43　乳がんに関わる核内長鎖ノンコーディングRNAの解析	斉藤　典子

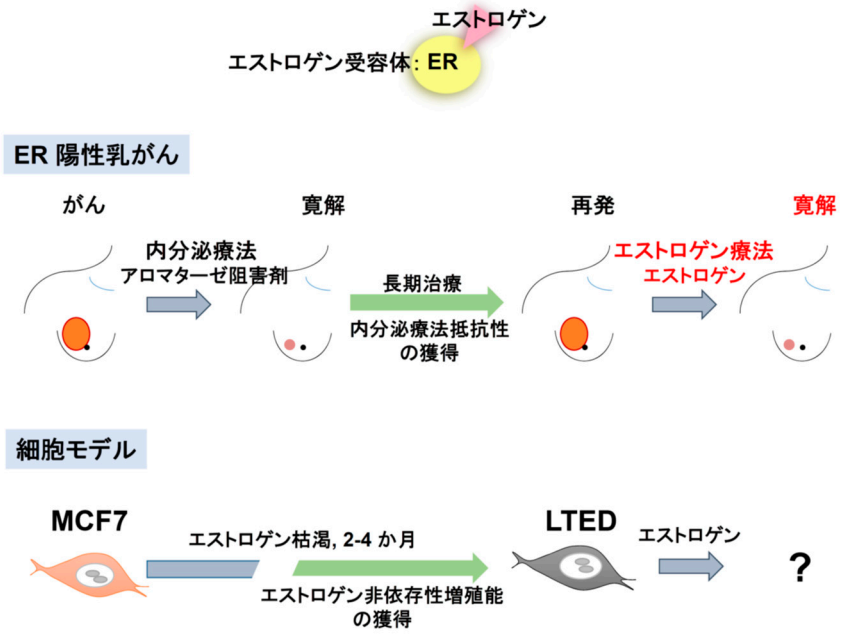
【目的】乳がんのおよそ 70%を占めるエストロゲン受容体（ER）陽性型乳がんは、女性ホルモンのエストロゲン存在下で増殖するため、エストロゲンを阻害する内分泌療法が有効である。しかし、治療中にがん細胞は治療抵抗性を獲得し、その結果、高い頻度で再発することが問題である（下図）。一見矛盾するが、再発乳がん患者に高濃度のエストロゲンを投与することにより、寛解することが古く（1950 年代）よりみとめられており、「エストロゲン療法」とよばれてきた（下図）。しかし機序は明らかでなく、その解明が必要である。

ヒト乳がん培養細胞株である MCF7 細胞をエストロゲン枯渇下で培養して生き残る LTED 細胞は、この内分泌療法抵抗性再発乳がんのモデル細胞である（下図）。研究代表者の斉藤は、LTED 細胞で、タンパク質に翻訳されないノンコーディング RNA（non-coding RNA）群が過剰発現することを見出し、これらを「エレノア」と命名した。エレノアは、細胞核内で RNA クラウドとよばれる構造体を形成し、ER をコードする *ESR1* 遺伝子座を活性化する。エストロゲン枯渇下でのがん細胞の増殖に必須なノンコーディング RNA である。本研究では、再発乳がんに対する治療候補であるエストロゲン療法に、エレノアがいかに関わるかを分子レベルで理解することを目的とした。それにより、ノンコーディング RNA が担う、新たなエピジェネティクスの制御機序を明らかにすることが期待される。

【方法】LTED 細胞をエストロゲンおよびエストロゲン類似化合物で処理し、その後、エレノアクラウド形成、*ESR1* 遺伝子の発現、細胞増殖への影響を調べるために、FISH、qRT-PCR、FACS 解析などを行った。

【結果】エストロゲンとレスベラトロールは LTED 細胞において、エレノアクラウド形成、*ESR1* 遺伝子の発現、細胞増殖を抑制すること、さらに、アポトーシスを誘導することを明らかにした。これらの結果は、エストロゲン療法を細胞培養下で再現可能としたこと、それにより、治療の分子機序の解明が可能となったこと、エレノアが本療法の標的である可能性が示された。さらに、治療抵抗性となって再発した乳がん細胞には、適確な“トリガー”（エストロゲン）を加えることで効率的にアポトーシスを誘導できるという、乳がんの脆弱性を新たに示した。細胞核内ノンコーディング RNA が、がんの治療選択の指標と治療の標的となる可能性を示した。

ER 陽性乳がんの内分泌療法抵抗性獲得とエストロゲン療法



43. 乳がんに関わる核内長鎖ノンコーディング RNA の解析

斉藤　典子

がん研究会 がん研究所 がん生物部

Key words：ノンコーディング RNA，乳がん，クロマチン，細胞核, エピジェネティクス

緒　言

乳がんのおよそ 70%はエストロゲン受容体（ER）を発現し、その治療には内分泌（抗エストロゲン）療法が施される。しかし、やがてがんは治療抵抗性を獲得し、高頻度に再発することが問題である。一見矛盾するが、古くより再発乳がん患者に高濃度のエストロゲンを投与することにより、寛解することもみとめられており、「エストロゲン療法」とよばれる。しかし機序は明らかでなく、その解明が必要である［1，2］。

ヒト乳がん細胞株 MCF7 は、ER 陽性乳がん由来で、エストロゲン存在下で増殖する。エストロゲンを長期枯渇した状態で培養すると、はじめ多くは死滅するが、ある一群の細胞がエストロゲンに依存しない増殖能を獲得し、生き延びて再びさかんに増殖する。これは LTED（Long Term Estrogen Deprivation）細胞と呼ばれ、治療が効かなくなった再発乳がんのモデル細胞である。

ゲノム DNA の遺伝情報は、体の形成、体質や個性、疾患などを決定する。ゲノム中で最もよく研究されているのは、タンパク質をコードする領域である。しかし近年、ヒトゲノムのうちタンパク質をコードする領域はわずか 2%にすぎない一方で、75%以上が転写されており、生体内には膨大な種類のノンコーディング RNA が存在していることが明らかとなってきた。特に、200 nt を超える長鎖ノンコーディング RNA が、細胞の種類、組織や発生段階に特異的に発現していること、がんを含む様々な疾患に深くかかわることが示唆されはじめ、生体にとって重要な制御因子であることが推察されてきた。長鎖ノンコーディング RNA の多くは細胞核内に局在し、ゲノム DNA が作るクロマチン高次構造や転写の調節にかかわる。DNA の変化を伴わない表現型の違いを生み出す、エピジェネティクスの新たな機能因子のメンバーであることが示唆されている。しかし、長鎖ノンコーディング RNA 機能分子メカニズムと疾患における意義はほとんど不明である。

LTED 細胞はエストロゲン非依存性増殖能を獲得するために、ER が過剰発現し、それにより、わずかな量のエストロゲンに応答して増殖できるとされている。代表研究者の斉藤らは、今までの研究により、LTED 細胞では、ER をコードする *ESR1* 遺伝子座とその上流を含む 0.7 Mb の広い非コード領域よりエレノアと総称する多種のノンコーディング RNA が多量に転写され、それが核内に繋留され、塊（RNA クラウド）を形成し、*ESR1* mRNA の転写を活性化していることを見出し、報告した［3，4］。また、エレノアは実際の ER 陽性乳がん患者組織にも検出された。

本研究では、再発乳がんに対する治療候補となるエストロゲン療法に、エレノアがいかに関わるかを分子レベルで理解することを目的とした。核内長鎖ノンコーディング RNA の新しい作動原理が示唆されること、再発乳がんの治療標的が明らかになることが期待される［5］。

方　法

1.　細胞の培養と薬剤処理

ER 陽性乳がん細胞株 MCF7 は RPMI1640（Sigma）-10% fetal bovine serum（Corning）を培地に用いて培養した。LTED 細胞を確立するためには、MCF7 細胞を phenol red free RPMI 1640（Wako）-4% dextran-coated charcoal-stripped FBS（Thermo Fisher Scientific）で 2～4 か月培養した。MCF7 と LTED 細胞には、50～100 μM レスベラトロール（Sigma-Aldrich）か β-エストラジオール（Wako）、または溶媒として用いた DMSO をそれぞれ 24 時間添

加した。

2. FISH（Fluorescence *in situ* hybridization）

FISH は過去に報告したとおりに行った[3]。まず細胞をカバースリップ上に培養し、その後、4% paraformaldehyde-0.5% Triton X-100 で室温 15 分間固定した。その後、0.5% saponin-0.5% Triton X-100-PBS で室温 20 分間処理して透過処置をした。カバースリップを 20% glycerol-PBS に室温 30 分間浸し、液体窒素を用いて凍結融解を 4 回繰り返した。さらにカバースリップを 20% glycerol に戻した後、0.1 N HCl で室温 15 分間処置した。ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション混合液（2 × SSC、50% formamide、10% dextran sulfate、1 mg/mL tRNA, and 5～10 μg/mL プローブ DNA）内で 37℃、48 時間以上、Hybridizer（Dako）にて行った。BAC プローブ（RP11-450E24）はニックトランスレーションキット（Roche）により digoxigenin で標識して調整した。ハイブリダイゼーション後、カバースリップを次のように洗浄した。2 × SSC-50% formamide（37℃または室温で 5 分ずつを 3 回）、さらに 2 × SSC（室温で 5 分ずつを 3 回）洗浄。ハイブリダイズしたプローブは、FITC-anti-digoxigenin（Roche）で、全体の DNA は 5,6-diamidino-2-phenylindole（DAPI）で標識した。カバースリップは ProLong Gold Antifade（Thermo Fisher Scientific）で包埋し、顕微鏡下での観察に用いた。

3. 逆転写-定量 PCR（RT-qPCR）

TRIzol（Thermo Fisher Scientific）を用いて細胞から全 RNA を調製し、Rever-Tra Ace PCR RT キット（TOYOBO）を用いて逆転写を行い、cDNA を作成した。リアルタイム PCR（qPCR）は、SYBR green fluorescence を用いて Step One Plus（Applied Biosystems）で行った。*ESR1* mRNA に対する値は、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）mRNA の値で正規化した。使用したプライマー配列は以下のとおり。*ESR1* mRNA:5′-CAGGCCAAATTCAGATAATCG-3′（forward）と 5′-TCCTTGGCAGATTCCATAGC-3′（backward）、GAPDH mRNA: 5′-ACACCCACTCCTCCACCTTT-3′（forward）と 5′-TAGCCAAATTCGTTGTCATACC-3′（backward）。

4. アポトーシスアッセイ

Annexin-V-FLUOS キット（Roche）を用いて細胞を染色した。細胞をトリプシン処理で培養ディッシュからはがした後、Annexin-V-FLUOS 標識溶液中に室温で 15 分間浸し、FACS（BD FACSCanto™Ⅱ）での解析に用いた。データは FlowJo（10.4.1v）プログラムを用いて解析した。

結果および考察

1. エストロゲンはエレノアを阻害し、LTED 細胞の増殖を抑制した

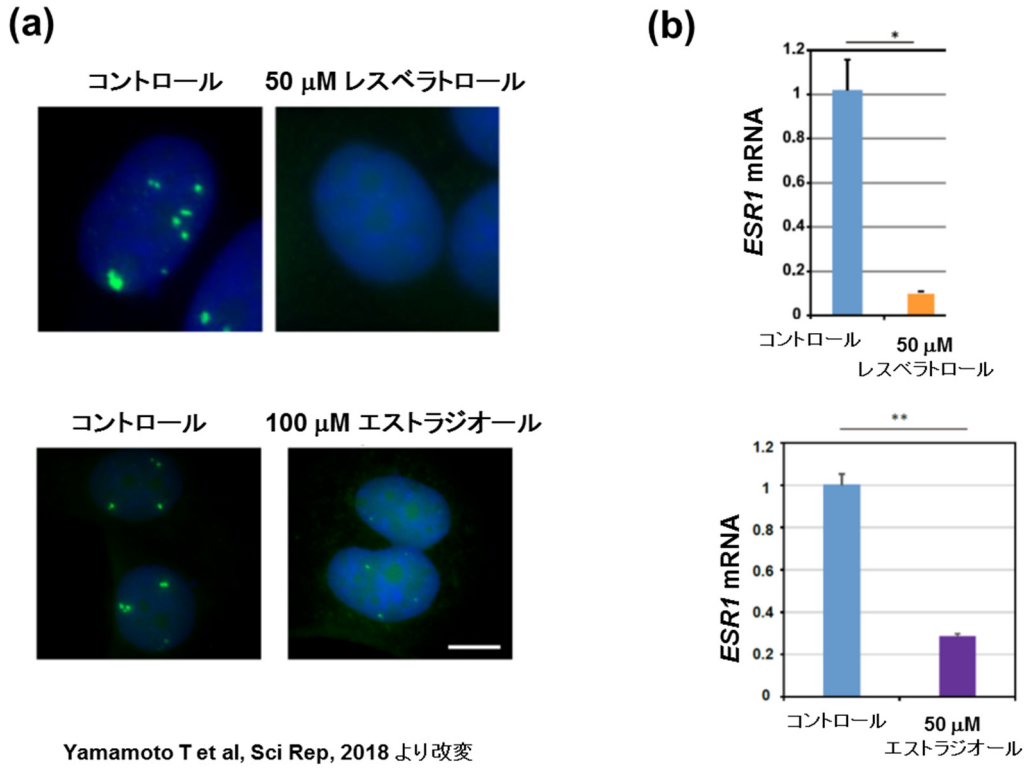
内分泌療法耐性乳がんに対するエストロゲン療法を細胞株で再現させるために、内分泌療法耐性乳がんの細胞モデルである LTED 細胞に、エストロゲン（1～100 μM）およびエストロゲン類似化合物であるレスベラトロール（50 μM）を添加して 24～72 時間培養した。その結果、それぞれの化合物が時間と濃度依存的に LTED 細胞の増殖を阻害することがわかった［6］。LTED 細胞の増殖には過剰発現したエレノアによる *ESR1* 遺伝子の転写活性化が必須であることから［3］、エストロゲン処理がエレノアに影響を与える可能性を考えた。そこで、エストロゲンおよびレスベラトロール処理した細胞において FISH（fluorescence *in situ* hybridization）を用いてエレノアを可視化した（図 1a）。その結果、どの化合物も核内のエレノアクラウドの形成を阻害することがわかった。これと合致するように、エストロゲンおよびレスベラトロール処理により、細胞内の *ESR1* mRNA レベルが低下した（図 1b）。さらに、細胞内の ER タンパク質量が減弱していることも確認した［6］。

これらの結果は、再発乳がんに対するエストロゲン療法を細胞モデルで再現できたことを示す。さらに、エレノアがエストロゲン療法のターゲットである可能性が示唆された。エレノア阻害により ER 量が減り、がんの細胞増殖が低下したと考えられる。

2. LTED 細胞にてエストロゲンはアポトーシスを誘導した

LTED 細胞ではアポトーシス関連遺伝子の転写が変化していることを、以前の RNA-Seq データを新たに解析することにより確認した［6］。そこで、エストロゲンにより LTED 細胞の増殖抑制がアポトーシスによるものであるかを Annexin V の染色により調べた。Annexin V は、アポトーシス細胞特異的に細胞膜の外層に露出される phosphatidylserine を認識して結合する蛍光試薬である。LTED 細胞をエストロゲン処理したのち、FACS にて解析したところ、Annexin V 陽性細胞が有意に増加していた（図 2）。

この結果は、LTED 細胞をエストロゲン処理することによりアポトーシスを誘導できることを示している。またエストロゲン療法の機序を示唆するものでもある。内分泌療法抵抗性細胞は、細胞核内でクロマチン制御するノンコーディング RNA を標的とすることにより、アポトーシスに誘導できる可能性を示している。



Yamamoto T et al, Sci Rep, 2018 より改変

図 1. エストロゲンはエレノアを抑制し *ESR1* の転写を低下させた

a) エレノアを可視化する FISH 解析。LTED 細胞をレスベラトロールおよびエストロゲン（エストラジオール）で処理することにより、核内（青）のエレノアクラウド（緑色）が消失した。スケールバーは 10 μm 示す。

b) *ESR1* mRNA 量を調べる逆転写-定量 PCR 解析。LTED 細胞をレスベラトロールおよびエストロゲン処理することにより、*ESR1* mRNA の転写量が低下した。

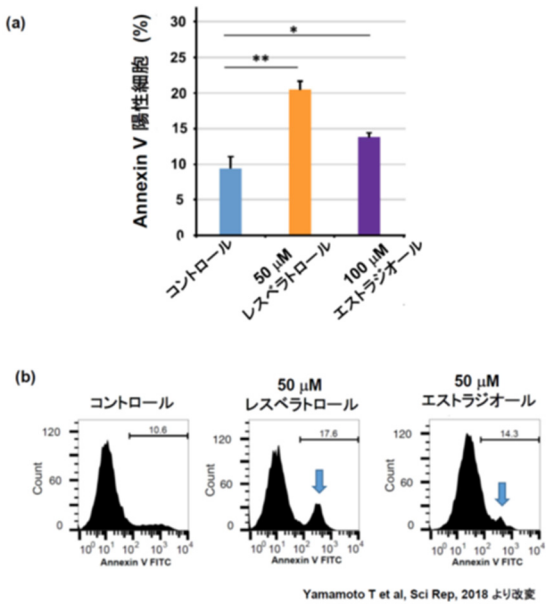


図 2. LTED 細胞はエストロゲン処理によりアポトーシスへと誘導された

(a) アポトーシス細胞（AnnexinV 陽性細胞）の FACS 解析。LTED 細胞をレスベラトロールおよびエストロゲン（エストラジオール）で処理することにより、アポトーシスの指標である Annexin V 染色性細胞が増加した。

(b) 解析の FACS データ例。Annexin V 強染色細胞群（青矢印）がレスベラトロールおよびエストロゲン処理で増加した。

共同研究者・謝辞

がん研究会がん研究所がん生物部斉藤研究室の皆様に感謝する。

文　献

1) Haddow A, Watkinson JM, Paterson E, Koller PC. Influence of Synthetic Oestrogens on Advanced Malignant Disease. Br Med J. 1944 Sep 23;2(4368):393-8. PMID: 20785660

2) Haddow A. David A. Karnofsky memorial lecture. Thoughts on chemical therapy. Cancer. 1970 Oct;26(4):737-54. Review. PMID: 4918638

3) Tomita, S., Abdalla, M. O. A., Fujiwara, S., Matsumori, H., Maehara, K., Ohkawa, Y., Iwase, H., Saitoh, N.* (corresponding author) and Nakao, M.* A cluster of noncoding RNAs activates the *ESR1* locus during breast cancer adaptation. Nat Commun. 2015 Apr 29;6:6966. doi: 10.1038/ncomms7966. PMID: 25923108

4) Tomita, S., Abdalla, M. O. A., Fujiwara, S., Yamamoto, T., Iwase, H., Nakao, M. * and Saitoh, N.* (corresponding author) Roles of long non-coding RNAs in chromosome domains. Wiley Interdiscip Rev RNA. 2017 Mar;8(2). doi: 10.1002/wrna.1384. Epub 2016 Aug 3. Review. PMID: 27489248

5) Yamamoto T, Saitoh N. * (corresponding author) Non-coding RNAs and chromatin domains. Curr Opin Cell Biol. 2019 2019 Jan 22;58:26-33. doi: 10.1016/j.ceb.2018.12.005. [Epub ahead of print] Review. PMID: 30682683

6) Yamamoto, T., Sakamoto1,C., Tachiwana, H., Kumabe, M., Matsui, T., Yamashita, T., Shinagawa, M., Ochiai, K., Saitoh, N.* (corresponding author), Nakao, M.* Endocrine therapy-resistant breast cancer model cells are inhibited by soybean glyceollin I through Eleanor non-coding RNA. Sci Rep. 2018 Oct 12;8(1):15202. doi: 10.1038/s41598-018-33227-y. PMID: 30315184