

**Identification of aberrantly expressed long non-coding RNAs**

**in ovarian high-grade serous carcinoma cells**

卵巣高異型度漿液性腺癌において異常に発現する long non-coding RNA の同定

中島 健吾

山口大学大学院医学系研究科

産科婦人科学講座

令和 2 年 5 月

## 目次

【要旨】	3
【研究の背景と目的】	4
【方法】	5
【結果】	9
【考察】	16
【結語】	18
【謝辞】	18
【利益相反および研究倫理】	18
【参考文献】	19

## 【要旨】

**目的** ; 本研究は、卵巣高異型度漿液性腺癌 (high-grade serous carcinoma : HGSC) において異常に発現する long non-coding RNA (lncRNA) の同定を目的とした。

**方法** ; HGSC 細胞株、正常ヒト卵巣上皮細胞および正常卵巣組織から抽出した total RNA について、84 種類の lncRNA の発現を網羅的に解析できる PCR アレイで解析し、HGSC 細胞株で異常に発現する lncRNA を同定した。同定した lncRNA の機能を調べるため、それらの発現を改変した HGSC 細胞株を樹立し、細胞増殖能、遊走能、細胞周期およびアポトーシスにおける影響を調べた。また、同定した lncRNA の発現レベルを多症例の正常卵巣組織および卵巣 HGSC 組織において解析した。

**結果** ; HGSC 細胞株で高発現している 6 個の lncRNA および低発現している 4 個の lncRNA の合計 10 個を HGSC 細胞株で異常に発現する lncRNA として同定した。我々は、同定した lncRNA のうち 4 個の lncRNA の発現を改変した HGSC 細胞株を樹立した:すなわち、HGSC 細胞株で高発現している 2 個の lncRNA を発現抑制した細胞株および低発現している 2 個の lncRNA (MEG3 および POU5F1P5) を過剰発現した細胞株のそれぞれである。樹立した 4 つの細胞株において、細胞増殖、細胞周期およびアポトーシスについては、コントロール細胞株と比較して有意差はみられなかったが、細胞遊走能については、MEG3 および POU5F1P5 を過剰発現した HGSC 細胞株において有意に抑制された。さらに、HGSC 細胞株で低発現している 4 個の lncRNA は、卵巣 HGSC 組織においても正常卵巣組織に比べ、低発現であることが確認された。

**結論** ; 我々は、卵巣 HGSC において異常に低発現している 4 個の lncRNA を同定した。

## 1, 【研究の背景と目的】

卵巣癌は、婦人科領域において最も致死的な癌である。上皮性卵巣癌は、組織学および分子遺伝学に基づいて、主に類内膜癌、明細胞癌、粘液性癌、低異型度漿液性癌、および高異型度漿液性癌 (HGSC) に分類される (1-3)。これらのうちで、HGSC は最も悪性度の高いサブタイプであり、上皮性卵巣癌症例のうち全体の約 2/3 を占める (2)。これら上皮性卵巣癌のサブタイプは、それぞれ異なった組織学的特徴を持ち、さらに発生母地や遺伝的背景が異なることから、それぞれが異なる疾患であるとの考えが一般的になってきている (2,3)。近年の手術および化学療法 of 進歩にもかかわらず、卵巣癌は、鑑別診断の遅れ、化学療法抵抗性および再発しやすいこと等から、5 年生存率が未だ 30-40% 程度であり、予後が非常に悪い疾患である (4)。これらの予後を改善するためには、卵巣癌の進行と悪性化に関わる分子機構を解明する必要がある。

近年、大規模シーケンス技術の進歩等により、ヒトゲノムの 98% 以上がタンパク質をコードしない non-coding RNA として転写されることが一般に認知されてきている (5-7)。Non-coding RNA の一種である long non-coding RNA (lncRNA) は、200 塩基以上の転写産物と定義されている。lncRNA は、X 染色体不活化、ゲノム刷り込み、クロマチンリモデリングおよび細胞運命決定等、多岐にわたる生物学的過程において役割を担っている (8,9)。さらに、lncRNA は多くの種類の癌において腫瘍形成に密接に関わっている。実際、癌における lncRNA の生物学的役割に関する報告は、この数年間で指数関数的に増加している (7,10)。卵巣癌においては、H19、HOTAIR、HOXA11-AS、LSINCT5、MALAT1 および PVT1 等の lncRNA が細胞増殖および悪性度に関与することが報告されている (10-13)。

本研究では、卵巣癌の中で最も高頻度で悪性度の高いサブタイプである HGSC に焦点を当て、HGSC の進行と悪性度に関与する lncRNA を同定することを目的とした。我々は、lncRNA の発現プロファイルを HGSC 細胞株と正常ヒト卵巣上皮細胞および正常卵巣組織において比較し、HGSC 細胞株で異常に発現する lncRNA を同定した。さらに、HGSC 細胞株で低発現する lncRNA のいくつかは、卵巣 HGSC 組織においても低発現であることを明らかにした。本研究結果は、また、同定した lncRNA のいくつかは HGSC の悪性度の抑制



に効果があることも示唆している。

## 2, 【方法】

### 2.1 細胞培養と組織検体

ヒト卵巣癌細胞株である KURAMOCHI および TYK-nu を HGSC 細胞モデルとして用いた。これらの細胞株は JCRB 細胞バンク (Japanese Collection of Research Bioresources, Tokyo, Japan) から購入した。KURAMOCHI は RPMI-1600 (Wako, Tokyo, Japan)、TYK-nu は Minimal essential medium eagle (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) の各培地に 10%ウシ胎児血清 (FBS) を添加した培養液で培養した。正常ヒト卵巣上皮細胞 (HOSE) はコスモバイオ (Tokyo, Japan) から購入し、ヒト卵巣上皮細胞培地 (ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA) にて培養した。

22 症例の HGSC 検体は、島根大学病院で手術を受けた患者から採取した。10 症例の正常卵巣組織検体は、山口大学病院にて HGSC とは異なる理由で卵巣摘出術を受けた患者から採取した。採取した組織検体は直ちに液体窒素に浸し、RNA 抽出まで -80°C で保存した。

### 2.2 RNA 抽出と real-time RT-PCR

各細胞株からの total RNA 抽出には RNeasy mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いた。各組織検体からの total RNA 抽出は ISOGEN 試薬 (ニッポンジーン、Tokyo, Japan) を用いて、クロロホルム抽出および 2-propanol 沈殿にて行った (14)。

相補的 DNA (cDNA) 合成は 1  $\mu$ g の total RNA を材料とし、ランダムヘキサマーを用いて QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) にて行った。Real-time RT-PCR は TB Green Primer Ex Taq II DNA Polymerase (TAKARA, Tokyo, Japan) を使用し、表 1 に示したプライマーを用い、次の増幅条件で行った：40 cycles of 95°C for 5 sec and 60°C for 20 sec with an initial step of 95°C for 10 sec。相対的発現レベルは GAPDH を内部標準遺伝子として  $\Delta \Delta Ct$  法により算出した。

表 1. 本研究で使用した PCR プライマー

Primer name	Usage	Forward	Reverse
CDKN2B-AS1	RT-PCR	ATTCCTCAGCTCCTCTCATCTG	CCAAGACAGCAAGTGGTATTGA
DLEU2	RT-PCR	CTGGAGAACAGCCTCACTTCTT	GTAGAGGTCTCTTTTATTGTGGTCTT
LINC00152	RT-PCR	ATGGCTTGAACATTTGGTCTTC	TTCGATCAAGTGTGTCATAGAGC
LINC01234	RT-PCR	TGGGAAAGAGGAGTCTCTCG	ATCTGAGGAGCTTGGGAATGC
ADAMTS9-AS2	RT-PCR	TATTGAAACCTGCTTTGTGCTG	TCATACTTTGGCATGACTGTCC
MEG3	RT-PCR	GCCATCACCTGGATGCCTAC	AGTCTCTGGGTCCAGCCTGT
POU5F1P5	RT-PCR	ACTGCAGCAGATCAGTCACATT	CAAAATCCTCTCATGGTGCATA
XIST	RT-PCR	ACGCTGCATGTGTCCTTAGTAG	TTGGSGCCTCTTATAGCTGTTTTG
GAPDH	RT-PCR	AGGTGAAGGTCGGAGTCA	GGTCATTGATGGCAACAA
MEG3 vector	Construction	ATTAAGGATCCTCGAAGAGAGGGAGCG CGCCTTGG	CCTGCGGTGCGGGCCGCACACATTTATTG AGAGCACA
POU5F1P5 vector	Construction	ATTAAGGATCCTCGAATCCAGTCCCAGG ACATCTC	CCTGCGGTGCGGGCCGCTCTACCTACTGT GTCCCAGT

### 2.3 PCR アレイ

cDNA 合成は、RT2 First Strand Kit (QIAGEN) にて取扱説明書に従い行った (15,16)。本研究では、さまざまな種類の癌において関与が報告されている 84 種類の lncRNA を網羅した PCR アレイを用いた (RT2 lncRNA PCR Array Human Cancer Pathway Finder (QIAGEN))。Real-time RT-PCR は RT2 SYBR Green Master Mix (Qiagen) を使用し、次の増幅条件で行った : 40 cycles of 95 °C for 15 sec, 60 °C for 60 sec, with an initial step of 95 °C for 10 min。相対的発現レベルは ACTB を内部標準遺伝子として  $\Delta \Delta Ct$  法により算出した。lncRNA 発現における有意な変化は、2 つの HGSC 細胞株の両方で HOSE および正常卵巣組織に比べ 2 倍以上の高発現あるいは 1/2 以下の低発現と定義した。

### 2.4 HGSC 細胞株 (TYK-nu) における lncRNA の発現抑制および過剰発現

LINC00152 および LINC01234 の発現抑制のため、各 lncRNA に対する siRNA (Lincode Human lncRNAs siRNA SMART pool) と何も認識しないコントロールの siRNA (Lincode Non-Targeting pool siRNA) のそれぞれを Dharmacon (Lafayette, CO, USA) より購入した。TYK-nu を 6-well プレートに  $5 \times 10^4$  細胞/well で培養し、50% コンフルエンスの状態、20 nM siRNA を RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) にて導入した (17)。

MEG3 および POU5F1P5 の過剰発現のため、各 lncRNA の発現ベクターを構築した。

MEG3 および POU5F1P5 の完全長 cDNA は HOSE cDNA をテンプレートとして、表 1 に示した各プライマーと PrimeSTAR GXL DNA polymerase (Takara) を用いて、次の条件下で増幅した：35 cycles of 98 °C for 10 sec, 60 °C for 15 sec, and 68 °C for 2.5 min。増幅した完全長 cDNA を In-Fusion HD Cloning Kit (Takara) により pMXs-IRES-Bsd 発現ベクター (Cell Biolabs、San Diego、CA、USA) のマルチクローニングサイトに挿入した (17)。構築した MEG3 および POU5F1P5 発現ベクターとコントロールベクター (cDNA を挿入していない発現ベクター) を、レトロウイルスの構成タンパク質を発現するベクターと共に、リポフェクタミン 3000 (Invitrogen) を用いて HEK293T 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入 2 日後に培養液を 100 倍に濃縮し、発現ベクターを内包するレトロウイルス溶液として使用した。レトロウイルス溶液を 6-well プレートに  $5 \times 10^4$  細胞/well で培養した TYK-nu に添加した。安定発現細胞株は 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のブラストサイジンで 1 ヶ月間薬剤選別することで樹立した。

## 2.5 細胞増殖アッセイ

lncRNA の発現を改変した TYK-nu 株およびコントロール細胞株のそれぞれを 6-well プレートに  $6 \times 10^4$  細胞/well の密度で播種した。各細胞株について 24 時間ごとにトリプシン処理にて単一細胞懸濁液を調整し、TC20 自動セルカウンター (Bio-Rad、Hercules、CA、USA) で細胞数を計測した (18,19)。各細胞株の増殖は 3 回の独立した実験で評価した。

## 2.6 細胞周期およびアポトーシス解析

細胞周期解析では、MEG3 および POU5F1P5 を過剰発現した TKY-nu 株とコントロール細胞株をトリプシン処理し、70% エタノールで 30 分固定し、0.25 mg/ml RNase を添加した PBS で  $1 \times 10^6$  細胞/ml に調整した。調整した単一細胞懸濁液を 7-AAD (Bio-Rad) で染色し、フローサイトメーター (NovoCyte Flow Cytometer) (ACEA Biosciences、San Diego、CA、USA) にて解析した。各細胞周期 (G1、S、G2 および subG1 期) にある細胞の割合を専用のソフトウェア (NovoExpress) (ACEA Biosciences) にて算出した。

アポトーシス解析は Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Affymetrix、San Jose、CA) を

用いて、取扱説明書に従い行った。MEG3 および POU5F1P5 を過剰発現した TKY-nu 株とコントロール細胞株をトリプシン処理し、調整した単一細胞懸濁液を Annexin V-FITC および 7-AAD にて染色した。Annexin V 陽性で 7-AAD 陰性の早期アポトーシス細胞および、Annexin V および 7-AAD の両方が陽性である後期アポトーシス細胞のそれぞれをフローサイトメーターにて計測した。

## 2.7 創傷治癒アッセイ

MEG3 および POU5F1P5 を過剰発現した TKY-nu 株とコントロール細胞株のそれぞれを 6-well プレートに  $2 \times 10^5$  細胞/well に調整し、コンフルエントまで培養した。1000  $\mu$ l チップの先端で well の中央を搔爬し、細胞層に溝（創傷）を形成した。創傷作製 72 時間後に、創傷領域内に移動した細胞を顕微鏡下で撮影し、細胞の移動により狭められた創傷領域両端の距離を創傷治癒活性として測定した (18)。創傷治癒活性はそれぞれ独立した 3 回の実験の平均値から算出した。

## 2.8 細胞遊走アッセイ

細胞遊走アッセイは、Biocoat Matrigel Invasion Chamber (Corning Life Science Inc、MA、USA)を用いて、取扱説明書に従い行った (18)。MEG3 および POU5F1P5 を過剰発現した TKY-nu 株とコントロール細胞株のそれぞれを FBS 非添加培地に  $5 \times 10^4$  細胞/well で懸濁し、ウェル (12-well マイクロプレート (Corning)) 上に設置したインサートチャンバー内に播種した。化学遊走物質として 10% FBS を添加した培地をインサートチャンバー下のウェルに満たした。培養 24 時間後に、チャンバーの膜上面に残った細胞を綿棒で完全に拭き取った。次に、チャンバーの膜を Diff-Quick 染色液 (Sysmex、Kobe、Japan) に浸し、膜の下面に遊走した細胞を染色した。倍率 200 倍の顕微鏡下で無作為に抽出した 5 視野について、染色された細胞を遊走した細胞として計測した。遊走細胞数はそれぞれ独立した 3 回の実験の平均値から算出した。

## 2.9 統計解析

両群間の有意差の比較には t-検定および Wilcoxon 検定を行った。p-value が 0.05 未満の場合を有意と定義した。統計解析は、SPSS 5.0 J for windows ソフトウェアパッケージ (SAS Institute、NC、USA)を用いて行った。

## 3, 【結果】

### 3.1 HGSC 細胞株において異常に発現する lncRNA の同定

我々は、HGSC で異常に発現している lncRNA の同定のために HGSC 細胞株を用いた。細胞株を用いたのは、一般に、細胞株を用いた方が個人差を反映する組織検体を用いるよりも普遍的なデータが得られるという理由からである。様々な種類の癌に関連する 84 種類の lncRNA を網羅的に解析できる PCR アレイを用いて、2つの HGSC 細胞株 (KURAMOCHI および TYK-nu) における lncRNA の発現レベルを、正常ヒト卵巣上皮細胞 (HOSE) および正常卵巣組織と比較した。解析した 84 個の lncRNA のうち、HGSC 細胞株で高発現している 6 個の lncRNA (CDKN2B-AS1、DLEU2、LINC00152、LINC01234、PRNCR1 および SNHG16) および、低発現している 4 個の lncRNA (ADAMTS9-AS2、MEG3、POU5F1P5 および XIST) を HGSC 細胞株において異常に発現する lncRNA として同定した (表 2)。

表 2. 卵巣高異型度漿液性腺癌 (HGSC) 細胞株において異常に発現する lncRNA

Symbol	Fold change comparing to HOSE		Fold change comparing to ovaries	
	KURAMOCHI	TYK-nu	KURAMOCHI	TYK-nu
<b>Upregulated in HGSC cell lines</b>				
CDKN2B-AS1	81.99	8.52	81.99	8.52
DLEU2	65.46	7.27	18.18	2.02
LINC00152	7.58	3.34	498.86	219.51
LINC01234	57.33	51.79	187.10	169.01
PRNCR1	3.94	4.10	11.20	11.66
SNHG16	2.41	2.55	3.03	3.20
<b>Downregulated in HGSC cell lines</b>				
ADAMTS9-AS2	0.01	0.02	0.00	0.00
MEG3	0.01	0.02	0.00	0.00
POU5F1P5	0.02	0.02	0.03	0.04
XIST	0.00	0.00	0.00	0.00

KURAMOCHI and TYK-nu: HGSC cell lines. HOSE: Human ovarian surface epithelial cells.

次に、同定した lncRNA の発現レベルを 2 つの HGSC 細胞株および HOSE において real-time RT-PCR により解析した。PRNCR1 および SNHG16 においては、設計したプライマーで PCR 増幅がみられなかったが、それらを除く 8 個の lncRNA においては、PCR アレイにおける発現プロファイルが再現された (図 1)。

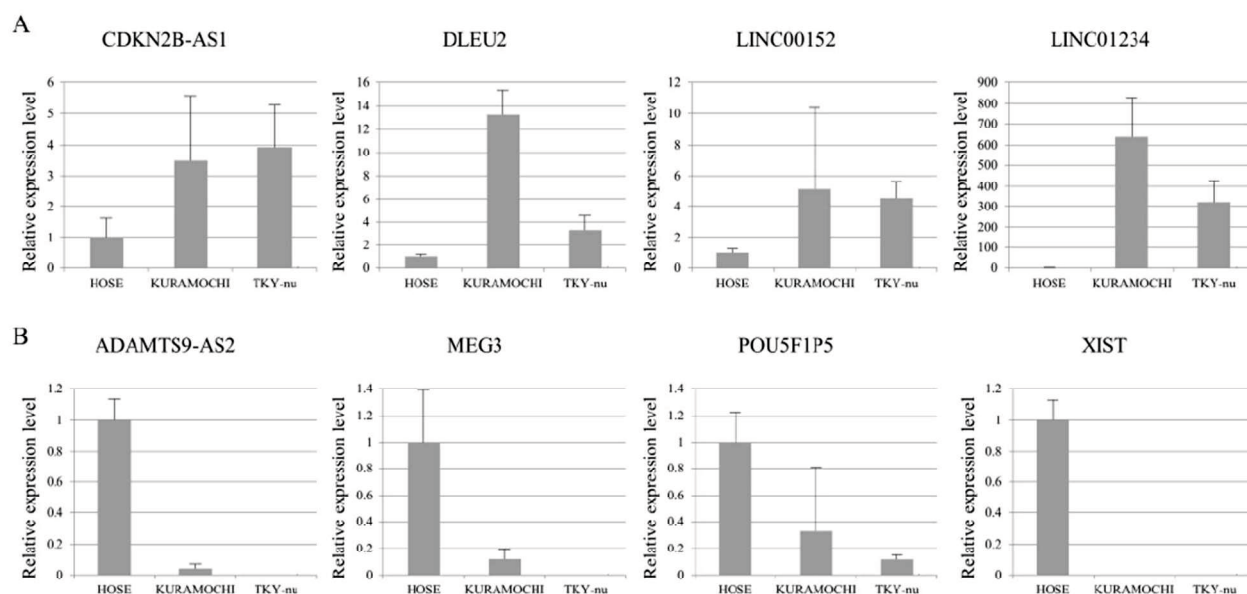


図 1. PCR アレイで同定した lncRNA の HGSC 細胞株 (KURAMOCHI および TYK-nu) および HOSE における発現レベルの検証

(A) HGSC 細胞株で高発現している 4 個の lncRNA (CDKN2B-AS1、DLEU2、LINC00152 および LINC01234) の発現レベルを 2 つの HGSC 細胞株および HOSE について real-time RT-PCR により解析した。GAPDH を内部標準として用いた。グラフは 3 回の独立した実験の平均値  $\pm$  SD を示している。

(B) HGSC 細胞株で低発現している 4 個の lncRNA (ADAMTS9-AS2、MEG3、POU5F1P5 および XIST) の発現レベルを 2 つの HGSC 細胞株および HOSE について real-time RT-PCR により解析した。GAPDH を内部標準として用いた。グラフは 3 回の独立した実験の平均値  $\pm$  SD を示している。

### 3.2 HGSC 細胞株で高発現あるいは低発現する lncRNA の発現を改変した細胞株の樹立

HGSC 細胞株で異常に発現する lncRNA の機能を解析するために、我々は、高発現の lncRNA については発現抑制した HGSC 細胞株および、低発現の lncRNA については過剰発現した HGSC 細胞株を樹立した。発現抑制および過剰発現は、TYK-nu においては成功したが、KURAMOCHI においては細胞の増殖速度が遅く、遺伝子導入効率が悪いいため、うまくいかなかった。高発現の lncRNA のうち、LINC00152 および LINC01234 は siRNA によって発現抑制されたが (図 2A)、CDKN2B-AS1 および DLEU2 は発現抑制されなかった。

低発現の lncRNA のうち、MEG3 および POU5F1P5 のそれぞれについては、発現ベクターの導入により安定過剰発現株を樹立した。残りの低発現 lncRNA である ADAMTS9-AS2 および XIST については、これらの完全長 cDNA が長過ぎて設計したプライマーでは増幅できなかつたため、発現ベクターを構築できなかつた。樹立した 4 つの発現改変細胞株における発現抑制および過剰発現は real-time RT-PCR により確認した (図 2C および D)。樹立した発現改変細胞株と親株の間に細胞形態の差異は認められなかつた (図 2A および B)。

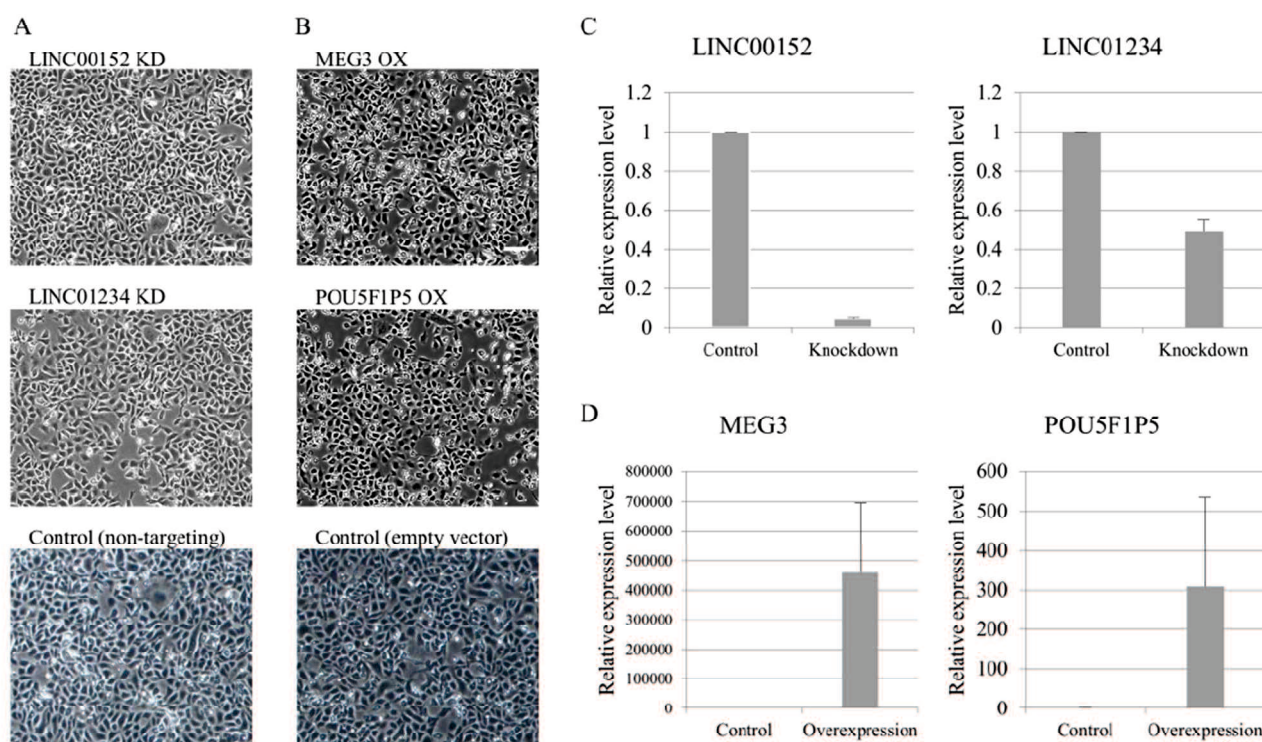


図 2. 高発現 lncRNA (LINC00152 および LINC01234) および低発現 lncRNA (MEG3 および POU5F1P5) の発現を改変した HGSC 細胞株 (TYK-nu) の樹立

(A) LINC00152 あるいは LINC01234 を発現抑制 (KD) した TYK-nu 株の細胞形態。Mock コントロール細胞株として何も認識しない siRNA を遺伝子導入した細胞株を使用した。スケールバー: 100  $\mu$ m。

(B) MEG3 あるいは POU5F1P5 を過剰発現 (OX) した TYK-nu 株の細胞形態。Mock コントロール細胞株として cDNA を挿入していない発現ベクターを遺伝子導入した細胞株を使用した。スケールバー: 100  $\mu$ m。

(C) LINC00152 あるいは LINC01234 の発現抑制の確認。それぞれの発現抑制細胞株とコントロール細胞株において、GAPDH を内部標準とし LINC00152 および LINC01234 の相対発現レベルを real-time RT-PCR にて解析した。グラフは 3 回の独立した実験の平均値  $\pm$  SD を示している。

(D) MEG3 あるいは POU5F1P5 の過剰発現の確認。それぞれの過剰発現細胞株とコントロール細胞株において、GAPDH を内部標準とし MEG3 および POU5F1P5 の相対発現レベルを real-time RT-PCR にて解析した。グラフは 3 回の独立した実験の平均値  $\pm$  SD を示している。



### 3.3 樹立した発現改変細胞株における細胞増殖能

LINC00152 あるいは LINC01234 を発現抑制した細胞株および、MEG3 あるいは POU5F1P5 を過剰発現した細胞株のそれぞれについて細胞増殖能をコントロール細胞株と比較した。その結果、細胞増殖能において発現改変細胞株とコントロール細胞株の間に有意差はみられなかった (図 3)。

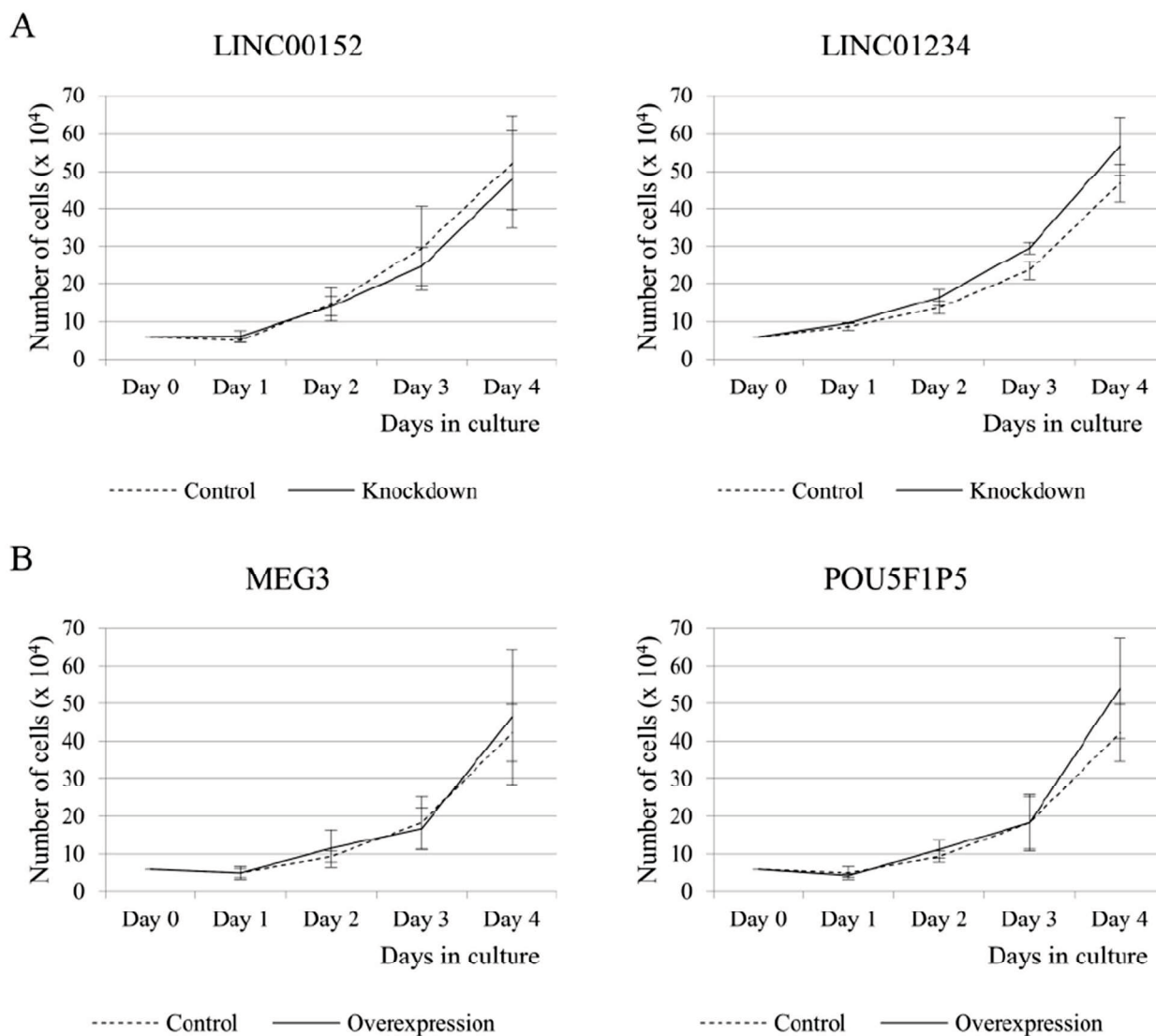


図 3. 樹立した HGSC 細胞株における細胞増殖アッセイ

(A) それぞれの発現抑制細胞株 (LINC00152 および LINC01234) およびコントロール細胞株 (non-targeting) における 24 時間おきに計測した細胞数。グラフは 3 回の独立した実験の平均値  $\pm$  SD を示している。

(B) それぞれの過剰発現細胞株 (MEG3 および POU5F1P5) とコントロール細胞株 (empty vector) における 24 時間おきに計測した細胞数。グラフは 3 回の独立した実験の平均値  $\pm$  SD を示している。



### 3.4 樹立した発現改変細胞株における細胞周期とアポトーシス

MEG3 あるいは POU5F1P5 を過剰発現した HGSC 細胞株について、細胞周期およびアポトーシスについて解析した。この 2 つの細胞株を解析した理由は、これらが安定発現細胞株であり、解析に十分な細胞数が得られたためである。一方、LINC00152 あるいは LINC01234 を発現抑制した HGSC 細胞株については、これらが siRNA によって一過的に発現抑制された細胞株であるため、これらの解析に十分な細胞数は得られなかった。

細胞周期解析において、MEG3 あるいは POU5F1P5 の過剰発現細胞株とコントロール細胞株との間で各細胞周期 (G1、S、G2 および subG1 期) に含まれる細胞の割合に有意差はなかった (図 4A)。

アポトーシス解析では、annexin V 陽性および 7-AAD 陰性の細胞を早期アポトーシス細胞として、また、annexin V 陽性および 7-AAD 陽性の細胞を後期アポトーシス細胞としてそれぞれ検出した (図 4B、上部パネル)。MEG3 あるいは POU5F1P5 の過剰発現細胞株とコントロール細胞株との間で早期および後期アポトーシス細胞の割合に有意差はなかった (図 4B、下部パネル)。

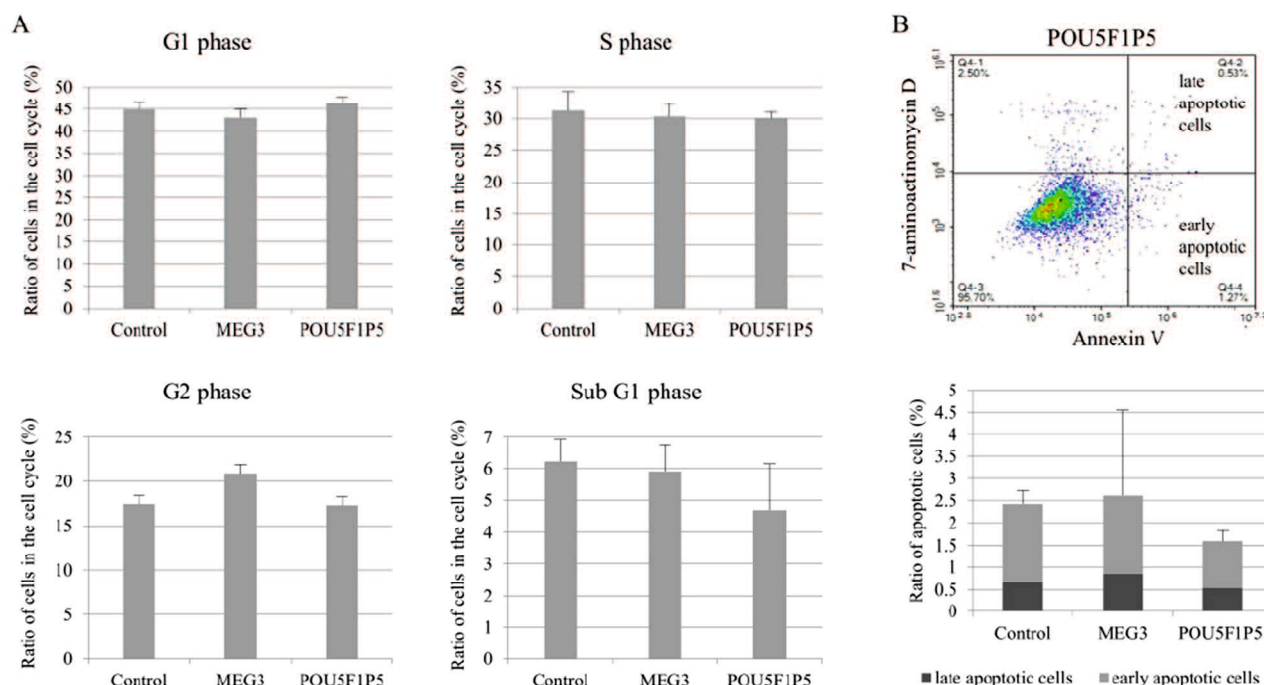


図 4. MEG3 および POU5F1P5 を過剰発現した HGSC 細胞株における細胞周期とアポトーシス

(A) MEG3 および POU5F1P5 を過剰発現した HGSC 細胞株およびコントロール細胞株におけるフローサイトメーターを用いた細胞周期解析。それぞれの細胞周期 (G1、S、G2 および subG1 期) にある細胞の割合を解

析した。グラフは3回の独立した実験の平均値  $\pm$  SD を示している。

(B) MEG3 および POU5F1P5 を過剰発現した HGSC 細胞株およびコントロール細胞株におけるフローサイトメーターを用いたアポトーシス解析。上部パネルは、POU5F1P5 を過剰発現した HGSC 細胞株におけるフローサイトメトリーの結果を代表例として示した。Annexin V 陽性および 7-AAD 陰性の細胞を早期アポトーシス細胞として、annexin V 陽性および 7-AAD 陽性の細胞を後期アポトーシス細胞としてそれぞれ検出した。下部パネルは後期（黒色）および早期（灰色）アポトーシス細胞の割合をそれぞれ示した。グラフは3回の独立した実験の平均値  $\pm$  SD を示している。

### 3.5 樹立した発現改変細胞株における細胞遊走能

細胞遊走能は、MEG3 あるいは POU5F1P5 の過剰発現細胞株について、創傷治癒アッセイ(図 5A) および細胞遊走アッセイ (図 5B) の2つの方法で解析した。創傷治癒アッセイにおいて、MEG3 および POU5F1P5 過剰発現株では、コントロール細胞株と比較し、創傷作製 72 時間後に創傷領域へ移動してきた細胞数が有意に少なく(図 5A、上部パネル)、また、創傷治癒活性も有意に低下していた (図 5A、下部パネル)。細胞遊走アッセイにおいては、MEG3 および POU5F1P5 過剰発現株では、コントロール細胞株と比較し、インサートチャンバーの膜を透過した遊走細胞の数は有意に少なかった (図 5B)。以上の結果は、これらの2つの lncRNA の過剰発現は HGSC 細胞株において細胞遊走能を抑制することを示している。

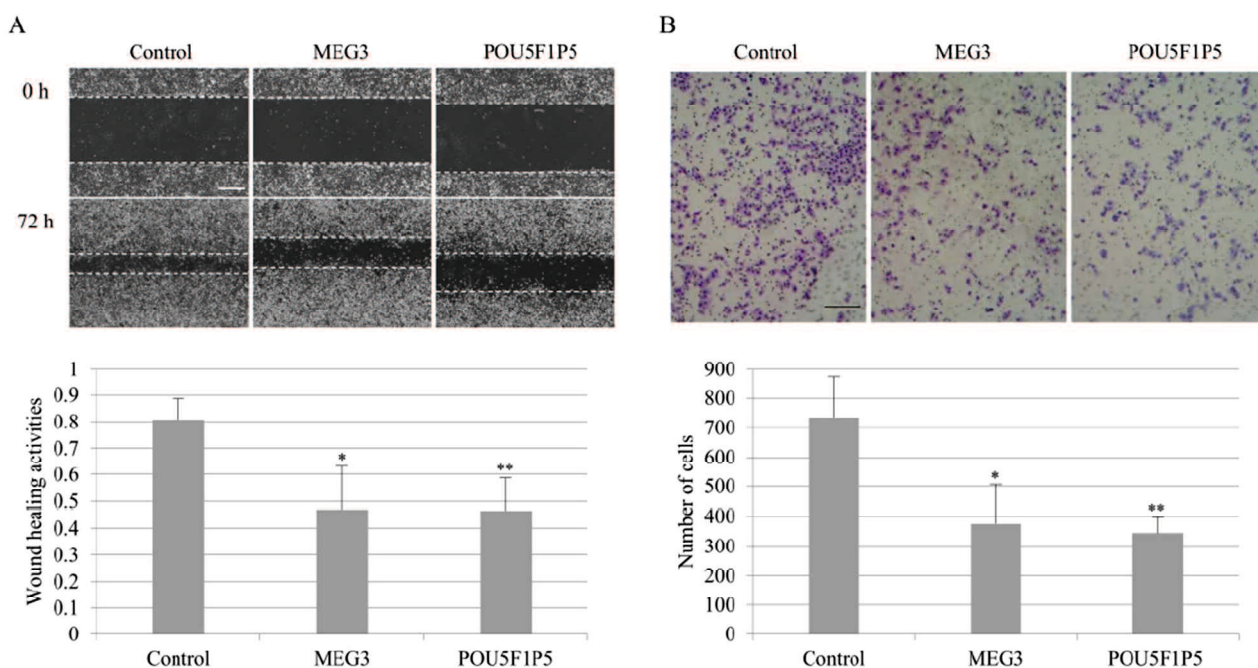


図 5. HGSC 細胞株において lncRNA (MEG3 あるいは POU5F1P5) の過剰発現が細胞遊走能に及ぼす影響

(A) MEG3 および POU5F1P5 を過剰発現した HGSC 細胞株およびコントロール細胞株における創傷治癒アッセイ。創傷作製 0 時間および 72 時間後における同一視野の代表例を示した (上部パネル)。水平の点線は創傷の辺縁を示している。スケールバー: 200  $\mu\text{m}$ 。創傷治癒活性は、細胞の移動により狭められた創傷辺縁の幅を元の幅で除して算出した (下部パネル)。グラフは 3 回の独立した実験の平均値  $\pm$  SD を示している。\*;  $p < 0.05$  vs コントロール株。\*\*;  $p < 0.01$  vs コントロール株。

(B) MEG3 および POU5F1P5 を過剰発現した HGSC 細胞株およびコントロール細胞株における細胞遊走アッセイ。Diff-Quick で染色された遊走細胞の代表例を示した (上部パネル)。スケールバー: 200  $\mu\text{m}$ 。細胞遊走活性は無作為に選んだ 5 視野における遊走細胞数を計測することで算出した (下部パネル)。グラフは 3 回の独立した実験の平均値  $\pm$  SD を示している。\*;  $p < 0.05$  vs コントロール株、\*\*;  $p < 0.01$  vs コントロール株 (T 検定)。

### 3.6 HGSC 細胞株で異常に発現する lncRNA の卵巣 HGSC 組織における発現レベル

HGSC 細胞株で異常に発現する lncRNA の卵巣 HGSC 組織における発現プロファイルを調べるため、22 検体の卵巣 HGSC 組織および 10 検体の正常卵巣組織における 4 個の高発現 lncRNA (CDKN2B-AS1、DLEU2、LINC00152 および LINC01234) および 4 個の低発現 lncRNA (ADAMTS9-AS2、MEG3、POU5F1P5 および XIST) の発現レベルを real-time RT-PCR により解析した。4 個の低発現 lncRNA (ADAMTS9-AS2、MEG3、POU5F1P5 および XIST) の発現レベルは、卵巣 HGSC 組織において正常卵巣組織と比較し有意に低く、これら 4 個の lncRNA の発現プロファイルは HGSC 細胞株と卵巣 HGSC 組織において一致することが確認された (図 6)。しかしながら、4 個の高発現 lncRNA (CDKN2B-AS1、DLEU2、LINC00152 および LINC01234) においては、卵巣 HGSC 組織および正常卵巣組織で発現レベルに有意差はなかった (データは示さず)。

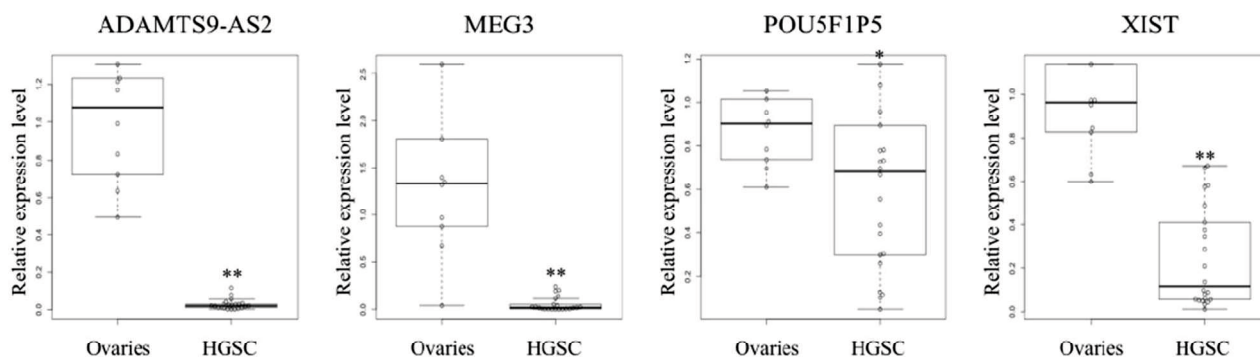


図 6. 多症例の卵巣 HGSC 組織および正常卵巣組織における HGSC 細胞株で異常に発現する lncRNA の発現レベル

箱ひげ図は、22 検体の卵巣 HGSC 組織および 10 検体の正常卵巣組織における HGSC 細胞株で低発現してい

る lncRNA (ADAMTS9-AS2、MEG3、POU5F1P5 および XIST) の相対的発現レベルを示す。各 lncRNA の相対的発現レベルは、real-time RT-PCR を用いて 3 回の独立した実験を行い、解析した。内部標準には GAPDH を用いた。箱ひげ図内にプロットされた丸は各サンプルを示している。\*;  $p < 0.05$  vs コントロール、\*\*;  $p < 0.01$  vs コントロール (Mann-Whitney U 検定)。

#### 4, 【考察】

本研究では、HGSC 細胞株と正常ヒト卵巣上皮細胞および正常卵巣組織との発現プロファイルの比較をもとに、HGSC 細胞株で異常に発現する 10 個の lncRNA を同定し、さらに、それらのうち、異常に低発現する 4 個の lncRNA (ADAMTS9-AS2、MEG3、POU5F1P5 および XIST) が卵巣 HGSC 組織においても同様に低発現していることを示した。ADAMTS9-AS2、MEG3 および XIST の卵巣 HGSC 組織における発現レベルは、正常卵巣組織と比較し、特に低値であった。したがって、これらの lncRNA は将来的な分子標的治療において、HGSC に特異的な分子標的の候補となり得る。悪性度を抑制する lncRNA の活性をドラッグデリバリーシステムなどで癌でのみ特異的に回復させることで、これらの lncRNA は治療に応用出来るかもしれない。

また、本研究において、HGSC 特異的な lncRNA のいくつかは HGSC の悪性度に関与する可能性が示された。4 個の異常に低発現な lncRNA (ADAMTS9-AS2、MEG3、POU5F1P5 および XIST) のうち、MEG3 および POU5F1P5 の過剰発現は細胞遊走を阻害した。これは、卵巣 HGSC において、細胞遊走に対する MEG3 および POU5F1P5 の抑制効果を示した最初の報告である。しかしながら、MEG3 および POU5F1P5 が HGSC 細胞株において細胞増殖を抑制しなかった理由は不明である。

POU5F1P5 は、さまざまな種類の癌組織および癌細胞株で高発現していることが報告されているが、その機能は未だ明らかではない (20)。POU5F1P5 は子宮体癌検体で高発現しており、POU5F1P5 の過剰発現は子宮体癌細胞株の細胞増殖を促進するという報告がある (21)。この結果は、POU5F1P5 の過剰発現は HGSC 細胞株において癌抑制効果を示すという本研究の結果と矛盾している。この矛盾は癌の種類の違いを反映したものかもしれない。仮にそうであるならば、POU5F1P5 の機能は癌の種類によって異なることが示唆される。実際、XIST を含むいくつかの lncRNA では、癌の種類によって癌抑制あるいは癌促進に働

くことが報告されている (7,13,22,23)。

MEG3 は、さまざまな種類の癌において悪性度を抑制する (10-13)。さらに、MEG3 は卵巣癌組織において低発現であり、卵巣癌細胞株における MEG3 の過剰発現は細胞増殖、細胞遊走および浸潤を阻害し、アポトーシスを促進する (24-26)。しかしながら、本研究では、MEG3 の過剰発現が HGSC 細胞株において細胞遊走を阻害することしか示されなかった。この矛盾は機能解析に使用された細胞株の差異による可能性がある。上記の研究で使用されている卵巣癌細胞株は、OVCAR3、SKOV4 および A2780 であり、我々が用いた HGSC 細胞株とは異なる性質を持っている (24-27)。近年、膨大な HGSC 検体および多くの卵巣癌細胞株における各種データが The Cancer Genome Atlas (TCGA) および Broad-Navartis Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) のそれぞれでカタログ化され公開されている。OVCAR3、SKOV4 および A2780 はこれまでに卵巣癌の研究において、しばしば HGSC 細胞のモデルとして使用されてきた。しかしながら、最近、これらの細胞株は上記 2 つのデータベースの比較から、遺伝子変異、染色体コピー数および mRNA 発現プロファイルが HGSC 検体と異なるため、HGSC 細胞のモデルとして適切でないことが明らかとなっている (27)。そこで、本研究では、HGSC 検体に遺伝子変異および mRNA 発現プロファイルが類似した KURAMOCHI および TYK-nu を HGSC 細胞株として使用した (27)。

ADAMTS9-AS2 および XIST の発現低下は、卵巣癌の細胞増殖と悪性度の促進に関与している (12,22,28)。本研究において ADAMTS9-AS2 および XIST の機能は調べられていないが、HGSC 組織における発現が著しく低いことから、ADAMTS9-AS2 あるいは XIST が HGSC の悪性度を抑制する機能を持つ可能性が示唆される。

4 個の高発現 lncRNA (CDKN2B-AS1、DLEU2、LINC00152 および LINC01234) については、siRNA を用いた発現抑制では癌抑制効果を全く示さず、さらにこれらの発現レベルは卵巣 HGSC 組織と正常卵巣組織において有意差がなかった。これらの高発現 lncRNA と低発現 lncRNA 間での作用および発現における差異は、我々には明瞭に説明できない。しかしながら推測として以下が考えられる。本研究において lncRNA はもともと HGSC 細胞株で同定されている。本研究で用いた HGSC 細胞株は卵巣 HGSC 組織の細胞に由来している

が、卵巣 HGSC 組織は個体差が反映されるため、不均一である。したがって、HGSC 細胞株の特性が必ずしも全ての卵巣 HGSC 組織の特性と一致しないことはあり得ると推測される。

## 5, 【結語】

本研究で我々は、卵巣 HGSC において低発現している 4 個の新たな lncRNA (ADAMTS9-AS2、MEG3、POU5F1P5 および XIST) を同定した。これらの 4 個の lncRNA は将来的に HGSC の診断および治療に応用できる可能性がある。

## 6, 【謝辞】

本研究を進めるに当たり、HGSC 組織検体を御提供いただいた島根大学の京哲教授に感謝の意を表す。

本研究の一部は日本学術振興会の科学研究費補助金 20K09601、20K18222、18K09262、18K09230 および 18K16802 によって行われた。

## 7, 【利益相反および研究倫理】

利益相反：本研究において、著者らに利益相反はありません。

研究倫理等：本研究において、ヒト組織を扱う実験は全てヘルシンキ宣言に則って行われ、実験方法は山口大学医学部附属病院治験及び人を対象とする医学系研究等倫理審査委員会および組換え DNA 実験安全委員会によって承認されている。組織採取に関しては、医学的適応により手術を施行された患者を対象とし、研究の主旨を説明した上で、自由意志によって参加し、文書による同意が得られたものを対象としている。

本論文は *Reproductive Medicine and Biology* の論文の和訳であり、学位論文として投稿することを許可されている。

## 8, 【参考文献】

1. Seidman JD, Horkayne-Szakaly I, Haiba M, Boice CR, Kurman RJ, Ronnett BM. The histologic type and stage distribution of ovarian carcinomas of surface epithelial origin. *Int J Gynecol Pathol.* 2004;23:41-44.
2. Vaughan S, Coward JI, Bast RC Jr, et al. Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nat Rev Cancer.* 2011;11:719-725.
3. Berns EM, Bowtell DD. The changing view of high-grade serous ovarian cancer. *Cancer Res.* 2012;72:2701-2704.
4. Yeung TL, Leung CS, Yip KP, Au Yeung CL, Wong ST, Mok SC. Cellular and molecular processes in ovarian cancer metastasis. A Review in the Theme: Cell and Molecular Processes in Cancer Metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2015;309:C444-456.
5. Lorenzen JM, Thum T. Long noncoding RNAs in kidney and cardiovascular diseases. *Nat Rev Nephrol.* 2016;12:360-373.
6. Djebali S, Davis CA, Merkel A, et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature.* 2012;489:101-108.
7. Huarte M. The emerging role of lncRNAs in cancer. *Nat Med.* 2015 Nov;21(11):1253-61.
8. Hung T, Chang HY. Long noncoding RNA in genome regulation: prospects and mechanisms. *RNA Biol.* 2010;7:582-585.
9. Flynn RA, Chang HY. Long noncoding RNAs in cell-fate programming and reprogramming. *Cell Stem Cell.* 2014;14:752-761.
10. Tripathi MK, Doxtater K, Keramatnia F, et al. Role of lncRNAs in ovarian cancer: defining new biomarkers for therapeutic purposes. *Drug Discov Today.* 2018;23:1635-1643.
11. Wang JY, Lu AQ, Chen LJ. LncRNAs in ovarian cancer. *Clin Chim Acta.* 2019;490:17-27.
12. Zhan L, Li J, Wei B. Long non-coding RNAs in ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018;37:120.
13. Meryet-Figuière M, Lambert B, Gauduchon P, et al. An overview of long non-coding RNAs in ovarian cancers. *Oncotarget.* 2016;7:44719-44734.
14. Sato S, Maekawa R, Tamura I, et al. SATB2 and NGR1: potential upstream regulatory factors in uterine leiomyomas. *J Assist Reprod Genet.* 2019;36:2385-2397.

15. Yamagata Y, Nishino K, Takaki E, et al. Genome-wide DNA methylation profiling in cultured eutopic and ectopic endometrial stromal cells. *PLoS One*. 2014;9:e83612.
16. Maekawa R, Lee L, Okada M, et al. Changes in gene expression of histone modification enzymes in rat granulosa cells undergoing luteinization during ovulation. *J Ovarian Res*. 2016;9:15.
17. Tamura I, Takagi H, Doi-Tanaka Y, et al. Wilms tumor 1 regulates lipid accumulation in human endometrial stromal cells during decidualization. *J Biol Chem*. 2020;295:4873-4683.
18. Kajimura T, Sato S, Murakami A, et al. Overexpression of carbonyl reductase 1 inhibits malignant behaviors and epithelial mesenchymal transition by suppressing TGF- $\beta$  signaling in uterine leiomyosarcoma cells. *Oncol Lett*. 2019;18:1503-1512.
19. Nishimoto Y, Murakami A, Sato S, et al. Decreased carbonyl reductase 1 expression promotes tumor growth via epithelial mesenchymal transition in uterine cervical squamous cell carcinomas. *Reprod Med Biol*. 2018;17:173-181.
20. Suo G, Han J, Wang X, et al. Oct4 pseudogenes are transcribed in cancers. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;337:1047-1051.
21. Bai M, Yuan M, Liao H, et al. OCT4 pseudogene 5 upregulates OCT4 expression to promote proliferation by competing with miR-145 in endometrial carcinoma. *Oncol Rep*. 2015;33:1745-1752.
22. Wang C, Qi S, Xie C, Li C, Wang P, Liu D. Upregulation of long non-coding RNA XIST has anticancer effects on epithelial ovarian cancer cells through inverse downregulation of hsa-miR-214-3p. *J Gynecol Oncol*. 2018;29:e99.
23. Xu B, Gong X, Zi L, et al. Silencing of DLEU2 suppresses pancreatic cancer cell proliferation and invasion by upregulating microRNA-455. *Cancer Sci*. 2019;110:1676-1685.
24. Wang L, Yu M, Zhao S. lncRNA MEG3 modified epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells by sponging miR-219a-5p and regulating EGFR. *J Cell Biochem*. 2019;120:17709-17722.
25. Xiu YL, Sun KX, Chen X, et al. Upregulation of the lncRNA Meg3 induces autophagy to inhibit tumorigenesis and progression of epithelial ovarian carcinoma by regulating activity of ATG3. *Oncotarget*. 2017;8:31714-31725
26. Sheng X, Li J, Yang L, et al. Promoter hypermethylation influences the suppressive role of maternally



expressed 3, a long non-coding RNA, in the development of epithelial ovarian cancer. *Oncol Rep.* 2014;3:277-285.

27. Domcke S, Sinha R, Levine DA, Sander C, Schultz N. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nat Commun.* 2013;4:2126.
28. Wang A, Jin C, Li H, Qin Q, Li L. LncRNA ADAMTS9-AS2 regulates ovarian cancer progression by targeting miR-182-5p/FOXF2 signaling pathway. *Int J Biol Macromol.* 2018;120:1705-1713.