

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 2 9 年 6 月 7 日現在

機関番号 : 1 4 4 0 1

研究種目 : 挑戦的萌芽研究

研究期間 : 2015 ~ 2016

課題番号 : 1 5 K 1 5 4 7 4

研究課題名 (和文) マイクロRNA分子のメチル化を網羅的に検出する革新的チップ技術の創出

研究課題名 (英文) Development of chip device to detect methylations on microRNAs

研究代表者

西田 尚弘 (Nishida, Naohiro)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号 : 5 0 5 8 8 1 1 8

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 2,800,000 円

研究成果の概要 (和文) : 本研究は、マイクロRNAなどの短鎖ノンコーディングRNAに起こる化学修飾を網羅的に検出する技術を開発する目的で進めてきた。アフィニティークロマトグラフィーによるサンプルの純化の技術、イオン化効率の向上などのための条件の検討を行い、合成オリゴのレベルであれば、1~5%以下のメチル化を検出できるまでの精度を実現することができた。質量分析に関しては、小分子核酸の検出に最適な質量測定レンジや、レーザー強度の調整を行なった。網羅的検出のため、基板上にターゲットを捕捉するためのオリゴ核酸を高密度に配置する技術の開発を進めており、チップ基板上への捕捉オリゴのプリントの工程に関して条件検討を行なった。

研究成果の概要 (英文) : Chemical modifications of microRNA molecules potentially alter their biological functions. This study is aimed for a development of devices to comprehensively detect methylations of small nucleotide molecules including microRNAs. Efficient purifications of target microRNAs and highly accurate detection using mass spectrometry are key processes of this system. We have developed target enrichment method using affinity chromatography to precisely quantify chemical modifications on microRNAs from a very few amount of RNA samples. Furthermore, the optimizations of mass spectrometry settings including improvement of ionization efficiency and adjustment of measurement ranges enabled detection of a very small amount of chemical modifications (less than 5%) on microRNA oligonucleotides. To detect variety kinds of chemical modifications on many microRNA species, we have designed chip devices, on which oligonucleotides with complement DNA sequence of target microRNAs are densely printed.

研究分野 : 外科学

キーワード : 核酸 癌 遺伝子 臨床

課題名「マイクロ RNA 分子のメチル化を網羅的に検出する革新的チップ技術の創出」

1. 研究開始当初の背景

近年の RNA の化学修飾に関する研究から RNA は DNA やヒストン同様そのメチル化状態をダイナミックに変換させ、これが遺伝子発現の重要な調節因子として機能していることが知られるようになった。さらに 2013 年以降、RNA メチル化は ES 細胞における幹細胞性の維持や、分化細胞においても mRNA の核外輸送、選択的スプライシング など多くの重要な細胞機能に関わる事が次々と報告されている(Y.Wang et al, Nat cell Biol. 2014)(X. Wang et al, Nature 2014)。一方でマイクロ RNA を始めとする小分子 RNA のメチル化に関してはいまだ詳細が明らかにされていない。RNA-タンパク複合体に内包された形で機能を発揮する小分子 RNA の作用動態を明らかにするためには、従来のトランスクリプトーム解析のような RNA 発現量を調べるだけでは不十分で、定量のみならず機能の推察が重要と考えられる。つまり、RNA の存在だけでなく、それが実際に機能しているかどうかを別のアプローチにより調べる必要があると考え、RNA のメチル化に焦点をあてるという着想にいたった。本研究では、小分子 RNA が様々なメチル化修飾(N1,6 位メチルアデニン、3,5 位メチルシトシン)を受ける可能性に関して調べ、多様な化学修飾、多様な RNA の種類に対応するために、これらを網羅的に検出するチップ基板の開発を目指した。

2. 研究の目的

本研究では、小分子 RNA が様々なメチル化修飾(N1,6 位メチルアデニン、3,5 位メチルシトシン)を始めとする化学修飾を受ける可能性に関して調べ、そのメチル化機構を明らかにするとともに、マイクロ RNA を始めとする多様な小分子 RNA に起こる多種の化学修飾を網羅的に検出するチップ基板の開発を目指した。

3. 研究の方法

小分子 RNA の化学修飾の検出には、各種修飾体に起こるわずかな質量差を検出する必要があるため、PCR 等の定量法ではなく、液体クロマトグラフ質量分析(LC/MS-MS)ならびにマトリックス支援型 **マトリックス**支援レーザー脱離イオン化質量分析(MALDI-TOF-MS)を用いた。試料としては、今回の研究では培養細胞株から抽出した Total RNA を中心に解析を行なったが、血液検査などで得られるわずかな量の試料からの分析も想定し、ターゲットの RNA をより効率良く純化できる技術の最適化を行った。また、検出すべき小分子 RNA の種類、化学修飾の種類を絞り込むために、小分子 RNA メチル化機構の解明、RNA メチル化に関わる酵素の

同定、その機能解析にも取り組んだ。さらに、チップ基板上にプリントするターゲット相補的なオリゴヌクレオチドの配置に関して、より効率的なターゲットの純化を実現できるように、in silico での数理的な予測を行った。

4. 研究成果

今回の研究では、培養細胞から得られた Total RNA を中心に試料として使用したが、最終的に目指すシステムが、がんを始めとする疾患における小分子 RNA の化学修飾の検出を目指すものであることから、血液検査などで得られるわずかな量の試料を想定し、ターゲットの RNA をより効率良く純化できる技術の最適化を行った。具体的には、アフィニティークロマトグラフィーを用いたターゲット RNA 分離の技術に関しては、オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションの際の条件最適化、ならびに質量分析での検出のプロセスにおいては、検出対象を小分子 RNA に限定し、イオン化効率の向上などのための条件検討、質量測定レンジや、レーザー強度の調整などを行った。その結果、合成オリゴヌクレオチドのレベルであれば、5%以下のメチル化を検出できるまでの精度を実現することに成功した。また、目的である化学修飾の網羅的な検出のため、基板上にターゲットを捕捉するためのオリゴ核酸を高密度に配置する技術の開発を進め、チップ基板上への捕捉オリゴのプリントの工程に関して条件検討を行なった。検出対象となる小分子 RNA に関しては、その中心となるマイクロ RNA だけでも 2500 種類にもものぼる。このため、効率的な化学修飾の検出のために、基板上に配置する核酸の種類に関して絞り込みを行った。培養細胞株から抽出した小分子 RNA 分画から、6 位メチル化アデニン(m6A)、ならびに 5 位メチル化シトシン(m5C)の抗体を用いて免疫沈降を行い、これを次世代シーケンサーで解析(メチル化 RNA 免疫沈降シーケンス:meRIP-seq)することで、これらの修飾を受ける可能性の高い小分子 RNA を網羅的に同定した。チップ基板上に配置するターゲット相補的なオリゴヌクレオチドの配置に関しては、お互いが干渉せず、より効率的なターゲットの捕捉が可能となるようように、数理的な予測を行った。

また、これに並行して、どの分子に起こるどのような化学修飾が生物学的に重要かを見極め、チップ基板開発に役立てるため、各種小分子 RNA の人工合成オリゴに実際に m6A や m5C などのメチル化修飾を加え、これらの修飾が、細胞の増殖能、細胞周期、スフェア形成能など細胞機能に与える影響を調べた。その結果、一部のマイクロ RNA に関して、メチル化修飾がそのターゲット抑制能に大きな変化をもたらすことを明らかにすることができた。これらのデータを利用し、疾患の進行や、発症に重要な役割を果たす可能性があ

る分子を選別、開発する基板上に配置することで、今後の臨床応用の際に有効なデバイスの開発を目指して研究をすすめてきた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 14 件)

- 1) Nishizawa, Y., Nishida, N., Konno, M., Kawamoto, K., Asai, A., Koseki, J., Takahashi, H., Haraguchi, N., Nishimura, J., Hata, T., Matsuda, C., Mizushima, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Clinical significance of histone demethylase NO66 in invasive colorectal cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, 24(3):841-849, 2017.
- 2) Miyo, M., Konno, M., Colvin, S. H., Nishida, N., Koseki, J., Kawamoto, K., Tsunekuni, K., Nishimura, J., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. The importance of mitochondrial folate enzymes in human colorectal cancer. *Oncol. Rep.*, 37(1):417-425, 2017.
- 3) Miyo, M., Konno, M., Nishida, N., Sueda, T., Noguchi, K., Matsui, H., Colvin, H., Kawamoto, K., Koseki, J., Haraguchi, N., Nishimura, J., Hata, T., Gotoh, N., Mastuda, F., Saotoh, T., Mizushima, T., Shimizu, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Metabolic adaptation to nutritional stress in human colorectal cancer. *Sci. Rep.*, 6:38415, 2016.
- 4) Colvin, S. H., Nishida, N., Konno, M., Haraguchi, N., Takahashi, H., Nishimura, J., Hata, T., Kawamoto, K., Asai, A., Tsunekuni, K., Koseki, J., Mizushima, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Oncometabolite D-2-hydroxyglurate directly induces epithelial-mesenchymal transition and is associated with distant metastasis in colorectal cancer. *Sci. Rep.*, 6:36289, 2016.
- 5) Baek, S.J., Sato, K., Nishida, N., Koseki, J., Azuma, R., Kawamoto, K., Konno, M., Hayashi, K., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H., Ogawa, K. MicroRNA miR-374, a potential radiosensitizer for carbon ion beam radiotherapy. *Oncol. Rep.*, 36(5):2946-2950, 2016.
- 6) Sakatani, A., Doi, Y., Kitayama, T., Matsuda, T., Sasai, Y., Nishida, N., Sakamoto, M., Uenoyama, N., Kinoshita, K. Pancreaticoduodenal artery aneurysm associated with coeliac artery occlusion from an aortic intramural hematoma. *World. J. Gastroenterol.*, 22(16):4259-4263, 2016.
- 7) Hasegawa, S., Nagano, H., Konno, M., Eguchi, H., Tomokuni, A., Tomimaru, Y., Asaoka, T., Wada, H., Hama, N., Kawamoto, K., Marubashi, S., Nishida, N., Koseki, J., Mori, M., Doki, Y., Ishii, H. A crucial epithelial to mesenchymal transition regulator, Sox4/Ezh2 axis is closely related to the clinical outcome in pancreatic cancer patients. *Int. J. Oncol.*, 48(1):145-152, 2016.
- 8) Koseki, J., Colvin, S. H., Fukusumi, T., Nishida, N., Konno, M., Kawamoto, K., Tsunekuni, K., Matsui, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Mathematical analysis predicts imbalanced IDH1/2 expression associates with 2-HG-inactivating β -oxygenation pathway in colorectal cancer. *Int. J. Oncol.*, 46(3):1181-1191, 2015.
- 9) Konno, M., Ishii, H., Koseki, J., Tanuma, N., Nishida, N., Kawamoto, K., Nishimura, T., Nakata, A., Matsui, H., Noguchi, K., Ozaki, M., Noguchi, Y., Shima, H., Gotoh, N., Nagano, H., Doki, Y., Mori, M. Pyruvate kinase M2, but not M1, allele maintains immature metabolic states of murine embryonic stem cells. *Regen. Therap.*, 1, 63-71, 2015.
- 10) Ogawa, H., Wu, X., Kawamoto, K., Nishida, N., Konno, M., Koseki, J., Matsui, H., Noguchi, K., Gotoh, N., Yamamoto, T., Miyata, K., Nishiyama, N., Nagano, H., Yamamoto, H., Obika, S., Kataoka, K., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. MicroRNAs induce epigenetic reprogramming and suppress malignant phenotypes of human colon cancer cells. *PLoS One*, 10(5):e0127119, 2015.
- 11) Ogawa, H., Nagano, H., Konno, M., Eguchi, H., Koseki, J., Kawamoto, K., Nishida, N., Colvin, H., Tomokuni, A., Tomimaru, Y., Hama, N., Wada, H., Marubashi, S., Kobayashi, S., Mori, M., Doki, Y., Ishii, H. The combination of the expression of hexokinase 2 and pyruvate kinase M2 is a prognostic marker in patients with pancreatic cancer. *Mol. Clin. Oncol.*, 3(3):563-571, 2015.
- 12) Konno, M., Koseki, J., Kawamoto, K., Nishida, N., Matsui, H., Dewi, D.L., Ozaki, M., Noguchi, Y., Mimori, K., Gotoh, N., Tanuma, N., Shima, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Embryonic microRNA-369 controls metabolic splicing factors and urges cellular reprogramming. *PLoS One*, 10(7):

- e0132789, 2015.
- 13) Baek, S.J., Ishii, H., Tamari, K., Hayashi, K., Nishida, N., Konno, M., Kawamoto, K., Koseki, J., Fukusumi, T., Hasegawa, S., Ogawa, H., Hamabe, A., Miyo, M., Noguchi, K., Seo, Y., Doki, Y., Mori, M., Ogawa, K. Cancer stem cells: The potential of carbon ion beam radiation and new radiosensitizers (Review). *Oncol. Rep.*, 34(5):2233-2237, 2015.
 - 14) Noguchi, K., Eguchi, H., Konno, M., Kawamoto, K., Nishida, N., Koseki, J., Wada, H., Marubashi, S., Nagano, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Susceptibility of pancreatic cancer stem cells to reprogramming. *Cancer Sci.*, 106(9):1182-1187, 2015.

〔学会発表〕(計6件)

- 1) 西田尚弘、小関準、今野雅允、川本弘一、太田勝也、土岐祐一郎、森正樹、石井秀始：消化器癌におけるヒストン脱メチル化酵素の標的化、第75回日本癌学会学術総会、2016年10月7日、パシフィコ横浜(神奈川県)
- 2) 西田尚弘、大房健、山縣彰、小関準、今野雅允、川本弘一、浅井歩、水島恒和、江口英利、瀧口修司、佐藤太郎、三森功士、落谷 孝広、土岐祐一郎、森正樹、石井秀始：臨床情報が裏付けるノンコーディング RNA エピゲノム修飾の意義、第39回日本分子生物学会年会、2016年12月1日、パシフィコ横浜(神奈川県)
- 3) Nishida, N., Konno, M., Koseki, J., Kawamoto, K., Asai, A., Mizushima, T., Eguchi, H., Takiguchi, S., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H.: Epigenetic modifications on non-coding RNAs in cancer、2017年1月6日、2017 Cellular and Molecular Bioengineering Annual Conference、Hapuna Beach Prince Hotel(アメリカ)
- 4) Nishida, N., Kano, Y., Koseki, J., Konno, M., Kawamoto, K., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H.: KDM5B plays a central role in esophageal cancer progression、2015年4月19日、AACR Annual Meeting 2015、PENNSYLVANIA CONVENTION CENTER(アメリカ)
- 5) 西田尚弘、太田勝也、加納義浩、小関準、今野雅允、川本弘一、溝端栄一、井上豪、土岐祐一郎、森正樹、石井秀始：ヒストン脱メチル化酵素 KDM5B の大腸癌進展機構への関わり、第74回日本癌学会学術総会、2015年10月9日、名古屋国際会議場(愛知)
- 6) 西田尚弘、Ferdin Jana、今野雅允、小関準、川本弘一、Calin George、三

森功士、石井秀始、森正樹：ノンコーディング RNA の消化器癌進展への関わり、第26回日本消化器癌発生学会総会、2015年11月19日、米子全日空ホテル(鳥取)

○ 出願状況(計1件)

名称：がんを検出、又はがんの進行期を判定する方法

発明者：石井秀始、西田尚弘、森正樹、土岐祐一郎、今野雅允、川本弘一、小関準、江口英利、瀧口修司、水島恒和、大房健
権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2016-162203

出願年月日：平成 28 年 8 月 22 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 尚弘 (Nishida, Naohiro)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50588118

(2) 研究分担者

今野 雅允 (Konno, Masamitsu)
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教
研究者番号：80618207

川本 弘一 (Kawamoto, Koichi)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教(常勤)
研究者番号：30432470

小関 準 (Koseki, Jun)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教(常勤)
研究者番号：20616669

石井 秀始 (Ishii, Hideshi)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任教授(常勤)
研究者番号：10280736

(3) 連携研究者

森 正樹 (Mori, Masaki)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70190999

小比賀 聡 (Obika, Satoshi)
大阪大学・大学院薬学系研究科・教授
研究者番号：80243252