

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08566

研究課題名（和文）胃癌腹膜播種進展におけるRNA後天的修飾の意義

研究課題名（英文）Significance of RNA editing for development of peritoneal metastasis of gastric cancer

研究代表者

沖上 正人 (Okigami, Masato)

三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト

研究者番号：90722596

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：A-to-I RNA editingが高頻度に発生する遺伝子として報告されるAZIN1を、今回胃癌組織でそのRNA editing ratioを定量し、臨床病理学的特徴、生存再発予後に関して検証した。結果として胃癌組織においてはAZIN1 RNA editing ratioは有意に高値であり ($p < 0.001$)、AZIN1 hyper-editing群は生存予後不良であり、多変量解析ではAZIN1 hyper-editingは生存予後不良、再発、同時性リンパ節転移に関する独立したリスク因子として抽出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、AZIN1においてだがそのRNA editing levelが胃癌の有用なバイオマーカーとなる可能性が示唆された。RNA editingにおいてはAZIN1以外の遺伝子にもeditingが起こり、それが胃癌腹膜播種において重要なkey playerとなる可能性が示唆され、次世代シーケンスを用いたdiscovery、ならびに当講座で厳重に保管管理しているサンプルを用いてバイオマーカーとしての意義を検証し、さらには胃癌細胞株やマウスモデルでその胃癌進展/播種転移における機序解明の研究を今後も継続していく予定であり、本研究成果はその試金石として重要な役割を果たしていると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We evaluated AZIN1 RNA editing levels in GC tissues using a RNA editing site-specific quantitative polymerase chain reaction assays. We also analyzed the clinical significance of these results as disease biomarkers in GC patients. As a result, AZIN1 RNA editing levels were significantly elevated in GC tissues. Furthermore, hyper-edited AZIN1 emerged as an independent prognostic factor for OS and DFS in GC patients.

研究分野：上部消化管悪性腫瘍

キーワード：胃癌 腹膜播種 RNA修飾

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胃癌は、本邦や中国、韓国などの東アジアや南米に患者が多い疾患であり、近年検診や胃内視鏡などの普及もあり、死者数は年々減少傾向にあるものの、2018年度の本邦における胃癌の死者数は44,192人(男28,843人、女15,349人)で、肺癌、大腸癌に次いで第3位と依然、死亡者数の多い疾患である(厚生労働省 人口動態統計より)。

中でも腹膜播種は胃癌の転移再発形式として最も高頻度で、病勢増悪にて腹水貯留、癌性腹膜炎に伴う消化管閉塞や水腎症を発症し全身状態を著しく悪化させる。近年の画像診断の発達も著しいが、高度進行胃癌の腹膜播種や術後腹膜播種再発を正確に診断するには難渋することが多く、審査腹腔鏡も必要に応じて導入されているが麻酔を含めた侵襲など改善すべき点も多い。近年進行胃癌全体に対する全身化学療法が発達してきたが、薬剤の腹膜移行性が不良であることから胃癌腹膜播種に対する標準的治療と呼べる治療法は存在していないのが現状である。

従って腹膜播種診断と治療は胃癌治療の中でも非常に重要な位置を占め、腹膜播種診断目的の新たなバイオマーカーの確立ならびに播種転移機序解明からの新規治療法開発の確立が急がれる現状である。

2. 研究の目的

RNA editing は転写された RNA において、特定の塩基が他の塩基に置換されたり、塩基挿入/欠失が起こる後天的修飾であり、RNA editing はタンパク質変質による機能変化や発現調節に関わると考えられている。近年相次いで、癌組織特異的な RNA editing 起こり、その変化が蛋白変容をきたし、癌進展に関わる新たな機序である可能性が示唆された(Nat Med2013, Gut2014)。さらに RNA editing は翻訳蛋白の機能変化のみならず、非翻訳 RNA 領域(non coding RNA)においても、その発現調節や標的遺伝子の変容機序に深く関わる事が明らかになりつつあるもの、消化器癌進展の過程における RNA editing の役割や RNA editing の Biomarker としての可能性は十分に検証されていない現状である。

本研究では同時性腹膜播種を認めた原発巣ならびに同一患者の播種巣、腹膜播種を認めなかったほぼ同一深達度の原発巣、そして健常粘膜の4群間のシーケンスをおこなう事で、腹膜播種症例で著明な異常プロファイリングとなる RNA editing sites の同定を行う。さらに原発組織、播種組織と同一患者の血清を利用して、腫瘍組織と血清をともにシーケンスする事で、胃癌分泌血清 biomarker を同定する事を目的とする。本研究において治療への応用を考慮した腹膜播種進展機序解明を行う点は、学術的にも意義深いものであり、胃癌腹膜播種根絶への試金石ともなりうる治療戦略につながる可能性があり、臨床的償却に直結した研究が遂行できるものと期待している。

3. 研究の方法

(1)胃癌腹膜播種関連 RNA editing site の検索

胃癌患者で同時性腹膜播種(PM)を認めた症例(PM+)の原発巣との播種巣、ほぼ同一深達度で腹膜播種を認めなかった患者(PM-)の原発巣、健常粘膜の計4群の組織から genomic DNA/total RNA を抽出。whole genome sequence と next generation sequence で得た生データを比較解析し胃癌腹膜播種特異的な RNA editing site(hyper-editing/hypo-editing)を同定する。

(2)候補 editing site の少数サンプルでの検証

・(2-) : PM+例の原発巣 VS PM-例の原発巣 VS 健常粘膜間で editing ratio に著明な差のある editing site を生物統計学的手法で narrow down して絞り込む。

・(2-) : PM+例の原発巣 VS PM+例の播種巣、特に播種巣で高 editing ratio となる editing site を同定する。

・(2-)と(2-)で同定された editing site を少数サンプルで RESS-PCR(ddPCR)法もしくは pyrosequence 法で editing ratio の定量をおこない群間の差を統計学的に解析する。

(3)候補 editing site の多数サンプルでの検証

前述の(2-)と(2-)で同定された候補 editing site に関して、多数サンプルで RESS-PCR 法もしくは pyrosequence 法で editing ratio の定量をおこないデータ解析する。特に(2-)に関してはあらかじめ予後が判明しているサンプルを用い、候補 editing site の editing level が臨床病理学的、異時性再発の有無、予後と相関を認めるか否かも解析する。

(4)候補 editing site の血液、腹水サンプルでの検証

(2)(3)で同定された候補 editing site の中で特に hyper-editing level なものは、胃癌 PM+症例の血清や、さらには術中腹水でも hyper-editing level となるか否かを検証する。

(5)候補 editing site の In Vitro での機能解析

前述の候補 editing sequence の plasmid vector を作成し胃癌細胞株に lipofectamine2000 で transfection させて候補 editing site を hyper-editing level とし、各種 In vitro assay で癌進展に関する機能変化を解析する。

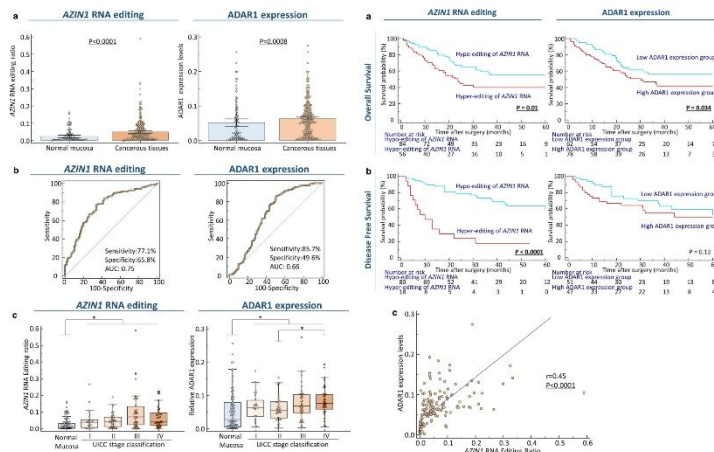
(6)候補 editing site の In Vivo での機能解析

(5)で有用な結果が出た胃癌細胞株を用いて、ヌードマウスに腹腔内投与し腹膜播種形成能の変化を評価する。

4. 研究成果

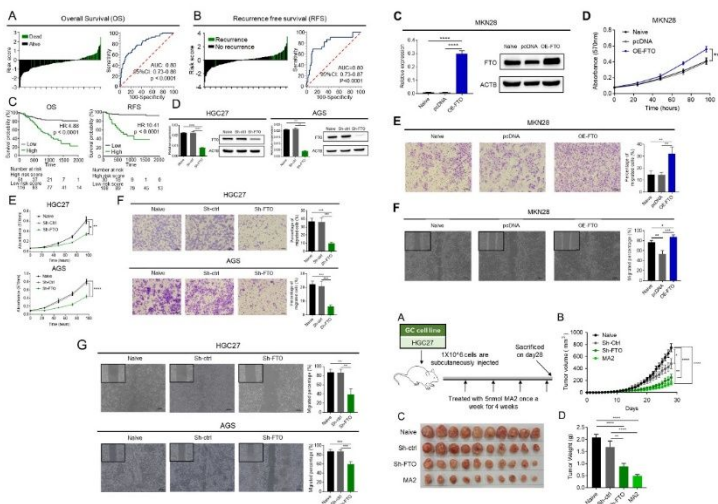
前述に示した計画のもと、Adenosine-to-inosine (A-to-I) RNA editing が高頻度に発生する遺伝子として AZIN1 が他の癌種で報告されている事もあり、今回胃癌組織を用いて AZIN1 の RNA editing ratio、ならびに A-to-I RNA editing を誘発する分子である adenosine deaminases acting on RNA1 (ADAR1) 発現値と臨床病理学的特徴、生存再発予後に関して検証する事とした。RNA editing level の定量には RNA editing site-specific quantitative polymerase chain reaction assays を用いる事とした。結果として胃癌組織においては AZIN1 RNA editing ratio と ADAR1 発現がそれぞれ有意に高値であり ($p < 0.001$)、両者には正の相関関係が見られた。AZIN1 hyper-editing 群、ADAR1 高値群は有意に生存予後不良であり、多変量解析では AZIN1 hyper-editing は生存予後不良、再発、同時性リンパ節転移に関する独立したリスク因子として抽出された。結論として AZIN1 においてだがその RNA editing level が胃癌において有用なバイオマーカーとなる可能性が示唆された(下図: Okugawa Y, Toyama Y, Ohi M, et al. J Transl Med 2018 Dec 18;16(1):366)。

胃癌におけるAZIN1 RNA editingレベルとADAR1発現のバイオマーカーとしての臨床的意義



また本研究に随伴しての研究だが、近年転写された RNA に起きる後天的修飾の一種である m6A RNA メチル化においても癌進展/転移に重要な役割を示す事が報告されており、胃癌において m6A メチル化に関与する分子 (writer, eraser, reader) のバイオマーカーとしての可能性、癌進展における機序を検証した。結果として m6A 脱メチル化に関与する FTO は高発現例では予後不良で腹膜播種陽性例と関与し、FTO の stable knockdown/overexpression はレンチウイルスベクターを用いておこない in-vitro、in-vivo で機能解析し、FTO が癌進展において重要な役割を果たす分子であることを証明した。また FTO が上皮間葉移行に関与する可能性を証明したが、FTO が脱メチル化する標的の下流分子に関しては今後更に検証中である (下図 Shimura T, Okugawa Y, Ohi M, Toyama Y, et al. under review)。

胃癌におけるm6A RNAメチル化関連分子のバイオマーカーとしての意義、癌進展/転移の機序の解明



研究成果として示した通り、A-to-I RNA editing や他の形態の RNA 修飾は胃癌進展において重要な役割を果たしている事が示唆され、RNA editing においては AZIN1 以外にも editing が起こり癌進展の key player となる分子をさらに探求していく必要がある。次世代シーケンスを用いた discovery、ならびに当講座で厳重に保管管理しているサンプルを用いてバイオマーカーとしての意義を検証し、さらには胃癌細胞株やマウスモデルでその胃癌進展/播種転移における機序解明の研究を今後も継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okugawa Yoshinaga, Toiyama Yuji, Shigeyasu Kunitoshi, Yamamoto Akira, Shigemori Tsunehiko, Yin Chengzeng, Ichikawa Takashi, Yasuda Hiromi, Fujikawa Hiroyuki, Yoshiyama Shigeyuki, Hiro Junichiro, Ohi Masaki, Araki Toshimitsu, Kusunoki Masato, Goel Ajay	4. 巻 16
2. 論文標題 Enhanced AZIN1 RNA editing and overexpression of its regulatory enzyme ADAR1 are important prognostic biomarkers in gastric cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12967-018-1740-z	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
1. 著者名 Ichikawa Takashi, Okugawa Yoshinaga, Toiyama Yuji, Tanaka Koji, Yin Chengzeng, Kitajima Takahito, Kondo Satoru, Shimura Tadanobu, Ohi Masaki, Araki Toshimitsu, Kusunoki Masato	4. 巻 121
2. 論文標題 Clinical significance and biological role of L1 cell adhesion molecule in gastric cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1058 ~ 1068
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-019-0646-8	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 -
1. 著者名 Shimura Tadanobu, Toden Shusuke, Kandimalla Raju, Toiyama Yuji, Okugawa Yoshinaga, Kanda Mitsuro, Baba Hideo, Koderu Yasuhiro, Kusunoki Masato, Goel Ajay	4. 巻 -
2. 論文標題 Genomewide Expression Profiling Identifies a Novel miRNA-Based Signature for the Detection of Peritoneal Metastasis in Patients With Gastric Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Surgery	6. 最初と最後の頁 1 ~ 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SLA.0000000000003647	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
1. 著者名 Takeda S, Shigeyasu K, Okugawa Y, Yoshida K, Mori Y, Yano S, Noma K, Umeda Y, Kondo Y, Kishimoto H, Teraiishi 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 Lett.	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

1. 著者名 Shigeyasu Kunitoshi, Okugawa Yoshinaga, Toden Shusuke, Miyoshi Jinsei, Toiyama Yuji, Nagasaka Takeshi, Takahashi Naoki, Kusunoki Masato, Takayama Tetsuji, Yamada Yasuhide, Fujiwara Toshiyoshi, Chen Leilei, Goel Ajay	4. 巻 3
2. 論文標題 AZIN1 RNA editing confers cancer stemness and enhances oncogenic potential in colorectal cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e99976
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.99976	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 奥川喜永、問山裕二、井出正造、北嶋貴仁、志村匡信、廣 純一郎、田中光司、楠 正人
2. 発表標題 胃癌におけるL1CAM発現解析の臨床的意義とその癌進展における機能
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術集会、京都
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 志村匡信、Raju Kandimalla、問山裕二、奥川 喜永、楠 正人、Ajay Goel
2. 発表標題 RNAメチル化制御遺伝子の胃癌患者における予後マーカーとしての意義ならびに機能解析
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術集会、京都
4. 発表年 2019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
研究分担者	問山 裕二 (Toiyama Yuji) (00422824)	三重大学・医学系研究科・教授 (14101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	奥川 喜永 (Okugawa Yoshinaga) (30555545)	三重大学・医学部附属病院・講師 (14101)	
研究分担者	安田 裕美 (Yasuda Hiromi) (60586767)	三重大学・医学部附属病院・助教 (14101)	
研究分担者	吉山 繁幸 (Yoshiyama Shigeyuki) (60444436)	三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト (14101)	
研究分担者	大井 正貴 (Ohi Masaki) (40418752)	三重大学・医学部附属病院・准教授 (14101)	
研究分担者	楠 正人 (Kusunoki Masato) (50192026)	三重大学・医学系研究科・寄附講座大学教員 (14101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関