

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：72602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06059・19K21184

研究課題名（和文）乳がんの再発に關する核内ノンコーディングRNAを介した新しい転写制御機構の解明

研究課題名（英文）Defining novel transcriptional regulatory mechanisms via nuclear non-coding RNA involved in breast cancer recurrence

研究代表者

市川 雄一（Ichikawa, Yuichi）

公益財団法人がん研究会・がん研究所 がん生物部・研究員

研究者番号：20632160

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：ノンコーディングRNAエレノアは、エストロゲン受容体（ER）をコードするESR1遺伝子の転写を活性化することでER陽性乳がんの再発に關すると示唆されている。本研究では、エレノアRNAを標的としたChromatin Isolation by RNA Purification（ChIRP）法を用いて、エレノアRNAと相互作用するゲノム領域を明らかにすることに成功した。また、エレノアの機能を阻害する薬剤を複数同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エレノアRNAは細胞のがん化や乳がんの治療耐性化との関与が示唆されていることから、本研究によって得られる成果は、がん細胞が治療抵抗性を獲得するメカニズムの一端を明らかにするものであり、再発がんの診断や治療標的の同定につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：It has been proposed that ELEANOR non-coding RNAs may be involved in the recurrence of estrogen receptor (ER)-positive breast cancer by activating transcription of the ESR1 gene, which encodes ER. In this study, using chromatin isolation by RNA purification (ChIRP) method, I have revealed genomic regions associated with ELEANOR RNAs. Also, I have identified several drugs that inhibit ELEANOR's function.

研究分野：分子生物学

キーワード：ノンコーディングRNA クロマチン ER陽性乳がん ESR1 エピジェネティクス 細胞核

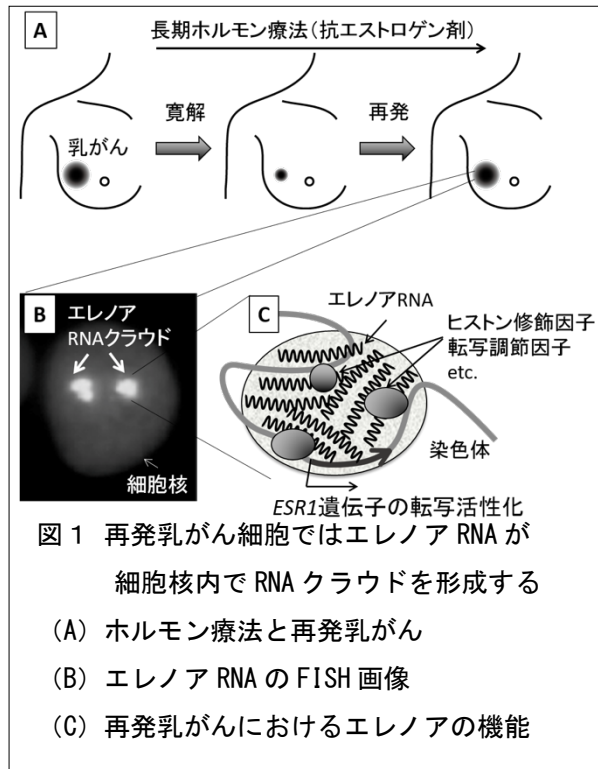
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

約70%の乳がんはエストロゲン受容体を発現しており、その増殖に女性ホルモンであるエストロゲンを必要とする。そのため、抗エストロゲン剤を用いたホルモン療法が有効である。

一方、長期治療の過程でがん細胞が薬剤耐性を獲得し、再発することが問題である

(図1 A)。このような再発乳がんでは、エストロゲン受容体をコードする *ESR1* 遺伝子が過剰発現していることが明らかになっているが、詳しい仕組みは分かっていない。エレノアは、エストロゲン枯渇に耐性を持つ再発乳がんのモデル細胞を用いた解析から見つかった核内長鎖ノンコーディング RNA である (引用文献1)。再発乳がん細胞では、エレノアが *ESR1* 遺伝子座近傍から転写され、細胞核内で集積し、RNA クラウドを形成する (図1 B)。興味深いことに、エレノア RNA をノックダウンすると、*ESR1* の転写量が減少した。エレノア RNA ク



ラウドは *ESR1* 遺伝子座と共局在することから、エレノア RNA はクロマチンに直接相互作用し機能していると考えられる (図1 C)。しかしながら、エレノア RNA がどのように遺伝子の発現に関わるか、その分子基盤は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、再発乳がんを高発現しているエレノア RNA をモデル系として、核内長鎖ノンコーディング RNA による転写活性化機構の解明を目的とした。さらに、抗がん剤やエピゲノム関連試薬が、エレノア RNA クラウドの形成と *ESR1* 遺伝子の発現に及ぼす影響を明らかにし、既知の薬剤の活性をもとに、エレノア RNA の作用機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) エレノア RNA とクロマチンの相互作用解析

エレノア RNA 特異的なビオチン化オリゴ DNA プローブを用いた RNA プルダウン法 (ChIRP 法) を施行し、エレノア RNA と共沈降したゲノム DNA について解析を行った。

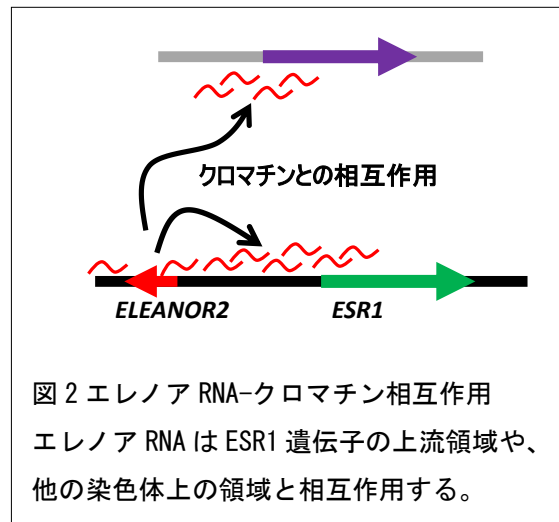
(2) エレノア RNA クラウドの形成を促進、または阻害する薬剤の探索

既知の抗がん剤やエピゲノム関連試薬を用いて、それらの薬剤がエレノア RNA クラウドの形成と *ESR1* 遺伝子の発現に及ぼす影響を解析した。

4. 研究成果

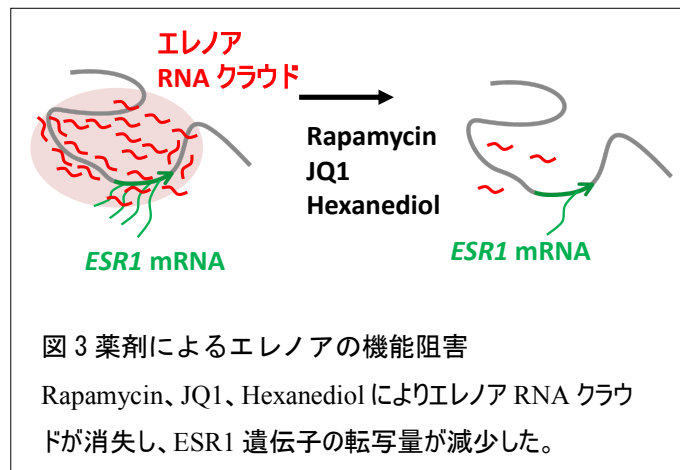
(1) エレノア RNA と相互作用するゲノム領域の同定

ER 陽性乳がん細胞株および再発乳がんモデル細胞株を用いて、エレノア RNA を標的とした RNA プルダウン実験を行った。エレノア RNA と共沈降したゲノム DNA を qPCR および次世代シーケンサーにより解析し、エレノア RNA と相互作用するゲノム領域を同定した。解析の結果、エレノア RNA は *ESR1* 遺伝子の上流領域と相互作用することが明らかになった (図 2)。さらに、*ESR1* 遺伝子座以外の領域に対しても *trans* に作用する可能性が示唆された。最近になり、エレノア RNA がヌクレオソーム構造を不安定化することが、研究代表者が所属する研究グループによって明らかになった (引用文献 2)。したがって、エレノア RNA はクロマチンと相互作用し、クロマチンを緩めることで転写活性化に寄与していると考えられる。



(2) エレノア RNA クラウドの形成を阻害する薬剤の同定

再発乳がんモデル細胞株を既知の抗がん剤やエピジェネティック試薬で処理し、RNA-FISH および RT-qPCR によってエレノア RNA の機能に及ぼす影響を解析した。その結果、mTOR 阻害薬である Rapamycin や、BET 阻害薬である JQ1 によってエレノア RNA クラウドが消失し、*ESR1* 遺伝子の転写量が減少することを明らかにした。さらに、液滴阻害剤である Hexanediol を用いた解析から、液-液相分離 (Liquid-Liquid Phase Separation) と呼ばれる現象が、エレノア RNA クラウドの形成と維持、さらには *ESR1* 遺伝子座の転写活性化に関与するという知見を得た (図 3)。



<引用文献>

1. Tomita S. *et al.* A cluster of noncoding RNAs activates the *ESR1* locus during breast cancer adaptation. *Nat Commun.* 6: 6966 (2015) doi: 10.1038/ncomms7966.
2. Fujita R. *et al.* Nucleosome destabilization by nuclear non-coding RNAs. *Commun Biol.* 3: 60 (2020) doi: 10.1038/s42003-020-0784-9.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

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 -
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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 市川雄一、福岡恵、上野貴之、斉藤典子
2. 発表標題 ER陽性乳がんが高発現しているノンコーディングRNAエレノアの機能解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 市川雄一、斉藤典子
2. 発表標題 ER陽性乳がんの治療抵抗性獲得に関与するノンコーディングRNA Eleanorの機能解析
3. 学会等名 第36回 染色体ワークショップ、第17回 核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市川雄一、斉藤典子
2. 発表標題 Eleanor RNAクラウドを介した転写活性化機構
3. 学会等名 RNAフロンティアミーティング2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市川雄一、斉藤典子
2. 発表標題 ER陽性乳がん細胞におけるEleanor RNAクラウドを介した転写活性化機構
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 福岡 恵、上野 貴之、市川 雄一、山本 達郎、斉藤 典子
2. 発表標題 ER陽性乳癌におけるEleanor非コードRNAの臨床的意義の解明
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 渡辺 健司、山本 達郎、市川 雄一、泉 厚志、落合 孝次、斉藤 典子
2. 発表標題 乳がん細胞におけるGlyceollin Iのエストロゲンレセプター非依存的な増殖抑制機構の解析
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 市川雄一、斉藤典子
2. 発表標題 Eleanor RNAクラウドを介した転写活性化
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

1. 発表者名 市川雄一、斉藤典子
2. 発表標題 ER陽性乳がんで高発現している非コードRNA Eleanorsを介した転写活性化
3. 学会等名 第20回関東ホルモンと癌研究会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----