178　RNAのメチル化異常による消化管癌の増殖機構の解明	工藤　健介

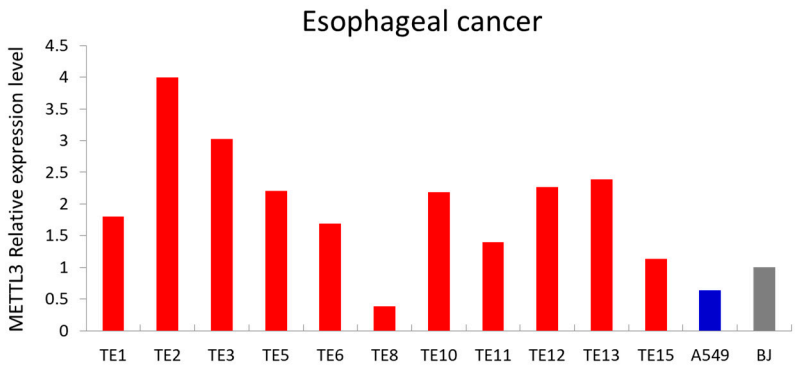
【目的】我々の細胞の RNA は、DNA やヒストンと同様にメチル化修飾を受けており、肺癌や急性骨髄性白血病などの悪性腫瘍の発生や増殖において重要な役割をもつ事が報告され注目を集めている。消化器癌においては近年胃癌における RNA メチル化酵素 METTL3 の過剰発現が胃癌の増殖と肝転移を促進すると報告された。しかし、RNA のメチル化に関する研究はほとんどが基礎的実験に基づくデータについて論じたものであり、臨床応用には至っていないのが現状である。本研究では、消化管癌と RNA メチル化異常との関連性を探索することを目的とした。

【方法】先行研究として、骨格筋芽細胞を用いて、RNA メチル化修飾酵素 METTL3 発現を制御する事により骨格筋分化に与える影響について検証した。METTL3 による骨格筋分化制御が RNA のメチル化修飾（N6-methyladenosine：m^6A）を介しているかどうか、m^6A-seq によって評価した。さらに消化器癌への応用として、食道癌／胃癌/大腸癌の cell line 及び臨床検体を用いて、METTL3 の mRNA レベルを RT-qPCR にて定量し、その他の細胞株、正常組織との比較検討を行った。

【結果】マウス骨格筋芽細胞において METTL3 の siRNA を用いてノックダウンすると、骨格筋分化に必要な転写因子 MyoD の mRNA レベルが有意に低下し骨格筋分化も抑制された。さらに m^6A-seq により MyoD mRNA の m^6A 修飾部位が、5’ UTR、3’ UTR 主体に存在することを同定し、5’ UTR を欠損させた MyoD mRNA は通常の MyoD mRNA と比較し安定性の低下を認めた。食道癌／胃癌／大腸癌細胞株において qPCR を行い METTL3 の発現を定量すると、胃癌、大腸癌と比較し食道癌細胞株では非癌細胞株や肺癌細胞株と比較し総じて METTL3 の発現が高い傾向を認めた。また、食道癌検体における癌と非癌部の METTL3 の発現を定量したが有意差はみられなかった（P＝0.1389）。

【まとめ】骨格筋前駆細胞において、METTL3 が m^6A 修飾を介して MyoD の mRNA を維持し骨格筋分化に必要である事を示した。また、食道癌細胞株において、非癌細胞と比較し METTL3 が高発現している傾向を認めた。更なる研究により、食道癌と METTL3 の関連性、制御メカニズムの解明が期待される。

食道癌細胞における METTL3 mRNA の発現



Cell line	METTL3 relative expression level (mean)
Esophageal cancer	**2.043**
Lung cancer	**0.637**
Fibroblast	**1.000**

Normalized by *GAPDH*

178. RNA のメチル化異常による消化管癌の増殖機構の解明

工藤　健介

国立病院機構 九州医療センター 消化管外科 臨床研究センター

Key words：食道癌，胃癌，大腸癌，RNA メチル化，METTL3

緒　言

我々の細胞の RNA は、DNA やヒストンと同様にメチル化修飾を受けており、近年癌発生や進行において多数の重要な役割をもつ事が報告され注目を集めており、具体的には、肺癌や急性骨髄性白血病において、RNA のメチル化異常が腫瘍の発生や増殖、浸潤を促進すると報告された［1，2］。消化管癌においては、近年胃癌における RNA メチル化酵素 *METTL3* の過剰発現が癌の増殖と肝転移を促進すると報告された［3］が、これまでの殆どの研究は基礎的実験に基づくデータについて論じたものが多く、臨床応用には至っていないのが現状である。

当研究室では RNA メチル化に関する先行研究を行い、RNA メチル化修飾酵素の 1 つである Mettl3 が骨格筋芽細胞の分化制御に関与していることを示した（図 1）［4］。またこれまでの先行知見においても、RNA のメチル化は未分化段階の細胞の増殖や分化制御と密接に関連しているため、分化度や増殖の程度がその病態や治療に大きく影響する癌細胞においても、RNA のメチル化が関与する可能性は大いに考えられる。さらに興味深い点として、RNA のメチル化は遺伝子異常によらない制御機構であるため、既知の遺伝子異常では説明不可能な発癌の原因や癌の heterogeneity などの疑問点が、このメカニズムを追究する事により解明出来る可能性がある。また、RNA のメチル化異常が癌と関連する事が証明出来れば、全く新しい癌治療の標的分子の同定が期待できる。しかしながら、これまでの RNA のメチル化に関する研究は、そのほとんどが基礎的実験に基づくデータについて論じたものであり、臨床の検体やデータと結びつけて行われた研究は極めて少ない。

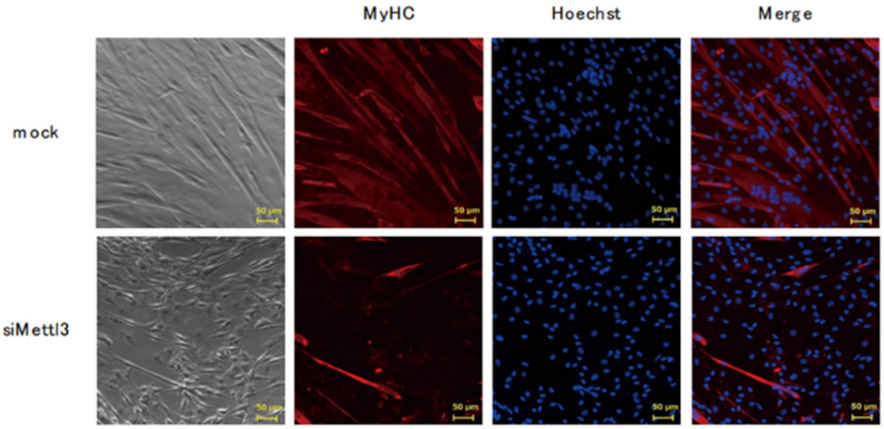


図 1. *Mettl3* のノックダウンによる骨格筋分化の抑制
骨格筋芽細胞において、control と *Mettl3* をノックダウンした細胞において、myosin heavy chain 染色を行い、*Mettl3* をノックダウンした細胞で骨格筋への分化が抑制されることを示した。
スケールバー：50 μm。

本研究では、真核生物において最も広く認められる RNA の修飾である N^6-methyladenosine（m^6A）に着目した。m6A は N6 位のアデノシンのメチル化であり、メチル化修飾酵素の Mettl3 と Mettl14、及び脱メチル化酵素の FTO

と ALKBH5 によって調節されている（図 2）[5]。現在までに報告されている RNA のメチル化異常による具体的な癌の制御機構はこれらの酵素の発現異常に起因するとされており、具体的には Mettl3 の高発現が肺癌細胞の増殖、浸潤を促進し、また FTO の高発現が急性骨髄性白血病の細胞増殖や発症の促進に関与することが示されている [1, 2]。消化管癌においてこれらの酵素の発現や機能解析を行う事により、癌発生のメカニズムや、新たな治療標的分子の同定が期待できる。

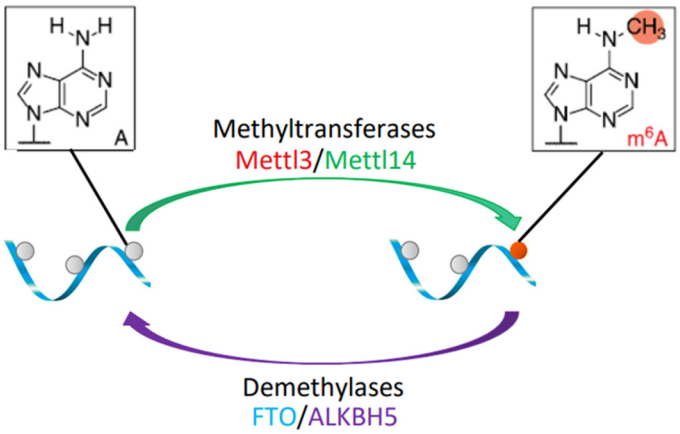


図 2. M^6A 修飾酵素、及び脱メチル化酵素
M^6A は真核生物において最も広く認められる RNA の修飾であり、メチル化修飾酵素の Mettl3 と Mettl14、及び脱メチル化酵素の FTO と ALKBH5 によって制御されている。

方　法

1. 食道癌/胃癌/大腸癌の cell line 及び臨床検体を用いた、癌部、非癌部における RNA メチル化、酵素、脱メチル化酵素の mRNA、タンパク質レベルの定量

食道癌、胃癌、大腸癌の cell line の細胞培養、ならびに、手術を施行された食道癌、胃癌、大腸癌の切除標本より癌部、非癌部組織から RNA、あるいはタンパク質を抽出し、qRT-PCR 及び Western blotting を行い、RNA メチル化酵素（Mettl3、Mettl14）ならびに RNA 脱メチル化酵素（FTO、ALKBH5）の mRNA レベル、タンパク質レベルを定量した。

2. 食道癌/胃癌/大腸癌細胞における、RNA メチル化酵素あるいは脱メチル化酵素のノックダウン時の評価

食道癌／胃癌／大腸癌細胞において、RNA メチル化酵素（Mettl3、Mettl14）、RNA 脱メチル化酵素（FTO、ALKBH5）の siRNA を用いてノックダウンを行うことによる影響の有無について、以下の方法により解析、評価した。

1）RNA メチル化制御因子のノックダウンにより発現が変動する癌関連遺伝子の探索

今回評価を行う RNA のメチル化（m6A）は RNA の安定性に寄与する事が報告されているため、RNA メチル化酵素、あるいは脱メチル化酵素のノックダウンによって、標的となる遺伝子の RNA は安定化もしくは不安定化し発現が変動することが予想される。そこで、ノックダウンによって発現が変動する癌関連遺伝子を探索することにより、m6A 修飾を受けている、もしくは RNA メチル化酵素の直接的な制御を受けている癌関連遺伝子を同定した。評価方法として、ノックダウン時の RNA レベル、タンパク質レベルを、それぞれ qRT-PCR、Western blotting により定量した。

2）RNA メチル化制御因子のノックダウンによる癌細胞の表現型の変化についての評価

研究代表者は先行研究において RNA メチル化酵素のノックダウンにより骨格筋芽細胞の分化が抑制されることを発見した。本研究で用いる食道癌／胃癌／大腸癌細胞に関しては、癌細胞の増殖や浸潤能、アポトーシスに関する変動を評価する予定である。

3）次世代シーケンシングを用いた、食道癌／胃癌／大腸癌細胞における癌関連遺伝子の RNA メチル化修飾の網羅的解析

食道癌／胃癌／大腸癌細胞の RNA を大量に抽出し、断片化した後、m^6A を特異的に認識する抗体を用いて RNA 免疫沈降を行った。得られた配列を次世代シーケンシングにより解析し、m^6A 修飾部位を網羅的に同定する（m^6A-seq）。m^6A-seq 結果は、解析ソフトウェアを用いてマッピング、データ処理を行った後、Integrative Genomics Viewer（IGV）にて可視化した。

< Cell line >

	Cell line
Esophageal cancer	TE-1, 2, 3, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 15, OE33
Gastric cancer	MKN45, KATO3, MKN74, NCI-N87, NUGC4, SNU-1, SNU-16
Colorectal cancer	DLD1, HT29, LOVO, LSI-74T, SE48, SW620
Control	Hela, BJ, A549

< Pathological tissue specimen >

Esophageal cancer: 49 cases who underwent surgical resection

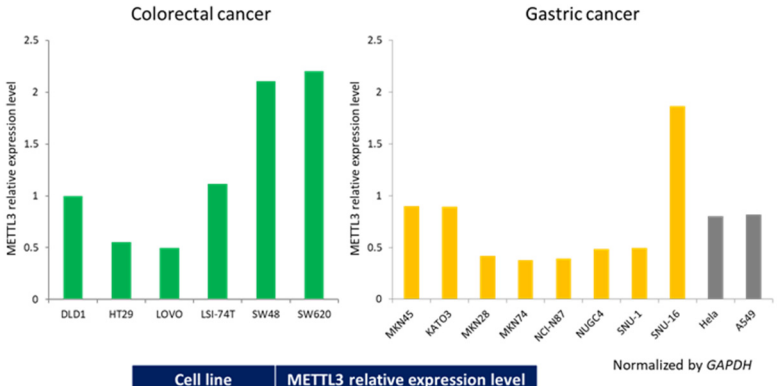
図 3. 本研究で使用した cell line、食道癌組織

本研究では、12 種の食道癌細胞株、7 種の胃癌細胞株、6 種の大腸癌細胞株を対象とし各実験を行った。
また、Control として、一般的に広く用いられている Hela、A549 などの細胞株を選択した。

結　果

1.　大腸癌細胞、胃癌細胞における METTL3 mRNA の発現

大腸癌細胞株 6 種、胃癌細胞株 8 種を用いて、qRT-PCR を行い、各細胞株の METTL3 mRNA 発現レベルの定量を行った。結果、大腸癌細胞の平均発現レベルは 1.385、胃癌細胞は 0.730 と、非癌細胞やその他の癌細胞の発現と比較して有意差は認められなかった（図 4）。



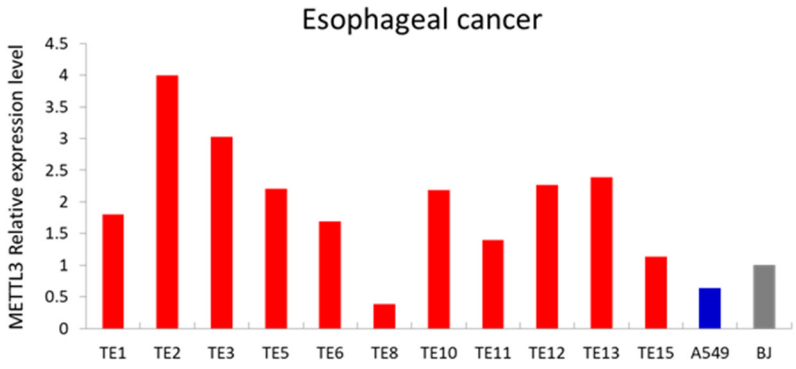
Cell line	METTL3 relative expression level (mean)
Colorectal cancer	1.385
Gastric cancer	0.730

図 4. 大腸癌、胃癌の各細胞株における qRT-PCR による METTL3 mRNA レベル

各種大腸癌、胃癌細胞株において qRT-PCR を行い、METTL3 の発現レベルを測定した結果、株によっては高発現を認めるものもあったが、平均値としては有意差は認められなかった。

2. 食道癌細胞における METTL3 mRNA の発現

食道癌細胞株 11 種を用いて qRT-PCR を行い、各細胞株の METTL3 mRNA の発現レベルの定量を行った。また、比較対象として、肺癌細胞株、非癌細胞株として fibroblast の発現も確認した。結果、fibroblast の METTL3 発現を基準として、肺癌細胞株は 0.637、食道癌細胞株は平均 2.043 と、食道癌細胞において METTL3 mRNA の発現が高かった（図 5）。



Cell line	METTL3 relative expression level (mean)
Esophageal cancer	**2.043**
Lung cancer	**0.637**
Fibroblast	**1.000**

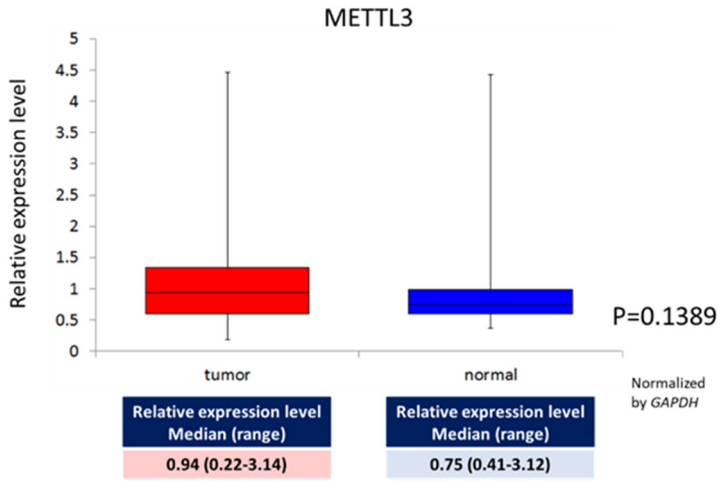
Normalized by *GAPDH*

図 5. 食道癌細胞における METTL3 mRNA の発現

qRT-PCR により食道癌細胞株における METTL3 発現レベルを測定した結果、TE8 を除く細胞株で総じて発現レベルが高く、relative expression level の平均値は control の 2 倍以上であった。

3. 食道癌組織と正常組織における METTL3 mRNA の発現レベルの比較

食道癌の切除組織 49 症例を用いて、癌組織部分と正常組織部分それぞれにおける METTL3 mRNA の発現レベルを qRT-PCR 解析を行い比較した。結果、癌組織の平均が 0.94、正常組織が 0.75 で、やや癌組織の発現が高い傾向であったが有意差は認められなかった（P＝0.1389）（図 6）。



Relative expression level Median (range)	Relative expression level Median (range)
0.94 (0.22-3.14)	0.75 (0.41-3.12)

図 6. 食道癌組織と正常組織における METTL3 mRNA の発現レベルの比較

食道癌の切除組織 49 症例を用いた、癌組織部分と正常組織部分それぞれにおける METTL3 mRNA の発現レベルの qRT-PCR 結果を boxplot で提示した。

考　察

本研究では、複数の食道癌、胃癌、大腸癌細胞株を用いて、METTL3 の発現レベルの定量を行った。結果、平均発現レベルは、1 を基準とした場合の Relative expression level として、大腸癌細胞が 1.385、胃癌細胞は 0.730 と、非癌細胞やその他の癌細胞の発現と比較して有意差は認められなかった。一方、食道癌細胞株は平均 2.043 と、食道癌細胞において METTL3 mRNA の発現が高かった。以上より、今回検証した結果、消化管癌の細胞株においては、胃癌、大腸癌、或いはその他の癌細胞株と比較し、食道癌細胞株において METTL3 が高発現している傾向を認めた。過去の報告、また当研究室での先行研究においても、METTL3 自体が癌の増殖、進行を促進する因子というよりは、m^6A 修飾を介して、増殖に関与する遺伝子の発現を制御する事により、各種の癌細胞の増殖に関与しているというメカニズムが複数報告されており、食道癌においても、METTL3 あるいは m^6A が何らかの因子の発現制御を介している可能性も考えられる。更なる研究により、食道癌と METTL3 の関連性、制御メカニズムの解明が期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、国立病院機構九州医療センター消化管外科臨床研究センターの南原翔、津田康雄、楠元英次、吉田倫太郎、坂口善久、楠本哲也、池尻公二である。

文　献

1) Lin S, Choe J, Du P, Triboulet R, Gregory RI. The m(6)A Methyltransferase METTL3 Promotes Translation in Human Cancer Cells. Mol Cell. 2016 May 5;62(3):335-345. doi: 10.1016/j.molcel.2016.03.021. Epub 2016 Apr 21. PMID: 27117702

2) Li Z, Weng H, Su R, Weng X, Zuo Z, Li C, Huang H, Nachtergaele S, Dong L, Hu C, Qin X, Tang L, Wang Y, Hong GM, Huang H, Wang X, Chen P, Gurbuxani S, Arnovitz S, Li Y, Li S, Strong J, Neilly MB, Larson RA, Jiang X, Zhang P, Jin J, He C, Chen J. FTO Plays an Oncogenic Role in Acute Myeloid Leukemia as a N6-Methyladenosine RNA Demethylase. Cancer Cell. 2017 Jan 9;31(1):127-141. doi: 10.1016/j.ccell.2016.11.017. Epub 2016 Dec 22. PMID: 28017614

3) Wang Q, Chen C, Ding Q, Zhao Y, Wang Z, Chen J, Jiang Z, Zhang Y, Xu G, Zhang J, Zhou J, Sun B, Zou X, Wang S. METTL3-mediated m(6)A modification of HDGF mRNA promotes gastric cancer progression and has prognostic significance. Gut. 2020 Jul;69(7):1193-1205. doi: 10.1136/gutjnl-2019-319639. Epub 2019 Oct 3. PMID: 31582403

4) Kudou K, Komatsu T, Nogami J, Maehara K, Harada A, Saeki H, Oki E, Maehara Y, Ohkawa Y. The requirement of Mettl3-promoted MyoD mRNA maintenance in proliferative myoblasts for skeletal muscle differentiation. Open Biol. 2017 Sep; 7(9): 170119. doi: 10.1098/rsob.170119. PMID: 28878038

5) Wang X, Lu Z, Gomez A, Hon GC, Yue Y, Han D, Fu Y, Parisien M, Dai Q, Jia G, Ren B, Pan T, He C.N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. Nature. 2014 Jan 2;505(7481):117-20. doi: 10.1038/nature12730. Epub 2013 Nov 27. PMID: 24284625