

令和元年6月14日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04744

研究課題名(和文) 再発乳がんにおいて非コードRNAが形成する活性染色体ドメインの解明

研究課題名(英文) The active chromatin domain that is regulated by the non-coding RNAs in recurrent breast cancer

研究代表者

斉藤 典子 (Saitoh, Noriko)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 がん生物部・部長

研究者番号：40398235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：乳がんのおよそ70%はエストロゲン受容体(ER)を発現するER陽性型で、その増殖は女性ホルモンであるエストロゲンに依存する。よって抗エストロゲン剤を用いた治療が効果的である。しかし治療が長期にわたると、高い頻度で難治性再発乳がんとなることが大きな問題である。本研究では、再発乳がんのモデル細胞系を用いて、タンパク質に翻訳されない非コードRNAエレノアが、ERをコードする遺伝子ESR1の遺伝子の制御を巨大クロマチンドメインの形成を介して行う新しい分子機序を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子の発現制御はほぼ全ての生命現象に重要で、その異常はがんを含む疾患に深く関わる。本研究成果では、乳がん重要なESR1遺伝子の発現が非コードRNAエレノアによるクロマチンドメインの制御を介して行われるという、学術的に新しい知見を得られた。また、非コードRNAを標的とする再発乳がんの診断や治療への道筋をつける成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Approximately 70% of breast cancers is estrogen receptor (ER)-positive, which highly express the ER protein. The endocrine therapy that inhibits estrogenic action is effective for this type of breast cancer, however, the cancer acquires the therapy resistance after long term of the treatment, resulting in recurrence. In this study, using the endocrine-therapy resistant breast cancer cell model, I have revealed a molecular mechanism underlying the overexpression of ESR1, the gene for ER during the acquisition of the therapy resistance. I found that the non-coding RNAs, Eleanors regulate the mega-base chromatin domain and expression of the multiple genes involving breast cancer including ESR1.

研究分野：分子細胞生物学、がん生物学

キーワード：非コードRNA クロマチン 細胞核 乳がん

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトゲノムのうち、タンパク質をコードする領域は 2% にすぎない一方、75% 以上が転写され、膨大な種類の非コード RNA が産出されていることが明らかとなった。また、多くの非コード RNA が組織の種類や分化段階、疾患に特異的に発現していることから、非コード RNA が生体にとって重要な制御因子であると推察されている。

(2) 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、そのがん細胞の増殖には女性ホルモンである

エストロゲンが必要である。よって、エストロゲン作用を阻害する内分泌療法が効果的に使われる。しかし、長期治療中に高い頻度で再発することが大きな問題である。この治療効果を失った再発乳がんのモデル細胞 LTED (Long Term Estrogen Deprivation) 細胞は、ヒト乳がん細胞 MCF7 を、エストロゲンを長期枯渇した状態で培養して樹立することができる (図 1)。

(3) LTED 細胞では ER が過剰発現しており、それにより、わずかな量のエストロゲンにตอบสนองして増殖できると推察されている。また、我々の過去の研究により、LTED 細胞においては、非コード RNA エレノアが高発現し核内に繫留され、塊 (RNA クラウド) を形成していることが明らかにされていた (引用文献)。エレノアは、ER をコードする *ESR1* 遺伝子座とその上流 3 遺伝子を含む 0.7 Mb の染色体ドメイン内の非コード領域より転写される多種の RNA の総称である。エレノアは ER 陽性乳がん患者由来の組織細胞にも存在することが認められている。また、siRNA を用いてノックダウンすると LTED 細胞の増殖が抑制されることから、エレノアは再発乳がんに重要であり、診断や治療の標的となることが示唆されていた。しかし、エレノア非コード RNA がどのように遺伝子の発現に関わるか、そのメカニズムは理解されていない。

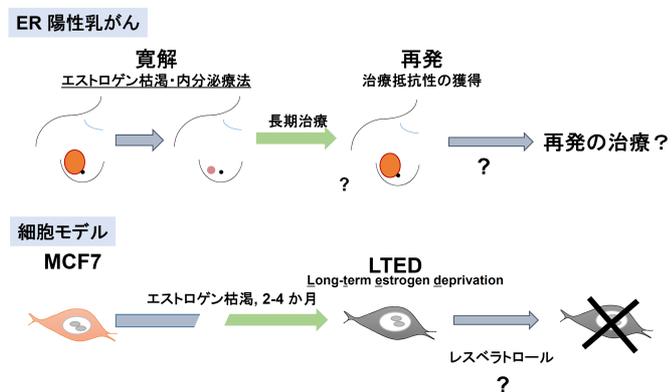


図 1: 乳がんの内分泌療法抵抗性獲得とその細胞モデル  
ヒト乳がん由来 MCF7 細胞を、エストロゲン枯渇下で長期培養することで、再発乳がんモデル LTED 細胞が樹立される

## 2. 研究の目的

本研究では、「エレノア RNA は、Mb 単位の巨大な活性染色体ドメインの形成に関わり、治療環境下のがん細胞の増殖を促進する。」というモデルを作業仮説とした。細胞核内の非コード RNA を介した新しいタイプの転写活性化のメカニズムを深く追求することを目的とした。また、エレノアを阻害する小分子化合物の作用機序を理解することにより、再発難治性がんの病態解明、創薬に道筋をつけることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) エレノアが応答する薬剤の探索と応答メカニズムの解析

エレノア RNA クラウドの形成に作用する薬剤についてその作用様式を調べた。

### (2) エレノアが転写されるクロマチンの 3 次元構造の解析

エレノアが転写される 0.7Mb のクロマチン領域について、C-テクノロジー (Chromosome

Conformation Capture)法などを用いて、核内の3次元構造について解析を行った。

### (3) エレノアクロマチドメイン内の遺伝子の発現調節の解析

エレノアが転写される0.7Mbのゲノム領域内にはESR1遺伝子を含む4つの遺伝子が含まれている。これらの遺伝子の発現調節にエレノアがどのように関わるかをsiRNAとqPCR、FISH法を用いて解析した。

## 4. 研究成果

### (1) エストロゲンとレスベラトロールによるエレノアとLTED細胞の阻害

ポリフェノール的一种で、ヒストン脱アセチル化酵素の活性剤でもあるレスベラトロールは、エレノアを阻害することが既に示されていた。そこで、5-Azacytidin, TSA (Tryptostatin A), JQ1などのエピゲノム試薬、およびエストロゲンとエストロゲンモジュレータであるICI182,780などについて、エレノアの形成、増殖への影響を指標にして、LTED細胞とMCF細胞においてその活性を調べた。その結果、エストロゲンおよびその構造類似体がエレノアの形成をLTED細胞にて阻害し、増殖も阻害することがわかった。これは、内分泌療法に抵抗性を獲得した再発乳がん患者にエストロゲンを投与することにより寛解する、エストロゲン療法を再現している可能性が示唆された。さらに、ESR1 mRNAの転写活性も効果的に阻害されることを明らかにした(引用文献)。

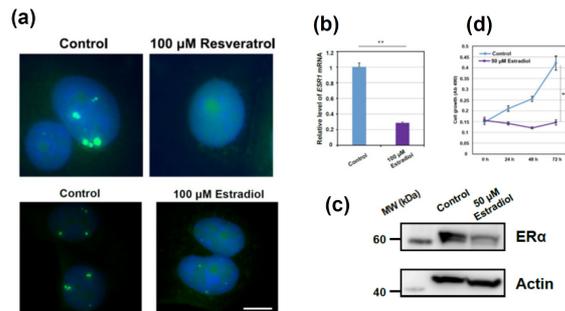


図2:エストロゲンによるLTED細胞の阻害  
エストロゲンによりエレノアクラウド(a)、ESR1 mRNAの転写(b)、ERタンパク質の生産(c)が阻害され、LTED細胞の増殖が抑制された(d)。これは、長い間不明であった再発乳がん患者に対する「エストロゲン療法」の機序を示唆する。

エストロゲンおよびその構造類似体がエレノアの形成をLTED細胞にて阻害し、増殖も阻害することがわかった。これは、内分泌療法に抵抗性を獲得した再発乳がん患者にエストロゲンを投与することにより寛解する、エストロゲン療法を再現している可能性が示唆された。さらに、ESR1 mRNAの転写活性も効果的に阻害されることを明らかにした(引用文献)。

### (2) エレノアが転写されるクロマチンの3次元構造の解析

C-テクノロジー(Chromosome Conformation Capture)は、細胞核内で物理的に近傍にあるゲノム領域を同定する手法である。細胞核をホルマリンで固定して制限酵素でDNAを切断し、その後ライゲーション反応を行う。2次元ゲノム上では遠方にコードされていても核内での3次元構造により近傍にある領域どうしが融合され、そこを高速シーケンサーで同定する。

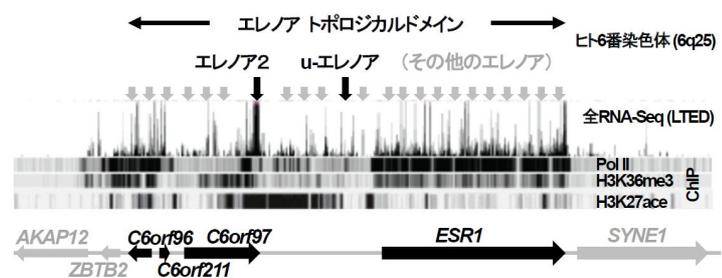


図3:C-テクノロジーにより明らかになったエレノアTAD  
4C-Seqによりエレノアを発現する染色体6q25上に0.7Mbの巨大クロマチドメインであるトポロジカルドメイン(TAD)が形成されていることが明らかになった。

本研究では、ESR1遺伝子のプロモーター領域を「ベイト」としてそこに相互作用するゲノム領域を4C-Seqにより同定した。その結果、ESR1遺伝子座に高頻度に相互作用する部位と、エレノアが転写される部位が一致した。この領域は、公開されている複数のHi-C手法(核内のゲノム間相互作用をゲノムワイドに検出する方法)で明らかにされたTAD(トポロジカルドメイ

ン)に相当するものであることがわかり、エレノア TAD とした(図3)。非コード RNA が Mb 単位の巨大ドメインを規定していることや、その全体の転写活性化に関わる可能性が示唆された。

### (3) エレノアによる TAD 内の遺伝子クラスターの協調発現

エレノアが転写される 0.7 Mb のゲノム領域内には *C6orf96*、*C6orf211*、*C6orf97*、*ESR1* の 4 つの遺伝子が含まれている(図3)。ESR1をはじめこれらはいずれも乳がんに関連することが報告されている。本研究ではまず qRT-PCR により、これらの遺伝子群が MCF7 細胞内での転写に比べ LTED 細胞内にて協調的に活性化していることを見出した。さらにこれらの遺伝子の発現調節にエレノアが関わるかを調べるために、LTED 細胞にて LNA(locked nucleic acid)によりエレノアをロックダウンした後に転写を調べた。その結果、エレノア TAD 内の全ての遺伝子の転写が阻害された一方で、エレノア TAD 外の近隣遺伝子の転写には影響がなかった。また、エレノアを阻害するエストロゲンおよびレスベラトロール処理においても同様の結果を得た。これらの結果から、エレノアは 0.7 Mb の巨大ドメインの全体の転写活性化に関わるという、新しいタイプの転写制御機構を見出した。

### 引用文献

Tomita, S. et al. A cluster of noncoding RNAs activates the ESR1 locus during breast cancer adaptation. Nat. Commun 6: Article No. 6966, 2015. doi: 10.1038/ncomms7966.

Yamamoto, T. et al. Endocrine therapy-resistant breast cancer model cells are inhibited by soybean glyceollin I through Eleanor non-coding RNA. Sci. Rep 8:15202, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-33227-y

### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

\*: corresponding author

1. Yamamoto T, Saitoh N. Non-coding RNAs and chromatin domains. Curr Opin Cell Biol. 58:26-33, 2019. doi: 10.1016/j.ceb.2018.12.005.
2. Yamamoto, T., Sakamoto1,C., Tachiwana, H., Kumabe, M., Matsui, T., Yamashita, T., Shinagawa, M., Ochiai, K., Saitoh, N.\*, Nakao, M. Endocrine therapy-resistant breast cancer model cells are inhibited by soybean glyceollin I through Eleanor non-coding RNA. Sci. Rep 8:15202, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-33227-y
3. Ichikawa, Y., Saitoh, N., Kaufman, P.D. An asymmetric centromeric nucleosome. eLife, 7, 2018. pii: e37911. doi: 10.7554/eLife.37911
4. Wang, X., Liang, S., Sun, Y., Li, H., Endo, F., Nakao, M., Saitoh, N. \* and Wu, L. Analysis of estrogen receptor beta gene methylation in autistic males in a Chinese Han population. Metab Brain Dis 32, 1033-1042, 2017. doi: 10.1007/s11011-017-9990-7
5. Tanaka H, Takebayashi SI, Sakamoto A, Igata T, Nakatsu Y, Saitoh N., Hino S and Nakao, M. \* The SETD8/PR-Set7 Methyltransferase Functions as a Barrier to Prevent Senescence-Associated Metabolic Remodeling. Cell Rep, 18:2148-2161, 2017. doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.021.
6. Tomita, S., Abdalla, M. O. A., Fujiwara, S., Yamamoto, T., Iwase, H., Nakao, M., Saitoh,

N.\* Roles of long non-coding RNAs in chromosome domains. Wiley Interdisciplinary Review RNA, 2016 doi: 10.1002/wrna.1384.

7. Nakayama, T., Saitoh, N., Morotomi-Yano, K., Yano, K.I., Nakao, M, Saitoh, H. Nuclear extrusion precedes discharge of genomic DNA fibers during tunicamycin-induced neutrophil extracellular trap-osis (NETosis)-like cell death in cultured human leukemia cells. Cell Biol Int, 40(5):597-602, 2016. doi: 10.1002/cbin.10594.
8. Matsumoto, A., Sakamoto, C., Matsumori, H., Katahira, J., Yasuda, Y., Yoshidome, K., Tsujimoto, M., Goldberg, I. G., Matsuura, N., Nakao, M., Saitoh, N.\*, Hieda, M. Loss of the integral nuclear envelope protein SUN1 induces alteration of nucleoli, Nucleus, 7: 68-83, 2016. doi: 10.1080/19491034.2016.1149664.

〔学会発表〕(計 28 件)

1. Saitoh, N. Nuclear non-coding RNAs Eleanors, define the active ESR1 chromatin domain in breast cancer cells. Cold Spring Harbor Conferences Asia, RNA Biology. October 30, 2018. Dashu Lake Conference Hotel, Suzhou, China.
2. Saitoh, N. Chromatin regulation by nuclear non-coding RNA in breast cancer cells. (第 10 回 HiHA 国際ワークショップ –染色体動態、分配と機能の理解に向かって。 October 10, 2018, 広島大学、東広島市)
3. Yamamoto, T., Abdalla, M.O., Fujiwara, S., Tomita, S., Nakao, M., Saitoh, N. Non-coding RNAs involved in active chromatin domain in breast cancer. (HMGU-Japan Epigenetics and Chromatin Symposium, September 5, 2017. Helmholtz Zentrum München, Großhadern, Germany)
4. Saitoh, N. Eleanor non-coding RNA defines the active ESR1 chromatin domain in breast cancer recurrence. (43rd Naito Conference on “Noncoding RNA: Biology, Disease, & Chemistry”) June 29, 2017, CHÂTERAISÉ Gateaux Kingdom SAPPORO, Hokkaido, Japan
5. Yamamoto, T., Abdalla, MO. Fujiwara, S., Tomita, S., Nakao, M., and Saitoh, N. A cluster of non-coding RNAs, Eleanors determine the active chromatin domain in breast cancer. (4D Nucleome: The Cell Nucleus in Space and Time, May 15, 2017, Jagiellonian University, Auditorium Maximum Conference Center, Kraków, Poland

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

発明の名称：グリセオリン I の作用機序とその利用

発明者：山本達郎、立和名博昭、斎藤典子、井出剛、落合孝次

権利者：公益財団法人がん研究会、大豆エナジー株式会社

種類：特許

番号：特願 2018-192177

出願年：2018 年

国内外の別：国内

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

[https://www.jfcr.or.jp/laboratory/department/cancer\\_biology/index.html](https://www.jfcr.or.jp/laboratory/department/cancer_biology/index.html)

6．研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：山本達郎、坂本智代美、立和名博昭

ローマ字氏名：( YAMAMOTO, tatsuro, SAKAMOTO, chiyomi, TACHIWANA, hiroaki )

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。