

学位論文

Identification of long noncoding RNAs downregulated
specifically in ovarian high-grade serous carcinoma

(卵巣高異型度漿液性腺癌において特異的に低発現を示す
long noncoding RNA の同定)

氏名 岡田 真希

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 産科婦人科学講座

令和6年10月

目 次

1. 要旨	3
2. 研究の背景と目的	4
3. 方法	5
4. 結果	9
5. 考察	16
6. 謝辞	22
7. 利益相反	22
8. 人権に関する声明とインフォームド・コンセント	23
9. 倫理委員会による承認	23
10. 資金提供情報	23
11. 参考文献	23

1, 【要旨】

目的 ; 卵巣高異型度漿液性腺癌 (high-grade serous carcinoma : HGSC) において long non-coding RNA (lncRNA) がその進展や悪性度に関与しているかどうかを調べるため、HGSC において特異的に発現する lncRNA を同定することを試みた。

方法 ; HGSC、正常卵巣および卵管組織検体から total RNA を抽出し、癌に関連する 84 種類の lncRNA の発現を解析できる PCR アレイを用いて解析した。正常卵巣および卵管組織の複数の検体と比較し、HGSC 検体において高発現または低発現を示す lncRNA を real-time RT-PCR にて同定した。さらに、機能解析のため、同定した lncRNA を過剰発現させた卵巣癌細胞株を樹立し、細胞増殖能、遊走能、浸潤能における影響を調べた。

結果 ; HGSC 検体において 11 個の lncRNA (ACTA2-AS1、ADAMTS9-AS2、CBR3-AS1、HAND2-AS1、IPW、LINC00312、LINC00887、MEG3、NBR2、TSIX、XIST)が低発現であった。我々は ADAMTS9-AS2、CBR3-AS1、NBR2 を過剰発現する細胞株を樹立した。ADAMTS9-AS2 の過剰発現細胞株において、細胞増殖は抑制されたが、細胞遊走と浸潤は促進された。CBR3-AS1 と NBR2 の過剰発現細胞株において、細胞遊走は促進される傾向にあったが、細胞増殖と浸潤に有意差を認めなかった。

結論 ; 我々は HGSC において特異的に低発現を示す 11 個の lncRNA を同定した。このうち、CBR3-AS1、NBR2、ADAMTS9-AS2 は HGSC の悪性度においてそれぞれ特異的な機能を有していた。

2, 【研究の背景と目的】

卵巣癌は婦人科領域において予後不良な癌である。卵巣癌には様々な組織型があり、一般的なものは高異型度漿液性腺癌 (HGSC)、低異型度漿液性腺癌、粘液性癌、類内膜癌、明細胞癌である。各組織型により、それぞれ異なる腫瘍起源、腫瘍形成に関与する遺伝子、および臨床像を呈する (1)。卵巣癌の中で HGSC は最も一般的な組織型であり、卵巣癌全体の 70% を占め、その大部分が卵管上皮から発生する。ヒトの悪性腫瘍の中で最も急速に進行する癌種の一つであり、ほとんどの患者は進行癌で診断される。そのため、5 年生存率は 9-34% と低い (2)。したがって、HGSC の発生と悪性度に関与する分子機構を解明することが不可欠である。

The Cancer Genome Atlas (TCGA) プロジェクトにより、TP53 変異を含む、いくつかの HGSC の原因遺伝子が解明されたが、TP53 以外に機能的に重要な遺伝子変異はほとんど見つかっていない。対照的に、染色体コピー数異常の領域が広範囲に見つかっており、癌遺伝子の増幅や癌抑制遺伝子の欠失が HGSC の進行に寄与していることが示唆される (3)。全ゲノム解析研究により、コード遺伝子がゲノムの 2% 未満であることが示され、非コードゲノム内の異常が癌の形質を決める大きな要因であることが明らかになってきている (4)。HGSC においても、遺伝子の異常だけでなく、non-coding RNA (ncRNA) の発現異常も高頻度で生じており、癌を引き起こす可能性があると考えられている。long non-coding RNAs (lncRNA) は、タンパク質に翻訳されない 200 塩基以上の転写産物と定義され、その多くは分化した組織や特定の癌種で特異的に発現する (5)。一塩基多型 (SNPs)、コピー数変化・多型、あるいは非コードゲノム内の変異は、lncRNA の転写を劇的に変化させる可能性がある。前立腺癌リスク関連 SNP rs11672691 は、細胞増殖、腫瘍増大、転移を促進する lncRNA アイソフォームである PCAT19-long を増加させる (6)。ゲノムワイドのコピー数多型に基づき、LOC101927151、LINC00861 および LEMD1-AS1 が卵巣癌の予後に関連する lncRNA として同定された (7)。多くの lncRNA が、様々な癌種において特異的に高発現または低発現することが明らかになっている。さらに、それらのうちいくつかの詳細な作用機序も解明されつつある。卵巣癌では、H19、HOTAIR、MALAT1、PVT1 を

含むいくつかの lncRNA が悪性度に関与することが報告されている (8-10)。しかしながら、HGSC におけるこれらの lncRNA に関する報告はほとんどない。Nicholas らは、16,325 個の lncRNA 配列のうち 1943 個が、正常卵管組織と比較して HGSC で異なる発現していることを示し、HGSC において生存に関連する 3 つの lncRNA (MON2-AS1 (AC079035.1)、LINC00399、AC002115.1) を同定した (11)。最近、我々の研究室において、4 つの異常に発現する lncRNA (MEG3、POU5F1P5、ADAMTS9-AS2、XIST) が卵巣癌細胞株と初代培養卵巣上皮細胞から同定され、さらに、複数の HGSC と卵巣組織検体を用いて検証された (12)。

本研究では、HGSC に特異的な lncRNA の更なる同定のために、複数の HGSC 検体と HGSC の起源となりうる正常卵巣および卵管組織検体における lncRNA をスクリーニングおよび検証し、HGSC に特異的な lncRNA を新たに同定した。さらに、同定された lncRNA が HGSC の進展や悪性度に関与しているかどうかを調べるために、これらの lncRNA のうちいくつかの lncRNA について発現を変化させた卵巣癌細胞株を樹立し、in vitro の機能解析を行った。その結果、HGSC の悪性度に関与するいくつかの lncRNA を同定した。

3, 【方法】

3.1 患者組織検体と細胞培養

22 症例の HGSC 組織検体が島根大学医学部附属病院から提供された (臨床データの詳細を表 S1 に示す)。HGSC は組織学的所見に基づいて診断された。p53 または WT-1 による免疫組織化学染色は、臨床では卵巣癌の病理診断のためにルーチンには行われていない。

10 症例の正常卵巣組織と 10 症例の正常卵管組織が、山口大学医学部附属病院で付属器切除術と卵管切除術を受けた患者から得られた。臨床診断および病理診断を表 S2 および表 S3 に示す。卵管組織検体には上皮内癌成分は認められなかった。正常卵巣および卵管組織検体を採取した患者の家族歴は、いずれも遺伝性乳癌卵巣癌症候群 (HBOC) の存在を示唆するものではなかった。検体採取後、組織片は直ちに液体窒素に浸し、-80°C で保

存した。本研究は、当院の医学系研究等倫理審査委員会により組織検体の採取について承認された (No.H27-216)。すべての患者から文書によるインフォームド・コンセントを得た。

本研究では、2つのヒト卵巣癌細胞株、CaOV3 と OVCAR3 を HGSC 細胞モデルとして用いた。CaOV3 細胞は American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) から購入し、10%ウシ胎児血清 (FBS) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (Wako, Osaka, Japan) で培養した。OVCAR3 細胞は、東北大学加齢医学研究所細胞資源センターから提供され、20%FBS を添加した RPMI-1640 (Wako) で培養した。すべての細胞株についてマイコプラズマ検査を行った。

3.2 RNA 抽出

AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて、HGSC および正常卵巣組織検体から、取扱説明書に従い total RNA を抽出した。正常卵管組織検体からの total RNA 抽出には、ISOGEN 試薬(ニッポンジーン、Tokyo, Japan) を用い、クロロホルム抽出および 2-propanol 沈殿にて行った。

3.3 PCR アレイ

HGSC 組織検体 6 例と正常卵巣および卵管組織検体核 3 例を無作為に選択した。cDNA 合成は、取扱説明書に従い、RT2 First Strand Kit (Qiagen 社製) を用いて行った。これらの cDNA を、様々な癌に関連すると報告されている 84 種類の lncRNA を解析することができる RT2 lncRNA PCR Array Human Cancer PathwayFinder (Qiagen, GeneGlobe ID LAHS-002Z) を用いて解析した (12)。相対発現量は、ACTB を内部標準遺伝子として $\Delta\Delta Cq$ 法を用いて算出した。選択された候補 lncRNA の発現量は、正常卵巣および卵管組織検体と比較して、HGSC 組織検体における発現が少なくとも 2 倍以上の高発現あるいは 1/2 以下の低発現で有意な変化と定義した。(p < 0.05)。

3.4 Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR には、HGSC 組織 22 検体、正常卵巣および卵管組織各 10 検体を用いた。cDNA 合成は、既報 (13) と同様に、1 μ g の total RNA から、Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen) にて、ランダムヘキサマーを用いて行った。Real-time RT-PCR は、Luna Universal qPCR Master Mix (NEB, Ipswich, MA, USA) と表 1 に示したプライマーを用いて、増幅条件 95°C 60 秒、[95°C 15 秒、60°C 30 秒] \times 45 サイクルで行った。相対的発現量は、内部標準遺伝子として GAPDH を用い、 $\Delta \Delta Cq$ 法により算出した。

表 1. 本研究で RT-PCR に使用した PCR プライマー

primer name	Usage	Forward	Reverse
ACTA2-AS1	RT-PCR	GCTGTTCCAAGAATGTTGCTTTACT	ATAATTGAGGCAGAAATCACCAACC
ADAMTS9-AS2	RT-PCR	GAAGGATGTGCTTGGGAACCTTAAG	CTTTCCTTATCCTCAGCTTCTCACT
CBR3-AS1	RT-PCR	GCAGTAAGTGGTGTAATTCCTTT	TGCTAATAAAGGGCTACACAACCTCA
HAND2-AS1	RT-PCR	CAAAGAACACGAGATGCCATTTCT	GAAAGAGGAGAAGAGGAAGAAGGAG
IPW	RT-PCR	CTGGGAGTGAATGTTATCAGCAAAT	ACCAACTCAACAAATCCACCTCTTT
LINC00312	RT-PCR	CTTCTTAATCTGGCTGTTGTTGTGT	CTTAGTACCTGGGCTCTGTTTAACT
LINC00152 (CYTOR)	RT-PCR	AATATGACAGACACCGAAAATCACG	CATGACCAAAAATATCACAGGCAGAC
LINC00887	RT-PCR	GTGCTGTTATATTACTGGATCCT	GTGACTTCAGACAATTTACGCCTC
MEG3	RT-PCR	GCCATCACCTGGATGCCTAC	AGTCTCTGGGTCCAGCCTGT
NBR2	RT-PCR	CCATAAAGTGCCCTGCCCTCTAG	GATTGGGACCTCTTCTTACGACTG
TSIX	RT-PCR	TCATTCTCTTTCTTTTGGAGGCAAC	AGAGCAAGACTTAGCAGGGAATAAA
XIST	RT-PCR	ACGCTGCATGTGTCCTTAGTAG	TTGGAGCCTCTTATAGCTGTTTG
GAPDH	RT-PCR	AGGTGAAGGTCGGAGTCA	GGTCATTGATGGCAACAA
ADAMTS9-AS2	Construction †	AAACTTGACGTACACACGCA	TTCTGTTTTATAATGTACA
CBR3-AS1	Construction †	AGCCGCGGTGTGAGGGAGCG	ATCATAAAAATGTTGAGTATC
NBR2	Construction †	GGATGACGTAAAAAGGAAAGA	TTCATCAGAGGCTGGACTCT

3.5 HGSC 細胞株における lncRNA の過剰発現

本研究で同定された lncRNA の細胞株 (CaOV3 および OVCAR3) における発現量は著しく低かったため、その機能を調べるために過剰発現実験を行った。3 つの lncRNA (ADAMTS9-AS2、CBR3-AS1、NBR2) の過剰発現を行うために、まず発現ベクターを作成した。それぞれの lncRNA の全長 cDNA を、正常卵巣組織の cDNA をテンプレートとして、PrimeSTAR GXL DNA polymerase (Takara, Kyoto, Japan) と表 1 に示すプライマーセットを用いて RT-PCR により増幅した。ADAMTS9-AS2 および NBR2 については [98°C 10 秒間、55°C 15 秒、68°C 3 分] \times 35 サイクル、CBR3-AS1 については [98°C 10 秒間、60 °C

15 秒、68°C 3 分]×25 サイクルの増幅条件で行った。

増幅された lncRNA 断片を、In-Fusion HD Cloning Kit (Takara) を用いて pMXs-IRES-Bsd 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。構築されたベクターの配列解析により、標的とした lncRNA が正しい配列で挿入されていることを確認した。構築した lncRNA 発現ベクターとコントロールベクター(非処理の pMXs-IRES-Bsd ベクター) のそれぞれをレトロウイルスの構成タンパクを発現するベクターとともに、Lipofectamine 3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いてパッケージング細胞株である HEK293T 細胞 (Takara) に遺伝子導入し、発現ベクターがパッケージされたレトロウイルスベクターを作製した。レトロウイルスベクターを 24-well プレートに 50%コンフルエントで培養した CaOV3 と OVCAR3 に添加した。CaOV3 では 4 μ g/mL の blasticidin S で、OVCAR3 では 2 μ g/mL の blasticidin S で 1 ヶ月間薬剤選別することにより、安定発現細胞株を樹立した。

3.6 細胞増殖アッセイ

lncRNA を過剰発現する安定細胞株およびコントロール細胞株を、6-well プレートに 2×10^5 細胞/well ずつ播種した。24 時間毎に、トリプシン処理によって各株の単一細胞懸濁液を調製し、Vi-CELL XR cell counter (Beckman Coulter, Tokyo, Japan)を用いて細胞数を計測した。各実験は 3 回の独立した実験で評価した。

3.7 創傷治癒アッセイ

細胞を 6-well プレートでコンフルエントまで培養した。200 μ l ピペットチップを用い、各ウェルの中央に線状の創傷を作製した。創傷治癒を評価するため、創傷の作製から 0 時間後と 72 時間後に、同一視野で 40 倍の顕微鏡下で画像を取得し、ImageJ ソフトウェアプログラムを用いて創傷間の面積を測定した。創傷治癒活性は、72 時間後の移動距離を 0 時間後の移動距離で割ることにより算出した。各実験は 3well ずつ行い、3 回の独立した実験から平均値を求めた。

3.8 細胞遊走・浸潤アッセイ

BioCoat Matrigel Invasion Chamber (Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA)を用い、既報(14)のように取扱説明書に従って、細胞遊走・浸潤アッセイを行った。細胞を単一細胞にトリプシン処理し、無血清培養液中に 1×10^5 細胞/well に調整し、トランスウェルシステムのマトリゲルコートおよび非コートの上部インサートチャンバーに播種した。下側のチャンバーは、化学遊走物質として 10%FBS を含む培養液で満たした。CaOV3 では 24 時間、OVCAR3 では 48 時間培養後、インサートチャンバーの膜上面を綿棒で拭き取り、残った細胞を完全に除去した。インサートチャンバーの膜を Diff-Quick (Sysmex, Kobe, Japan)を用いて、固定・染色した。染色した細胞を 100 倍の倍率で無作為に 3 視野カウントし、平均数を算出した。遊走活性は、非コート膜の下面に遊走した細胞数で評価した。浸潤活性は、マトリゲルコート膜の下面に移動した細胞数を、非コート膜の下面に移動した細胞数で割ったものとして計算した。各実験は 3well ずつで行い、平均値は 3 回の独立した実験から計算した。

3.9 統計解析

2 群間の有意差は Student の t-検定を用いて分析した。3 群間の差の有意性は、Kruskal-Wallis 検定および Wilcoxon 検定を用いて分析した。2 群間の比較では $P < 0.05$ の値が統計的に有意とし、3 群間の比較では $P < 0.0167$ の値が統計的に有意を示すとした。すべての統計解析は R software program (Ver 4.1.0) を用いて行った。

4, 【結果】

4.1 HGSC に特異的に発現する lncRNA の同定

HGSC に特異的に発現する lncRNA を同定するため、様々な種類の癌に関連することが知られている 84 種類の lncRNA の発現を網羅的に解析できる PCR アレイを用いて、HGSC 組織における lncRNA の発現レベルを正常卵巣組織および卵管組織と比較した。解析した

84 種類の lncRNA のうち、1 個の高発現 lncRNA (LINC00152) と 11 個の低発現 lncRNA (ACTA2-AS1、ADAMTS9-AS2、CBR3-AS1、HAND2-AS1、IPW、LINC00312、LINC00887、MEG3、NBR2、TSIX および XIST) が HGSC 特異的 lncRNA の候補として同定された (表 2)。

表 2. PCR アレイによる HGSC において特異的に発現する lncRNA

Symbol	comparing to fallopian tubes			comparing to ovaries		
	Fold Change	95% CI	p-value	Fold Change	95% CI	p-value
Upregulated in HGSC						
LINC00152	5.6086	(2.47, 8.74)	0.009965	8.0316	(0.00001, 17.19)	0.008841
Downregulated in HGSC						
ACTA2-AS1	0.0804	(0.00001, 0.26)	0.02981	0.2929	(0.02, 0.57)	0.028693
ADAMTS9-AS2	0.0483	(0.02, 0.08)	0.000044	0.0246	(0.00, 0.04)	0.003201
CBR3-AS1	0.2967	(0.20, 0.40)	0.000222	0.3691	(0.23, 0.51)	0.001895
HAND2-AS1	0.0206	(0.01, 0.03)	0.000118	0.0261	(0.01, 0.04)	0.000731
IPW	0.1221	(0.02, 0.23)	0.000111	0.1091	(0.01, 0.21)	0.000493
LINC00312	0.1334	(0.00001, 0.29)	0.021831	0.183	(0.06, 0.31)	0.002766
LINC00887	0.3612	(0.12, 0.61)	0.008175	0.1311	(0.00001, 0.27)	0.008167
MEG3	0.0974	(0.01, 0.18)	0.001565	0.0438	(0.01, 0.08)	0.000042
NBR2	0.212	(0.08, 0.35)	0.000705	0.1621	(0.05, 0.27)	0.00078
TSIX	0.0599	(0.01, 0.11)	0.001156	0.2033	(0.05, 0.35)	0.002829
XIST	0.2143	(0.11, 0.32)	0.000329	0.3553	(0.06, 0.65)	0.030877

次に、12 個の候補 lncRNA を複数の検体を用いた real-time RT-PCR で検証し (図 1)、個々の検体における相対発現量を図 S1 に示した。LINC00152 は PCR アレイで高発現であったが、複数の検体を用いた real-time RT-PCR による検証では、その発現量は正常卵巣組織と変わらず、正常卵管組織よりも低発現であった (図 1)。したがって、LINC00152 は HGSC 特異的ではないと考えられた。一方、複数の検体を用いた検証実験において、11 個の低発現 lncRNA 候補は、正常卵巣組織および卵管組織と比較して、HGSC において有意に低い発現量を示した (図 1)。これにより、11 個の低発現 lncRNA 候補が HGSC に特異的な lncRNA として同定された。

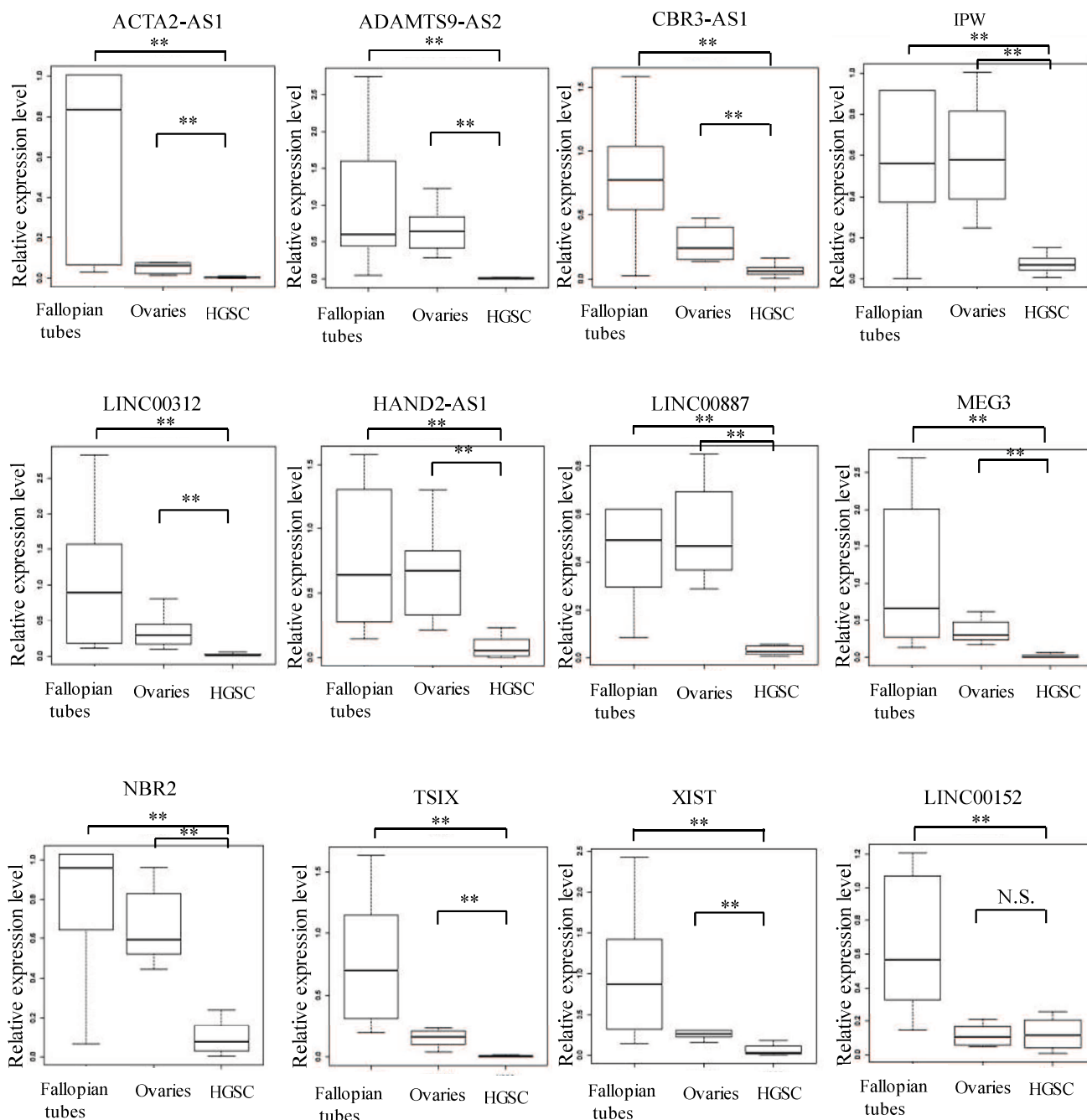


図 1. HGSC において特異的に発現する lncRNA の HGSC 組織、正常卵管組織および正常卵巣組織の複数の検体における検証

HGSC 組織 22 検体、正常卵管組織 10 検体、正常卵巣組織 10 検体における 12 種類の lncRNA 候補の相対発現量の箱ひげ図。正常卵管組織の平均値を 1 として相対発現量を算出した。内部標準遺伝子として GAPDH を用いた。** $P < 0.01$ 。HGSC で低発現していた 11 個の lncRNA 候補 (ACTA2-AS1、ADAMTS9-AS2、CBR3-AS1、HAND2-AS1、IPW、LINC00312、LINC00887、MEG3、NBR2、TSIX、XIST) の相対発現量が HGSC で低下していることが確認された。一方、HGSC で高発現していた lncRNA 候補 (LINC00152) の相対発現量は、HGSC では高発現することが検証されなかった。

4.2 lncRNA を過剰発現させた HGSC 細胞株の樹立

同定された低発現 lncRNA の機能を解析するために、CBR3-AS1、NBR2 および ADAMTS9-AS2 を過剰発現する 2 つの HGSC 細胞株 (CaOV3 および OVCAR3) を樹立した。樹立した各細胞株における lncRNA の過剰発現レベルは、real-time RT-PCR で確認した (図 2)。また、他の 8 個の lncRNA の過剰発現も試みたが、RT-PCR で全長の lncRNA が増幅されなかったり、lncRNA の発現ベクターが構築できなかったため、過剰発現細胞株を樹立することはできなかった。

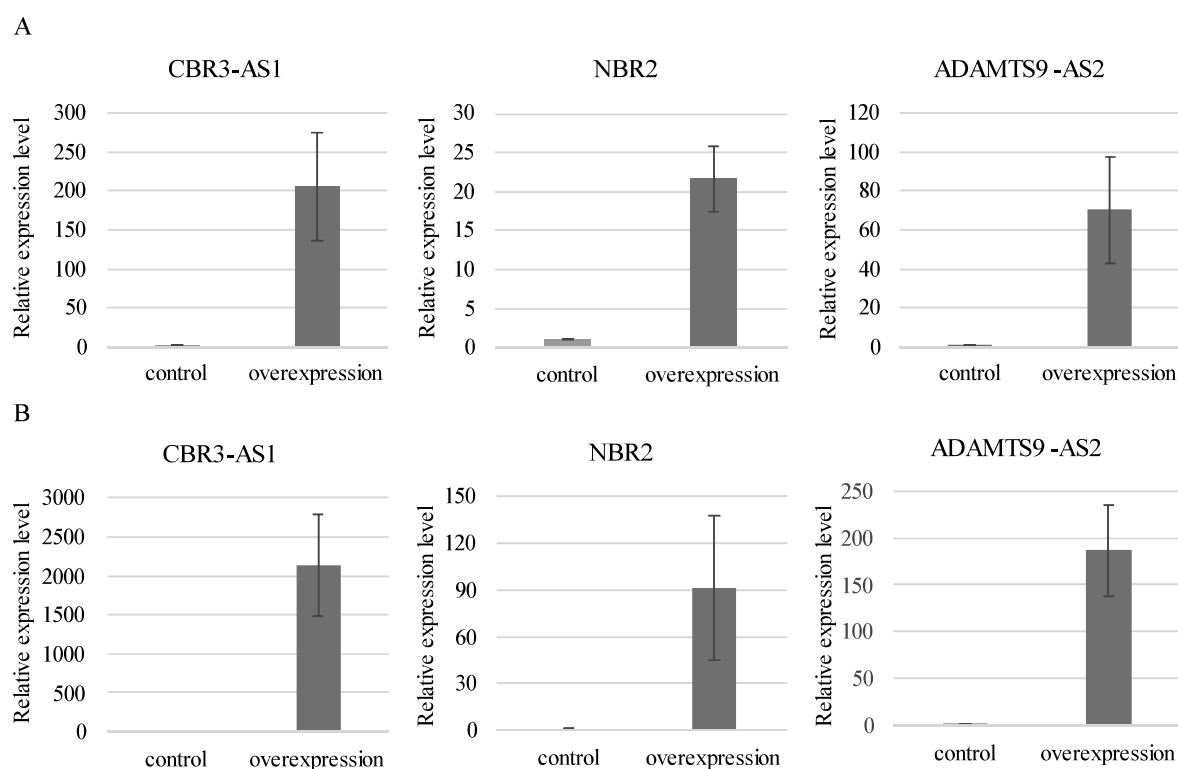


図 2. 樹立した CBR3-AS1、NBR2 および ADAMTS9-AS2 をそれぞれ過剰発現する HGSC 細胞株における lncRNA (CBR3-AS1、NBR2 および ADAMTS9-AS2) の発現レベル

OVCAR3 細胞株 (A) および CaOV3 細胞株 (B) それぞれにおける CBR3-AS1、NBR2 または ADAMTS9-AS2 の過剰発現の確認。CBR3-AS1、NBR2 および ADAMTS9-AS2 の GAPDH を内部標準遺伝子とした相対発現量は、それぞれの過剰発現細胞株およびコントロール細胞株 (空ベクター) において、real-time RT-PCR により同一サンプルを 2 回測定し、コントロール細胞株の発現量を 1 として相対値で示した。数値は 3 回の独立した実験の平均値 \pm SD を示す (n=3)。

4.3 樹立した細胞株における細胞増殖能

ADAMTS9-AS2 を過剰発現する OVCAR3 細胞株において、細胞増殖は有意に抑制され

ており、CBR3-AS1 または NBR2 を過剰発現する細胞株において、細胞増殖はコントロール細胞株との間に有意差はなかった (図 3A)。CBR3-AS1、NBR2、または ADAMTS9-AS2 を過剰発現する CaOV3 細胞株において、細胞増殖はコントロール細胞株との間に有意差はなかった (図 3B)。

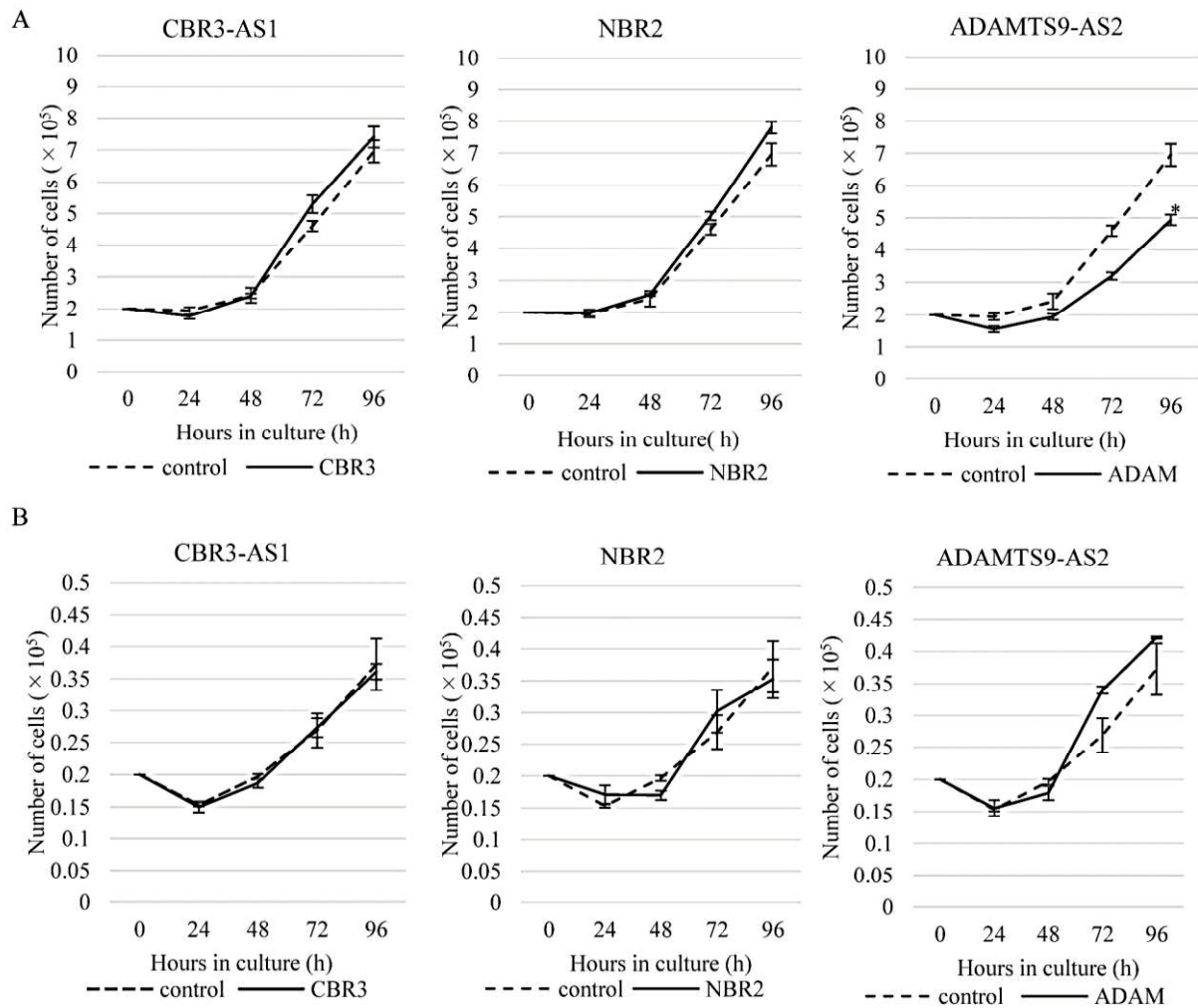


図 3. 樹立した細胞株における細胞増殖アッセイ

CBR3-AS1、NBR2 および ADAMTS9-AS2 をそれぞれ過剰発現させた OVCAR3 細胞株 (A) および CaOV3 細胞株 (B)、ならびにコントロール細胞の細胞数を 24 時間ごとに計測した。各実験は 3well ずつで行った。数値は 3 回の独立した実験の平均値 \pm SD を示す (n=3)。*; P < 0.05。

4.4 樹立した細胞株における創傷治癒アッセイ

ADAMTS9-AS2 を過剰発現する OVCAR3 細胞株では、創傷治癒活性がコントロール細胞株よりも有意に高かった (図 4A)。CBR3-AS1 または NBR2 を過剰発現する細胞株とコ

ントロール細胞との間に創傷治癒活性の差はなかった（図 4A）。CBR3-AS1、NBR2、または ADAMTS9-AS2 を過剰発現する CaOV3 細胞株では、創傷治癒活性はコントロール細胞株よりも高かった（図 4B）。

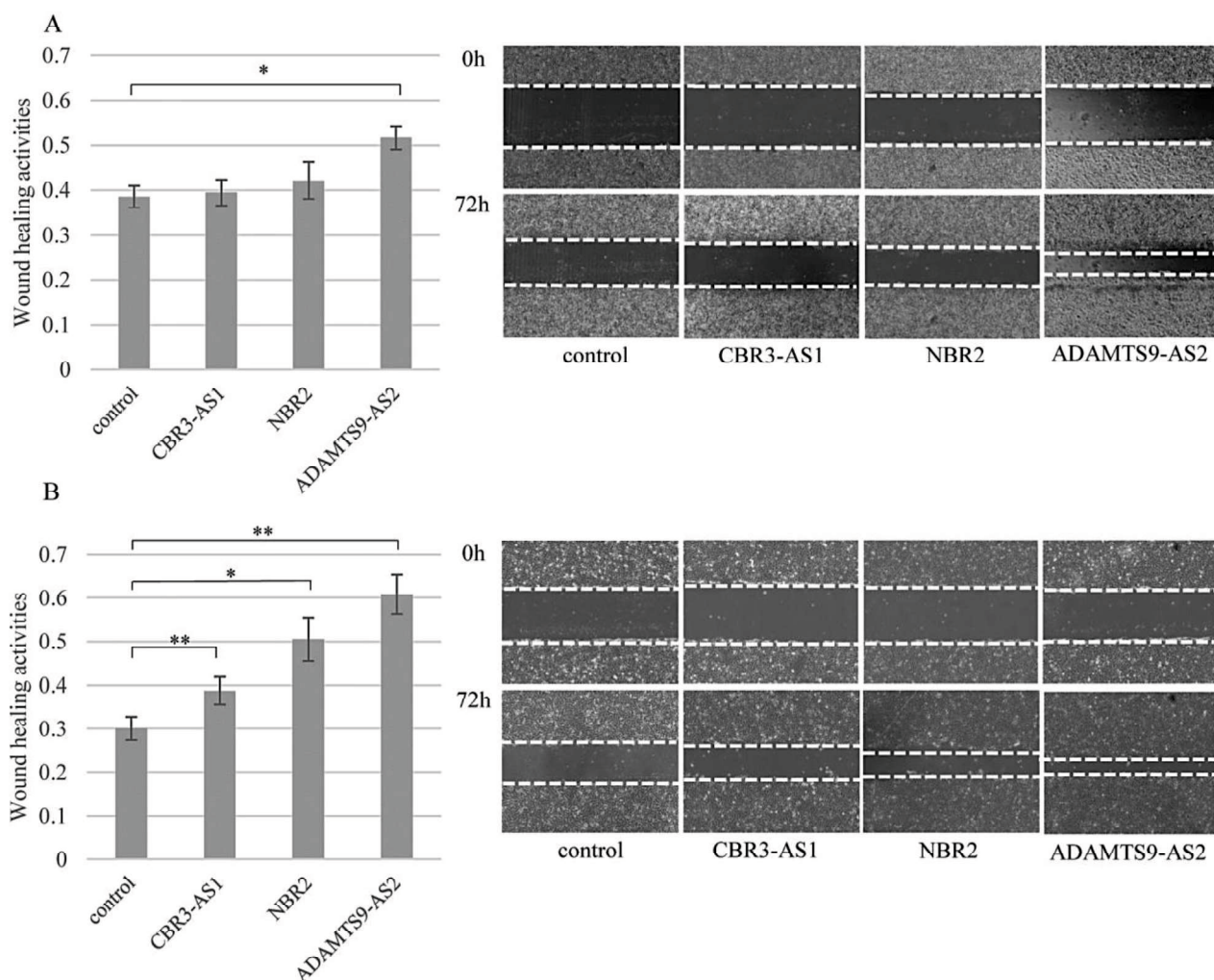


図 4. 樹立した細胞株における創傷治癒アッセイ

OVCAR3 細胞株 (A) と CaOV3 細胞株 (B) において、CBR3-AS1、NBR2 または ADAMTS9-AS2 をそれぞれ過剰発現させた細胞、およびコントロール細胞における創傷治癒アッセイ。画像は、創傷形成から 0 時間後と 72 時間後に同じ視野で得られた (右図)。水平点線は創傷縁を示す。創傷治癒活性 (左図) は、72 時間後の移動距離を 0 時間後の移動距離で割ることにより算出した。数値は 3 つの独立した実験 (n=3) の平均値±SD を示す。コントロールと比較して、*; P < 0.05 および**; P < 0.01。

4.5 樹立した細胞株における細胞遊走能および細胞浸潤能

CBR3-AS1、NBR2 および ADAMTS9-AS2 を過剰発現する OVCAR3 細胞株において、膜の下面に遊走した細胞数がコントロール細胞株よりも有意に多かった (図 5A)。CBR3-

AS1 および ADAMTS9-AS2 を過剰発現する CaOV3 細胞株 (図 5B) においても、遊走した細胞数はコントロール細胞株よりも多かった。しかし、NBR2 を過剰発現する CaOV3 細胞株においては、遊走した細胞数はコントロール細胞株と差がなかった。

浸潤活性は、マトリゲルコート膜を移動した細胞数を、非コート膜を移動した細胞数で割ることで評価した。ADAMTS9-AS2 を過剰発現する OVCAR3 細胞株において、浸潤活性はコントロール細胞株よりも有意に高かったが、CBR3-AS1 または NBR2 を過剰発現する OVCAR3 細胞株とコントロール細胞株との間には浸潤活性の差はなかった (図 5C)。同様に、ADAMTS9-AS2 を過剰発現する CaOV3 細胞株では、浸潤活性はコントロール細胞株と比較して有意に高かったが、CBR3-AS1 または NBR2 を過剰発現する CaOV3 細胞株ではコントロール細胞株と差がなかった (図 5D)。

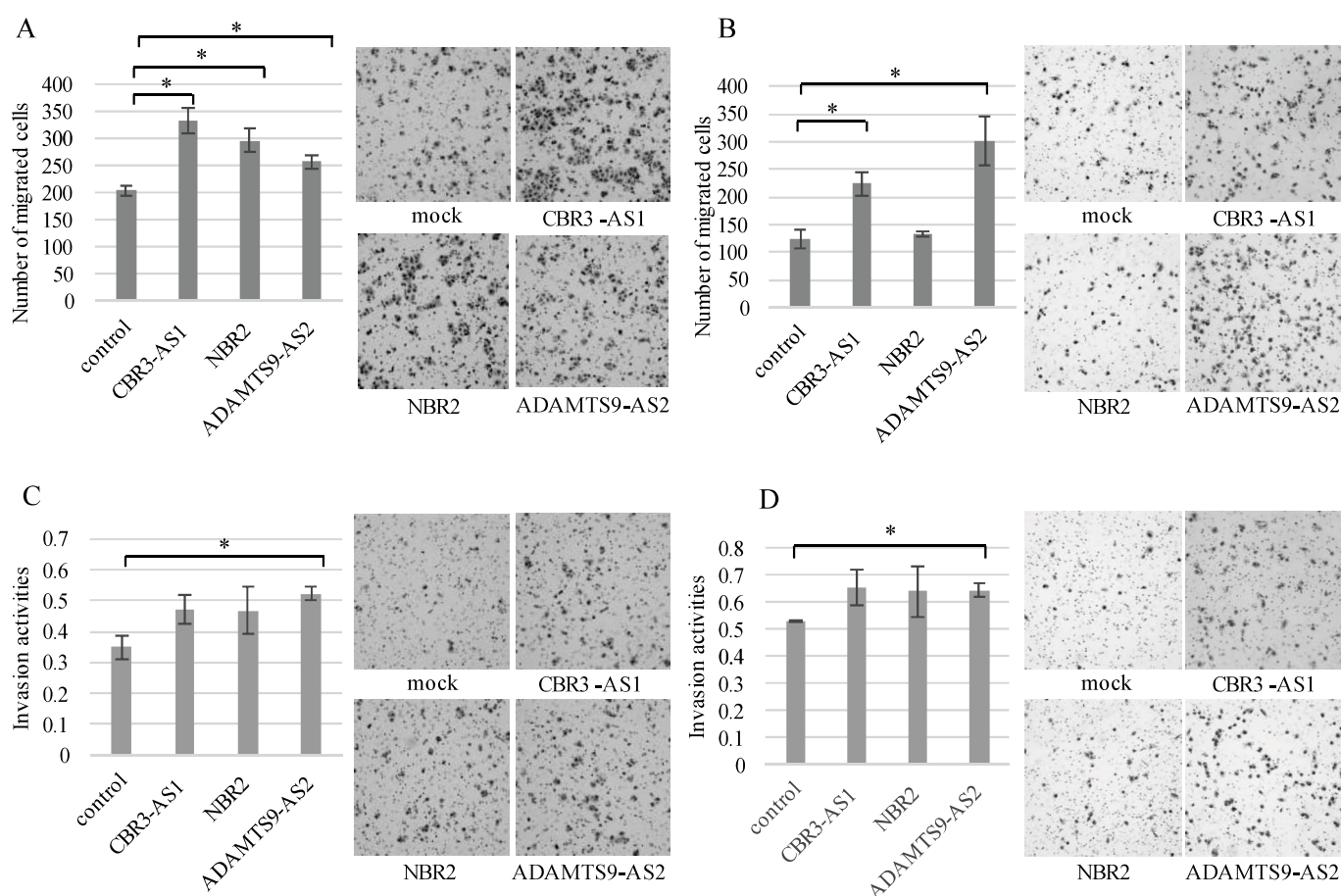


図 5. 樹立した細胞株における細胞遊走能および細胞浸潤能

OVCAR3 細胞株 (A) および CaOV3 細胞株 (B) において CBR3-AS1、NBR2 または ADAMTS9-AS2 をそれぞれ過剰発現させた細胞、およびコントロール細胞における細胞遊走アッセイ。Diff-Quick で染色した遊

走細胞の代表写真を示す。遊走した細胞数は無作為に 5 視野で計測し、平均値を算出した。各実験は 3well ずつで行った。数値は 3 回の独立した実験 (n=3) の平均値±SD を表す。*; コントロールと比較して P < 0.05。OVCAR3 細胞株 (C) および CaOV3 細胞株 (D) における、CBR3-AS1、NBR2 または ADAMTS9-AS2 を過剰発現した細胞およびコントロール細胞の細胞浸潤アッセイ。Diff-Quick で染色した浸潤細胞の代表写真。浸潤活性は、マトリゲルコート膜上の細胞数を非コート膜上の細胞数で割って算出した。各実験は 3well ずつで行った。数値は 3 回の独立した実験の平均値±SD を表す (n=3)。*; コントロールと比較して P < 0.05。

5, 【考察】

本研究では、HGSC 組織検体を正常卵巣および卵管組織検体と比較することにより、HGSC で低発現する 11 個の HGSC 特異的 lncRNA を同定した。我々は以前、卵巣癌細胞株と正常ヒト卵巣上皮細胞のスクリーニングに基づき、HGSC に特異的な 4 個の lncRNA を同定した (12)。このうち 3 個の lncRNA (ADAMTS9-AS2、MEG3、および XIST) は、本研究で同定されたものと一致した。さらに、HGSC 患者の生存に関与する lncRNA として Nicholas らによって同定された MON2-AS1、LINC00399、および AC002115.1 は、本研究で同定された lncRNA とは一致しなかった (11)。本研究では、HGSC に特異的な 8 個の新規 lncRNA (ACTA2-AS1、CBR3-AS1、HAND2-AS1、IPW、LINC00312、LINC00887、NBR2、および TSIX) が同定された。

本研究で同定された 11 個の lncRNA のうち 8 個については、卵巣癌における発現プロファイルまたは機能的役割が報告されている。XIST、MEG3、IPW、HAND2-AS、ADAMTS9-AS2、および LINC00312 は、いくつかの研究において卵巣癌で発現低下していることが報告されており (15-20)、これは本研究と一致している。XIST と MEG3 は卵巣癌における細胞遊走と浸潤を抑制することが報告されている (15,16)。HAND2-AS1 は HGSC 細胞株において腫瘍抑制因子として働くことが報告されている (18)。ADAMTS9-AS2 は細胞増殖、浸潤、上皮間葉転換を抑制する (19)。LINC00312 は細胞増殖を抑制し、アポトーシスを促進する。さらに、化学療法抵抗性の漿液性上皮性卵巣癌組織における LINC00312 の発現は、化学療法感受性組織における発現よりも有意に低いことが報告されている (20)。一方、本研究での HGSC における lncRNA の発現とは対照的に、ACTA2-AS1 と NBR2 の発現は卵巣癌で上昇することが報告されている (21-23)。ACTA2-AS1 は卵巣癌における

細胞増殖と浸潤に関連することが報告されており (21)、卵巣癌細胞株および組織におけるシスプラチン抵抗性にも関連している (22)。NBR2 に関しては、高発現している患者において予後が良好な傾向であった(23)。上記の 8 個の lncRNA とは異なり、CBR3-AS1、LINC00887、TSIX を発現している卵巣癌の報告はなく、本研究が HGSC を含む卵巣癌におけるこれらの発現についての初めての報告である。

本研究では、同定された 11 個の lncRNA のうち 3 個 (CBR3-AS1、NBR2、ADAMTS9-AS2) について過剰発現細胞株を樹立し、機能解析を行った。機能解析の結果を表 3 にまとめ、各 lncRNA に関する様々な癌に関連する過去の報告を表 4 に示す。CBR3-AS1 (PlncRNA-1 としても知られる) は、最初に前立腺癌の細胞株や組織で高発現していることが発見された(24)。これまでの研究で、CBR3-AS1 が乳癌 (25)、大腸癌 (26)、骨肉腫 (27) を含むいくつかの癌種で高発現していることが示されている。さらに、CBR3-AS1 はこれらの癌における予後不良や悪性度の促進にも関連することが報告されている (表 4、25-27)。しかしながら、この HGSC の研究では、他の多くの癌種の研究とは異なり、CBR3-AS1 は低発現であった一方で、その過剰発現は *in vitro* での遊走活性を促進した。

表 3. 本研究における機能解析結果のまとめ

	CBR3-AS1		NBR2		ADAMTS9-AS2	
	OVCAR3	CaOV3	OVCAR3	CaOV3	OVCAR3	CaOV3
Proliferation assay	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	suppression	n.s.
Wound healing assay	n.s.	promotion	n.s.	promotion	promotion	promotion
Migration assay	promotion	promotion	promotion	n.s.	promotion	promotion
Invasion assay	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	promotion	promotion

表 4. 様々な癌種における 3 つの lncRNA (CBR3-AS1、NBR2、ADAMTS9-AS2) に関するこれまでの報告

	CBR3-AS1		NBR2		ADAMTS9-AS2	
	expression level & functions	Reference	expression level & functions	Reference	expression level & functions	Reference
breast cancer	up-regulated poor prognosis, cell proliferation(+), apoptosis(-)	Xu L, <i>et al</i> (25)				
clear cell renal cell carcinoma					down-regulated	Song E, <i>et al</i> (44)
colorectal cancer	up-regulated poor prognosis cell proliferation(+), migration(+), invasion(+)	Xie L, <i>et al</i> (26)	down-regulated proliferation(-) migration(-)	Lai F, <i>et al</i> (61)	down-regulated cell proliferation(-), migration(-), invasion(-)	Liu W, <i>et al</i> (63)
	down-regulated migration(+), invasion(+)	YE W, <i>et al</i> (36)				
endometrial cancer			down-regulated	Dong P, <i>et al</i> (62)		
esophageal cancer					down-regulated cell proliferation(-), migration(-), invasion(-)	Chen Z, <i>et al</i> (31)
gastric cancer					down-regulated cell proliferation(-), migration(-) cisplatin sensitivity(+)	Ren N, <i>et al</i> (32)
gestational choriocarcinoma	up-regulated cell proliferation(+)	Zhang Y, <i>et al</i> (59)				
glioma			up-regulated poor prognosis, cell proliferation(+), migration(+), invasion(+)	Zhang J, <i>et al</i> (37)		
hepatoblastoma			up-regulated cell proliferation(+), migration(+), invasion(+)	Zhu C, <i>et al</i> (38)		

liver cancer					cell proliferation(-), migration(-), invasion(-)	LI H, <i>et al</i> (33)
lung adenocarcinoma					down-regulated	Lin Z, <i>et al</i> (34)
non-small cell lung cancer	up-regulated poor prognosis, cell proliferation(+), migration(+), invasion(+)	GUANY, <i>et al</i> (60)	down-regulated cell proliferation(-), migration(-), invasion(-)	YGAO YP, <i>et al</i> (28)	down-regulated	Sulewska A, <i>et al</i> (64)
Osteosarcoma	up-regulated poor prognosis, cell proliferation(+), migration(+), invasion(+), apoptosis(-)	Zhang Y, <i>et al</i> (27)	down-regulated cell proliferation(-), migration(-), invasion(-)	Cai W, <i>et al</i> (29)		
prostate cancer	up-regulated cell proliferation(+), apoptosis(-)	Cui Z, <i>et al</i> (24)			down-regulated	He L, <i>et al</i> (35)
thyroid cancer			down-regulated cell proliferation(-), migration(-), invasion(-), apoptosis(+)	Yang W, <i>et al</i> (30)		

(+): promoted, (-): inhibit

NBR2 (the neighbor of BRCA1 gene 2) は様々な癌種で低発現し、癌抑制因子として機能する (表 4、28-30)。本研究では、NBR2 は HGSC 組織において低発現しており、これは他の癌種における挙動と一致しているが、その過剰発現は *in vitro* での細胞遊走を促進した。

ADAMTS9-AS2 は、いくつかの癌種において細胞増殖、遊走、浸潤を抑制し、食道癌、胃癌、肝臓癌で低発現である (表 4、31-33)。さらに、ADAMTS9-AS2 の低発現は、肺腺癌や前立腺癌における予後不良と相関している (表 4、34、35)。本研究では、ADAMTS9-AS2 は HGSC 組織において低発現し、その過剰発現は細胞増殖を抑制した。これは他の

癌種における挙動と一致していたが、一方、その過剰発現は *in vitro* において細胞の遊走および浸潤活性を促進した。

2つの lncRNA (CBR3-AS1 および NBR2) については、HGSC 組織における発現レベルと *in vitro* での悪性度との間に矛盾があるように思われた (表 4)。このことは、これらの lncRNA がいくつかの癌種を促進する一方で、他の癌種では抑制に働くといった癌種間で異なる挙動を示すことと類似している。

CBR3-AS1 は様々な癌種でしばしば高発現することが報告されているが(24-27)、大腸癌では CBR3-AS1 が低発現しており、その過剰発現は *in vitro* で miR-29a と結合することにより細胞遊走と浸潤を抑制することが報告されている(36)。さらに、NBR2 はほとんどの癌種において低発現しているが、神経膠腫と肝芽腫では高発現し、細胞増殖、遊走、浸潤を促進する(37, 38)。lncRNA は、転写制御、核内ドメイン構成、タンパク質や RNA 分子の制御など複数の機能を持つため(39)、その機能は癌種によって異なる可能性がある。加えて、lncRNA は通常、microRNA、mRNA、タンパク質などの他の因子と相互作用するため (36, 38, 40)、それぞれの癌種におけるこれらの分子間の相互作用の違いによって、悪性度に影響を及ぼす能力が変化する可能性がある。

ADAMTS9-AS2 は、ほとんどの癌種において低発現し、細胞増殖、遊走、浸潤を抑制する (表 4)。しかし、本研究では、ADAMTS9-AS2 の過剰発現は、OVCAR3 細胞株では細胞増殖を抑制したが、両細胞株において細胞遊走と浸潤を促進した。これらの相反する細胞の反応性に対する明確な説明はないが、ADAMTS9-AS2 と TGF- β または FOXO1 との関連は、本研究で観察された相反する現象を説明するのに役立つ可能性がある。ADAMTS9-AS2 は、乳癌や舌扁平上皮癌において TGF- β シグナルを調節することにより、癌細胞の悪性度を制御する(41, 42)。興味深いことに、TGF- β はヒト口腔癌細胞において、上皮間葉転換 (EMT) を誘導することで細胞の遊走と転移を促進する一方、G1 期の細胞周期停止を誘導することで細胞増殖を抑制することが報告されている(43)。さらに、ADAMTS9-AS2 は淡明細胞型腎細胞癌において FOXO1 を制御している(44)。FOXO1 を含む遺伝子ファミリーである FOXA1 は、前立腺癌細胞において細胞増殖を促進し、細胞運

動性と EMT を抑制する(45)。これらの知見は、ADAMTS9-AS2 が TGF- β や FOXO1 などの因子を制御することによって、相反する細胞の反応性に関与し、潜在的に癌細胞の挙動に二重の影響を及ぼしている可能性を提起している。しかしながら、lncRNA には様々な機能があるため、ADAMTS9-AS2 の過剰発現によって誘導される矛盾した細胞の反応性を説明するには、さらなる研究が必要である。

本研究で観察された相反する細胞の反応性には、別の可能性も考慮される。細胞株を用いた過剰発現実験における ADAMTS9-AS2、CBR3-AS1 および NBR2 の発現レベルは、卵管や卵巣と比較した HGSC 組織における発現レベルよりも高い。これまで示したように、ADAMTS9-AS2、CBR3-AS1、NBR2 の過剰発現によって誘導される細胞の反応性には、いくつかの矛盾が見られた。高すぎる過剰発現が細胞株の生物学的反応に影響を与えた可能性について否定することはできない。

正常卵管および卵巣組織が、本研究で同定された lncRNA を強く発現していたことは興味深い (図 S1)。卵管や卵巣におけるこれらの lncRNA の機能は明らかでないが、他の lncRNA が生殖に関与していることが報告されている(46)。本研究で同定された lncRNA は、セカンドメッセンジャーを介して生理機能に関与している可能性がある。ADAMTS9-AS2 の作用は TGF- β によって媒介されることが報告されている(41, 42)。TGF- β は卵管と卵巣に発現しており、それぞれ着床のための初期胚発生と卵胞発育に寄与している可能性がある(47-49)。CBR3-AS1 と NBR2 は Notch シグナルを介して働き(50, 51)、卵管では細胞リモデリングに、卵巣では顆粒膜細胞の分化と卵巣ステロイドホルモンの産生に関与している(52)。NBR2 はまた、AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) とも相互作用する(53)。AMPK は顆粒膜細胞および卵母細胞のオートファジーに関与し、卵胞発育を制御することが報告されており(54)、卵管における AMPK は胚発生、精母細胞の DNA 損傷修復、および卵巣ステロイドホルモン産生に寄与している可能性がある(55)。

さらに、本研究において卵管における ADAMTS9-AS2、CBR3-AS1、および NBR2 の発現は、若年女性で低い傾向がある。年齢依存的な発現の理由は不明であるが、エストロ

ゲンによって増加する lncRNA と抑制される lncRNA があることが報告されていることから、これらの lncRNA はエストロゲンによって抑制されている可能性がある(56)。

加えて、本研究で同定された lncRNA の発現レベルは、卵巣よりも卵管において高い傾向である。しかし、この所見を説明する説得力のある答えは得られていない。卵巣は卵巣表層上皮、間質細胞、線維芽細胞などの多くの種類の細胞から構成されているのに対し、卵管は主に上皮細胞から構成されている。卵管と卵巣におけるこれらの lncRNA の局在は不明であるが、これらの lncRNA の発現レベルが異なるのは、卵管と卵巣の細胞成分の違いによる可能性がある。

本研究にはいくつかの限界があった。P53 は HGSC の病因に関与することが知られている(57)。本研究では HGSC 組織、正常卵巣組織、正常卵管組織では、p53 の発現および p53 ドライバー変異は調べられなかった。p53 は lncRNA を制御することが報告されているので (40, 58)、p53 ドライバー変異の有無が lncRNA の発現に影響を及ぼす可能性がある。さらに、正常卵巣および卵管組織の採取時の患者の年齢は、患者間でばらつきがあった。lncRNA の発現が年齢によって影響を受ける可能性は無視できない。

結論として、我々は HGSC 患者において 11 個の低発現 lncRNA を同定した。そのうちの 3 個、CBR3-AS1、NBR2、および ADAMTS9-AS2 は、HGSC の悪性度に関与していることが明らかになった。これらの lncRNA は、HGSC において低発現であるが、過剰発現により必ずしも HGSC の悪性度を抑制しない。これらの lncRNA が HGSC の悪性度を制御する詳細なメカニズムを明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

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、中山健太郎先生に感謝の意を表す。

7, 【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。杉野法広は、Reproductive Medicine

and Biology 誌の編集委員であり、本論文の共著者である。バイアスを最小化するため、本論文の掲載可否に関するすべての編集上の意思決定から除外した。

8, 【人権に関する声明とインフォームド・コンセント】

ヒト組織を扱うすべての実験は、ヘルシンキ宣言に則って行われた。組織採取の前に、すべての患者からインフォームド・コンセントを得た。

9, 【倫理委員会による承認】

ヒト組織を扱うすべての実験は、山口大学大学院医学系研究科の治験審査委員会 (No.H27-216) の承認を得たプロトコールにおいて施行した。

10, 【資金提供情報】

本研究の一部は、日本学術振興会の科学研究費補助金 23K08889, 23K08824, 23K08870, 23K07312, 23K15838, 22K09620, 21K16816, 21K09517, 21K09495 および 21K09542 の助成を受け行われた。

11, 【参考文献】

1. Kurman RJ, and Shih IM. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer -a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol* 2010; 34(3): 433–443
2. Pal S, Garg M and Pandey AK. Deciphering the mounting complexity of the p53 regulatory network in correlation to long non-coding RNAs (lncRNAs) in ovarian cancer. *Cells* 2020; 9(3): 527
3. The Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011; 474(7353): 609–615
4. Schmitt AM and Chang HY. Long noncoding RNAs in cancer pathways. *Cancer Cell* 2016; 29: 452-463

5. Iyer MK, Niknafs YS, Malik R, Singhal U, Sahu A, Hosono Y, *et al.* The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nat Genet* 2015; 47(3): 199-211
6. Hua JT, Ahmed M, Guo H, Zhang Y, Chen S, Soares F, *C* Risk SNP-mediated promoter-enhancer switching drives prostate cancer through lncRNA PCAT19. *Cell* 2018; 174(1): 564–575
7. Zheng M, Hu Y, Gou R, Nie X, Li X, Liu J, Lin B. Identification three lncRNA prognostic signature of ovarian cancer based on genome-wide copy number variation. *Biomed Pharmacother* 2020; 124: 109810
8. Tripathi MK, Doxtater K, Keramatnia F, Zacheaus C, Yallapu MM, Jaggi M, *et al.* Role of lncRNAs in ovarian cancer: defining new biomarkers for therapeutic purposes. *Drug Discov Today* 2018; 23(9): 1635–1643
9. Beg A, Parveen R, Fouad H, Yahia ME and Hassanein AS. Role of different non-coding RNAs as ovarian cancer biomarkers. *J Ovarian Res* 2022; 15: 72
10. Wang J, Lu A, Chen L. LncRNAs in ovarian cancer. *Clin Chim Acta* 2019; 490: 17-27
11. Cardillo N, Russo D, Newtonson A, Reyes H, Lyons Y, Devor E, *et al.* Identification of novel lncRNAs in ovarian cancer and their impact on overall survival. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 1079
12. Nakashima.K, Sato S, Tamura I, Hayashi-Okada M, Tamehisa T, Kajimura T, *et al.* Identification of aberrantly expressed long non-coding RNAs in ovarian high-grade serous carcinoma cells. *Reprod Med Biol* 2020; 19: 277–285
13. Sato S, Maekawa R, Tamura I, Shirafuta Y, Shinagawa M, Asada H, *et al.* SATB2 and NGR1: potential upstream regulatory factors in uterine leiomyomas. *J Assist Reprod Genet* 2019; 36: 2385–2397
14. Kajimura T, Sato S, Muramami A, Hayashi-Okada M, Nakashima K, Sueoka K, *et al.* Overexpression of carbonyl reductase 1 inhibits malignant behaviors and epithelial mesenchymal transition by suppressing TGF- β signaling in uterine leiomyosarcoma cells. *Oncol Lett* 2019; 18: 1503-1512
15. 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(6): e99
16. Tao P, Yang B, Zhang H, Sun L, Wang Y, Zheng W. The overexpression of lncRNA MEG3 inhibits cell viability and invasion and promotes apoptosis in ovarian cancer by sponging miR-205-5p. *Int J Clin Exp Pathol* 2020; 13(5): 869-879
17. Shen L, Liu W, Cui J, Li J and Li C. Analysis of long non-coding RNA expression profiles in ovarian cancer. *Oncol Lett* 2017; 14: 1526-1530
18. Gokulnath P, Cristofaro T, Manipur I, Palma TD, Soriano AA, Guarracino MR, *et al.* Long non-coding RNA HAND2-AS1 acts as a tumor suppressor in high-grade serous ovarian carcinoma. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 4059
19. 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
20. Zhang C, Wang M, Shi C, Shi F, Pei C. Long non-coding RNA Linc00312 modulates the sensitivity of ovarian cancer to cisplatin via the Bcl-2/Caspase-3 signaling pathway. *Biosci Trends* 2018; 12(3): 309-316
21. Li Y, Yang Z and Chen J. Mechanism underlying the regulation of lncRNA ACTA2-AS1 on CXCL2 by absorbing miRNA-532-5p as ceRNA in the development of ovarian cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2021; 14(5): 596-607
22. Lin C, Zheng M, Yang Y, Chen Y, Zhang X, Zhu L, *et al.* Knockdown of lncRNA ACTA2-AS1 reverses cisplatin resistance of ovarian cancer cells via inhibition of miR-378a-3p-regulated Wnt5a. *Bioengineered* 2022; 13(4): 9829–9838
23. Wang X, Han L, Zhou L, Wang L and Zhang LM. Prediction of candidate RNA signatures for recurrent ovarian cancer prognosis by the construction of an integrated competing endogenous RNA network. *Oncol Rep* 2018; 40: 2659-2673
24. Cui Z, Ren S, Lu J, Wang F, Xu W, Sun Y, *et al.* The prostate cancer-up-regulated long noncoding

RNA PlncRNA-1 modulates apoptosis and proliferation through reciprocal regulation of androgen receptor. *Urol Oncol* 2013; 31: 1117–1123

25. Xu L, Zhu H, Gao F, Tang Y, Zhu Y, Sun Z, *et al.* Upregulation of the long non-coding RNA CBR3-AS1 predicts tumor prognosis and contributes to breast cancer progression. *Gene X* 2019; 721: 100014

26. Xie L, Cui G and Li T. Long Noncoding RNA CBR3-AS1 promotes stem-like properties and oxaliplatin resistance of colorectal cancer by sponging miR-145-5p. *J Oncol* 2022; 2260211

27. Zhang Y, Wang M and Cui H. LncRNA CBR3-AS1 predicts unfavorable prognosis and promotes tumorigenesis in osteosarcoma. *Biomed Pharmacother* 2018; 102: 169-174

28. Ygao YP, Li Y, Li HJ and B. Zhao. LncRNA NBR2 inhibits EMT progression by regulating Notch1 pathway in NSCLC. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019; 23: 7950-7958

29. Cai W, Wu B, Li Z, He P, Wang B, Cai A, *et al.* LncRNA NBR2 inhibits epithelial-mesenchymal transition by regulating Notch1 signaling in osteosarcoma cells. *J Cell Biochem* 2019; 120: 2015-2027

30. Yang W, Zheng Z, Yi P, Wang S, Zhang N, Ming J, *et al.* LncRNA NBR2 inhibits the malignancy of thyroid cancer, associated with enhancing the AMPK signaling. *Front Oncol* 2020; 10: 956

31. Chen Z, Tang W, Ye W, Song L and Chen Z. ADAMTS9-AS2 regulates PPP1R12B by adsorbing miR-196b-5p and affects cell cycle-related signaling pathways inhibiting the malignant process of esophageal cancer. *Cell Cycle* 2022; 21(16): 1710–1725

32. Ren N, Jiang T, Wang C, Xie S, Xing Y, Piao D, *et al.* LncRNA ADAMTS9-AS2 inhibits gastric cancer (GC) development and sensitizes chemoresistant GC cells to cisplatin by regulating miR-223 3p/NLRP3 axis. *Aging* 2020; 12(11): 11025-11041

33. Li H, Huang H, Li S, Mei H, Cao T and Lu Q. Long non-coding RNA ADAMTS9-AS2 inhibits liver cancer cell proliferation, migration and invasion. *Exp Ther Med* 2021; 21: 559

34. Lin Z, Huang W, Yi Y, Li D, Xie Z, Li Z, *et al.* LncRNA ADAMTS9-AS2 is a prognostic biomarker and correlated with immune infiltrates in lung adenocarcinoma. *Int J Gen Med* 2021; 14:

8541–8555

35. He L, Xiao Y, Ma L, Zhao F, Yu T and Huang Y. ADAMTS9-AS2: a potential diagnostic and prognostic hallmark in prostate cancer. *JBUON* 2021; 26(4): 1623-1627
36. Ye W, Ni Z, Yicheng S, Pan H, Huang Y, Xiong Y, *et al.* Anisomycin inhibits angiogenesis in ovarian cancer by attenuating the molecular sponge effect of the lncRNA-Meg3/miR-421/PDGFR α axis. *Int J Onco* 2019; 55: 1296-1312
37. Zhang J, Jiang H, Feng X, Wang L and Yang X. NBR2 promotes the proliferation of glioma cells via inhibiting p15 expression. *JBUON* 2021; 26(2): 388-394
38. Zhu C, He X, Chen K, Huang Z, Yao A, Tian X, *et al.* LncRNA NBR2 aggravates hepatoblastoma cell malignancy and promotes cell proliferation under glucose starvation through the miR-22/TCF7 axis. *Cell Cycle* 2021; 20: 575–590
39. Kopp F and Mendell JT. Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. *Cell* 2018; 172: 393-407
40. Huarte M, Guttman M, Feldser D, Garber M, Koziol MJ, Kenzelmann-Broz D, *et al.* A Large Intergenic Noncoding RNA Induced by p53 Mediates Global Gene Repression in the p53 Response. *Cell* 2010; 142: 409–419
41. Li Y, Wan Q, Wang W, Mai L, Sha L, Mashrah M, *et al.* 2019 LncRNA ADAMTS9-AS2 promotes tongue squamous cell carcinoma proliferation, migration and EMT via the miR-600/EZH2 axis. *Biomed Pharmacother* 2019; 112: 108719
42. Ni K, Huang Z, Zhu Y, Xue D, Jin Q, Zhang C, *et al.* The lncRNA ADAMTS9-AS2 regulates RPL22 to modulate TNBC progression *via* controlling the TGF- β signaling pathway. *Front Oncol* 2021; 11: 654472
43. Takahashi K, Podyma-Inoue KA, Saito M, Sakakitani S, Sugauchi A, Iida K, *et al.* TGF- β generates a population of cancer cells residing in G1 phase with high motility and metastatic potential *via* KRTAP2-3. *Cell Rep* 2022; 40: 111411
44. Song E, Xing L, Wang L, Song W, Li D, Wang Y, *et al.* LncRNA ADAMTS9 -AS2 inhibits cell

- proliferation and decreases chemoresistance in clear cell renal cell carcinoma via the miR-27a/FOXO1 axis. *Aging* 2019; 11(15): 5705-5725
45. Jin HJ, Zhao JC, Ogden I, Bergan R, and Yu J. Androgen receptor-independent function of FoxA1 in prostate cancer metastasis. *Cancer Res* 2013; 73(12): 3725–3736
46. Taylor DH, Chu ET, Spektor R, and Soloway PD. Long non-coding RNA regulation of reproduction and development. *Mol Reprod Dev* 2015;82(12):932-56.
47. Zhao Y, Chegini N, and Flanders KC. Human fallopian tube expresses transforming growth factor (TGF beta) isoforms, TGF beta type I-III receptor messenger ribonucleic acid and protein, and contains [125I] TGF beta-binding sites. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79(4):1177-84.
48. Cometti BPS, Dubey RK, Imthurn B, and Rosselli M. Natural and environmental oestrogens induce TGFB1 synthesis in oviduct cells. *Reproduction* 2018;155(3):233-244.
49. Baerwald AR, Adams GP, and Pierson RA. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. *Hum Reprod Update* 2012;18(1):73-91.
50. Ghafouri-Fard S, Glassy MC, Abak A, Hussen BM, Niazi V, and Taheri M. The interaction between miRNAs/lncRNAs and Notch pathway in human disorders. *Biomed Pharmacother* 2021;138:111496.
51. Cai W, Wu B, Li Z, He P, Wang B, Cai A, *et al.* LncRNA NBR2 inhibits epithelial-mesenchymal transition by regulating Notch1 signaling in osteosarcoma cells. *J Cell Biochem* 2019;120(2):2015-2027.
52. Moldovan GE, Miele L, and Fazleabas AT. Notch signaling in reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 2021;32(12):1044-1057.
53. Wang T, Li Z, Yan L, Yan F, Shen H, and Tian X. Long Non-Coding RNA Neighbor of BRCA1 Gene 2: A Crucial Regulator in Cancer Biology. *Front Oncol* 2021;11:783526.
54. Bhardwaj JK, Paliwal A, Saraf P, and Sachdeva SN. Role of autophagy in follicular development and maintenance of primordial follicular pool in the ovary. *J Cell Physiol* 2022;237(2):1157-1170.
55. Sun Z, Zhang Z, Liu Y, Ren C, He X, Jiang Y, *et al.* Integrated Analysis of mRNAs and Long

Non-Coding RNAs Expression of Oviduct That Provides Novel Insights into the Prolificacy Mechanism of Goat (*Capra hircus*). *Genes* 2022;13(6):1031.

56. Sedano MJ, Harrison AL, Zilaie M, Das C, Choudhari R, Ramos E, *et al.* Emerging Roles of Estrogen-Regulated Enhancer and Long Non-Coding RNAs. *Int J Mol Sci* 2020;21(10):3711.

57. Bischof K, Knappskog S, Hjelle SM, Stefansson I, Woie K, Salvesen HB, *et al.* Influence of p53 Isoform Expression on Survival in High-Grade Serous Ovarian Cancers. *Sci Rep* 2019; 9: 5244

58. Sanchez Y, Segura V, Marn-Bejar O, Athie A, Marchese FP, Gonzalez J, *et al.* Genome-wide analysis of the human p53 transcriptional network unveils a lncRNA tumour suppressor signature. *Nat Commun* 2014; 5:5812

59. Zhang Y, Zhang H, Zhang X and Liu B. CBR3-AS1 Accelerates the malignant proliferation of gestational choriocarcinoma cells by stabilizing SETD4. *Dis Markers* 2022; 7155525

60. Guan Y, Yang J, Liu X and Chu L. Long noncoding RNA CBR3 antisense RNA 1 promotes the aggressive phenotypes of non-small-cell lung cancer by sponging microRNA-509-3p and competitively upregulating HDAC9 expression. *Oncol Rep* 2020; 44: 1403-1414

61. Lai F, Zhang H, Xu B, Xie Y and Yu H. Long non-coding RNA NBR2 suppresses the progress of colorectal cancer in vitro and in vivo by regulating the polarization of TAM. *Bioengineered* 2021; 12(1): 5462–5475

62. Dong P, Xiong Y, Yue J, Xu D, Ihira K, Konno Y, *et al.* Long noncoding RNA NEAT1 drives aggressive endometrial cancer progression via miR-361-regulated networks involving STAT3 and tumor microenvironment related genes. *J Exp Clin Cancer Res* 2019; 38:295

63. Liu W, Zhang Z, Luo X, Qian K, Huang B, Deng J, *et al.* M6A Promotes Colorectal Cancer Progression via Regulating the miR-27a-3p/BTG2 Pathway. *J Oncol* 2023; 7097909

64. Sulewska A, Niklinski J, Charkiewicz R, Karabowicz P, Biecek P, Baniecki H, *et al.* A Signature of 14 Long non-coding RNAs (lncRNAs) as a step towards precision diagnosis for NSCLC. *Cancers* 2022; 14: 439

表 S1. 22 症例の HGSC 患者の臨床データ

No	Age	FIGO stage	CA125 at diagnosis	CA19-9 at diagnosis	CEA at diagnosis	Residual disease
1	62	IC2	37	14	1.7	complete
2	84	IIIB	1434	1	unknown	suboptimal
3	61	IIIB	824	6	2	optimal
4	56	IIIC	548	2	<0.5	suboptimal
5	45	IIIC	696	10	unknown	suboptimal
6	51	IIIC	920	1	1.4	suboptimal
7	63	IIIC	376	14	1.8	suboptimal
8	74	IIIC	7044	18	unknown	suboptimal
9	74	IIIC	850	<1	15.8	complete
10	72	IIIC	3230	19	2.5	suboptimal
11	74	IIIC	1201	18	5.2	suboptimal
12	65	IVA	3821	7	2	suboptimal
13	53	IVA	921	16	2.9	optimal
14	81	IVB	127	20	1.8	optimal
15	64	IVB	853	20	unknown	suboptimal
16	64	IVB	1914	12	0.7	suboptimal
17	80	IVB	41	18	unknown	optimal
18	54	IVB	4772	1	31	optimal
19	77	IVB	5455	33	unknown	suboptimal
20	74	IVB	4616	<0.5	2	suboptimal
21	40	IVB	1245	unknown	unknown	suboptimal
22	77	IVB	975	1	2.7	suboptimal

表 S2. 正常卵巣組織検体を得た患者の臨床データ

No	Age	Clininical diagnosis	Pathological diagnosis	Ovaries used in this study (Rt or Lt)
1	68	Endomertial cancer	endometrioid carcinoma, Grade 2	Rt
2	66	Uterine fibroid	Uterine leiomyoma	Rt
3	51	Uterine fibroid	Uterine leiomyoma	Rt
4	59	Lt. ovarian cyst	mucinous cystadenoma	Rt
5	71	Lt. ovarian cancer	clear cell carcinoma	Rt
6	68	Lt. ovarian cancer	high grade neuroendocrine carcinoma	Rt
7	37	Cervical cancer	Squamous cell carcinoma	Rt
8	75	Endomertial cancer	endometrioid carcinoma, Grade 1	Rt
9	69	Cervical cancer	adenosquamous carcinoma	Rt
10	67	Rt. ovarian cancer	clear cell carcinoma	Lt

表 S3. 正常卵管組織検体を得た患者の臨床データ

No	Age	Clininical diagnosis	Pathological diagnosis	Fallopian tubes used in this study (Rt or Lt)
1	68	Endomertial cancer	endometrioid carcinoma, Grade 2	Rt
2	66	Uterine fibroid	Uterine leiomyoma	Rt
3	59	Lt. ovarian cyst	mucinous cystadenoma	Rt
4	71	Lt. ovarian cancer	clear cell carcinoma	Rt
5	68	Lt. ovarian cancer	high grade neuroendocrine carcinoma	Rt
6	40	Cervical cancer	Squamous cell carcinoma	Rt
7	53	Uterine fibroid	Uterine leiomyoma	Rt
8	57	Endomertial cancer	endometrioid carcinoma, Grade 1	Rt
9	44	Uterine fibroid	Uterine leiomyoma	Rt
10	42	Uterine fibroid	Uterine leiomyoma	Rt

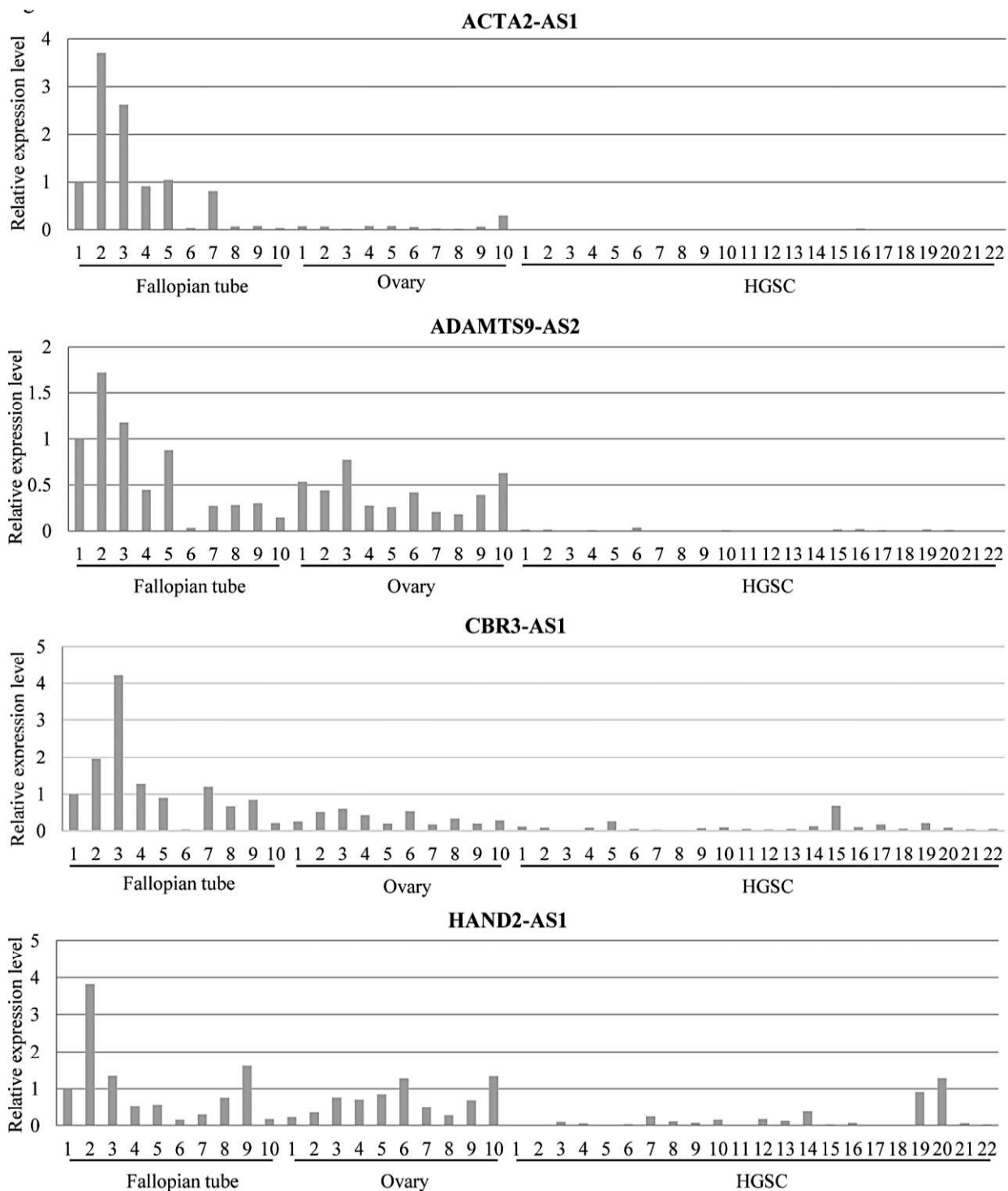


図 S1. HGSC において特異的に発現する lncRNA の HGSC 組織、正常卵管組織および正常卵巣組織の複数の検体における検証の元データ

X 軸の番号は表 S1、S2、S3 の患者番号に対応する。real-time RT-PCR により 3 連で解析した HGSC 組織 22 検体、正常卵管組織 10 検体、および正常卵巣組織 10 検体における lncRNA の相対発現量を、正常卵管組織 #1 を 1 とした相対値で示す。内部標準遺伝子として GAPDH を用いた。

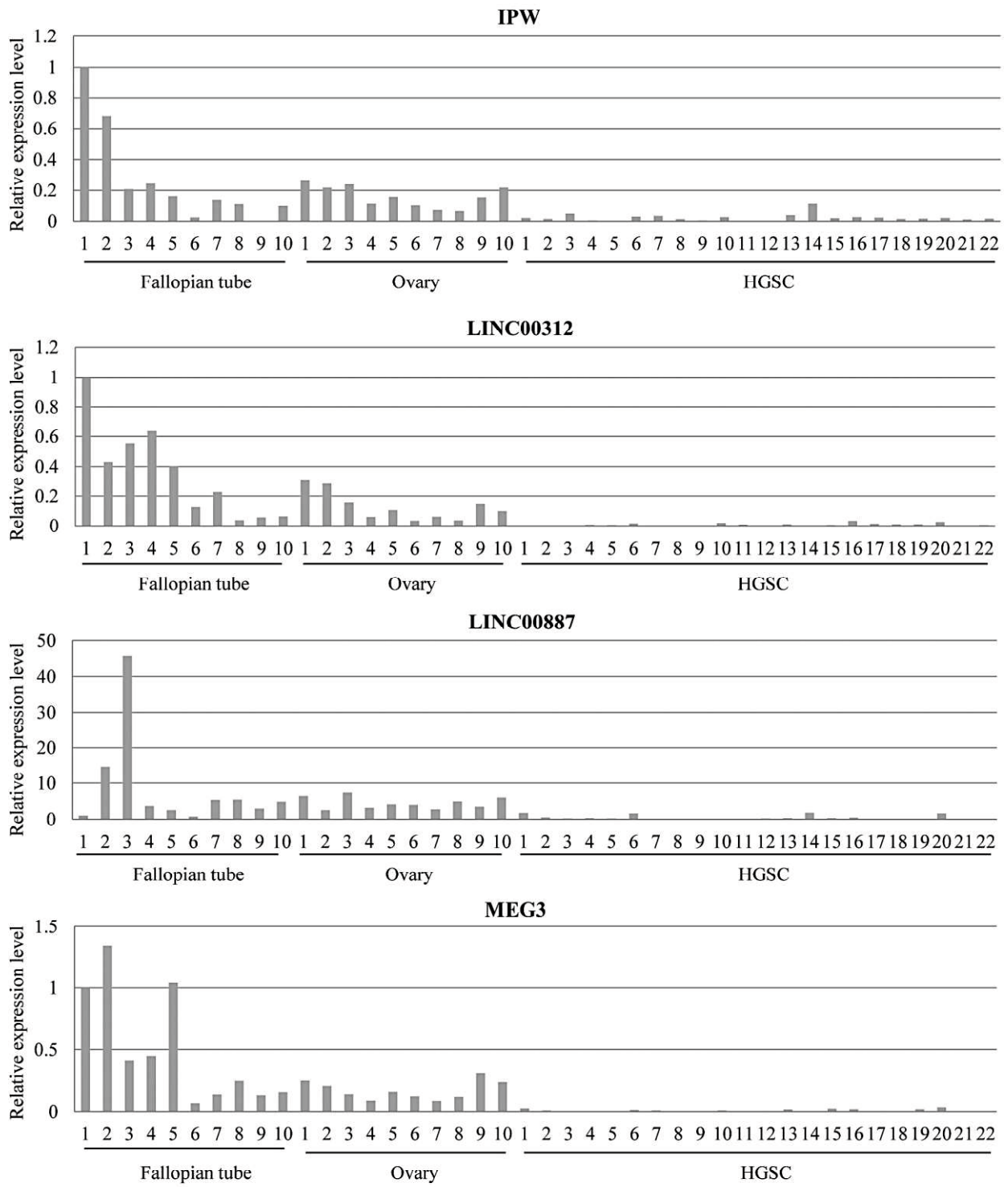


図 S1 続き.

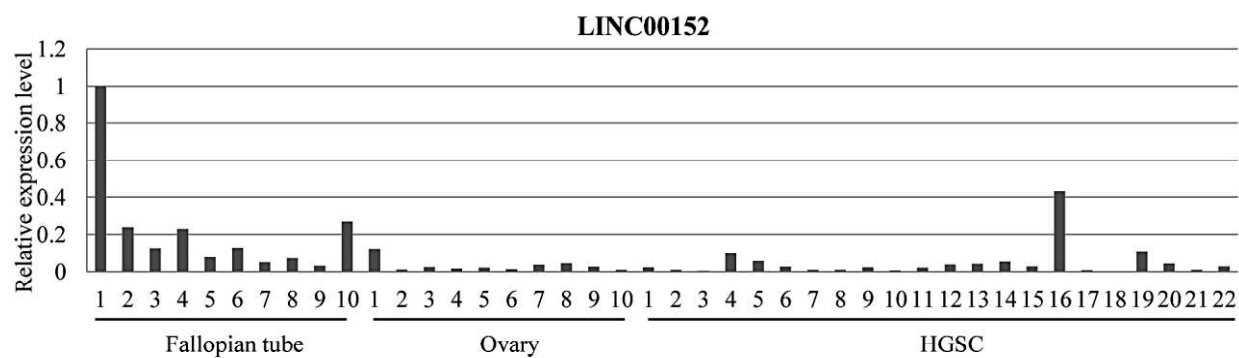
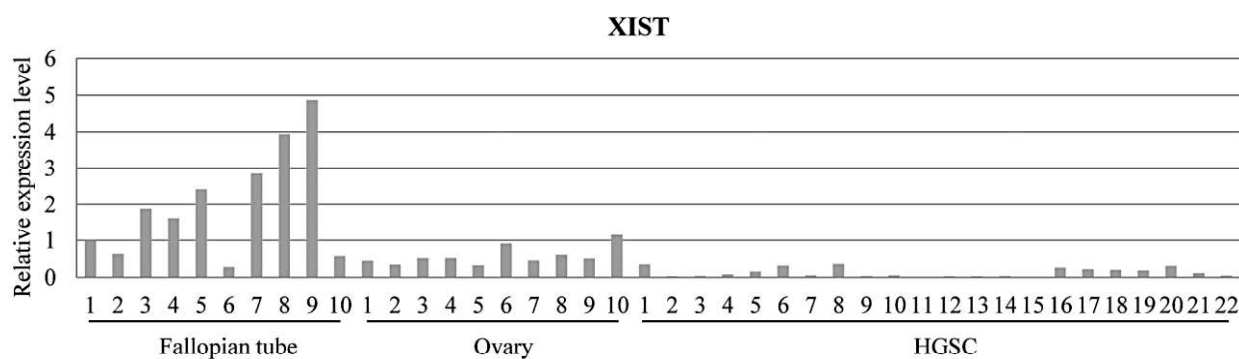
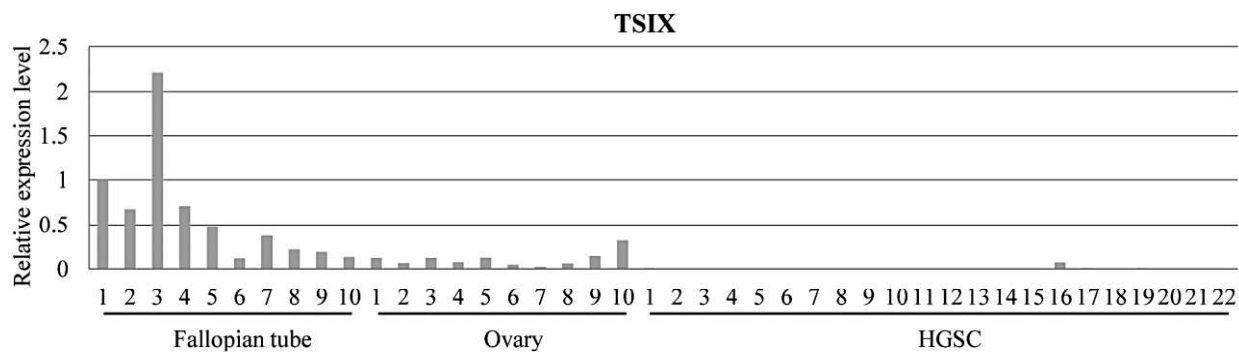
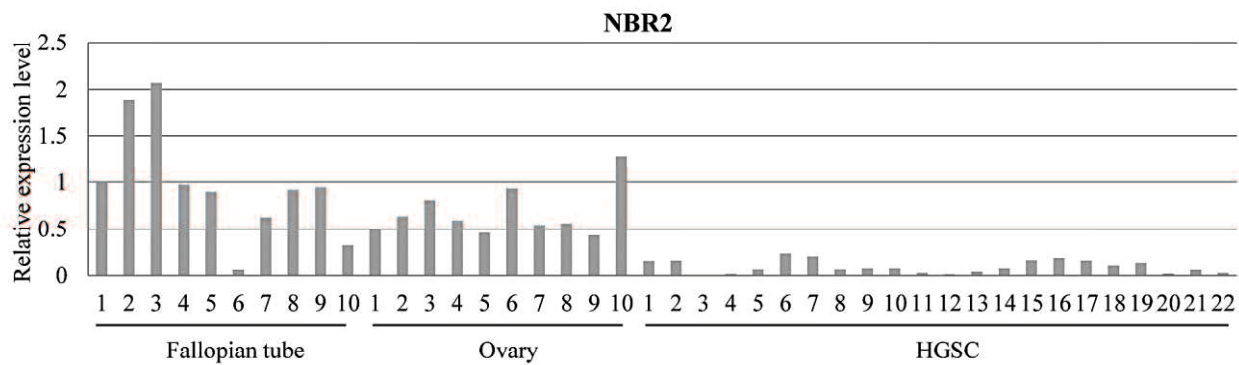


図 S1 続き.