

乳がんの再発に関わる核内長鎖非コードRNAの解析

公益財団法人がん研究会がん研究所がん生物部

斉藤 典子

1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

乳がん患者の多くはエストロゲン受容体 (ER) を発現するER陽性タイプで、その増殖に女性ホルモンであるエストロゲンが必要である。よって効果的な治療として抗エストロゲン剤による内分泌療法が施される。しかし、長期治療後に高い頻度で再発することが大きな問題であり、その解決のためには、乳がんが治療抵抗性を獲得する分子メカニズムを理解することが重要である。

ヒト乳がん細胞MCF7は、エストロゲン受容体タンパク質 (ER) 陽性乳がん由来で、エストロゲン存在下で増殖する。エストロゲン長期枯渇した状態で培養すると、はじめ多くは死滅するが、ある一群の細胞がエストロゲンに依存しない増殖能を獲得し、生き延びて再びさかんに増殖する。これはLTED (Long Term Estrogen Deprivation) と呼ばれ、内分泌 (抗エストロゲン) 療法が効かなくなった再発乳がんのモデル細胞である (図1)。LTEDがエストロゲン非依存性増殖能を獲得するために、ERが過剰発現し、それにより、わずかな量のエストロゲンに応答して増殖できるとされている。また、機序は不明なものの、LTED細胞の増殖はポリフェノールの一種であるレスベラトロールで阻害される。

我々のトランスクリプトーム解析により、LTED細胞にて過剰発現する遺伝子群の中に、*ESR1*をみとめ、本研究では、この遺伝子の転写活性の分子機序を、高次元エピジェネティクスの局面から精細に理解することを目的とした。

ヒトゲノムDNAは、全長2 mに及ぶが、細胞内では直径わずか10 μmの細胞核に収められる。よって裸のDNAは、核内因子群と相互作用しながら複数階層にわたって折りたたまれる。その結果、各階層において様々な遺伝子発現制御の機構が存在する。本研究では、TAD (topologically associating domain) と呼ばれる、Mb単位の大きなクロマチドメインの形成に、非コードRNAが関わる可能性の検証を行った。

近年の高速シーケンサー解析により、生体内には膨大な種類の非コードRNAが存在されていることが明らかとなってきている。特に200 ntを超える長鎖非コードRNAが、細胞の種類、組織や発生段階に特異的に発現していること、がんをはじめとする様々な疾患に深くかかわることが示唆され、生体にとって重要な制御因子であることが推察されてきた。長鎖非コードRNAの多くは細胞核内に局在し、クロマチン構造や転写の調節にかかわる。ゲノムDNAの配列を変えずに細胞表現を操るエピジェネティクスの新たな機能因子のメンバーとなると示唆されている。

2. 方法

LTED細胞における*ESR1*遺伝子の転写活性の分子機序を、高次元エピジェネティクスの局面から精細に理解するために、下記について調べた。

- ① MCF7、LTED、およびLTED細胞をレスベラトロール処理したLTED-RES細胞を用いて、mRNAと全RNAを対象としたRNA-Seq解析を行い、*ESR1* 遺伝子座近傍について非コードRNAの存在を調べた。
- ② FISH (fluorescence *in situ* hybridization)を用いて非コードRNAの細胞内局在を調べた。
- ③ 非コードRNAが、*ESR1*遺伝子の転写活性、LTED細胞の増殖能に寄与するかを検証した。
- ④ *ESR1* 遺伝子と相互作用する遺伝子群をchromosome conformation capture法で調べた。

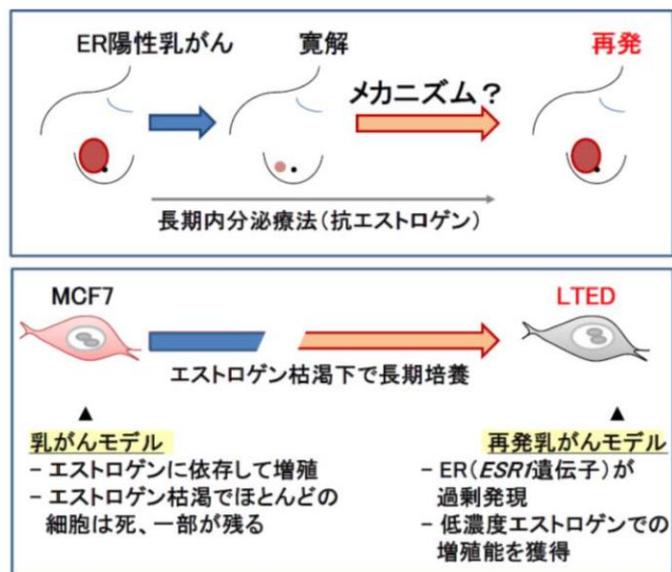


図1：ヒト乳がん由来 MCF7 細胞を、エストロゲン枯渇下で長期培養することで、再発乳がんモデル LTED 細胞が樹立される。

3. 結果 研究成果

① MCF7、LTED、およびLTED-RES細胞を用いたRNA-Seq解析

MCF7、LTED、LTED-RES (LTED細胞を100 μmレスベラトロールで24時間処理した細胞)について、poly A+ mRNAを対象としたmRNA-Seqと、リボソームRNAを除いたトータルRNAを対象にRNA-Seqを行ったところ、*ESR1* mRNAがLTEDで転写活性される際に、*ESR1*遺伝子とその上流3遺伝子を含む0.7 Mbに及ぶ広い領域から一群の非コードRNAが転写されている

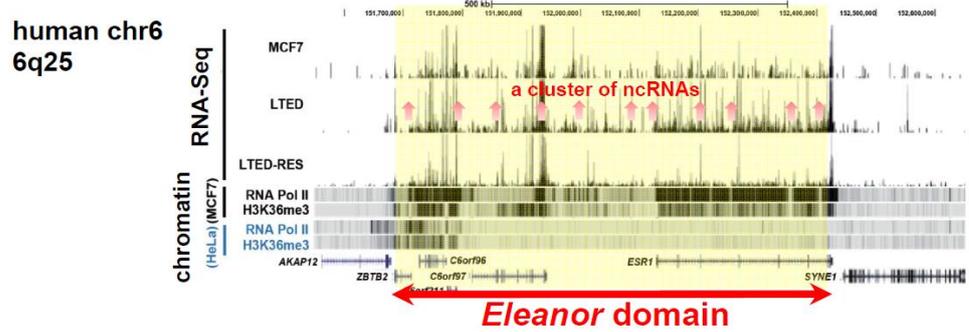


図2：再発乳がんモデルLTED細胞において、*ESR1*遺伝子を含む0.7 Mbの広汎な領域（黄色ハイライト）から非コードRNA群（赤矢印、エレノアと総称）が転写されている。エレノアドメインと名付けたこの領域は、乳がん細胞で活性クロマチン修飾パターンを示す。

ことを見出し、これらのRNAをエレノアと名付けた（図2）。公開ChIP (Chromatin immunoprecipitation)-SeqとTADを規定するHi-Cデータとの比較より、乳がんではこの領域にRNAポリメラーゼIIや、H3K36me3をはじめとする活性ヒストン修飾が蓄積している一方、H3K9me3などの抑制ヒストン修飾がほとんどなく、この領域が活性クロマチンであることより、エレノアドメイン (TAD) と名付けた。

② FISH (fluorescence in situ hybridization)によるエレノアの検出

エレノアの細胞内局在を調べるために、エレノアドメイン内由来の複数のBACクローンをプローブに用いてFISHを行ったところ、LTED特異的に肥大したシグナルを核内に認めた（図3）。このシグナルはRNase処理で消失、DNaseでは維持され、エレノアドメイン外由来のBACクローンプローブでは検出されなかった。またこのシグナルの肥大は、*ESR1* mRNAを検出するcDNAプローブでは検出されない一方、*ESR1*遺伝子のイントロン部に相当するプローブでは検出され、また、*ESR1*遺伝子上流の非コード領域のみを含むBACクローンで検出されたことなどから、シグナルは主に非コードRNA群、エレノアで構成されていることを確認した。また、MCF7とは別のER陽性乳がん細胞株であるHCC1428細胞由来のLTED細胞を用いたFISHでも同様のエレノアRNAクラウドを検出したことから、一定の普遍性が示された。

さらに、*ESR1*遺伝子座を可視化するDNA FISHとエレノアを検出するRNA FISHを同一細胞で行ったところ、エレノアの肥大RNAシグナルが、自身をコードするDNAシグナルを取り囲むように存在することを観察した。よって、エレノアはLTEDで自身が転写されるゲノム領域に相互作用し、核内にRNAクラウドを形成しながら近隣の*ESR1* mRNAの転写を促進しているという結論にいたった。

エレノアRNAクラウドが、実際の乳がん患者由来組織にも存在するかどうかを調べるために、組織マイクロアレイを用いたFISH解析を行ったところ、ER陽性患者の80%程度に、同様のシグナルが認められた。

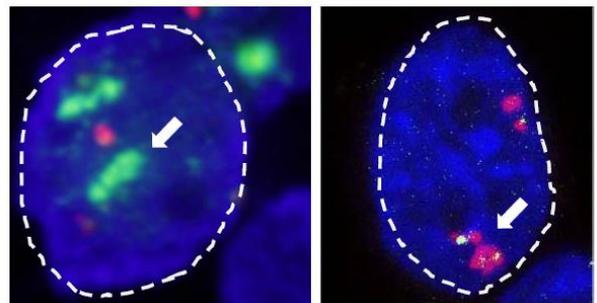


図3：エレノアRNAが核内に形成するRNAクラウド

（左）乳がん患者組織を用いたエレノアRNA FISH（緑シグナル）

（右）LTED細胞のDNA-RNA FISH

エレノアRNAクラウド（赤シグナル）が*ESR1*遺伝子座（白シグナル）を取り囲んでいる。

③ エレノアの*ESR1*遺伝子の転写活性、LTED細胞の増殖能への寄与を検証した。

LTED細胞をsiRNAで処理することにより、エレノアの一つであるu-エレノアを特異的にノックダウンした。その結果、*ESR1* mRNAの転写が抑制され、エレノアRNAクラウドが消失した。したがって、エレノアを介して*ESR1*遺伝子が転写活性化維持されること、RNAクラウドの形成にエレノアが必要であることが示された。また、エレノアをノックダウン後にLTEDの細胞数を計数したところ、LTED細胞の増殖が阻害されることがわかった。LTED細胞は再発乳がんのモデルであることから、エレノアが治療のよい標的であることが示唆された。

④ *ESR1*遺伝子と相互作用する遺伝子群の同定と解析

chromosome conformation capture法は、細胞核内でクロマチンがどのような3次元構造を形成しているかを調べる手法である。MCF7とLTED細胞をホルマリン固定後、制限酵素で処理し、その後ライゲ-

ション処理を行った。空間的に近傍の遺伝子同士は融合されるが、*ESRI* 遺伝子と融合された領域について、核内で相互作用している遺伝子群として同定した。現在、その詳細な分子機序と生物学的意義の検証を行っている。

4. 考察 まとめ

内分泌治療への抵抗性を獲得した再発乳がんにおいて、エレノア非コードRNAが核内でRNAクラウドを形成し、*ESRI* 遺伝子座に相互作用しながら転写を活性化させている、という新たな高次エピジェネティクス制御の可能性を見出した。FISHの結果、エレノアは核内自身のゲノム領域にとどまることが明らかにされたがどのようなメカニズムにより核内にとどまり、クロマチンに結合し、活性クロマチンドメインを形成するかは、不明である。クロマチンをオープンにするような作用を持つリモデリング因子、転写活性化因子、活性ヒストン修飾因子を呼び込むといった可能性が想定され、エレノアに結合する因子の同定実験などで解明されると期待している。特徴的なエレノアクラウドは、実際のER陽性患者由来組織でも検出されることから、診断のよい標的となりうる。また、エレノアをノックダウンすることにより、LTED細胞の増殖が阻害されたことから、エレノアは難治性再発乳がんの治療標的ともなりうると思われる。

5. 発表論文、参考文献

1. *Dobrucki J and Saitoh N. The 4D Nucleome in Kraków—prospects for an emerging field. *Nucleus*, 8:447–448, 2017
2. Ono, T., Sakamoto, C., Nakao, N., Saitoh, N. and *Hirano, T. Condensin II plays an essential role in reversible assembly of mitotic chromosomes *in situ*. *Mol. Biol. Cell*, 28:2875–2886, 2017.
3. Wang, X., Liang, S., Sun, Y., Li, H., Endo, F., Nakao, M., *Saitoh, N. and *Lijie Wu. Analysis of estrogen receptor beta gene methylation in autistic males in a Chinese Han population. *Metabolic Brain Disease*. 2017. doi: 10.1007/s11011-017-9990-7
4. Tomita, S., Abdalla, M. O. A., Fujiwara, S., Yamamoto, T., Iwase, H., *Nakao, M. and *Saitoh, N. Roles of long non-coding RNAs in chromosome domains. *Wiley Interdisciplinary Review RNA*, 2016 doi: 10.1002/wrna.1384.
5. Tomita, S., Abdalla, M. O. A., Fujiwara, S., Matsumori, H., Maehara, K., Ohkawa, Y., Iwase, H., *Saitoh, N. and *Nakao, M. A cluster of noncoding RNAs activates the *ESRI* locus during breast cancer adaptation. *Nat. Commun* 6: Article No. 6966, 2015.