

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07698

研究課題名(和文) RNAのメチル化修飾がスキルス胃がんの転移で果たす機能の解明

研究課題名(英文) Analysis of RNA methylation in metastasis of human scirrhous gastric cancer

研究代表者

原 敏文 (Hara, Toshifumi)

愛知学院大学・薬学部・講師

研究者番号：80456219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：スキルス胃がんは、高頻度に転移を起こす患者予後の極めて悪い癌である。本研究では、RNAのメチル基転移酵素METTL3が、スキルス胃がんの転移で果たす役割について解析を行った。まず、METTL3の発現を変動させた細胞株を樹立し、細胞機能を解析した結果、METTL3が癌転移で重要な役割を果たすことを明らかにした。次に、抗m6A抗体を用いたRNAの免疫沈降物を次世代シーケンサーにより解析し、癌転移選択的なm6A修飾を同定した。また、遺伝子選択的なm6A修飾の制御するためツールを作製した。本研究は、METTL3を介したm6A修飾がスキルス胃がんの腹膜転移で重要な機能を果たすことを提起している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の癌治療において、癌転移を標的とする治療薬は開発されていない。その原因の一つは、癌転移の分子機構が未だ解明されていないことにある。本研究では、ヒトスキルス胃がんの腹膜転移細胞モデルを用いた解析により、これまで癌の転移で機能の知られていない数多くのRNAメチル化修飾が同定された。今後、RNAメチル化修飾が果たす役割の解明が進むことにより、癌転移の分子機構の一端を明らかにできる可能性を秘めている。加えて、本研究の成果は、RNAのメチル化修飾が癌転移を予測するための転移予測マーカーをして利用できることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：The patient prognosis of human scirrhous gastric cancers (SGCs) is very poor, mainly owing to the high frequency of peritoneal dissemination. In this study, we analyzed the functions of RNA methyltransferase METTL3 in the metastasis of SGCs. First, we generated the METTL3-knockdown cells in the metastatic model of SGCs. By the analysis of these cell lines, we found that METTL3 has a pivotal role in the cancer metastasis of SGCs. Next, we performed a comprehensive analysis of m6A modification on RNA by the Next Generation DNA Sequencer (NGS). As a result, we identified metastasis-specific m6A modifications in SGCs. Further, we generated a novel tool for gene-specific RNA demethylation based on CRISPR/Cas13b. Our findings indicate that METTL3-mediated m6A has an important role in SGCs metastasis and would be a key for understanding the molecular mechanisms of SGCs metastasis.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：癌転移 RNA修飾

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、日本人の2人に1人が癌に罹患し、また3人に1人が癌を原因として亡くなっている。癌による死の90%は、癌の転移が原因である。しかし、癌転移の分子機構については未だ不明な点が多く、癌転移に特異的な分子機構を標的とした癌治療は確立されていない。癌転移の分子機構の解析が困難な要因は、以下の2点である。(1) 癌転移は、生体内において癌細胞とそれを取り巻く様々な細胞が複雑に相互作用をする過程を経る現象であること。(2) 癌転移の研究が、これまで限定された細胞株や臨床を反映しない実験モデルのみで行われ、原発巣から転移するまでの過程で起こる癌細胞内の変化を捉える実験系が確立されていなかったこと。つまり、癌転移を研究するための良い実験モデルが確立されていなかったことが原因である。これら問題を解決するために、申請者らは癌臨床を踏まえた転移実験モデルを構築し、癌転移の分子機構の解明を目指している。

我々研究グループは、スキルス胃癌(びまん性胃癌)の腹膜転移に注目して研究を進めている。スキルス胃癌は、胃の粘膜下に進行し、リンパ節や肝臓、腹膜への転移を高頻度起こすため、転移を起した患者の5年生存率は10%程度と予後不良の癌である。

スキルス胃癌の腹膜転移の分子機構を明らかにするため、申請者らはスキルス胃癌患者由来の親細胞株(HSC-44PE、HSC-58)を樹立し、これら細胞株をヌードマウスの胃に同所性移植することを繰り返した結果、腹膜転移を好発する高転移亜株(44As3、58As9)を独自に単離した。これら細胞株を用いた解析から、miR-516a-3pが腹膜転移能の獲得に伴って発現低下し、高転移亜株でその発現を回復させると細胞の転移能が低下することをこれまでに明らかにしている。また、miR-516a-3pの*in vivo*における投与システムを確立し、癌転移の治療可能性を示した(Takei Y et al, *Cancer Res* 2011, Takei Y, Hara T et al, *Pathobiology* 2018)。さらに、申請者らは癌転移の実験モデルを解析する過程で、新たにRNAのメチル基転移酵素のサブユニットMETTL3が、複数の高転移亜株で高発現していることを新たに見出した。

METTL3は、METTL14と複合体を形成し、RNAのアデノシンをメチル化することにより、N<sup>6</sup>-メチルアデノシン(m<sup>6</sup>A)を生成する。m<sup>6</sup>Aは、細胞内で最も豊富なRNAの転写後修飾であり、RNAの安定性や結合タンパク質との相互作用などに変化を起こすことで、様々な細胞機能に関与することが報告されている(Liu et al. *Nature* 2015)。さらに近年、m<sup>6</sup>A修飾の異常は神経疾患の発症や白血病細胞の増殖に関与するなど、様々な病態の発症に影響を及ぼすことが明らかとなった(Barbieri et al. *Nature* 2017, Hoob et al. *Nature* 2017)。そのため、我々が見出した高転移亜株におけるMETTL3の発現亢進は、高転移亜株においてRNAのm<sup>6</sup>A修飾が豊富に存在し、転移能に関連することを示唆する。

様々な癌に対するゲノムDNAやRNAの解析は、国際プロジェクトにより進展する一方、タンパク質の解析は解析技術の標準化などの問題も抱えているため、遅れている。また、癌の転移においてはサンプル量の確保に限界があり、タンパク質解析は困難を極めている。そこで、RNA発現からタンパク質機能への橋渡し役となるm<sup>6</sup>A修飾の重要性が解明できれば、分子生物学のセントラルドグマの支持基盤として、新たな視点から生命現象を捉えることが可能になると考えられる。

そこで本研究は、腹膜転移におけるm<sup>6</sup>A修飾の生物学的意義の解明を目指す。遺伝子機能の上流マスター因子として注目されるm<sup>6</sup>A修飾の機能解明は、癌転移の分子機構の解明だけでなく、m<sup>6</sup>A修飾を標的とした癌転移の治療応用性、さらには基礎から高次までの生命現象を解き明かす鍵となることが期待される。

### 2. 研究の目的

本研究は、申請者らが確立した癌転移の実験モデルを用いて、RNAのm<sup>6</sup>A修飾がスキルス胃癌の転移で果たす役割の解明を目的とする。つまり、癌転移特異的なm<sup>6</sup>A修飾をつける遺伝子を同定し、癌転移特異的なm<sup>6</sup>A修飾を標的とする新しい癌治療への応用性を見据えた独自の研究戦略の確立を目指す。本目的を達成するため、遺伝子特異的なm<sup>6</sup>A変動ツールを作成し、その効果を検証する。具体的には、以下の3つを研究の目的とした。(1) 癌転移実験モデルでm<sup>6</sup>A量を変動させて、細胞機能を調べることにより、癌転移におけるm<sup>6</sup>Aの重要性を明らかにする。(2) 癌転移選択的なm<sup>6</sup>A修飾を網羅的に同定する。(3) 遺伝子選択的なm<sup>6</sup>A修飾を制御する研究ツールを開発する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 材料

スキルス胃癌の患者より樹立された親細胞株(HSC-44PE、HSC-58)、およびこれら親細胞株をそれぞれヌードマウスの胃に同所性移植を繰り返したことにより樹立された高転移能を有する44As3および58As9からなるスキルス胃癌の転移細胞モデルを本研究に用いた。

#### (2) METTL3のノックダウン(KD)およびノックアウト(KO)細胞の樹立

スキルス胃がんの 44As3 および 58As9 に対し、METTL3 の mRNA 配列を標的とした 2 つの short-hairpin RNA (shRNA) および、METTL3 のゲノム DNA を標的とした guide RNA (gRNA) を設計し、リポフェクションにより細胞内へ遺伝子導入した。gRNA の場合、Cas9 タンパク質を同時に細胞内へ導入した。shRNA の導入から 72 時間後から、培地にピューロマイシンを添加し、細胞を 2 週間培養することにより、遺伝子導入された細胞の生存選択を行った。gRNA と Cas9 を導入した細胞は、1 週間後に限界希釈法により、細胞のクローニングを行った。その後、各クローンからゲノム DNA を単離し、METTL3 領域を PCR により増幅後、DNA 配列をシーケンズ解析することにより、ゲノム欠損細胞を選択した。

### (3) 遺伝子発現解析

タンパク質の発現レベルを解析するため、細胞内で発現するタンパク質を RIPA バッファーで抽出し、SDS-PAGE で電気泳動後に PVDF メンブレンへ転写した。その後、標的タンパク質に対する抗体を用いたウェスタンブロットング法により解析した。

RNA 発現レベルを解析するため、細胞内 RNA を ISOGEN (ニッポンジーン社) により抽出後、iScript Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad 社) を用いて、単鎖 cDNA を合成した。その後、Fast SYBR Green Master Mix と遺伝子増幅プライマーを用いて、qPCR を行った。リファレンス遺伝子には SDHA を用いて、 $\Delta\Delta CT$  法により対象遺伝子発現の解析を行った。

### (4) 網羅的 m<sup>6</sup>A 修飾解析

細胞内で m<sup>6</sup>A 修飾される RNA を網羅的に明らかにするため、まず抗 m<sup>6</sup>A 抗体を用いた RNA 免疫沈降 (RNA-IP) を行った。細胞内 RNA を ISOGEN により抽出後、PolyATtract mRNA Isolation System を用いて、mRNA の単離を行った。その後、RNA Fragmentation Reagents (ThermoFisher Scientific 社) を用いて、RNA の均一な断片化を行った。断片化された mRNA に対して、抗 m<sup>6</sup>A 抗体を用いた免疫沈降を行うことにより、m<sup>6</sup>A 修飾された mRNA のみを選択精製した。免疫沈降前の断片化された mRNA は、インプットコントロールとして用いた。これらサンプルを基に、次世代シーケンズ (NGS) 用ライブラリを調製した。調整したライブラリを NGS により解析し、解析結果は一般的なプロセス後に MACS2 でピークコールすることにより、m<sup>6</sup>A 修飾部位を特定した。

### (5) 細胞機能アッセイ

細胞の増殖能は、96 穴プレートに細胞を播種した後、24 時間、48 時間、そして 72 時間後に Cell Counting Kit-8 (Dojindo 社) を用いて増殖レベルを比色法により測定し、解析を行った。

細胞の遊走能は、創傷治癒アッセイを行った。まず、24 穴プレートにカルチャーインサートを設置し、インサート内に細胞を播種した。24 時間後にインサートを取り除くことにより創出された、細胞間隔の面積を経時的に撮影し、測定することにより、細胞の遊走能を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) METTL3 のノックダウン (KD) およびノックアウト (KO) 細胞の樹立

スキルス胃がんの転移細胞モデルにおいて、親細胞株の HSC-44PE および HSC-58 に比べ、転移細胞株 44As3 および 58As9 は、METTL3 のタンパク質レベルの増加を示した。そこで、スキルス胃がんの転移における METTL3 の機能を明らかにするため、転移細胞株 44As3 および 58As9 を用いて、METTL3 の KD 細胞 (METTL3-KD) および KO 細胞 (METTL3-KO) の樹立を行った。qPCR 法およびウェスタンブロットング法により、44As3 および 58As9 の METTL3-KD#1 および #2 細胞で METTL3 遺伝子が発現抑制されていることが明らかとなった。一方で、METTL3-KO 細胞は、ゲノム編集後に行った細胞のクローニング後に、両アリルの欠損を示す細胞が樹立されず、片アリルの欠損を示した細胞でも、METTL3 の発現が完全に消失しなかった。このことは、METTL3 の発現が転移細胞株の生存に必須であり、METTL3 の完全消失は細胞死が誘導されることが示唆された。そこで、本研究の実験では、44As3 および 58As9 で、それぞれ樹立された 2 種の METTL3 の KD 細胞を用いて行うこととした。

### (2) METTL3-KD 細胞の機能解析

抗 m<sup>6</sup>A 抗体を用いたブロットング法により m<sup>6</sup>A レベルを解析したところ、転移細胞株 44As3 の METTL3-KD 細胞では、細胞内 RNA の有意な m<sup>6</sup>A レベルの低下が示された。そのため、スキルス胃がんの転移細胞株で m<sup>6</sup>A の生成において METTL3 は主要な役割を果たしていることが示唆された。そこで、METTL3-KD 細胞の細胞機能を調べるため、細胞増殖能の変化を調べたが、有意な増殖能の変化は認められなかった。次に、METTL3-KD 細胞の遊走能の変化を調べるため、創傷治癒アッセイを行った。その結果、METTL3-KD 細胞はコントロールの細胞に比べ、顕著な細胞遊走能の低下を示した。そのため、METTL3 を介した m<sup>6</sup>A の制御が細胞の遊走や転移で重要な働きを担うことが示唆された。

### (3) 網羅的解析による癌転移選択的な m<sup>6</sup>A 修飾の同定

細胞内で m<sup>6</sup>A 修飾される RNA の全貌を明らかにするため、m<sup>6</sup>A 修飾部位を標的とした免疫

沈降サンプルを次世代シーケンサーにより解析した。親細胞株と転移細胞株を用いた解析を行った結果、HSC-44PE では 9638 箇所、44As3 では 9839 箇所の免疫沈降物のピークを得た。そのうち、8677 箇所は細胞株に共通しており、1162 箇所が 44As3 選択的なピークであった。また、HSC-58 では 9735 箇所、58As9 では 9794 箇所のピークを示し、8381 箇所のピークは細胞株に共通し、1413 箇所が 58As9 選択的なピークであった。加えて、143 箇所のピークが転移細胞株の 44As3 および 58As9 で共通していることが明らかとなった。一方で、親細胞株および転移細胞株によらず、全ての細胞株で 7050 箇所のピークが共通していた。

加えて、44As3細胞においてMETTL3-KD細胞との比較により、240箇所のピークがMETTL3の発現に関連することが明らかとなった。また同様に、58As9細胞では、34箇所のピークがMETTL3の発現と関連することが明らかとなった。これらピークのうち、6箇所のピークが細胞間で共通していたが、いずれの遺伝子もこれまで細胞の癌化や転移能に関わることが報告されていなかった。

### (3) 遺伝子選択的な m<sup>6</sup>A 修飾の制御を目的とした研究ツールの開発

癌転移における個々の m<sup>6</sup>A 修飾の役割を明らかにするため、遺伝子選択的な m<sup>6</sup>A 修飾の制御するための研究ツールの作成を行った。まず RNA 選択的、かつ遺伝子特異的に結合する因子について検討を行い、CRISPR/Cas システムの利用を検討した。汎用の CRISPR/Cas9 は、DNA および RNA に対して結合活性が認められることから、より選択的に RNA に結合する CRISPR/Cas システムを検討した。その結果、本研究では *Prevotella* sp. P5-125 (PspCas13b) から構成される CRISPR/PspCas13b システムを採用した。また、RNA を脱メチル化するための酵素として、ALKBH5 および FTO について検討を行った。その結果、FTO はスキルス胃がんの転移細胞モデルにおいて、ほとんど発現が認められないのに対し、ALKBH5 は一定の発現が認められることが明らかとなった。そこで、本研究では ALKBH5 を m<sup>6</sup>A の脱メチル化酵素として用いた。具体的には、不活化型 PspCas13b(dPspCas13b)にリンカー配列を介して、m<sup>6</sup>A の脱メチル化酵素 ALKBH5 を融合させたプラスミドベクターを作製した。作製したベクターを細胞に導入した後、細胞からタンパク質を回収し、ウェスタンブロッティングを行ったところ、融合タンパク質として予想される分子量付近に抗 ALKBH5 抗体で認識される特異的バンドが検出された。そのため、遺伝子選択的な m<sup>6</sup>A 修飾の制御を目的とした研究ツールの開発が完了したと考えられた。

本研究は、METTL3 を介した m<sup>6</sup>A 修飾がスキルス胃癌細胞の転移能に関与することを示し、転移選択的な m<sup>6</sup>A 修飾が腹膜転移で重要な役割を果たしていることを示唆した。そのため、m<sup>6</sup>A 修飾は、スキルス胃がんの転移マーカーとしての有効性が期待される。今後、本研究で開発した遺伝子選択的な m<sup>6</sup>A 修飾制御ツールを用いた解析を行うことにより、癌転移に直結する m<sup>6</sup>A 修飾の解明が期待され、癌転移の全貌解明に貢献する可能性がある。

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 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Toshifumi Hara, Yuri Nomura, Masaaki Hattori, Keichiro Mihara, Kazuyoshi Yanagihara, Yoshifumi Takei	4. 巻 4
2. 論文標題 Elevated expression of CELSR1 is associated with peritoneal metastasis in human scirrhus gastric cancers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 103-111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpbreports.4.4_103	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 Toshifumi Hara, Yuuki Tominaga, Koji Ueda, Keichiro Mihara, Kazuyoshi Yanagihara, Yoshifumi Takei	4. 巻 30
2. 論文標題 Elevated METTL9 is associated with peritoneal dissemination in human scirrhus gastric cancers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2022.101255	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 Yoshifumi Takei, Toshifumi Hara, Akiko Suzuki, Keichiro Mihara, Kazuyoshi Yanagihara.	4. 巻 87
2. 論文標題 Long Noncoding RNA HOTAIR promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and is a suitable target to inhibit peritoneal dissemination in human scirrhus gastric cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathobiology	6. 最初と最後の頁 277 ~ 290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000508350	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 Mariko Mizuguchi, Toshifumi Hara, Manami Yoshita-Takahashi, Takashi Kohda, YuetsuTanaka, Masataka Nakamura.	4. 巻 26
2. 論文標題 Promoter CpG methylation inhibits Kruppel-like factor 2 (KLF2)-Mediated repression of hTERT gene expression in human T-cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100984 ~ 100984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.100984	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 Piatnitskaia S, Takahashi M, Kitaura H, Katsuragi Y, Kakihana T, Zhang L, Kakita A, Iwakura Y, Nawa H, Miura T, Ikeuchi T, Hara T, Fujii M	4. 巻 9
2. 論文標題 USP10 is a critical factor for Tau-positive stress granule formation in neuronal cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10591
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-47033-7.	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6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 野村祐里、原敏文、森田あや美、武井佳史
2. 発表標題 スキルス胃癌の腹膜転移で発現増加するCELSR1の役割
3. 学会等名 第67回日本薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田あや美、岩砂浩樹、原敏文、武井佳史
2. 発表標題 Galectin 4 の発現変化とスキルス胃癌の腹膜転移能の関係
3. 学会等名 第67回日本薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toshifumi Hara, Kazuyoshi Yanagihara, Yoshifumi Takei
2. 発表標題 The importance of methyltransferase like (METTL) genes on metastatic property in human scirrhus gastric cancer
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toshifumi Hara, Kazuyoshi Yanagihara, Yoshifumi Takei
2. 発表標題 A novel signature gene associated with peritoneal dissemination of human scirrhus gastric cancer
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原敏文、柳原五吉、武井佳史
2. 発表標題 Analysis of CELSR1 functions in peritoneal metastasis
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 弥礼、丸山 奈緒美、原 敏文、森田 あや美、武井 佳史
2. 発表標題 スキルス胃癌の腹膜転移におけるMRC2 (CD280) の役割
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022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	武井 佳史  (Takei Yoshifumi)  (70362233)	愛知学院大学・薬学部・教授    (33902)	

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
---------	---------