

## 受賞対象論文

Takeda S, Shigeyasu K, Okugawa Y, Yoshida K, Mori Y, Yano S, Noma K, Umeda Y, Kondo Y, Kishimoto H, Teraishi F, Nagasaka T, Tazawa H, Kagawa S, Fujiwara T, Goel A : Activation of AZINI RNA editing is a novel mechanism that promotes invasive potential of cancer-associated fibroblasts in colorectal cancer. *Cancer Lett* (2019) 444, 127-135.

## ハイライト

- ・大腸癌組織では癌細胞および癌関連線維芽細胞において ADAR1 の発現が上昇している。
- ・ADAR1 の発現上昇により AZINI RNA 編集頻度が上昇し、ODC が蓄積される。
- ・線維芽細胞における ADAR1 の発現上昇により癌微小環境における浸潤能が促進される。

## 武田 正

Sho Takeda



## 岡山大学病院 消化管外科

Department of Gastroenterological Surgery, Okayama University Hospital

## &lt;プロフィール&gt;

平成21年3月 岡山大学医学部医学科卒業  
 平成21年4月 国立病院機構岩国医療センター 初期研修医  
 平成23年4月 国立病院機構岩国医療センター 外科 後期研修医  
 平成25年4月 国立病院機構岩国医療センター 外科 医師  
 平成26年4月 岡山済生会総合病院 外科 チーフレジデント  
 平成28年4月 岡山済生会総合病院 外科 副医長  
 岡山大学医歯薬学総合研究科博士課程入学  
 岡山大学病院 消化管外科 医員  
 平成28年10月 岡山刑務所 医務課長  
 平成31年4月 岡山大学医歯薬学総合研究科博士課程修了  
 令和元年9月 岡山大学病院 消化管外科 医員  
 令和元年10月 現在に至る

## 研究の背景と経緯

DNA から転写された RNA は様々な装飾 (RNA 修飾) を受けており、この RNA 修飾によって RNA の機能および発現量に様々な影響が与えられ、結果 RNA に多様性が生み出されている<sup>1)</sup>。RNA 編集は RNA 修飾の一種であり、1980年代後半に Bass や Melton, Nishikura などにより報告された<sup>2,3)</sup>。これは二本鎖 RNA 中のアデノシンがイノシンに変換される現象 (A to I RNA 編集) であり、RNA 編集責任遺伝子の一つとして adenosine deaminase acting on RNA (ADAR) が同定された。ADAR が RNA のアミノ酸をコードしている部分に作用すれば、DNA 変異がなくともアミノ酸置換が生じ、蛋白質の構造変化を引き起こす可能性がある。また miRNA に作用すれば、前駆体段階での RNA 編集により Drosha や Dicer という切断酵素が阻害される、あるいはシード領域への RNA 編集により miRNA が異なる標的遺伝子を認識ようになる、などの方法で miRNA 経路を抑制する可能性がある。

発癌においては多彩な epigenetic な変化が関わっ

ており、近年 RNA 編集もその一つとして認識されている<sup>4)</sup>。消化器癌においては ADAR ファミリーの中の一つである ADAR1 の発現が上昇し、標的となる RNA の塩基置換が促進される。ADAR1 の標的として代表的なものが *antizyme inhibitor 1 (AZINI)* であり、AZINI RNA 編集レベルの上昇により ODC (ornithine decarboxylase) およびポリアミンが蓄積され癌の悪性度が増すと考えられている。近年肝細胞癌<sup>5)</sup>、食道癌<sup>6)</sup>、大腸癌<sup>7)</sup> などの癌腫において RNA 編集の意義が報告されてきたが、これらの既報は癌細胞に注目した研究である。癌組織では癌細胞以外にも癌関連線維芽細胞 (cancer associated fibroblasts : CAFs) や腫瘍随伴マクロファージなど様々な細胞が腫瘍微小環境 (tumor microenvironment : TME) を形成し、癌の浸潤や転移を促進すると言われている<sup>8)</sup>が、TME における RNA 編集の意義は不明である。

## 研究成果の内容

今回我々は大腸癌における TME、その中でも最も

代表的な CAFs に注目し、その RNA 編集の意義について研究を行った。

### 1. 患者とサンプル

本研究では岡山大学消化器外科教室において外科的切除を行われた大腸癌115例の切除標本 (testing cohort) と TCGA データベースから抽出した512例 (validation cohort) のあわせて627例の大腸癌症例について検討を行った。

### 2. 大腸癌組織において ADAR1 の発現は上昇する

はじめに testing cohort および validation cohort における ADAR1 の発現について検討を行ったところ、隣接する正常部位と比較してがん組織では ADAR1 が過剰発現していた。また ADAR1 の標的となりうる AZINI の RNA 編集頻度も上昇していることが確認された。

2015年に大腸癌の CMS 分類 (the consensus molecular subtypes of colorectal cancer) が提唱され<sup>9)</sup> 臨床へ応用されつつあるが、この CMS 分類と RNA 編集についても検討を行った。CMS4 大腸癌は他群と比較して予後不良であり、また間質型であることが特徴である。我々の研究でも間葉系マーカーである Vimentin と fibroblast activation protein (FAP) は CMS4 群において有意に増加していた。一方 ADAR1 の発現は免疫型である CMS1 と間質型の CMS4 において発現の上昇が認められた。大腸癌組織における ADAR1 の発現は Vimentin および FAP と正の相関を有し、RNA 編集が EMT (epithelial mesenchymal transition: 上皮間葉系移行) ないし線維芽細胞の蓄積によって行われることが示唆されたが、実際に大腸癌細胞株で EMT を誘導する実験系では ADAR1 の発現上昇は認められなかった。

これらの事実から、我々は CMS4 大腸癌における ADAR1 の発現上昇は間葉系細胞によるものと考えた。そこで大腸癌切除標本を用い免疫組織化学染色を行ったところ、正常組織と比較して癌組織では癌細胞のみならず間葉系の線維芽細胞においても ADAR1 の強い染色が認められた。

### 3. CAFs において ADAR1 の発現は上昇し、AZINI RNA 編集頻度も上昇する

CAFs における ADAR1 の発現がどのような意味をもつのか、in vitro の実験を行った。線維芽細胞株における ADAR1 の発現を抑制したところ AZINI RNA 編集頻度は低下し、逆にプラスミドを用いて ADAR1

を過剰発現させたところ AZINI RNA 編集頻度は増加した。これらの結果から線維芽細胞においても癌細胞同様に AZINI RNA 編集が ADAR1 によって制御されていることが示唆された。

次に癌細胞と線維芽細胞の相互作用について検討を行うため、大腸癌細胞の培養上清を回収し線維芽細胞に付加し培養を行ったところ、コントロールと比較して ADAR1 の発現の上昇および AZINI RNA 編集頻度の上昇を認めた。このことから癌細胞は ADAR1 RNA 編集酵素の誘導を介し、線維芽細胞における AZINI RNA 編集を促進することが示唆された。

### 4. Edited-AZINI は線維芽細胞における浸潤能、遊走能を亢進させる

線維芽細胞において AZINI RNA 編集頻度が上昇することが確認されたため、この生物学的意義についてより詳しく検討を行った。線維芽細胞にプラスミドを用いて Edited type の AZINI および Wild type の AZINI を過剰発現させ、invasion assay および migration assay を行った。Edited-AZINI を強発現させた線維芽細胞は、Wild-AZINI を強発現させた線維芽細胞と比較して浸潤能および遊走能が亢進した。また AZINI の下流の標的の一つである癌遺伝子 ODC のタンパク質発現も上昇しており、Edited-AZINI が ODC の蓄積を介して線維芽細胞の浸潤能、遊走能を亢進させていることが示唆された。

これらの結果から、癌組織における ADAR1 の過剰発現は癌の悪性度を促進させ、線維芽細胞における ADAR1 の発現上昇が癌微小環境における浸潤能を促進させていることが示唆された (図1)。

## 研究成果の意義

RNA 編集は多くの癌腫において判明した epigenetic な変化であり、がん遺伝子やがん抑制遺伝子における RNA 編集は腫瘍の特徴を変化させる。線維芽細胞は細胞外マトリクスをリモデリングし、がん細胞の浸潤経路を形成することで TME に影響を及ぼしうる<sup>8)</sup>。がん治療において CAFs は標的となり得るが、その CAFs における RNA 編集の意義は不明のままであった。本研究において癌細胞のみならず線維芽細胞においても ADAR1 の発現の上昇および AZINI RNA 編集頻度の上昇が認められた。当研究は大腸癌 TME における RNA 編集の意義および ODC 蓄積について検

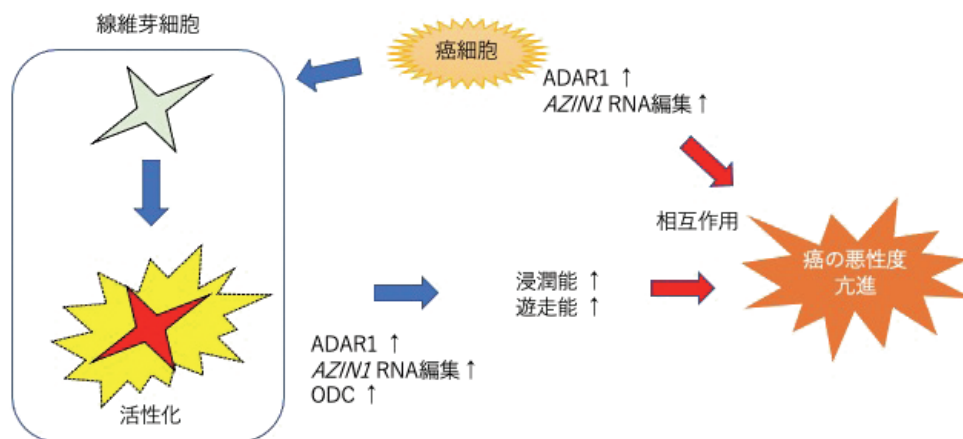


図1 大腸癌微小環境におけるADAR1の発現上昇と cancer progression

討した初めての研究であり極めて独創的である。線維芽細胞における Edited-AZINI の腫瘍促進的な役割が明らかとなり、AZINI RNA 編集が浸潤能を評価するバイオマーカーとなりうること、また新たな治療ターゲットとなりうることが示唆された。

### 今後の展開や展望

癌組織における RNA 編集の意義については研究の歴史も浅く、まだまだ不明な点が多い。本研究では癌微小環境における CAFs に注目したが、癌微小環境には腫瘍随伴マクロファージや各種免疫系細胞など多種多様な細胞が存在し、それらについての研究は未だなされておらず今後の課題である。

近年免疫療法が外科的治療、化学療法、放射線療法に次ぐ第4の治療法として脚光をあびており、免疫と RNA 編集の関連についても注目されている。例えば悪性黒色腫では RNA 編集が亢進することにより別のタンパク質が作られ、それらがネオアンチゲンとして提示される可能性が示唆されている<sup>10)</sup>。大腸癌においても免疫型である CMS1 において ADAR1 の発現は上昇しており、大腸癌免疫療法における RNA 編集の意義が注目される。

RNA 編集は今回対象とした coding RNA のみでなく non-coding RNA にも起こりうる。long coding RNA (lncRNA) における RNA 編集についての報告、miRNA のような small RNA における RNA 編集についての報告も徐々に増えてきており今後の研究が期待される。

### 文 献

- 1) 飯笹 久：疾患における A-to-I RNA 編集酵素 ADAR1 の役割 (特集 DNA/RNA 編集研究の新たな眺望). 生化学 (2016) 88, 593-599.
- 2) Bass BL, Weintraub H : An Unwinding Activity That Covalently Modifies Its Double-Stranded RNA Substrate. Cell (1988) 55, 1089-1098.
- 3) Wagner RW, Nishikura K : Cell Cycle Expression of RNA Duplex Unwindase Activity in Mammalian Cells. Mol Cell Biol (1988) 8, 770-777.
- 4) Okugawa Y, Grady WM, Goel A : Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer : Emerging Biomarkers. Gastroenterology (2015) 149, 1204-1225. e12.
- 5) Chen L, Li Y, Lin CH, Chan TH, Chow RK, et al. : Recoding RNA Editing of AZIN1 Predisposes to Hepatocellular Carcinoma. Nat Med (2013) 19, 209-216.
- 6) Qiao JJ, Chan TH, Qin YR, Chen L : ADAR1 : A Promising New Biomarker for Esophageal Squamous Cell Carcinoma? Expert Rev Anticancer Ther (2014) 14, 865-868.
- 7) Shigeyasu K, Okugawa Y, Toden S, Miyoshi J, Toiyama Y, et al. : AZIN1 RNA Editing Confers Cancer Stemness and Enhances Oncogenic Potential in Colorectal Cancer. JCI Insight (2018) 3, e99976.
- 8) Noma K, Smalley KS, Lioni M, Naomoto Y, Tanaka N, et al. : The Essential Role of Fibroblasts in Esophageal Squamous Cell Carcinoma-Induced Angiogenesis. Gastroenterology (2008) 134, 1981-1993.
- 9) Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, et al. : The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer. Nat Med (2015) 21, 1350-1356.
- 10) Zhang M, Fritsche J, Roszik J, Williams LJ, Peng X, et al. : RNA Editing Derived Epitopes Function as Cancer Antigens to Elicit Immune Responses. Nat Commun (2018) 9, 3919.

令和3年1月4日受稿  
〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1  
電話：086-235-7257 FAX：086-221-8775  
E-mail：sho-takeda\_surgery@s.okayama-u.ac.jp