

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293223

研究課題名 (和文) 乳がんにおけるエストロゲン受容体の転写制御機構・下流シグナル経路の解明と臨床応用

研究課題名 (英文) Elucidation of estrogen receptor-mediated transcription regulatory systems and downstream signaling pathways in breast cancer and clinical application to cancer management

研究代表者

堀江 公仁子 (HORIE, KUNIKO)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：90261982

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 12,900,000 円

研究成果の概要 (和文) : エストロゲン感受性およびホルモン治療的抵抗性モデル乳がん細胞を用いて、次世代シーケンス解析によりエストロゲン受容体結合領域近傍にてホルモン応答性発現を示す複数個の長鎖非コードRNAを同定した。これらの発現を抑制することにより、治療的抵抗性を含む乳がん細胞の増殖を抑制することを見出し、マウスにおける乳がん細胞移植実験において、長鎖非コードRNAを標的とするsiRNAにより腫瘍増殖が抑制された。機能的スクリーニングにより、ホルモン治療的抵抗性獲得にかかわる因子、またマイクロRNAとその標的遺伝子を複数個同定し、乳がん予後との相関性から診断・治療標的として臨床応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文) : Based on high-throughput sequencing using estrogen-sensitive and hormone therapy-refractory model breast cancer cells, we identified several long noncoding RNAs that are transcribed from the vicinity of estrogen receptor binding sites and exhibit estrogen-dependent expression. We found that the siRNA-mediated knockdown of these noncoding RNAs inhibited the growth of breast cancer cells including hormone therapy-refractory types and the growth of breast cancer cell-derived tumors inoculated in nude mice. Based on functional screenings, we identified several relevant factors and microRNAs together with their target genes, which have associations with prognosis of breast cancer patients. Those molecules could be clinically applied to diagnostic and therapeutic targets for breast cancer management.

研究分野：内分泌学、分子生物学、腫瘍学

キーワード：乳がん エストロゲン受容体 ホルモン治療抵抗性 長鎖非コードRNA マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

乳がんは診断時において大多数がエストロゲン受容体陽性であり、ホルモン療法の応答性にはエストロゲン受容体 α (ER α) の発現性が強く関連している。しかし、元々ER α 陽性であってもホルモン療法抵抗性乳がんが存在し、またホルモン療法応答性の乳がんの約半数においても耐性へと移行することが観察されている。研究代表者らは、ER α 標的遺伝子の一つであるEfp/TRIM25が強発現する乳がんにおいては、内因性エストロゲンが分泌されない環境においても腫瘍増殖することを明らかにし、乳がん臨床検体においてもEfpの強発現が予後不良因子となることを報告してきた。また、ER α 蛋白質自体のリン酸化シグナルもER α の転写制御機構において重要であることを報告してきた。ER α の共役因子であるSRC-3の過剰発現も、乳がんの増殖と浸潤性に深く関与することが報告されている。従って、乳がんにおけるER α の転写制御機構・下流シグナル経路の解明は、特にホルモン療法耐性に至る乳がんや転移性がんの病態を理解する上で必須で、臨床上的重要な課題である。

研究代表者らは、これまでエストロゲンおよびアンドロゲン標的遺伝子とその関連因子の同定と機能解析を行い、乳がんや前立腺がんなどのホルモン依存性がんの新規診断・治療法の開発に応用できることを示してきた。特に、エストロゲン受容体標的遺伝子としてEfp、EBAG9、COX7RP等を同定し、Efpは細胞周期チェックポイントである14-3-3 σ の蛋白分解に関わるユビキチンリガーゼであり乳がんの増悪因子であること、EBAG9は細胞性免疫監視からの回避により腫瘍増殖に関わる因子であることを示してきた。COX7RPは、ミトコンドリア酸化的リン酸化を行う呼吸鎖酵素群の超複合体形成を促進する因子であることを明らかにした。さらに、ER α や転写因子等のゲノム結合領域を明らかにする手法として、国内外にも先駆けてクロマチン免疫沈降(ChIP)法や次世代シーケンサーを活用したChIPシーケンスを施行し、これら転写因子の結合領域近傍に標的遺伝子を同定し、ホルモン依存性がんの増殖、悪性化、臨床的予後に関わる因子の機能を発見してきた。その1つとして、非コードRNA分子のCTBP1-ASを新たにホルモン受容体標的遺伝子として同定し、エピゲノム制御に作用することにより、前立腺がんの病態進展につながるメカニズムを明らかにした。また、ホルモン受容体結合領域における転写因子のモチーフ解析の結果から、他の転写因子結合配列の共存を予測し、OCT1をはじめとした、がんのホルモン応答性にかかわる転写因子の新たな機能についても明らかにしている。以上のような背景に基づき、本研究ではER α の転写制御メカニズム、下流応答シグナルを包括的に解析し、乳がんの予後予測などの診断への応用、ならびにホルモン療法耐性となり難治性に至る乳がんの病態に対する、新規治療標的への応用を目指すこ

とを目標とした。本研究により、ER α の下流シグナルの全貌の解明がより一層深化することに加え、治療抵抗性乳がんへの治療への応用に至る研究が進むことが期待され、ER α の転写調節機構に関わる因子、それらの相互作用を研究することで、ホルモン療法耐性乳がんにおけるER α の過敏性獲得へのメカニズム解明、およびそれを標的とした治療戦略を構築することが期待できると考えた。

2. 研究の目的

エストロゲン受容体 α (ER α) は、乳がんの増殖・進展を制御する転写因子として重要であり、ER α の発現性はホルモン療法応答性に深く関連する。本研究では、統合的ゲノム解析方法に基づき、乳がんにおいてER α の転写制御機構に共役する転写因子、およびホルモン療法耐性へ至る乳がんの病態において作用するER α 下流のシグナル経路を明らかにし、各経路において指令役を担う分子を同定してその機能を解明することを目的にした。体系的に同定されたER α 関連転写因子群とER α シグナル分子群の相互作用、およびER α 転写制御機構へのフィードバック作用について解析し、乳がんにおけるER α 転写ネットワークの解明を目指すものとした。さらに乳がん臨床サンプルを用いて、ER α 関連転写因子とER α シグナル分子を用いた新たな診断法の確立を目指し、かつホルモン療法耐性乳がんのマウスモデルを用いて分子標的治療への応用を目指すものとした。

3. 研究の方法

次世代シーケンス解析は、mRNA および長鎖非コードRNAの解析を目的としたRNAシーケンスと、マイクロRNAの解析を目的とした小分子RNAシーケンスを施行した。各種乳がん細胞および臨床浸潤性乳がん検体（所属先臨床部門のIRB承認下で文書による同意を得られた症例）から精製されたRNAを用いて、HiSeq2000 または HiSeq2500 (Illumina 社) のプラットフォームにより施行し、独自のパイプラインを用いて解析を行った。ホルモン治療的抵抗性モデル乳がん細胞としては、1) MCF7 細胞から抗エストロゲン薬である tamoxifen または hydroxy-tamoxifen (OHT)存在下での長期培養(>6ヶ月)により確立した TamR または OHTR 細胞、2) 長期エストロゲン欠乏状態の培養により得られた LTED 細胞、を研究代表者らが独自に確立し、本研究に使用した。

乳がんの診断・治療標的として注目される mRNA および長鎖非コード RNA に対する siRNA については、RNAi 社の独自の siRNA 配列設計システムを用いて設計を行い、それぞれの標的分子の発現抑制について定量的 PCR を用いて検討を行った上で、抑制効率が良好なものを選択して本研究に使用した。細胞動態については、細胞増殖性を WST-8 アッセイ、細胞周期およびアポトーシス誘導性を

FACS により検討した。ER α シグナル解析としてエストロゲン応答配列レポーター遺伝子を用いたルシフェラーゼアッセイ、ER α への結合性解析としてクロマチン免疫沈降法を施行した。

tamoxifen 感受性または耐性にかかわる機能的スクリーニングについては、System Biosciences 社の miRNA 前駆体レンチウイルスライブラリー、または Thermo Scientific 社のレンチウイルス shRNA ライブラリーを使用し、乳がん細胞に感染させた数日後、ウイルスベクターに含まれる GFP 蛋白質の発現性により、FACS を用いて感染効率を検討した。1 μ M の OHT または対照溶媒で 1 ヶ月培養し、細胞に取り込まれたウイルスベクターの骨格に対する PCR から、細胞内に取り込まれている miRNA または shRNA を抽出し、カスタマイクローアレイにより miRNA または shRNA の種類と発現量を検討した。

4. 研究成果

[エストロゲン応答性 RNA の同定]

エストロゲン感受性乳がん細胞 MCF7 および T47D を用いて、ER α のゲノム結合領域近傍にエストロゲン応答性に発現が増強する転写産物をストランド特異的な RNA シーケンス法を用いて体系的に同定した。このうち、蛋白質をコードしない長鎖非コード RNA に着目し、エストロゲン受容体の標的となりうる転写産物の同定を複数個行い、エストロゲン応答性について、細胞レベルで発現の検証を行った。これらの転写産物のうち、特に注目される RNA に対する発現抑制実験を行うため、各々に対する複数個の siRNA を独自に作製し、ホルモン感受性およびホルモン治療的抵抗性モデル乳がん細胞における細胞増殖や浸潤能、細胞周期等の影響を検討した。

これらの解析からエストロゲン応答性長鎖非コード RNA として注目される候補 RNA (BClnc-X, BClnc-Y) については、さらに臨床浸潤性乳がん検体における発現を RNA シーケンス法により解析し、乳がん臨床検体における病態的意義について検討を行った。これら候補 RNA に対する各数種類の siRNA のうち、細胞増殖を効果的に抑制する核酸製剤については、ヌードマウスにおけるホルモン治療的抵抗性モデル乳がん細胞の腫瘍形成への治療効果を検討し、注目するこれら RNA が乳がんの治療標的候補になりうることを見出した。エストロゲン感受性乳がんおよびホルモン治療的抵抗性乳がん細胞において、siRNA を用いてこれら候補 RNA の発現を抑制し、細胞動態を検討したところ、いずれも細胞周期の進行抑制およびアポトーシス誘導作用が認められ、候補 RNA ががん増殖に直接寄与する可能性が示唆された。また、候補 RNA の発現調節によるエストロゲン受容体シグナルの変化については、クロマチン免疫沈降やプロモーター活性試験、マイクローアレイ解析によって検討を行った。また、

BClnc-X については siRNA によりエストロゲンシグナルが抑制され、エストロゲン受容体 ER α を介する転写制御の調節に直接関与する可能性が示唆された。これら候補 RNA に結合する蛋白質について、質量分析により数種類の同定に成功しており、今後さらに乳がん病態における RNA 結合蛋白質の機能解析に結びつく研究シーズを見出している。

[乳がん細胞のホルモン治療抵抗性獲得にかかわる因子の同定]

乳がん細胞のホルモン治療抵抗性獲得にかかわる因子の同定に関しては、RNA と蛋白質の両面から解析を行った。RNA のうち、小分子のマイクロ RNA については、エストロゲン感受性乳がん細胞とホルモン治療的抵抗性モデル乳がん細胞 (TamR および LTED 細胞) における発現プロファイルを、次世代シーケンサーを用いた小分子 RNA シーケンス法により解析した。そこから、ホルモン治療抵抗性獲得に伴って発現低下するマイクロ RNA の 1 つとして miR-378a-3p を同定し、マイクロ RNA の標的遺伝子を同定する複数のアルゴリズムから候補標的遺伝子としてゴルジ体蛋白質 GOLT1A を同定した。臨床乳がん検体における定量的 PCR により、miR-378a-3p と GOLT1A の発現には逆相関の傾向が認められ、さらに臨床乳がんデータベースにより、miR-378a-3p の低発現および GOLT1A の高発現は予後不良に相関することが認められた。

また、マイクロ RNA ライブラリーを用いた機能的スクリーニングによって、OHT 長期存在下で、エストロゲン感受性乳がん細胞に取り込まれているマイクロ RNA のリストから脱落したマイクロ RNA を同定し、さらに OHT 耐性乳がん細胞と臨床乳がん検体においても発現低下しているマイクロ RNA として、miR-574-3p を同定した。このマイクロ RNA の候補標的遺伝子として複数のアルゴリズムから CLTC を同定し、CLTC mRNA の 3' 非翻訳領域に含まれる miR-574-3p 結合配列を組み込んだレポーター遺伝子によるルシフェラーゼアッセイで、実際にこのマイクロ RNA が CLTC を標的とすることが明らかになった。さらに miR-574-3p の発現調節により、乳がん細胞において CLTC の発現が逆相の変化をきたし、臨床乳がんデータベースによる予後との相関解析により、CLTC の高発現が乳がん症例群および tamoxifen 治療を行った乳がん症例群の予後不良と有意に相関することが明らかになった。

ホルモン治療抵抗性獲得にかかわる mRNA については、mRNA の発現抑制を目的とした shRNA ライブラリーをエストロゲン感受性細胞に導入し、抗エストロゲン薬である OHT の存在の有無で長期培養し、生き残った細胞に含まれる shRNA から、OHT 存在下で細胞が生存するために必要な mRNA を複数個同定した。臨床乳がんにおける生存曲

線解析データベースから、予後に関連する mRNA に絞込みを行い、そのうちの1つについては、蛋白分解機構のサブユニット遺伝子であることが同定され、がん増殖を調節する蛋白質に対する特異的な作用を含め、機能解析を進めている。

蛋白質については、特にエストロゲン受容体陽性乳がんにおいて、免疫組織科学的検討から、Efp と構造上の類似性がある蛋白質の予後予測因子を複数見出すことに成功した。これら因子の蛋白質レベルでのバイオマーカーとしての有用性を示すとともに、乳がんにおける機能解析を進めている。

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 5 件)

①Nagai S, Ikeda K, Horie-Inoue K, Shiba S, Nagasawa S, Takeda S, Inoue S. Estrogen modulates exercise endurance along with mitochondrial uncoupling protein 3 downregulation in skeletal muscle of female mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 480(4):758-764, 2016. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.129. 査読有.

②Obinata D, Takada S, Takayama K, Urano T, Ito A, Ashikari D, Fujiwara K, Yamada Y, Murata T, Kumagai J, Fujimura T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Homma Y, Takahashi S, Inoue S. Abhydrolase domain containing 2, an androgen target gene, promotes prostate cancer cell proliferation and migration. *Eur J Cancer*. 57:39-49, 2016. doi: 10.1016/j.ejca.2016.01.002. 査読有.

③Ikeda K, Horie-Inoue K, Ueno T, Suzuki T, Sato W, Shigekawa T, Osaki A, Saeki T, Berezikov E, Mano H, Inoue S. miR-378a-3p modulates tamoxifen sensitivity in breast cancer MCF-7 cells through targeting GOLT1A. *Sci Rep*. 5:13170, 2015. doi: 10.1038/srep13170. 査読有.

④Ujihira T, Ikeda K, Suzuki T, Yamaga R, Sato W, Horie-Inoue K, Shigekawa T, Osaki A, Saeki T, Okamoto K, Takeda S, Inoue S. MicroRNA-574-3p, identified by microRNA library-based functional screening, modulates tamoxifen response in breast cancer. *Sci Rep*. 5:7641, 2015. doi: 10.1038/srep07641. 査読有.

⑤Miyazaki T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Kondo T, Takahashi S, Inoue S. EBAG9 modulates host immune defense against tumor formation and metastasis by regulating cytotoxic activity of T lymphocytes. *Oncogenesis*. 3:e126, 2014. doi: 10.1038/oncsis.2014.40. 査読有.

〔学会発表〕(計 7 件)

①Horie K. Functional shRNA library screening and sequencing-based identification of coding and non-coding RNAs that associate with the biology of hormone refractory cancers. 第 39 回日本分子生物学会年会. 2016 年 12 月 2 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

②堀江公仁子、池田和博、井上聡. ホルモン依存性がんにおける長鎖非コード RNA の役割. 第 38 回日本分子生物学会年会. 2015 年 12 月 2 日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

③Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S. A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly facilitates breast tumor growth in hypoxia. EMBO Meeting, Nuclear receptors: From molecules to humans. 2015 年 9 月 24 日～2015 年 9 月 28 日 アジャクシオ(コルシカ島、フランス)

④Horie-Inoue K, Ikeda K, Inoue S. Integrated analysis identified estrogen-dependent FOXP1 actions on G protein-coupled receptor signaling in breast cancer cells. FASEB Science Research Conferences. Molecular and Systems Integration of Genomic and Nongenomic Steroid Hormone Action. 2015 年 8 月 9 日～2015 年 8 月 14 日 Big Sky Resorts (モンタナ州、米国)

⑤堀江公仁子、井上聡. ホルモン応答性長鎖非コード RNA の同定・機能の解明と抗加齢医学への応用. 第 15 回日本抗加齢医学会総会. 2015 年 5 月 30 日 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

⑥ Horie-Inoue K, Ikeda K, Inoue S. Gene regulatory networks mediated by estrogen receptor and forkhead transcription factors in breast cancer. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Systems Biology: Networks. 2015 年 3 月 17 日～2015 年 3 月 21 日 Cold Spring Harbor Laboratory (ニューヨーク州、米国)

⑦堀江公仁子、池田和博、井上聡. 乳がんの病態進行にかかわるアンチセンス長鎖非コード RNA の同定と機能解析. 第 22 回日本ステロイドホルモン学会学術集会. 2014 年 11 月 3 日 都道府県会館 (東京都千代田区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

①名称: 二本鎖核酸分子、DNA、ベクター、癌細胞増殖抑制剤、及び医薬
発明者: 井上聡、池田和博、堀江公仁子

権利者：学校法人埼玉医科大学
種類：特許
番号：PCT/JP2015/067054
出願年月日：2015年6月12日
国内外の別：外国

②名称：二本鎖核酸分子、DNA、ベクター、
癌細胞増殖抑制剤、及び医薬
発明者：井上聡、池田和博、堀江公仁子
権利者：学校法人埼玉医科大学
種類：特許
番号：特願 2014-122067
出願年月日：2014年6月13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
埼玉医科大学ゲノム医学研究センター遺伝
子情報制御部門
http://www.saitama-med.ac.jp/genome/Div02_GRST/index.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

堀江 公仁子 (HORIE KUNIKO)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：90261982

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

井上 聡 (INOUE SATOSHI)
埼玉医科大学・医学部・客員教授
研究者番号：40251251

(4)研究協力者

()