

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：82674

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16798

研究課題名(和文) 卵巣がんにおける長鎖非コードRNA複合体の同定および機能解明と診断・治療への応用

研究課題名(英文) Research on roles of long noncoding RNA-containing complexes in ovarian cancer and their application to ovarian cancer diagnosis and therapy

研究代表者

竹岩 俊彦 (Takeiwa, Toshihiko)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：20635643

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)：本研究で我々は、倫理基準を満たした正常卵巣組織及び卵巣がん検体を用いたRNAシーケンスのデータから、卵巣がんでは最も発現量の高いlong intergenic noncoding RNA (lincRNA)として機能未知のNONHSAT013448を同定し、ovarian cancer lincRNA 1 (OIN1)と命名した。OIN1が卵巣がん細胞の増殖を促進する一方、siRNAによるOIN1の発現抑制はアポトーシスを亢進し、卵巣がん異種移植動物モデルでの腫瘍増殖を抑制することを明らかにした。また、OIN1の下流遺伝子としてアポトーシス関連遺伝子であるRASSF5及びADORA1を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣がんは婦人科領域における最も予後不良ながんのひとつであり、新たな治療法の開発が求められている。本研究で我々は、卵巣がん特異的に発現する長鎖非コードRNAを新たに同定し、その卵巣がんにおける機能を明らかにする一方、その治療応用への可能性について示した。本研究成果は長鎖非コードRNAやその作用メカニズムを標的とする卵巣がんの革新的な治療法の開発につながることで期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated ovarian cancer-specific long intergenic noncoding RNAs (lincRNAs) using our RNA-sequence data obtained from normal ovarian tissues and ovarian cancers. We identified NONHSAT013448, an unannotated lincRNA, as the most highly expressed lincRNA in ovarian cancer tissues, and designated this lincRNA as ovarian cancer long intergenic noncoding RNA (OIN1). We demonstrated that OIN1 promotes ovarian cancer cell proliferation, while siRNA-mediated OIN1 silencing enhances apoptosis of ovarian cancer cells and suppresses in vivo growth of ovarian cancer cells inoculated in immunodeficient mice. We also identified RASSF5 and ADORA1, apoptosis-related genes, as OIN1 downstream target genes.

研究分野：RNA医学・生物学

キーワード：卵巣がん 長鎖非コードRNA

## 1. 研究開始当初の背景

婦人科がんのひとつである卵巣がんは本邦において女性生殖器がんでも死亡数の多いがんである。卵巣がんは自覚症状に乏しく、既に進行した状態で発見されることが多いが、進行卵巣がんの予後は依然として不良である。さらに、卵巣がんの罹患数と死亡数はともに増加傾向にあるため、卵巣がんの新規バイオマーカー・治療標的の同定及び新たな診断・治療法の開発は社会的急務である。従来、がんの新規バイオマーカー・治療標的の探索は蛋白質を主な対象として行われてきた。近年、蛋白質をコードしないRNA(非コードRNA)が、様々な生命現象や疾患で重要な役割を果たすことが報告され、がんの診断・治療標的の新たな候補としても注目されている。非コードRNAのうち、200塩基以上の長さを示すものが長鎖非コードRNAとして分類され、これらはRNA結合蛋白質と複合体を形成することにより、遺伝子の転写やmRNAの安定性・翻訳制御等に関わることが報告されつつある。しかし、卵巣がんにおける長鎖非コードRNAの役割に関しては十分解明されていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究は、卵巣がんの悪性化・進展に関与する新規長鎖非コードRNA及びその複合体を同定し、その機能を解明して新しい卵巣がんの診断・治療法開発等の臨床応用につなげることを目的とする。

## 3. 研究の方法

倫理基準を満たした正常卵巣組織及び卵巣がん検体を用いたRNAシーケンスのデータから、卵巣がんの特異的な長鎖非コードRNAを*in silico*で探索し、候補長鎖非コードRNAを同定した。卵巣がん細胞における*OINI*の発現は定量的PCR法により評価した。卵巣がん特異的な候補長鎖非コードRNAに対する特異的なsiRNAを設計し、本siRNAを用いて候補長鎖非コードRNAの発現を抑制して卵巣がん細胞における増殖能やアポトーシスへの影響を検討した。細胞増殖能についてHoechst 33258によりDNAを染色し評価した。アポトーシスについては、アポトーシスを起こした細胞をAnnexin Vで染色し、フローサイトメトリー法により解析した。また、*OINI*の発現プラスミドを作製し、卵巣がん細胞にトランスフェクションして*OINI*を過剰発現させた。*OINI*の過剰発現が細胞増殖能に及ぼす影響を上記の方法により評価した。候補長鎖非コードRNAの下流遺伝子について、まずRNAシーケンスのデータを用いて*in silico*で探索し、候補下流遺伝子を同定した。卵巣がん細胞で*OINI*の発現抑制及び過剰発現実験を行い、候補下流遺伝子の発現変動を定量的PCR法により評価した。卵巣がん細胞であるA2780細胞を雌の免疫不全マウス(BALB/cAJcl-nu/nu)の皮下に移植し腫瘍を作らせることにより卵巣がん異種移植動物モデルを作出した。本モデルの腫瘍に*OINI*特異的なsiRNAまたはsiRNAコントロールを注射し(各5µg)、腫瘍体積の変動を測定することにより、*OINI*の治療標的への応用可能性を評価した。また、腫瘍よりRNAを抽出して、*OINI*及び候補下流遺伝子の発現を解析した。

#### 4 . 研究成果

本研究では埼玉医科大学国際医療センター婦人科腫瘍科と共同研究を行い、倫理基準を満たした正常卵巣組織及び卵巣がんの臨床検体を用いた RNA シーケンスのデータから、卵巣がん特異的に発現する長鎖非コード RNA を探索した。蛋白質をコードする遺伝子と重ならないゲノム領域から転写される long intergenic noncoding RNA (lincRNA) と呼ばれる種類の長鎖非コード RNA は発現の組織特異性が高いことが示唆されており、特に lincRNA に注目して解析を行ったところ、卵巣がん検体で最も発現量の高い lincRNA として *NONHSAT013448* を同定した。本 lincRNA はヒトの第 10 番染色体の長腕 (10q21.1) にその遺伝子が存在しており、二つのエキソンから構成される。*NONHSAT013448* は非コード RNA のデータベースである NONCODE に配列情報が登録されているものの、機能に関する報告がなく、卵巣がんにおける役割も不明であった。そこで我々は本 lincRNA を *ovarian cancer long intergenic noncoding RNA 1 (OINI)* と命名し、卵巣がんにおける *OINI* の機能を解析した。

まず、いくつかの卵巣がん細胞株における *OINI* の発現量を定量的 PCR 法により解析した結果、A2780 及び SKOV3 細胞において高発現が認められたことから、これらの卵巣がん細胞を用いて *OINI* の機能を検証した。A2780 及び SKOV3 を使用した生化学・分子生物学的解析により、*OINI* が細胞増殖を促進する一方、siRNA による *OINI* の発現抑制はアポトーシスを亢進し、A2780 細胞を免疫不全マウスに移植し作製した卵巣がん異種移植動物モデルでの腫瘍増殖を抑制することを明らかにした。また、*OINI* の下流遺伝子としてアポトーシス関連遺伝子である *ras association domain family member 5 (RASSF5)* 及び *adenosine A1 receptor (ADORA1)* を同定した。

本研究成果について、原著論文としてまとめ国際英文誌に発表した (Takeiwa T *et al.* Long Intergenic Noncoding RNA *OINI* Promotes Ovarian Cancer Growth by Modulating Apoptosis-Related Gene Expression. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 11242, 2021)。また本成果を、国際学会において発表した (Keystone Symposia “Non-Coding RNAs: Biology and Applications (EK44)” 及び Ovarian Cancer Research Seminar Series, virtual)。また、本研究と関連して総説論文を 1 報発表した (Takeiwa T, *et al.* Mechanisms of Apoptosis-Related Long Non-coding RNAs in Ovarian Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 641963, 2021)。さらに、RNA シーケンス解析を進展させることにより、卵巣がん特異的に発現し細胞増殖に関わる RNA 結合蛋白質を探索しており、現在候補蛋白質の解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takeiwa Toshihiko, Ikeda Kazuhiro, Horie-Inoue Kuniko, Inoue Satoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Mechanisms of Apoptosis-Related Long Non-coding RNAs in Ovarian Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 641963-641963
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2021.641963	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 Toshihiko Takeiwa, Yuichi Mitobe, Kazuhiro Ikeda, Kosei Hasegawa, Kuniko Horie, Satoshi Inoue	4. 巻 22
2. 論文標題 Long Intergenic Noncoding RNA OIN1 Promotes Ovarian Cancer Growth by Modulating Apoptosis-Related Gene Expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 11242 ~ 11242
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222011242	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Toshihiko Takeiwa, Kazuhiro Ikeda, Kuniko Horie-Inoue, Satoshi Inoue
2. 発表標題 Identification of OIN1, a lncRNA overexpressed in high-grade serous and clear cell ovarian carcinomas, as a cancer therapeutic target
3. 学会等名 Ovarian Cancer Research Seminar Series, virtual（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toshihiko Takeiwa, Kazuhiro Ikeda, Kuniko Horie-Inoue, Satoshi Inoue
2. 発表標題 Identification of a tumor-promoting long intergenic noncoding RNA, OIN1, in ovarian cancer
3. 学会等名 Keystone Symposia “Non-Coding RNAs: Biology and Applications (EK44)”（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------