

氏名・(本籍)	長岐 雄志 (秋田県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第1027号
学位授与の日付	令和2年9月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	m6A demethylase ALKBH5 promotes proliferation of esophageal squamous cell carcinoma associated with poor prognosis. (m6A 脱メチル化酵素 ALKBH5 は食道扁平上皮癌の細胞増殖を促進する予後不良因子である)
論文審査委員	(主査) 柴田 浩行 教授 (副査) 田中 正光 教授 大森 泰文 教授

学位論文内容要旨

m⁶A demethylase ALKBH5 promotes proliferation of esophageal squamous cell carcinoma associated with poor prognosis.

(m⁶A 脱メチル化酵素 ALKBH5 は食道扁平上皮癌の細胞増殖を促進する予後不良因子である)

申請者氏名 長岐 雄志

研究目的

食道癌は罹患率、死亡率ともに高い予後不良の癌である。これまでに DNA のメチル化などエピゲノムの変化が、食道癌の発症、増悪に寄与することが報告されてきたが、一方で RNA のメチル化といったエピトランスクリプトームの関与は不明である。近年、RNA の m⁶A 脱メチル化酵素が神経膠芽腫や乳癌の増悪に寄与することが明らかになっていることから、食道扁平上皮癌における m⁶A 脱メチル化酵素の役割、意義について検討した。

研究方法

まず、秋田大学医学部附属病院で 2001 年から 2011 年までの間に、根治手術が行われた食道扁平上皮癌患者で、術前治療症例を除く、177 名の腫瘍組織検体から作製した組織マイクロアレイを用いて、ALKBH5 の免疫染色を行い、Kaplan-Meier 法を用いて生存解析を行った。また単変量解析、多変量解析を行い、ALKBH5 と食道癌患者の予後について検討した。次にヒト食道扁平上皮癌細胞株を用いた siRNA による loss-of-function 解析を行い ALKBH5 の発現が細胞増殖能、遊走能に及ぼす影響について評価した。さらに RNA-Seq で網羅的な遺伝子発現解析を行い、ALKBH5 のノックダウンによって有意に発現量が変動する遺伝子を同定し、解析を行った。その結果をもとにフローサイトメトリーによる細胞周期解析、抗 m⁶A 抗体を用いた RNA 免疫沈降実験、転写阻害剤を用いた mRNA の安定性試験を行った。最後に ALKBH5 に対する shRNA 発現細胞株を作製し、ヌードマウスを用いて皮下移植実験を行った。

研究成績

まず、食道扁平上皮癌の臨床検体より作成した組織マイクロアレイを用いて、ALKBH5 の免疫染色を行った結果、ALKBH5 高発現群は、低発現群よりも 5 年全生存期間が短く ($P = 0.001$)、単変量解析、多変量解析では ALKBH5 は食道扁平上皮癌の独立した予後不良因子であった ($HR = 2.424$, $95\%CI:1.506-3.779$, $P = 0.0002$)。次に siRNA を用いて各種のヒト食道扁平上皮癌細胞株の *ALKBH5* 遺伝子をノックダウンしたところ、細胞増殖能、細胞遊走能ともに有意に低下した。RNA-Seq 解析では、ALKBH5 ノックダウンによって細胞周期に関わる遺伝子群がより有意に変動していることがわかった。そこで細胞周期を解析したところ、ALKBH5 ノックダウン細胞では、コントロール細胞に比べて有意に G1 期の増加と S 期の減少を認めた。RNA-Seq の結果を詳細に解析したところ、ALKBH5 ノックダウンによって有意に変動した因子(発現亢進因子 556 遺伝子, 発現抑制因子 582 遺伝子)の内、細胞周期に関わり、かつ G1-S 期の移行に関わる因子(発現上昇の 2 遺伝子, 発現低下の 27 遺伝子)が ALKBH5 の標的候補遺伝子であると考えられた。その内、ALKBH5 ノックダウン細胞で発現が上昇していた *CDKN1A* 遺伝子でコードされる細胞周期抑制因子 p21 蛋白質は、その他の発現が低下していた細胞周期関連遺伝子(*CDK4*, *CCND1*, *CDK2*, *CCNE2*, *E2F1*, *PCNA* など)の発現を抑制することが知られていることから、私達は *CDKN1A* mRNA が ALKBH5 の標的因子ではないかと考えた。そこで、抗 m⁶A 抗体を用いた RNA 免疫沈降-qPCR 実験を行い、ALKBH5 ノックダウンによって *CDKN1A* mRNA の m⁶A が増加していることを同定した。さらに、転写阻害剤を用いて mRNA の安定性を調べたところ、ALKBH5 ノックダウンによって *CDKN1A* mRNA の安定性が増加していることがわかった。最後に安定的な ALKBH5 ノックダウン細胞株を作製し、ヌードマウスの皮下の移植したところ、ALKBH5 ノックダウン細胞では腫瘍の増殖が有意に抑制された。

結論

ALKBH5 高発現は食道扁平上皮癌の予後不良因子であり、ALKBH5 は *CDKN1A* mRNA の m⁶A を脱メチル化することによって、*CDKN1A* mRNA を不安定化させ、*CDKN1A*(p21)蛋白質の発現を抑制し、さらには細胞周期の G1 期から S 期への移行を促進し、細胞増殖を亢進させていることが分かった。ALKBH5 は治療開始前の予後予測等に応用できる可能性があり、将来的に食道扁平上皮癌の治療標的となることが期待される。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査： 柴田浩行

申請者： 長岐雄志

論文題名：英文○m⁶A demethylase ALKBH5 promotes proliferation of esophageal squamous cell carcinoma associated with poor prognosis○

(和訳) ○ (m⁶A 脱メチル化酵素 ALKBH5 は食道扁平上皮癌の細胞増殖を促進する予後不良因子である) ○

要旨

申請者の研究は食道扁平上皮癌におけるメッセンジャーRNA の N⁶-Methyladenosine (m⁶A) の脱メチル化酵素 ALKBH5 の重要性を検討したものである。

177 人の食道癌の組織マイクロアレイを解析し、m⁶A の脱メチル化酵素 ALKBH5 の発現が生命予後の独立した予測因子であることを示した。他の脱メチル化酵素 FTO は予後との関連はなかった。Si オリゴによるノックダウン実験で、*ALKBH5* 遺伝子のノックダウンは食道扁平上皮癌細胞株の増殖と移動を抑制した。*ALKBH5* 遺伝子のノックダウンは細胞周期の進行を G0/G1 期に停止させた。ALKBH5 を欠失させた細胞では CDKN1A (p21) の発現が亢進していた。ALKBH5 をノックダウンすると *CDKN1A* mRNA の安定性が増加した。ALKBH5 を欠失させた細胞はヌードマウスの皮下に移植しても増殖が抑制された。このように ALKBH5 は食道扁平上皮癌細胞の細胞周期を進行させ、細胞増殖を促進させる m⁶A 脱メチル化酵素として最初に同定され、食道扁平上皮癌患者の予後に関連することが示された。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1) 斬新さ

食道扁平上皮癌は最も悪性度の高い腫瘍の一つで、世界中で毎年、57万人が罹患し、約

50万人が死亡しているが、有効な治療法に乏しく長期生存が困難である。この問題を解決するために“エピトランスクリプトーム”という RNA 修飾の新しい観点から食道扁平上皮癌の病態を明らかにしようと試み、その結果、ALKBH5 の重要性を示した本論文には十分な斬新性が認められる。

2) 重要性

本研究によってメッセンジャーRNA の m⁶A の脱メチル化酵素 ALKBH5 の発現が食道扁平上皮癌患者の生命予後の独立した予測因子であることが示された。細胞生物学的に ALKBH5 は *CDKN1A* mRNA の m⁶A の脱メチル化に関与し、食道扁平上皮癌細胞の細胞周期を進行させ、細胞増殖を促進させることが初めて示された。その効果はマウス実験でも、同様に示された。このような新知見から、本研究には十分な重要性が存在すると考えられる。

3) 研究方法の正確性

本研究では 177 症例からなる組織マイクロアレイを ASCO/CAP のガイドラインに基づいて解析した。細胞培養、遺伝子導入実験、Si オリゴの導入実験、細胞増殖アッセイ、細胞移動アッセイ、FACS 解析、免疫不全動物への腫瘍移植実験、ウェスタン解析、RT-PCR、RNA 安定性アッセイ、RNA シークエンス、MeRIP などは先行研究に準じて正確に行われた。動物実験、および臨床研究の開始に際して秋田大学の研究倫理委員会に研究計画を提出し、審査承認を得ている。また、臨床研究はすべての研究参加者の同意を取得している。さらに実験データは統計学的に正しく処理されるなど、本研究は正確に行われたと評価される。

4) 表現の明瞭さ

本論文は論旨に矛盾や錯誤、また結果解釈の誇張はなく、データに沿って正しく、明瞭に記載されている。本論文は 2020 年 5 月に Genes to Cells 誌に受理されるなど外部査読においても十分な評価を得ている。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。