

令和 5 年 7 月 20 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07651

研究課題名(和文) 癌で検出される多様な変異体ER の分子機能異常性の網羅的解析と病的意義の解明

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of mutant ERα found in cancers to reveal their aberrant functions

研究代表者

中太 智義 (NAKADAI, Tomoyoshi)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 がんエピゲノムプロジェクト・研究員

研究者番号：10364770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：変異体ER α -K303Rを発現するMB453細胞のATAC/ChIP-seqにより、K303R及び野生型共に間接的にDNA結合FoxA1へ会合するが、K303Rのみその領域を活性化しNcoA2のFoxA1/DNA複合体への結合を促進することを明らかにし、新規乳がん悪性化モデルを提唱した。一方、網羅的ルシフェラーゼアッセイにより機能異常性が示された変異体9種もMB453に導入、ATAC/ChIP-seqを行ったところ、恒常的活性化型変異体(Y537S等)同様の異常性を示すA86V/S463Pや、新規異常性(AP1転写因子領域への結合亢進と活性化)を呈するE247K/E380Qを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで高頻度変異体ER α の解析によるがんの治療や診断への応用がすすんでいる。一方中程度以下の変異については、未解析かつがん化との関連性を統計学的に見出すことも難しい。本研究はこれらの問題点へ切り込むことを目的とし、ルシフェラーゼアッセイやNGS等の網羅的解析を行い、複数の変異体の異常性の有無と新規異常性について明らかにした。特に変異体K303Rの異常性の分子機構(NcoA2のFoxA1会合の促進)を解明、新規がん化機構の提唱を行った。同時に野生型ER α の間接的FoxA1への会合を発見、野生型ER α の新機能を発見した。以上、本研究はER α の新規機能とER α 変異を有するがんの理解へつながった。

研究成果の概要(英文)：MB453 inducibly expressing mutant K303R was established and ATAC/ChIP-seq analyses were performed. The results showed that both of wild type and the mutant K303R associated with DNA-bound FoxA1 indirectly, but only the mutant K303R opened those regions. Moreover, biochemical analyses showed that the mutant K303R induced the association of NcoA2 to FoxA1/DNA complex. These results proposed the novel mechanism of breast cancer development by the mutant K303R.

Nine ER α mutants, which were shown to exhibit functional abnormalities in the luciferase assay, were also introduced into MB453. ATAC/ChIP-seq analyses revealed that mutant A86V/S463P showed the constitutive active phenotype as Y537S, and also mutants E247K/E380Q showed the novel abnormality (induced association to AP-1 binding region).

研究分野：遺伝子発現制御

キーワード：ER α Breast cancer Mutation FoxA1 NcoA2 ATAC-seq ChIP-seq K303R

1. 研究開始当初の背景

近年、臨床検体からのがん関連遺伝子変異の検出法が発展しており、がんの診断や治療への利用が期待されている。変異情報を臨床で有効活用するためには、各変異の病的意義を把握する必要がある。DNA 結合性転写活性化因子（アクチベーター）である ER α は、DNA に結合し、エストロゲンが ER α の C 末端の活性化部位 2 に結合することにより活性型に構造変化し、非 DNA 結合性転写制御因子群（コファクター）を呼び込みクロマチン構造を変化させ、基本転写因子群の DNA への会合が可能になり標的遺伝子の転写が「オン」になる。エストロゲンの ER α への結合を阻害するエストロゲン拮抗薬等による内分泌療法が ER α 陽性乳がんの治療に使用されているが、約 1/3 の症例で耐性を獲得し再発、そのうち約 20%では多発変異部位（ホットスポット）をはじめとするアミノ酸置換を伴う ER α の変異（ミスセンス変異）を生じる。ホットスポット変異体はエストロゲン非依存的に活性型を呈することから、この耐性獲得機構の一端を担うと考えられているが、一方でこれら変異体も拮抗薬により阻害されること、そして他の変異体に関しては未解析なこと等、変異体 ER α の機能異常性は不明確な部分が多い。

2. 研究の目的

がんで見出される ER α の各変異体を網羅的体系的に比較、解析することにより、「どの変異体がどのような作用機序で転写制御機能異常性を示すのか」を解明する。これにより各変異体の病的意義を同定、変異体 ER α を有するがん化機構解明への貢献を目的とする。また、変異により異常化する機構の解析は逆に正常機構の理解に繋がる。よって「ER α 依存的な新規転写制御機構の発見」も目的とする。

3. 研究の方法

乳がん細胞株を用い、ER α の転写活性化能及び変異体の異常性を適切に検出できる細胞株を同定、その後網羅的ルシフェラーゼアッセイにより機能異常性を有する変異体を同定する。ルシフェラーゼアッセイで機能異常性が示された変異体について、誘導的に ER α を発現する細胞株を作成、ATAC-seq 及び ChIP-seq 解析を用い、各変異体の異常性について解析する。異常性が検出された変異体については、生化学的解析によりその異常機構を明らかにする。

4. 研究成果

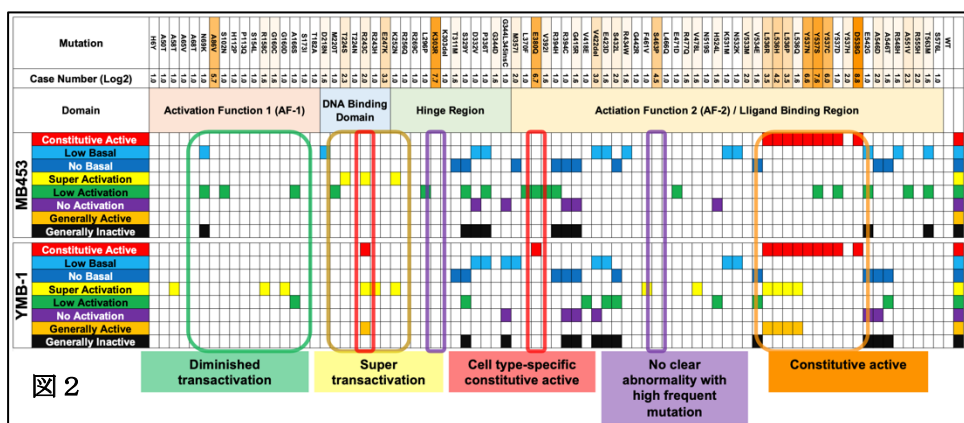
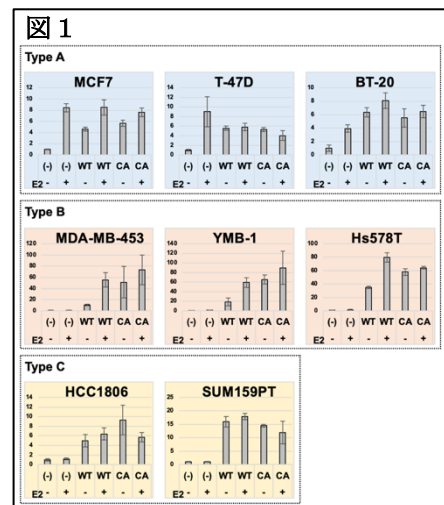
(1) 乳がん細胞を用いたルシフェラーゼアッセイ

変異体 ER α の異常性を検出、解析する系を樹立するために、多種多様な乳がん細胞を用いて、ルシフェラーゼアッセイを行った（図 1）。その結果、Type B の細胞群において、外来性野生型 ER α のエストロゲン依存的転写活性化と、恒常的活性化型変異体の一つである D538G のエストロゲン非依存的転写活性化を検出することができた。従って、MB453、YMB-1 を以降の解析に使用した。

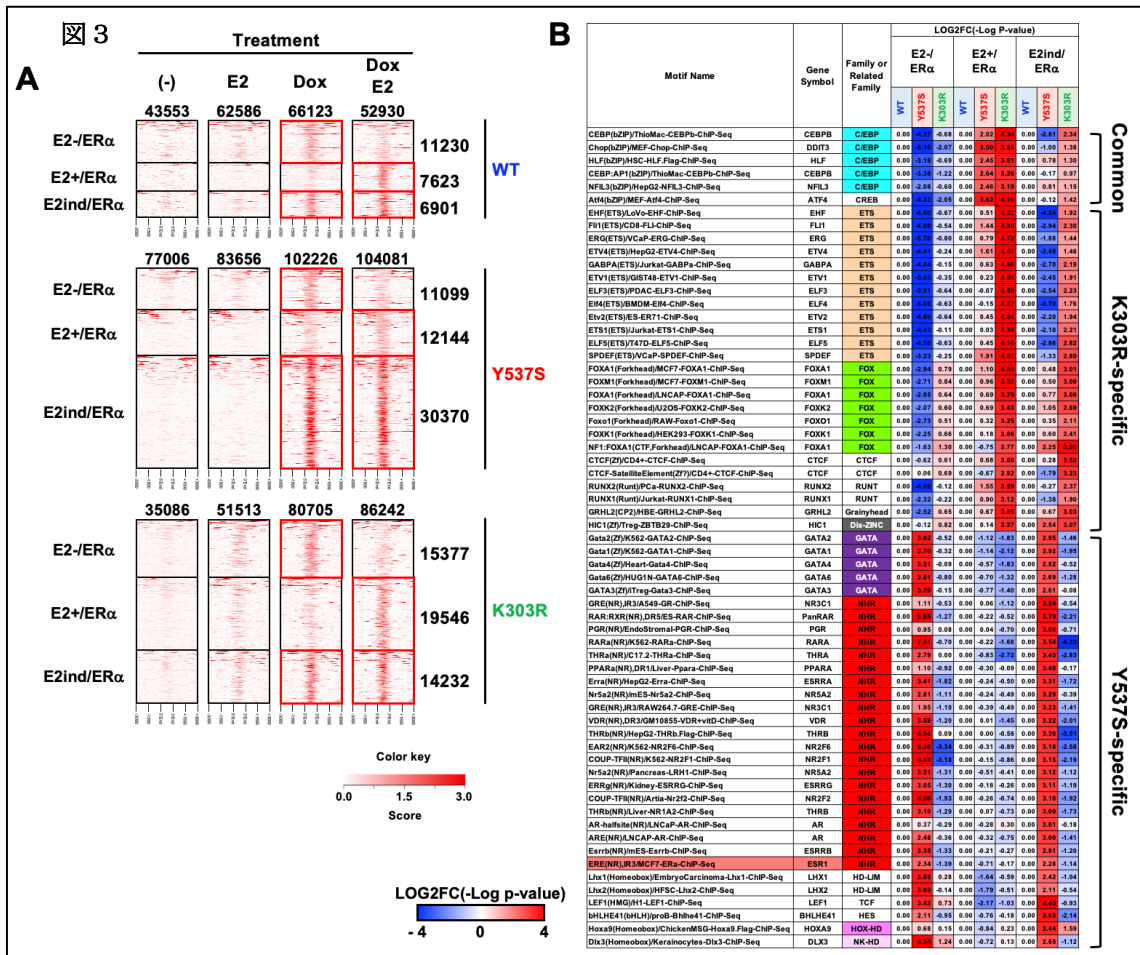
(2) 多種の変異体を用いたルシフェラーゼアッセイ 1

(1) のルシフェラーゼアッセイの系を用い、79 種類の高～低頻度の変異体 ER α について、転写活性化能について解析した（図 2）。その結果、これまで異常性が既知のエストロゲン非依存性恒常的転写活性化（オレンジ枠）だけでなく、エストロゲン依存的転写活性化能喪失型

（緑枠）、エストロゲン依存的転写活性化能亢進型（黄枠）、細胞特異的恒常的活性化型（赤枠）、乳がんにおいて高頻度に見いだされる変異体だが異常性を

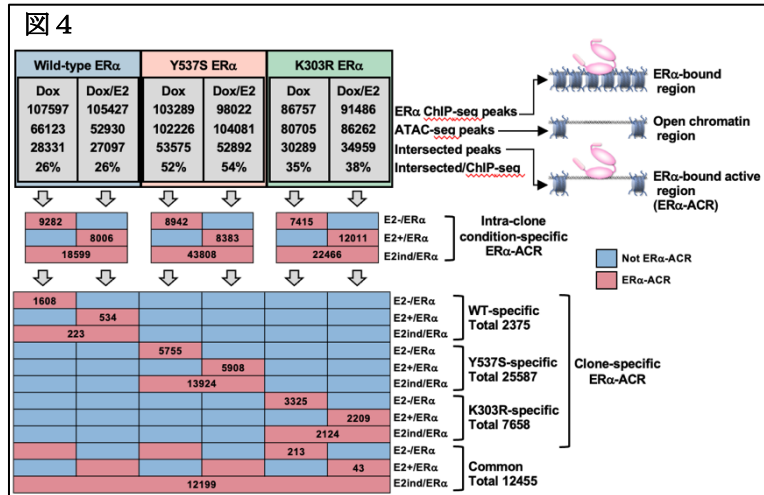


を呈さないもの（紫枠）等、様々な新規機能異常性や不検出性を同定することができ、これらとがん化メカニズムとの関連性に興味を持たれる。

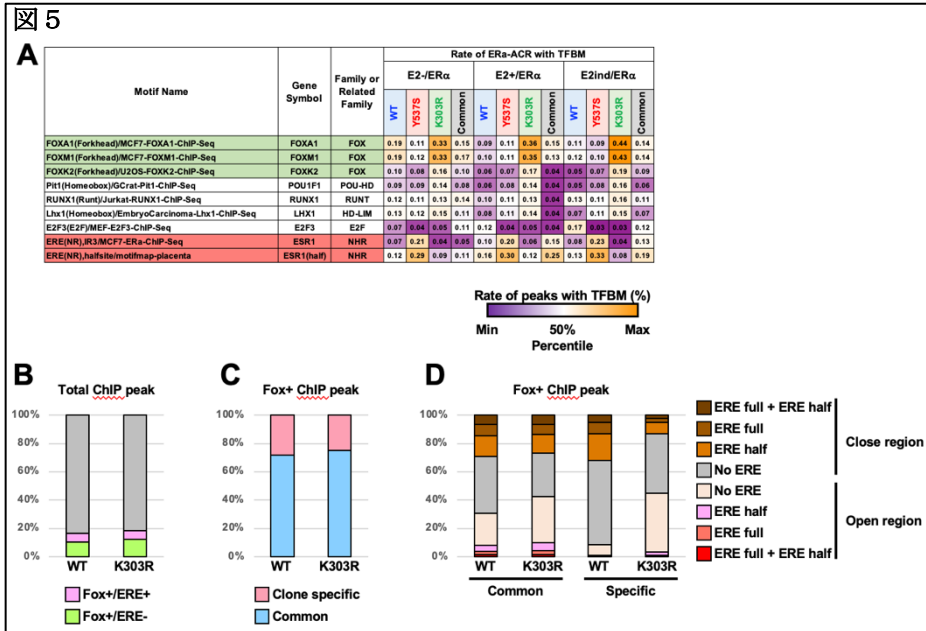


(3) CS-ERα/MB453 細胞の樹立と NGS 解析

ドキシサイクリン誘導的に ERα (野生型及び変異体) を発現する細胞株 CS-ERα/MB453 細胞株を樹立した。(2)において、興味深い挙動や新規異常性を呈する変異体の中から、エストロゲン非依存的恒常的活性化型変異体である Y537S、中頻度の変異体 K303R、そして野生型 ERα を CS-ERα/MB453 の系に導入、ATAC-seq 解析を行い、ゲノム構造から異常性の解析を行った。各細胞株における条件特異的ゲノム活性化領域 (ERα 依存的、エストロゲン及び ERα 依存的、エストロゲン(-)/(+)ERα 依存的ゲノム活性化領域) を抽出 (図 3 パネル A)、それぞれのグループにおいてエンリッチしている転写因子結合モチーフ (TFBM) を野生型 ERα と Y537S または K303R 間で比較、明確に変化している TFBM を抽出した (図 3 パネル B)。その結果、これまで Y537S において報告されているように、ERE や核内受容体 (NHR) の TFBM が増加していることが示され、系の妥当性が示されたと同時に、K303R については、Y537S とは全く異なるパターンを示しており、ETS や Fox ファミリーの TFBM が増加 (Log P-value で 3 倍以上) していることを発見した。次にこれらの領域について、ERα の直接的な関連性を解析する為、ERα 抗体を用いた ChIP-seq を行い、各細胞株における ERα 結合領域を解析した。ATAC-seq で検出された領域 (ゲノム活性化領域) と ChIP-seq (ERα 結合領域) がオーバーラップする領域を ERα が結合するクロマチン活性化領域 (ERα-binding Active Chromatin Region、ERα-ACR) と定義し、各細胞株内における細胞株特異的かつ条件特異的 ERα-ACR (Clone-specific ERα-ACR) (図 4 下段) について、それら領域における TFBM 数をカウントして割合を算出、各細胞間で比較した (図 5 パネル A)。その結果 Y537S においては



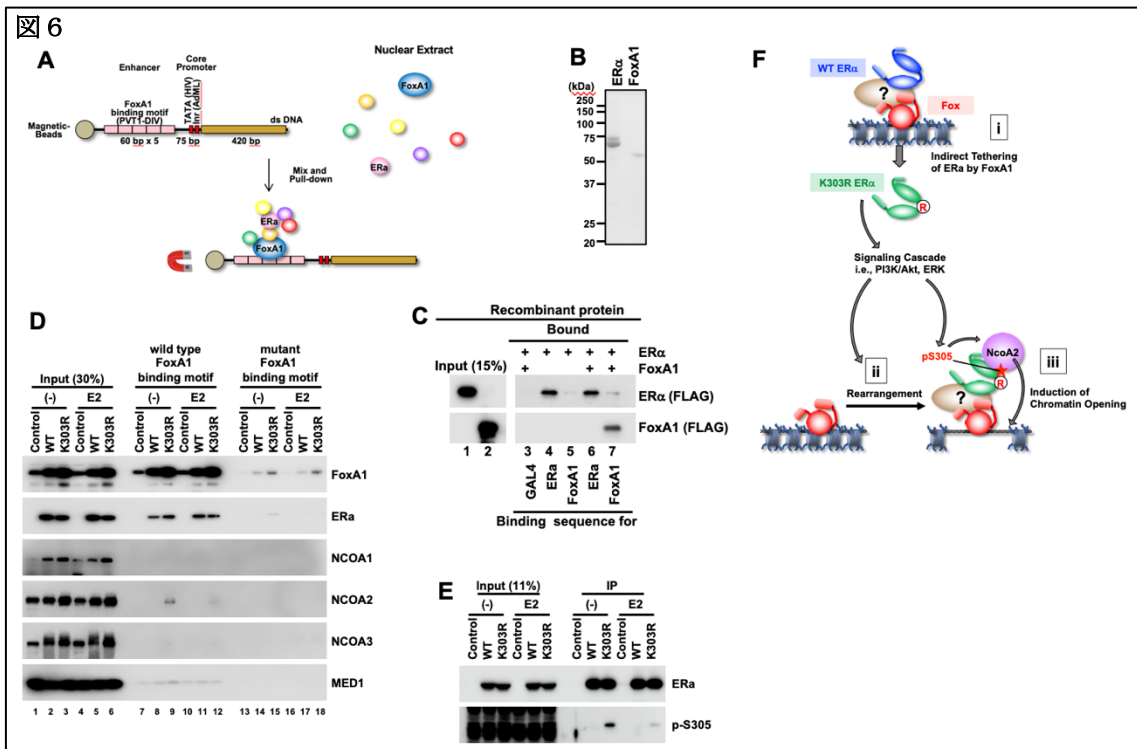
EREのみその割合が大きく増加していた一方 (~10%→~30%)、K303RについてはFoxA1/M1/K2が有意に増加しており (~10%→~40%)、やはりK303Rの異常性はFox領域への結合及び活性化と関連していることが明確となった。更にK303RのFoxA1



結合異常性やクロマチン活性化に対しての異常性の詳細を解析するために、ChIP-seqのデータに戻り、FoxA1の結合モチーフを有するERα結合領域について野生型ERαとK303R間で比較したところ、驚くことに野生型ERαもFoxA1領域にK303Rと同等割合で結合していること(図5パネルB)、しかしながらK303Rの変異により、結合領域の大部分は変化しないが一部の分布が変化していること(~30%)(図5パネルC)、そしてこれら領域のATAC-seqのデータを比較解析したところ、野生型ERαに比べてK303R結合FoxA1領域はよりオープン=活性化していることが明らかとなった(図5パネルD)。これらの結果より、K303RはERαのFoxA1結合領域を変化させ、同時にクロマチンを開放型にして活性化することが示された。

(4) DNA上結合因子解析法によるK303RのFox因子領域活性化機構の解析

以上発見したK303Rの機能異常性の分子機構を明らかにするために、FoxA1、ERα、FoxA1結合モチーフを有するDNAを用いたDNA上結合因子解析法(図6パネルA)により更に解析した。まず組み換えタンパク質ERαやFoxA1(図6パネルB)を用いて解析したところ、DNA結合FoxA1とERαは直接結合しないことがわかった(図6パネルC)。一方CS-ERα/MB453細胞の核抽出液を用いて解析したところ、野生型ERα及びK303RともにDNA結合FoxA1に会合することが示され、直接結合はしないが、間接的に野生型ERα及びK303RとFoxA1は会合していることがわか



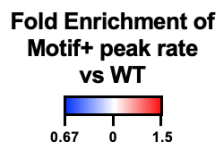
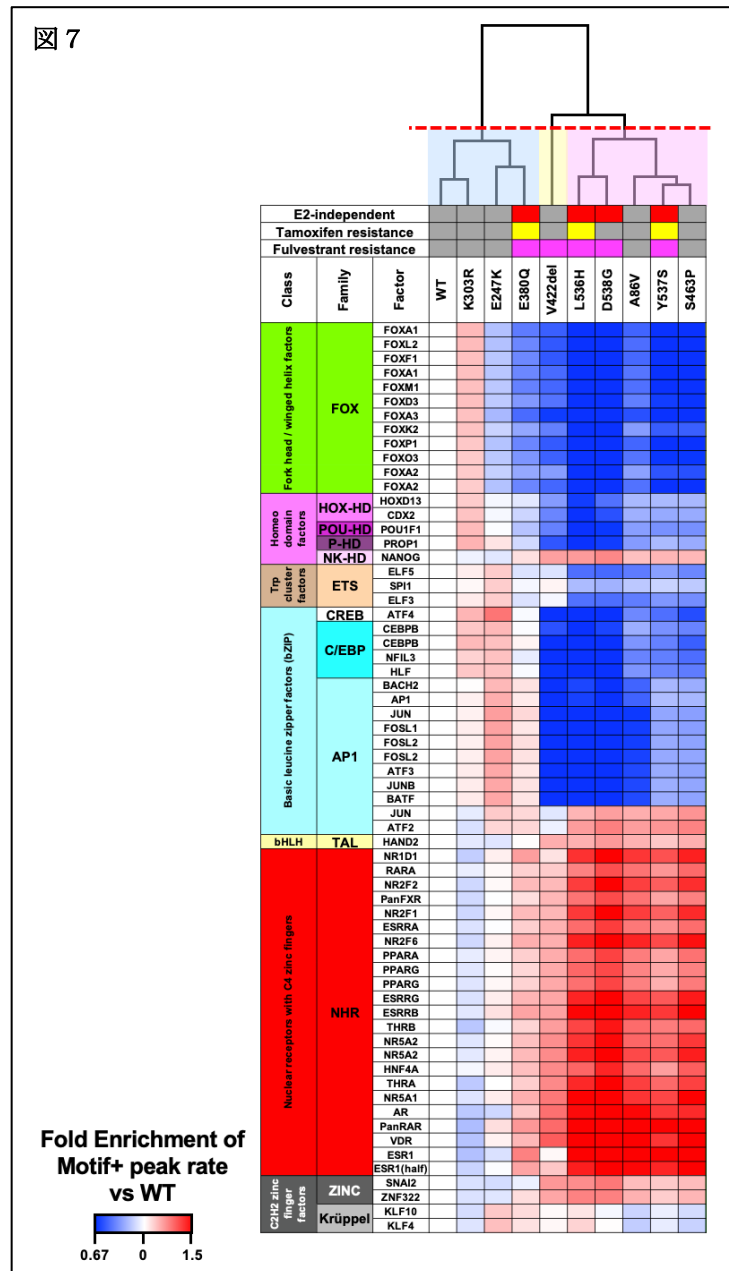
った(図6パネルD、上部2パネル)。これら DNA/FoxA1/ER α 複合体に、ER α と機能的関連性があり、クロマチン修飾・活性化因子と会合してゲノム領域を活性化する因子が存在しているか解析したところ、そのうちNcoA2がK303R 特異的に共沈してくることがわかった(図6パネルD、下部4パネル)。また、この変異体K303Rは305番目のセリンリン酸化(p305S)を誘導することが知られているが、CS-ER α /MB453においてもこの現象が観察された(図6パネルE)。これらから、変異体K303Rは報告されているようにリン酸化カスケードを活性化、これら下流で機能変化することが知られるFoxファミリーの分布を変化させ、同時に間接的に会合しているER α の分布も変化、さらに変異体K303RはFoxA1/ER α /DNA複合体へのNcoA2の会合を未知の機構により亢進、NcoA2がゲノム領域を活性化する機能異常モデルが考えられた(図6パネルF)。これらの結果より、K303Rを有する乳がん悪性化には、FoxA1を介した以上のモデルが関与している可能性が示唆された。

(5) その他の変異体の解析

(2)の解析で異常性が検出された、乳がんにおいて中程度～高頻度の変異頻度の変異体8種について、CS-ER α /MB453システムへ導入、K303Rに行ったように、各クローンのER α -ACRにおけるTFBMを図5パネルA同様にカウント、野生型ER α に対して有意差あるもののみを抽出、クラスタリングを行った(図7)。

結果、変異体は3つのグループに分かれることが明らかになった。一つはY537Sのように、NHRの結合モチーフがER α -ACRにエンリッチする恒常的活性化型グループ(右側)であるが、興味深いことに、このグループには、ホルモン療法耐性乳がんが高頻度に検出され、恒常的活性化型ということが既知のC末端変異体群(L536H/Y537S/D538G)だけでなく、全く異なるAF-1部位及びN末端寄りのAF-2領域に存在する変異体A86VやS463Pが属していた。次に、Fox結合モチーフがエンリッチする変異体K303Rを含むグループ(青背景)であり、その中にAP-1結合モチーフがエンリッチする変異体E247KやE380Qがあり、興味深いことにE380Qは上述の恒常的活性化型とともにホルモン療法耐性乳がんが高頻度に発見されるが、機能異常性が全く異なる可能性が示唆される。その他、独立した中間タイプ(黄背景)に属する変異体V422delは、恒常的活性化型グループ同様NHRの結合モチーフがエンリッチしているが、EREは全くエンリッチしておらず、ユニークな機能異常性を呈している。以上より、乳がんにおいて中～高頻度見いだされる変異体においても、機能異常性については多様性に富んでいることを明らかにした。現在この機能異常性の多様性について、各変異体への結合因子を解析することから、機能異常分子機構の差異の解析を目指している。

図7



以上の研究は、「各変異体の転写制御機能異常性の解明」及び「ER α 依存的な新規転写制御機構の発見」、さらには「ER α 変異を有するがんの解明」につながったと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kenichi Miyata, Yoshinori Imai, Satoshi Hori, Mika Nishio, Tze Mun Loo, Ryo Okada, Liying Yang, Tomoyoshi Nakadai, et. al.	4. 巻 118
2. 論文標題 Pericentromeric noncoding RNA changes DNA binding of CTCF and inflammatory gene expression in senescence and cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2025647118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Leonen Calvin Jon A, Shimada Miho, Weller Caroline E, Nakadai Tomoyoshi, Hsu Peter L, Tyson Elizabeth L, Mishra Arpit, Shelton Patrick MM, Sadilek Martin, Hawkins R David, Zheng Ning, Roeder Robert G, Chatterjee Champak	4. 巻 10
2. 論文標題 Sumoylation of the human histone H4 tail inhibits p300-mediated transcription by RNA polymerase II in cellular extracts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.67952	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kumegawa Kohei, Saeki Sumito, Takahashi Yoko, Yang Liying, Osako Tomo, Nakadai Tomoyoshi, Amino Sayuri, Maeda Tetsuyo, Takahata Chikako, Mori Seiichi, Noda Tetsuo, Ohno Shinji, Ueno Takayuki, Maruyama Reo	4. 巻 128
2. 論文標題 Chromatin profile-based identification of a novel ER-positive breast cancer subgroup with reduced ER-responsive element accessibility	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1208 ~ 1222
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-023-02178-1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakadai Tomoyoshi, Shimada Miho, Ito Keiichi, Cevher Murat Alper, Chu Chi-Shuen, Kumegawa Kohei, Maruyama Reo, Malik Sohail, Roeder Robert G	4. 巻 33
2. 論文標題 Two target gene activation pathways for orphan ERR nuclear receptors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Research	6. 最初と最後の頁 165 ~ 183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41422-022-00774-z	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakadai Tomoyoshi, Yang Liying, Kumegawa Kohei, Maruyama Reo	4. 巻 50
2. 論文標題 Estrogen receptor K303R mutation reorganizes its binding to forkhead box protein A1 regions and induces chromatin opening	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 1209 ~ 1220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11033-022-08089-3	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kumegawa Kohei, Takahashi Yoko, Saeki Sumito, Yang Liying, Nakadai Tomoyoshi, Osako Tomo, Mori Seiichi, Noda Tetsuo, Ohno Shinji, Ueno Takayuki, Maruyama Reo	4. 巻 8
2. 論文標題 GRHL2 motif is associated with intratumor heterogeneity of cis-regulatory elements in luminal breast cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 npj Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41523-022-00438-6	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中太智義
2. 発表標題 Comprehensive analysis of mutant ERα detected in various cancers to reveal their aberrant molecular functions and pathological significances
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中太智義
2. 発表標題 Comprehensive analysis of mutant ERα detected in various cancers to reveal their aberrant molecular functions and pathological significances
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中太智義、楊麗英、丸山玲緒
2. 発表標題 癌で検出される多様な変異体ERaの分子機能異常性の網羅的解析と病的意義の解明
3. 学会等名 日本分子生物学会第42回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中太 智義、楊美麗、大塚裕美、桑川晃平、宮木里帆、丸山 玲緒
2. 発表標題 癌で検出される多様な変異体ER の網羅的解析と分子機能異常性の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中太 智義、桑川晃平、丸山 玲緒
2. 発表標題 癌で検出される多様な変異体ERaの分子機能異常性の網羅的解析と病的意義の解明
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------