

令和 2 年 4 月 20 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19479

研究課題名(和文) エレノアRNAを指標とする治療耐性乳がんのエストロゲン誘導細胞死の応用

研究課題名(英文) Application of estrogen induced apoptosis in endocrine therapy-resistant breast cancer using Eleanor RNAs as an indicator

研究代表者

中尾 光善 (NAKAO, Mitsuyoshi)

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号：00217663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：女性の部位別の第1位である乳がんの約70%はエストロゲン受容体ER陽性で、エストロゲンに依存して増殖する。エストロゲンを阻害するホルモン療法が有効であるが、治療抵抗性を獲得して再発することが課題である。その要因として、ERをコードするESR1遺伝子座から長鎖非コードRNA群(エレノア)が発現誘導されて、同遺伝子座が活性化することを見出した。本研究では、乳がんのホルモン療法耐性の分子病態に基づいて、エレノアRNA群を指標とするエストロゲン誘導細胞死の応用基盤を確立することを目的とした。ホルモン療法耐性モデル細胞にERリガンドで細胞死を誘導するという逆転の発想の有効性について検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

女性の乳がん、男性の前立腺がんなどのホルモン依存性がんの罹患率は近年、持続的に増加傾向にある。本研究は、がんのホルモン療法抵抗性に共通する分子機序、さらに診断・評価法および治療・制御法の開発につながる学術的・社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Approximately 70% of breast cancer, which is the frequent cancer in female, is estrogen receptor (ER) positive and grows in an estrogen-dependent manner. Hormone therapy that inhibits estrogen is effective, but the problem is to acquire the therapy resistance and subsequent relapse. We have found that the ESR1 gene encoding ER is highly expressed by inducing the long noncoding RNAs (named Eleanors) from the ESR1 locus in therapy-resistant breast cancer. The purpose of this study is to establish a new application platform for the estrogen-induced apoptosis using the Eleanor RNAs as an indicator, based on the molecular mechanisms of hormone therapy resistance in breast cancer. We demonstrated that apoptosis induced by ER ligands is effective as a new therapeutic strategy in hormone therapy-resistant breast cancer.

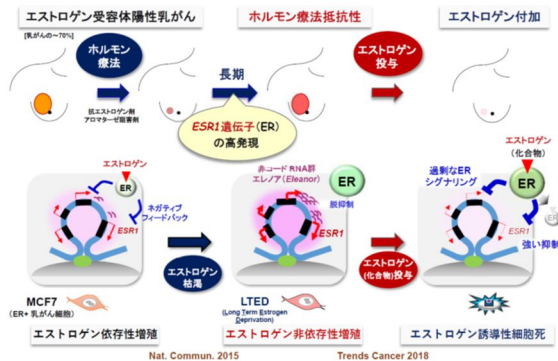
研究分野：エビジェネティクス

キーワード：乳がん エピゲノム 非コードRNA エストロゲン エストロゲン受容体 細胞死

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

女性の部位別がんの第1位である乳がんでは、その約70%がエストロゲン受容体(ER)陽性で、エストロゲンに依存して増殖する。このため、エストロゲンを阻害するホルモン療法(内分泌療法)が有効であるが、その後に治療抵抗性を獲得して再発することが課題である。この要因として、ERをコードする*ESR1*遺伝子が高発現することが多いが、その機序は不明である。これまで我々は、治療耐性乳がんにおいて、*ESR1*遺伝子座から新規の長鎖非コードRNA群(エレノアと名付けた)が発現誘導されて、同遺伝子座全体が転写活性化することを見出した。また、エストロゲンおよびレスベラトロールが、エレノアRNA群と*ESR1*遺伝子の発現を抑制して、細胞死を誘導することを見出した。



## 2. 研究の目的

本研究では、乳がんのホルモン療法耐性におけるエピジェネティックな分子病態に基づいて、エレノアRNA群を指標とするエストロゲン誘導細胞死の応用基盤を新たに確立することを目的とした。ER高発現でエストロゲン枯渇に適応した細胞にERリガンドを投与して細胞死を誘導するという逆転の発想が新規の治療法として有効である可能性を検証した。女性の乳がん、男性の前立腺がんなどのホルモン感受性がんの罹患は、近年、増加傾向が続いている。本研究は、がんのホルモン療法抵抗性に共通する分子機序、さらに診断・評価法および治療・制御法の開発につながる学術的・社会的意義がある。

## 3. 研究の方法

ER陽性乳がん細胞株(MCF7)をエストロゲン枯渇下で4ヶ月以上培養して増殖能を再獲得したホルモン療法抵抗性モデル系(LTED: long term estrogen deprivation)を用いて、エレノアRNAが*ESR1*遺伝子座の転写活性化、エピゲノム修飾、高次クロマチン構造の形成に働くメカニズムを分子レベルで明らかにし、エストロゲン誘導性細胞死の詳しい解析を行った。

### (1) LTED細胞における遺伝子発現とエピゲノム解析:

網羅的なRNAシーケンス解析の結果、エレノアRNA群は*ESR1*遺伝子を含む約700-kbのゲノム領域から発現し、他に3つの遺伝子(タンパク質をコードする)が含まれていた。これらの遺伝子群の発現は共制御を受けることから、ホルモン療法耐性化に関わる可能性が高く、定量RT-PCR、ウエスタンブロットや免疫染色で解析を行った。また、染色体コンフォーメーション捕捉法(4C)、クロマチン免疫沈降法(ChIP-qPCR)、ChIP-Seq法などで検討した。

### (2) エレノアRNA阻害がLTED細胞に及ぼす効果とその機序:

FISH法で調べると、LTED細胞の核内でエレノアRNA群は*ESR1*遺伝子座を取り囲むように貯留していた(RNAクラウド)。ESR1遺伝子のエンハンサー由来エレノアRNA(u-エレノア)およびプロモーター由来エレノアRNA(p-エレノア)を特異的なRNA干渉法で阻害して、エレノアRNA全体及び*ESR1*mRNAの発現、細胞増殖などに関する機能解析を行った。

### (3) エレノアRNAを用いた治療抵抗性・再発乳がんの診断・治療開発:

LTED細胞の誘導過程では、エレノアRNA群の発現は*ESR1*遺伝子の高発現よりも先行することが分かり、エレノアRNAの発現が重要視される。ER陽性乳がん組織の約80%程度にFISH法でエレノアRNA群の貯留を検出するため、エレノアRNAを指標とする治療抵抗性乳がんの評

価技術の開発を目指した。

#### (4) エストロゲンまたはエストロゲン様化合物が LTED 細胞に及ぼす効果とその機序：

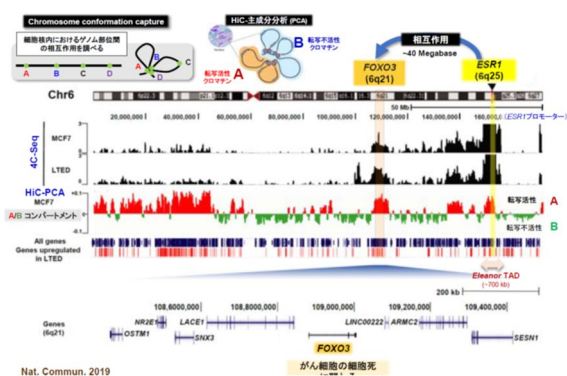
LTED 細胞をレスベラトロールで処理すると、エレノア RNA 群及び *ESR1* mRNA の発現が低下して、細胞増殖が停止し細胞死を誘導することが分かった。この効果には ER タンパク質が必要であることから、エストロゲン枯渇に対して ER を高発現する乳がん細胞に ER リガンドを作用させると、過剰なシグナルが働いて細胞死を起こすと考えられる (エストロゲン誘導細胞死)。エストロゲン様作用をもつ化合物を用いて、LTED 細胞の細胞死誘導を確認し、LTED 細胞の抑制効果をもつ化合物を検討した。

### 4. 研究成果

本研究により、エレノア RNA を用いた治療抵抗性・再発乳がんの診断・治療開発、エストロゲンによる細胞死誘導という治療的応用につながる成果を得た。エストロゲン誘導細胞死の臨床応用を目指している Cancer navigation strategy を国際的に提唱した。

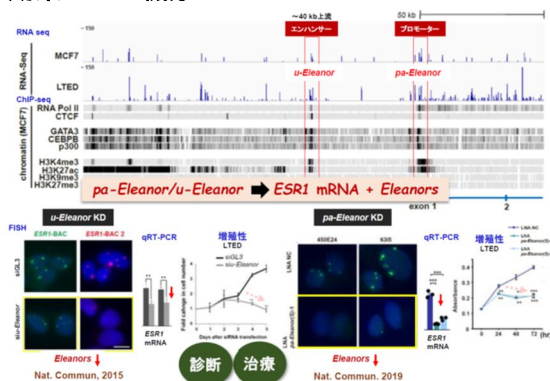
#### (1) LTED 細胞における遺伝子発現とエピゲノム解析：

網羅的な RNA シーケンス解析の結果、*ESR1* 遺伝子座では *ESR1* とその近傍の他 3 つの遺伝子群、エレノア RNA 群の発現が共制御されることが明らかになった。染色体コンフォメーション捕捉法 (4C) を用いて、*ESR1* 遺伝子プロモーターと相互作用するゲノム領域を同定したところ、同じヒト 6 番染色体上で約 40Mb 離れた *FOXO3* 遺伝子座が同定された。興味深いことに、*ESR1* 遺伝子 (細胞増殖に関連する) と *FOXO3* 遺伝子 (細胞死に関連する) は LTED 細胞でともに高発現していた。このエピゲノム機構は、ホルモン療法耐性化及び耐性化細胞の特性に関わる可能性が高いと考えられた。



#### (2) エレノア RNA 阻害が LTED 細胞に及ぼす効果とその機序：

*ESR1* 遺伝子のエンハンサー由来エレノア RNA (u-エレノア) 又はプロモーター由来エレノア RNA (p-エレノア) を特異的な RNA 干渉法で阻害すると、いずれも、エレノア RNA 全体及び *ESR1* mRNA の発現が低下して、細胞増殖が停止することが判明した。エレノア RNA の中で、この 2 つは *ESR1* 遺伝子座全体の発現制御を担う、特別な機能をもつと考えられた。

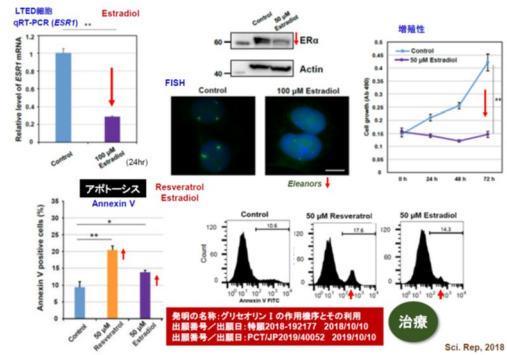


#### (3) エレノア RNA を用いた治療抵抗性・再発乳がんの診断・治療開発：

FISH 法で調べると、LTED 細胞の核内でエレノア RNA 群は *ESR1* 遺伝子座を取り囲むように貯留していた (RNA クラウド)。ER 陽性乳がん組織の約 80% 程度に FISH 法でエレノア RNA の貯留を検出するため、FISH 法によるエレノア RNA 検出は治療抵抗性乳がんの評価に有効であると考えられる。近年、細胞外小胞 (extracellular vesicle: EV) に含まれて分泌される RNA 分子が判明したことから、EV 中のエレノア RNA の有無などの検討は診断法開発 (血液中の EV 測定) において注目することができる。

#### (4) エストロゲンまたはエストロゲン様化合物が LTED 細胞に及ぼす効果とその機序：

LTED 細胞をエストロゲン又はレスベラトロールで処理すると、エレノア RNA 群及び *ESR1* mRNA の発現が低下して、細胞増殖が停止し細胞死を誘導することが判明した。これは、エストロゲン枯渇に対して ER を高発現する乳がん細胞に ER リガンドを作用させると、過剰な ER シグナルが働いて細胞死を引き起こすと考えられる(エストロゲン誘導細胞死)。エストロゲン、レスベラトロールに次いで、グリセオリン I がエストロゲン誘導細胞死を引き起こすことを報告した。また、エストロゲン誘導細胞死の臨床応用を目指して Cancer navigation strategy を新たに提案した。



### <引用文献>

- S. Tomita, M.O. Abdalla, S. Fujiwara, H. Matsumori, K. Maehara, Y. Ohkawa, H. Iwase, N. Saitoh, and M. Nakao. A cluster of non-coding RNAs activates the *ESR1* locus during breast cancer adaptation to hormone deprivation. **Nat. Commun.** 6: 6966, 2015.
- T. Yamamoto, C. Sakamoto, H. Tachiwana, M. Kumabe, T. Matsui, T. Yamashita, M. Shinagawa, K. Ochiai, N. Saitoh, and M. Nakao. Endocrine therapy-resistant breast cancer model cells are inhibited by soybean glyceollin I through *Eleanor* non-coding RNA. **Sci. Rep.** 8: 15202, 2018.
- M. Nakao, S. Fujiwara, and H. Iwase. Cancer navigation strategy for endocrine therapy-resistant breast tumors. **Trends Cancer** 4: 404-407, 2018.
- M.O. Abdalla, T. Yamamoto, K. Maehara, J. Nogami, Y. Ohkawa, H. Miura, R. Poonperm, I. Hiratani, H. Nakayama, M. Nakao, and N. Saitoh. The *Eleanor* ncRNAs activate the topological domain of the *ESR1* locus to balance against apoptosis. **Nat. Commun.** 10: 3778, 2019.
- 藤原沙織、中尾光善 .乳癌のエピゲノム異常と診断・治療への応用、がん不均一性を理解し、治療抵抗性に挑む、実験医学別冊、羊土社、36: 148-153, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 M.O. Abdalla, T. Yamamoto, K. Maehara, J. Nogami, Y. Ohkawa, H. Miura, R. Poonperm, I. Hiratani, H. Nakayama, M. Nakao, and N. Saitoh.	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 Nat. Commun.	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 該当する
1. 著者名 R. Fujita, T. Yamamoto, Y. Arimura, S. Fujiwara, H. Tachiwana, Y. Ichikawa, Y. Sakata, L. Yang, R. Maruyama, M. Hamada, M. Nakao, N. Saitoh, and H. Kurumizaka.	4. 巻 3
2. 論文標題 Nucleosome destabilization by nuclear-RNAs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Commun. Biol.	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 Y. Yasuda, K. Tokunaga, T. Koga, C. Sakamoto, I.G. Goldberg, N. Saitoh, and M. Nakao.	4. 巻 9
2. 論文標題 Computational analysis of morphological and molecular features in gastric cancer tissues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Med.	6. 最初と最後の頁 2223-2234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.2885	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 該当する
1. 著者名 M. Nakao, K. Anan, H. Araki, and S. Hino.	4. 巻 30
2. 論文標題 Distinct roles of NAD <sup>+</sup> -Sirt1 and FAD-LSD1 pathways in metabolic response and tissue development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trends Endocrinol. Metab.	6. 最初と最後の頁 409-412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tem.2019.04.010	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 Yamamoto Tatsuro, Sakamoto Chiyomi, Tachiwana Hiroaki, Kumabe Mitsuru, Matsui Toshiro, Yamashita Tadatashi, Shinagawa Masatoshi, Ochiai Koji, Saitoh Noriko, Nakao Mitsuyoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Endocrine therapy-resistant breast cancer model cells are inhibited by soybean glyceollin I through Eleanor non-coding RNA	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-33227-y	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 Nakao Mitsuyoshi, Fujiwara Saori, Iwase Hirotaka	4. 巻 4
2. 論文標題 Cancer Navigation Strategy for Endocrine Therapy-Resistant Breast Tumors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Trends in Cancer	6. 最初と最後の頁 404 ~ 407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.trecan.2018.04.005	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 Takase Ryuta, Hino Shinjiro, Nagaoka Katsuya, Anan Kotaro, Kohroggi Kensaku, Araki Hirotaka, Hino Yuko, Sakamoto Akihisa, Nicholson Thomas B., Chen Taiping, Nakao Mitsuyoshi	4. 巻 33
2. 論文標題 Lysine-specific demethylase-2 is distinctively involved in brown and beige adipogenic differentiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 5300 ~ 5311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201801422RR	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 該当する

1. 著者名 Anan Kotaro, Hino Shinjiro, Shimizu Noriaki, Sakamoto Akihisa, Nagaoka Katsuya, Takase Ryuta, Kohroggi Kensaku, Araki Hirotaka, Hino Yuko, Usuki Shingo, Oki Shinya, Tanaka Hirotoshi, Nakamura Kimitoshi, Endo Fumio, Nakao Mitsuyoshi	4. 巻 46
2. 論文標題 LSD1 mediates metabolic reprogramming by glucocorticoids during myogenic differentiation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 5441 ~ 5454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gky234	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 10件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 中尾光善
2. 発表標題 乳がんのホルモン療法抵抗性の機序と治療ストラテジー
3. 学会等名 第27回日本乳癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Yamamoto, M.O.A. Abdalla, K. Maehara, J. Nogami, Y. Ohkawa, H. Miura, R. Poonperm, I. Hiratani, H. Nakayama, and M. Nakao, and N. Saitoh
2. 発表標題 Eleanor non-coding RNAs balance between cell proliferation and death, through the long-range chromatin interaction in breast cancer
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（ワークショップ：On the interplay between nuclear organization and the flow of genetic information）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Koga, F. Sasaki, T. Yokomizo, and M. Nakao.
2. 発表標題 Regulation of monocytic cell subset by lipid mediator and epigenetics
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（シンポジウム：エピゲノム制御による表現型バリエーションの分子基盤）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中尾光善
2. 発表標題 エピゲノム制御の分子基盤とその病態に関する遺伝医学研究
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第64回大会（日本人類遺伝学会賞講演）（招待講演）
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 中尾光善
2. 発表標題 栄養環境にตอบสนองするエピゲノム機構と表現型制御
3. 学会等名 第34回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中尾光善
2. 発表標題 エピジェネティクスゲノミクス研究における最近の進歩
3. 学会等名 第19回日本分子脳神経外科学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Nakao
2. 発表標題 The role of LSD1 family proteins in energy metabolism and pathophysiology
3. 学会等名 International Symposium on Epigenome 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Nakao
2. 発表標題 Cancer navigation strategy in endocrine therapy-resistant breast cancer
3. 学会等名 The 34th International Kumamoto Medical Bioscience Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 M. Nakao
2. 発表標題 Epigenetic remodeling of energy metabolism and cancer
3. 学会等名 Special Seminar in Khon Kaen University (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 中尾光善	4. 発行年 2019年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 301
3. 書名 早産児, 低出生体重児の成長と発達のみかた - 出生からAYA世代まで -	

1. 著者名 阿南浩太郎、中尾光善	4. 発行年 2019年
2. 出版社 メディカル・ドゥ	5. 総ページ数 304
3. 書名 遺伝子医学MOOK別冊 (最新遺伝医学研究と遺伝カウンセリング)	

1. 著者名 中尾光善	4. 発行年 2018年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 192
3. 書名 環境とエピゲノム からだは環境によって変わるのか?	

1. 著者名 藤原沙織、中尾光善	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 199
3. 書名 実験医学別冊（がん不均一性を理解し、治療抵抗性に挑む がんはなぜ進化するのか？再発するのか？）	

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 グリセオリン I の作用機序とその利用	発明者 山本達郎；立和田博昭；齋藤典子；中尾光善	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

産業財産権の名称 グリセオリン I の作用機序とその利用	発明者 山本達郎；齋藤典子；中尾光善；松井利郎；井手剛；落合	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-192177	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 浮遊性細胞のリアルタイム測定トレイと測定装置、ならびにそれを用いた測定方法	発明者 中尾光善；日野信次朗；興相健作；岩佐卓哉；熊谷聡士	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-178967	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

熊本大学発生医学研究所 <a href="http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp">http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp</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
---------------------------	-----------------------	----