED1 single KO, MED1/MED24 double KO]マウスに関してはFVB/N への遺伝背景の統一が完了し、乳癌モデルマウスと交配した。このようにして完成したMED1 変異乳癌マウスモデルは、検討に十分な個体数が準備できつつあり、乳癌発症が抑制されるか、計画的にコホート研究を開始している。今後これらのマウスについて、MED1 が野生型の乳癌マウスと、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、致死率について比較する予定である。

新たに作成した MED1(1 ~ 530) ノックインマウスに関しては、遺伝的背景の統一が終了間近の段階であり、順次乳癌発症モデルマウスと交配して同様の検討を行う予定である。

##### (2) CCAR1 ノックアウトマウスの作製とCCAR1 の乳癌発症・特性における役割の解析

MED1 結合蛋白CCAR1 の欠損マウスの作製を開始した。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、サザンプロットで相

同組換えを確認した。そのうち2個のクローンをマウスプラストシストに注入し、キメラ雄マウスを作製した。これからキメラマウスを C46BL6 雌マウスと合わせてノックアウトマウスを完成させる。本マウスの完成を待って、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、順次検討を開始していく予定である。

#### 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)

[雑誌論文](計 3件)

Ruri Ishino, Kaori Minami, Satowa Tanaka, Mami Nagai, Keiji Matsui, Natsumi Hasegawa, Robert G. Roeder, Shigetaka Asano, Mitsuhiro Ito. FGF7 supports hematopoietic stem and progenitor cells and niche-dependent myeloblastoma cells via autocrine action on bone marrow stromal cells in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 440, 125-131, 2013.

Keiji Matsui, Kasumi Oda, Shumpei Mizuta, Ruri Ishino, Norinaga Urahama, Natsumi Hasegawa, Robert G. Roeder, Mitsuhiro Ito. Mediator subunit MED1 is a T3-dependent and T3-independent coactivator on the thyrotropin  $\beta$  gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 440, 184-189, 2013.

Shumpei Mizuta, Tomoya Minami, Haruka Fujita, Chihiro Kaminaga, Keiji Matsui, Ruri Ishino, Azusa Fujita, Kasumi Oda, Asami Kawai, Natsumi Hasegawa, Norinaga Urahama, Robert G. Roeder, Mitsuhiro Ito. CCAR1/CoCoA pair-mediated recruitment of the Mediator defines a novel pathway for GATA1 function. *Genes Cells* 19, 28-51, 2014.

[学会発表](計 11件)

Natsumi Hasegawa, Keiji Matsui, Kasumi Oda, Shumpei Mizuta, Ruri Ishino, Asami Kawai, Norinaga Urahama, Robert G. Roeder, Mitsuhiro Ito. Role for Mediator subunit MED1 in homeostasis of TSH $\beta$  gene transcription. 第37回日本分子生物学会年会

Asami Kawai, Haruka Fujita, Syumpei Mizuta, Oriie Kanda, Yusuke Takemoto, Gentaro Tango, Taku Takahara, Mahiro Mori, Natsumi Hasegawa, Mitsuhiro Ito. Manner of recruitment of GATA1 coactivators to  $\gamma$ -globin promoter during erythroid differentiation. 第70回日本血液学会学術集会

Oriie Kanda, Yuki Morimoto, Keiji Matsui, Yusuke Takemoto, Gentaro Tango, Nanako Inoue, Hiroki Nagasaki, Akane Maekawa, Natsumi Hasegawa, Robert G.

Roeder, Mitsuhiro Ito. Conditional adipocytic hypertrophy and dysfunctioned glucose metabolism via the nuclear receptor-binding ability of MED1. 第37回日本分子生物学会年会

Gentaro Tango, Keiji Matsui, Natsumi Hasegawa, Yusuke Takemoto, Oriie Kanda, Asami Kawai, Mahiro Mori, Taku Takahara, Norinaga Urahama, Robert G. Roeder, Mitsuhiro Ito. PPAR $\gamma$  ligand-dependent adipocytic hypertrophy is mediated by Mediator subunit MED1. 第37回日本分子生物学会年会

Yusuke Takemoto, Keiji Matsui, Oriie Kanda, Gentaro Tango, Asami Kawai, Nanako Inoue, Hiroki Nagasaki, Akane Maekawa, Natsumi Hasegawa, Robert G. Roeder, Mitsuhiro Ito. CCAR1 and CoCoA pair activates PPAR $\gamma$ 2-induced transcription via Mediator subunit MED1. 第37回日本分子生物学会年会

Asami Kawai, Haruka Fujita, Syumpei Mizuta, Oriie Kanda, Yusuke Takemoto, Gentaro Tango, Taku Takahara, Mahiro Mori, Natsumi Hasegawa, Mitsuhiro Ito. Manner of recruitment of GATA1 coactivators to  $\gamma$ -globin promoter during erythroid differentiation. 第37回日本分子生物学会年会

Satowa Tanaka, Ruri Ishino, Masaya Yano, Azusa Imanishi, Akiho Maekawa, Kenji Yonezawa, Natsumi Hasegawa, Shigetaka Asano, Mitsuhiro Ito. FGF7 produced by BM stromal cells supports hematopoietic progenitor cells in an autocrine manner. 第37回日本分子生物学会年会

Azusa Imanishi, Satowa Tanaka, Ruri Ishino, Masaya Yano, Asami Nagai, Akiho Maekawa, Natsumi Hasegawa, Shigetaka Asano, Mitsuhiro Ito. FGF7 elicits maintenance and growth of stromal cell-dependent human MB-1 myeloblastoma cells. 第37回日本分子生物学会年会

Masaya Yano, Ruri Ishino, Akiko Sumitomo, Kana Inoue, Norinaga Urahama, Azusa Imanishi, Satowa Tanaka, Akiho Maekawa, Natsumi Hasegawa, Shigetaka Asano, Mitsuhiro Ito. Mechanistic analysis of MED1-dependent function of VDR and Runx2 on the Osteopontin promoter. 第37回日本分子生物学会年会

Robert G. Roeder, Satoshi Iida, Wei Chen, Keiji Matsui, Ruri Ishino, Natsumi Hasegawa, Mitsuhiro Ito. Role of Mediator subunit MED1 in nuclear receptor functions in adipogenesis. EMBO Conference, Nuclear Receptors. September 6, 2013, Sorrento, Italy. (招待講演、

基調講演)

Ruri Ishino, Satowa Tanaka, Keiji Matsui, Kaori Minami, Yukiko Ikeuchi, Masaya Yano, Azusa Imanishi, Mami Nagai, Natsumi Hasegawa, Ssigetaka Asano and Mitsuhiro Ito. FGF7 supports hematopoietic stem and progenitor cells and niche-dependent myeloblastoma cells via autocrine action on bone marrow stromal cells in vitro. Highlights of ASH in Asia, March 29-30, 2014, Singapore, Singapore. (招待講演)

〔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：  
出願年月日：  
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