

令和 6 年 6 月 5 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：2022～2023

課題番号：22K20973

研究課題名（和文）卵巣高異型度漿液性腺癌の早期発見につながる新規リキッドバイオブシー法の開発

研究課題名（英文）The development of a novel biomarker to early detect high grade serous carcinoma of ovary.

研究代表者

山本 実咲（Yamamoto, Misa）

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：50962875

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：卵巣高異型度漿液性癌（HGSOC）に焦点を当て、当院で加療を行った24例のHGSOC症例の腫瘍組織よりRNAを抽出し環状RNAの発現を解析した。具体的には、2症例のHGSOC癌患者の癌組織と対側の正常卵巣よりRNAを抽出し、circRNA microarrayを行い、2症例ともに特異的に高発現している circESRP1 に着目した。HGSOC細胞株におけるcircESRP1の発現を検討し、卵管上皮細胞に比べて細胞株で発現が上昇していることを確認した。さらに細胞株に circSOD2 の siRNA を transfection し、細胞のアポトーシスが誘導され増殖能が低下することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌の組織型の中でも最多の約40%を占める高異型度漿液性卵巣癌（HGSOC）と対側の正常卵巣より RNA を抽出し、circular RNA microarray を行い、HGSOC 特異的に発現が亢進している環状 RNA である circESRP1 を同定し、その役割を解明した。HGSOC における環状 RNA の新しい意義および治療標的としての可能性を証明し、早期発見につながる新たなリキッドバイオブシー法を確立するとともに、新たな分子標的治療の可能性を提示した。得られた成果は2024年の第76回日本産科婦人科学会学術講演会で口演発表した。今後論文作成予定である。

研究成果の概要（英文）：Our current research focused on identifying highly elevated circular RNAs (circRNAs) in high grade serous carcinoma of ovary (HGSOC) and elucidating their roles. CircRNA microarray analysis were performed using two HGSOC clinical samples. Their expression profiles were validated across 24 clinical HGSOC samples. To assess the functions of identified circRNAs in HGSOC, in-vitro analyses were executed following siRNA transfection. Further, proteasome analyses were performed and the mechanism how this circRNA works was identified. CircESRP1 was identified as the most highly expressed circRNA. Significant upregulation was seen across HGSOC clinical samples and cell lines. Its suppression resulted in the inhibition of cell proliferation followed by apoptosis. Proteasome analyses revealed the suppression of circESRP1 inhibited CDK1 expression in cell lines, and in silico analyses showed circESRP1 works as a sponge of mir-182-5p, and thereby this miRNA negatively regulates CDK1 expression.

研究分野：産婦人科 婦人科腫瘍 卵巣癌

キーワード：卵巣がん 環状RNA 高異型度漿液性癌 バイオマーカー circESRP1

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

卵巣癌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 名の罹患患者であったが、2018 年の統計では 13049 名と急増している。その一方で卵巣癌により死亡者数は 2019 年で 4733 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。卵巣に限局した I 期であれば、約 90% の 5 年生存率である。卵巣癌の代表的な腫瘍マーカーは CA125 である。CA125 は進行癌であれば、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 による卵巣癌スクリーニングは、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開発・確立が望まれる。

今回、新しいリキッドバイオプシー法の候補として、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 RNA はエクソソームを通じて細胞外に分泌され、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られている。また、近年、環状 RNA の機能として、単なるタンパク質の翻訳に留まらず、マイクロ RNA (miRNA) と結合しその機能を中和するスポンジ機能、タンパク質と結合しユビキチン化などを誘導する (Protein Scaffold) など、癌の増殖、転移、播種、血管新生、抗がん剤耐性化などに関わる様々な役割が報告されており (Front Cell Dev Biol. 2021;9:709512)、新規の分子標的治療となる可能性を秘めている。

そこで今回の研究では、卵巣癌の組織型のうち、最多の 4 割をしめ、かつ予後が最も不良である高異型度漿液性卵巣癌 (High Grade Serous Ovarian Carcinoma; HGSOC) に焦点を当てた研究を行うことにした。HGSOC はしばしば、腹腔内に癌が飛び散った状態で発見され、一次治療が奏功したとしても、腹膜播種が完治することはなく、最終的には 2/3 以上の患者が現病死する。そこで、臨床教室である利点を生かして患者血清を用いた環状 RNA の新規バイオマーカーとしての可能性および環状 RNA の癌化、腹膜播種の進展における役割を解明したいと考えた。

### 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効果的な分子標的治療の確立が重要である。本研究の第一の目的は卵巣癌の中でも最も予後不良である HGSOC の早期発見につながるような新たなバイオマーカーの可能性を検討することである。具体的には HGSOC 由来の環状 RNA (circRNA) を同定することである。circRNA の新規バイオマーカーとしての可能性の報告はこれまでいくつか存在するが、単施設における解析レベルの報告しか存在せず、卵巣癌においてソリッドなエビデンスに基づく報告は存在しない。

本研究の第二の目的は circRNA の miRNA sponge 機能に焦点を当てて、新しい卵巣癌腹膜播種に対する分子標的治療の可能性を追求することである。そのため癌促進的に働く circRNA の機能を siRNA を用いて抑制し、その治療薬としての可能性を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 高異型度漿液性卵巣がん (High Grade Serous Ovarian Carcinoma; HGSOC)組織における環状 RNA の網羅的解析

我々は以前より施設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。2019-21 年の間に HGSOC 21 例の検体および手術前後の血清を所有収集した。そこで、対側の正常卵巣組織も採取できている 2 症例の HGSOC の癌組織および正常卵巣計 4 サンプルより RNA を抽出し、circular RNA microarray (Arraystar 社)を行った。

#### (2) HGSOC 細胞株および良性コントロール細胞における circESRP1 の発現の検討

HGSOC 細胞株として OVCAR-3、CaOV3、HeyA-8、SKOV3ip1 を選び、良性コントロールとして卵管上皮細胞を不死化した FT240 を用いて、RNA を抽出し、(1)で抽出した circESRP1 の発現を Real time RT-PCR 法で検討した。

#### (3) HGSOC で特異的に発現が上昇している circESRP1 の役割の解明

NIH が提供する Circular RNA Interactome ([https://circinteractome.nia.nih.gov/siRNA\\_design.html](https://circinteractome.nia.nih.gov/siRNA_design.html)) で

circESRP1 に対する siRNA をデザイン作成した。それを HGSOC 細胞株である OVCAR-3 と CaOV-3 に強制導入し、In vitro cell proliferation assay や Annexin V/PI assay を行い、circESRP1 の細胞増殖に与える影響を観察した。

#### (4) circESRP1 が制御するタンパク質の網羅的解析

HGSOC 細胞株である OVCAR-3 に circESRP1 siRNA と control siRNA を遺伝子導入し、タンパク質を抽出した。両者における発現タンパク比を、TMT 法で網羅的解析を行った。

#### (5) circESRP1 の役割の In silico 解析

上記(4)のTMT解析の結果をふまえ、circESRP1 の役割を検証するための In silico 解析を circRNA の microRNA sponge 機能に着目して行った。具体的には Target Scan, miRDB, circRNA interactome, circBank などの Public Database を用いた絞り込みを行った。

#### (6) circESRP1 が卵巣癌における CDK1 の発現を制御しているかどうかの検討

卵巣癌細胞株 OVCAR-3 と CaOV-3 に circESRP1 siRNA と control を強制導入し、48 時間後に CDK1 の発現の変化を Western blot で検討した。さらに HGSOC 検体を用いて、CDK1 の発現を評価し、circESRP1 siRNA の発現量との関連を評価した。

Total of number patients(N)	24
FIGO stage : III-IV	21/24 (87.5%)
HRD positive	3/8 (37%)
BRCA mutation	4/16 (25%)

図1 患者背景

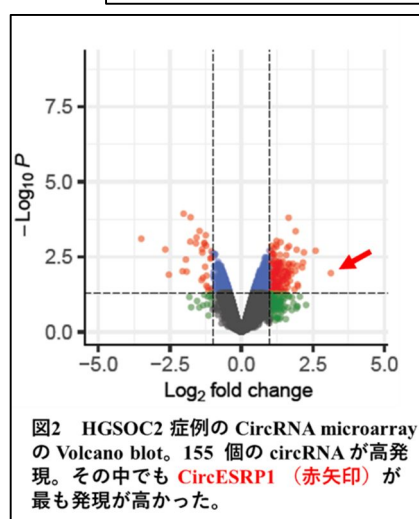
### 4. 研究成果

#### (1) 高異型度漿液性卵巣がん (High Grade Serous Ovarian Carcinoma; HGSOC)組織における環状 RNA の網羅的解析

2019-21 年の間に大阪大学医学部附属病院産婦人科で加療した HGSOC 症例 24 例より腫瘍組織を抽出した。その患者背景を図 1 に示す。これらの症例の中から、対側の正常卵巣から組織を抽出できた 2 症例より、癌組織と正常組織から RNA を抽出し、計 4 例の CircRNA Microarray (Arraystar 社) を実施した。

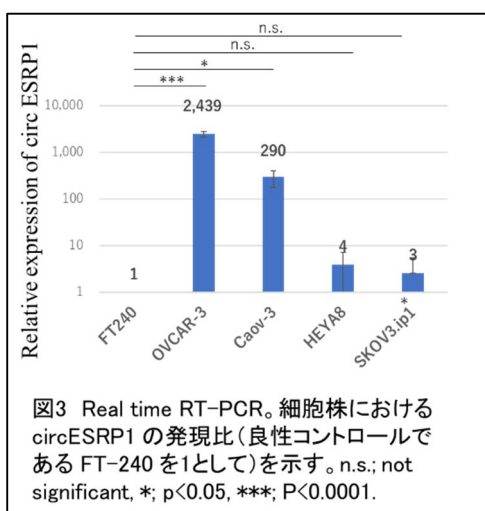
結果をまとめた Volcano Blot を図 2 に示す。

計 155 個の circRNA が有意に高発現していた。その中でも最も発現が高かった (Log2 fold change of 3.12) circESRP1 に焦点を当てて、以下の解析を行った。



#### (2) HGSOC 細胞株および良性コントロール細胞における circESRP1 の発現の検討

HGSOC 細胞株である OVCAR-3, CaOV3, HeyA-8, SKOV3ip1 と良性コントロールとして卵管上皮細胞を不死化した FT240 より Trizol を用いて、RNA を抽出した。それらを用いて、(1)で抽出した circESRP1 の発現比を Real time RT-PCR 法で検討した。結果を図 3 に示す。FT240 と比べて、4 種の HGSOC 細胞株すべてで circESRP1 の発現が上昇していた。その中でも、OVCAR3 と CaOV3 における circESRP1 の発現は非常に高く、以下の研究ではこれらの細胞株を用いて、検討した。



#### (3) HGSOC で特異的に発現が上昇している circESRP1 の役割の解明

NIH が提供する Circular RNA Interactome ([https://circinteractome.nia.nih.gov/siRNA\\_design.html](https://circinteractome.nia.nih.gov/siRNA_design.html))

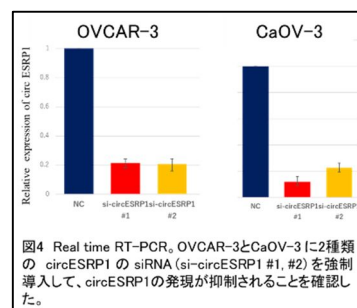
で circESRP1 に対する siRNA をデザイン作成した。それを HGSOC 細胞株である OVCAR-3 と CaOV-3 に強制導入し、In vitro cell proliferation assay や Annexin V/PI assay を行い、circESRP1 の細胞増殖に与える影響を観察した。

まず細胞株に二種類の siRNA (si-circESRP1 #1, #2) を細胞株に導入し、circESRP1 の発現が抑制されることを確認した(図 4)。

そこで、circESRP1 の発現抑制の影響を In vitro cell proliferation assay (CyQUANT Assays) と Annexin V/PI assay で評価した。

図 5 に示すように circESRP1 siRNA は卵巣癌細胞株 OVCAR-3 と CaOV-3 の増殖能を有意に抑制した。

さらに Annexin V/PI assay を行い、circESRP1 siRNA の導入により、細胞株における Apoptosis 細



胞の割合が有意に上昇することを確認した。すなわち、circESRP1 の発現抑制により、細胞周期が抑制され、Apoptosis が誘導される。その結果、細胞増殖が抑制されることが判明した。

#### (4) circESRP1 が制御するタンパク質の網羅的解析

HGSOC 細胞株である OVCAR-3 に circESRP1 siRNA と control siRNA を遺伝子導入し、タンパク質を抽出した。両者における発現タンパク比を、TMT 法で網羅的解析を行った。結果、43 個のタンパク質の発現が circESRP1 の発現抑制により、発現が抑制されることが判明した。Pathway 解析では Apoptosis induced DNA fragmentation が同定され、circESRP1 の発現抑制により Apoptosis が誘導されることが示唆された。

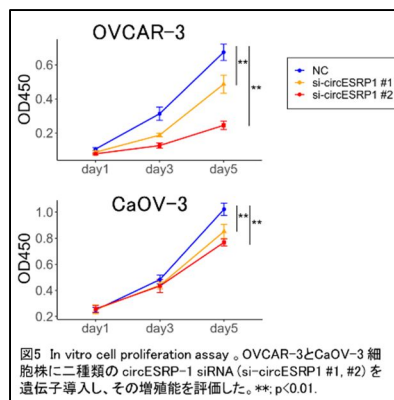


図5 In vitro cell proliferation assay。OVCAR-3とCaOV-3細胞株に二種類の circESRP-1 siRNA (si-circESRP1 #1, #2) を遺伝子導入し、その増殖能を評価した。\*\*, p<0.01。

#### (5) circESRP1 の役割の In silico 解析

上記(4)の研究で見出した CDK1 の発現を circESRP1 は制御しているかどうかの In silico 解析を circRNA の microRNA sponge 機能に着目し、図 6 に示すように Target Scan, miRDB, circRNA interactome, circBank などの Public Database を用いた絞り込みを行った。結論として、circESRP1 は miR182-5p の機能を Sponge することにより細胞周期関連タンパク質 CDK1 の発現を制御するのではないかと結論付けた。

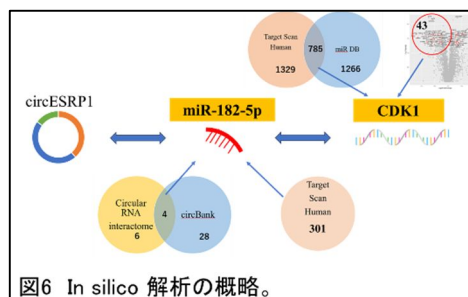


図6 In silico 解析の概略。

#### (6) circESRP1 が卵巣癌における CDK1 の発現を制御しているかどうかの検討

上記 In silico 解析で得られた結果の検証を行った。具体的には卵巣癌細胞株 OVCAR-3 と CaOV-3 に circESRP1 siRNA と control を強制導入し、48 時間後に CDK1 の発現の変化を Western blot で検討した。さらに HGSOC 検体

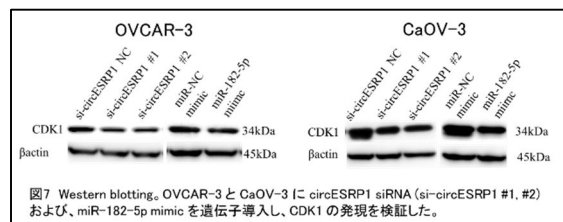


図7 Western blotting。OVCAR-3 と CaOV-3 に circESRP1 siRNA (si-circESRP1 #1, #2) および、miR-182-5p mimic を遺伝子導入し、CDK1 の発現を検証した。

を用いて、CDK1 の発現を評価し、circESRP1 siRNA の発現量との関連を評価した。図 7 に示すように circESRP1 の発現抑制は CDK1 の発現を抑制した。さらに miR-182-5p の強制導入により、同様に CDK1 の発現が抑制されたことより、circESRP1 は miR-182-5p の機能を Sponge することにより、CDK1 の発現を制御していることを確認した。さらに(1)で収集した HGSOC 24 症例の CDK1 による免疫組織染色を行い、circESRP1 高発現症例では CDK1 の発現が高く、低発現症例では CDK1 の発現が低いことを確認した。

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 Tadashi Oride, Kenjiro Sawada, Yukako Oi, Aska Toda, Koji Nakamura, Mahiru Kawano, Yasuto Kinose, Michiko Kodama, Kae Hashimoto, Tadashi Kimura
2. 発表標題 CircESRP1 promotes cell proliferation of high-grade serous ovarian cancers (HGSOC) via miR-142-3p/HMGA2 pathway
3. 学会等名 第76回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2024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)		
研究協力者	岡村 綾子  (Okamura Ayako)		

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