

令和元年6月5日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19613

研究課題名(和文) 卵巣癌DNAコピー数異常の謎を解く - piRNAの卵巣癌への関与 -

研究課題名(英文) Elucidating the mechanisms of DNA copy number aberrations in ovarian cancer - role of piRNA in ovarian cancer -

研究代表者

千代田 達幸 (Chiyoda, Tatsuyuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：40445367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：Piwi-interacting RNA (piRNA)は生殖組織特異的に産生される小分子RNA群である。卵巣漿液性癌 5検体と正常卵巣 2検体を用いて全トランスクリプトーム解析(mRNA-seq)および全小分子RNA解析(miRNA-seq)を行ったところ、20-23塩基長のmiRNAは卵巣癌と正常卵巣の間で発現パターンが明らかに異なっていたが、26-34塩基長のpiRNAは卵巣癌の一部において発現異常がおきていた。統合的解析により26個のmRNA-small RNAネットワークが明らかとなり、piRNA-RPS6KL1ネットワークの解析ではRPS6KL1の高発現群は有期に予後が悪かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌は進行例では予後が悪く、20年間以上その大きな改善を認めていない。卵巣癌はドライバーとなる明確な変異遺伝子をもたないため、分子標的薬の導入は遅れてきた。Piwi-interacting RNA (piRNA)は生殖組織特異的に産生される小分子RNA群であり、トランスポソンの働きを抑えることで次世代への正確な遺伝情報の伝達を助けている。piRNAの癌における機能は今まであまりわかっていないが、本研究により卵巣癌でpiRNAが発現異常を起こしていることが明らかとなり、piRNAを標的とする卵巣癌治療の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Piwi-interacting RNA (piRNAs) are animal-specific small RNAs usually restricted to the germline, which act on transposon silencing. We performed whole transcriptome sequencing (mRNA-seq) and whole small RNA sequencing (miRNA-seq) using 5 serous ovarian cancers and 2 normal ovaries. miRNA-seq showed that 20-23 nt miRNA profiles differ greatly among ovarian cancers and normal ovaries. 26-34 nt piRNA profiles differ in some ovarian cancers. Integrative analysis of mRNA-seq and miRNA-seq revealed 26 ovarian cancer specific mRNA-small RNA networks. Among them, high expression of RPS6KL1 was correlated with worse survival in ovarian cancer.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 小分子RNA トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

上皮性卵巣癌の5年生存率は40%程度であり、30年間以上大きく改善していない。その原因として明確なドライバー遺伝子が存在しないため、分子標的薬の導入が遅れていたことが挙げられる。卵巣癌の特徴の一つは多くのDNAコピー数異常を有することであるが、その原因は明らかではない。

Piwi-interacting RNA (piRNA)はPIWIファミリー蛋白質と結合する小分子RNA群と定義される。piRNAはmiRNAよりも少し長い23-32塩基の長さであり、2006年にマウス精巣において発見された。PIWIは生殖組織特異的に発現する基質特異性のない酵素(Argonaute)であり、PIWIはpiRNAと相補的な標的RNAを認識し、その遺伝子発現を抑制する。卵巣癌は生殖組織である卵巣に発生するものの、その発生母地が生殖組織である観点からは精査は行われていない。

そこで、上記2つの背景をもとに本研究を立案した。

2. 研究の目的

哺乳類ゲノムの半分近くは転移因子(Transposable elements: TE)によって占められている。Long interspersed element 1 (LINE1)に代表されるTEであるレトロトランスポゾン、元のTEを残しながらコピーがゲノム内を転移することにより哺乳類ゲノムを改変する、ゲノムの内在性変異源である。配列の同一な、または極めて類似したTE間でのDNA相同組み換えが引き起こされることにより、染色体の大きな再編成が誘導されることが予想される。卵巣癌においては多くのDNA増幅、DNA欠失が認められるが、その部位は卵巣癌のなかで共通しており、ランダムな機構とは考えにくい。姉妹染色体のあいだでrecombination(複製)、annealing(アニーリング)、transposition(転移)を起こすことにより増幅、欠失がおきるが、その起点として類似したTEが使われている可能性が考えられる。そこで、卵巣癌においては卵巣特異的なpiRNAの異常がおき、ゲノム上のTEの場所、数に変化がおこり、そこを複製起点としてコピー数異常が形成されていくという仮説をたてた。本研究では卵巣癌の大きな特徴であるDNAコピー数異常の原因を、現在までに検討されていない生殖組織特異的であるpiRNAの観点から解明することを目標とした。

3. 研究の方法

- (1) 卵巣漿液性癌と正常卵巣の全トランスクリプトーム解析(mRNA-seq)および全小分子RNA解析(miRNA-seq)
- (2) 卵巣癌におけるmRNA-small RNAネットワークの解析
- (3) PIWI蛋白の卵巣癌における機能の解析

4. 研究成果

(1) 卵巣漿液性癌5検体と正常卵巣2検体を用いて全トランスクリプトーム解析(mRNA-seq)および全小分子RNA解析(miRNA-seq)を行った。その結果20-23塩基長のmiRNAは卵巣癌と正常卵巣の間で発現パターンが明らかに異なっていた(図1A)。26-34塩基長のpiRNAは生殖細胞に特異的に発現する小分子RNAとされるが、piRNAは卵巣癌において正常卵巣と発現パターンが類似しているものと異なっているものがあることがわかった(図1B)。このことから、miRNAの発現パターンは卵巣癌と正常卵巣で大きく異なっており、piRNAは卵巣癌の一部において発現異常がおきていることがわかった。

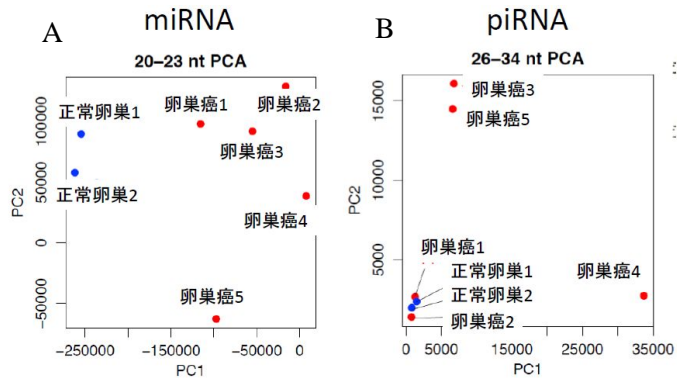


図1. 卵巣癌と正常卵巣のmiRNA、piRNAの主成分解析

(2) つづいてmRNA-seqおよびmiRNA-seqの統合的解析を行った。small RNAのうちsRNA、miRNA、piRNAをmRNA-seqのデータにマッピングをおこなった(図2)。その結果26個のmRNA-small RNAネットワークが明らかになった。例えばsRNAでは16個のネットワークが明らかとなった(図3)。同様に6個のmiRNA-mRNAネットワーク、4個のpiRNA-mRNAネットワークが明らかとなった。同定されたネットワークのなかで卵巣癌の発がん・進展に関連していると考えられる経路を同定されたmRNAの*in silico*におけるTCGAデータセ

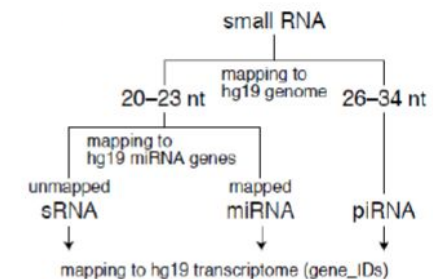


図2. mRNAとmiRNAの統合的解析

ットを用いた予後解析により候補を抽出した。そしてまず piRNA と RPS6KL1 のネットワークに着目した。

		sRNA			
		up		down	
mRNA	up	NM_001285829	CEBPA	NM_001177676	GPR68
		NM_001031713	MCUR1	NM_052876	NACC1
				NM_001282962	HJURP
	down	NM_001164343	ZBTB20	NM_001006624	PDPN
		NM_001278253	PIP5K1B	NM_005380	NBL1
				NM_001308264	ST7L
				NM_001271754	ITGBL1
				NM_000633	BCL2
				NM_001290787	ECEL1
				NM_001079823	LAMA2
		NR_040022	LOC100289495		
		NM_001006938	TCEAL6		

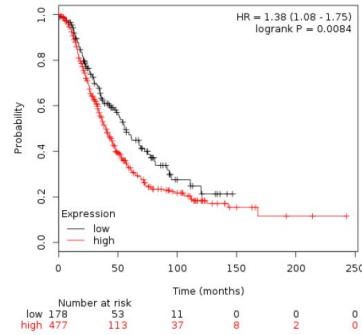


図3. 卵巣癌における sRNA-mRNA ネットワーク 図4. RPS6KL1 高発現群は予後が悪い

in silico で解析したところ卵巣癌において RPS6KL1 の高発現群は有期に予後が悪いことがわかった(図4)。また、同定された miR-497-5p について乳癌と肝臓癌において *in silico* 解析で高発現が予後良好と関連が認められたため、*in vitro* において解析を行った。卵巣癌細胞株

(Kuramochi) に miR-497 mimic を投与したところ増殖は抑制され、miR-497 inhibitor を投与したところ増殖が亢進した。このことから miR-497-5p は卵巣癌において腫瘍抑制に働いていると考えられた(図5)。

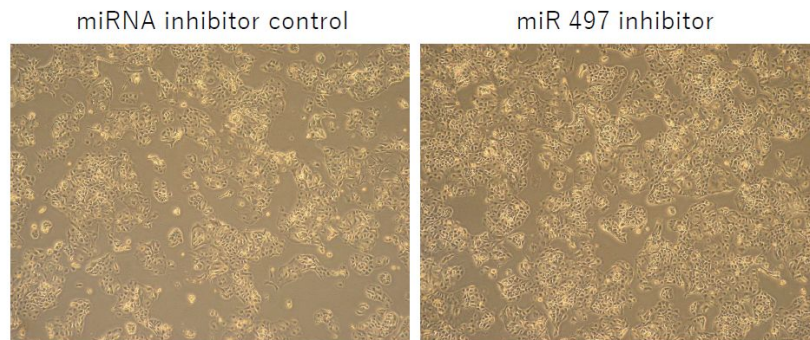


図5. miR-497 は卵巣癌の腫瘍抑制に働く

(3) 続いて PIWI 蛋白の卵巣癌における解析を行った。mRNA-seq の結果より PIWIL1、PIWIL2、PIWIL3、PIWIL4 のうち PIWIL2 と PIWIL4 の発現が卵巣癌では高いことがわかった。なかでも PIWIL1 の低発現および PIWIL4 の高発現が予後不良と関連することを見出した。また、si RNA を用いたノックダウンにより PIWIL4 のノックダウンが卵巣癌の増殖を抑制することが明らかとなった。現在これら PIWI 蛋白の機能解析を継続している。

また、現在はいままで同定した上記ネットワークが DNA コピー数異常を起こすか *in vitro* での解析を継続中である。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計3件)

1. Aoki D, **Chiyoda T**. PARP inhibitors and quality of life in ovarian cancer. *Lancet Oncol.* 19(8):1012-1014, 2018. 査読あり
2. Nanki Y, **Chiyoda T**, Kataoka F, Nomura H, Nakadaira N, Iwasa N, Hashimoto S, Arima H, Susumu N, Aoki D. Elevated preoperative neutrophil : lymphocyte ratio as a preoperative indicator of mature cystic teratoma with malignant transformation. *J Obstet Gynaecol Res.* 43(4):744-748, 2017. 査読あり
3. **Chiyoda T**, Hart PC, Eckert MA, McGregor SM, Lastra RR, Hamamoto R, Nakamura Y, Yamada SD, Olopade OI, Lengyel E, Romero IL. Loss of BRCA1 in the cells of origin of ovarian cancer induces glycolysis: A window of opportunity for ovarian cancer chemoprevention. *Cancer Prev Res (Phila).* 10(4):255-266, 2017. 査読あり

〔学会発表〕(計1件)

〔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：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：佐藤 薫

ローマ字氏名：SATO, Kaoru

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。