

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09169

研究課題名(和文)大腸癌・潰瘍性大腸炎関連癌における後天的RNA修飾マーカーの有用性

研究課題名(英文)Clinical significance of RNA editing marker in patients with CRC and UC-CRC

研究代表者

奥川 喜永 (Okugawa, Yoshinaga)

三重大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：30555545

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)：大腸癌組織特異的に部位特異的なRNA hyper-editingを呈し、また増殖能や浸潤能・遊走能に関与する可能性が示唆された。また線維芽細胞とがん細胞の相互関係の中で、RNA editing調節に伴うがん進展を誘導する機序が考慮された。一方、潰瘍性大腸炎関連癌との相関では、今回測定したRNA editing部位はepigenetic clockを反映せず、今後の検討が必要であった。本研究に付随して、部位特異的なメチル化レベルを、非癌部直腸粘膜を用いて測定することで、潰瘍性大腸炎関連癌発症症例を精度が高く(AUC:0.84)同定可能である可能性が考慮された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、RNA後天的修飾の新たな大腸癌発癌・癌進展における機序が解明され、またエピゲノム機序を利生することで、あらたな潰瘍性大腸炎関連癌早期診断マーカー開発の一助となる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Our study showed that RNA editing was occurred tissue-specific pattern in colorectal cancer (CRC), and series of in vitro analysis revealed that RNA editing was deeply involved in disease development in CRC. In addition, intimate correlation between cancer cells and fibroblast cells via mechanism of RNA editing for CRC development in cancer microenvironments also clarified. In contrast, identified RNA editing sites did not correlated with aging factors in ulcerative colitis (UC) or UC-associated CRC, and further studies are need. Accompanied with this study, we successfully identified novel CpG site in DNA methylation level to detect patients with UC-CRC with high accuracy (AUC:0.84) via assessment of non-cancerous rectal mucosa.

研究分野：エピゲノム

キーワード：潰瘍性大腸炎 大腸癌 メチル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国における大腸癌患者数は年々増加しており、厚生労働省の人口動態調査では、その死亡数は男女合わせて 2009 年は 42,434 人で、悪性新生物の中では肺癌、胃癌に次いで 3 番目に多く、女性では最も死亡数が多い。大腸癌死亡数の減少やその治療に関わる医療費の削減のためには、早期診断・早期治療することが極めて重要となる。大腸癌早期診断には便潜血反応検査の有用性が証明されているが、全国の大腸癌検診率は 20%前後と低い状態が続いており、癌遺伝子診断(便中 DNA 変異、methylation)や内視鏡を絡めた検診システムが考案されつつあるが、総合的な評価で便潜血反応を凌駕するものは確立されておらず、より精度の高い非侵襲的検査法確立が急がれる。

潰瘍性大腸炎(ulcerative colitis: UC)は本邦約 10 万人で年間約 4 千人が発病し、患者数は増加している。内科的治療の進歩により、劇症例、内科的治療抵抗例は減少傾向である。しかし慢性長期経過例では炎症を母地とした大腸癌を合併し、その累積癌化率は 30 年で 30-40%ともされ、長期経過例に対してはサーベイランスが重要となる。本邦における UC 診療ガイドラインにおいても、発症 8-10 年経過後は年 1 回以上の全大腸内視鏡検査下の random-step biopsy あるいは拡大内視鏡を併用した有所見部位の target biopsy によるサーベイランスが推奨されている。しかし UC 関連大腸癌の特徴として、多発癌・低分化型でびまん性病変を呈し、背景粘膜に炎症を伴うため、内視鏡での肉眼的発見が困難なことも多く、低侵襲で精度の高い早期診断マーカーを確立することが重要となる。

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への置換・挿入・欠失が起こる RNA レベルの後天的修飾であり、タンパク質変質による機能変化や発現調節に関わるとされている。近年、相次いで RNA editing が癌組織特異的に起こり、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 Med.2013;19:209-16, Gut.2014;63:832-43)。さらに RNA editing による miRNA などの Non-coding RNA の発現調節や標的遺伝子の変容機序が近年明らかとなりつつあるが、消化器癌進展の過程における RNA editing の役割や RNA editing の Biomarker としての可能性は未だ報告されていない。すでに我々は、大腸癌組織と正常粘膜における Gene X の RNA editing 解析を行っており、結果、adenoma-carcinoma sequence の早期段階から RNA editing level に変化が起こり、さらに RNA editing level そのものが大腸癌組織診断マーカー、ならびに予後マーカーとなりうることを確認している。この結果から RNA レベルの後天的修飾が大腸癌発癌過程ならびに癌進展プロセスに関与している可能性が考慮される。さらに、慢性炎症に伴う酸化ストレスが RNA editing を誘導するという背景もふまえると(PNAS 2010,107:4028-33)、潰瘍性大腸炎癌化過程においても RNA editing が重要な役割を果たしているとする仮説が想起される。

RNA editing の癌化における機序が近年、解明されつつあり、RNA editing は翻訳蛋白の機能変化のみならず、非翻訳 RNA 領域においても、その発現変容に深く関わることが明らかとなってきている。孤発性大腸癌ならびに潰瘍性大腸炎発癌過程において、Epigenetic 変化は Genetic 変化より早期の段階で変化を認めることが指摘されており、早期診断または癌化リスク診断に優れている可能性が考慮される。今回、大腸癌ならびに UC 関連大腸癌における様々な抽出標本や臨床検体を用いることで、がん組織を用いた診断・予後予測マーカーの開発や、大腸粘膜を用いた Field cancerization/Epigenetic drift の概念を用いたハイリスク診断マーカーの確立、さらには RNA editing そのものの癌進展における機序解明を行うことによるあらたな治療法の開発をめざす Multi-endpoint approach を行う。これは学術的にも意義深く、あらたな治療戦略につながる可能性があり、早期患者から転移性大腸癌患者まで幅広い患者層への臨床的償却に直結した研究を遂行することを目標とする。

3. 研究の方法

・RNA 抽出(組織)、cDNA 化

大腸癌組織 300 例の原発腫瘍、近傍正常大腸粘膜より採取した RNA later 保存凍結標本と潰瘍性大腸炎関連癌ならびに潰瘍性大腸炎にて手術加療を行った組織検体 70 例から RNA を RNeasy RNA extraction kit(Qiagen)を利用して抽出し、cDNA を Advantage RT PCR-kit (Clontech Laboratories Inc., Mountain View, CA, USA)を使用して合成した。

・定量的 PCR

大腸組織より抽出した cDNA を用い、RNA editing の定量解析は、RNA editing site-specific quantitative PCR (RESSq-PCR)を用いて定量化を施行した。また RNA editing 酵素である ADAR1, ADAR2 発現解析は qPCR を用いて行い、normalizer は GAPDH を使用した。

・In vitro 解析(細胞株を用いて)

大腸癌細胞株を使用し、候補 RNA editing の野生型と RNA edited 型のプラスミドを作成し、pLenti6/V5-TOPO@vector を用いて、細胞株に導入することにより、候補 RNA editing の野生

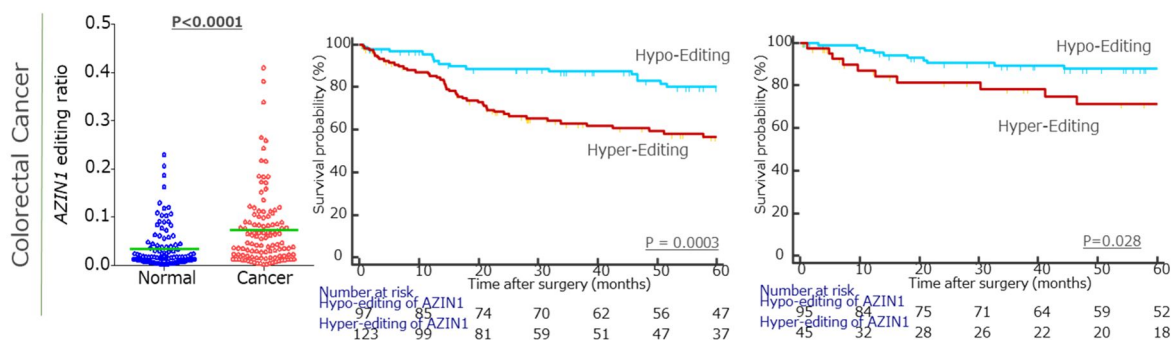
型と RNA edited 型の大腸癌細胞株を作成した。またヒト線維芽細胞株(WI38)にも同様に候補 RNA editing の野生型と RNA edited 型細胞株を樹立した。それらの細胞株を用いて MTT assay、Invasion assay、migration assay などをおこない、RNA editing 調節による phenotype の変化を評価した。

・ In vitro 解析 (細胞株上清を用いて)

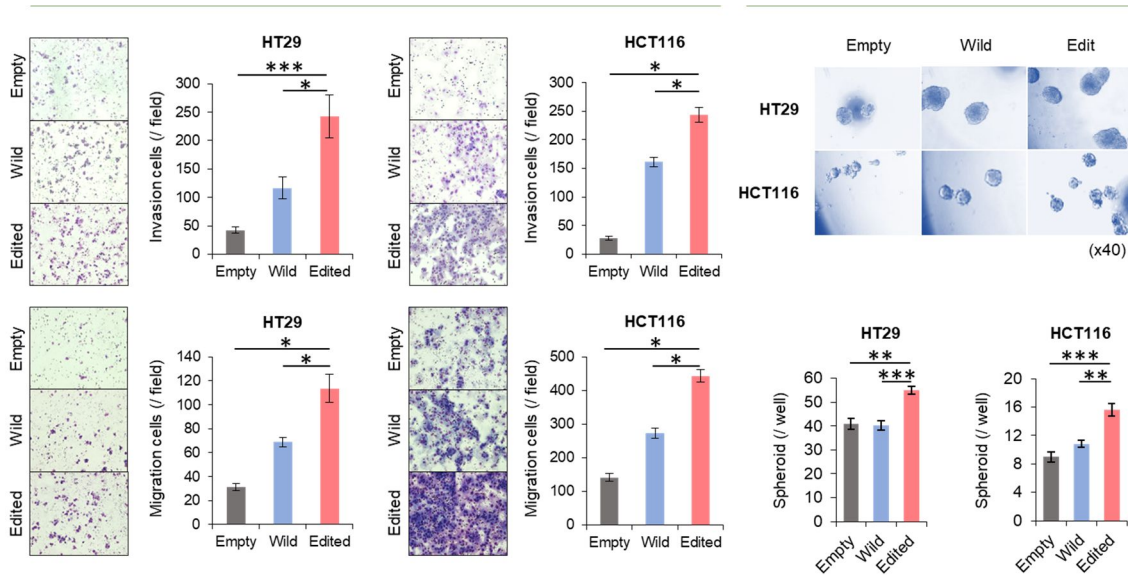
大腸癌細胞株から培養上清を採取し、ヒト線維芽細胞株(WI38)に添加することによる、ADAR1 発現変化と候補 RNA editing レベルの推移を上記 RESS-PCR と qPCR を用いて評価した。

4. 研究成果

まず大腸癌進展にかかわる可能性のある RNA editing 部位を同定するために RESS-PCR にて定量解析を行ったところ、本解析に伴い、AZIN1 RNA editing が同定され、AZIN1 RNA hyper-editing は癌組織特異的に起こり、また AZIN1 RNA hyper-editing 群は、全生存期間・無再発生存期間にて、有意に予後不良となることを確認した(下図)。またこの AZIN1 RNA editing が大腸がん細胞に与える表現型への影響を考慮するために、

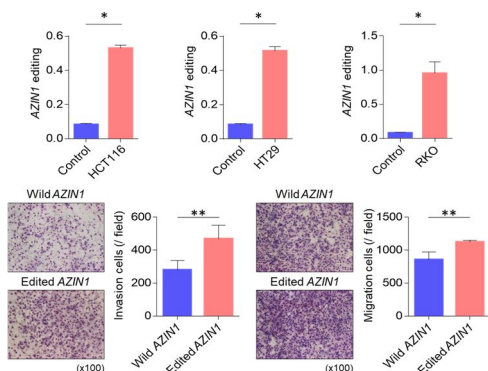


AZIN1 RNA editing の野生型大腸癌細胞株と RNA edited 型の大腸癌細胞株を作成し、増殖能や浸潤能、さらには sphere formation assay を施行すると、AZIN1 RNA edited 細胞株は野生型株と比較し、増殖能や遊走能・浸潤能、sphere 形成能も亢進していたことから(下図)、AZIN1 editing は大腸癌進展に深くかわり、治療標的ともなりうる可能性を考慮した。



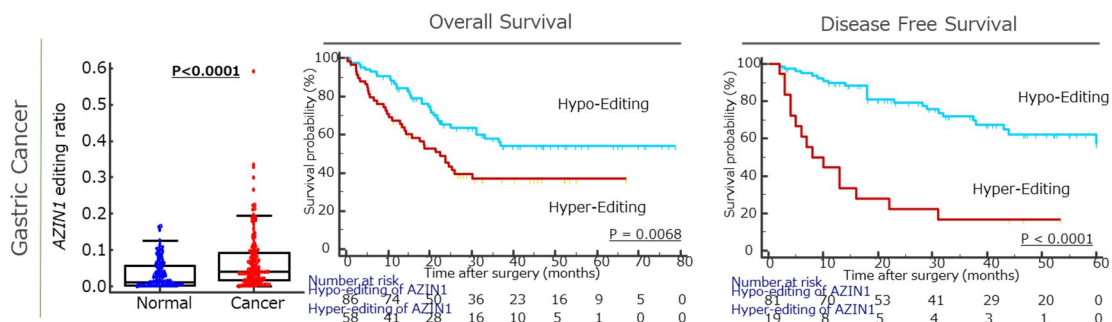
また上記実験に付随し、がん細胞とがん周囲組織との相互関係に目を広げて実験を遂行した。

大腸癌細胞株 (HCT-116, HT29, RKO) から抽出した培養上清を、ヒト線維芽細胞に添加すると、ヒト線維芽細胞における ADAR1 発現が上昇し、また AZIN1 RNA editing レベルも上昇することが明らかとなり、がん周囲線維芽細胞で RNA 修飾を介した癌進展の機序が存在する可能性が考慮された。このことを証明するために、ヒト線維芽細胞株 (WI38) に、候補 RNA editing の野生型と RNA edited 型のプラスミドを、pLenti6/V5-TOPO@vector を用

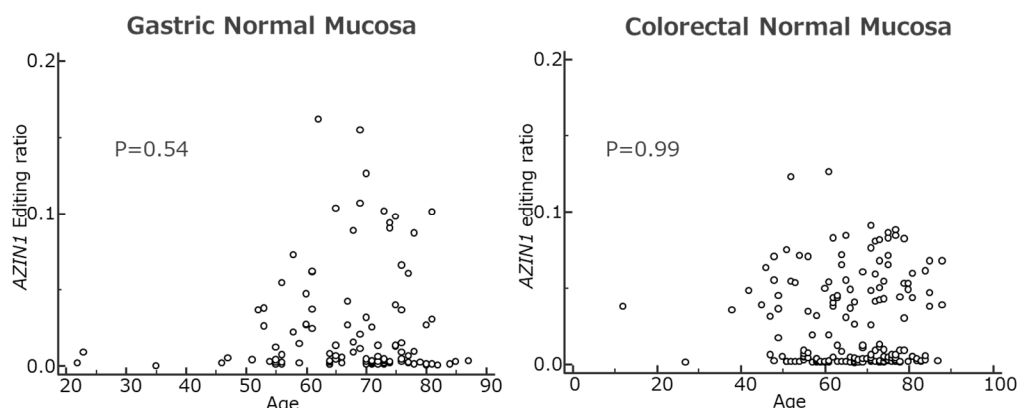


いて、導入し、AZIN1 RNA editing の野生型線維芽細胞株と RNA edited 型線維芽細胞株を樹立した。そのうえで、浸潤と遊走能を行うと、それらを亢進することから、がん進展に与えるあらたな機序となる可能性が考慮された。

また本研究に付随し、胃癌においても AZIN1 RNA editing の臨床的意義を明らかにするために同様の解析を進めたところ、大腸癌と同様に胃癌においても、AZIN1 RNA hyper-editing は癌組織特異的に起こり、また AZIN1 RNA hyper-editing 群は、全生存期間・無再発生存期間にて、有意に予後不良となることを確認した（下図）。また潰瘍性大腸炎関連癌早期診断マーカーへの転用を考慮し、実験をすすめた。まず先行研究の

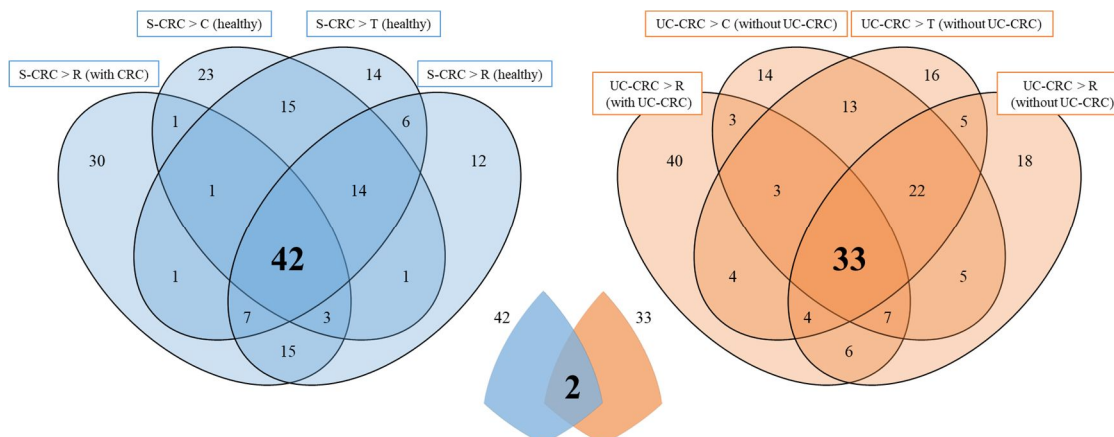


DNA メチル化と同様に、炎症蓄積の評価には aging の要素と深くかかわることから、RNA editing level が aging と相関する変化であるかどうかを明らかにするために、大腸癌ならびに胃癌組織における健常正常粘膜における AZIN1 RNA editing レベルと、手術時年齢との相関解析を行った。しかし、年齢との相関をみとめず（下図）、AZIN1 RNA editing は epigenetic clock を評価しうるマーカーとしては向いていない可能性が考慮された。実際、潰瘍性大腸炎検体を用



いた解析においても同様に有意な結果は得られず、その他の RNA editing 部位を再度評価する必要性が考慮された。

また本研究に付随し、再度 DNA メチル化にも目を向け、DNA メチル化網羅的解析を大腸癌と潰瘍性大腸炎関連癌組織を用いて行った結果、ニカ所の CpG サイトが、大腸癌ならびに潰瘍性大腸炎関連癌組織特異的に高メチル化を呈する部位であることを同定した。これらの CpG サイトの DNA メチル化を非癌部直腸粘膜組織を用いて定量化することで AUC 0.84 (sensitivity:0.83, specificity:0.72)で担癌症例を同定できる可能性が考慮され、研究を継続中である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8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 Mori Koichiro, Toiyama Yuji, Okugawa Yoshinaga, Ichikawa Takashi, Nagano Yuka, Oki Satoshi, Shimura Tadanobu, Fujikawa Hiroyuki, Hiro Junichiro, Kobayash Minako, Araki Toshimitsu, Inoue Yasuhiro, Mohri Yasuhiko, Kusunoki Masato | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 Preoperative heat shock protein 47 levels identify colorectal cancer patients with lymph node metastasis and poor prognosis | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Oncology Letters | 6. 最初と最後の頁 333-333 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2020.12196 | 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 Okita Yoshiki, Koi Minoru, Takeda Koki, Ross Ryan, Mukherjee Bhramar, Koepp Erika, Stoffel Elena M., Galanko Joseph A., McCoy Amber N., Keku Temitope O., Okugawa Yoshinaga, Kitajima Takahito, Toiyama Yuji, Martens Eric, Carethers John M. | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Fusobacterium nucleatum infection correlates with two types of microsatellite alterations in colorectal cancer and triggers DNA damage | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Gut Pathogens | 6. 最初と最後の頁 46-46 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13099-020-00384-3 | 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 Okugawa Yoshinaga, Toiyama Yuji, Yamamoto Akira, et al | 4. 巻 272 |
| 2. 論文標題 Lymphocyte-C-reactive Protein Ratio as Promising New Marker for Predicting Surgical and Oncological Outcomes in Colorectal Cancer | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Annals of Surgery | 6. 最初と最後の頁 342 ~ 351 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SLA.0000000000003239 | 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 Omura Yusuke, Toiyama Yuji, Okugawa Yoshinaga, Yin Chengzeng, Shigemori Tsunehiko, Kusunoki Kurando, Kusunoki Yukina, Ide Shozo, Shimura Tadanobu, Fujikawa Hiroyuki, Yasuda Hiromi, Hiro Junichiro, Ohi Masaki, Kusunoki Masato | 4. 巻 69 |
| 2. 論文標題 Prognostic impacts of tumoral expression and serum levels of PD-L1 and CTLA-4 in colorectal cancer patients | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy | 6. 最初と最後の頁 2533 ~ 2546 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-020-02645-1 | 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 Omura Yusuke, Toiyama Yuji, Okugawa Yoshinaga, Yamamoto Akira, Yin Chengzeng, Kusunoki Kurando, Kusunoki Yukina, Shigemori Tsunehiko, Ide Shozo, Kitajima Takahito, Fujikawa Hiroyuki, Yasuda Hiromi, Hiro Junichiro, Yoshiyama Shigeyuki, Ohi Masaki, Kusunoki Masato | 4. 巻 27 |
| 2. 論文標題 Crohn's-Like Lymphoid Reaction is Associated with Oncological Prognosis and Nutritional Status in Patients with Pathological Stage II/III Gastric Cancer | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology | 6. 最初と最後の頁 259 ~ 267 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-019-07709-w | 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 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 Pichler Martin, Rodriguez-Aguayo Cristian, Nam Su Youn, Dragomir Mihnea Paul, Bayraktar Recep, Anfossi Simone, Knutsen Erik, Ivan Cristina, Fuentes-Mattei Enrique, Lee Sang Kil, Ling Hui, Catela Ivkovic Tina, Huang Guoliang, Huang Li, Okugawa Yoshinaga | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Therapeutic potential of FLANC, a novel primate-specific long non-coding RNA in colorectal cancer | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Gut | 6. 最初と最後の頁 2019-318903 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/gutjnl-2019-318903 | 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 Shimura Tadanobu, Toden Shusuke, Kandimalla Raju, Toiyama Yuji, Okugawa Yoshinaga, Kanda Mitsuro, Baba Hideo, Kodera 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 Okugawa Yoshinaga, Toyama Yuji, Yamamoto Akira, Shigemori Tsunehiko, Ichikawa Takashi, Yin Chengzeng, Suzuki Akihiro, Fujikawa Hiroyuki, Yasuda Hiromi, Hiro Junichiro, Yoshiyama Shigeyuki, Ohi Masaki, Araki Toshimitsu, McMillan Donald C., Kusunoki Masato | 4. 巻 39 |
| 2. 論文標題 Lymphocyte-to-C-reactive protein ratio and score are clinically feasible nutrition-inflammation markers of outcome in patients with gastric cancer | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Clinical Nutrition | 6. 最初と最後の頁 1209 ~ 1217 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clnu.2019.05.009 | 査読の有無 無 |
| 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 - |

〔学会発表〕 計5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、藤川裕之、廣 純一郎、三澤雅子、手島信子、岩下義明、荒木俊光、三木誓雄、楠 正人 |
| 2. 発表標題 腫瘍宿主相互作用の観点に基づいた 転移組織分泌型miR-203による腫瘍誘導宿主サルコペニアの可能性の検討 |
| 3. 学会等名 第34回日本静脈経腸栄養学会学術集会、東京 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 問山裕二、山本 晃、奥川喜永、楠 蔵人、楠 由希奈、大村悠介、市川 崇、井出正造、志村匡信、北嶋貴仁、藤川裕之、安田裕美、大北喜基、横江 毅、廣 純一郎、大井正貴、荒木俊光、内田恵一、楠 正人 |
| 2. 発表標題 網羅的メチル化解析から抽出したOPLAHメチル化異常の潰瘍性大腸炎における臨床的意義 |
| 3. 学会等名 第74回日本大腸肛門病学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 問山裕二、山本 晃、奥川喜永、楠 蔵人、大村悠介、藤川裕之、大北喜基、廣 純一郎、大井正貴、内田恵一、楠 正人 |
| 2. 発表標題 網羅的DNAメチル化解析から抽出した潰瘍性大腸炎合併大腸癌診断マーカー |
| 3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会、東京 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 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 奥川喜永、問山裕二、山本 晃、大村悠介、浦谷 亮、井出正造、近藤 哲、志村匡信、安田裕美、藤川裕之、大北喜基、白井由美子、横江 毅、三枝 晋、廣 純一郎、大井正貴、荒木俊光、田中光司、三木誓雄、楠 正人 |
| 2. 発表標題 臨床実装を視野に入れた大腸癌外科診療におけるあらたなmultiple-outcome prediction biomarkerの確立 |
| 3. 学会等名 第74回日本大腸肛門病学会学術集会、東京 |
| 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) | |
| 研究分担者 | 大北 喜基 (Okita Yoshiki) (20378342) | 三重大学・医学部附属病院・講師 (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) | |

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 | 荒木 俊光 (Araki Toshimitsu) (70343217) | 三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト (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 |
|---------|---------|
| | |