

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23034

研究課題名(和文) 口腔がんにおけるm6A修飾を標的とした新規バイオマーカーと新規治療法の開発

研究課題名(英文) The investigation of m6A function in oral cancer.

研究代表者

平山 真弓(Hirayama, Mayumi)

熊本大学・病院・医員

研究者番号：40876364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：RNA修飾は、細胞の増殖や分化において重要な役割を果たしており、様々な疾患のバイオマーカーや新規治療法のターゲットなど、新しいアプローチとなることが期待されている。本研究ではmRNA転写後修飾のひとつであるN⁶-メチルアデノシン(m6A)修飾に着目し、口腔がんにおける新規バイオマーカーとしての役割を見出すことを目的に研究を行った。m6A修飾は、口腔健常組織と比較して口腔腫瘍組織で修飾レベルが有意に低いことがわかった。またFTOの発現は、腫瘍組織で高く、FTOの発現とサイクリンD1の発現に相関性を認めた。このことから、FTOの発現レベルが口腔がんのバイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

5-アザシチジンなどのDNAメチル化阻害薬やポリノスタットなどのヒストン脱アセチル化酵素阻害薬阻害剤といったエピゲノムを標的とする治療薬は国内でも承認されており、がんや生活習慣病の治療薬として応用されている。一方エピトランスクリプトームを標的とする治療薬については、未だ機序が明らかになっていないことから、バイオマーカーや新規治療薬の標的として応用できるといった報告は未だなされていない。本研究は、口腔がん組織でFTOが高発現し、サイクリンD1の発現と正の相関性があることを見出したことから、今後口腔がんにおける新規バイオマーカーとしての役割や治療標的としての応用に十分期待ができると考える。

研究成果の概要(英文)：RNA modifications play important roles in biological processes such as cell growth and differentiation. N⁶-methyladenosine (m6A) modification is one of the most prevalent modifications in messenger RNA (mRNA). Our previous study showed that m6A demethylase FTO (Fat mass and obesity related gene) regulates cyclin D1 expression level in oral cancer. In this study, we searched for the possibility of FTO or m6A for the biomarker for oral cancer. m6A modification level is lower in oral tumor tissue than adjacent healthy tissue. FTO expression level is higher in tumor tissue and it correlates to cyclin D1 expression level. From our study, we concluded that FTO and m6A level can play a biological marker for oral cancer.

研究分野：口腔がん

キーワード：口腔がん RNA修飾

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA やヒストンがメチル化やアセチル化などの化学修飾により遺伝子の発現を制御するという「エピジェネティクス」の概念に加え、近年では RNA も化学修飾を持ち、様々な細胞内プロセスに重要であることが明らかになり、「エピトランスクリプトミクス」として概念が定着しつつある。RNA の修飾は 100 種類を超えており、そのひとつの *N*⁶-メチルアデノシン (*m*⁶A) 修飾は mRNA で最も多い修飾である。申請者らは先行研究において、*m*⁶A 修飾のメチル基を除去する Fat mass and obesity-associated (FTO) が口腔がんにおいて、細胞周期を制御する重要な因子であるサイクリン D1 の mRNA の *m*⁶A 修飾状態を細胞周期に応じて変化させ、発現量をコントロールされているという、新たな見解を見出した。この発見は、口腔がんをはじめとする様々な疾患に対する新たなアプローチを可能にすると考え、臨床応用へと発展させたいと考えた。

また一部の悪性腫瘍において、「R-loop」という、新生 RNA が鋳型鎖 DNA と結合して DNA:RNA 二重鎖と一本鎖 DNA の 3 本鎖から構成される構造物が蓄積し、ゲノム不安定性を誘発していることがわかっている。近年、この R-loop 中の RNA に *m*⁶A 修飾が存在し、R-loop の形成に関与していると報告されたが、未だ不明な点が多い。R-loop 制御という *m*⁶A 修飾の新たな役割からの視点で、口腔がん と R-loop の関連性を検討することは、新たな治療手法の開拓につながると考えた。

2. 研究の目的

エピゲノムを標的とする治療薬について、5-アザシチジンなどの DNA メチル化阻害薬や、ポリノスタットなどのヒストン脱アセチル化酵素阻害薬阻害剤が国内でも承認されており、がんや生活習慣病の治療薬として応用されている。またその他の修飾酵素を標的とする治療薬も現在治験が進められている。一方、エピトランスクリプトームを標的とする治療薬については、未だ機序が明らかになっていないことから、バイオマーカーや新規治療薬の標的として応用できるといった報告は未だなされていない。したがって本研究では、がんの診断や治療において、FTO の発現量や *m*⁶A 修飾レベルをがんの性質を把握するためのバイオマーカーとして確立することを目的とした。また、口腔がんにおいて *m*⁶A 修飾と R-loop 構造の関連性について検討を行うために、まずは R-loop を検出する方法、ならびに R-loop 中の RNA 修飾の探索方法を確立することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 熊本大学病院歯科口腔外科で口腔がんに対する手術を受ける患者に対し、文書による同意を得た口腔がん患者において、手術時に摘出した腫瘍組織ならびに隣接した健常組織を採取し、RNA を抽出後、qPCR 解析による FTO やサイクリン D1 mRNA の発現量の測定を行なった。

(2) 口腔がん細胞株を用いて、R-loop の DNA:RNA ハイブリッドに特異的に結合するが 2 本鎖を消化することのできない非活性型の RNaseH1(D210N)を用いて、免疫クロマチン沈降法により R-loop を濃縮した(R-ChIP 法)。濃縮された R-loop から RNA、タンパク質を抽出し、質量分析装置で *m*⁶A 修飾レベルの測定、またウェスタンブロット解析より *m*⁶A 修飾制御酵素の検出を行った。

4. 研究成果

(1) 口腔がん患者のがん組織における FTO 発現レベル

まず、口腔がん患者の腫瘍組織と健常組織における FTO の mRNA 発現レベルを qPCR で確認したところ、健常組織と比較して腫瘍組織で FTO の発現が高いことがわかった(図 1)。

m⁶A 修飾は Methyltransferase-like 3 (METTL3)を中心とする

複合体によりメチル基が付与されるが、METTL3 の発現は腫瘍組織と健常組織で有意な発現の差が無かった。したがって、FTO の発現レベルが口腔がんのバイオマーカーとなり得ることが示唆された。

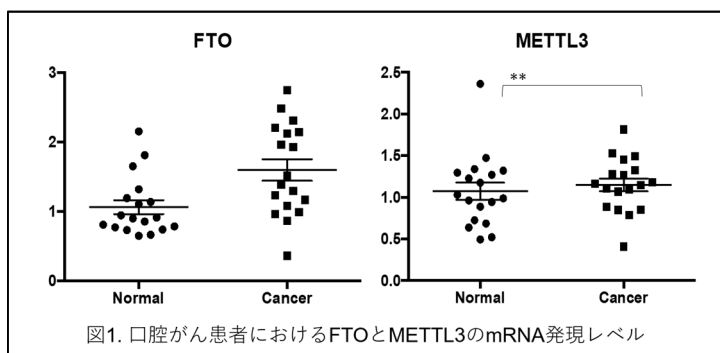


図1. 口腔がん患者におけるFTOとMETTL3のmRNA発現レベル

(2) FTO とサイクリン D1 mRNA の発現レベルの相関

次に、同一検体でサイクリン D1 の mRNA 発現レベルを測定し、FTO の発現と相関性を認めるかどうか検討した。健常組織では FTO の発現とサイクリン D1 の発現に有意な相関性を認めなかったが、腫瘍組織では相関性があることがわかった(図 2)。

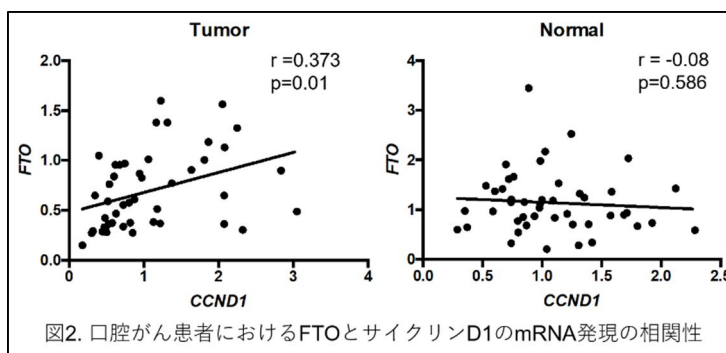


図2. 口腔がん患者におけるFTOとサイクリンD1のmRNA発現の相関性

2)。先行研究において、FTO がサイクリン D1 mRNA をターゲットとして G1 期にサイクリン D1 mRNA の m⁶A 修飾を除去することで、サイクリン D1 mRNA を安定化し、細胞増殖を上昇させることを明らかにしたが、腫瘍組織で FTO が高発現しサイクリン D1 と正の相関性にあるというこの結果は、その機序と相違ない。したがって、FTO が口腔がんのバイオマーカーになり得る可能性に加え、新規治療標的となり得ることが示唆された。

(3) R-loop における m⁶A 修飾ならびに m⁶A 修飾酵素の探索

RNaseH1 を標的とした ChIP 法で R-loop を濃縮 (R-ChIP) したところ、ウェスタンブロット法にて R-loop に既知の RNA polymerase II の存在が確認できたことから、R-loop の濃縮に成功していると考えた(図 3 左)。

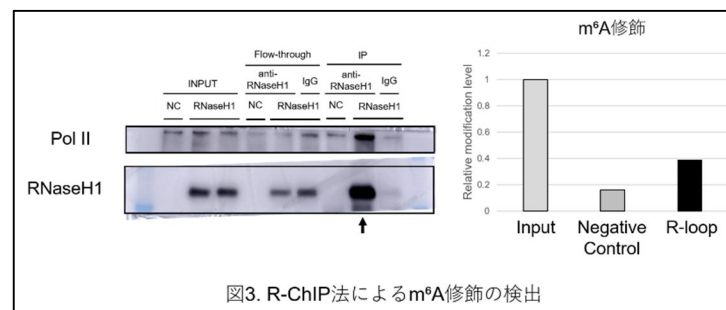


図3. R-ChIP法によるm⁶A修飾の検出

左)。R-loop 濃縮産物から RNA を精製し、質量分析装置を用いて RNA 修飾を確認したところ、m⁶A 修飾が存在することが確認できた(図 3 右)。ウェスタンブロット法で R-loop 中の m⁶A 修飾制御酵素を探索したところ、METTL3 と脱メチル化酵素 alkB homolog 5 (ALKBH5) が検出されたが、FTO は検出されなかった。これら R-loop に存在する m⁶A 修飾酵素と R-loop 形成の関係性、また腫瘍の増殖など、引き続き検討を重ねたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Yakita Maya, Chujo Takeshi, Wei Fan-Yan, Hirayama Mayumi, Kato Koji, Takahashi Nozomu, Naganuma Kenta, Nagata Masashi, Kawahara Kenta, Nakayama Hideki, Tomizawa Kazuhito	4. 巻 -
2. 論文標題 Extraceellular N6-isopentenyladenosine (i6A) addition induces co-transcriptional i6A incorporation into ribosomal RNAs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1261/rna.079176.122	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 Liu Rin, Shinriki Satoru, Maeshiro Manabu, Hirayama Mayumi, Jono Hirofumi, Yoshida Ryoji, Nakayama Hideki, Matsui Hirotaka	4. 巻 14
2. 論文標題 The Tumour Suppressor CYLD Is Required for Clathrin-Mediated Endocytosis of EGFR and Cetuximab-Induced Apoptosis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 173 ~ 173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers14010173	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 Hiroyuki Fukuda, Takeshi Chujo, Fan-Yan Wei, Sheng-Lan Shi, Mayumi Hirayama, Taku Kaitsuka, Takahiro Yamamoto, Hiroyuki Oshiumi and Kazuhito Tomizawa	4. 巻 49
2. 論文標題 Cooperative methylation of human tRNA3 Lys at positions A58 and U54 drives the early and late steps of HIV-1 replication	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 11855-11867
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkab879	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 Kawahara Kenta, Hiraki Akimitsu, Arita Hidetaka, Takeshita Hisashi, Hirotsue Akiyuki, Matsuoka Yuichiro, Sakata Junki, Obayashi Yuko, Nakashima Hikaru, Hirayama Mayumi, Nagata Masashi, Yoshida Ryoji, Shinohara Masanori, Nakayama Hideki	4. 巻 27
2. 論文標題 Role of serum amylase and salivary cytokines in oral complications during chemoradiotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 1564 ~ 1571
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/odi.13686	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平山 真弓
2. 発表標題 The role of RNA modifications in cancers
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平山 真弓
2. 発表標題 Interactions of calcium with mitochondria contribute to cisplatin resistance in oral 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 平山 真弓
2. 発表標題 Loss of DDX41 function induces splicing disability and R-loop-associated DNA damage
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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

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