

令和 5 年 5 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20805

研究課題名（和文）エピトランスクリプトミクス破綻により引き起こされた軟部肉腫の解析

研究課題名（英文）Epitranscriptomic alteration in soft tissue sarcoma

研究代表者

岩崎 健（Iwasaki, Takeshi）

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号：40766185

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：軟部平滑筋肉腫のRNA-seq、ゲノムシーケンズデータを用いた解析を行った。RNA-seqでは、RNAメチル化酵素であるMETTL3遺伝子高発現群は、低発現群と比較し、予後不良の傾向であった。遺伝子変異解析では、17%の症例でALKBH5の遺伝子増幅を認めた。腫瘍組織サンプルの免疫染色ではMETTL3、WTAP、ALKBH5高発現は、低発現と比べ有意にMitosisが多かった。PD-L1高発現がMETTL3高発現で有意に多く、YTHDF2高発現で多い傾向にあった。エピトランスクリプトーム修飾酵素の阻害とチェックポイント分子の阻害をすることは、新規治療標的となるかもしれない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟部平滑筋肉腫は、有効な治療薬が少なく予後不良の疾患である。近年、腫瘍シグナル伝達経路、免疫チェックポイント分子を標的とした治療が、短期間の無増悪生存は得られるものの、根治は困難である。近年、遺伝子発現を調整する因子として、RNAの翻訳後修飾がRNAの安定化、分解促進に寄与するエピトランスクリプトームという概念が登場した。我々は、RNAメチル化酵素の遺伝子異常を解析し、ALKBH5遺伝子増幅を見出した。免疫染色でALKBH5高発現、METTL3高発現は、低発現と比べて、有意に核分裂数が多かった。以上から、RNAメチル化酵素METTL3、ALKBH5の阻害は新規治療標的となることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We analyzed soft-tissue leiomyosarcoma using RNA-seq and genome sequencing data.

RNA-seq showed that patients with high expression of METTL3 gene, an RNA methyltransferase, tended to have a poorer prognosis than those with low expression. Gene mutation analysis showed amplification of the ALKBH5 gene in 17% of cases. Immunostaining of tumor tissue samples showed that high expression of METTL3, WTAP, and ALKBH5 was associated with significantly more Mitosis than low expression; PD-L1 expression was significantly more common in high METTL3 expression and YTHDF2 expression.

Combinate inhibition of epitranscriptome modifying enzymes and checkpoint molecules may be a novel therapeutic target.

研究分野：病理学

キーワード：軟部肉腫

## 1. 研究開始当初の背景

骨軟部腫瘍は、組織型が多彩で、正常組織における細胞分化との類似性に基づき疾患分類されるが、疾患特異的な遺伝子異常を有する肉腫は少ないため、診断困難例が多く (Iwasaki et al. CTOO. 2019)、有効な治療薬が少ない。申請者は、今日まで軟部肉腫の治療標的として癌シグナルパスウェイや免疫チェックポイント分子に着目した研究を展開し、未分化多型肉腫において、CMTM6 遺伝子のコピー数増幅により免疫チェックポイント分子 PD-L1 の発現亢進が起こることを報告した(JCRCO 2021)。一方で、平滑筋肉腫は、JAK-STAT 経路の異常発現亢進により、免疫チェックポイント分子 PD-L1, IDO1 の発現誘導が起こることを明らかにしたが、原因と考えられる特異的な遺伝子異常はなかった(JCRCO 2020)。このように、タンパク質の異常発現が遺伝子異常のみで説明できず、タンパク質発現量と mRNA 存在量が乖離することもこれらの研究過程で認められた。正常細胞は、数万種類の同一の遺伝子群(ゲノム)から、選択的に遺伝子を使い分けることで固有の機能を獲得する。遺伝子発現の調節機構には、ヒストンバリエントやヒストン修飾、クロマチンリモデリング因子によるクロマチン構造変換、転写因子の結合、さらには転写後 RNA への修飾が関与しているとされる(Barbieri et al. Nat Rev Cancer. 2020)。RNA 転写後にさまざまな化学修飾を受けることで、遺伝子発現を調節する概念はエピトランスクリプトミクスと呼ばれ近年、注目され始めている。

申請者は、骨格筋がモデルのヒストンを中心とした基礎研究にて、骨格筋分化においては、最も初期にヒストンバリエントが適切な遺伝子領域に取り込まれることが必要であり、この機構の破綻は細胞分化の異常を引き起こすことを報告した(Harada, Iwasaki et al. Nat. Commun. 2018)。次いで、骨軟部肉腫の病態をエピジェネティック・エピトランスクリプトミクスな遺伝子発現制御機構の破綻と考え研究を展開し、骨巨細胞腫と悪性骨巨細胞腫においてはヒストンH3 遺伝子異常が、診断マーカーとして応用可能であることを報告した (Human Pathol. 2018)。

## 2. 研究の目的

軟部肉腫において上述のようにタンパク質異常発現の原因となる原因遺伝子異常がないことや mRNA 発現量との乖離がある点からエピトランスクリプトミクス異常が推定される。この概念は新しく、その制御分子機構、疾患との関連性は未解明である。本研究は、軟部肉腫をエピトランスクリプトミクス制御の破綻による分解異常という観点から病態解析を行い、創薬標的の探索を目指す。

骨軟部肉腫におけるエピトランスクリプトミクスを網羅的に探索し、組織亜型ごとの分化状態を解明することは、下記の独自性がある。

i) RNA 修飾状態を明らかにすることで、mRNA 存在量の評価にとどまらず、その後のタンパク質発現に至るまでの RNA の機能についての評価が可能となる。既存の研究では、RNA の安定性や翻訳効率の影響を評価することができず、タンパク質発現量と mRNA 存在量が乖離することも多い。本研究では、この乖離を説明できる可能性が高い。 ii) 軟部肉腫増悪に関連する mRNA を不安定化、翻訳効率が低下するような RNA 修飾変化を標的とした治療法が期待できる。

## 3. 研究の方法

組織検体を用いた解析：軟部平滑筋肉腫 70 例を対象とした。

- 1) 公開 NGS データを用い、エピトランスクリプトーム制御関連分子の遺伝子異常の解析
- 2) メチル化修飾酵素を中心としたエピトランスクリプトーム関連分子のエピトランスクリプトミクス関連分子を中心に免疫染色を行う。さらに、これまでに研究した癌シグナルパスウェイや免疫チェックポイント分子の発現との関係性を探索する。
- 3) 我々が樹立した軟部平滑筋肉腫の細胞株を用いて、これらの分子を KD した際の遺伝子発現変動、増殖能を評価する。

#### 4 . 研究成果

軟部平滑筋肉腫 53 例の RNA-seq、ゲノムシーケンスデータを用いて解析を行った。

RNA-seq では、RNA メチル化酵素である METTL3 遺伝子高発現群は、低発現群と比較し、予後不良の傾向であった。

遺伝子変異解析では、17%の症例で ALKBH5 の遺伝子増幅を認めた。FTO の遺伝子増幅は 1 例で認めた。METTL3, METTL14, WTAP, ALKBH1-4 に遺伝子変異は認めなかった。

[臨床検体の解析] 免疫染色 H-score の平均値をカットオフとし、高、低発現に分類した。

METTL3、WTAP、ALKBH5 高発現は、低発現と比べ有意に Mitosis が多かった。

YTHDF2、METTL14 高発現は Mitosis が高い傾向にあるが、有意差はなかった。

PD-L1 高発現が METTL3 高発現で有意に多く( $p=0.008$ )、YTHDF2 高発現で多い傾向にあった( $p=0.080$ )。

[細胞実験] METTL3 の KD を行い、RNA およびタンパク発現の抑制を確認した。

METTL3 KD 検体の RNA-seq では、Gene ontology 解析にて発現低下した遺伝子は炎症反応に関連するターム、腫瘍シグナル伝達経路に関連するタームが得られた。

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 安部 拓也, 岩崎 健, 井手 圭一郎, 立岩 友美, 奥園 学, 豊嶋 憲子, 笹栗 毅和, 木下 伊寿美, 本下 潤	4. 巻 -
2. 論文標題 婦人科領域に発生した悪性度の異なる血管周囲類上皮細胞腫瘍の2症例	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本臨床細胞学会雑誌	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) なし	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩崎 健
2. 発表標題 Epitranscriptomic controls in soft-tissue leiomyosarcoma
3. 学会等名 第81回日本癌学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 岩崎健, 山元範昭, 小田義直	4. 発行年 2022年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 8
3. 書名 20. 骨軟部腫瘍 病理と臨床 40(臨時増刊):	

〔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
---------	---------