

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2023

課題番号：19K23736

研究課題名（和文）非コードRNAによる転写活性なクロマチン高次構造形成機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of forming transcriptionally active chromatin structures by non-coding RNA

研究代表者

山本 達郎（Yamamoto, Tatsuro）

熊本大学・病院・医員

研究者番号：90844770

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：再発乳がん細胞では、エレノア非コードRNAが過剰発現することを先行研究により報告したが、エレノアRNAの機能は不明である。本研究では、非コードRNAがクロマチン構造に影響を与える機構を解明することを目的とした。そこで、ゲノムの細胞核内の3次元的クロマチン間相互作用の解析法を用いて、非コードRNAによるクロマチン構造の変化を解析した。その結果エレノアRNAの転写物が、3次元的にクロマチン構造を変化させ、転写が活性化されやすい場の形成に寄与することを報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クロマチン構造に関する研究は近年注目を浴びており、この構造が破綻すると、遺伝子発現が変化し、がんなどの疾患に関与することが報告されている。しかしながら、非コードRNAによるクロマチン3次元構造の変化は未解明であった。本研究では、発癌や治療耐性を獲得する過程で、非コードRNAによる転写活性なクロマチン高次構造の形成機構を解明した。本研究の成果は、現在注目を浴びているクロマチン高次構造の形成・維持の解明の一端を担うものに位置し、がんに対する新規の診断法や治療法につながると思われる。

研究成果の概要（英文）：The previous study reported that Eleanor non-coding RNAs are overexpressed in recurrent breast cancer cells, but the function is not elucidated. In this study, we aimed to elucidate the mechanism of the role of non-coding RNAs with chromatin structures. Therefore, we investigated the 3D chromatin structure changes caused by non-coding RNAs using a method for analyzing 3D chromatin interactions in the cell nucleus of the genome. As a result, Eleanor RNA transcripts change chromatin structure formation in 3D, and contribute to making a spot for transcriptional activation.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピジェネティクス クロマチン構造 非コードRNA 乳がん

## 1. 研究開始当初の背景

乳がんは女性の罹患率が第1位のがんであり、近年患者数は増加傾向にある。乳がんの多くは、増殖因子であるエストロゲンと結合するエストロゲン受容体(ER)を高発現しているため、エストロゲン作用を標的とした内分泌療法が効果的である。しかし、一部の乳がんは治療耐性を獲得し、再発することが問題となっている。乳がん細胞は内分泌療法耐性を獲得する過程で、非コードRNAである *ELEANORs* (*ESR1* locus enhancing and activating non-coding RNAs) が転写され、ERをコードする *ESR1* 遺伝子の発現を活性化し、治療耐性獲得に関わる (Tomita et al., *Nat Commun.* 2015)。非コードRNAとは、タンパク質をコードしないRNAで、多くが核内に留まり遺伝子の発現調節に関わることが明らかになりつつある。申請者は、治療耐性乳がん細胞に、エストロゲンと構造の類似するレスベラトロールを投与すると、*ELEANORs* が消失し、*ESR1* の発現が抑制され、アポトーシスを誘導することを見出した。しかしながら、*ELEANORs* がどのような機構で、*ESR1* 遺伝子を含む区画において、転写が活性化されたクロマチン構造を形成するかは不明である。

Hi-C法など、細胞核内でのゲノム同士の位置関係を解析する技術であるCテクノロジー技術の革新により、クロマチンは10-100 kbのクロマチンループ、100 kb-1 MbのTAD (topologically associating domain)、転写が活性・不活性なTAD同士が集まった2-10 MbのA/Bコンパートメントといった階層性を持った高次構造体が存在することが明らかになった。これらは細胞の個性を規定する重要な現象である。発癌や治療耐性の獲得時に重要であるクロマチン高次構造は、非コードRNAにより制御される可能性があるが、その詳細な分子機構は未解明である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、「がんの発癌や治療耐性を獲得する過程において、*ELEANORs* が転写活性なクロマチン高次構造を形成する詳細な機構を解明すること」である。がんにおけるクロマチン高次構造を含むエピゲノム異常は発癌から進展、治療耐性に至る過程で、これらの特性に大きく影響を与えている。エピゲノムの異常から生じる遺伝子発現の変化は、がん細胞の個性を作り、治療耐性を獲得する要因の一つとなっている。そこで、Hi-C法などゲノムシークエンズの技術を用いて、非コードRNAによるクロマチン高次構造の変化を捉えることで、がんの特性を理解し、エピゲノムの理解をより深めることを目指した。

## 3. 研究の方法

本研究では、ゲノムシークエンズ技術などを用いて、非コードRNAである *ELEANORs* がクロマチン構造に与える影響を解析した。また、再発乳がんの治療標的として、*ELEANORs* を分解する核酸医薬を用いて、効果の有効性並びに、クロマチン相互作用の変化を検討した。

### (1) 乳がんの治療耐性獲得における *ELEANORs* の転写活性な構造形成の解明

ER陽性乳がん細胞株であるMCF7細胞と内分泌療法耐性乳がん細胞モデルであるLTED細胞を解析に用いた。*ELEANOR* 転写領域内のゲノムにおいて特徴的クロマチン構造の変化が *ELEANORs* の転写を活性化、さらには転写活性なクロマチン高次構造形成に寄与しているのではないかと予想し、MCF7、LTED細胞の3C、4C-seqおよびHi-C実験を行い、A/Bコンパートメント・クロマチン相互作用変化を解析した。*ELEANOR* ドメインの制御に関わると予想された領域の変化をRNA-seq、ChIP-seqデータを組み合わせ、比較し、重要な領域として抽出した。この領域に対して、CRISPR/Cas9システムを用いてゲノム編集を行い、細胞の特性・*ELEANORs* や遺伝子発現変化・クロマチン構造の変化を調べた。

### (2) *ELEANORs* の分解による及ぼすクロマチン構造変化の解明と新規治療法の可能性の検討

LTED細胞にレスベラトロール処理をすると *ELEANORs* を消失させ、アポトーシスを引き起こすことを報告した。レスベラトロール処理前後のエピゲノム変化を検討し、*ELEANORs* が分解されることによるクロマチン構造変化の解明のため、レスベラトロール処理前後で3C、Hi-C実験を行い、*ELEANORs* 消失時のA/Bコンパートメント・クロマチン相互作用変化を調べた。また、*ELEANORs* を標的とした核酸医薬を用いることで、*ELEANORs* を分解し、3C解析を行い、クロマチン相互作用の変化を解析した。

また、この核酸医薬を用いて細胞の増殖変化や遺伝子発現の変化を調べ、新規治療薬となりえるか検討した。

#### 4. 研究成果

本研究では、細胞株を用いた実験を行い、クロマチン構造解析法である 3C、4C-seq および Hi-C 法を使用してクロマチン間相互作用の変化を解析した。解析結果から、再発乳がんモデル細胞である LTED 細胞では、アポトーシスを促進する *FOXO3* 遺伝子と細胞増殖に関わる *ESR1* 遺伝子が 3 次元的に近接し、遺伝子発現が協調的に活性化されていることがわかった。これは非コード RNA により、遠距離にある DNA が 3 次元的に近接させる新たな機能の発見であった。再発乳がん細胞がアポトーシスに誘導されやすい性質の根底にあるメカニズムは、クロマチン構造の形成から生じている可能性を報告した (Abdalla, Yamamoto et al., *Nat Commun.* 2019)。

*ELEANORs* を標的とした核酸治療薬を用いることで、再発乳がんモデル細胞の細胞死を誘導した。これは以前に報告したレスペラトロールを使用した効果と類似していた。この結果より、再発乳がん細胞に対する核酸医薬の新規治療法としての可能性を見出した。レスペラトロールの投与もしくは核酸医薬による *ELEANORs* の分解は、クロマチン間の相互作用を抑制した (Abdalla, Yamamoto et al., *Nat Commun.* 2019)。さらに、*ELEANORs* の転写物が細胞核内にとどまることで、クロマチン構造を変化させ、転写を活性化しやすい場の形成に寄与することを報告した (Fujita, Yamamoto et al., *Commun Bio.* 2020)。

ER の ChIP-seq 解析、RNA-seq 解析から、*ELEANOR* ドメイン内に重要と予想される領域を抽出した。この領域を CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集することで、乳がん細胞株が細胞死を引き起こすことを見出した。さらに Hi-C や公共データからエレンアが転写される領域は乳がん細胞特有に A-コンパートメントと呼ばれる転写が活性化された区画に属することが分かった。

本研究では、発癌や治療耐性を獲得する過程で、非コード RNA による転写活性なクロマチン高次構造の形成機構を解明した。本研究の成果は、クロマチン高次構造の形成・維持の解明の一端を担うものに位置し、生命現象に関わるエピゲノムの解明ならびにがんに対する新規の診断法や治療法につながると期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Abdalla Mohamed Osama Ali, Yamamoto Tatsuro, Maehara Kazumitsu, Nogami Jumpei, Ohkawa Yasuyuki, Miura Hisashi, Poonperm Rawin, Hiratani Ichiro, Nakayama Hideki, Nakao Mitsuyoshi, Saitoh Noriko	4. 巻 10
2. 論文標題 The Eleanor ncRNAs activate the topological domain of the ESR1 locus to balance against apoptosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3778
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-11378-4	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 Fujita Risa, Yamamoto Tatsuro, Arimura Yasuhiro, Fujiwara Saori, Tachiwana Hiroaki, Ichikawa Yuichi, Sakata Yuka, Yang Liying, Maruyama Reo, Hamada Michiaki, Nakao Mitsuyoshi, Saitoh Noriko, Kurumizaka Hitoshi	4. 巻 3
2. 論文標題 Nucleosome destabilization by nuclear non-coding RNAs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-0784-9	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 Sakata Junki, Hirose Akiyuki, Yoshida Ryoji, Matsuoka Yuichiro, Kawahara Kenta, Arita Hidetaka, Nakashima Hikaru, Yamamoto Tatsuro, Nagata Masashi, Kawaguchi Sho, Gohara Shunsuke, Nagao Yuka, Yamana Keisuke, Toya Ryo, Murakami Ryuji, Kuwahara Yoshikazu, Fukumoto Manabu, Nakayama Hideki	4. 巻 12
2. 論文標題 Enhanced Expression of IGFBP-3 Reduces Radiosensitivity and Is Associated with Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 494 ~ 494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12020494	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 Tachiwana Hiroaki, Yamamoto Tatsuro, Saitoh Noriko	4. 巻 61
2. 論文標題 Gene regulation by non-coding RNAs in the 3D genome architecture	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Opinion in Genetics & Development	6. 最初と最後の頁 69 ~ 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gde.2020.03.002	査読の有無 有
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 Yamamoto Tatsuro, Hirose Akiyuki, Nakamoto Masafumi, Yoshida Ryoji, Sakata Junki, Matsuoka Yuichiro, Kawahara Kenta, Nagao Yuka, Nagata Masashi, Takahashi Nozomu, Hiraki Akimitsu, Shinohara Masanori, Nakao Mitsuyoshi, Saitoh Noriko, Nakayama Hideki	4. 巻 123
2. 論文標題 BRD4 promotes metastatic potential in oral squamous cell carcinoma through the epigenetic regulation of the MMP2 gene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 580 ~ 590
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-020-0907-6	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 Nozawa Ryu Suke, Yamamoto Tatsuro, Takahashi Motoko, Tachiwana Hiroaki, Maruyama Reo, Hirota Toru, Saitoh Noriko	4. 巻 111
2. 論文標題 Nuclear microenvironment in cancer: Control through liquid liquid phase separation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3155 ~ 3163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14551	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 Suzuki Hidefumi, Abe Ryota, Shimada Miho, Hirose Tomonori, Hirose Hiroko, Noguchi Keisuke, Ike Yoko, Yasui Nanami, Furugori Kazuki, Yamaguchi Yuki, Toyoda Atsushi, Suzuki Yutaka, Yamamoto Tatsuro, Saitoh Noriko, Sato Shigeo, Tomomori-Sato Chieri, Conaway Ronald C., Conaway Joan W., Takahashi Hidehisa	4. 巻 13
2. 論文標題 The 3 Pol II pausing at replication-dependent histone genes is regulated by Mediator through Cajal bodies' association with histone locus bodies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	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) 10.1038/s41467-022-30632-w	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 Ishikawa Kohei, Matsuoka Yuichiro, Shinohara Kosuke, Inoue Junki, Yano Hiromu, Eto Takafumi, Yamamoto Tatsuro, Yamana Keisuke, Gohara Shunsuke, Takeshita Hisashi, Hirayama Masatoshi, Kawahara Kenta, Hirose Akiyuki, Fukugawa Yoshiyuki, Yoshida Ryoji, Komohara Yoshihiro, Nakayama Hideki	4. 巻 -
2. 論文標題 Involvement of ferroptosis defensive xCT/GPX4 axis in radioresistance and its impacts on prognosis in oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Oral Science International	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) 10.1002/osi2.1227	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 Takeshita Hisashi, Yoshida Ryoji, Maeshiro Manabu, Yamamoto Tatsuro, Oyama Toru, Liu Rin, Ota Kazutoshi, Shinohara Masanori, Nakayama Hideki	4. 巻 -
2. 論文標題 True facial artery aneurysm of the submandibular region: A rare case report	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	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) 10.1016/j.ajoms.2024.04.002	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 山本達郎、福岡恵、斉藤典子	4. 巻 272
2. 論文標題 医学のあゆみ クロマチン高次構造	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医歯薬出版株式会社	6. 最初と最後の頁 23-29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 市川雄一, 山本達郎, 斉藤典子	4. 巻 52
2. 論文標題 非コード RNA による遺伝子発現制御	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 細胞 ニューサイエンス社	6. 最初と最後の頁 308-311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 山本達郎, 市川雄一, 斉藤典子	4. 巻 93
2. 論文標題 ノンコーディング RNA による 3 次元ゲノム構造の制御	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Japanese Biochemical Society	6. 最初と最後の頁 141-146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本達郎、Abdalla Mohamed Osama、前原一満、野上順平、大川恭行、三浦尚、Rawin Poonperm、平谷伊智朗、中尾光善、斉藤典子
2. 発表標題 Eleanor 非コードRNAを介したクロマチンドメインの活性化は治療耐性乳がんの増殖と細胞死に関わる
3. 学会等名 新学術領域研究 遺伝子制御の基盤となるクロマチンポテンシャル 第2回領域会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本達郎、中山秀樹、中尾光善、斉藤典子
2. 発表標題 乳がん細胞のエレノアクロマチンドメインは非コードRNAとクロマチン相互作用により制御される
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本達郎、Abdalla Mohamed Osama、前原一満、野上順平、大川恭行、三浦尚、Rawin Poonperm、平谷伊智朗、中尾光善、斉藤典子
2. 発表標題 Eleanor 非コードRNAは乳がんの増殖と細胞死のバランスに関わる遠距離クロマチン相互作用を制御する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本達郎、Abdalla Mohamed Osama、前原一満、大川恭行、三浦尚、平谷伊智朗、中尾光善、斉藤典子
2. 発表標題 Eleanor 非コード RNA を介したクロマチン相互作用は治療耐性乳がんの増殖 と細胞死に関わる
3. 学会等名 第37回染色体ワークショップ・第18回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 グリセオリン の作用機序とその利用	発明者 山本達郎、他	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/40052	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

ゲノムDNAの立体構造から見えた乳がん細胞の弱点 - 再発乳がんの治療に新たな道 - <a href="https://www.jfcr.or.jp/laboratory/news/6833.html">https://www.jfcr.or.jp/laboratory/news/6833.html</a>
---

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
---------	---------