

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15256

研究課題名(和文) ヒト腫瘍のRNA 塩基修飾の変化

研究課題名(英文) RNA modifications of human tumors

研究代表者

梶村 春彦 (Sugimura, Haruhiko)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：00196742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト肺がん組織内のm6Aの測定をおこなったところ、腫瘍部でm6Aが有意に多く観察され、さらに、予後と比較をするとm6A/Aの比が高い肺がんは予後が悪かった。生物学的原因探索のため基礎dataとして肺がん細胞株でm6Aの修飾酵素METTL14, METTL3, WTAP, FTO, ALKBH5, YTHDF1, YTHDF2の発現を調べた。不死化気管支上皮で発現無く、肺がんを高発現するWTAPのsiRNAによる発育抑制効果・m6A/Aの減少を確認した。逆にWTAP過剰発現ではgrowthの亢進がみられた。最後に641例の自験例を用いてWTAPの肺がん組織での発現とその予後との相関を見いだした。

研究成果の概要(英文)：m6A measurement in human cancer tissue revealed m6A is relatively abundant in tumor portion of the lung and high m6A/A was related to the worse prognosis of the lung cancer. To elucidate the biological basis of this observation, modifying enzymes METTL14, METTL3, WTAP, FTO, ALKBH5, YTHDF1, YTHDF2 expression were investigated in 8 lung cancer cell lines and immortalized bronchial epithelium. Among them, WTAP, which is not expressed in immortalized bronchial epithelium and over expressed in lung cancer cell lines was investigated on its effect of siRNA and enforced overexpression. SiRNA experiment showed growth inhibition and decrease of m6A/A whereas over expression induced growth promotion. Immunoprecipitation analysis confirm its modification on EGFR 3UTR mA. Finally using our clinical cohort of 642 lung cancer cases, expression of WTAP in human lung cancer tissues are related to the prognosis including performance status and overall survival.

研究分野：分子病理学

キーワード：RNA修飾 肺がん

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム計画が終了して、すでに十数年たち、ヒト腫瘍におこる DNA の変化というのは広汎、大規模、また国際的共同研究によって膨大な情報が蓄積されている。話題になりやすいのは、点突然変異で、その mutation signature によりヒト腫瘍の発癌過程も含めた分類が Sanger から提案されており、よく知られる様にもなった。いっぽう、copy number の変化や DNA の修飾などについても、多くの情報が得られている。メチル化の landscape は一部の腫瘍の分類や治療戦略といった系統的な分類の基盤になりうるが、実用段階になっているものは少ない。copy number についても、ゲノムベースの個別化医療に現場で役立っている HER2 増幅以外ではそれを治療の標的にしている薬剤はまだわずかで、かつ研究段階である。fusion を起こすような変化つまり rearrangement が診断面でも治療面でも実施の症例の中での個々の頻度が低いながら多くの研臨床研究がされ、実際の薬剤が使われつつあるのとは対照的である。

ヒトの核酸の塩基は、種々の修飾をうけていることが近年分かってきた。上述のようにシトシン塩基のメチル化をはじめとする DNA 修飾は、大変広汎な promoter のメチル化といった研究が展開され、ゲノムワイドにも多くの情報がある。いっぽう、メチル化が酸化をうけた状態である hydroxy methylation や、さらにそれが進んだ carboxyl 化、formyl 化などといった修飾がある。これらの修飾塩基の実際のヒト組織内での検討はあるが、まだ、比較的少ない。

もうひとつの DNA 変化として、いままで、ヒト組織の中での状態があまりわからなかったと言わざるをえないのが、DNA 付加体である。多くの環境変異原や酸化 DNA 障害のひとつとしての DNA の塩基修飾は、主に動物を用いた発癌実験の分野で研究がすすみ、その化学的性質、実験的生成機構が知られる様になっていた。この修飾塩基は、発癌物質によっても異なるし、同じ発癌物質が異なる DNA 付加体を生じせしめたり、異なった化学物質で同様の塩基修飾が起こったりする。近年、主に測定法の進歩もあって、このような多数の DNA 付加体を網羅的に検出・解析しようという試みが DNA adductomics が行われつつある。つまり、4種(あるいは RNA の場合をいれると5種)の塩基で、種々の生命現象を説明できた状況は過去ものとなっている。

一方 RNA のほうにも各種の塩基修飾が知られる様になり、その生物学的意義やそれに関わる酵素群などが分かってきた。methyl cytosine, pseudouridine, N6-methyl adenosine についてはその mRNA 上でのよくみられる部位(enriched position)なども提唱されている。m6A に対する抗体で、immunoprecipitation(metagenome analysis of methylated RNA immuno-precipitation) を

すると、m6A は mRNA transcript の特定の領域に、全体(あくまでも仮想的な mRNA があつたとして)としては 3' UTR の stop codon のそばにあることが多いというような主張がされている。さらに、これらの修飾には writer, eraser, reader というように呼び慣わされている修飾酵素が知られている。Base excision repair などの系でも時折話題になるようなものと同じ群の酵素も含まれており、核酸修飾の付加と除去とのダイナミクスにかかわる修復酵素群の特性が研究されつつある。このように、分子生物学的動態が、この研究領域の中心課題であるが、やはり、ヒト腫瘍など、ヒト組織のなかで、多少とも意義のある役割をしているのかという視点での研究は少なく、また、一般にこの分野の研究者のヒト組織への access も popular ではない。介在する不確定要因の多さを考えると、研究開始当初から、ヒト組織内の核酸の修飾の実態は、現在の暗黒大陸という認識で臨んできたが、いまだに、測定法や標準品などの課題も多い分野である。本研究の2年間では、まず、ヒト組織のなかで、RNA 修飾自体が認識できるのかという基本的な問題からアプローチを試みた。

2. 研究の目的

前述のように、RNA の修飾として、現在手がかりになりやすいのは mRNA のなかにある、adenine の 6 位 N のメチル化であり、N6-methyladenosine, m6A と書くことにする。ヒト腫瘍とその周辺部の組織からの RNA 中に m6A が存在しているか、その検出方法はどうかすればよいか、また、臨床的意義があるのか、あるとしたらどのような機構があるのかについて、主に手術でとられた肺腫瘍、特に non-small cell lung cancer を対象として m6A などの修飾酵素などとともに実態を明らかにすることを目的とする。

特に、修飾酵素のうち、肺の非腫瘍不死化上皮で発現がなく、いくつかの腫瘍細胞株で発現のみられる WTAP に着目して、その動態や臨床的意義を解析することにした。

3. 研究の方法

手術でとられた肺がんの切除検体について、日本病理学会のゲノム研究用病理検体取り扱い規定したが、腫瘍部と非腫瘍部を液体窒素で急速凍結する。これらから Total RNA および polyA column で mRNA を抽出する。nuclease P 処理(WAKO)後 m6A および A は標準品を流しながら LC-MSMS で定量する。RNA および mRNA は RIN 値をだして、その質を担保する。m6A/A を指標に各臨床所見との関連を見る。臨床所見としては年齢、性、喫煙歴、組織型、病理学的ステージ、変異 EGFR の発現である。

細胞株は、気管支上皮不死化細胞 BEAS2B, 肺がん細胞株として、H1299, H460, A549 (以上3つは large cell type), ABC1, H358, PC3, PC9, ACC-LC176 (以上は腺がん株)を用いる。

m6A 修飾酵素として、METLL14, METTL3, WTAP (以上 writer), FTO, ALKBH5 (以上 eraser), YTHDF1, YTHDF2 (以上 reader)について、それぞれ、Western blot に使用できる抗体を用いてタンパク質としての発現を評価する。これらの酵素群の発現量の評価は、quantitative RT-PCR を用いる。

肺がんの組織 cohort 670 例は、Tissue Microarray を作成して、WTAP の immunohistochemistry 用の抗体を用いて評価した。

発現抑制実験は、WTAP の siRNA を 2 種設計して、高発現株に transfection した。growth は 4 日間毎日細胞数をカウント、また、apoptotic cell の assay と、migration assay をおこなった。

WTAP の標的のひとつとして EGFR の 3-UTR 部分の adenine 修飾が知られているが、この確認のために immunoprecipitation を行った。

4. 研究成果

肺がん組織で検討すると、腫瘍部と非腫瘍部〔比較的近接〕の m6A/A 値の非 T/N を検討すると、腫瘍部で m6A が増加している症例が有意に多い。m6A/A の値を二分して臨床情報を比較すると、年齢、性、組織型、病理学的ステージ、喫煙歴などとの関連はなかったが、5 年生存率で、marginal ながら有意な差が生じた。つまり m6A/A の高いほうが予後が悪い。多変量解析をおこなっても、年齢、性、喫煙、組織型(腺がんかそうでないか)、病期、EGFR 変異などとともに、独立して予後因子に残ることが明らかになった。

つぎに、この m6A/A の比を決める各種修飾酵素の発現により肺がんの予後がどうなっているのかを TCGA の data で確認すると、METLL14, METTL3, WTAP の writer では、高発現のほうが予後がよい。YTHDF1, YTHDF2 の reader でも高発現で予後が良い。eraser FTO でも高発現で予後がよい。eraser のひとつ ALKBH5 のみ高発現で予後が悪いという状況であった。

実際の肺の症例で、多くの場合、これらの酵素は腫瘍で低発現しているように見える。これらの酵素の発現量と m6A/A の T/N 比をみてみると、多くの酵素で、発現が高いと値は低くなるが、有意になったのは METLL14 と FTO。発現自体と m6A/A 比との関係性はあまりはっきり見えなかったが、酵素発現の定量性の評価(qRT-PCR)の robustness にやや疑問をもっている。

修飾酵素群 METLL14, METTL3, WTAP, FTO, ALKBH5, YTHDF1, YTHDF2 の発現を BEAS2B, H-1299, H460, A540, ABC1, H358, PC3, PC), ACC-LC176 における発現では、WTAP は BEAS2B や、H460 で発現がなく、また、H460 は METTL14, METTL3, FTO の発現もない。その他、多量の多寡はあるものの、その他の腫瘍細胞株では概ねすべてのここにあげた酵素が発現している。厳密な定量をしてはいないが、BEAS2B では WTAP や YTHDF2 などの発現量が少

ないように見える。既報とやや齟齬のある部分もあるため、H460 などは細胞を再注文したが、結果は変わらなかった。

WTAP は不死化気管支上皮細胞では発現が弱く大多数の腫瘍細胞株では強発現していたので、siRNA による増殖抑制実験を試みた。PC9 では 4 日間の培養で顕著な増殖の抑制をみとめ、また、wound healing assay でも migration assay でも抑制効果を見とめた。さらに siRNA 投与により、mRNA 中の m6A/A 比が減少し、PC3, PC9, H1299 いずれも同様の所見であった。

つぎに過剰発現についての検討をおこなった。WTAP を外から A549 に導入すると、m6A/A の比率はそれほどかわらず、また、増殖もわずかにふえるのみであった。細胞株によって context がかなり変わるようであった。

つぎに WTAP の標的遺伝子の候補である、EGFR, MAPKAPK2, AKT について PC9 を用いて抑制実験を行うと、EGFR の発現、リン酸化 EGFR の発現、MAPKAPK2 の発現、AKT の発現いずれも減弱した。これらの標的あるいは新規の標的についてさらに探索を行っている。

WTAP の肺がん組織での発現を評価するために、641 例の自験例コホートをを用いて染色強度を評価すると、overall survival でも Recurrence Free Survival でも WTAP の発現が高いほうが予後がよかった。TCGA の *in silico* の発現 data でも同様の結果であり、多変量解析でも stage などとともに独立因子として有意に残るものであった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 15 件)

1. Distinctive characteristics and prognostic significance of interstitial pneumonia with autoimmune features in patients with chronic fibrosing interstitial pneumonia.

Yoshimura K, Kono M, Enomoto Y, Nishimoto K, Oyama Y, Yasui H, Hozumi H, Karayama M, Suzuki Y, Furuhashi K, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Inui N, Sumikawa H, Johkoh T, Colby TV, Sugimura H, Suda T.

Respir Med. 2018 Apr;137:167-175.

2. Heterogeneous MET gene copy number and EGFR mutation elicit discordant responses to crizotinib between primary and metastatic lesions in erlotinib-resistant lung adenocarcinoma. Yoshimura K, Karayama M, Inoue Y, Kahyo T, Inui N, Maekawa M, Sugimura H, Suda T. Lung Cancer. 2018 Mar 17. pii: S0169-5002(18)30305-2.

3. MBD4 frameshift mutation caused by DNA mismatch repair deficiency enhances cytotoxicity by trifluridine, an active antitumor agent of TAS-102, in colorectal

cancer cells. Suzuki S, Iwaizumi M, Yamada H, Sugiyama T, Hamaya Y, Furuta T, Kanaoka S, Sugimura H, Miyajima H, Osawa S, Carethers JM, Sugimoto K. *Oncotarget*. 2017;9(14):11477-11488.

4. Editorial Comment on Validation of the digital PCR system for use in tyrosine kinase inhibitor-resistant EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. Sugimura H, Kahyo T. *Pathol Int*. 2018 ;68(3):174-175.

5. Immunohistochemical features and staging of early gastric cancer. Gurzu S, Orłowska J, Sugimura H, Bara T, Szentirmay Z, Januszewicz W, Bara T Jr, Szederjesi J, Jung I. *Arch Med Sci*. 2017;13(6):1373-1382.

6. Mutation Spectrum Induced by 8-Bromoguanine, a Base Damaged by Reactive Brominating Species, in Human Cells. Shinmura K, Kato H, Goto M, Tao H, Inoue Y, Nakamura S, Yoshida H, Tsuzaki E, Sugimura H. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:7308501.

7. Application of digital PCR with chip-in-a-tube format to analyze Adenomatous polyposis coli (APC) somatic mosaicism. Kahyo T, Iwaizumi M, Yamada H, Tao H, Kurachi K, Sugimura H. *Clin Chim Acta*. 2017;475:91-96.

8. Insertionally polymorphic sites of human endogenous retrovirus-K (HML-2) with long target site duplications. Kahyo T, Yamada H, Tao H, Kurabe N, Sugimura H. *BMC Genomics*. 2017;18(1):487.

9. Homeobox Transcription Factor NKX2-1 Promotes Cyclin D1 Transcription in Lung Adenocarcinomas. Harada M, Sakai S, Ohhata T, Kitagawa K, Mikamo M, Nishimoto K, Uchida C, Niida H, Kotake Y, Sugimura H, Suda T, Kitagawa M. *Mol Cancer Res*. 2017 ;15(10):1388-1397.

10. Immunohistochemical expression analysis of leucine rich PPR motif containing protein (LRPPRC), a candidate colorectal cancer biomarker identified by shotgun proteomics using iTRAQ. Nishio T, Kurabe N, Goto-Inoue N, Nakamura T, Sugimura H, Setou M, Maekawa M. *Clin Chim Acta*. 2017;471:276-282.

11. Characterization of V-set and immunoglobulin domain containing 1 exerting a tumor suppressor function in gastric, lung, and esophageal cancer cells. Inoue Y, Matsuura S, Yoshimura K, Iwashita Y, Kahyo T, Kawase A, Tanahashi M, Maeda M, Ogawa H, Inui N, Funai K, Shinmura K, Niwa H, Suda T, Sugimura H. *Cancer Sci*. 2017;108(8):1701-1714.

12. A systematic review of the possible carcinogenic role of the aristolochic acid.

Bara T Jr, Gurzu S, Sugimura H, Bara T, Beleau MA, Jung I. *Rom J Morphol Embryol*. 2017;58(1):41-44. Review.

13. BSND is a Novel Immunohistochemical Marker for Oncocytic Salivary Gland Tumors. Shinmura K, Kato H, Kawanishi Y, Kamo T, Inoue Y, Yoshimura K, Sugiyama K, Misawa K, Hosokawa S, Mineta H, Sugimura H. *Pathol Oncol Res*. 2018;24(2):439-444.

14. Distinct prognostic roles and heterogeneity of TTF1 copy number and TTF1 protein expression in non-small cell lung cancer. Yoshimura K, Inoue Y, Mori K, Iwashita Y, Kahyo T, Kawase A, Tanahashi M, Ogawa H, Inui N, Funai K, Shinmura K, Niwa H, Suda T, Sugimura H. *Genes Chromosomes Cancer*. 2017;56(7):570-581.

15. Successful crizotinib monotherapy in EGFR-mutant lung adenocarcinoma with acquired MET amplification after erlotinib therapy. Yoshimura K, Inui N, Karayama M, Inoue Y, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Takeuchi K, Sugimura H, Suda T. *Respir Med Case Rep*. 2017;20:160-163.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 梶村春彦 Adductomics study of human tissues Possible markers of exposures? 日本放射線影響学会 第60回大会 千葉 10月25-18日

2. 梶村春彦 梶村春彦 第6回、第7回 HBOC コンソーシアム 教育セミナー 本邦の家族集積性胃がんについて ともに品川 6月25日および12月3日

〔図書〕(計 1 件)

1. 梶村春彦 朝倉書店 山科正平、高田邦昭責任編集 ライフサイエンス顕微鏡学ハンドブック(総ページ数 318p) XI章 ヴァーチャル顕微鏡といわゆるヴァーチャルスライド pp180-185, 2018

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

梶村春彦(SUGIMURA, Haruhiko)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号: 00196742

(2)研究分担者 なし

()

研究者番号:

(3)連携研究者 なし

()

研究者番号:

(4)研究協力者 なし

()