

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16903

研究課題名(和文) 頭頸部癌におけるRNAメチル化修飾

研究課題名(英文) RNA methylation analysis of HNSCC

研究代表者

望月 大極 (Mochizuki, Daiki)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40467246

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)：ELISAに類似した蛍光法(Relative Quantification法)で、トータルRNA中のm6Aを計測した。結果は、m6Aが癌部で正常部より有意に増加していた($P=0.004$)。m6A比 = 癌部m6A(%) / 正常部m6A(%)と定義し、m6A比、 >1.5 群と、 <1.5 群で臨床情報と比較した。予後解析では、ログランクテストで、高m6A群(>1.5 群)が有意に予後不良であった。コックス比例ハザード分析では、年齢、性別、喫煙歴、飲酒歴、ステージと比較した。 >1.5 群が有意に予後不良であった。METTL3遺伝子を頭頸部細胞株でノックダウンを施行し、癌細胞増殖性の評価を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAメチル化などの可逆的な塩基修飾が、癌化機構に影響を与えていることが解明されている。RNAにもアデニン6位窒素原子へのメチル基の付加反応(m6A)という塩基修飾が、DNAよりも動的に存在しており、癌とRNAメチル化について研究を行ってきた。頭頸部癌では、m6Aの増加は予後不良群に認められた。さらにRNAメチル化メチルトランスフェラーゼであるMETTL3遺伝子を頭頸部細胞株でノックダウンを施行し、癌細胞増殖性の抑制とm6Aの減少を認められた。これらの結果は、頭頸部発癌におけるm6Aの重要性を示すものである。今後の展開として、治療後の腫瘍モニタリング、リキッドバイオプシーへの応用などが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed m6A levels in a well-characterized dataset of 44 matched pairs of HNSCC tissues and normal tissues. m6A levels were examined via relative quantification assay using ELISA. Cancer tissues had significantly lower levels of m6A than matched normal mucosa ($P < 0.01$). m6A levels were evaluated according to various clinical characteristics and prognostic implications. Notably, we found that m6A levels were significantly correlated with recurrence ($P = 0.031$). Low levels of m6A were correlated with poor survival (DFS; log-rank test, $P = 0.031$). In multivariate analysis, low levels of m6A were evaluated as a significant independent prognostic factor of DFS (hazard ratio: 3.606, 95% confidence interval: 1.262–10.306; $P = 0.017$). HNSCC cells treated with METTL3 siRNA showed a reduction in growth and a decrease in m6A levels. Taken together, our findings showed that low levels of m6A and subsequent overexpression of METTL3 may affect the development of HNSCC.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：RNAメチル化 DNAメチル化 METTL3 m6A

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA メチル化などの可逆的な塩基修飾が、癌化機構など生物に多様な影響を与えていることが解明されている。以前から RNA にもアデノシン 6 位窒素原子へのメチル基の付加反応(m6A) という塩基修飾が存在する事が認識されていた。近年になり m6A に対する抗体が開発され、それに次世代シーケンサーを組み合わせることで、m6A が 25%ものヒト遺伝子に存在し、5000 個以上の mRNA 分子が m6A 化されていることが報告された。しかし、そのエピトランスクリプトームにおける生理作用に関してはまだ報告が少ない。今回我々は、頭頸部癌の m6A 解析により、新たな頭頸部癌エピゲノム異常を見つけ、新たなバイオマーカーを確立したいと考えた。

2. 研究の目的

我々は頭頸部癌における癌抑制遺伝子の DNA メチル化解析を行ってきた。今回は我々がもつ臨床情報のある癌サンプルに関して、癌部及び相当する非癌部においての RNA メチル化状況を調べ、RNA メチル化と癌化機構、癌抑制遺伝子との関連の知見を蓄積していくことを今回の研究の目的としている。

3. 研究の方法

最初に、同意を得た頭頸部癌患者 44 例から癌部、正常部のトータル RNA を抽出し、RNA ELISA で手術検体の癌部正常部における m6A 量の検討を行った。

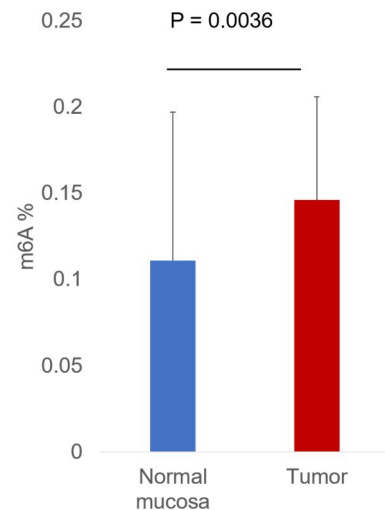
エライザに類似した方法(蛍光法)の Relative Quantification 法で、トータル RNA 中の m6A を比率で計測した。AUROC 値を求めた。RNA メチル化メチルトランスフェラーゼである METTL3 遺伝子を頭頸部細胞株でノックダウンを施行し、癌細胞増殖性の評価ならびに METTL3 遺伝子発現と m6A 値の比較検討を行った。

4. 研究成果

頭頸部癌患者 44 例から癌部、正常部の m6A 解析の結果、有意に癌部で m6A が高値であった (P = 0.0036) (Figure 1)。

臨床情報との解析では、年齢、性別、飲酒歴、喫煙歴、TNstage、再発イベントの有無で検討した。年齢、性別、飲酒歴、喫煙歴、TNstage において統計学的に有意な項目は認めなかった。再発イベントの有無において再発有の症例で有意に m6A 高値を認める症例が多かった (P = 0.031) (Table 1)。

Figure 1



Patient and tumor characteristics	m6A levels (n = 44)		
	> 1.5 (20)	< 1.5 (24)	P-value*
Age			
Under 65	9	8	
65 and older	11	16	0.539
Gender			
Female	3	3	
Male	17	21	1
Alcohol exposure			
Ever	15	18	
Never	5	6	1
Smoking status			
Smoker	16	20	
Non smoker	4	4	1
Tumor size			
T1-3	14	18	
T4	6	6	1
Lympho-node status			
N0	5	5	
N+	15	19	1
Stage			
I, II, III	8	6	
IV	12	18	0.342
Recurrence events			
Positive	12	6	
Negative	8	18	0.031*

予後解析では、ログランクテストで高m6A 群が低 m6A 群と比べ有意に予後不良であった (P=0.030)(Figure 2)。

多変量解析コックス比例ハザード分析では、年齢(>65 vs <65)、性別、飲酒歴、喫煙歴、TNM ステージと比較した。高 m6A 群が低 m6A 群と比べ有意に予後不良であった (P=0.017)(Table 2)。

Figure 2

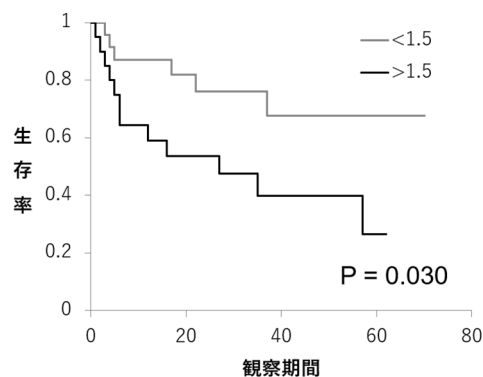


Table 2. Multivariate analysis of factors affecting survival using Cox proportional hazards model in 44 HNSCC patients.

Variables	Disease-free survival	
	HR (95% CI)	P
<i>Age</i>		
65 and older vs. < 65	0.923 (0.289-2.947)	0.893
<i>Sex</i>		
Female vs. Male	0.553 (0.100-3.068)	0.498
<i>Alcohol exposure</i>		
Ever vs. Never	3.031 (0.670-13.70)	0.15
<i>Smoking status</i>		
Smoker vs. Non smoker	0.552 (0.108-2.822)	0.476
<i>Stage</i>		
I, II, III vs. IV	2.532 (0.809-7.921)	0.11
<i>m6A levels</i>		
> 1.5 vs. < 1.5	3.606 (1.261-10.31)	0.017*

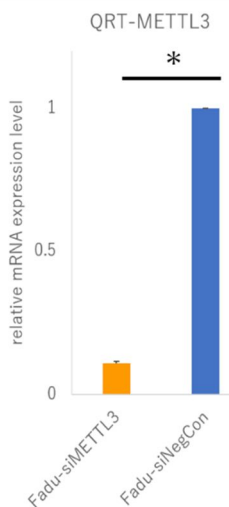
HR: hazard ratio; 95% CI: 95% confidence interval; * P < 0.05

頭頸部癌細胞株 FaDu を METTL3 siRNA でノックダウンすると METTL3 の mRNA 発現は有意に減少した (P<0.001)(Figure 3A)。

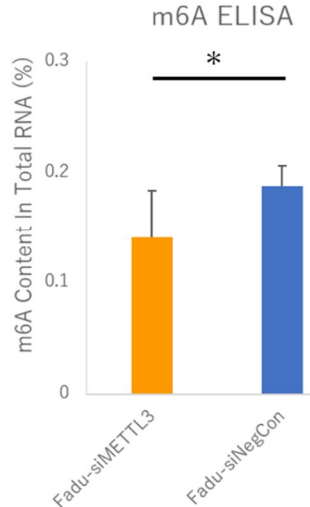
METTL3 siRNA でノックダウンした FaDu 細胞株の m6A を計測すると有意に m6A 値は低下していた (P = 0.017)(Figure 3B)。

Figure 3

A



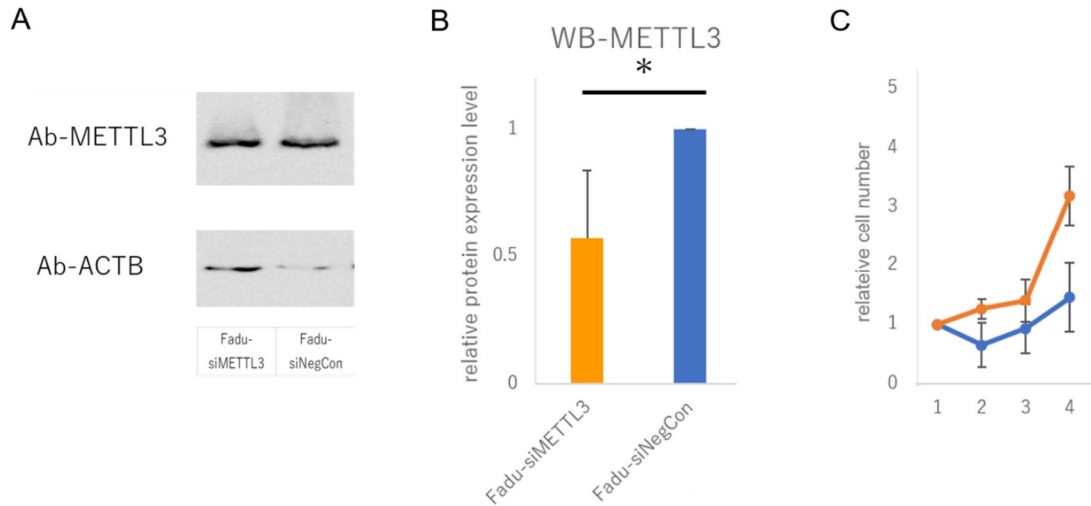
B



同じく、頭頸部癌細胞株 FaDu を METTL3 siRNA でノックダウンすると METTL3 の蛋白発現は有意に減少した ($P = 0.023$) (Figure 4A, 4B)。

METTL3 siRNA でノックダウンした FaDu 細胞株の細胞増殖能を計測すると有意に細胞増殖は低下していた ($P = 0.035$) (Figure 4C)。

Figure 4



まとめ：以上の研究から、頭頸部癌では、m6A の増加は予後不良群に認めた。さらに、RNA メチル化メチルトランスフェラーゼである METTL3 遺伝子を頭頸部細胞株でノックダウンを施行し、癌細胞増殖性の抑制と m6A の減少を認めた。これらの結果は、頭頸部発癌における m6A の重要性を示すものである。今後の展開として、治療後の腫瘍モニタリング、リキッドバイオプシーへの応用などが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Misawa K, Misawa Y, Imai A, Mochizuki D, Endo S, Mima M, Ishikawa R, Yamatodani T, Kawasaki H and Kanazawa T	4. 巻 9(6)
2. 論文標題 Epigenetic modification of SALL1 as a novel prognostic factor of early T1 and T2 patients with head and neck cancer. Epigenetic modification of SALL1 as a novel prognostic factor of early T1 and T2 patients with head and neck cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 941-949
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7150/jca.23527	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Misawa K, Mochizuki D, Imai A, Mima M, Misawa Y and Mineta H	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Site-specific epigenetic analysis of the tumor-related genes in head and neck cancer: potential utility as biomarkers for prognosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 E27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers10010027.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Misawa K, Mima M, Imai A, Mochizuki D, Misawa Y, Endo S, Ishikawa R, Kanazawa T and Mineta H	4. 巻 10
2. 論文標題 The neuropeptide genes SST, TAC1, HCRT, NPY, and GAL are powerful epigenetic biomarkers in head and neck cancer: A site-specific analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Epigenetics	6. 最初と最後の頁 52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13148-018-0485-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Misawa Kiyoshi, Mochizuki Daiki, Imai Atsushi, Mima Masato, Misawa Yuki, Mineta Hiroyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Analysis of Site-Specific Methylation of Tumor-Related Genes in Head and Neck Cancer: Potential Utility as Biomarkers for Prognosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 27~27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers10010027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Misawa Kiyoshi, Imai Atsushi, Mochizuki Daiki, Misawa Yuki, Endo Shiori, Hosokawa Seiji, Ishikawa Ryuji, Mima Masato, Shinmura Kazuya, Kanazawa Takeharu, Mineta Hiroyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Genes encoding neuropeptide receptors are epigenetic markers in patients with head and neck cancer: a site-specific analysis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 76318-76328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.19356	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Misawa Yuki, Misawa Kiyoshi, Kawasaki Hideya, Imai Atsushi, Mochizuki Daiki, Ishikawa Ryuji, Endo Shiori, Mima Masato, Kanazawa Takeharu, Iwashita Toshihide, Mineta Hiroyuki	4. 巻 39
2. 論文標題 Evaluation of epigenetic inactivation of vascular endothelial growth factor receptors in head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Tumor Biology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1010428317711657	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Daiki Mochizuki, Kiyoshi Misawa, Atsushi Imai, Takeharu Kanazawa, Hiroyuki Mineta
2. 発表標題 "Genes encoding neuropeptide receptors are epigenetic markers in patients with head and neck cancer: a site-specific analysis "
3. 学会等名 109rd AACR Annual Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----