

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16557

研究課題名(和文) 癌微小環境における癌関連線維芽細胞のRNA編集の意義と治療への応用

研究課題名(英文) Activation of RNA editing is a novel mechanism that promotes invasive potential of cancer-associated fibroblasts in colorectal cancer

研究代表者

重安 邦俊 (Shigeyasu, Kunitoshi)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：70544071

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)：今回我々は、大腸癌微小環境(TME)のなかで最も代表的な癌関連線維芽細胞(CAF)におけるRNA編集の意義について検討した。627例の大腸癌症例を解析した結果、癌組織ではADAR1の発現およびAZIN1 RNA編集レベルが上昇しており、それらは間質性マーカーであるVimentinやFAPの発現との相関が認められた。ついで大腸癌組織の免疫染色を施行し、ADAR1の発現は癌細胞、線維芽細胞ともに上昇していることを確認した。癌培養上清を線維芽細胞に添加するとADAR1の発現およびAZIN1 RNA編集レベルが上昇した。またEdited AZIN1を強発現させた線維芽細胞では浸潤能が上昇した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究の結果から大腸TME中のCAFのAZIN1発現の上昇は、CAFの浸潤能を増加させるとともに、腫瘍の浸潤能の重要な予測因子となり得ることが示された。当研究は大腸癌TMEにおけるRNA編集の意義について検討した初めての独創的な研究であり、浸潤能を評価するバイオマーカーとなりうること、また新たな治療ターゲットとなりうることを示した。

研究成果の概要(英文)：We systematically analyzed a large cohort of 627 colorectal cancer (CRC) specimens, and investigated the expression pattern of ADAR1 and the its biological significance on the antizyme inhibitor 1 (AZIN1) RNA editing levels. Both ADAR1 expression and AZIN1 RNA editing levels were significantly elevated in CRC tissues vs. normal mucosa, and these findings correlated with the increased expression of mesenchymal markers, Vimentin ($r=0.44$) and Fibroblast activation protein ($r=0.38$). Intriguingly, ADAR1 expression was specifically upregulated in both cancer cells and fibroblasts from cancerous lesions. Conditioned medium from cancer cells led to induction of ADAR1 expression and activation of AZIN1 RNA editing in fibroblasts ($p<0.05$). Additionally, edited AZIN1 enhanced the invasive potential of fibroblasts.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：RNA編集 大腸癌 微小環境 癌関連線維芽細胞 ADAR1 AZIN1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

発癌には多彩な epigenetic な変化が関わっており、RNA 編集はその一つである。RNA 編集によって RNA 転写後の塩基の修飾が行われ、タンパクの構造変化や miRNA との親和性の変化を引き起こす。消化器癌では、RNA 編集酵素の一つである Adenosine deaminase acting on RNA 1 (ADAR1) の発現が上昇し、標的となる RNA の塩基置換が促進される。ADAR1 の標的として代表的なものが *antizyme inhibitor 1* (AZIN1) であり、AZIN1 RNA 編集レベルの上昇により ornithine decarboxylase およびポリアミンが蓄積され癌の悪性度が増すと考えられている。近年、肝細胞癌、食道癌、胃癌、大腸癌などの癌腫において RNA 編集の意義が報告されてきたが、これらの既報は癌細胞に注目した研究である。癌組織では、癌細胞以外にも、癌関連線維芽細胞や腫瘍随伴マクロファージなど様々な細胞が癌微小環境を形成し、癌の浸潤や転移を促進すると言われているが、癌微小環境における RNA 編集の意義は不明である。今回我々は、大腸癌微小環境のなかで、最も代表的な癌関連線維芽細胞における RNA 編集の意義について検討した。

2. 研究の目的

大腸癌微小環境中の癌関連線維芽細胞における RNA 編集の意義を明らかにする。

特に、癌細胞からの液性因子による線維芽細胞への作用に着目し、癌微小環境中のエピジェネティクスを介したシグナル伝達とリモデリング機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 臨床サンプル解析

The cancer genome atlas (TCGA) と岡山大学の独自の cohorts を用い、RNA 編集酵素 ADAR1 の発現と、AZIN1 RNA 編集の解析を行った。特に、ADAR1 の免疫染色を用い、癌微小環境での、癌細胞と線維芽細胞における ADAR1 蛋白の発現強度を解析した。

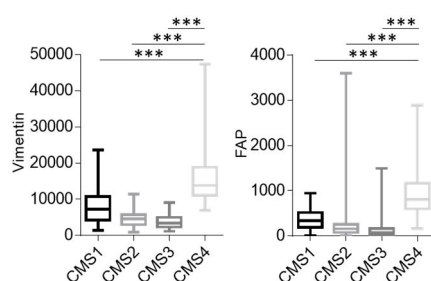
(2) *in vitro* 解析：癌細胞株 (HT29、RKO) と、線維芽細胞株 WI38 を用い、癌微小環境モデルを作成し、RNA 編集の解析を行った。癌細胞培養上清を回収したのち、線維芽細胞に添加し、線維芽細胞における RNA 編集の変化を計測した。また、野生型 (wild type) と編集型 (edited type) の AZIN1 を強制発現し、表現型の変化を確認した。

4. 研究成果

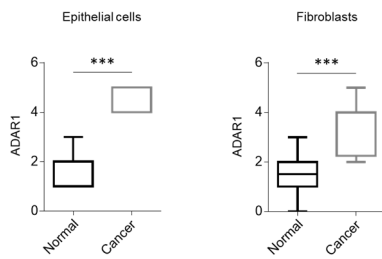
(1) TCGA データベースでの解析 (RNA sequencing)

627 例の大腸癌症例を解析した結果、癌組織では ADAR1 の発現および AZIN1 RNA 編集レベルが上昇しており、それらは間質性マーカーである Vimentin や FAP の発現との相関が認められた。特に、CMS4 において ADAR1 の発現上昇を認め、間葉系の性質を持つ大腸癌との相関が強く示唆された。

CMS4 は間葉系の性質をもつ大腸癌としてコンセンサスが得られているが、癌関連線維芽細胞の存在が予後不良の原因と言われている。このため、癌関連線維芽細胞における RNA 編集を解析すると、予後不良の原因を RNA 編集の観点から論証できると考えた。

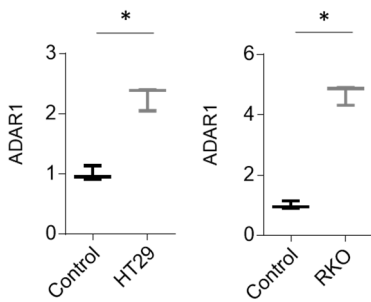


(2) 大腸癌組織の ADAR1 免疫染色



大腸癌臨床検体を用い、ADAR1 の免疫染色を施行した。ADAR1 の発現は、癌細胞のみならず、癌関連線維芽細胞においても発現が上昇していた。これまで癌細胞における ADAR1 の発現上昇は報告されていたが、癌関連線維芽細胞での報告は、これが初めてである。

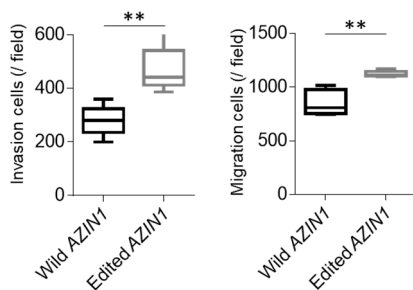
(3) *in vitro* analysis (癌細胞上清を線維芽細胞に添加)



癌関連線維芽細胞における RNA 編集酵素 ADAR1 の発現上昇の原因を明らかにすることを試みた。

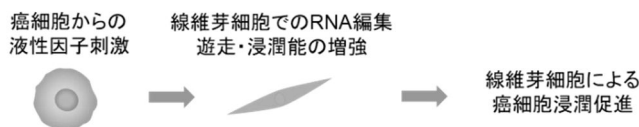
癌培養上清を線維芽細胞に添加すると、RNA 編集酵素 ADAR1 の発現および AZIN1 RNA 編集レベルが上昇した。このことから、癌細胞からの液性因子により、線維芽細胞で RNA 編集が誘導されていることが判明した。

(4) *in vitro* analysis (edited AZIN1 を線維芽細胞で強制発現)



線維芽細胞における AZIN1 RNA 編集の意義を解析した。Edited AZIN1 を強制発現させた線維芽細胞では、浸潤能が上昇した。癌細胞と同様に、癌関連線維芽細胞でも RNA 編集が促進され、浸潤能が増強していることが明らかになった。

(5) 大腸癌微小環境での癌関連線維芽細胞における RNA 編集の意義



癌細胞からの液性因子刺激により、癌関連線維芽細胞で RNA 編集が誘導され、浸潤能が増強することを初めて報告

した。従来、線維芽細胞は、癌細胞の先導を務める形で浸潤を促進と言われてきた (Cancer Cell. 2011 Aug 16;20(2):229-45.)。我々の研究は、RNA 編集の観点からそれを論証することができた。当研究は大腸癌微小環境における RNA 編集の意義について検討した初めての独創的な研究である。RNA 編集は、癌微小環境の浸潤能を評価するバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

以上の内容は、Activation of AZIN1 RNA editing is a novel mechanism that promotes invasive potential of cancer-associated fibroblasts in colorectal cancer. **Cancer letters** 444: 127-135

として論文発表した。大学院生の武田 正が岡山医学会賞 (林原賞) を受賞した。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Takeda S, Shigeyasu K, Okugawa Y, Yoshida K, Mori Y, Yano S, Noma K, Umeda Y, Kondo Y, Kishimoto H, Teraishi F, Nagasaka T, Tazawa H, Kagawa S, Fujiwara T, Goel A	4. 巻 444
2. 論文標題 Activation of AZIN1 RNA editing is a novel mechanism that promotes invasive potential of cancer-associated fibroblasts in colorectal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 127 ~ 135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2018.12.009	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sho Takeda, Kunitoshi Shigeyasu, Yoshinaga Okugawa, Kazuhiro Yoshida, Yoshiko Mori, Shuya Yano, Kazuhiro Noma, Yuzo Umeda, Yoshitaka Kondo, Hiroyuki Kishimoto, Fuminori Teraishi, Hiroshi Tazawa, Shunsuke Kagawa, Ajay Goel, Toshiyoshi Fujiwara
2. 発表標題 Activation of AZIN1 RNA editing facilitates and promotes invasive potential of cancer associated fibroblasts in colorectal cancer
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kunitoshi Shigeyasu, Ajay Goel, Toshiyoshi Fujiwara
2. 発表標題 Novel evidence for AZIN1 RNA editing-mediated oncogenic role in colorectal cancer
3. 学会等名 JDDW 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 重安 邦俊、武田 正、奥川 喜永、問山 裕二、永坂 岳司、田 澤 大、香川 俊輔、Ajay Goel、藤原 俊義
2. 発表標題 大腸癌における AZIN1 のRNA 編集に関する新しい知見
3. 学会等名 The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kunitoshi Shigeyasu, Shusuke Toden, Yoshinaga Okugawa, Jinsei Miyoshi, Takeshi Nagasaka, Toshiyoshi Fujiwara, Leilei Chen and Ajay Goel
2. 発表標題 Novel evidence for AZIN1 RNA editing-mediated oncogenic role in colorectal cancer
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

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