

エストロゲン制御性non-coding RNAの乳がん再発への関与の解明

国立がん研究センター研究所 細胞情報学分野 山本 雄介

和文要約

エストロゲン受容体陽性のルミナル型乳がんの再発は患者の予後を決める上で重要な因子であり、克服すべき大きな臨床上の問題である。術後の最初の5年以内のホルモン内分泌療法は再発リスクを有意に減少させるが、治療後10～20年経過した後に突然再発する腫瘍もある。最近の基礎研究において、長鎖非コードRNA（以下、lncRNAと略す）が腫瘍の発生、進行、転移など様々な過程において関連していることが明らかになってきている。lncRNAの中には、腫瘍の組織や細胞に特異的に機能するものも一定数あることから、申請者は未知のlncRNAの機能を解明することで、腫瘍の再発に関する新たな知見が得られるのではないかと仮定した。本研究課題では、遠隔転移を起こした患者と再発の兆候のない患者から得られた原発腫瘍24例の遺伝子発現プロファイルを比較することにより、腫瘍の再発に関連して発現するlncRNA群を同定した。それらのlncRNAの中で、特に、NR2F1-AS1（Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 1 Antisense RNA 1）が、エストロゲン受容体陽性のルミナル型乳がん細胞におけるホルモン受容体（エストロゲン受容体やプロゲステロン受容体）の発現との間に相関関係があることを見出した。さらに、NR2F1-AS1の発現亢進は、休眠誘導因子や多能性マーカーの発現亢進により、がん細胞を休止状態に誘導し、転移に関連する遺伝子経路を活性化することが示唆された。本研究で得られた結果は、エストロゲン受容体陽性乳がんの再発過程におけるNR2F1-AS1の動態を明らかにし、治療法としての可能性を持つ新たなバイオマーカーを示すものであり、臨床への応用が期待される。

緒言

乳がんは食生活の欧米化に伴いその患者数が増えているがんではあるが、マンモグラフィー検診などの普及により早期発見が進み乳がん全体での5年生存率は90%を超えている。しかしながら、壮年期に限ると女性の死因1位の疾患であり、その主な死亡原因は再発・転移によるものである。エストロゲン受容体陽性の乳がんの10～40%は、術後の治療を中止して10年以上の長期経過後に再発を起こすことがある(1)。再発までの時間は腫瘍の種類によって異なっており、エストロゲン受容体陰性腫瘍はより侵襲性が高く、診断後約2～5年で再発する傾向がある。対照的にエストロゲン受容体陽性乳がんは、診断後最初の5年間は再発のリスクが低くなっている。再発までの時間の違いは、特定のがん細胞が体液中を移動し、遠隔組織にコロニーを形成した後、前転移ニッチを確立する能力に関連している可能性があることが示唆されている。遠隔の組織に移動したがん細胞は、そこで休眠状態に入り長期間休眠状態を維持したまま、静かに生存し続けることが

分かっている。つまり、長期間経過後に再発する乳がん細胞は、遠隔転移した組織内で休眠状態から目覚め、再び増殖のスイッチが入った乳がん細胞から生じると考えられている。休止状態から覚醒状態へのスイッチとなる因子や刺激はがん細胞が転移した先の微小環境にあると考えられており、休眠誘導因子としては、トランスフォーミング増殖因子 β や骨形成誘導因子などが知られているが、その多くはまだ不明である(2)。

長鎖非コードRNA（以下、lncRNAと略す）は200～数千ヌクレオチドを超える非コードの転写産物であり、高い組織/細胞特異的活性を示す。その機能は多岐にわたり、遺伝子やゲノム調節の複数の分子機構に関与していることが近年の研究で明らかになっている。lncRNAは疾患や発達障害に関与しているため、臨床的にもバイオマーカーや治療標的として注目を集めている。乳がんとの関連も多く報告されており、具体的には有名なlncRNAとして知られるMALAT1（metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript-1）は、エストロゲン受

容体陽性の乳がん細胞株の腫瘍進行に寄与することが示され、乳がん細胞の脱分化過程における細胞膜タンパク質CD133の発現を制御することが示されている (3)。HOTAIR (HOX Transcript Antisense RNA) は乳がんの早期段階の腫瘍における転移に関わっていること、また乳がんの予後を予測するバイオマーカーとなりうることが報告された (4)。LncRNAが、がん促進因子として機能するだけでなく、抑制的に働く報告も数多くありその機能は多岐にわたっている (5)。

本研究課題では、24症例のエストロゲン受容体陽性ルミナル型の乳がんの原発腫瘍を再発および非再発群に分け、遺伝子の発現プロファイルと比較することによって、乳がんの再発に関わるlncRNAの探索ならびに機能解析を実施した。さらに、それらとホルモン受容体因子の関連、細胞の休止に関わる遺伝子・経路の検証を実施した。

方法

臨床検体

乳がん患者の臨床検体は、国立がん研究センター中央病院から提供された。国立がん研究センター内部審査委員会の承認を得て実施された (第2013-173号)。合計24個の原発性腫瘍サンプルを針生検で採取した。14サンプルは再発なし (少なくとも10年以上再発が認められない) とし、10サンプルは10年以内に再発した原発腫瘍とした。

細胞培養および遺伝子導入

細胞株は抗生物質入り10%胎児牛血清添加下でRPMI1640基礎培地によって37°Cおよび5%二酸化炭素状態で培養した。BT474細胞株にトランスフェクションしたプラスミドは、NR2F1-AS1の短いバリエーションVar4と長いバリエーションVar1の配列を含むpcDNA3.1ベクターを使用した。トランスフェクションは、Nucleofector™ 2bデバイス (Lonza Bioscience) をした。

RNA抽出と定量化

High Capacity Reverse cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を使用し、細胞から単離された1 μ gのトータルRNAからcDNAを合成した。TaqMan Gene Expression Assays (ThermoFisher Scientific) および

Platinum™SYBR™Green qPCR SuperMix-UDG (ThermoFisher Scientific) で特定のプライマーを使用して、定量的PCR法によって標的遺伝子を検出した。

マイクロアレイ

Agilent SurePrint G3 Human GE v2 8x60Kマイクロアレイ (デザインID:039494) を用いて遺伝子発現解析を実施した。各遺伝子の発現量はAgilent Feature Extractionソフトウェアバージョン11.5.1.1およびAgilent GeneSpringバージョン13.1.1を使用して定量化した。log2変換された遺伝子の発現値はPartek Genomics Suite 6.6 (Partek Inc.) およびIngenuity Pathway Analysis (以下、IPAと略す) により解析を行った。

細胞の足場非依存性の検討

足場非依存性の検討には、CytoSelect Anoikis Assay (CBA-081, Cell Biolabs, Inc.) を使用した。NR2F1-AS1-Var1、Var4、またはコントロールプラスミドを、リポフェクタミン3000試薬でトランスフェクトし、細胞を、正常および接着耐性のある96ウェルプレートに播種し、生存率を検証した。

移植実験

NR2F1-AS1-Var1および対照のプラスミドを、リポフェクタミン3000試薬 (ThermoFisher Scientific) を用いてBT474細胞に一過性にトランスフェクションした。その2日後に、トランスフェクションした細胞 (5×10^5 細胞) を免疫不全マウスに静脈注射した。注入から3日後、マウスを安楽死させて解剖し、肺組織を採取した。転移した細胞はヒト特異的プライマー (6) およびマウス特異的プライマー (7) を用いたゲノムDNAの定量的PCRにより検出した。本実験は国立がん研究センター動物委員会の承認を受けて実施された (T19-010)。

統計処理

データは平均 \pm 標準誤差 $n=3$ のサンプルを使用した。2群間比較では、Student's t検定で統計的有意性を決定した。多群間比較では、平均値の違いの有意性はDunnnett検定により分析した。統計的有意差は* $p < 0.01$ および** $p < 0.001$ として定義した。

結果

再発関連因子としてNR2F1-AS1の同定

エストロゲン受容体陽性のルミナル型乳がんの再発に関わるlncRNAを同定するために、再発および非再発症例の乳がん原発腫瘍を用いたマイクロアレイ解析を行った。その結果、35個のlncRNAの発現が有意に再発した原発腫瘍で上昇しており、一方で17個のlncRNAの発現が有意に減少していた（図1A）。それら52個のlncRNAの発現データを用いて教師なしのクラスタリング解析を行ったところ、再発群と非再発群を大まかに分類することができた（図1B）。再発群において、発現が上昇している35個の中で、ルミナルA型およびルミナルB型の両方で発現が上昇しているlncRNAとして5個に絞り込んだ（図1C）。それら5個のlncRNAの発現量は検体をルミナルA型とルミナルB型に分けても、2倍以上

発現が上昇している（図1D）。定量的PCR法で発現量の検証を行ったところ、NR2F1-AS1のみで有意差が確認された（図1E, F）。

ホルモン受容体とNR2F1-AS1の発現相関

エストロゲン受容体陽性のルミナル型乳がんの再発症例において、NR2F1-AS1の発現が亢進していたため、次にNR2F1-AS1とエストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、HER2遺伝子との発現の相関を臨床検体において検討した（図2A）。再発した乳がんの原発腫瘍のデータを用いて解析したところ、エストロゲン受容体とNR2F1-AS1には弱い負の相関がみられ、プロゲステロン受容体とNR2F1-AS1には強い負の相関が確認された。一方で、HER2遺伝子とは弱い正の相関が確認された（図2A）。9種類の細胞株において、それらの遺伝子の

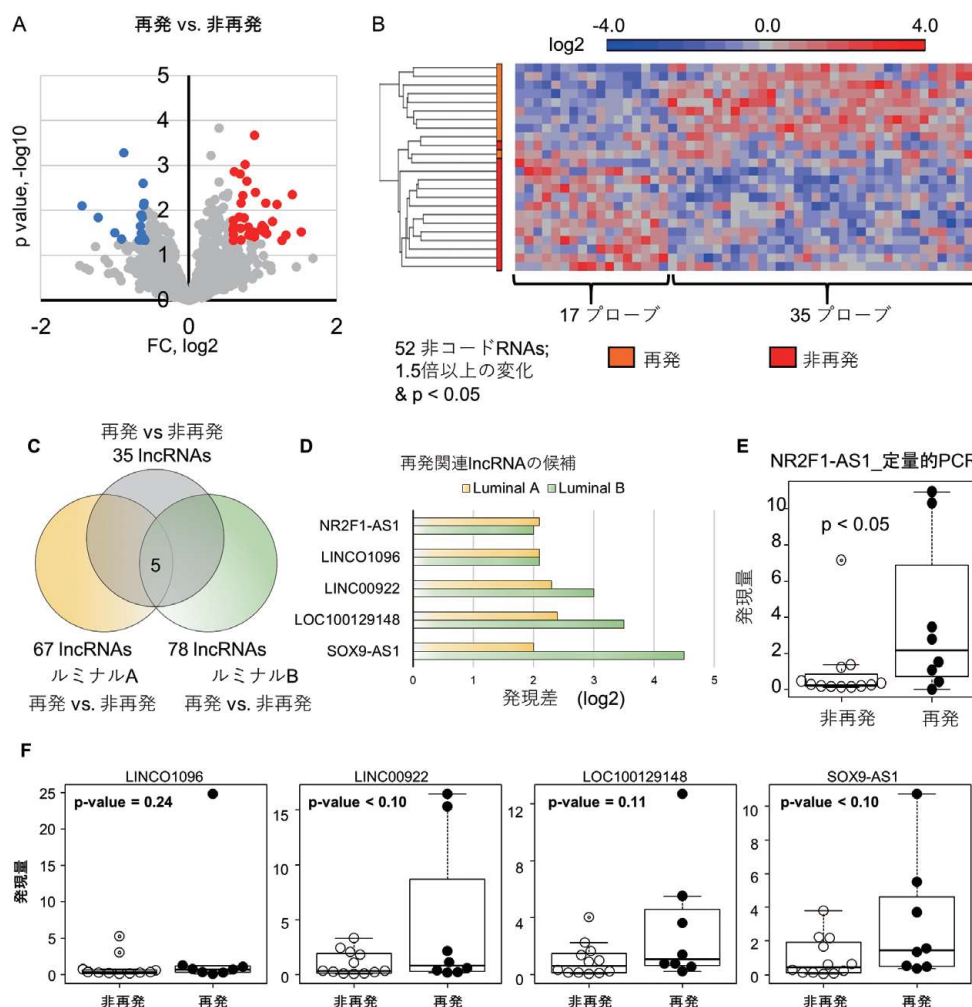


図1. 乳がん再発関連因子としてのNR2F1-AS1の同定

A. 再発・非再発群で発現変化のあったlncRNA. B. 再発症例で再発上昇した35個のlncRNAおよび減少した17個のlncRNAのヒートマップ. C, D. ルミナルA型とB型の両方で共通して発現上昇が認められたlncRNAの抽出. E, F. 定量的PCR法によるlncRNAの発現の確認

発現を確認した (図2B)。その結果、細胞株においても、臨床検体と同様に、エストロゲン受容体とプロゲステロン受容体はNR2F1-AS1に対して、負の相関を示し、HER2は正の相関が確認された (図2C)。

エストロゲン受容体やプロゲステロン受容体がNR2F1-AS1のプロモーター部位に直接結合して、発現の制御を行っているかを免疫沈降法によって確認した (図2D)。その結果、MCF7とT47D乳がん細胞株の両方において、エストロゲン受容体とプロゲステロン受容体がNR2F1-AS1のプロモーター部位に結合することが示された。

NR2F1-AS1の強制発現による生体外での機能解析

NR2F1-AS1を強制発現させ、その表現型を確認

した。NR2F1-AS1には10種類のバリエントがあり、その中で、長いバリエントのNR2F1-AS1 Variant 1 (Var1) と短いバリエントのVariant 4 (Var4) を用いた。機能解析のため原発腫瘍に由来してNR2F1-AS1の発現がないBT474細胞株にエレクトロポレーションでVar1とVar4をそれぞれ導入した。両方のバリエントの過剰発現によって、細胞増殖速度は弱まった。細胞生存率は徐々に低下し、長期培養によって60日目に小さなコロニーが観察された。75日後、コロニーは対照群のBT474細胞と比較して顕著な形態学的変化を示した (図3A)。

NR2F1-AS1-Var1を導入した細胞において顕著な差が見られたため、活性化している遺伝子経路をIPAによって解析した。NR2F1-AS1-Var1を導入した細胞においては細胞の休眠に関わる経路と細胞増

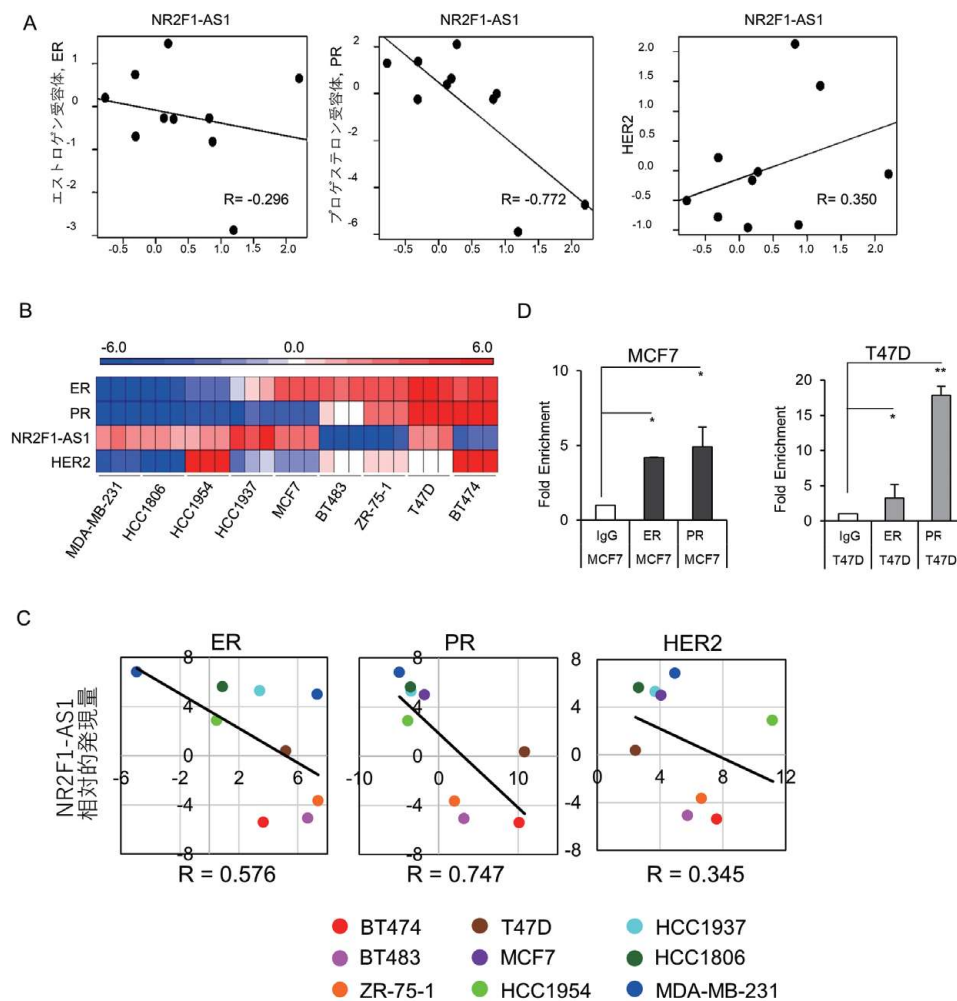


図2. NR2F1-AS1とホルモン受容体の相関性

A. 再発腫瘍におけるNR2F1-AS1とホルモン受容体の発現相関 B. 乳がん細胞株でのNR2F1-AS1とホルモン受容体の発現量のヒートマップ. C. 乳がん細胞株でのNR2F1-AS1とホルモン受容体の相関. D. 免疫沈降法によるホルモン受容体のNR2F1-AS1プロモーター領域への結合の確認

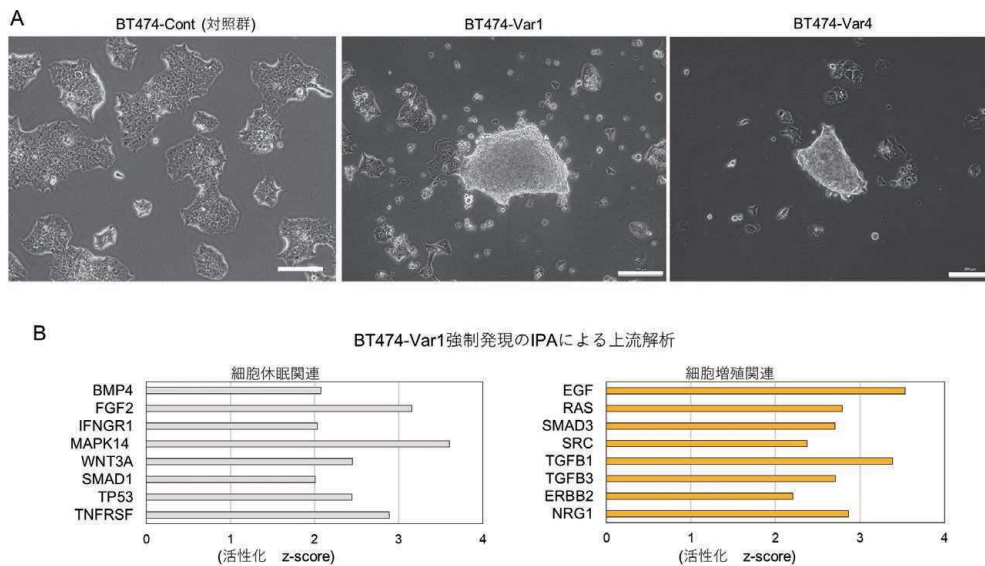


図3. NR2F1-AS1の再発に関わる機能解析

A. BT474細胞へのNR2F1-AS1-Var1とNR2F1-AS1-Var4の強制発現実験，スケールバー：200 μ m. B. IPAによるNR2F1-AS1-Var1強制発現細胞での活性化経路の探索

殖に関わる経路の両方が検出された（図3B）。

つまり、休止状態から覚醒状態のさまざまなポイントでの細胞重集団の共存を示唆している。増殖を再開するためには、EGF、RAS、TGF β を活性化させる必要があることが推定された。

NR2F1-AS1強制発現の転移における機能解析

NR2F1-AS1の強制発現が細胞に与える影響について、Var1とVar4を強制発現させたBT474細胞の足場非依存性を確認するため、非接着プレートと通常の細胞培養プレートでの生存率を確認したところ、通常の培養条件では、Var1とVar4を強制発現させたBT474において、細胞増殖が減っていることが確認されたが、非接着状態では、それは確認されなかった（図4A）。つまり、Var1とVar4を強制発現させたBT474は少しではあるが、足場非依存的に生存する割合が増えていることを見出した（図4B）。

さらに、その性質が生体内における転移に関わるかを検証するために、Var1を強制発現させたBT474を免疫不全マウスの尾静脈に注射し、マウス肺への転移能を解析した。肺へ転移した細胞はヒトゲノム特異的なAlu配列を定量的PCR法によって、検出することによって、推定した。その結果、有意差は認められなかったものの、Var1を強制発現させたBT474がより、肺へ移動し接着している傾向が確認された。

考察

転移カスケードは、浸潤、新生血管形成、血管内浸潤、播種、体外浸潤、休眠、およびコロニー化のイベントを包含する（8）。腫瘍細胞が二次臓器に移動した後、腫瘍細胞は休眠状態に入り、長い無症状期間休眠状態のままになることがある。したがって、長期間経過した後の再発は、前転移性ニッチを確立し、休眠状態から覚醒した転移性の細胞から再発すると考えられている。本研究の結果より、NR2F1-AS1の発現が転移カスケードに関連する生物学的プロセスを活性化することを発見した。

BT474-Var1において活性化された上流調節因子に対する解析から、休眠および増殖に関連するシグナルの2つの分子パターンの傾向が観察された。これはBT474-Var1の中に、休眠状態から覚醒状態の異なる点での腫瘍細胞の存在を示している。つまり、NR2F1-AS1の発現は乳がん細胞を休眠状態にすることで、細胞の後発的な転移に寄与している可能性が示された。次の重要な問いとしては、休眠状態に陥った細胞がどのような刺激やシグナルによって、長期経過後に覚醒状態になるかを解明することであるが、本研究では、鍵となる分子またはシグナルを同定することができなかった。

これらの結果から、エストロゲン受容体陽性のルミナル型乳がんにおける腫瘍再発の動態の一端とNR2F1-AS1の生物学的関連性を明らかにした。また、NR2F1-AS1の強制発現がエストロゲン受容体

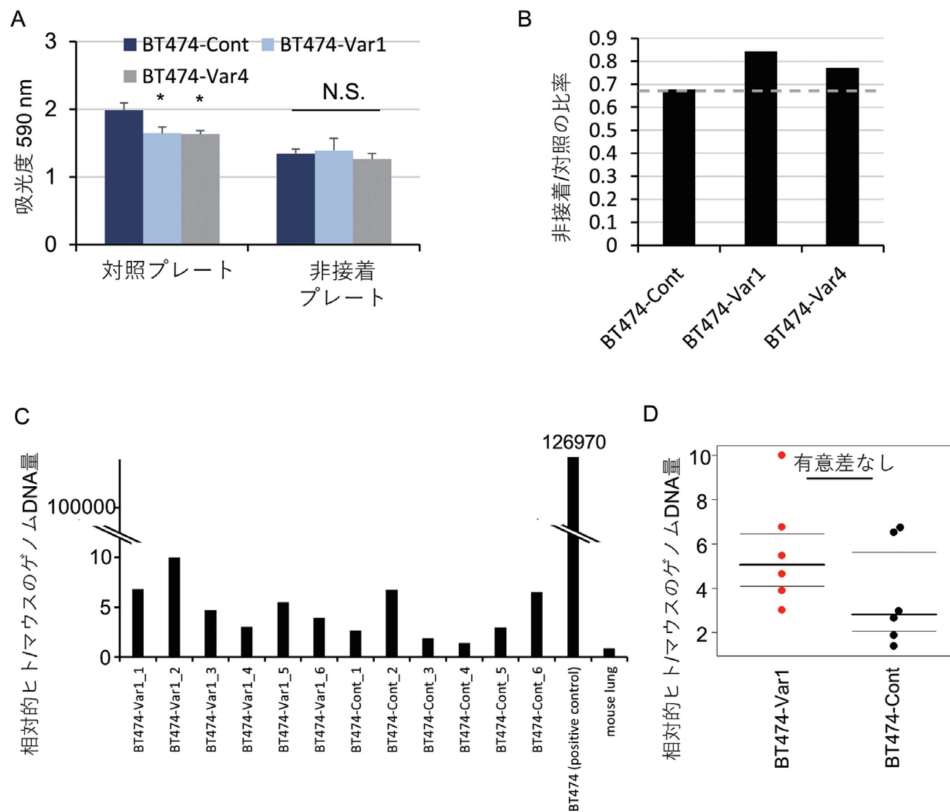


図4. NR2F1-AS1の移転に関する機能解析

A,B. NR2F1-AS1-Var1とNR2F1-AS1-Var4の強制発現による細胞足場非依存性の検討。 C. 移植したBT474でのNR2F1-AS1-Var1(n=6)とNR2F1-AS1-Cont(n=6,対照群)のヒトとマウスゲノムDNAの比率。 BTA474細胞のゲノムDNA: 陽性対照, マウス肺ゲノムDNA: 陰性対照。 D. ヒトとマウスゲノムDNAの比率のドットプロット

陽性のルミナル型乳がん に 休止期様の状態を誘導することを明らかにした。これらの知見は、新たな乳がんの予後予測アプローチや新たな治療法の開発につながる可能性がある。

参考文献

1. Pan H, Gray R, Braybrooke J, et al., 20-Year risks of breast-cancer recurrence after stopping endocrine therapy at 5 years. *N Engl J Med* 2017, 377, 1836–1846.
2. Giancotti FG. Mechanisms Governing Metastatic Dormancy and Reactivation. *Cell*, 2013, 155, 750-764.
3. Jadhavi M, Zong X, Malakar P, et al. Functional and prognostic significance of long non-coding RNA MALAT1 as a metastasis driver in ER negative lymph node negative breast cancer. *Oncotarget*. 2016, 7, 40418-40436.
4. Gupta RA, Shah N, Wang KC, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*. 2019, 464, 1071–1076.
5. Sanchez Calle A, Kawamura Y, Yamamoto Y, et al. Emerging roles of long non-coding RNA in cancer. *Cancer Sci*. 2018, 109, 2093-2100.
6. Funakoshi K, Bagheri M, Zhou M, et al. Highly sensitive and specific Alu based quantification of human cells among rodent cells. *Sci Rep* 2017, 7, 13202.
7. Duleba M, Yamamoto Y, Neupane R, et al. Cloning of ground state intestinal stem cells (gISC) from endoscopic biopsies. *Nat Protoc*, 2020, 15, 1612–1627.
8. Dasgupta A, Lim AR and Ghajar CM. Circulating and disseminated tumor cells: harbingers or initiators of metastasis- *Mol Oncol* 2017, 11, 40–61.

Abstract

Recurrence of estrogen receptor (ER)-positive luminal breast cancer is a major clinical problem, leading to poor prognosis. Hormonal endocrine therapy within the first 5 years after surgery significantly improves the patient prognosis; however, some tumors unexpectedly recur 10 to 20 years after treatment. Recent evidence has demonstrated that long non-coding RNAs (lncRNAs) are associated with various processes of cancer progression. In this study, by comparing the gene expression profiles of 24 primary tumors obtained from patients with recurrence and those without recurrence, we identified a group of lncRNAs that are associated with tumor recurrence. Among those lncRNAs, NR2F1-AS1 was specifically identified as a lncRNA whose expression is related to hormone receptors. Furthermore, our data suggest that enhanced expression of NR2F1-AS1 induces cancer cells into a quiescent state by increasing the expression of dormancy-inducing factors and pluripotency markers, and activates gene pathways associated with metastasis. The results clarify the dynamics of NR2F1-AS1 during the recurrence process of estrogen receptor-positive breast cancer and represent a new biomarker with therapeutic potential, which is expected to be applied to clinical practice.