

令和 2 年 6 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16842

研究課題名(和文) 卵巣明細胞癌および婦人科難治癌の原因遺伝子のcDNAライブラリーによる探索

研究課題名(英文) Discovery of genes responsible for ovarian clear cell carcinoma and gynecological refractory cancers with a cDNA library

研究代表者

樋口 正太郎 (Higuchi, Shotaro)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・助教

研究者番号：50750098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣明細胞癌(OCCC)の発癌に深く関与している可能性のある新規遺伝子の検索・同定することを目的とし、OCCC細胞株RMG-1のcDNAライブラリーを作成し、これをNIH3T3細胞に導入し、腫瘍性質を有する形質転換focusから導入されたcDNAを同定した。同定された遺伝子のうち、SEC61B、DVL1、C10RF38は卵巣癌の中で特にOCCCで発現が増強しており、OCCCに特徴的であることが示唆された。またNIH3T3へのこれらの遺伝子導入により形質転換focusの有意な増加が観察され、これらの遺伝子がOCCC発癌への関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣明細胞癌(OCCC)は日本人に特に多い癌であり、既存の治療に抵抗性であることが大きな問題である。新規治療標的を見出し、新たな治療法を開発していくためにはOCCC発癌の分子メカニズムを解明していく必要がある。本研究で用いた手法は、煩雑であり簡便ではないが、実際に形質転換能を持つ遺伝子を見出す方法であり、有用性は高い。本研究手法では、肺腺癌でEML4-ALK融合遺伝子が見出された実績があり、本研究手法で新たなドライバー遺伝子や融合遺伝子が見出される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To discover and identify novel genes that may be deeply involved in the carcinogenesis of ovarian clear-cell carcinoma (OCCC), we created a cDNA library of the OCCC cell line RMG-1 and transfected it into the NIH3T3 cells. Then, the cDNAs were identified from the transformed foci with tumor properties. Among the identified genes, SEC61B, DVL1, and C10RF38 were specifically upregulated in OCCC, suggesting that it is characteristic of OCCC. The transfection of these genes significantly increased the number of transformed foci into NIH3T3. These results indicate that these three genes may be implicated in OCCC carcinogenesis.

研究分野：産科婦人科学

キーワード：cDNAライブラリー 機能的スクリーニング 卵巣明細胞癌 難治性婦人化がん SEC61B DVL1

## 1. 研究開始当初の背景

近年、卵巣子宮内膜症性嚢胞 (OEM) 患者の増加に伴い、それを発生源とした卵巣癌が急速に増加している。卵巣癌は OEM の約 0.7% に発生し (Kobayashi et al. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008;138:187-93)、欧米人に比して日本人では明細胞癌 (OCCC) の発生が多いことが大きな特徴である。卵巣癌は患者の約 6 割が死に至る婦人科悪性腫瘍で最も予後不良の疾患であり、とくに OCCC は抗癌剤の奏効率が他の組織型に比べて低く (Goff BA et al. *Gynecol Oncol.* 1996;60:412-7.) 治療が困難であることが、OCCC の発生頻度の高い本邦では大きな問題となっている。このため OEM での OCCC の発生、進展や抗癌剤耐性の病態の解明は急務と言える。

OEM からの OCCC 発生については、慢性炎症と OEM 内の豊富な鉄イオンによる酸化ストレスの関与が考えられてきたが (Yamaguchi et al. *Oncogene.* 2010;29:1741-52.)、その分子メカニズムは十分に解明されていない。我々の研究室は、炎症によるミスマッチ修復異常や鉄イオンの運搬タンパクである LCN2 が酸化ストレス下での細胞の生存能力を高めることを報告しており、これらが OCCC 発生に関与していることが示唆される (Fuseya et al. *Hum Pathol.* 2012;43:1964-72、Yamada et al. *Free Radic Res.* 2016;50:414-25.) OCCC では PIK3CA の活性化型変異が約 33% と高頻度に認められ、発癌への関与が示唆されている (Kuo et al. *Am J Pathol.* 2009;174:1597-601.)。また近年、クロマチン再構成にかかわる ARID1A 遺伝子の変異および発現低下が OCCC の約半数に認められることが明らかとなり大きな注目を集めているが (Wiegand et al. *N Engl J Med.* 2010;363:1532-43、Jones et al. *Science.* 2010;330:228-31.)、OCCC の発癌メカニズムはいまだ十分に解明されておらず、未知の分子や遺伝子異常の関与が強く示唆される。

発癌に関与する分子メカニズムの解明に関しては、次世代シーケンサーによる全ゲノム解析や全エクソン解析、RNA シーケンス、癌関連遺伝子パネル検査等による遺伝子変異や遺伝子発現の網羅的解析が進められ、膨大な数の遺伝子変異やコピー数異常が発見されるなどの成果を挙げている (Cancer Genome Atlas Research Network. *Nature.* 2011;474:609-15.)。しかし、個々の変異が実際にどの程度癌化や進行に寄与しているのかは特定できないといった問題点が挙げられる。一方で Soda らは肺腺癌組織から採取した mRNA から cDNA library を作成し、これを NIH3T3 に導入して形成された形質転換コロニーの解析から、EML4-ALK 融合遺伝子を同定した (Soda et al. *Nature.* 2007; 448: 561-6.)。この方法は、癌組織で実際に形質転換能を有する機能遺伝子を同定できる機能的スクリーニング法である。そこで、本研究ではこの cDNA ライブラリーによる機能的スクリーニング法を応用して OCCC 発生に関わる遺伝子の検索を行う。また、同様に悪性度の高い他の婦人科癌についても検討を行う。

## 2. 研究の目的

OCCC は、欧米と比し本邦での発生率が高いうえに抗癌剤耐性を示し治療が困難であることから、その生物学的な特性に基づく新たな治療戦略の開発は喫緊の課題である。本研究ではレトロウイルスベクターによる OCCC の cDNA ライブラリーを用いた機能遺伝子スクリーニングにより、OCCC の発癌に深く関与している可能性のある遺伝子を検索・同定することを目的とする。また、再発性卵巣癌や難治性腫瘍の手術検体から樹立した cDNA ライブラリーによる機能遺伝子スクリーニングを行い、婦人科癌の発癌や抗癌剤耐性に関与する新規遺伝子や遺伝子変異の同定およびその分子機序の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) mRNA の抽出および cDNA 合成

OCCC 細胞株 RMG-1 より RNAeasy mini kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) で DNase 処理下に RNA を抽出し、oligo-dT primer で逆転写を行い、cDNA を合成した。また、倫理委員会の承認の基、文書での同意を得て採取された 23 例の難治性婦人科悪性腫瘍組織 { 卵巣がん 9 例、子宮頸がん 3 例 (うち小細胞神経内分泌癌 1 例)、子宮体がん 11 例 (うち癌肉腫 1 例、肉腫 2 例) } から mRNA を抽出し、cDNA を合成した。

### (2) cDNA library 作成およびレトロウイルスへの組み込み

合成された cDNA の両端にアダプター配列を連結させ、制限酵素で切断後にレトロウイルスベクターである pDON5/Neo に連結して組み込み、cDNA ライブラリーを作成した。さらに E.coli に組み込むことで増幅した。この pDON5 cDNA ライブラリーとレトロウイルス構成蛋白プラスミドを G3T-high producer cell に遺伝子導入し、cDNA ライブラリーが組み込まれたレトロウイルス粒子を作成した。

### (3) NIH3T3 細胞への感染から形質転換 focus に組み込まれた cDNA の同定

上述のレトロウイルスを NIH3T3 に感染させ、感染細胞を G418 で選択し、重層化した形質転換 focus が形成されるまで 2 次元培養を継続した。形質転換 focus を形成した細胞を採取し、DNA を抽出し、pDON5 特異的 primer で組み込まれていた cDNA 部分を増幅し、サンガー法で sequencing することで形質転換に関与した cDNA を同定した。

### (4) 発現確認および形質転換能の確認

患者の同意を得て採取した卵巣癌手術検体 60 例 (漿液性腺癌 17 例、粘液性腺癌 7 例、類内膜腺癌 9 例、OCCC 27 例) の total RNA を抽出し、real-time RT-PCR で (3) で得られた遺伝子

の発現を確認した。また、形質転換能を確認するため、(3)で得られた cDNA を NIH3T3 に導入し、形質転換能を確認した。

#### 4. 研究成果

**(1) OCCC 細胞株 RMG-1 の cDNA ライブラリー作成:** RMG-1 細胞をヌードマウス皮下異種移植腫瘍の組織型が OCCC であることを確認した。(図1)この RMG-1 より作成した cDNA ライブラリーは、5000bp 程度の十分な insert size を持つことを確認した。

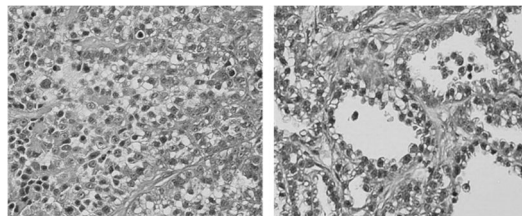


図1: RMG-1異種移植腫瘍 RMG-1細胞による腫瘍は、OCCCの組織像を示す。

**(2) 形質転換 focus に導入されていた遺伝子の同定:** cDNA ライブラリー導入により NIH3T3 細胞が悪性化兆候の一つである、細胞が重層化して増殖する形質転換 focus 形成が認められた。(図2)これらの focus を採取し、それぞれに導入されていた cDNA の配列を同定した。これらの cDNA は実際に NIH3T3 の形質転換に関与した可能性がある。これらのうち house keeping gene や機能が不明な遺伝子は削除し、最終的に *DVL1*、*SEC61B*、*KDM4A*、*C10RF38*、*SF1*、*RPS2*、*RPS3A* に注目した。

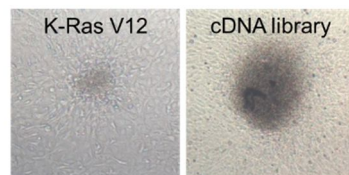


図2: 形質転換focus K-Ras V12 導入 (positive control) 細胞と同様に細胞が重層化している。

**(3) 卵巣癌の組織型による各遺伝子の発現:** 上記の各遺伝子の mRNA 発現を組織型別に比較すると、特に *SEC61B* と *DVL1* の OCCC での有意な発現増強が観察された ( $P < 0.05$ ) (図3: 引用文献[1]の Fig.1 より改変して引用)。また、免疫染色による検討では、*SEC61B* と *C10RF38* タンパク発現は他の組織型に比較して OCCC 有意に強く ( $P < 0.05$ )、また癌を伴う OEM においても高発現する傾向が観察された (図4: 引用文献[1]の Fig.2 より改変して引用)。これらの因子は OCCC の発癌に特徴的である可能性が示唆された。

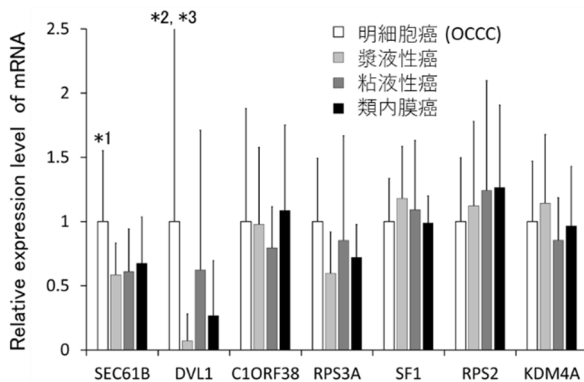


図3<sup>[1]</sup>: 組織型による各遺伝子発現 SEC61B, DVL1は漿液性癌に比べOCCCで有意に発現が増強していた。

**(4) 形質転換能の確認:** (3)の結果から *SEC61B*、*DVL1*、*C10RF38* に特に注目した。*DVL1* は Wnt シグナル経路の重要な因子であり、前立腺癌など多くの癌で高発現が報告されている。*SEC61B* は小胞体に存在し、子宮体癌などで高発現が報告されている *PKD1* などの因子の合成に不可欠とされている。*C10RF38* は toll-like receptor 4 の制御因子であり、炎症の制御やエストロゲン感受性に関与していることが報告されている。これら各遺伝子の cDNA を組み込んだレトロウイルスベクターを作成し NIH3T3 細胞に感染させて形質転換 focus の形成を比較したところ、これらの各遺伝子導入により形質転換 focus の有意な増加が観察された (図3: 引用文献[1]の Fig.3 より改変して引用)。

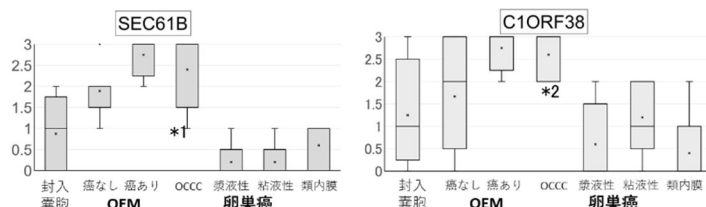


図4<sup>[1]</sup>: SEC61B, C10RF38タンパク発現 (免疫染色) OCCCおよび隣接するOEMで発現が増強していた。

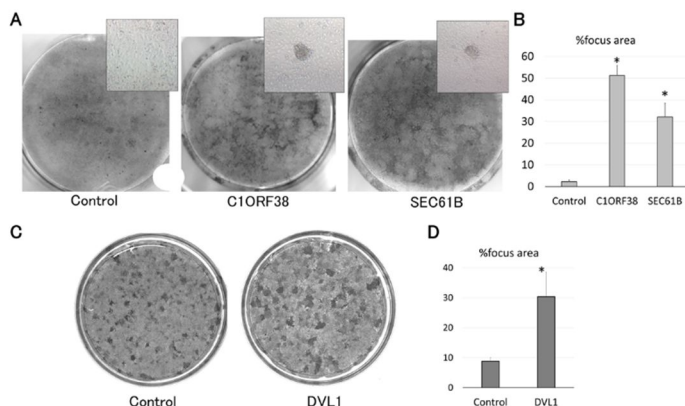


図5<sup>[1]</sup>: SEC61B, C10RF38, DVL1の形質転換能の確認 これらの遺伝子導入により形質転換focusは有意に増加した。

本法により OCCC 発癌に関与する可能性のある複数の新規因子が見出され、本法の有用性が確認できた。一方、今回見出された因子は足場非依存性増殖を確

立できるほどの強い形質転換能は示さなかった。また、臨床検体から作成された **cDNA** ライブラリーにおいても、これまでのところ強力な形質転換能を有する新規遺伝子は見出されていない。今後も検討を継続する予定である。

## 5 . 引用論文

- [1] **Yasushi Yamada, Tsutomu Miyamoto, Shotaro Higuchi, Motoki Ono, Hisanori Kobara, Ryoichi Asaka, Hirofumi Ando, Akihisa Suzuki, Tanri Shiozawa. cDNA Expression Library Screening Revealed Novel Functional Genes Involved in Clear Cell Carcinogenesis of the Ovary in vitro. *J Obstet Gynaecol.* 2020 Mar 11;1-6. doi: 10.1080/01443615.2020.1716310. Online ahead of print.**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamada Yasushi, Miyamoto Tsutomu, Higuchi Shotaro, Ono Motoki, Kobara Hisanori, Asaka Ryoichi, Ando Hirofumi, Suzuki Akihisa, Shiozawa Tanri	4. 巻 40
2. 論文標題 cDNA expression library screening revealed novel functional genes involved in clear cell carcinogenesis of the ovary in?vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/01443615.2020.1716310	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Higuchi Shotaro, Miyamoto Tsutomu, Kobara Hisanori, Yamada Satoshi, Asaka Ryoichi, Kikuchi Norihiko, Kashima Hiroyasu, Ohira Satoshi, Shiozawa Tanri	4. 巻 85
2. 論文標題 Trophoblast type-specific expression of senescence markers in the human placenta	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Placenta	6. 最初と最後の頁 56~62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.placenta.2019.06.377	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ida Koichi, Miyamoto Tsutomu, Higuchi Shotaro, Takeuchi Hodaka, Yamada Satoshi, Ono Motoki, Nishihara Hiroshi, Shiozawa Tanri	4. 巻 36
2. 論文標題 Effectiveness of a genetic test panel designed for gynecological cancer: an exploratory study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Oncology	6. 最初と最後の頁 62~62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12032-019-1286-9	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----