

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20967

研究課題名(和文) 環状RNAに焦点をあてた卵巣がん新規リキッドバイオプシー法の確立

研究課題名(英文) The identification of circular RNA which is specifically elevated in ovarian cancer and the elucidation of its role

研究代表者

岡村 綾子 (Okamura, Ayako)

大阪大学・大学院医学系研究科・技術補佐員

研究者番号：40910253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣明細胞癌(CCC)症例2検体より、RNAを抽出、環状RNAマイクロアレイを行い、CCC特異的に発現が上昇するcircSOD2を同定した。RT-qPCRを行い、circSOD2は正常卵巣や良性子宮内膜症に比べてCCCで高発現していることを確認した。機能解析を行った。データベース上でcircSOD2との結合が予想されるマイクロRNAを絞り込み(miR-224-5p、miR-532-3p)、プルダウンアッセイで結合を確認、CCC細胞株(ES2、OVISE)においてsiRNAによるノックダウンを行うと、細胞増殖能は変化しなかったが、浸潤能が有意に低下した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では卵巣癌に特異的に発現する環状RNAの同定とその機能の解析を行った。具体的には卵巣癌の中でも抗がん剤に対する抵抗性が高く、予後不良である卵巣明細胞癌に焦点を当てた検討を行った。明細胞癌は難治性であり、新規治療の開発が望まれる。本研究により、卵巣明細胞癌において特異的に発現が上昇している環状RNAであるcircSOD2を同定し、そのがん浸潤における役割の一部を解明し、新規分子標的治療の可能性を提示した。

研究成果の概要(英文)：Clear cell carcinoma (CCC) of ovary, at least partly, arises from endometriotic cyst. Underlying mechanisms during this malignant transformation needs to be elucidated. Herein, we focused on circular RNAs (circRNAs) during this process and assessed their roles. Through circRNA microarray using extracted RNAs from two CCCs with each corresponding normal ovarian tissue, circRNAs highly expressed in CCCs were identified. Among 3 candidate circRNAs, circSOD2 were specifically elevated in CCC clinical samples. The interaction between circSOD2 and miR-224-5p as well as miR-532-3p was suggested by in silico analyses, and thereafter verified by RNA pull-down assay. Silencing circSOD2 inhibited cancer invasion in Matrigel Invasion Assay. As a conclusion, we presented that circSOD2 is highly expressed in CCC and showed circSOD2/miR-224-5p/miR-532-3p axis during ovarian cancer invasion. Silencing circSOD2 alleviated cancer cell invasion, suggesting it can be a novel molecular target to treat CCC.

研究分野：卵巣がん 婦人科腫瘍 産婦人科

キーワード：卵巣がん 環状RNA 新規バイオマーカー 浸潤 卵巣癌 バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

卵巣がんは我が国において年々増加している。厚生労働省の統計では2011年には9314名の罹患者であったが、2016年の統計では13338名と急増している。現病死するものは4784名であり、現代でも少なくとも3分の1の患者が死亡する“致命的な”疾患である。卵巣がんの予後を根本的に改善させる方策の一つとして、早期発見につながる新規バイオマーカーの開発が挙げられる。卵巣がんが予後不良である最大の要因は、腹腔内奥に存在する卵巣腫瘍を形成しただけでは自覚症状の出現に至らず、約半数が腹腔播種を来したIII期以上で見つかる点にある。実際、卵巣に限局したI期であれば、約90%の5年生存率であり、子宮、卵管にまで浸潤しているII期であっても、5年生存率は70%を超えている。卵巣がんの代表的な腫瘍マーカーはCA125である。CA125は進行がんであれば、病勢を忠実に反映するが、初期癌(I/II期)ではCA125の上昇が約50%にとどまるうえに、CA125はしばしば月経や子宮内膜症、炎症の影響を受けるため、CA125による卵巣がんスクリーニングは、いくつかの臨床試験が示すように卵巣がんの早期発見や患者の生存率向上に寄与しておらず(JAMA 2011; 305: 2295-303)、新たなリキッドバイオプシー法の確立が望まれる。

そこで、生体内に微量ながら安定して存在する環状RNAに着目した。RNAはそのトポロジーにより直鎖状RNAと環状RNAの2種類に大別できる。環状RNAは5'末端と3'末端がつながっている一本鎖のRNAで、主にバックスプライシングにより生成される(RNA Biol, 2015;12:381-8)。いくつかのがんにおいて環状RNAが特異的に異常発現することが報告されている。環状ゆえPoly A Tailをもたないため、RNaseに分解されず、体液中で安定して存在することができる。つまり、環状RNAは、ヌクレアーゼに対する安定性、分解への抵抗性があり、微量ではあるが血漿中においても安定して存在できるため、もし卵巣癌特異的に放出される環状RNAを同定することができれば、新規卵巣癌バイオマーカーとしての可能性が期待できると考えた。そこで、今回、臨床教室である利点を生かして、卵巣がん検体、その患者血漿を用いた新規バイオマーカーを検索する研究計画を立案した。

## 2. 研究の目的

卵巣癌のような難治性癌の克服には、早期発見につながるバイオマーカーの確立と再発癌に対する有効な治療法の両輪が必要である。本研究の第一の目的は卵巣がんを早期発見すべく、新たなバイオマーカーとして卵巣癌特異的な環状RNAを同定することである。環状RNAの卵巣がんの新規バイオマーカーとしての可能性の報告はいくつか存在するが、少数例の後方視的解析レベルの解析に留まっており、確立されたエビデンスは存在しない。研究の第二の目的として、前記研究で卵巣がん特異的に高発現する環状RNAを同定できれば、その機能をmiRNAスポンジ機能に焦点を当てて解明し、その卵巣癌進展における役割を明らかにし、新しい卵巣癌腹膜播種治療の可能性を追求する。本研究期間では、卵巣がんの中でも最も化学療法に抵抗性が高く予後が不良である明細胞癌(Clear Cell Carcinoma; CCC)に焦点をあてた解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) CCC組織における環状RNAの網羅的解析

我々は以前より附属病院での卵巣癌初回手術の際に、倫理委員会の承認下、文書同意を得た患者の治療前血漿と卵巣癌組織を採取し、凍結保存している。今回、そのうち対側の正常卵巣組織も採取できている(Clear Cell Carcinoma; CCC)2症例の癌組織および正常卵巣よりRNAを抽出し、circular RNA microarray (Arraystar社 circRNA アレイ)を行った。その結果、それぞれ2症例共で正常卵巣に比べて癌組織で発現が2.0倍以上上昇している環状RNA(circRNA)の解析を以下の方法で検討した。

### (2) CCC組織における(1)で同定した環状RNAの発現量の検討

所有するCCC組織およびその発生源である良性子宮内膜症組織よりRNA抽出し、(1)で同定した環状RNAの腫瘍組織/正常卵巣組織の発現比をReal-time RT-PCR法で算出し、これがCCC特異的に発現は亢進しているかの検討を行った。

### (3) 同定した環状RNAの機能の解明 - miRNAスポンジとしての可能性の検討

癌特異的に高発現している環状RNAはがん抑制miRNAを“スポンジ”することにより、卵巣がんの腹膜播種を進展していると考えられる。そこで、同定した環状RNAとがん抑制miRNAの関連を明らかにすべく以下の実験を行った。

#### 環状RNAとmiRNAのアノテーション

上記研究で抽出した環状RNAが標的とするmiRNAをNIHが提供するCircular RNA Interactome ([https://circinteractome.nia.nih.gov/mirna\\_target\\_sites.html](https://circinteractome.nia.nih.gov/mirna_target_sites.html))でIn silico解析を行った。

#### 環状RNAと標的miRNAが直接結合していることの確認

所有する卵巣がん細胞株を用いて、RNA pull down assayを行った。具体的にはBiotin標識した標的miRNAをstreptavidin磁気ビーズに結合させ、卵巣癌細胞株Lysateに反応させる。しかる後にビーズに結合したRNAを抽出し、標的miRNAと環状RNAが結合しているこ

とを qRT-PCR 法で確認した。

### 同定した環状 RNA の卵巣がん腹膜播種進展に与える影響の解析

同定して環状 RNA の siRNA を卵巣癌細胞株に強制導入し、がん細胞の増殖能、浸潤能、接着能、抗がん剤に対する感受性に与える影響を検証した。

## 4. 研究成果

### (1) 卵巣明細胞癌 (CCC) 組織における環状 RNA の網羅的解析

対側の正常卵巣が摘出できている卵巣がん臨床検体のうち、CCC 2 症例より RNA を抽出し、計 4 サンプルを用いた circRNA microarray を行った。そのうち、CCC 2 症例の結果を図 1 に示す。図 1A にクラスター分析の結果を、図 1B にそのうち 2 症例ともで腫瘍/正常卵巣における発現比が 2.0 倍以上であった環状 RNA が 3 つあったことを示す。図 1C にその 3 つのリストを示す。その中で、明細胞癌細胞株 (OVISE、ES-2) を用いた RT-PCR による validation を行い、以下の研究では circ\_0004662 (circSOD2) に焦点を当てた解析を行うことにした。

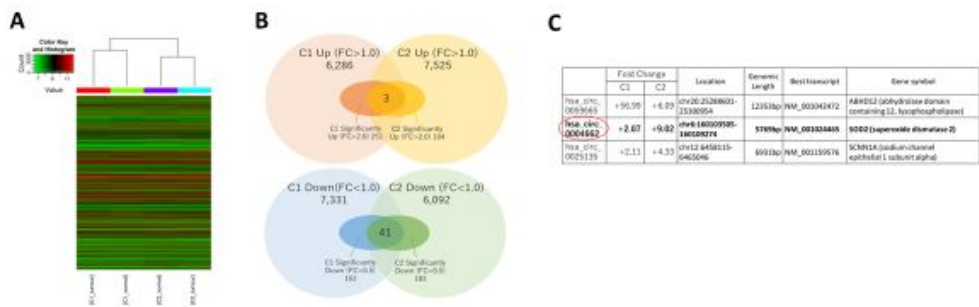


図1 CircRNA マイクロアレイ。A. クラスター分析。C1 tumor; 明細胞癌1の腫瘍、C1 normal; 明細胞癌1の正常卵巣、C2 tumor; 明細胞癌2の腫瘍、C2 normal; 明細胞癌2の正常卵巣。B. ペン図。C1 と C2 両方で circRNA の腫瘍/正常発現比が 2.0 以上であったものが 3 つあったことを示している。C. 明細胞癌 2 症例ともで発現が上昇していた circRNA のリスト。

### (2) 正常卵巣、良性子宮内膜症性嚢胞、卵巣明細胞癌における circSOD2 の発現量の検討

図 2 に正常卵巣 (Normal Ovary; 7 症例)、良性卵巣子宮内膜症性嚢胞 (Benign Endometrioma; 35 症例)、卵巣明細胞癌 (Clear Cell Carcinoma; 19 症例) における circSOD2 の相対的発現比を示す。正常卵巣における発現量を 1 とした時に良性卵巣子宮内膜症性嚢胞では中央値 5.39、卵巣明細胞癌では 7.44 と有意に発現が上昇していた。すなわち、この環状 RNA が子宮内膜症を経て CCC に癌化するにつれ、発現が上昇することを証明した。

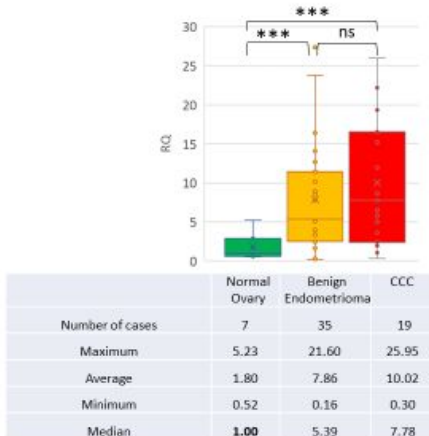


図2 circSOD2 の正常卵巣 (Normal Ovary; 7 症例)、良性卵巣子宮内膜症性嚢胞 (Benign Endometrioma; 35 症例)、卵巣明細胞癌 (Clear Cell Carcinoma; 19 症例) における相対的発現比。\*\*\*:  $p < 0.001$ , ns: not significant.

### (3) circSOD2 の機能の解明 miRNA とのアノテーション

Public Database である Circular RNA Interactome と CircBank を用い、circSOD2 が結合する可能性がある miRNA (miR-224-5p、miR-532-3p) を見出した (図 3)。

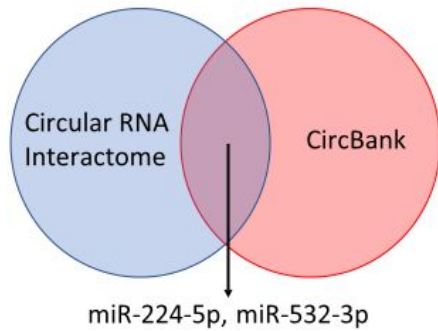


図3 circSOD2 が結合する miRNA の In silico 解析。Circular RNA Interactome とCircBank の2つのデータベースを用い、ベン図を作成した。

### circSOD2 と標的 miRNA が直接結合していることの確認

明細胞癌細胞株 OVISe と ES-2 を用い、それぞれの Cell Lysate と Biotin で標識した miR-224-5p と miR-532-3p を反応させたのちに circSOD2 の qRT-PCR を行い、circSOD2 がこれらの miRNA と結合していることを確認した (図 4)。

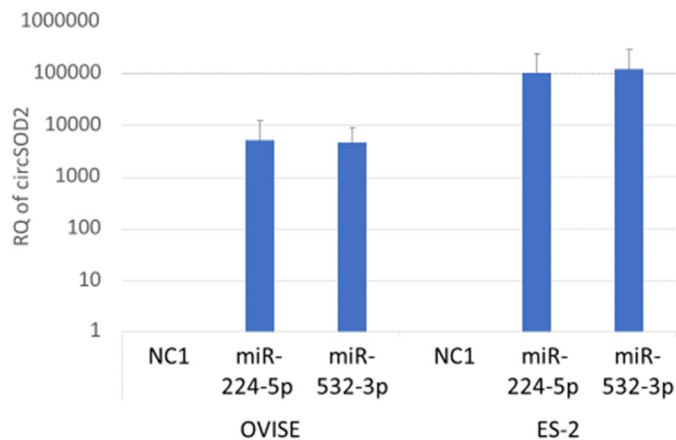


図4 RNA pull down assay. 明細胞癌細胞株 OVISe と ES-2 を用い、その Cell Lysate と Biotin で標識した miR-224-5p と miR-532-3p を反応させたのちに circSOD2 の RT-PCR を行い、circSOD2 がこれらの miRNA と結合していることを確認した。NC; negative control.

### circSOD2 の卵巣明細胞癌の浸潤に与える影響の解析

明細胞癌細胞株 OVISe と ES-2 に二種類の circSOD2 の siRNA を導入し、その発現を抑制したのち、細胞の増殖能を MTS Assay で評価したが、circSOD2 siRNA による発現抑制は増殖を与えなかった。さらに浸潤能を Matrigel Invasion Assay で評価したところ、図 5 A に示すように circSOD2 siRNA は卵巣明細胞癌の浸潤能を有意に抑制した。図 5 B に実際に浸潤した細胞数 (24 ウェル Boyden Chamber あたりの細胞数) を示す。

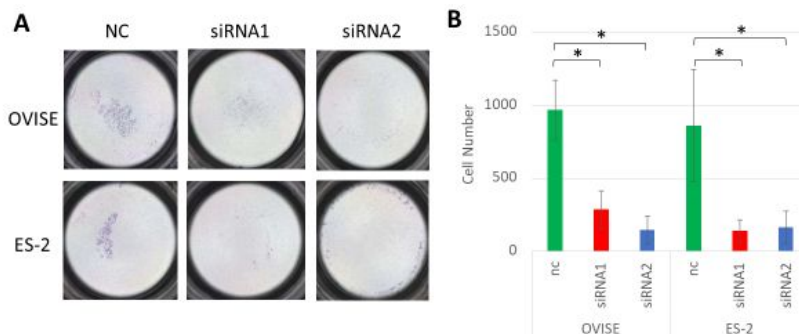


図5 circSOD2 の発現抑制は明細胞癌細胞株の浸潤能を抑制する。A. In vitro Invasion Assay. 卵巣明細胞癌細胞株 OVISe と ES-2 に二種類の circSOD2 の siRNA を導入し、その発現を抑制したのち、Matrigel Invasion Assay を行った。B. 浸潤した細胞数 (24 ウェル Boyden Chamber あたりの細胞数)。NC; negative control. \*: p<0.05.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Oi Yukako, Sawada Kenjiro, Yamamoto Misa, Nakamura Koji, Kinose Yasuto, Kodama Michiko, Hashimoto Kae, Kimura Tadashi
2. 発表標題 Identification of circular RNAs which are elevated in ovarian cancer and elucidation of their roles
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

〔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
研究協力者	澤田 健二郎  (Sawada Kenjiro)		
研究協力者	大井 友香子  (Oi Yukako)		
研究協力者	折出 唯志  (Oride Tadashi)		

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
---------	---------