

論文の内容の要旨

論文題目 乳がん細胞における次世代シーケンサーを用いたエストロゲン応答遺伝子の探索

氏名 山賀 亮之介

乳がんは女性において最も多いがんであり、現在も増加傾向にある。本邦においても、食事など生活スタイルの欧米化に伴い乳がんが増加し、現在日本女性の罹患率第一位の悪性新生物となっており、その対策が求められている。

乳がんはエストロゲンによってその発生・増殖・浸潤・転移などのシグナルを受ける、ホルモン感受性がんの一つである。その為、抗エストロゲン薬であるタモキシフェンなどがホルモン療法として用いられ、治療の観点からもエストロゲンシグナルが重要な因子と考えられる。一方で、一部の乳がんはホルモン療法に対して耐性を獲得しており、予後を増悪させている。

これまで、エストロゲンシグナルを解明することにより、乳がんの発達・進展の機序解明や、治療の開発、ホルモン療法抵抗性に関する検討などが行われてきた。しかし、エストロゲンは核内受容体であるエストロゲン受容体に受容された後、転写因子として多くの遺伝子の発現を調整するほか、二次的・三次的にも様々なシグナルに多段階で影響を与え、そのネットワークは非常に複雑なため、未だ十分な解明に至っていない。

今までゲノムワイドのエストロゲンシグナル解析は主にマイクロアレイ法にて行われてきたが、近年の次世代シーケンサーの急速な発達と普及により、正確に多くのデジタル的な DNA・RNA・エピゲノムの評価が可能になっている。

本研究においては、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析によって乳がん細胞におけるエストロゲンシグナル解析を行い、乳がんの増殖や進展の分子メカニズムを明らかにすると同時に、新たなマーカーや予防法、治療法への開発への道を探索することを目的とした。

エストロゲン受容体陽性のヒト乳がん細胞株である MCF-7 に対し、3 日間エストロゲン枯渇状態で培

養した後に 100 nM の 17 β エストラジオール (E₂) を添加し、添加前 (0 時間) 及び添加後 (2, 4, 8, 12, 24 時間) に、RNA を採取した。

採取した RNA を精製し、CAGE (Cap Analysis of Gene Expression)-Seq 及び RNA-Seq の手法で次世代シーケンサー Illumina GA II x を用いたシーケンスを行った。CAGE-Seq は、mRNA の CAP 構造を認識して、5' 末端の 20 塩基のみをシーケンスし、転写産物の転写開始点の同定とその発現定量化を行う方法である。一方、RNA-Seq は mRNA をランダムに切断した mRNA 断片を全てシーケンスすることによって、転写産物全長の評価とその発現定量化を行う方法である。

CAGE-Seq 及び RNA-Seq の結果得られた RNA 配列を NCBI Human Build 36.1 のリファレンスゲノムにマッピングし、各転写産物の定量的評価を行った。各シーケンス結果よりエストロゲン応答性を示す転写産物を抽出し、定量的 RT-PCR にてエストロゲン応答性を検証し、エストロゲン応答遺伝子を同定した。さらに、siRNA を用いた機能スクリーニングによって、MCF-7 の増殖および遊走に影響を与える遺伝子を検索した。

CAGE-Seq によって得られたシーケンスタグに関して、400 塩基以内に存在するタグをまとめ、一つの Tag Cluster (TC) と定義し、転写開始点における mRNA の発現を示すグループとして解析した。その結果、リファレンスゲノムにマッピングされる全 34,861 個の TC を同定した。そのうち、E₂ 刺激によって、時系列 (2, 4, 8, 12, 24 時間) のいずれかの時点で E₂ 負荷前(0 時間)に比べて 1.5 倍以上変動するエストロゲン応答 TC は、全体の 1,550 個 (14.2%) 存在した。さらに、既報データベースのエストロゲン受容体結合部位 (ERBS; Estrogen Receptor Binding Site) の近傍 10 kb 以内に存在し、既知遺伝子 (RefSeq 遺伝子) の転写開始点にマッピングされる、高発現・高エストロゲン応答性の TC を 26 個同定した。この 26 個の TC に相当する 26 遺伝子に対して、定量的 RT-PCR を用いて MCF-7 における同時系列(0, 2, 4, 8, 12, 24 時間)での E₂ 負荷 RNA 発現解析を行い、15 遺伝子のエストロゲン応答性を検証した。その内、12 遺伝子は今までエストロゲン応答の報告がない、新規のエストロゲン応答遺伝子であった。

RNA-Seq によって得られたシーケンスタグに関しては、各 RefSeq 遺伝子のエクソンにマッピングされるタグをカウントし、発現変動解析を行った。その結果、同じく ERBS 近傍 10 kb 以内に存在する高発現・高エストロゲン応答性の Refseq 遺伝子を、37 遺伝子同定した。この 37 遺伝子に対して、CAGE-Seq と同様に qRT-PCR による RNA 発現解析を行い、29 遺伝子のエストロゲン応答性を検証した。そのうち、21 個の新規のエストロゲン応答遺伝子が含まれていた。

CAGE-Seq 及び RNA-Seq より抽出した再現性のあるエストロゲン応答遺伝子のうち、GREB1、CA12、PPM1D の 3 遺伝子は両方で重複していた。重複を除く計 41 遺伝子(うち、新たにエストロゲン応答性を同定した遺伝子は 32 遺伝子)に関して、それぞれの遺伝子に対する siRNA を用いて各遺伝子をノックダウンし、MCF-7 細胞における増殖、遊走、エストロゲン受容体活性に対する影響を検討した。細胞の増殖は MTS アッセイによって、細胞の遊走はトランスウェル遊走試験によって、エストロゲン受容体活性に対する影響はエストロゲン応答配列を組み込んだレポーター遺伝子によるプロモーターアッセイによって検証した。

その結果、エストロゲン応答性 41 遺伝子のうち、10 遺伝子のノックダウンによって、増殖もしくは遊走が有意に影響を受けた。この 10 遺伝子の内、GPRC5C を除く 9 遺伝子はエストロゲンによって発現が亢進され、ノックダウンする事で増殖もしくは遊走が抑制された。GPRC5C のみがエストロゲンによって発現抑制を受け、ノックダウンする事で増殖が亢進された。

この 10 遺伝子の中で、乳がん細胞における浸潤および腫瘍形成を促進する RAMP3、がん原遺伝子である MYC、細胞周期の進行を担う CCND1 の 3 遺伝子は、既にエストロゲン応答性の報告がされている遺伝子であった。その他 7 遺伝子は乳がん細胞の増殖・遊走に影響を与え得る新規のエストロゲン応答遺伝子と考えられた。これらの中には、既報にて乳がんの発達や進展に関わることが示されている遺伝子などが含まれていた。

CAGE-Seq によって同定された新規のエストロゲン応答遺伝子である VDAC2 は、ミトコンドリアからのシトクローム C 放出によってアポトーシスを促進する BAK に結合し、その機能を阻害する事で抗アポト

ーシスに働く事が示されている遺伝子であり、エストロゲンによる抗アポトーシス作用に関する新たな因子として考えられた。

同じく CAGE-Seq によって同定された新規のエストロゲン応答遺伝子である GPRC5C は詳細な機能は判明していない七回膜貫通オーファンG 蛋白共役型受容体であり、本研究により、エストロゲンによって発現抑制を受け、ノックダウンすることによって MCF-7 の増殖を亢進する作用が認められ、この分子の乳がんに対する新たな治療薬開発への可能性も示唆された。

また、RNA-Seq によって同定された新規のエストロゲン応答遺伝子である EIF3A は、細胞周期や分化を制御する転写開始因子であり、本研究においてはがん促進的に働く可能性が示唆された。

同じく RNA-Seq によって同定された新規のエストロゲン応答遺伝子である TPD52L1 は細胞周期同調的に発現し、細胞周期の抑制因子である 14-3-3 ファミリーと結合する事が知られている。この遺伝子に関しても、乳がんにおける新たなエストロゲンシグナルの存在が示唆された。

さらに、CAGE-Seq 及び RNA-Seq の結果より、今まで遺伝子の存在が報告されていない領域に、CAGE-Seq 及び RNA-Seq 両方でエストロゲンによって発現が亢進される新たな転写産物を同定した。定量的 RT-PCR 法によってもこのエストロゲンによる転写亢進が検証された。この転写産物は長鎖 non-coding RNA である事が想定された。今までエストロゲン応答性の長鎖 non-coding RNA の報告はなく、今回の報告によって新たなエストロゲンシグナル存在の可能性が示唆された。

本研究において、次世代シーケンサーを用いてヒト乳がん細胞株 MCF-7 におけるゲノムワイドのエストロゲンシグナル解析を行い、計 41 個のエストロゲン応答遺伝子を見出した。そのうち、32 個の遺伝子が新規のエストロゲン応答性遺伝子であった。全エストロゲン応答性 41 遺伝子を siRNA によって系統的にノックダウンすることにより、MCF-7 の増殖もしくは遊走に影響を与える 10 遺伝子を特定した。さらに、新規のエストロゲン応答性長鎖 non-coding RNA を同定することに成功した。これらの結果により、乳がんの増殖や進展に関わるエストロゲン応答経路の一部を明らかにした。