

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09004

研究課題名(和文) RNAメチル化を介した胃癌腹膜播種進展の機序解明

研究課題名(英文) Elucidation for mechanism of peritoneal metastasis via RNA methylation in gastric cancer

研究代表者

田中 光司 (Tanaka, Koji)

三重大学・医学系研究科・客員教授

研究者番号：10345986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：m6a-RNAメチル化制御遺伝子発現のうちFTO-mRNA高発現は複数の臨床病理学的因子の悪性度と相関し、FTO-mRNA高発現群は低発現群と比べて有意に生存/再発予後不良であった。FTO-shRNAを用いたFTO-stable knockdownの効率は非常に良くSh-FTO群では、胃癌細胞の増殖能/浸潤能が顕著に低下していた。マウス実験でもFTO stable knockdownをおこなったxenograft tumorの増殖は著明に抑制されていた。またFTO stable knockdownによってEMT関連遺伝子のvimentinが著明減少していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNAメチル化の癌進展における機能的機序解明が世界的一流誌に相次いで報告されているhot-topicであり、総じて腫瘍特異的に生じたRNAメチル化が特定の遺伝子の発現調整や蛋白変容を起こし、癌進展に関わるとされている一方で胃癌含めた消化管癌におけるRNAメチル化による癌進展のプロセスに関する分子生物学的機序、RNAメチル化自体のバイオマーカーとしての有用性は未解明な部分が多いのが今後探求すべき課題である。

研究成果の概要(英文)：Patients with high FTO expression exhibited markedly worse OS. Then we observed that FTO expression was frequently upregulated in GC cell lines, with epithelial-mesenchymal-transition (EMT) features. FTO knockdown in HGC27 and AGS cells inhibited cell proliferation and migratory potential, while its overexpression in MKN28 cells resulted in enhanced proliferation and migration. Finally, confirming our in-vitro findings, FTO suppression led to significant tumor growth inhibition in a HGC27 xenograft model.

研究分野：上部消化管悪性腫瘍

キーワード：胃癌 RNAメチル化 FTO バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

胃癌は本邦含めて東アジアや南米に患者が多い疾患で、近年検診や胃内視鏡などの普及もあり、死者数は経年的に減少傾向にあるものの、2020年度の日本における胃癌の死者数は42319人(男性27771人、女性14548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。とりわけ腹膜播種は胃癌の転移再発形式として最も頻度の高く、播種進行に伴い患者の全身状態、生活の質は著明に低下する。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ことは難渋することが多く、診断能の高い審査腹腔鏡は一定の侵襲を伴い、全例への導入には障壁が高い。進行胃癌全体に対する全身薬物療法ならびに免疫チェックポイント阻害薬による治療成績は次第に向上してきているものの、薬剤の腹膜移行性の問題など、胃癌腹膜播種全体に対して標準的治療と呼べる治療法は現状では存在せず、腹膜播種の早期診断と治療介入は胃癌治療の中でも非常に重要な位置を占める事には変わりない現状である。

RNAメチル化は転写されたRNAレベルでおこる後天的修飾であり、発現遺伝子変質による機能変化や発現調節に関わるとされ、RNAメチル化の癌進展における機能的機序解明が世界的一流誌に相次いで報告されているhot-topicである。総じて、腫瘍特異的に生じたRNAメチル化が特定の遺伝子の発現調整や蛋白変容を起こし、癌進展に関わるとされている(Cancer Cell. 2017 Apr 10;31(4):474-475, Cancer Cell. 2017 May 8;31(5):619-620)。一方で胃癌含めた消化管癌におけるRNAメチル化による癌進展のプロセスに関する分子生物学的機序、RNAメチル化自体のバイオマーカーとしての有用性は未解明な部分が多いのが今後探求すべき課題である。

## 2. 研究の目的

前述の通り、新たなエピゲノム変化としてRNAメチル化の癌化/癌進展における機序が近年相次いで高名誌に報告されてきている。また癌転移形成には、癌細胞原発巣からの遊離、転移巣での接着、浸潤と生着、増殖、血管新生の各過程に多数の転移促進・抑制分子群が関与しており、癌細胞側と転移臓器側の複合的要素が関与している可能性が想定される。原発巣内の癌細胞自身の細胞接着・運動能や増殖能等以外に、原発巣進展を契機に転移臓器で生着するまで癌細胞自身がEMTからMETのようなdrasticな適応性変化を呈するにあたってRNAメチル化が関与している可能性は十分あると考える。

本研究では、同時性腹膜播種を認めた進行胃癌の原発巣と、同一患者の播種巣、腹膜播種を認めなかった進行胃癌の原発巣組織を網羅的解析し、腹膜播種関連候補RNAメチル化sitesの同定をおこなう。加えて同一進行胃癌患者の術前血液検体でも網羅的解析をおこなう事で胃癌組織分泌型血清バイオマーカーの同定・開発をおこなう事を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1)胃癌腹膜播種転移関連RNAメチル化sitesの網羅的検索(Pre-discovery phase)

・胃癌患者組織としてRNA later sampleを使用する。同時性腹膜播種を認めた進行胃癌の原発巣と(Primary for PM+:5例)、同一患者の播種巣(Matched PM:5例)、ほぼ同じ深達度で同時性腹膜播種転移を認めなかった進行胃癌症例の原発巣(Primary for PM-:5例)からRNAを抽出する。

・EZ RNA methylation kit (Zymo research)を用いて抽出したRNAをバイサルファイト処理施行。Bisulfite RNAを用いてwhole genome網羅的解析(Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS))を施行し、生データをもとにC5 methylationを来すRNAの中から様々な比較解析から胃癌腹膜播種転移関連候補RNAメチル化sites(Hyper-methylation, Hypo-methylation)を狭小化して同定する。比較解析に関する詳細を(2-1)と(2-2)に記載する。

(2-1)胃癌腹膜播種関連候補RNAメチル化sitesの同定-原発巣からのアプローチ(Discovery Phase1)

(1)で施行したRRBSの生データをもとに、Primary for PM+ VS Primary for PM-で各CpG sitesのメチル化率を比較し、Hyper-methylationとHypo-methylation sitesの二つを狭小化・同定する。

Hyper-methylation sites:メチル化率がPrimary for PM-と比べてPrimary for PM+で著明に高メチル化であるCpG sitesを同定。

Hypo-methylation sites:メチル化率がPrimary for PM+と比べてPrimary for PM-で著明に低メチル化であるCpG sitesを同定。

(2-2)胃癌腹膜播種関連候補RNAメチル化sitesの同定-原発巣 VS 播種巣からのアプローチ(Discovery Phase2)

(1)で施行したRRBSの生データをもとに、Primary for PM+ VS Matched PMで各CpG sitesのメチル化率を比較し、Hyper-methylationとHypo-methylation sitesの二つを狭小化・同定する。

Hyper-methylation sites:メチル化率がPrimary for PM+と比べてMatched PMで著明に高メチル化であるCpG sitesを同定。

Hypo-methylation sites:メチル化率がMatched PMと比べてPrimary for PM+で著明に低メチル化であるCpG sitesを同定。

(3-1)(2-1)で同定した胃癌腹膜播種関連候補RNAメチル化sitesの検証-原発巣からのアプローチ(Validation Phase1)

当科での胃癌切除症例(予後情報あり)約200例のRNA later sampleから抽出したtotal RNAを使用しバイサルファイト処理を施行、(2-1)で同定されたHyper-methylation sitesとHypo-

methylation sites のメチル化率を pyrosequencer もしくは qMSP で測定し、その臨床病理学的因子、同時性腹膜播種の有無/異時性腹膜播種再発の有無、予後との相関を解析し、予後並びに腹膜播種との有意な相関を認める腹膜播種関与候補 RNA メチル化 sites の更なる狭小化をおこなう。

(3-2)(2-2)で同定した胃癌腹膜播種関与候補 RNA メチル化 sites の検証-原発巣 VS 播種巣からのアプローチ(Validation Phase2)

当科で原発巣切除した Primary for PM+サンプルならびに Matched PM サンプル約 25 例から抽出した total RNA を使用しバイサルファイト処理を施行、(2-2)で同定された Hyper-methylation sites と Hypo-methylation sites のメチル化率を pyrosequencer もしくは qMSP で測定し、(2-2)同様のメチル化率の相違パターンを示すか再現性を確認し、Primary for PM+ VS Matched PM でメチル化率が著明に異なる腹膜播種関与候補 RNA メチル化 sites の更なる狭小化をおこなう。

(4)腹膜播種関与候補 RNA メチル化 sites(Hyper-methylation sites)のバイオマーカーとしての精度検証

・(4-a)(1)で使用した PM+症例 5 例の術前血清と胃癌 stage 5 例の術前血清で RRBS を施行。

(2-1)または(2-2)で同定した Hyper-methylation sites のメチル化率に注目する。

・(4-b)さらには上記の(3-1)で使用した胃癌患者約 200 例の術前血清を使用し、(4-a)で狭小化した Hyper-methylation sites のメチル化率を ddPCR を用いた qMSP で測定し、臨床病理学的因子や、同時性腹膜播種の有無/異時性腹膜播種再発の有無、予後との相関を解析する。術前血清で精度の高い結果が得られた場合術中腹水を使用して同様のプロセスで精度検証をおこなう。

(5-1)RNA メチル化調節遺伝子発現の腹膜播種進展における臨床的意義(原発巣からのアプローチ。Back up plan)

(3-1)で使用したコホートと同一コホート(当科での胃癌切除症例約 200 例)から抽出した RNA より合成した cDNA を用いて RNA メチル化調節遺伝子として著明な METTL3, FTO, ALKBH5 などの発現を測定。それらの胃癌腹膜播種進展にかかわる臨床的意義や予後予測能を解析する。また(3)で測定した RNA メチル化レベルとの相関解析を行う。左記によって予後並びに腹膜播種との有意な相関を認め、かつ RNA メチル化とも相関を認める腹膜播種関与 RNA メチル化調節遺伝子を同定する。

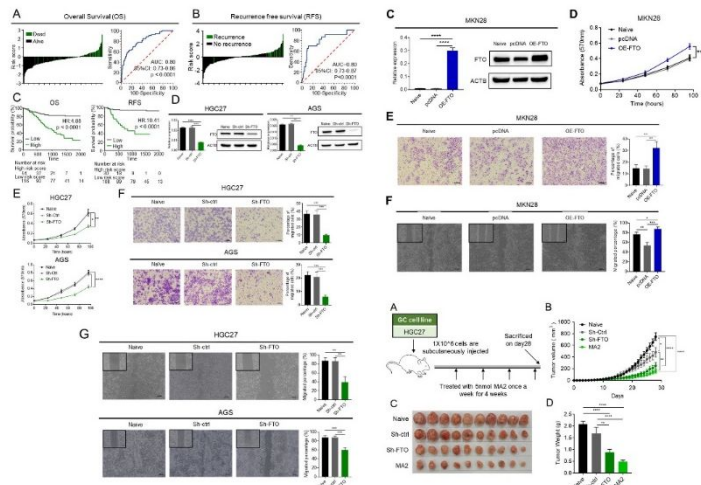
(5-2)RNA メチル化調節遺伝子発現の腹膜播種進展における臨床的意義(原発巣 VS 播種巣からのアプローチ。Back up plan)

(3-2)で使用した Primary for PM+サンプルならびに Matched PM サンプル約 25 例から抽出した RNA より合成した cDNA を用いて(5-1)同様に METTL3, FTO, ALKBH5 などの発現を測定し原発巣 VS 播種巣で発現差を認めるかを検証する。

#### 4. 研究成果

研究期間中に 3. 研究の方法で記載した行程を進め得るか、まず(1)として、Primary for PM+:3 例、Matched PM:3 例、Primary for PM- : 3 例から RNA を抽出し、EZ RNA methylation kit (Zymo research)を用いて RNA のバイサルファイト化をおこない外注委託した。生データの解析も外注でおこなったが、上記のキットでは通常は DNA を使用するため、本研究計画で使用した RNA では試薬の使用量などの modification が十分で無かったのか、technical error が影響しているのか、群間平均 メチル値  $\pm 0.2$  以上/未滿、かつ  $P < 0.05$  など比較的ラフな条件で設定すれど、群間でメチル化率に著明な相違を有する CpG sites は同定できなかった。条件の modification など今後改訂を加えるべき状態であり、前述の(2)-(4)へ進む事は断念した。

一方で Back up として考案した(5)を施行する事とした。FTO, METTL3, ALKBH5 など m6a-RNA メチル化制御遺伝子発現と同時に腹膜播種有無との相関こそ見出せ無かったが、FTO は mRNA レベルでの高発現は臨床病理学的な複数の因子の悪性度と相関し、FTO-mRNA 高発現群は低発現群と比べて有意に全生存予後ならびに無再発生存予後が不良であるという興味深い結果が得られたため、複数の胃癌細胞株を用いて FTO-shRNA を用いて FTO-stable knockdown をおこなう事とした。FTO の knockdown 効率は非常に良く stable knockdown をおこなった結果、胃癌細胞の増殖能/浸潤能が顕著に低下する事が regular in-vitro assay で証明でき、さらに FTO transient



overexpression によって胃癌細胞の増殖能/浸潤能が増高する裏付けができ、マウス実験に進んだ。マウス実験でも FTO stable knockdown をおこなった xenograft tumor の増殖は著明に抑制されていた。細胞実験で再検証すると FTO stable knockdown によって epithelial mesenchymal transition (EMT) 関連遺伝子の vimentin が著明減少している事が証明できた。研究成果を論文投稿し、無事に Br J Cancer.2022 Feb;126(2):228-237 として掲載に至った(左図)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shimura Tadanobu, Kandimalla Raju, Okugawa Yoshinaga, Ohi Masaki, Toiyama Yuji, He Chuan, Goel Ajay	4. 巻 126
2. 論文標題 Novel evidence for m6A methylation regulators as prognostic biomarkers and FTO as a potential therapeutic target in gastric cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 228 ~ 237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-021-01581-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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大井正貴、市川崇、北嶋貴仁、安田裕美、横江毅、志村匡信、今岡裕基、藤川裕之、奥川喜永、大北喜基、問山裕二
2. 発表標題 腹腔鏡下胃切除術後の脾関連合併症のリスク因子がロボット支援下胃切除術にきたす影響
3. 学会等名 第93回日本胃癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大井正貴、山本晃、市川崇、大村悠介、今岡裕基、志村匡信、北嶋貴仁、川村幹雄、安田裕美、横江毅、藤川裕之、奥川喜永、森本雄貴、大北喜基、問山裕二
2. 発表標題 胃癌に対するロボット支援下胃切除と腹腔鏡下胃切除術の短期成績の比較検討
3. 学会等名 第29回日本消化器関連学会週間
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大井正貴、山本晃、山下真司、川村幹雄、安田裕美、北嶋貴仁、志村匡信、今岡裕基、藤川裕之、森本雄貴、大北喜基、辻浦誠浩、横江毅、問山裕二
2. 発表標題 上部胃癌に対するロボット支援下食道残胃吻合の工夫
3. 学会等名 第34回日本内視鏡外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 志村匡信、問山裕二、奥川喜永、今岡裕基、安田裕美、横江 毅、廣 純一郎、大井正貴、Ajay Goel、楠 正人
2. 発表標題 胃癌患者における16種類のm6A RNA修飾制御因子発現と予後への意義
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奥川喜永、問山裕二、井出正造、志村匡信、北嶋貴仁
2. 発表標題 胃癌におけるRNAメチル化酵素METTL3発現の臨床的意義
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 Tadanobu Shimura, Raju Kandimalla, Yoshinaga Okugawa, Takahito Kitajima, Akira Yamamoto, Hiroki Imaoka, Mikio Kawamura, Yuhki Koike, Yuhki Morimoto, Yoshiki Okita, Takeshi Yokoe, Masaki Ohi, Yuji Toiyama, and Ajay Goel
2. 発表標題 Novel findings for m6A methylation regulators as prognostic biomarkers and FTO as a potential therapeutic target in gastric cancer
3. 学会等名 第30回日本消化器関連学会週間(JDDW2022FUKUOKA)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 志村匡信, Ma Ruiya, Yin Chengzeng, 奥川喜永, 北嶋貴仁, 山本晃, 森本雄貴, 安田裕美, 大北喜基, 横江毅, 大井正貴, 問山裕二
2. 発表標題 Andrographisの胃癌での抗腫瘍効果とHMOX1,GCLC,GCLM発現増強に関する検証
3. 学会等名 第94回日本胃癌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 志村匡信、北嶋 貴仁、横江 毅、奥川喜永、問山裕二
2. 発表標題 胃癌細胞株におけるAndrographisのフェロトーシス関連遺伝子発現変化を介した抗腫瘍効果の検証
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
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	問山 裕二 (Toiyama Yuji) (00422824)	三重大学・大学院医学系研究科・教授  (14101)	
研究分担者	奥川 喜永 (Okugawa Yoshinaga) (30555545)	三重大学・医学部附属病院・教授  (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
---------	---------