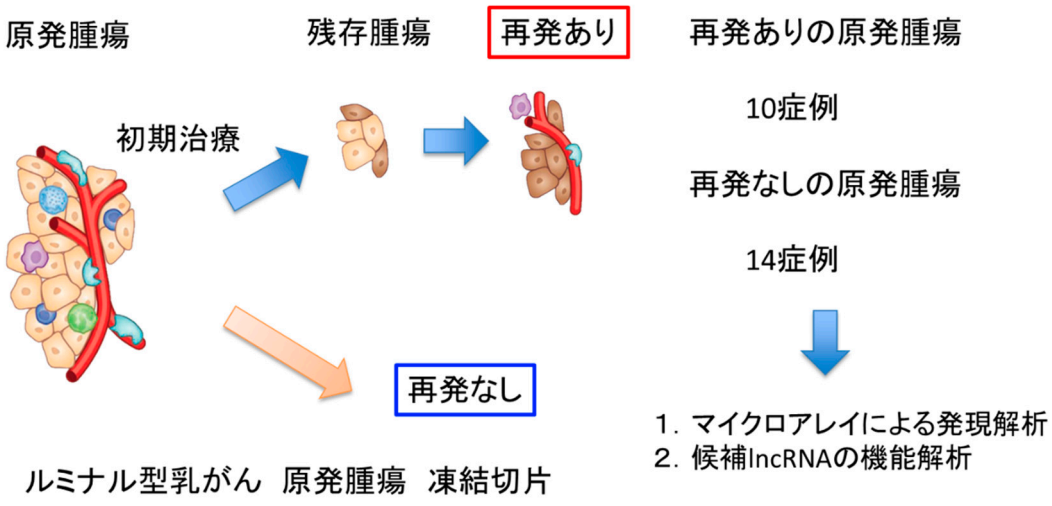
184　乳がんの再発に関与する長鎖ncRNAの機能解析	山本　雄介

【目的】乳がんは早期発見をすることによって、五年生存率が 90%を越えるため、予後の良いがんではあるものの、治療後の再発や遠隔転移は大きな問題である。近年、タンパク質をコードしない RNA、つまり non-coding RNA が細胞中に多数発現しており、様々な生命現象に関与していることが明らかになってきている。これまでに、発がんや腫瘍の抑制に関与するマイクロ RNA（miRNA）や long-non-coding RNA（lncRNA）が報告されてきた。そこで、我々はがんの再発に関わる lncRNA が存在すると仮定し、それらの探索および機能解析を目的として研究を開始した。

【方法】乳がんの再発に寄与する lncRNA を同定するために、再発群と非再発群のルミナル型の原発腫瘍の臨床検体を用いて遺伝子発現マイクロアレイ解析を実施した。臨床検体および乳がん細胞株で発現の確認が取れた lncRNA を乳がんの再発に関わる lncRNA とし、その発現制御、ならびに強制発現による機能解析を実施した。

【結果】再発群と非再発群の原発腫瘍の比較において 52 種類の lncRNA が有意に発現変化していた。定量的 PCR により LINC00922、NR2F1-AS1 と SOX9-AS1 の 3 つの lncRNA を候補因子として選択した。乳がん細胞株を用いた発現制御解析から候補 lncRNA とエストロゲン受容体やプロゲステロン受容体の発現が逆相関していることが明らかになった。臨床検体解析からも NR2F1-AS1 がエストロゲン受容体と弱い逆相関があり、また NR2F1-AS1 はプロゲステロン受容体の発現と弱い逆相関が認められた。次に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に対する siRNA とエストロゲン受容体の阻害剤タモキシフェン添加による NR2F1-AS1 の発現量の変化を定量的 PCR で検証したところ、その発現が上昇していることが確認された。抑制効果が NR2F1-AS1 のプロモーター領域へのホルモン受容体の直接の結合によるものかをクロマチン免疫沈降法で検証した結果からも、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ことが結論付けられた。これらの研究成果より同定された lncRNA が乳がんの再発した原発腫瘍で発現が亢進していることから予後予測をするうえでのバイオマーカーとして使用可能であること、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いたことが示された。さらに、NR2F1-AS1 を強制発現することで細胞の増殖が止まり、幹細胞のマーカーとなる遺伝子の発現や細胞の休眠に関わる遺伝子の発現ならびに遺伝子経路が活性化していることを確認した。つまり、これらの結果から、NR2F1-AS1 ががん細胞の休眠に関与し、その後の再発にも関与していることが実験的に示唆された。

乳がん細胞の抗がん剤耐性、転移、再発に関する Long-non-coding RNA の探索



184. 乳がんの再発に関与する長鎖 ncRNA の機能解析

山本　雄介

国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野

Key words：乳がん，再発，lncRNA，休眠，マイクロアレイ

緒　言

ヒトゲノム解析の結果、遺伝子情報を持つタンパク質をコードするゲノムの領域は約 2%に留まっており、タンパク質をコードしていない“ジャンク DNA”とされたゲノム領域がほとんどであると考えられていた。しかしながら、「FANTOM」などの大規模なトランスクリプトーム解析プロジェクトによって、実際にはゲノムの 80%に転写活性があり、多くの種類の非翻訳 RNA（ncRNA）が細胞内で発現していることが明らかになった［1］。一般的にタンパク質をコードしない 200 塩基以上のヌクレオチドの転写物を long non-coding RNA （lncRNA）の定義としており、生理的な役割だけでなく、がんなどの疾患においても多様な機能を有し疾患の発生に関連していることが報告されてきている。これまでに、発がんや腫瘍の抑制に関与するマイクロ RNA（miRNA）や long non-coding RNA（lncRNA）が報告されてきた［2，3］。乳がんは早期発見をすることによって、五年生存率が 90%を越えるため、予後の良いがんではあるものの、治療後の再発や遠隔転移は大きな問題である。本研究課題では乳がんの再発に関わる lncRNA を同定し、その機能解析を実施することで、新しい診断方法や治療標的の探索を行った（Calle AS et al. 論文投稿中）。

方　法

1.　マイクロアレイ

治療後に再発を起こした腫瘍（10 症例）と再発のなかった腫瘍（14 症例）のルミナル型の乳がんの組織検体は国立がん研究センター中央病院乳腺外科および病理・臨床検査科より提供いただいた。その検体からトータル RNA を抽出し、Agilent SurePrint G3 Human GE v2 8x60K Microarray（アジレント社）を用いて網羅的な発現解析を実施した。マイクロアレイのデータは Agilent GeneSpring version 13.1.1 を用いて正規化し、Partek Genomics Suite 6.6（Partek Inc.）を用いて解析を実施した。Ingenuity Pathway Analysis による遺伝子経路の解析を実施した。

2. 乳がん細胞株の培養

乳がん細胞株は ATCC 社より購入したものを使用した。すべての細胞株の培養は RPMI 1640 を基礎培地とし、10%胎児牛血清を加え、37℃で 5%の CO_2 条件で行った。培養された細胞からトータル RNA やタンパク質を抽出し、PCR やウェスタンブロット法による解析に使用した。NR2F1-AS1 の強制発現株は long variant（V1）と short variant（V4）、対照群として pcDNA3.1/Hygro（+）ベクターをエレクロポレーション法によって導入し、作製した（Nucleofector™ 2b Device、Lonza Bioscience）。

3. siRNA およびタモキシフェンによるエストロゲン受容体の抑制実験

各細胞株はエストロゲン受容体とプロゲステロン受容体に対する siRNA（Thermoscintific、JP）を Lipofectamine™ RNAiMAX（ThermoFisher Scientific）を用いたリポフェクション法によって実施した。siRNA 導入後 72 時間でトータル RNA やタンパク質の回収を行った。

結　果

1.　乳がんの再発に関わる可能性がある lncRNA の探索と検証

再発群と非再発群の原発腫瘍の検体を用いたマイクロアレイの比較において 52 種類の lncRNA が有意に発現変化していた（図 1A)。定量的 PCR により LINC00922、NR2F1-AS1 と SOX9-AS1 の 3 つの lncRNA を候補因子として選択した（図 1B)。乳がん細胞株を用いた発現制御解析から候補 lncRNA とエストロゲン受容体やプロゲステロン受容体の発現が逆相関していることが明らかになった（図 1C)。臨床検体解析からも NR2F1-AS1 がエストロゲン受容体と弱い逆相関があり、また Sox9-AS1 においてもエストロゲン受容体の発現と弱い逆相関が認められた（図 1D)。

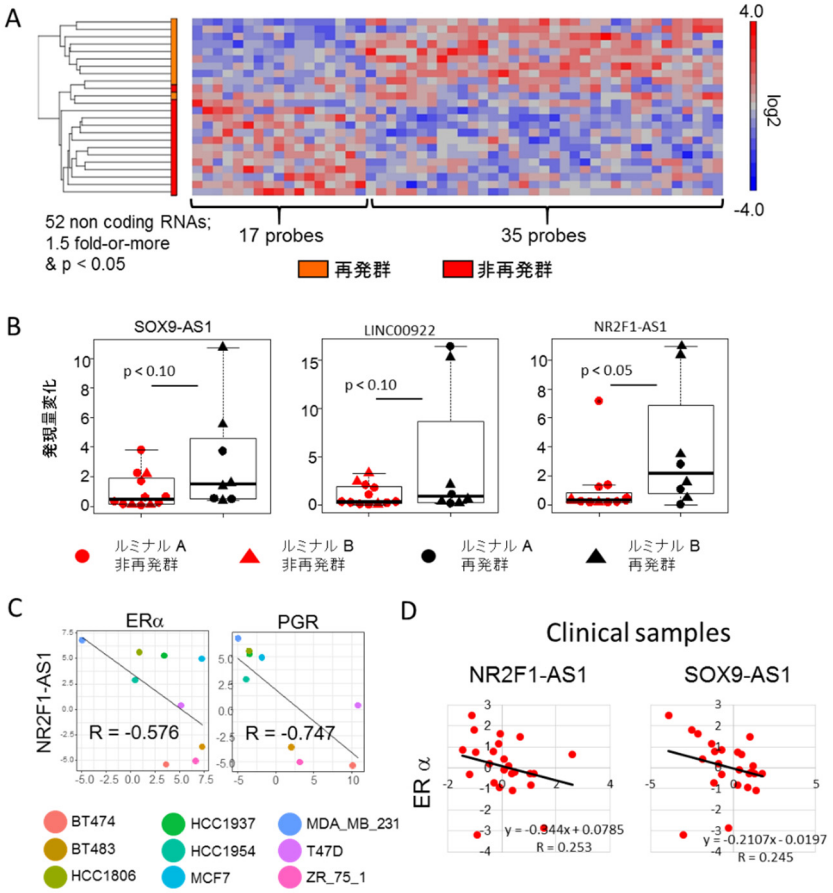


図 1.　マイクロアレイ法による再発関連 lncRNA の選択と定量的 PCR による検証

A)　再発がんと非再発がんで異なった発現を示す lncRNA

B)　PCR 法による発現量の検証. Student t テストによる検体

C)　乳がん細胞株を用いた NR2F1-AS1 とホルモン受容体の相関

D)　臨床検体を用いた発現量の相関

2.　エストロゲン受容体およびプロゲステロン受容体による NR2F1-AS1 の発現制御

次に乳がん細胞株においてエストロゲン受容体に対する siRNA を使用し、エストロゲン受容体のタンパク質を抑制し、NR2F1-AS1 の発現量を定量的 PCR 法において検証した。その結果、エストロゲン受容体が抑制されたサンプルでは、NR2F1-AS1 の発現量が上昇することが明らかになった（図 2A)。さらに、エストロゲン受容体の阻害剤タモキシフェン添加による NR2F1-AS1 の発現量の変化を定量的 PCR で検証したところ、その発現が顕著に上昇していることが確認された（図 2A)。抑制効果が NR2F1-AS1 のプロモーター領域へのホルモン受容体の直接の結合によるものかをクロマチン免疫沈降法で検証した結果からも、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ことが結論付けられた。

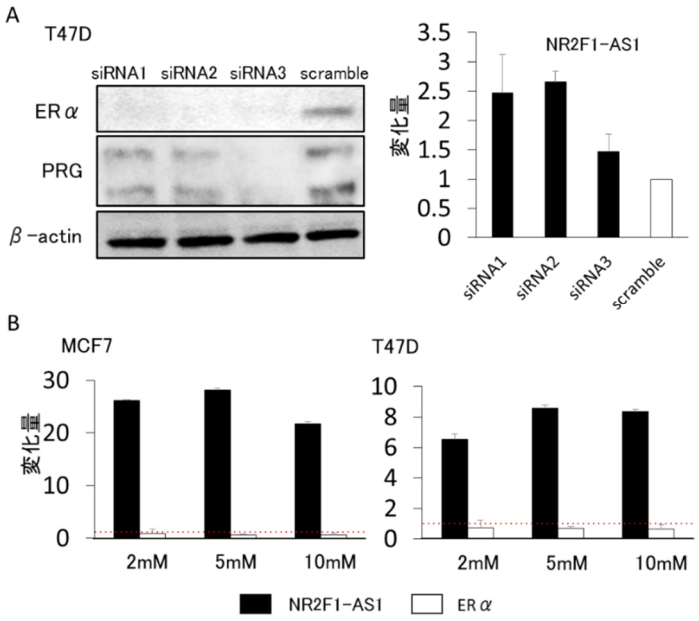


図 2. NR2F1-AS1 の発現は ERα シグナルによって制御される

A) ERα の siRNA による遺伝子抑制の NR2F1-AS1 発現変化

B) タモキシフェン処理による NR2F1-AS1 の発現量の検証

3. NR2F1-AS1 の強制発現による細胞の休眠状態の再現

NR2F1-AS1 には long と short の variant があり、それらを強制発現させ、細胞の表現型を検証した。その結果、両方の Variant で細胞形態が顕著に変化することが明らかになった（図 3A）。マイクロアレイによる遺伝子発現の主成分解析の結果からはバリアントごとに異なった遺伝子発現プロファイルを示すことが明らかになり（図 3B）、IPA（Ingenuity Pathway Analysis）からは異なった遺伝子経路が活性化していることが分かった（図 3C）。その中には、細胞の休眠や幹細胞に関連している遺伝子群が存在した。

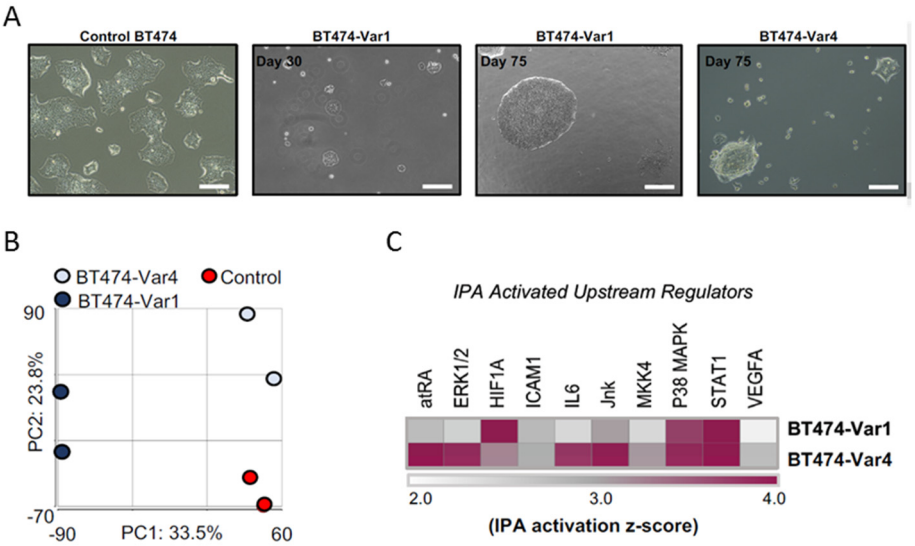


図 3. NR2F1-AS1 の強制発現の効果の検証

A) long variant（Var1）と short variant（Var4）の強制発現後の細胞形態の変化

B) long variant（Var1）と short variant（Var4）の強制発現後の遺伝発現の主成分解析

C) IPA を用いた強制発現後の遺伝子経路の変化の解析

考　察

これらの研究成果より同定された lncRNA が乳がんの再発した原発腫瘍で発現が亢進していることから予後予測をするうえで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。NR2F1-AS の発現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、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いたことが示された。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、国立がん研究センター研究所細胞情報学分野の Anna Sanchez Calle および機能解析部門の竹下文隆である。この場を借りて御礼申し上げる。

文　献

1） Hon CC, Ramilowski JA, Harshbarger J, Bertin N, Rackham OJ, Gough J, Denisenko E, Schmeier S, Poulsen TM, Severin J, Lizio M, Kawaji H, Kasukawa T, Itoh M, Burroughs AM, Noma S, Djebali S, Alam T, Medvedeva YA, Testa AC, Lipovich L, Yip CW, Abugessaisa I, Mendez M, Hasegawa A, Tang D, Lassmann T, Heutink P, Babina M, Wells CA, Kojima S, Nakamura Y, Suzuki H, Daub CO, de Hoon MJ, Arner E, Hayashizaki Y, Carninci P, Forrest AR. An atlas of human long non-coding RNAs with accurate 5' ends. Nature. 2017 Mar 9;543(7644）:199-204. doi: 10.1038/nature21374. Epub 2017 Mar 1. PMID: 28241135

2） Ji P, Diederichs S, Wang W, Böing S, Metzger R, Schneider PM, Tidow N, Brandt B, Buerger H, Bulk E, Thomas M, Berdel WE, Serve H, Müller-Tidow C. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. Oncogene. 2003 Sep 11;22(39）:8031-41. PMID: 12970751

3） Schmitt AM, Garcia JT, Hung T, Flynn RA, Shen Y, Qu K, Payumo AY, Peres-da-Silva A, Broz DK, Baum R, Guo S, Chen JK, Attardi LD, Chang HY. An inducible long noncoding RNA amplifies DNA damage signaling. Nat Genet. 2016 Nov;48(11）:1370-1376. doi: 10.1038/ng.3673. Epub 2016 Sep 26. PMID: 27668660