

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901
研究種目：若手研究
研究期間：2021～2022
課題番号：21K16789
研究課題名（和文）卵巣がん1細胞レベルでのマルチトランスクリプトーム解析による発がん機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of carcinogenesis of ovarian cancer using multi-transcriptome analysis at the single-cell resolution

研究代表者
吉田 康将（Yoshida, Kosuke）

名古屋大学・医学系研究科・客員研究者

研究者番号：90885550
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、卵巣がんに対する一細胞解析を通して、その悪性化機構を明らかにすることである。第一に卵巣成熟奇形腫の悪性転化を対象とした。卵巣成熟奇形腫の悪性転化は希少がんであり、その病態はほとんど明らかにされていない。5例の卵巣成熟奇形腫の悪性転化に対して、一細胞解析および空間的トランスクリプトーム解析を行い、がんの部分においてKLF5遺伝子の高発現を明らかにした。また、卵巣漿液性がんに対しては、4例の空間的トランスクリプトーム解析を施行しており、薬剤感受性に関わる因子を同定した。さらに、子宮平滑筋肉腫において細胞周期関連キナーゼが新規治療標的となりうることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
がん組織は様々な種類の細胞により構成されている。従って、従来のがん組織全体を対象とした解析では、様々な細胞の平均値を解析しているに過ぎなかった。しかし、最新の解析手法を用いると、一細胞レベルで遺伝子発現を評価できるようになった。これらの技術を使い、本研究においては、希少卵巣癌である成熟奇形腫の悪性転化の発がんに関わっている可能性のあるKLF5遺伝子を同定した。また、卵巣癌の治療抵抗性に関わる遺伝子も複数同定している。さらに、難治性の子宮肉腫に関する新規治療標的も同定した。これらの研究成果をもとに、更なる研究を行い、患者の予後改善に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aims to elucidate the mechanism of malignant transformation through single-cell analysis for ovarian cancer. First, we focused on the malignant transformation of ovarian mature teratoma. We performed single-cell and spatial transcriptome analysis of five cases of this malignancy and found that the KLF5 gene was highly expressed in the carcinoma cells. Spatial transcriptome analysis has also been performed for serous ovarian carcinoma in four cases, and factors related to drug sensitivity were identified. In addition, we also found that cell cycle-associated kinases are potential novel therapeutic targets in uterine leiomyosarcoma.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：シングルセルRNAシーケンス 卵巣癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん微小環境における多様性は、がんの進展に大きく関与している。近年、次世代シーケンス解析、とくに空間的トランスクリプトームおよびシングルセルトランスクリプトーム解析により、微小環境を高解像度で捉えることが可能になった。これらの技術を駆使することにより、がん組織全体を対象とした研究では解析できなかった知見が得られる可能性がある。

卵巣癌は、多彩な組織型を呈することが知られており、組織型毎に特徴が大きく異なる。そして、希少がんに至っては病態解明が進んでいない組織型も存在する。このような希少癌研究においては、次世代シーケンス解析に基づくアプローチは有効である可能性があり、研究計画を立案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、卵巣がんに対する一細胞解析・空間的トランスクリプトーム等の解析を通して、その発がん・悪性化・薬剤抵抗性などに関与する遺伝子発現について解析を行うことである。

3. 研究の方法

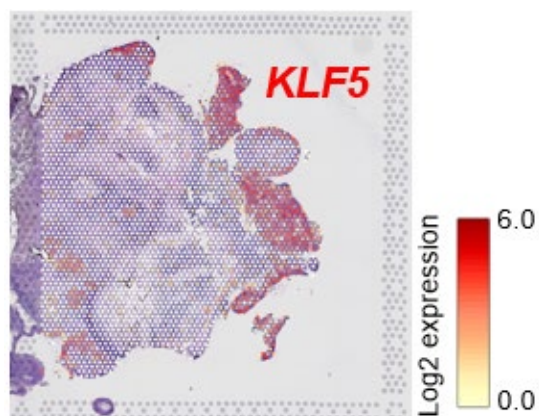
臨床検体は、名古屋大学医学部附属病院、もしくは国立がん研究センターのバイオバンクサンプルを用いた。空間的トランスクリプトーム解析は、新鮮凍結組織もしくはFFPE組織を用い、シングル核 RNA シーケンスは、新鮮凍結組織より核を抽出し、解析に用いた。ライブラリー調整は、10x Genomics 社の対応するキットを使用して作成し、シーケンスを行った。得られたデータは、SpaceRanger および Cell Ranger を用いて解析を行い、R ソフトウェアの Seurat パッケージを用いて可視化した。

また、組織全体を用いた RNA シーケンスおよびマイクロ RNA シーケンスについては、組織全体より RNA を抽出し、それぞれ適したキットによりライブラリー調整を行い、シーケンスを行った。得られたデータは、R ソフトウェア等を用いて、解析した。

4. 研究成果

第一に卵巣成熟奇形腫の悪性転化を対象とした。卵巣成熟奇形腫の悪性転化は希少がんであり、その病態はほとんど明らかにされていない。臨床的には、良性腫瘍である成熟奇形腫から二次性に発がんすると考えられているが、具体的にどのような種類細胞が、どのようにして発がんするかは未解明である。現在までに、5 例の卵巣成熟奇形腫の悪性転化に対して、一細胞解析および空間的トランスクリプトーム解析を行い、その微小環境の多様性について現在解析を行った。その結果、がんの部分において KLF5 遺伝子の高発現が認められた (図 1)。また、当研究室で樹立した細胞株を用いて機能解析を行った。siRNA を用いて KLF5 の発現低下させたところ、細胞増殖が著明に抑制された。また、

図 1



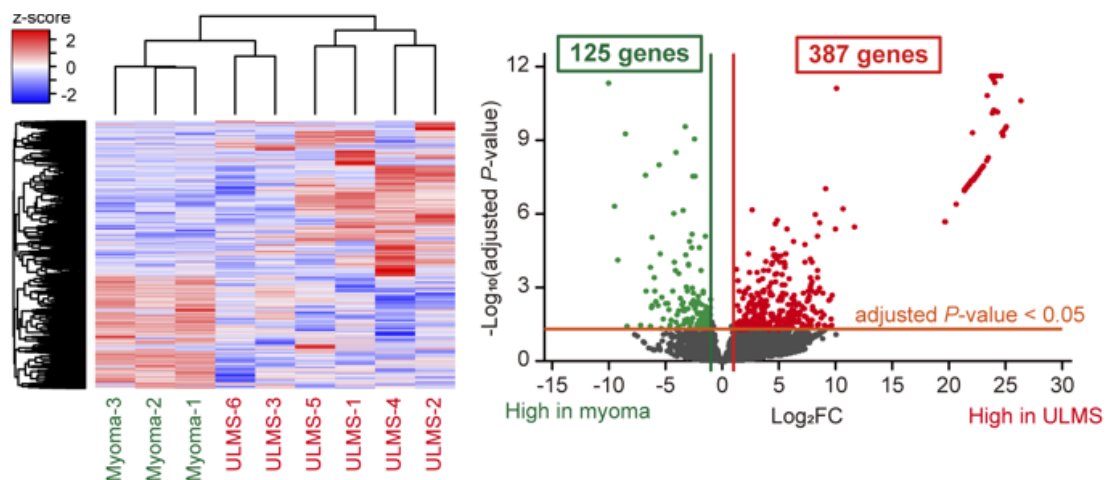
KLF5 に対する阻害剤も効果的であった。従って、KLF5 は増殖において重要な遺伝子であることが示唆された。今後、KLF5 の制御機構について更なる研究を進める予定である。

第二に、卵巣漿液性がんに対しても、空間的トランスクリプトーム解析を行った。名古屋大学で PARP 阻害剤による維持療法が行われた症例のうち、長期間投与できた症例（奏功例）、短期間しか投与できなかった症例（効果不良例）を解析に用いた。この 2 群に対して、遺伝子発現を比較することにより、効果不良例で発現上昇していた遺伝子を同定した。この遺伝子は、PARP 阻害剤の感受性に関わる可能性があり、その耐性化機序について研究を進める予定である。

さらに、子宮平滑筋肉腫に対する研究も行った。子宮平滑筋肉腫は、極めて悪性度の高い婦人科悪性腫瘍であり、有効な治療方法は存在しない。今回、臨床検体を用いた次世代シーケンス解析により、mRNA シーケンスを行った。その結果、子宮平滑筋肉腫は、子宮筋腫と比較した場合、遺伝子発現プロファイルは明らかに異なり、512 個の発現変動遺伝子が同定された（図 2）。次に、それらの発現変動遺伝子についてパスウェイ解析を行ったところ、子宮肉腫においては、PLK1 や CHEK1 といった細胞周期関連遺伝子の活性化が明らかとなった。また、細胞株に対して、これらの遺伝子に対する阻害剤は、極めて高い抗腫瘍効果を示した。従って、新規治療薬候補として期待される。また、マイクロ RNA シーケンスの結果、子宮平滑筋肉腫においては、子宮筋腫と比較して miR-10b-5p の発現低下を認めた。そして、細胞株を用いた実験の結果、miR-10b-5p は腫瘍抑制的なマイクロ RNA であることが示された。従って、miR-10b-5p の発現低下により、子宮肉腫の悪性化に寄与している可能性がある。

このように、本研究により、婦人科腫瘍学の発展に貢献する成果が得られた。

図 2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yoshida Kosuke, Yokoi Akira, Yamamoto Tomofumi, Hayashi Yusuke, Nakayama Jun, Yokoi Tsuyoshi, Yoshida Hiroshi, Kato Tomoyasu, Kajiyama Hiroaki, Yamamoto Yusuke	4. 巻 28
2. 論文標題 Aberrant Activation of Cell-Cycle-Related Kinases and the Potential Therapeutic Impact of PLK1 or CHEK1 Inhibition in Uterine Leiomyosarcoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 2147 ~ 2159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1078-0432.CCR-22-0100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Eri, Yokoi Akira, Yoshida Kosuke, Sugiyama Mai, Kitagawa Masami, Nishino Kimihiro, Yamamoto Eiko, Niimi Kaoru, Yamamoto Yusuke, Kajiyama Hiroaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Drug library screening identifies histone deacetylase inhibition as a novel therapeutic strategy for choriocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 4543 ~ 4556
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.5243	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Kazuhiro, Yokoi Akira, Yoshida Kosuke, Kato Tomoyasu, Ochiya Takahiro, Yamamoto Yusuke, Kajiyama Hiroaki	4. 巻 34
2. 論文標題 Preoperative serum microRNAs as potential prognostic biomarkers in ovarian clear cell carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Gynecologic Oncology	6. 最初と最後の頁 e34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3802/jgo.2023.34.e34	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nagao Yukari, Yokoi Akira, Yoshida Kosuke, Sugiyama Mai, Watanabe Eri, Nakamura Kae, Kitagawa Masami, Asano-Inami Eri, Koya Yoshihiro, Yoshihara Masato, Tamauchi Satoshi, Shimizu Yusuke, Ikeda Yoshiki, Yoshikawa Nobuhisa, Kato Tomoyasu, Yamamoto Yusuke, Kajiyama Hiroaki	4. 巻 189
2. 論文標題 Novel therapeutic strategies targeting UCP2 in uterine leiomyosarcoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pharmacological Research	6. 最初と最後の頁 106693 ~ 106693
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.phrs.2023.106693	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Kosuke, Yokoi Akira, Kitagawa Masami, Sugiyama Mai, Yamamoto Tomofumi, Nakayama Jun, Yoshida Hiroshi, Kato Tomoyasu, Kajiyama Hiroaki, Yamamoto Yusuke	4. 巻 49
2. 論文標題 Downregulation of miR-10b-5p facilitates the proliferation of uterine leiomyosarcoma cells: A microRNA sequencing-based approach	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2023.8523	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 吉田康将、横井暁、加藤友康、梶山広明
2. 発表標題 卵巣漿液性がんの治療奏功に関わる血中マイクロRNA発現解析
3. 学会等名 第9回婦人科癌バイオマーカー研究会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田康将、横井暁、加藤友康、梶山広明
2. 発表標題 子宮平滑筋肉腫に対するRNAシーケンス解析に基づく新規治療薬候補の同定
3. 学会等名 第64回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kosuke Yoshida, Akira Yokoi, Tomoyasu Kato, Hiroaki Kajiyama
2. 発表標題 Identification of novel therapeutic candidates for uterine leiomyosarcoma based on integrated biological analyses
3. 学会等名 第74回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kosuke Yoshida
2. 発表標題 Novel therapeutic approach for uterine leiomyosarcoma based on transcriptome analysis
3. 学会等名 ASGO 2022 international workshop (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kosuke Yoshida, Akira Yokoi, Tomoyasu Kato, Hiroaki Kajiyama, Yusuke Yamamoto
2. 発表標題 Aberrant activation of cell cycle-related kinases as novel therapeutic targets for uterine leiomyosarcoma.
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kosuke Yoshida, Akira Yokoi, Tomoyasu Kato, Hiroaki Kajiyama, Yusuke Yamamoto
2. 発表標題 Identification of novel therapeutic targets for uterine leiomyosarcoma through multi-omics analysis.
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 子宮肉腫を予防及び / 又は治療するための医薬組成物	発明者 吉田康将、横井暁、 梶山広明、山本雄 介、加藤友康	権利者 東海国立大学機 構、国立がん研 究センター
産業財産権の種類、番号 特許、2021-114523	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 METHODS FOR CATEGORIZING DISEASE OUTCOMES	発明者 Craif Inc., YOSHIDA Kosuke、他4名	権利者 東海国立大学機 構
産業財産権の種類、番号 特許、63318105	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------