

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860206

研究課題名(和文)新規プロモドメインタンパクのエピジェネティックリーダー機能の解析と癌細胞での役割

研究課題名(英文)Functional analysis of a novel bromodomain protein in cancer cells

研究代表者

山口 貴世志(Yamaguchi, Kiyoshi)

東京大学・医科学研究所・特任講師

研究者番号：50466843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がんで発現亢進を認めるプロモドメインタンパク質BRD8は、エピジェネティックな遺伝子発現調節に深く関わっているものと考えられるが、その標的となる遺伝子は明らかになっていない。本研究では遺伝子発現データ、ChIP-seqデータ、さらにChIA-PETデータを統合解析することにより、BRD8が直接制御する49遺伝子を同定した。この遺伝子群には、がんの発生や進展に関わる重要なシグナル経路を制御する遺伝子が含まれていた。BRD8はヒストンアセチル化酵素TIP60複合体の構成因子であることから、BRD8あるいはこの複合体を標的とする治療戦略は、新たながんの分子標的薬開発に役立つものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Bromodomain containing 8 (BRD8) is frequently accumulated in colorectal cancer. Although BRD8 has been considered to alter gene expression through epigenetic modification, genes regulated by BRD8 remain largely unknown. In this study, we analyzed the data of a transcriptome, ChIP-seq, and ChIA-PET, and identified a total of 49 genes that are directly regulated by BRD8. Interestingly, the list includes a gene associated with the regulation of an oncogenic signaling pathway. Consistently, knockdown of BRD8 reduced the expression of downstream gene, leading to change in the activity of the signaling pathway. Since BRD8 is a component in TRRAP/TIP60-histone acetyltransferase complex, our data may help for the development of novel strategies to treat human cancer through targeting the acetyltransferase complex.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：分子標的治療 大腸がん 遺伝子発現 エピジェネティクス

### 1. 研究開始当初の背景

近年、ヒトのがんにおいてプロモドメインをコードする遺伝子群の様々な異常が報告されている。例えば、BRD2およびBRD4は悪性黒色腫で遺伝子増幅が認められることや (Segura MF *et al*, Cancer Res 2013)、BRD4の転座によって生じる融合タンパク質 (BRD4-NUT)は扁平上皮がんを引き起こすことが知られている (French CA *et al*, Cancer Res 2003)。プロモドメインをもつタンパク質は、クロマチン修飾 (アセチル化) の認識に関わることが知られており、これらのタンパク質を標的とする薬剤は、新しいがんの分子標的治療薬として注目されている。

我々は以前の研究で、bromodomain containing 8 (BRD8)タンパク質が高頻度で大腸がんで蓄積していることを見出した。BRD8はヒストンアセチル化酵素である Tat interacting protein (TIP60)と相互作用することが知られており、TIP60複合体は少なくとも16個のサブユニットからなる巨大な複合体で、サブユニットの構成によって、そのアセチル化酵素活性は大きく変化することが報告されている (Avvakumov N *et al*, Oncogene 2007)。したがって、プロモドメインを持つBRD8は、TIP60複合体のクロマチンへの集積あるいはタンパク質のアセチル化を介してエピジェネティックな遺伝子発現調節に深く関わっているものと考えられる。しかしながら、BRD8の機能やがん細胞での役割はほとんど明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、エピジェネティック情報を認識する因子 (epigenetic reader) としてのBRD8の機能を検討する。また、BRD8によって発現制御される遺伝子群を網羅的に同定し、がん細胞におけるBRD8の役割を明らかにする。これらの解析を通じて、大腸がん治療・予防のための新たな戦略の基盤となる知見を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

がん細胞におけるBRD8の役割を明らかにするため、本研究では抗BRD8抗体を用いたChIP-seq (Chromatin immunoprecipitation coupled with high-throughput sequencing) を行い、以前に行ったマイクロアレイによる遺伝子発現解析データ、およびクロマチン相互作用データを統合的に解析し、BRD8が直接発現制御する遺伝子群を同定しようと試みた。

ChIP-seqは、HCT116大腸がん細胞にホルムアルデヒドを処置し、タンパク質とDNAを架橋した後、その細胞溶解液と抗BRD8抗体を用いて免疫沈降を行った。共沈したDNAにアダプターを付加し、PCRにて増幅を行った後、Ion Protonシステムを用いてシーケンスを行った。ピークの検出にはModel-based analysis of ChIP-Seq (MACS)を用いた。

我々は以前の研究で、BRD8に対する複数のsiRNA、あるいはコントロールsiRNAを処置したHCT116細胞からRNAを抽出し、遺伝子発現プロファイル解析を実施して、BRD8の発現抑制により変化する遺伝子群、719エンティティを同定している。

クロマチン相互作用データは、The Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE)プロジェクトによって得られた抗RNA Polymerase II抗体を用いたChromatin Interaction Analysis by Paired-End Tag Sequencing (ChIA-PET)データを用いた (<https://www.genome.gov/10005107/encode-project/>)。

### 4. 研究成果

BRD8はヒストンアセチル化酵素TIP60と複合体を形成することが報告されている。そこでまず、HCT116細胞にBRD8とTIP60を一過性に過剰発現させ、免疫沈降実験を行ったところ、図1に示すように、BRD8とTIP60が物理的に相互作用していることが確認された。TIP60は転写活性化に関わることから、BRD8はTIP60を介して転写活性化に関与していることが考えられる。そこで719エンティティの中からBRD8によって正に発現調節を受ける293エンティティを抽出した。

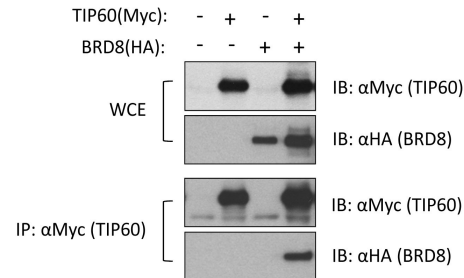


図1) BRD8とTIP60との結合。MycタグTIP60とHAタグBRD8をHCT116細胞に発現させ、抗Myc抗体を用いて免疫沈降を行った。

BRD8によって直接制御される遺伝子を同定するため、抗BRD8抗体を用いたChIP-seqを行った。さらにHCT116細胞のクロマチン相互作用データ (ChIA-PET)を加えることによって、遺伝子の転写開始から10 kb以内とエンハンサー領域に隣接するBRD8のピーク、4,766個を抽出した。最終的に遺伝子発現データとこれらのデータを統合し、BRD8によって直接転写が活性化される49種類の候補遺伝子を同定した (図2)。興味深いことに、これら49遺伝子のなかに、がん細胞の増殖やエネルギー代謝に関わるシグナルを調節する遺伝子が含まれていた。現在は、これらの候補遺伝子とBRD8の関係について詳細に検討を行っている最中である。

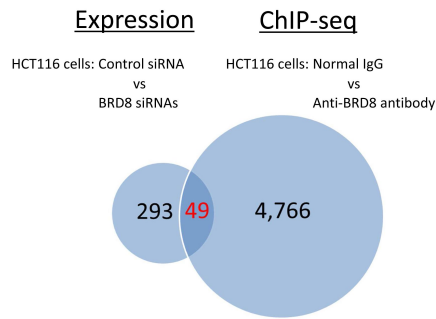


図2) 遺伝子発現データとChIP-seqデータの統合解析によって、BRD8が直接制御する49候補遺伝子が同定された。

これらの知見は、BRD8がこれらの候補遺伝子群の発現を制御することで、がん細胞の形質あるいは特徴に関わっていることを示唆するものである。さらに詳細な標的遺伝子の機能解析や発現調節メカニズムの解明が必要であるが、本研究で得られた成果は、今後の新しいがん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 7件)

- (1) Noguchi R, Yamaguchi K, Ikenoue T, Terakado Y, Ohta Y, Yamashita N, Kainuma O, Yokoi S, Maru Y, Nagase H, Furukawa Y. Genetic alterations in Japanese extrahepatic biliary tract cancer. *Oncol Lett*. 2016 in press. 査読有
- (2) Ikenoue T, Terakado Y, Nakagawa H, Hikiba Y, Fujii T, Matsubara D, Noguchi R, Zhu C, Yamamoto K, Kudo Y, Asaoka Y, Yamaguchi K, Ijichi H, Tateishi K, Fukushima N, Maeda S, Koike K, Furukawa Y. A novel mouse model of intrahepatic cholangiocarcinoma induced by liver-specific *Kras* activation and *Pten* deletion. *Sci Rep*. 2016;6:23899. 査読有
- (3) Iwaizumi M, Tao H, Yamaguchi K, Yamada H, Shinmura K, Kahyo T, Yamanaka Y, Kurachi K, Sugimoto K, Furukawa Y, Sugimura H. A novel *APC* mosaicism in a patient with familial adenomatous polyposis. *Hum Genome Var*. 2015;2:15057. 査読有
- (4) Noguchi R, Yano H, Gohda Y, Suda R, Igari T, Ohta Y, Yamashita N, Yamaguchi K, Terakado Y, Ikenoue T, Furukawa Y.

Molecular profiles of high-grade and low-grade pseudomyxoma peritonei. *Cancer Med*. 2015;4(12):1809-1816. 査読有

- (5) Kulak O, Chen H, Holohan B, Wu X, He H, Borek D, Otwinowski Z, Yamaguchi K, Garofalo LA, Ma Z, Wright W, Chen C, Shay JW, Zhang X, Lum L. Disruption of Wnt/ -catenin signaling and telomeric shortening are inextricable consequences of tankyrase inhibition in human cells. *Mol Cell Biol*. 2015;35(14):2425-2435. 査読有
  - (6) Yamaguchi K, Komura M, Yamaguchi R, Imoto S, Shimizu E, Kasuya S, Shibuya T, Hatakeyama S, Takahashi N, Ikenoue T, Hata K, Tsurita G, Shinozaki M, Suzuki Y, Sugano S, Miyano S, Furukawa Y. Detection of *APC* mosaicism by next-generation sequencing in an FAP patient. *J Hum Genet*. 2015;60(5):227-231. 査読有
  - (7) Ikenoue T, Yamaguchi K, Komura M, Imoto S, Yamaguchi R, Shimizu E, Kasuya S, Shibuya T, Hatakeyama S, Miyano S, Furukawa Y. Attenuated familial adenomatous polyposis with desmoids caused by an *APC* mutation. *Hum Genome Var*. 2015;2:15011. 査読有
- [学会発表](計 7件)
- (1) 山口貴世志, 上村光弘, 清水英悟, 長山聡, 山口類, 井元清哉, 渋谷哲朗, 池上恒雄, 宮野悟, 古川洋一. 全ゲノム解析により同定された腺腫性大腸ポリポースス患者の *APC* 遺伝子転写調節領域の欠失. 日本人類遺伝学会 第60回大会 2015年10月16日 東京
  - (2) 山口貴世志, 陶弘, 倉地清隆, 前川真人, 岩泉守哉, 中村利夫, 井元清哉, 山口類, 上村光弘, 宮野悟, 梶村春彦, 古川洋一. Efficacy of target enrichment-based sequencing for identifying genetic alterations in familial colorectal cancer. 第74回日本癌学会学術総会 2015年10月10日 名古屋
  - (3) Kiyoshi Yamaguchi, Mitsuhiro Komura, Rui Yamaguchi, Seiya Imoto, Eigo Shimizu, Shinichi Kasuya, Tetsuo Shibuya, Seira Hatakeyama, Norihiko Takahashi, Tsuneo Ikenoue, Keisuke Hata, Giichiro Tsurita, Masaru Shinozaki, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Satoru Miyano, Yoichi Furukawa. Next-generation sequencing detects a

mosaic APC mutation present at low allele frequencies in an FAP patient. The Clinical Genome Conference, June 22, 2015 San Francisco CA, USA

- (4) Kiyoshi Yamaguchi, Mitsuhiro Komura, Rui Yamaguchi, Seiya Imoto, Eigo Shimizu, Shinichi Kasuya, Tetsuo Shibuya, Seira Hatakeyama, Norihiko Takahashi, Tsuneo Ikenoue, Keisuke Hata, Giichiro Tsurita, Masaru Shinozaki, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Satoru Miyano, Yoichi Furukawa. Next-generation sequencing as a potential tool in the diagnostics of APC mosaicism in FAP patient. American Association for Cancer Research 106th Annual Meeting, April 22, 2015 Philadelphia PA, USA
- (5) Kiyoshi Yamaguchi, Masashi Miura, Chi Zhu, Tsuneo Ikenoue, Satoru Nagatoishi, Kouhei Tsumoto, Yoichi Furukawa. Bromodomain Protein BRD8 is a novel therapeutic target for colorectal cancer. 9th International Symposium on Cancer Research and Therapy. November 1, 2014 Tokyo
- (6) 山口貴世志, 上村光弘, 清水英悟, 粕谷慎一, 山口類, 渋谷哲朗, 井元清哉, 長山聡, 高橋則彦, 池上恒雄, 菅野純夫, 鈴木穰, 宮野悟, 古川洋一. Search for pathogenic variants in familial colorectal cancer using a next generation sequencer. 第73回日本癌学会学術総会 2014年9月26日 横浜
- (7) 大杉友之, 山口貴世志, 朱赤, 黄雨晴, 池上恒雄, 古川洋一. The interferon-induced protein family is down-regulated through the canonical WNT-signaling pathway. 第73回日本癌学会学術総会 2014年9月27日 横浜

〔図書〕(計 1件)

- (1) 山口貴世志, 古川洋一. 家族性腫瘍分野における NGS の活用. 臨床病理レビュー 「コンパニオン診断の進展」. 2015年, 第154号 17-23.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: 転写因子を調節する上流のシグナル伝達経路および転写因子の活性を制御する分子および物質のスクリーニング方法  
発明者: 古川洋一、山口貴世志  
権利者: 国立大学法人東京大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2015-027182

出願年月日: 2015年2月16日  
国内外の別: 国内

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・特任講師  
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: