

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07580

研究課題名(和文) NR2F1 antisense RNA1の乳がん再発に関与する分子機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism via NRE1 antisense RNA1 related to relapse of breast cancer

研究代表者

竹下 文隆 (Takeshita, Fumitaka)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・部門長

研究者番号：40466199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：乳がんの手術後10年以内に再発した患者の原発腫瘍組織で高発現していたNR2F1-AS1は、エストロゲン受容体とプロゲステロン受容体によって、発現が抑制的に調節されていることが示唆された。乳がんのNR2F1-AS1高発現株は培養条件とヌードマウスに移植した場合の両方で細胞増殖の速度が遅くなり、がん幹細胞のマーカーとしても知られるSOX2やSOX9の発現量が顕著に上昇していた。以上の結果から、乳がん細胞の休眠状態(dormancy)の維持にNR2F1-AS1が関与していることが示唆され、NR2F1-AS1の発現制御は乳がん再発の抑制に寄与することが期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳がんの化学療法前のがん組織において、同定されている、再発や薬剤耐性に寄与する分子は少ない。さらに、がん細胞がストレスを受けた場合に変動する遺伝子数は、タンパク質にコードされる遺伝子よりも、lncRNAのほうが多いという報告があり、lncRNAの多くは核内でクロマチンの制御に関与しているが、がんの再発や抗がん剤耐性獲得に関与するlncRNAについての報告はまだ少ない。本研究で着目したNR2F1-AS1は、乳がんの休眠状態に関与するlncRNAと推測され、発現機序解明により、再発や抗がん剤耐性獲得に対する予防・治療への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：NR2F1-AS1, which was highly expressed in the primary tumor tissues of patients with breast cancer recurrence within 10 years after surgery, was suggested to be downregulated by estrogen and progesterone receptors. Breast cancer cells that overexpress NR2F1-AS1 showed slow cell proliferation both in culture conditions and when transplanted into nude mice. Additionally, these cells exhibited significantly increased expression levels of SOX2 and SOX9, which are known as cancer stem cell markers. These findings suggest that NR2F1-AS1 is involved in maintaining the dormancy of breast cancer cells, and regulating its expression is expected to contribute to the suppression of breast cancer recurrence.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：long non-coding RNA

1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまでに、ドセタキセルが効かない乳がん患者の乳がん組織において ribophorin II (RPN2) という遺伝子が、ドセタキセルが効く乳がん患者よりも高発現を示すことに着目し、RPN2 が、乳がん細胞が抗がん剤を細胞外へ排出するポンプ機能を亢進させていることを報告した (Honma K, Takeshita F, et al. *Nature Med.* 2008)。また、RPN2 が乳がんの細胞集団におけるがん幹細胞の維持に関与することも報告している (Takahashi RU, Takeshita F et al. *Sci Reports.* 2013)。この RPN2 遺伝子は、タンパク質をコードし、RPN2 タンパク質の機能が上記のがんの悪性化に関与するが、近年ではタンパク質に翻訳されない、非コード RNA が注目されており、17-22 塩基の長さのマイクロ RNA (microRNA, miRNA) は、がんとの関連について多くの報告がある。我々も miRNA-27b が乳がん組織におけるがん幹細胞の発生に関与することを報告している (Takahashi RU, Takeshita F et al. *Nat Communications.* 2015)。RPN2 や miR27b 以外の遺伝子や miRNA についても、がん細胞の抗がん剤耐性の機序や、がん幹細胞の発生・維持に関与していると他の研究グループから報告されているが、抗がん剤耐性出現や、再発を予防、抑制するような創薬開発に結びついていない。抗がん剤による細胞の初期の応答は、核内の転写レベルで起こることが考えられ、これまで研究されてきた遺伝子、miRNA、タンパク質だけを調べていたのでは、抗がん剤抵抗性獲得や転移浸潤能獲得、さらに再発の機序の解明は不十分であると懸念される。

近年、抗がん剤を排泄するポンプ機能に関する分子や、がん幹細胞についての研究が進んでいるが、乳がんの化学療法前のがん組織においては、ポンプ機能の亢進や、がん幹細胞の存在は明確には確認されない。また、がん細胞がストレスを受けた場合に変動する遺伝子数は、タンパク質にコードされる遺伝子よりも、lncRNA のほうが多いという報告がある。また、lncRNA の多くは核内でメチル化やアセチル化などのクロマチンの制御に関与しており、がんにおけるエピジェネティックな異常に関しても、重要な役割を担っている。しかし、がんの再発や抗がん剤耐性獲得に関与する lncRNA についての報告はまだ少ない。そこで申請者は、乳がん患者の化学療法前の原発巣の摘出標本について、手術後 10 年以内に再発した群 (10 例) と、再発がなかった群 (14 例) のがん組織における遺伝子発現を比較したところ、タンパク質をコードする遺伝子については、乳がんの抗がん剤耐性獲得や再発に関連が推測されるものは有意な差はみられなかった。しかし、lncRNA である NR2F1 antisense RNA1 (NR2F1-AS1) が無再発群と比較し再発群で有意に高い発現を示した。さらにデータベースから抽出したデータセットにおいても、NR2F1-AS1 の高発現群は低発現群よりも予後が悪いことが示された。

NR2F1-AS1 の発現は、ヒト乳がん細胞株において、乳がん細胞株をタモキシフェンで処理した場合、NR2F1-AS1 の発現はエストロゲン受容体に非依存的に上昇することが示された。また、NR2F1-AS1 を乳がん細胞株に強制発現させると、細胞増殖を抑制し生細胞を減少させるが、生存した細胞は形態が変化し、コロニーを形成して休眠状態になることが確認された。さらに、NR2F1-AS1 は、TGFB2、NAOG、OCT4 等の幹細胞マーカーの発現を上昇させることが示された。これらの先行研究から乳がん細胞における NR2F1-AS1 の発現上昇は、がん幹細胞様の性質を獲得させ、休眠状態になり、抗がん剤に対する耐性を獲得し、再発に関与すると推測された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、乳がんの再発や抗がん剤耐性獲得に、NR2F1-AS1 の発現が関与する機序解明と、NR2F1-AS1 を標的とした再発性乳がんの創薬開発である。

NR2F1-AS1 に関する報告はまだ非常に少なく、肝がんでは oxaliplatin 耐性に関与する (Huang et al, *J Cell Mol Med.* 2018) という報告はあるものの、乳がんを含め他のがん種での再発や予後との相関性や、抗がん剤耐性、がん幹細胞様性質の獲得、休眠状態への移行に関する報告は極めて少なく、NR2F1-AS1 の詳細な解析は、がんの悪性化や再発に関する新たな機序の解明に寄与する可能性が高い。

一方、NR2F1-AS1 の過剰発現は、細胞の増殖は抑制され、約 2 ヶ月にもわたり休眠状態になり、がん幹細胞様の性質を示すにも関わらず、網羅的な遺伝子発現解析によると RAS や血管新生に関連するパスウェイが活性化傾向にある。これは、NR2F1-AS1 を高発現するがん細胞は、再増殖や浸潤・転移を示す準備段階にあり、何らかのきっかけによって休眠状態から目覚める可能性があることを示唆している。そして、休眠状態にある NR2F1-AS1 高発現細胞が再増殖状態へ移行する過程を詳細に解析することは、乳がんの再発に関する機序解明に大きく貢献することが期待される。

3. 研究の方法

(1) NRF2F1-AS1 の発現を制御因子の解明を目的とし、9 種類のヒト乳がん細胞株および臨床検体由来 RNA について定量的 PCR により解析する。

(2) 乳がん細胞株においてエストロゲン受容体とプロゲステロン受容体を、small interfering RNA (siRNA) による抑制と、タモキシフェンによるエストロゲン受容体の阻害により、NR2F1-AS1 の発現が変化するか検討する。

(3) エストロゲン受容体とプロゲステロン受容体による NR2F1-AS1 の制御の機序を解明するために、クロマチン免疫沈降法を行い、NR2F1-AS1 のプロモーター領域に両ホルモン受容体が結合するか検討する。

(4) 乳がん細胞株に NR2F1-AS1 に対する siRNA を導入し、エストロゲン受容体やプロゲステロン受容体の発現量を検討する。

(5) NR2F1-AS1 の細胞内での局在を調べるために細胞内の RNA を細胞質と核の画分に分けて発現量を定量する。

(6) NR2F1-AS1 発現ベクターを、ルミナル型の T47D 細胞に導入、安定発現株を作製し、NR2F1-AS1 高発現株 (T47D-NR2F1-AS1) を樹立し、細胞増殖、幹細胞マーカーの発現等への影響を検討する。

(7) ATGC データベースを用いて、乳がんにおいて NR2F1-AS1 を高発現する群の予後について検討する。

(8) T47D-NR2F1-AS1 をヌードマウスに同所移植し乳がんモデルマウスを作成し、造腫瘍能、増殖速度、転移能への影響を検討する。

4. 研究成果

(1) NRF2F1-AS1 の発現を制御因子の解明を目的とし、9 種類のヒト乳がん細胞株および臨床検体由来 RNA について定量的 PCR により解析した結果、NR2F1-AS1 の発現量は、エストロゲン受容体とプロゲステロン受容体 mRNA の発現量と逆相関を示した。

(2) ルミナル型の乳がん細胞株 MCF7、T47D、BT474 細胞においてエストロゲン受容体とプロゲステロン受容体を、small interfering RNA (siRNA) により抑制した結果、ホルモン受容体発現抑制下では NR2F1-AS1 の発現上昇が確認された。
また、エストロゲン受容体の阻害剤であるタモキシフェンを低濃度で乳がん細胞株に添加すると NR2F1-AS1 の発現が上昇した。

(3) ホルモン受容体による NR2F1-AS1 の制御の機序を解明するために、クロマチン免疫沈降法によって検証したところ、有意にホルモン受容体が NR2F1-AS1 のプロモーター領域にダイレクトに結合することが確認された。これらの結果から NR2F1-AS1 はルミナル型の乳がん細胞においてエストロゲン受容体とプロゲステロン受容体によって発現が抑制的に制御されている lncRNA であり、ホルモン療法で残存した腫瘍細胞内で NR2F1-AS1 の発現が上昇し、がんの再発の可能性が高まると推察された。

(4) NR2F1-AS1 に対する siRNA により抑制実験をおこなったが、エストロゲン受容体やプロゲステロン受容体の発現量に顕著な変化は認められなかった。

(5) NR2F1-AS1 の RNA は主に核内で検出された。複数種類の乳がん細胞で同様だったことから、NR2F1-AS1 は主に細胞の核内に局在し、がんの進展において何らかの機能を果たしていると示唆された。

(6) ルミナル型の T47D 細胞の NR2F1-AS1 高発現株 (T47D-NR2F1-AS1) は細胞増殖の速度が遅くなり、乳がんにおける休眠状態 (dormancy) に類似した表現型を示し、さらにがん幹細胞のマーカーとしても知られる SOX2 や SOX9 の発現量を定量的 PCR により解析したところ、それらが顕著に上昇していた。

(7) データベースを用いた解析からエストロゲン受容体陽性の乳がんにおいて NR2F1-AS1 を高発現する群の予後が不良であることが示された。これらの結果より NR2F1-AS1 はエストロゲン受容体やプロゲステロン受容体によってその発現が抑制され、発現が通常のルミナル型の乳がんにおいては発現が低いこと、さらに高発現させることで、がん幹細胞性を誘導することから薬剤耐性や転移能の獲得などの悪性度と関連しており、がん遺伝子として働くこと、さらに予後予測のバイオマーカーとして使用可能であることが示唆された。

(8) T47D-NR2F1-AS1 をヌードマウスに同所移植し乳がんモデルマウスを作成した。しかし、T47D-NR2F1-AS1 細胞は観察期間において、マウスの移植した部位に残存しているものの、形成された腫瘍の増大は認められなかった。他の乳がん細胞株についても、NR2F1-AS1 の高発現株を作製しマウスに移植すると、造腫瘍性が低下することが示された。これらの結果は、細胞培養条件において乳がん細胞の NR2F1-AS1 高発現株を作製した際、幹細胞性を示し増殖能が低下したことと一致している。ヒト乳がん細胞の NR2F1-AS1 高発現株を移植した乳がんモデルマウスによる、乳がんの抑制実験等は困難と判断したため、今後 NR2F1-AS1 の発現時期を調節可能な系で実施する予定である。

(9) 乳がんが再発例において、無再発例と比較して発現が上昇していた lncRNA として、さらに LOC283867 および FLJ35024 が同定された。LOC283867 はヒト乳がん細胞株の低転移よりも高転移株で発現が上昇していた。また、高転移株で LOC283867 を抑制すると、浸潤能も抑制され、LOC283867 が乳がん細胞の浸潤に関与することが示唆された。また、FLJ35024 はヒト乳がん細胞株の抗がん剤耐性株で親株よりも発現が上昇しており、FLJ35024 は乳がん細胞の抗がん剤耐性化に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9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 4件）

1. 著者名 Yueyuan Zhou, Yusuke Yamamoto, Fumitaka Takeshita, Tomofumi Yamamoto, Zhongdang Xiao, Takahiro Ochiya	4. 巻 22
2. 論文標題 Delivery of miR-424-5p via Extracellular Vesicles Promotes the Apoptosis of MDA-MB-231 TNBC Cells in the Tumor Microenvironment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 844 ~ 844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22020844	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 Teppei Sugano, Mari Masuda, Fumitaka Takeshita, Noriko Motoi, Toru Hirozane, Naoko Goto, Shigeki Kashimoto, Yuko Uno, Hideki Moriyama, Masaaki Sawa, Yuichi Nagakawa, Akihiko Tsuchida, Masahiro Seike, Akihiko Gemma, Tesshi Yamada	4. 巻 124
2. 論文標題 Pharmacological blockage of transforming growth factor- signalling by a Traf2- and Nck-interacting kinase inhibitor, NCB-0846.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Br J Cancer	6. 最初と最後の頁 228 ~ 236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-020-01162-3.	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 Ryuto Tsuchiya, Yuki Yoshimatsu, Rei Noguchi, Akane Sei, Fumitaka Takeshita, Jun Sugaya, Suguru Fukushima, Akihiko Yoshida, Seiji Ohtori, Akira Kawai, Tadashi Kondo	4. 巻 34
2. 論文標題 Establishment and characterization of NCC-DDLPS1-C1: a novel patient-derived cell line of dedifferentiated liposarcoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 260 ~ 270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-020-00436-5	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 Anna Sanchez Calle, Tomofumi Yamamoto, Yumi Kawamura, Ai Hironaka-Mitsunashi 1, Makiko Ono 1 3, Hitoshi Tsuda 4 5, Akihiko Shimomura, Kenji Tamura, Fumitaka Takeshita, Takahiro Ochiya, Yusuke Yamamoto	4. 巻 14
2. 論文標題 Long non coding NR2F1 AS1 is associated with tumor recurrence in estrogen receptor positive breast cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 2271 ~ 2287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1878-0261.12704	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 Lee Chuen Liew, Luc Gailhouse, Geok Chin Tan, Yusuke Yamamoto, Fumitaka Takeshita, Hitoshi Nakagama, Takahiro Ochiya	4. 巻 38
2. 論文標題 MicroRNA-124a inhibits endoderm lineage commitment by targeting Sox17 and Gata6 in mouse embryonic stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 STEM CELLS	6. 最初と最後の頁 504 ~ 515
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/stem.3136	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 Komatsu M, Ichikawa H, Chiwaki F, Sakamoto H, Komatsuzaki R, Asami M, Tsunoyama K, Fukagawa T, Matsushita H, Boku N, Matsusaki K, Takeshita F, Yoshida T, Sasaki H.	4. 巻 41
2. 論文標題 ARHGAP-RhoA signaling provokes homotypic adhesion-triggered cell death of metastasized diffuse-type gastric cancer.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 4779-4794
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-022-02469-6.	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 Urabe F, Matsuzaki J, Takeshita F, Kishida T, Ochiya T, Hirai K.	4. 巻 113
2. 論文標題 Independent verification of circulating miRNA as diagnostic biomarkers for urothelial carcinoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 3510-3517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15496.	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 Prieto-Vila M, Usuba W, Yoshioka Y, Takeshita F, Yoshiike M, Sasaki H, Yamamoto Y, Kikuchi E, Ochiya T.	4. 巻 1
2. 論文標題 High-grade bladder cancer cells secrete extracellular vesicles containing miRNA-146a-5p and promotes angiogenesis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J of Extracellular Bio.	6. 最初と最後の頁 e47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jex2.47	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 Komatsu M, Nakamura K, Takeda T, Chiwaki F, Banno K, Aoki D, Takeshita F, Sasaki H.	4. 巻 41
2. 論文標題 Aurora kinase blockade drives de novo addiction of cervical squamous cell carcinoma to druggable EGFR signaling.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 2326-2339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-022-02256-3.	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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高橋 真美, 千脇 史子, 小松 将之, 松崎 圭祐, 平岡 伸介, 竹下 文隆, 佐々木 博己, 今井 俊夫
2. 発表標題 LOH of a SNP near MC4R in patient-derived pancreatic cancer cells and the allele-specific gene expression analyses
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 千脇 史子, 小松 将之, 高橋 真美, 平岡 伸介, 佐々木 博己, 竹下 文隆
2. 発表標題 Development of mouse distal metastasis models by human cancer cell lines established from malignant ascites
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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