

ノンコーディングRNAによる3次元ゲノム構造の制御

山本 達郎, 市川 雄一, 斉藤 典子

1. はじめに

ノンコーディングRNAはタンパク質に翻訳されないRNAで、転写をはじめ多くの生理現象を制御する。ヒトゲノムDNAは遺伝子以外の領域も含めてほぼ全域が転写されるため、生体内には多種多様のノンコーディングRNAが存在する¹⁾。これらの多くは細胞種、発生・分化時期、がんなど疾患特異的に発現し、その一部は核内にとどまり、クロマチンと相互作用してその構造や機能を制御する²⁾。

乳がんの多くは、女性ホルモンのエストロゲンに結合して働くエストロゲン受容体 (estrogen receptor: ER) を発現するER陽性で、エストロゲン作用を阻害する内分泌療法が施される。しかし、長期の治療過程で耐性を獲得して再発することが問題である。我々は、この治療耐性を獲得した乳がんのモデル細胞を用いた解析で、再発に関わるノンコーディングRNA、エレノアを発見した³⁾。本稿では、クロマチン構造形成に関するノンコーディングRNAの新たな働きについて、エレノアを中心に紹介する。

2. 乳がんの再発過程で過剰発現するノンコーディングRNAエレノア

我々はER陽性ヒト乳がん細胞株であるMCF7細胞をエストロゲン除去培地で長期間培養して、エストロゲン非依存性に増殖能を獲得したLTED (long term estrogen deprivation) 細胞を樹立し、これを治療耐性獲得乳がんモデル細胞として用いている (図1A)。MCF7細胞は増殖にエストロゲンを必要とするため、エストロゲン除去の初期段階では多くの細胞死が起きる。しかし、この環境で増殖することができる能力を獲得したLTED細胞が現れ、これは、再発または閉経後に発生した腫瘍を再現している⁴⁾。LTED

細胞においてERをコードする*ESR1* 遺伝子発現の活性化は、エストロゲン枯渇環境に対してがん細胞が生き残るための細胞応答として重要である。その理由の一つとして、より低濃度のエストロゲンでもがん細胞の生存に必要なエストロゲンを確保できるようになることがある。我々は、LTED細胞における*ESR1* の高発現は、*ESR1* 遺伝子座を含む約700 kbの大きなクロマチンドメイン内で複数の場所から両鎖に多数転写されるエレノアRNA群によって誘導されることを見いだした³⁾。今までに3種のエレノアについて解析を行っており、それらが400~1200 nt長以上で、低コピー数のものに加え、*ESR1* mRNAよりも豊富に転写されるものがあることを認めている。エレノアをFISH法により可視化したところ、エレノアが自身の転写部位にとどまり、エレノアRNAクラウドと呼ばれるRNAの塊を形成し、*ESR1* の転写を活性化することを明らかにした³⁾ (図1A)。しかしながら、エレノアを含め核内ノンコーディングRNAが転写を活性化する分子メカニズムは不明であった。

真核生物のゲノムDNAは、クロマチンを形成して細胞核内に収納されている。クロマチンの基本構造はヒストン八量体にDNAが巻きついたヌクレオソームであり、非常に安定で、転写やDNA複製を抑制する。そこで我々はエレノア転写活性化のメカニズムを解明するために、エレノアRNA (断片) が*in vitro*再構成ヌクレオソームへ及ぼす影響を調べた。その結果、エレノアのRNA断片は、ヌクレオソームの構成要素であるヒストンH2A-H2B二量体を解離しやすくすることで、ヌクレオソームを不安定化することを発見した (図1B)⁵⁾。さらにLTED細胞を用いて、細胞内のオープンクロマチンを検出するATAC-seq解析を行ったところ、エレノアの転写部位は、クロマチンのアクセシビリティが高く、エレノアRNAによりヌクレオソームが不安定化していると示唆された。つまり、エレノアRNAが自身の転写部位にとどまることで、*ESR1* 遺伝子座においては転写が活性化しやすいクロマチン状態を形成することがわかった。RNAによるヌクレオソームの不安定化は、*in vitro*実験で、*MALAT1* や *XIST* など他のノンコーディングRNAの断片でも検出された。これはRNAによるヌクレオソームの不安定化は、転写活性、および抑制に関わる因子がリクルートされやすい環境を形成していることを示唆している。一方で、多様な二次構造をとらないpoly

がん研究会がん研究所がん生物部 (〒135-8550 東京都江東区有明3-8-31)

Regulation of 3D genome structure by non-coding RNAs

Tatsuro Yamamoto, Yuichi Ichikawa and Noriko Saitoh (Division of Cancer Biology, The Cancer Institute of JFCR, 3-8-31 Ariake, Koto-ku, Tokyo 135-8550, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930141

© 2021 公益社団法人日本生化学会

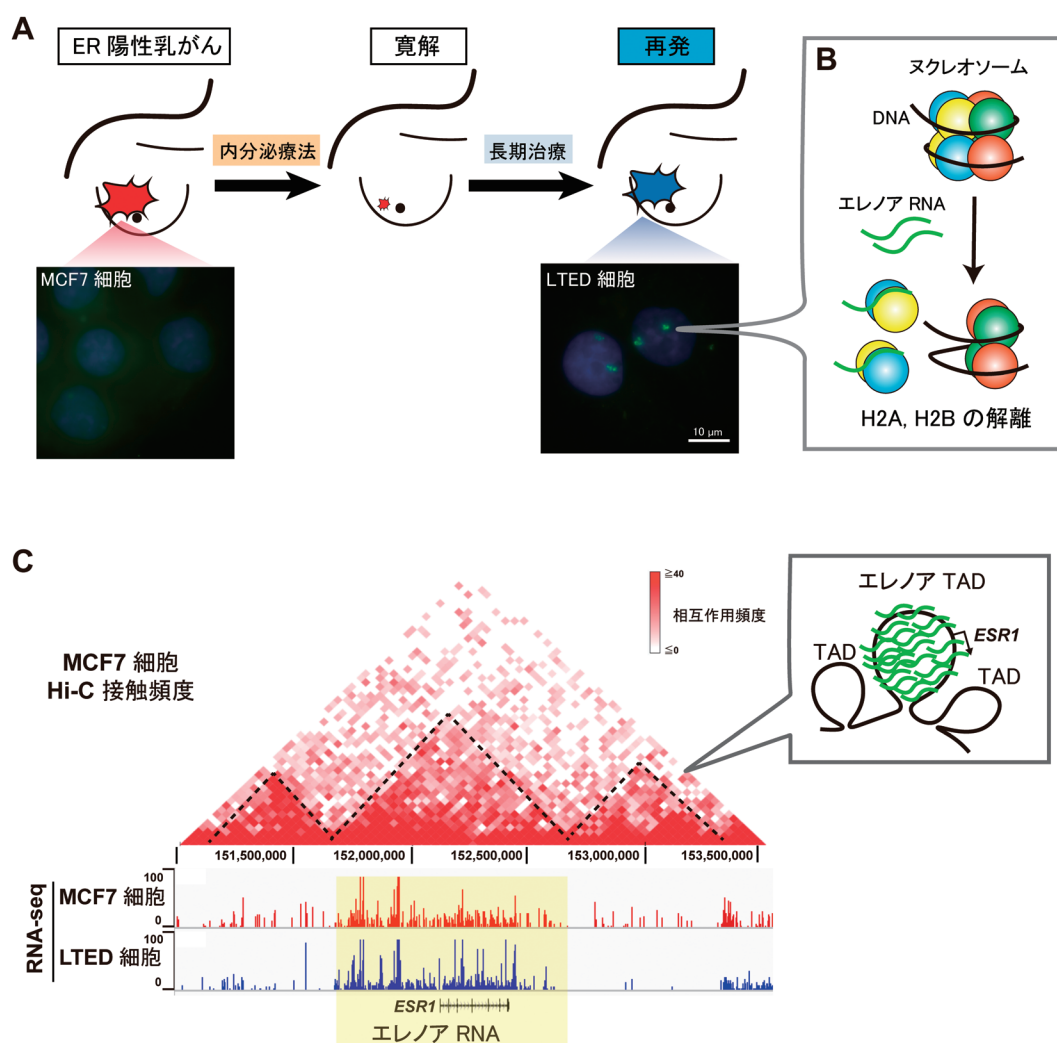


図1 乳がんにおけるノンコーディングRNAによるクロマチン制御

(A)再発乳がんでは*ESR1*の発現が活性化するにあたり、エレンアノンコーディングRNA群が*ESR1*遺伝子を含む約700 kbの広いゲノム領域から転写され、細胞核内にとどまりエレンアRNAクラウドを形成する。下図はFISH画像(緑：エレンアRNA、青：細胞核)。 (B)エレンアRNAは、ヒストンH2A、H2Bをクロマチンから解離させ、クロマチンを緩めることで転写を活性化しやすいクロマチン状態を形成する。 (C) Hi-C解析により、エレンアの転写領域は高次クロマチン構造であるtopologically associating domain (TAD) 領域と一致することがわかった。

(U)RNAやDNAには認めなかった。これらのことから、この活性はRNAに共通する機能であり、核内のクロマチンに作用するノンコーディングRNAがヌクレオソームの不安定化を介し、クロマチンの構造を制御していると示唆された⁵⁾。

エレンア同様に、細胞核の中に蓄積してクロマチンに作用するノンコーディングRNAはさまざまある。一例として、転移乳がんを高発現する*HOTAIR*は、*HOX*遺伝子領域から転写され、転写の抑制に関わるノンコーディングRNAである⁶⁾。*HOTAIR*は、自身が転写される染色体上ではない、ホメオティック遺伝子クラスターの*HOXD*遺伝子領域に、リシン特異的脱メチル化酵素1 (lysine-specific de-

methylase-1 : LSD1) を誘導し、転写活性なH3K4me2マークを除き、また、ポリコム複合体 (PRC2) を呼び込み、転写不活性マークであるH3K27me3を集積させ、転写を抑制する⁷⁾。このことから、ノンコーディングRNAが核内にとどまることで、タンパク質媒介の足場として働くことが示唆される。このようにノンコーディングRNAはエレンアRNAのようにヌクレオソームに作用したり、あるいは、クロマチン再構成複合体や核構造タンパク質に作用することなどにより、クロマチンに作用して転写の促進や抑制するなど、さまざまな機能を有する。

3. クロマチンドメイン構造の形成

Hi-Cは、次世代シーケンサーとクロマチン相互作用を解析するC-テクノロジーを組み合わせた革新的な新規技術である。これにより、ゲノムの3次元空間内の立体構造と、その遺伝子発現調節への寄与が明らかになってきた⁸⁾。クロマチンは、約1~2 Mbのtopologically associating domain (TAD) と呼ばれるいくつかの遺伝子を含んだドメインに区画化された高次構造体を形成していることがわかった⁹⁾。さらに、転写が活性なTADが集合体を作ってAコンパートメント、不活性なTADが集合体を作ってBコンパートメントを形成していることが明らかになった¹⁰⁾。A/Bコンパートメントは、細胞が分化する際に動的に変化するが、TADの区画は異なる細胞間でも保存されることがわかっている。また、長距離のクロマチン間相互作用は、TAD内またはTAD間で起こり、遺伝子発現、細胞分化および疾患に影響を与える¹¹⁾。クロマチン高次構造とノンコーディングRNAの関係性は不明な点が多いため、我々はエレノアがクロマチン高次構造に与える影響を調べた。C-テクノロジーである4C-seqとHi-C解析から、エレノアが転写されているゲノム領域は、TADの区画（エレノアTAD）と一致し、領域内で相互作用していることがわかった（図1C）。さらに、この領域にエレノアがとどまることによりドメイン内の転写が活性化されていた。これらのことから、エレノアは何らかのメカニズムによりRNAクラウドを形成することにより、エレノアTADの活性を制御していることが示唆された¹²⁾。

4. 乳がんの再発過程で活性化されるアポトーシス

以前からエストロゲンの投与は再発乳がんに対して一定の治療効果があることが示されてきたが、その分子メカニズムは不明であった。我々は、エストロゲンや、ポリフェノールの一種であるレスベラトロールが、LTED細胞のエレノアRNAクラウドの形成を抑制し、細胞死を引き起こすことを示した³⁾。レスベラトロールは、エストロゲンと構造的に類似しており、これらの結果は、前述したエストロゲン投与療法を反映していると考えられる。エストロゲンは一般にER陽性乳がんの増殖を促進し、細胞死の一つであるアポトーシスを回避するため、この療法は逆説的な方法であるが、LTED細胞は長期間のエストロゲン枯渇によりエストロゲン刺激によってアポトーシスに移行しやすい脆弱な状態であると考えられることができる。

我々は、レスベラトロールのような効果を持つ天然化合物がないか、大豆に着目して研究を進めた。多様な植物生理活性物質を誘導するために大量の大豆をストレス下で発芽させ、抽出液を分画してLTED細胞に投与したところ、

一部の画分の添加によってエレノアと*ESR1*の転写が抑制され、細胞死が起こった¹³⁾。この画分を、核磁気共鳴分光法と質量分析法で解析すると、大豆の二次代謝物質であるグリセオリンIが活性成分であることがわかった。グリセオリンIは、レスベラトロールよりも効果的に、かつLTED細胞への特性をもって増殖を抑制した。一方で、構造解析によりグリセオリンIは、エストロゲンやレスベラトロールとは異なりERと結合しないことがわかり、ERを介さずにエレノアを阻害する新しい機序があることを見いだした¹³⁾。以上より、治療耐性乳がん細胞は、適切なポリフェノール処理が引き金となってアポトーシスが誘導される脆弱な性質があることが示された¹³⁾。この新たに見いだされたグリセオリンIの作用機序が、治療耐性乳がんの新規治療法を開発する契機につながることが期待される。

5. 治療耐性乳がんの脆弱性における長距離クロマチン相互作用

再発乳がんの脆弱性の根底にある機序を明らかにするため、我々はHi-C法によりクロマチン高次構造を解析した。その結果、エレノアTADは転写活性なAコンパートメントに属し、同じくAコンパートメントに属するFOXO3をコードする遺伝子座と、約40 Mbの長距離をまたいで近接し、相互作用していることを見いだした（図2A）¹²⁾。FOXO3はアポトーシスを誘導する転写因子であることから、LTED細胞では、増殖に働く*ESR1*と、アポトーシスの引き金となるFOXO3が、同じAコンパートメント内で協調的に活性化していることが示唆された。これらのことから、LTED細胞ではアポトーシスの準備が整った状態であると考えられた。そこで、エレノア阻害のためにレスベラトロールを投与したところ、3次元的に近接していた二つの遺伝子間の相互作用が解離し、*ESR1*の発現は低下した。一方、FOXO3は高発現のままであった（図2B）¹²⁾。また、エレノアを標的とした核酸医薬であるアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与したところ、レスベラトロール処理と同様に、エレノアが消失し、FOXO3と*ESR1*の遺伝子間の距離が離れ、アポトーシスが誘導された。以上の結果から、治療耐性乳がん細胞では、細胞核内でエレノアRNAがクロマチン高次構造を制御することで、内部で進展するアポトーシスを克服しながら増殖していると考えられる（図2B）¹²⁾。

3次元クロマチン構造に寄与するノンコーディングRNAは他にもいくつか報告されている。活性化X染色体から転写される*Firre* ノンコーディングRNAは、エレノア同様に核内でRNAクラウドを形成し、染色体間結合のプラットフォームとして機能することが知られている。*Firre*は

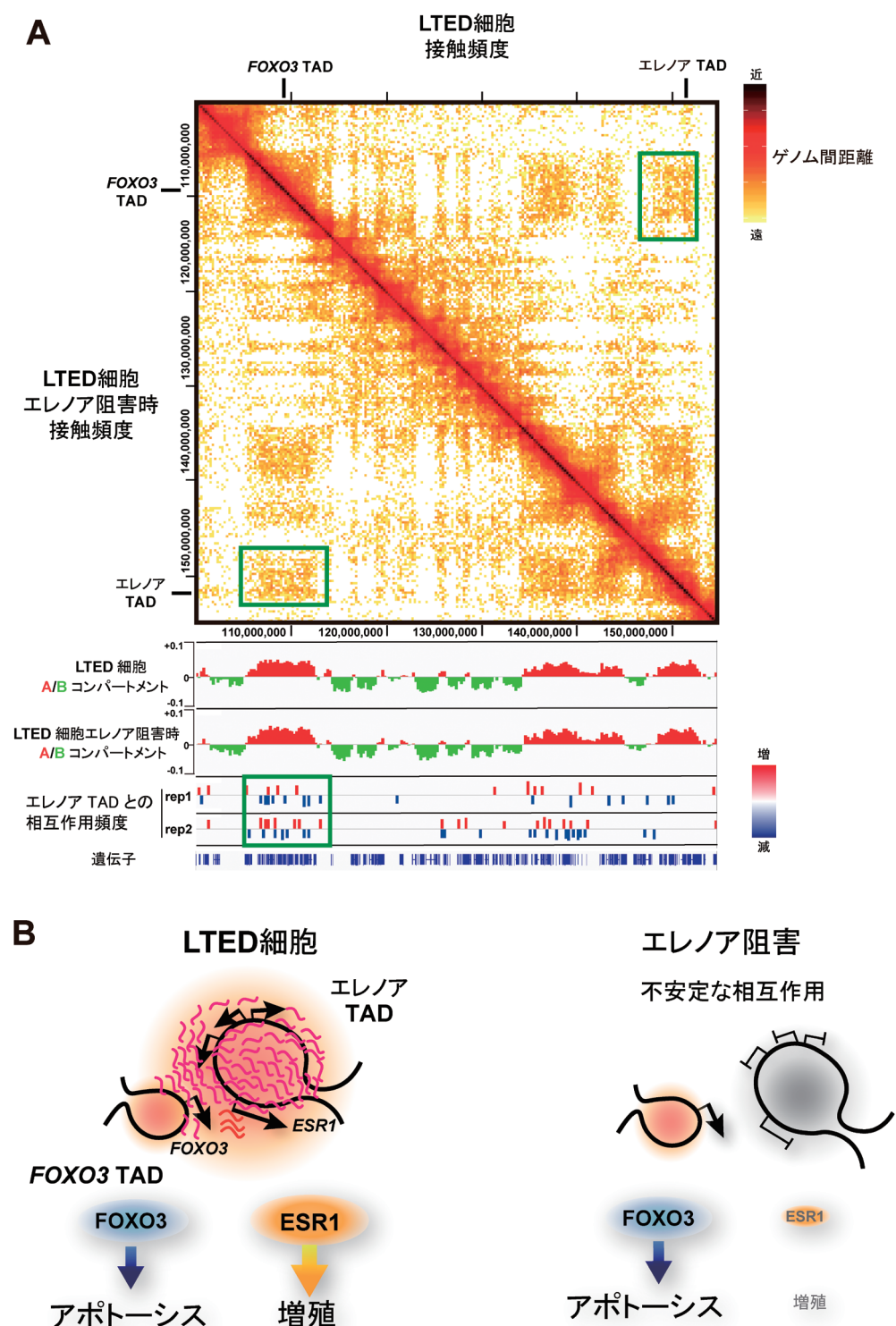


図2 エレノアによる長距離クロマチン相互作用と再発乳がん細胞の脆弱性

(A) Hi-C解析により、LTED細胞でエレノアTADとFOXO3TADは同じAコンパートメント内で3次元的に近接して転写が活性化されることが示された。また、エレノアの阻害により、この相互作用は不安定化した(緑枠)。(B)エレノアは長距離のクロマチン相互作用を媒介する。LTED細胞では、アポトーシスを誘導するFOXO3遺伝子が、細胞増殖に働くESR1遺伝子とともに活性化されており、アポトーシスが誘導されやすい脆弱性を持っている。エレノアを阻害することにより、アポトーシスのみが誘導される。

反復RNAドメインと呼ばれる反復配列を持ち、核マトリックスタンパク質hnRNP Uに結合して、他の染色体上の遺伝子 (*Ppp1r10*, *Slc25a12*, *Ype14* 遺伝子) と相互作用する¹⁴⁾。また、*Firre*は、不活性化X染色体を核小体に固定する機能も果たし、H3K27me3を維持することで、遺伝子発現を抑制する。以上より、*Firre*はトランスに作用して、3次元クロマチン構造を構築する。

UMLILO RNAは、自然免疫記憶における急速な免疫遺伝子の活性化を仲介する。免疫遺伝子 *IL8*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3* がコードされるTADから *UMLILO* が転写され、ヒストンメチルトランスフェラーゼMLL1複合体の構成要素であるWDR5タンパク質と相互作用することで、免疫遺伝子に転写活性マークであるH3K4me3を集積させ、転写を活性化させる¹⁵⁾。これらは、核内ノンコーディングRNAがドメイン単位のクロマチン制御と核内構造に寄与することを示唆している。

6. おわりに

我々は、ER陽性の内分泌療法耐性乳がんは、エストロゲン様の小分子によりアポトーシスを起こしやすい、という脆弱性を持つこと、その背景にノンコーディングRNAを介したクロマチン相互作用があることを明らかにした¹²⁾。これは、細胞増殖と細胞死の相反する作用を持つ二つの遺伝子を協調的に活性化する新しいエビジェネティックモデルを示し、治療耐性乳がん細胞の脆弱性の根底にあるクロマチンドメインの調節機構を示している¹²⁾。この現象の解明は、がん細胞が厳しい環境に適応して生き残る上で巧妙に保たれた遺伝子調節機構のバランスを崩すことが治療につながることを意味する。ノンコーディングRNAを標的とした核酸医薬を用いた治療は、特異性が高く副作用などが少ないと期待され、今後新たな治療法として確立されることが予想される。また、ノンコーディングRNAによる高次クロマチン構造の制御機構を解析することは、新たな生命現象の発見につながり、新規分子マーカーや治療標的を見いだす一つの鍵となると期待される。

謝辞

本稿で紹介した研究成果は、中尾光善研究室（熊本大学発生医学研究所）、胡桃坂仁志研究室（東京大学定量生命科学研究所）、大川泰行研究室（九州大学生体防御医学研究所）、平谷伊智郎研究室（理化学研究所）、中山秀樹研究室・岩瀬弘敬研究室（熊本大学生命科学研究部）、Daiz Incを含む多くの共同研究で達成できたものであり、深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Ponting, C.P. & Belgard, T.G. (2010) Transcribed dark matter: meaning or myth? *Hum. Mol. Genet.*, **19**(R2), R162–R168.
- 2) Rinn, J.L. & Chang, H.Y. (2012) Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu. Rev. Biochem.*, **81**, 145–166.
- 3) Tomita, S., Abdalla, M., Fujiwara, S., Matsumori, H., Maehara, K., Ohkawa, Y., Iwase, H., Saitoh, N., & Nakao, M. (2015) A cluster of noncoding RNAs activates the *ESR1* locus during breast cancer adaptation. *Nat. Commun.*, **6**, 6966.
- 4) Jeng, M.H., Shupnik, M.A., Bender, T.P., Westin, E.H., Bandyopadhyay, D., Kumar, R., Masamura, S., & Santen, R.J. (1998) Estrogen receptor expression and function in long-term estrogen-deprived human breast cancer cells. *Endocrinology*, **139**, 4164–4174.
- 5) Fujita, R., Yamamoto, T., Arimura, Y., Fujiwara, S., Tachiwana, H., Ichikawa, Y., Sakata, Y., Yang, L., Maruyama, R., Hamada, M., et al. (2020) Nucleosome destabilization by nuclear non-coding RNAs. *Commun. Biol.*, **3**, 60.
- 6) Li, Y., Wang, Z., Shi, H., Li, H., Li, L., Fang, R., Cai, X., Liu, B., Zhang, X., & Ye, L. (2016) HBXIP and LSD1 Scaffolded by lncRNA Hotair Mediate Transcriptional Activation by c-Myc. *Cancer Res.*, **76**, 293–304.
- 7) Gupta, R.A., Shah, N., Wang, K.C., Kim, J., Horlings, H.M., Wong, D.J., Tsai, M.C., Hung, T., Argani, P., Rinn, J.L., et al. (2010) Long non-coding RNA *HOTAIR* reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*, **464**, 1071–1076.
- 8) Yamamoto, T. & Saitoh, N. (2019) Non-coding RNAs and chromatin domains. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **58**, 26–33.
- 9) Dixon, J.R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J.S., & Ren, B. (2012) Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*, **485**, 376–380.
- 10) Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N.L., Williams, L., Imakaev, M., Ragoczy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B.R., Sabo, P.J., Dorschner, M.O., et al. (2009) Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*, **326**, 289–293.
- 11) Lupiáñez, D.G., Kraft, K., Heinrich, V., Krawitz, P., Brancati, F., Klopocki, E., Horn, D., Kayserili, H., Opitz, J.M., Laxova, R., et al. (2015) Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell*, **161**, 1012–1025.
- 12) Abdalla, M., Yamamoto, T., Maehara, K., Nogami, J., Ohkawa, Y., Miura, H., Poonperm, R., Hiratani, I., Nakayama, H., Nakao, M., et al. (2019) The *Eleanor* ncRNAs activate the topological domain of the *ESR1* locus to balance against apoptosis. *Nat. Commun.*, **10**, 3778.
- 13) Yamamoto, T., Sakamoto, C., Tachiwana, H., Kumabe, M., Matsui, T., Yamashita, T., Shinagawa, M., Ochiai, K., Saitoh, N., & Nakao, M. (2018) Endocrine therapy-resistant breast cancer model cells are inhibited by soybean glyceollin I through *Eleanor* non-coding RNA. *Sci. Rep.*, **8**, 15202.
- 14) Lewandowski, J.P., Lee, J.C., Hwang, T., Sunwoo, H., Goldstein, J.M., Groff, A.F., Chang, N.P., Mallard, W., Williams, A., Henao-Meija, J., et al. (2019) The *Firre* locus produces a trans-acting RNA molecule that functions in hematopoiesis. *Nat. Commun.*, **10**, 5137.

- 15) Fanucchi, S., Fok, E.T., Dalla, E., Shibayama, Y., Börner, K., Chang, E.Y., Stoychev, S., Imakaev, M., Grimm, D., Wang, K.C., et al. (2019) Immune genes are primed for robust transcription

by proximal long noncoding RNAs located in nuclear compartments. *Nat. Genet.*, **51**, 138–150.

著者寸描

●山本 達郎（やまもと たつろう）

Danish Cancer Society Research Center 研究員。博士（医学）。

■略歴 2013 年九州大学歯学部卒業。19 年熊本大学大学院医学教育部博士課程修了。18 年よりがん研究会がん研究所研究生および博士研究員。20 年 5 月より現職。

■研究テーマと抱負 がんの発生・治療耐性機構の解明をエピゲノムの観点から行い、個別化治療に向けた新規マーカーの同定、新規治療法の開発を目指している。

■趣味 スポーツ，旅行。