Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-07-08

Mediator subunits MED1 and MED24 cooperatively contribute to pubertal mammary gland development and growth of breast carcinoma cells.

Hayashi, Natsumi

(Degree)
博士（保健学）

(Date of Degree)
2020-09-09

(Date of Publication)
2021-09-01

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
乙第3392号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003392

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（別紙様式５）

学位論文の内容要旨

氏　　名　　林　菜摘

論文題目

Mediator subunits MED1 and MED24 cooperatively contribute to pubertal mammary gland development and growth of breast carcinoma cells.

（メディエーターサブユニット MED1 と MED24 は協調して思春期の乳腺発育と乳癌細胞の増殖に寄与する）

乳腺の発育・進展にはエストロゲン受容体(ER)αが重要な役割を果たすが、メディエーターサブユニット MED1 は ERα と直接結合し、思春期の乳腺の発育と乳腺管腔を構成する上皮細胞の増殖･分化に寄与する。私は MED1 および MED24 の single heterozygous KO マウスでは乳腺の発育は正常であるが、MED1 と MED24 の double heterozygous KO マウスにおいて思春期乳腺の発育が遅延することを発見した。乳腺の管腔細胞と基底細胞の DNA 合成および ER 標的遺伝子である E2F1 および cyclin D1 の発現は低下しており、MED1/MED24 ダブル変異マウスの胎児線維芽細胞を用いたルシフェラーゼアッセイでは ER 機能の特異的な低下を認めた。

本論文では、MED24 を含むメディエーターサブモジュール MED24/MED23/MED16 は思春期乳腺の発育において MED1 と特異的に協調して寄与することを証明し、さらに細胞培養系において、MED1 と同サブモジュールが協調して、乳癌の ER 非依存性の増殖も担うことを報告する。

メディエーター/TRAP 複合体は約 30 のサブユニットで構成され、構造から頭部、体部、尾部のモジュールに分けられる。メディエーターは RNA ポリメラーゼⅡホロ酵素のサブ複合体であり、主に尾部モジュールに存在するサブユニットとアクチベーターの相互作用により多種多様な細胞内シグナルを統合する。我々は以前核内受容体が誘導する転写活性化の多段階モデルを提案した。このモデルではヒストンアセチルトランスフェラーゼ（またはヒストンメチルトランスフェラーゼ）の活性を持つコアクチベーターがリガンド依存性に核内受容体と結合し、クロマチン構造が緩む。次にコアクチベーターの交換が行われ、メディエーターは MED1/TRAP220 サブユニットの二つの LxxLL モチーフ(NR ボックス)を介して ER などの核内受容体に結合する。最後にメディエーターに結合した RNA ポリメラーゼⅡを介して転写開始前複合体(PIC)が形成される。

条件付きノックアウト遺伝子を使用したマウスモデルの研究で、メディエーターの MED1 サブユニットが乳腺の発達と授乳の両方に不可欠であることが示されている。一方 LxxLL 変異 *Med1* cDNA をノックインした遺伝子組み換えマウス［*Med1(lx)* KI マウス］は、MED1 と ER の直接結合の寄与が、思春期の乳腺の発達と管腔細胞の分化に限定して関与することが示されている。これらの研究における表現型の違いは、MED1 が核内受容体コアクチベーターとしての役割とは別に、他のアクチベーターの共活性化を通じて乳腺の生理学に未確認の役割を持っていることを示唆する。

MED1 を欠損したメディエーターは構造的に安定である一方、MED24/MED23/MED16 はメディエーターの尾部モジュール内でサブモジュールを構成し、いずれかが欠損するとサブモジュールは不安定となる。MED24/MED23/MED16 モジュールは広範な転写機構に対するアクチベーターの機能を担い、MED1 サブユニットと MED24 サブユニット間には胚発生およびハウスキーピング遺伝子発現において量依存性が存在する。従って MED24

を含むサブモジュールの機能低下はMED1の機能を低下させ、*Med1*の遺伝子量によって表現型が著しく変化する可能性がある。本論文は、*Med1*および*Med24*の遺伝子量を半分にすることで、この仮説が乳腺の思春期発育で当てはまることを立証した。

まずMED1およびERαを介した乳腺発育におけるMED24/MED23/MED16サブモジュールの寄与を調べるために、*Med1*$^{+/-}$*Med24*$^{+/-}$マウスの思春期乳腺の発育を分析した。*Med1*$^{+/-}$マウスおよび*Med24*$^{+/-}$マウスの乳腺のホールマウント染色において4，6，8週齢で正常な乳管伸長が示され、3，4，6週齢で正常な乳管構造が示された。一方*Med1*$^{+/-}$*Med24*$^{+/-}$マウスの乳腺の発達は4，6，8週齢で有意に遅延しており、3，4，6週齢での乳管構造は正常であった。これらの研究はMED1サブユニットまたはMED24を含むサブモジュールのいずれかの完全な遺伝子量が思春期乳腺の発育に必要であることを示し、MED24を含むサブモジュールが乳腺発育におけるMED1を介したERα機能の完全な働きのために不可欠であることを示す。

Med1$^{+/-}$*Med24*$^{+/-}$マウスの血清エストロゲン濃度は正常であったため、ERα機能が選択的に損なわれていると仮定し、MEFで一過性トランスフェクションおよびルシフェラーゼアッセイを用いて様々なアクチベーター機能を確認した。Singleヘテロ接合体の*Med1*$^{+/-}$および*Med24*$^{+/-}$ MEFはERαおよびPRα機能は野生型MEFと比較して同レベルであったが、*Med1*$^{-/-}$ MEFではこれらの受容体機能に障害があり、*Med1*$^{+/-}$*Med24*$^{+/-}$ MEFではさらに低下した。*Med1*$^{+/-}$*Med24*$^{+/-}$細胞でERαとPRαの機能が選択的かつ強く損なわれていることが強く示唆される。

次に初代乳腺上皮細胞を分離し、E2で処理後、ER標的細胞増殖関連蛋白であるE2F1、サイクリンD1、c-MycおよびDAOをコードする遺伝子の発現を調査したところ、野生型、*Med1*$^{+/-}$、および*MED24*$^{+/-}$初代乳腺細胞ではこれらの遺伝子の発現が顕著に誘導されたが、*Med1*$^{+/-}$*Med24*$^{+/-}$初代乳腺上皮細胞ではわずかしか誘導されなかった。この結果はルシフェラーゼアッセイの結果と一致し、*Med1*$^{+/-}$*Med24*$^{+/-}$細胞でERα機能が著しく低下していることが確認された。さらにメディエーターが最適な乳腺上皮細胞の増殖に必要であると仮説し、*in vivo*および*in vitro*でのDNA合成をBrdU染色で分析した。先行研究により、乳腺管腔細胞は豊富なMED1を発現するが、管腔細胞の外層に位置する乳腺基底細胞はMED1をほとんど発現しない。8週齢の同腹子の雌をBrdUで2時間処理した結果、BrdU陽性細胞は*Med1*$^{+/-}$*Med24*$^{+/-}$乳腺上皮の管腔細胞と基底細胞の両方でコントロールレベルの約半分まで有意に減少し、DNA合成が損なわれることを示した。乳腺初代培養細胞を分離したin vitroでのBrdU染色においては、野生型，*Med1*$^{+/-}$、および*MED24*$^{+/-}$初代乳腺上皮細胞はE2に応答してBrdUを取り込んだが*Med1*$^{+/-}$*Med24*$^{+/-}$初代乳腺上皮細胞はE2に応答しなかった。これらの結果はMED1とMED24が乳腺上皮細胞の正常なERα介在のDNA合成に必要であることを強く示唆している。

次に乳癌細胞の増殖におけるメディエーターサブユニットの寄与を調べるため、様々な乳癌タイプのMED1、MED24、MED30の発現を確認した。ルミナルAおよびB、HER2、

基底細胞様乳癌のこれらのサブユニットのmRNAレベルを評価したところ全て高発現していた。特に興味深いのは、基底細胞様乳癌細胞においてMED1発現レベルがルミナル型およびHER2型と同程度みられたことである。

MED1がMED24を含むサブモジュールと協調して基底細胞様乳癌細胞の増殖にも寄与していると考え、BT-549細胞株を用い、RNA干渉によってMED1およびMED24の内因性発現を下方制御し、細胞の増殖を分析した。その結果MED1とMED24を同時にノックダウンした場合のDNA合成はコントロールに比較して約70%になり、細胞増殖は著しく減衰した。またHER2陽性HCC1954細胞を調べ、同様の結果を得た。これらの結果は、MED1とMED24を含むサブモジュールの両方がER陰性の乳癌細胞の増殖に関与しており、MED1とMED24が同一のシグナル伝達カスケードを構成していることを示している。

次にBT-549細胞でのsiRNAとsiRNA耐性cDNAの同時トランスフェクションによりノックダンの影響を様々な変異MED1でレスキューされるか確認した。NR結合部位を欠くヒトMED1（1～602）、NR結合部位をもつMED1（1～703）、およびMED1全長は細胞の増殖をレスキューした。その結果、MED1（1～602）によるレスキューは部分的であり、MED1（1～602）とMED1（603～703）ドメインの両方が協力して細胞分裂促進の機能を果たす可能性があることを示した。

以上のことから、MED 1サブユニットとMED24を含むサブモジュールとの間にはERαの機能を特異的に調節する機能的コミュニケーションが存在し、乳腺の発達と細胞周期の進行に関与するとともに、MED1とMED24/MED23/MED16サブモジュールが協調して、乳癌のER非依存性の増殖も担うことを見出した。これはERα機能とは異なる未知のメカニズムを介してMED1が乳癌増殖に貢献することを示している。Notch4によって不死化されたMED1の欠損した原発性乳腺上皮細胞においてMED1のN末端が細胞増殖を促進することが報告されており、MED1のN末端はMED1を介した細胞増殖の重要な構成成分である可能性がある。このメカニズムの根底にある活性化因子の同定は、ER非依存性の乳癌の治療に貢献する可能性がある。

（別紙１）

論文審査の結果の要旨

氏　名	林　菜摘		
論文題目	Mediator subunits MED1 and MED24 cooperatively contribute to pubertal mammary gland development and growth of breast carcinoma cells.（メディエーターサブユニットMED1とMED24は協調して思春期の乳腺発育と乳癌細胞の増殖に寄与する）　（外国語の場合は，その和訳を併記すること。）		
審査委員	区　分	職　名	氏　名
	主　査	教授	伊藤　光宏
	副　査	教授	安田　尚史
	副　査	教授	堀　裕一
	副　査		印

要　旨

転写共役複合体メディエーターを構成する約31個のサブユニットのうち、MED1は核内受容体のシグナルを統合する一方、MED24/MED23/MED16サブモジュールは基本的な転写の増幅機能を有する。MED1やMED24を完全欠損したマウスは胎児致死性である。学位申請者は、MED1およびMED24の単独ヘテロノックアウトマウスの思春期乳腺発育は正常である一方、これらのダブルヘテロノックアウトマウスの思春期乳腺上皮細胞のDNA合成が低下し乳腺発育が遅延すること、その遅延はエストロゲン濃度に起因しないことを見出した。胎児線維芽細胞と乳腺上皮初代培養で検討すると、それぞれの単独ヘテロノックアウト細胞ではエストロゲン受容体αの機能が正常であったが、ダブルヘテロノックアウト細胞では同受容体機能が低下しその標的遺伝子の発現が低下した。また、様々なヒト乳癌でMED1およびMED24の高発現を認めた。ヒト乳癌ではエストロゲン受容体αを発現しないものがある。そのような乳癌細胞株BT549等で、siRNAを用いてMED1およびMED24をノックダウンしMED1の種々の断片やMED24をレスキューすることにより、MED1とMED24がいずれも乳癌細胞の至適な増殖に必要であり、またMED1はそのN端と核内受容体結合ドメインを有する中央部が分子内で協調して細胞増殖を担うことが明らかになった。これらの結果から、MED1とMED24サブモジュールがエストロゲン受容体αの機能を特異的に調節する機能的コミュニケーションが存在し、乳癌ではエストロゲン非依存的にもこれらが協調して増殖を担う機構が存在することが初めて明らかになった。本研究はメディエーターの中でMED24/MED23/MED16サブモジュールがMED1の機能を増幅し乳腺上皮の増殖を担うことを初めて示す価値ある成果の集積であり、転写研究・内分泌生理学・腫瘍学の幅広い学問分野にインパクトを有するものである。以上より、本研究は博士（保健学）に相当すると認める。

掲載論文名・著者名・掲載（予定）誌名・巻（号），頁，発行（予定）年を記入してください。
Mediator subunits MED1 and MED24 cooperatively contribute to pubertal mammary gland development and growth of breast carcinoma cells. Hasegawa N, Sumitomo A, Fujita A, Aritome N, Mizuta S, Matsui K, Ishino R, Inoue K, Urahama N, Nose J, Mukohara T, Kamoshida S, Roeder RG, Ito M. Molecular and Cellular Biology 32(8), 1483-1495, 2012.