

令和元年6月14日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18061

研究課題名（和文）難治性婦人科がん特異的非コードRNAおよび結合因子複合体の作用機構解明と臨床応用

研究課題名（英文）Analysis of long non-coding RNAs and associated complex in ovarian cancer

研究代表者

水戸部 悠一（Mitobe, Yuichi）

埼玉医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50783255

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：卵巣がんは、婦人科腫瘍のなかでも特に死亡率が高いことが知られており、新しい診断、治療のターゲットが望まれている。近年の技術発展に伴い、長鎖非コードRNAという新しいカテゴリーの分子が新たに発見、着目されている。我々は、卵巣がんが高発現しており、未だ報告されていない長鎖非コードRNAを複数同定した。この長鎖非コードRNAの発現量を卵巣がん細胞にて抑制すると、細胞の増殖、また腫瘍の増大が抑えられることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣がんが多く発現しており、また未だ報告されていない長鎖非コードRNAを複数同定した。これら新しい長鎖非コードRNAは正常の卵巣組織ではほとんど発現が確認できないことから、婦人科腫瘍のなかでも死亡率が高いとされる卵巣がんの新規診断、もしくは治療のターゲットになりうることを示唆され、社会的な意義があると考えられる。さらにこの長鎖非コードRNAが卵巣がんの細胞増殖に強く関わっていることを、細胞株、また生体(マウス)を用いた実験によっても明らかにしており、学術的にも意義深い。

研究成果の概要（英文）：Ovarian cancer is the most poor prognostic cancer in women. Recent advances in sequencing technology have revealed that long non-coding RNAs (lncRNAs) are substantially associated with biological phenomena including cancer development and progression. We identified lncRNAs that are highly expressed in ovarian cancer clinical samples. Knockdown using siRNA against this lncRNA impaired cell growth of ovarian cancer cells in vitro and in vivo. These results suggest that this lncRNA could be novel diagnostic and therapeutic target for ovarian cancer.

研究分野：長鎖非コードRNA

キーワード：長鎖非コードRNA 卵巣がん

## 1. 研究開始当初の背景

婦人科腫瘍のひとつである卵巣がんは、自覚症状が乏しいことから発見時にすでに進行している症例が多い。またがん化する起源細胞(漿液性がん、明細胞がんなど)によって特徴が大きく異なることから、治療が困難であり、婦人科腫瘍の中でも特に死亡者数が多い。腫瘍の発見後は、手術による腫瘍組織の切除後、タキサン系抗がん剤、プラチナ製剤による化学療法が行われるが、再発例も非常に多いことが知られている。他のがん種において適応された抗がん剤が、婦人科腫瘍に適応されることはあるものの、婦人科腫瘍を主体とした新しい抗がん剤の開発例は乏しいのが現状であり、そのため卵巣がんを含む婦人科腫瘍の、早期診断のための新しいバイオマーカーの探索、さらには治療法の開発が社会的な急務であると考えられる。

RNAはタンパク質情報を持つ messenger RNA や、翻訳に必要な transfer RNA などタンパク質が機能する上で補助的な役割を担うとされていた。しかし近年のシーケンズ技術等の進展により、タンパク質をコードしない 200 塩基以上の長さを有する長鎖非コード RNA が大量に発見され、その一部はがんを含む様々な生命現象で重要な役割を担っていることが明らかとなってきている。長鎖非コード RNA は、それぞれ DNA、タンパク質、RNA 等の他の分子と複合体を形成し、機能しているとされている(図 1)。一方で、長鎖非コード RNA の実験技術はまだ発展途上の段階であり、いまだ機能や遺伝子構造が判明していない長鎖非コード RNA も多数存在している。以上より長鎖非コード RNA の研究分野は、大きな可能性を秘めた新大陸であると考えられる。そこで婦人科腫瘍の悪性化メカニズムを、長鎖非コード RNA という観点から解明し、その分子メカニズムを元に新しい診断・治療法を開発することを目指している(図 1)。

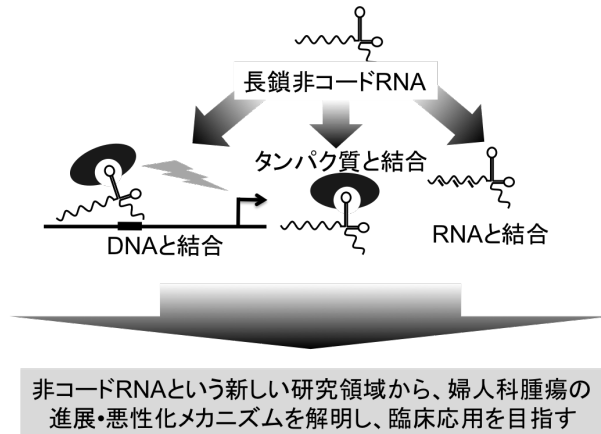


図1 研究の背景と目的

倫理基準を満たした卵巣がん臨床検体を用いて、RNA-sequencing を行い、未知の長鎖非コード RNA を含む網羅的な発現解析をすでに行なっている。卵巣がん臨床検体を用いた発現プロファイルから、正常組織サンプルではほとんど発現が検出されないが、卵巣がんサンプルにおいて発現が亢進しており、かついまだ報告されていない長鎖非コード RNA を複数同定している。しかしながらこれらの着目した長鎖非コード RNA が卵巣がんの発症、進展に関わっているか、またその作用メカニズム、さらには卵巣がんの新しい診断、治療のターゲットとなりうるかは不明である。

## 2. 研究の目的

卵巣がんを含む婦人科腫瘍の発症、進展のメカニズムを、長鎖非コード RNA という観点から解明し、明らかにした長鎖非コード RNA とその複合体を通じた分子メカニズムを元にして新しい診断・治療法を開発することを目指している。そのために、着目した長鎖非コード RNA 群が、どのような特徴を持った RNA 分子であるか、卵巣がん細胞の増殖などに関わっているか、また関わっていた場合にその作用メカニズムを明らかにすることを目的として研究を遂行した。

## 3. 研究の方法

以下の 3 ステップを遂行することで、上記の研究目的の達成を目指す。

- (1) 着目した長鎖非コード RNA の詳細な同定
- (2) 着目した長鎖非コード RNA の卵巣がんの増殖への影響の測定
- (3) 当該長鎖非コード RNA の卵巣がんに関わるメカニズムの解明

## 4. 研究成果

- (1) 着目した長鎖非コード RNA の詳細な同定

まずは、卵巣がん臨床検体を用いた RNA-seq による網羅的な発現解析にて得られた複数の新規長鎖非コード RNA の、卵巣がん細胞株における発現量を、定量的 PCR 法にて測定した。複数種類の卵巣がん細胞株にて特に発現が高い長鎖非コード RNA に着目し、後に続く実験を遂行した。

着目した長鎖非コード RNA はいまだ報告がされていない RNA であり、遺伝子構造も不確かである。そこで 5' rapid amplification of cDNA ends (RACE)、また 3' RACE 法を行い、5' 末端、3' 末端の配列を決定した。さらには決定した末端配列情報を元に、遺伝子構造が不明であ

った長鎖非コード RNA の全長のクローニングを行ない、シーケンスを確認することで遺伝子構造を決定した。

長鎖非コード RNA は、それぞれ特有の細胞内局在を有しており、その局在により機能がある程度予測されることが知られている。そこで細胞を細胞質分画と核分画に分取し、それぞれの分画における長鎖非コード RNA の発現量を定量的 PCR 法にて測定することで、着目している長鎖非コード RNA が、細胞質と核のどちらの分画に多く存在するか測定した。さらなる詳細な長鎖非コード RNA の細胞内局在を調べるために、fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法を行い、当該長鎖非コード RNA がそれぞれ特定の細胞内局在を有していることを明らかにした。

## (2) 着目した長鎖非コード RNA の卵巣がんの増殖への影響の測定

着目した長鎖非コード RNA が卵巣がん細胞の増殖に影響を与えるか測定するために、当該長鎖非コード RNA に対する siRNA を用いて、発現を抑制したとき(ノックダウン)の表現系解析を行なった。複数の卵巣がん細胞株において、当該長鎖非コード RNA に対する siRNA を導入すると、コントロール siRNA 群(比較対照群)とくらべ、有意に細胞増殖が抑制されることが判明した。この結果より着目した長鎖非コード RNA が卵巣がんの細胞増殖に関わっていることが示唆された。

上記の実験は細胞を培養皿上にて人工的な培養条件下において行なった実験である。そこで次に当該長鎖非コード RNA が、実際の生体内で形成される卵巣腫瘍の増大に重要であるか解析する目的で、卵巣がん細胞株を免疫不全マウスの皮下に導入し、腫瘍を形成させるモデルを作成した。さらに形成した腫瘍に週に 2 回、当該長鎖非コード RNA に対する siRNA を注射することで、コントロール siRNA 投与群に比べ、腫瘍の増大が有意に抑制されることを確認した。以上のことより着目した長鎖非コード RNA は卵巣がんの細胞増殖、また腫瘍形成に非常に重要な役割を担っていることが示唆された。さらに本研究で着目している当該長鎖非コード RNA は、背景で述べた通り、正常組織サンプルでは発現がほとんど検出されない長鎖非コード RNA であるため、当該長鎖非コード RNA の発現抑制が、卵巣がんの治療において有用である可能性が示唆された。

## (3) 当該長鎖非コード RNA の卵巣がんに関わるメカニズムの解明

最後に当該長鎖非コード RNA が、どのようにして卵巣がん細胞の増殖に関わっているか、その作用メカニズムを明らかにするために、当該長鎖非コード RNA をノックダウンしたときの RNA サンプルを用いてマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行なった。その結果当該長鎖非コード RNA をノックダウンしたサンプルにおいて、コントロール siRNA サンプルに比べ発現が変動した遺伝子群を多数同定した。さらにマイクロアレイによって得られた、当該長鎖非コード RNA による発現変動プロファイルを元に、当該長鎖非コード RNA が関わるシグナル経路を Gene set enrichment analysis (GSEA) というウェブ上のソフトウェアを用いて解析したところ、当該長鎖非コード RNA が細胞増殖関連経路などのシグナル経路に関わっていることが明らかとなった。

さらに、より確実に当該長鎖非コード RNA によって発現制御されていると予測される遺伝子群を同定するために、背景で述べた卵巣がん臨床検体の RNA-sequencing による遺伝子発現データと、本研究で行なったマイクロアレイ解析で得られたデータの統合的な解析を行った。具体的には、卵巣がん細胞株にて当該長鎖非コード RNA をノックダウンしたときに発現が変動した遺伝子が、卵巣がん臨床検体と正常組織サンプルと比較しても発現が変動しているか解析した。その結果、当該長鎖非コード RNA は特定の遺伝子群の発現を、卵巣がん細胞株、また臨床の卵巣がん腫瘍において制御し、卵巣がんの細胞増殖、腫瘍の悪性化に関わっていることが示唆された。

以上の研究により、卵巣がん特異的に発現が亢進しており、また卵巣がんの細胞増殖、腫瘍形成に関わる長鎖非コード RNA を同定することができた。さらに当該長鎖非コード RNA が、細胞増殖関連遺伝子群の発現を制御していることを明らかにし、今回着目した長鎖非コード RNA が、卵巣がんにおける新しい診断、治療のターゲットになることが示唆された。以上の研究を遂行する過程により得られた知見をもとに、複数の学会にて口頭による発表を行い、また国際雑誌である Cancer Letters 誌にがんの発症、進展に関わる長鎖非コード RNA の総説を執筆した。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Mitobe Yuichi, Takayama Ken-ichi, Horie-Inoue Kuniko, Inoue Satoshi  
Prostate cancer-associated lncRNAs  
Cancer Letters 481: 159-166, 2018 (査読あり)  
doi: 10.1016/j.canlet.2018.01.012.

〔学会発表〕(計 5 件)

Mitobe Yuichi, Ikeda Kazuhiro, Horie Kuniko, Inoue Satoshi  
Estrogen-inducible lncRNA facilitates estrogen receptor signaling and contributes to breast cancer tumorigenesis  
第 77 回日本癌学会学術総会 (2018 年度)

飯野 薫、水戸部 悠一、川端 英孝、鈴木 貴、池田 和博、堀江 公仁子、井上 聡  
RNA 結合タンパク質 NONO の乳がんにおける役割の解明  
第 8 回日本臨床腫瘍薬学会学術総会 (2018 年度)

Ikeda K, Mitobe Y, Horie K, Inoue S  
Identification of hormone-dependent lncRNAs that mediate estrogen signaling pathway in breast cancer  
The 43<sup>rd</sup> Naito Conference, Noncoding RNA: Biology, Chemistry, & Diseases (2017 年度)

水戸部 悠一、堀江 公仁子、池田 和博、高木 清司、鈴木 貴、井上 聡  
乳がんの増殖と生存に関わるエストロゲン応答性長鎖非コード RNA の役割  
第 25 回日本ステロイドホルモン学会学術総会 (2017 年度)

堀江 公仁子、水戸部 悠一、池田和博、井上 聡  
Long noncoding RNAs that associate with estrogen receptor signaling and contribute to the pathophysiology of endocrine therapy-resistant breast cancer  
第 40 回日本分子生物学会 conbio2017 (2017 年度)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究分担者  
特になし

(2) 研究協力者  
特になし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。