

令和元年5月28日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19698

研究課題名(和文) マイクロRNAモドミクスによる組織恒常性の把握と臨床応用

研究課題名(英文) Grasp of tissue homeostasis by microRNA modomics and clinical application

研究代表者

石井 秀始 (Ishii, Hideshi)

大阪大学・医学系研究科・特任教授(常勤)

研究者番号：10280736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：(1)マイクロRNAの一塩基レベルでの化学修飾を解読するための確立された技術は未だない。全マイクロRNAのモドミクスを厳密にプロファイリングするために、相互補完的な2つの技術を応用した。質量分析法による分子内修飾の高精度計測 トンネル電流シーケンス(TS)法による短配列のデータ蓄積を進めた。(2)上記の計測技術で単細胞レベルのマイクロRNAのモドミクス解析を進め、新しい視点で組織恒常性の機構を理解し把握することができた。マイクロRNAのメチル化酵素の遺伝子改変マウスを用いて膵臓の発生と癌化を研究し、ヒト疾患における体性幹細胞からの癌化におけるRNAモドミクスの役割を理解することを進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロRNAの科学修飾を解読してデータベース化する研究は、先駆的であり、まだ十分に行われていないため、本研究計画においてその内容を明らかにすることは大きな意義がある。特に、他のオミックスデータと融合させた形で、マイクロRNAのモドミクスにより組織の恒常性を把握して、難治癌などの早期発見と早期治療に貢献できる臨床応用には社会的意義が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：There is no established technique for deciphering chemical modification at the single base level of microRNA. Two closely complementary techniques were applied to precisely profile the modality of total microRNAs. Accurate measurement of intramolecular modification by mass spectrometry, and accumulation of data of short sequence by tunneling current sequence (TS) method was performed. We studied a new viewpoint by advancing the modulomic analysis of single cell level microRNA by the above measurement technology to understand the mechanisms of tissue homeostasis. We studied the development and carcinogenesis of the pancreas using genetically modified mice of microRNA methylation enzymes, and proceeded to understand the role of RNA modus in carcinogenesis from somatic stem cells in human diseases.

研究分野：恒常性維持器官の外科学およびその関連分野

キーワード：癌 ゲノム 細胞・組織 トンネル現象 核酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA のメチル化の存在と意義を調べるために、予備的な研究を行った。米国 NCBI のデータベースを参照して、マイクロ RNA のメチル化修飾の数と種類を調査した。その結果、真核生物の RNA のメチル化は 66 種類知られているが、そのうち 51 種類は tRNA であり、13 種類は mRNA に於けるものである (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。マイクロ RNA に関しては、11 種類が知られているが、N6 メチル・アデニン(N6A)と N1 メチル・アデニン(N1A)、および m5 メチル・シトシン(m5C)と m3 メチル・シトシン(m3C)が主たる修飾であり、私達の質量分析の結果と一致した。次に、癌で重要なマイクロ RNA (癌抑制遺伝子を標的とする Onco-MIR, 癌遺伝子を標的とする Suppressor-MIR) から 50 個に関して、捕捉核酸を合成してマイクロ RNA をキャプチャーし MALDI-in source decay (ISD)を応用して質量分析法で計測した。その結果、癌では正常に比べてマイクロ RNA の特異的な部位の塩基にメチル化修飾が誘導されていることが明らかとなった。またマイクロ RNA のメチル化体の分子シミュレーションを行ったところ、メチル化修飾が核酸の構造を変化させて標的遺伝子への結合活性に影響を生じ得ることが示された。従って、マイクロ RNA のメチル化修飾は構造化学としても大きな影響を生み出し、分子機能を左右し、疾患の病態で重要な役割を果たしている可能性が示された。私達が実施した予備的な研究では、4 つのマイクロ RNA の癌特異的な修飾を明らかにした。これらのマイクロ RNA は、これまでの内外の研究成果で、癌細胞の浸潤・転移能 (EMT[Epithelial Mesenchymal Transition]の Snail 転写因子発現等)に関わり、正常の体性幹細胞からの癌化、癌幹細胞化などと密接に関わっていることが報告されており、RNA にメチル化修飾が加わることで組織の恒常性の維持と破綻のプロセスを高精度に理解して、新たな機能の制御法を提示できる可能性が示唆される。

2. 研究の目的

マイクロ RNA (22~25 塩基の非コード RNA の 1 種)は、遺伝子の機能に重要な役割を果たしている。私達の予備的研究により、癌では「マイクロ RNA のメチル化」が疾患特異的に誘導され、新たな視点からの病態の理解と画期的な制御法を開拓する上で重要なシーズであることが示された。このようなマイクロ RNA のモドミクスは殆ど解明されていない。本研究では、全マイクロ RNA (2,671 種類)を読み解く技術の新構築し、単細胞レベルの解析から組織恒常性の維持と破綻を理解して把握することを目指す。研究の成果は、RNA モドミクスに基づく疾患の再分類と新しい治療法のパラダイムシフトに貢献できる。

3. 研究の方法

研究代表者(石井)が、分担者(西田ら)とともに、(1)質量分析(MS)法による分子内修飾の高精度計測を集約化し、また小関・谷口らとともに、(2)トンネル電流シーケンス(TS)法における流路の最適化を進め、短配列のデータを蓄積した。この融合した先端技術を用いて、今野・川本らが膵臓特異的な癌遺伝子の発現系による遺伝子改変マウスの臓器から細胞を取り出して発生と癌化を研究し、組織の恒常性に関わる RNA モドミクスの意義を明らかにした。さらに石井・西田が江口・森・土岐らとともにマイクロ RNA モドミクスの網羅的な解析技術を臨床の検体に応用して、手術的に得られた癌と正常組織や、低侵襲的に得られた患者体液(血清・唾液・尿)から抽出されたマイクロ RNA 分子のメチル化を検討した。これらを統合して、マイクロ RNA のモドミクスが演出する多彩な疾患を理解し、疾患のサブタイプ分類、さらには新しい治療法のハブとなる分子を提示し、画期的な創薬への道を拓くことができる。研究の進捗の把握は、毎週・毎月・年度末の報告会で密接に連絡し合って協働した研究を進めた。また社会への情報の発信は、癌学会等での毎年発表、知的財産などの整備を経て、積極的に成果をデータベース(KAKEN)などで広く公開した。中心となる論文の公表の手段は、査読のある高いインパクトの英文誌への掲載を第一目標にすえて、国際学会、国際シンポジウムでの積極的な発表に務めた。また、若手の育成の観点からは、英語化とともに国内での学会や情報交換の場を豊富に準備して整えた。科研費の原資が血税であるという点だけではなく、広く国民から科学技術に対する強い信頼を得る上で、アウトリーチ活動を積極的に進めた。

4. 研究成果

本研究経過にしたがって、臨床検体を用いて検討することにより、バイオマーカーとしての性能を検討した。その結果マイクロ RNA のメチル化をプロファイリングすることにより、癌と非癌の組織及び体液(血清・唾液・尿)の情報をもとにして高い感度と特異度で分類することが可能であった。さらに構造化学的な検討を加え、マイクロ RNA のメチル化により標的のプロファイリング、シフトが起こり、また分解制御が誘導されて機能性核酸のマイクロ RNA の新たな役割が明らかになり、特許化を進めた。さらに、個体レベルでの組織恒常性の把握を行うために、前臨床試験を進めてシングル細胞での RNA モドミクスの解明により人に応用するための基盤を構築し、本件の内容も知財化を進めて大学発の事業化展開として発展させることができた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

- 1) Oshiro, T., Komoto, Y., Konno, M., Koseki, J., Asai, A., Ishii, H., Taniguchi, M. Direct analysis of incorporation of an anticancer drug into DNA at single-molecule resolution. *Sci. Rep.*, 9(1):3886, 2019. DOI:10.1038/s41598-019-40504-x. 査読有.
- 2) Takaoka, Y., Konno, M., Koseki, J., Colvin, H., Asai, A., Tamari, K., Satoh, T., Mori, M., Doki, Y., Ogawa, K., Ishii, H. Mitochondrial pyruvate carrier 1 expression controls cancer EMT and radioresistance. *Cancer Sci.*, 110:1331–1339, 2019. DOI:10.1111/cas.13980. 査読有.
- 3) Tominaga, K., Minato, H., Murayama, T., Sasahara, A., Nishimura, T., Kiyokawa, E., Kanauchi, H., Shimizu, S., Sato, A., Nishioka, K., Tsuji, E., Yano, M., Ogawa, T., Ishii, H., Mori, M., Akashi, K., Okamoto, K., Tanabe, M., Tada, K., Tojo, A., Gotoh, N. Semaphorin signaling via MICAL3 induces symmetric cell division to expand breast cancer stem-like cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 116(2):625-630, 2018. DOI:10.1073/pnas.1806851116. 査読有.
- 4) Tamari, K., Konno, M., Asai, A., Koseki, J., Hayashi, K., Kawamoto, K., Murai, N., Matsufuji, S., Isohashi, F., Satoh, T., Goto, N., Tanaka, S., Doki, Y., Mori, M., Ogawa, K., Ishii, H. Polyamine flux suppresses histone lysine demethylases and enhances ID1 expression in cancer stem cells. *Cell Death Discovery*, 4:104, 2018. DOI:10.1038/s41420-018-0117-7. 査読有.
- 5) Toratani, M., Konno, M., Asai, A., Koseki, J., Kawamoto, K., Tamari, K., Li, Z., Sakai, D., Kudo, T., Satoh, T., Sato, K., Motooka, D., Okuzaki, D., Doki, Y., Mori, M., Ogawa, K., Ishii, H. A convolutional neural network uses microscopic images to differentiate between mouse and human cell lines and their radioresistant clones. *Cancer Res.*, 78:6703-6707, 2018. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-18-0653. 査読有.
- 6) Baek, S.J., Sato, K., Nishida, N., Koseki, J., Hayashi, K., Kawamoto, K., Konno, M., Doki, Y., Mori, M., Ogawa, K., Ishii, H. Carbon ion beam radioresistant rodent cells are sensitized to trifluorothymidine exposure. *Oncol. Lett.*, 16: 3389-3393, 2018. DOI:10.3892/ol.2018.9004. 査読有.
- 7) Kawamoto, K., Ohashi, T., Konno, M., Nishida, N., Koseki, J., Matsui H., Sakai, H., Kudo, T., Eguchi, H., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Cell-free culture conditioned medium elicits pancreatic β cell lineage-specific epigenetic reprogramming in mice. *Oncol. Lett.*, 16: 3255-3259, 2018. DOI:10.3892/ol.2018.9008. 査読有.
- 8) Toshiyama, R., Konno, M., Eguchi, H., Takemoto, H., Noda, T., Asai, A., Koseki, J., Haraguchi, N., Ueda, Y. Matsushita, K., Asukai, K., Ohashi, T., Iwagami, Y., Yamada, D., Sakai, D., Asaoka, T., Kudo, T., Kawamoto, K., Gotoh, K., Kobayashi, S., Satoh, T., Doki, Y., Nishiyama, N., Mori, M., Ishii, H. Poly(ethylene glycol)-poly(lysine) block copolymer-ubenimex conjugate targets aminopeptidase N and exerts an antitumor effect in hepatocellular carcinoma stem cells. *Oncogene*, 38(2):244-260, 2018. DOI:10.1038/s41388-018-0406-x. 査読有.

[学会発表](計 10 件)

Yanagisawa, K., Konno, M., Asai, A., Koseki, J., Mizushima, T., Satoh, T., Matsuzaki, M., Doki, Y., Ishii, H. : Generation of invasion model of colorectal cancer with three-dimensional culture method. Single Cells: Technology to Biology Cell Symposia, 2019 年

泥谷 直樹 (座長: 石井 秀始): 消化器癌の浸潤に関わる分子メカニズムの解明と治療への応用、第 9 回 癌・炎症と抗酸化研究会、2018 年

石井 秀始: がんエピトランスクリプトーム研究の新展開、第 29 回日本消化器癌発生学会総会、2018 年

田中 真二 (座長: 石井 秀始): 臨床からみた癌幹細胞と免疫微小環、第 77 回日本癌学会学術総会、2018 年

今野 雅允、佐藤 太郎、土岐 祐一郎、森 正樹、石井 秀始: がんエピトランスクリプトームの解明と応用、第 77 回日本癌学会学術総会、2018 年

小関 準、浅井 歩、今野 雅允、佐藤 太郎、土岐 祐一郎、辻川 和丈、森 正樹、石井 秀始: 消化器がん幹細胞のエピゲノム異常の標的化と制御、第 77 回日本癌学会学術総会、2018 年

常國 健太、今野 雅允、小関 準、浅井 歩、土岐 祐一郎、森 正樹、石井 秀始: CD44/CD133-Positive Colorectal Cancer Stem Cells Are Sensitive to Trifluridine、第 6 回がん代謝研究会、2018 年

今野 雅允、浅井 歩、田沼 延公、島 礼、小関 準、佐藤 太郎、土岐 祐一郎、森 正樹、石井 秀始: 糖代謝酵素のスプライシング変化による認知症発症機構の解明、第 6 回がん代謝研究会、2018 年

小関 準、今野 雅允、浅井 歩、佐藤 太郎、土岐 祐一郎、森 正樹、石井 秀始：新規トランスオミックス法を用いたがん幹細胞の DNA メチル化量及び転写量変化の相関解析、第 6 回がん代謝研究会、2018 年
常國 健太、今野 雅允、小関 準、浅井 歩、土岐 祐一郎、森 正樹、石井 秀始：Trifluridine efficacy in cancer stem cell、AACR Annual Meeting 2018、2018 年

〔産業財産権〕

出願状況（計 5 件）

名称：核酸医薬による癌治療
発明者：石井 秀始、今野 雅允、小比賀 聡、森 正樹
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2019- 85789
出願年：2019 年
国内外の別：国内

名称：RNA 修飾を利用した分析・診断法
発明者：石井 秀始、今野 雅允、森 正樹
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2018- 30099
出願年：2019 年
国内外の別：国内

名称：RNA 修飾を利用した分析・診断法
発明者：石井 秀始、今野 雅允、森 正樹
権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2019/ 6588
出願年：2019 年
国内外の別：国外

名称：抗がん剤
発明者：森 正樹、石井 秀始、今野 雅允、江口 英利、原口 直紹、俊山 礼志、西山 伸宏、
武元 宏泰
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2018-013678
出願年：2018 年
国内外の別：国内

名称：抗がん剤
発明者：森 正樹、石井 秀始、今野 雅允、江口 英利、原口 直紹、俊山 礼志、西山 伸宏、
武元宏泰
権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2019/003150
出願年：2018 年
国内外の別：国外

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：今野 雅允

ローマ字氏名：(KONNO, masamitsu)

所属研究機関名：大阪大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：寄附講座講師

研究者番号（8 桁）：80618207

研究分担者氏名：小関 準
ローマ字氏名：(KOSEKI, jun)
所属研究機関名：大阪大学
部局名：大学院医学系研究科
職名：特任助教(常勤)
研究者番号(8桁)：20616669

(2)研究協力者

研究協力者氏名：森 正樹
ローマ字氏名：(MORI, masaki)

研究協力者氏名：土岐 祐一郎
ローマ字氏名：(DOKI, yuichiro)

研究協力者氏名：江口 英利
ローマ字氏名：(EGUCHI, hidetoshi)

研究協力者氏名：谷口 正輝
ローマ字氏名：(TANIGUCHI, masateru)

研究協力者氏名：川本 弘一
ローマ字氏名：(KAWAMOTO, koichi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。