

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16355

研究課題名（和文）難治性消化器がんのm6Aエピトランスクリプトームの標的化と臨床応用

研究課題名（英文）Targeting and clinical application of m6A epitranscriptome for refractory gastrointestinal cancer

研究代表者

浅井 歩 (Asai, Ayumu)

大阪大学・産業科学研究所・特任助教（常勤）

研究者番号：40783262

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々はmiRNA中のメチル化アデノシン(m6A)の計測をがん診断に応用するために、我々が開発した計測技術でm6Aの計測法を確立した。

また、培養細胞でメチル化miRNAを計測することにより、消化器がん細胞でメチル化されているmiRNAを同定した。

さらに、早期がん患者において、既存の診断マーカーと比較した。その結果、既存の診断マーカーは早期がんとは健常人を判別できなかったが、メチル化miRNAの計測では早期がんとは健常人を判別することに成功した。これまでに、早期がんを高精度に判別可能な診断方法は存在しなかったため、我々の研究成果は今後のがんの早期発見・早期治療に大きく貢献する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、がん細胞においてm6Aの重要性が報告されていたが、実際のがん患者でm6Aを計測した事例はなく、m6Aの計測方法も確立されていなかった。

我々はヒト検体におけるm6Aの計測方法を確立したことから、今後がん以外にもm6Aの研究が発展する可能性を示したことから、学術的にも大変意義深い。

また、早期がんを高精度に判別可能な診断方法は存在しなかったため、我々の成果は今後のがんの早期発見・早期治療に貢献し、臨床的にも経済的にも波及効果をもたらす。

研究成果の概要（英文）：In order to apply measurements of methylated adenosine (m6A) in miRNA to cancer diagnosis, we have established a measurement method for m6A with a measurement technology we developed.

In addition, we identified methylated miRNAs in gastrointestinal cancer cells by measuring methylated miRNAs in cultured cells.

Furthermore, we compared with existing diagnostic markers in patients with early-stage cancer. As a result, the existing diagnostic markers could not discriminate between early cancer and healthy control, but the measurement of methylated miRNA succeeded in discriminating them. No diagnostic method that can detect early cancer with high accuracy have been developed, so our research results would greatly contribute to the early detection and treatment of cancer in the future.

研究分野：がんバイオマーカー

キーワード：エピトランスクリプトーム 先端計測 バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんは国内の死因第一位の重篤な疾患であり、早期発見・早期治療が根治の鍵である。特に膵臓がんは早期に発見することは非常に困難であり、発見時には既に手遅れであることも少なくない。つまり、がんの克服には高精度な診断法が必要不可欠である。近年では、がん細胞では遺伝子情報が変化していることから、がん組織から血液中に分泌されている miRNA の検出によってがんの診断が可能となる報告もあるが、早期がんを診断できるほどの精度は発揮できていない。一方、近年、我々を含む内外の研究成果により、がんは RNA を変化させること (RNA 修飾) により、悪性化・治療抵抗性をはじめとする様々な生物学的な機能を制御しており、RNA 修飾は 80% がメチル化アデノシン (m6A) であることが明らかとなってきた。そこで、我々はがんに特徴的な変化である m6A 修飾と miRNA を組み合わせて、miRNA 中の m6A 修飾を検出することで、高精度ながんの診断に応用することを着想した。しかし、がんの診断にどのような miRNA 中の m6A の計測が有用かは不明であり、臨床検体で m6A 修飾を計測する技術も確立されていない。

2. 研究の目的

本研究では miRNA 中の m6A 修飾の計測をがん診断に応用するために、新規の m6A 修飾の計測技術を確立し、消化器がん患者 (膵臓がん、大腸がん、胃がん) の手術切除標本と末梢血中の miRNA の m6A 修飾を計測して健常人と比較することで、miRNA 中の m6A 修飾の計測によるがん診断方法を樹立することを目的とした。

3. 研究の方法

m6A 修飾計測法の確立

我々が開発した計測技術で化学合成品及び培養細胞中の miRNA の m6A 修飾を計測することで、RNA 修飾計測法を確立した。

メチル化 miRNA の同定

消化器がん培養細胞から RNA を抽出し、メチル化されている miRNA を同定した。

臨床材料における計測

インフォームドコンセントの得られた消化器がん患者 (膵臓がん、大腸がん、胃がん) から手術で切除した腫瘍及び末梢血をそれぞれ 20 症例ずつ集積し、それぞれの試料から miRNA を抽出して m6A 修飾を計測した。

4. 研究成果

(1) データベースによる消化器がんにおける RNA 修飾酵素の発現: Gene Expression Omnibus のデータベースを用いて、消化器がんにおける RNA 修飾酵素の発現量を調査した。その結果、消化器がんにおいて m6A の修飾酵素である METTL3 が腫瘍部に高発現していることが明らかとなった (図 1)。

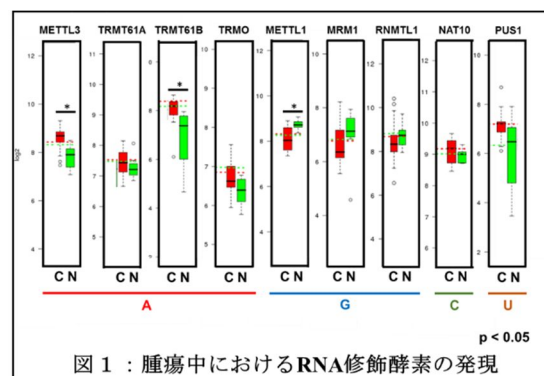


図 1: 腫瘍中における RNA 修飾酵素の発現

(2) RNA 修飾計測技術の確立: 我々は化学合成品や m6A 修飾を含む核酸配列を用いて、質量分析を応用した m6A 修飾計測技術を確立した (図 2)。

本手法の確立により、m6A 以外の RNA 修飾も計測可能であり、複数の修飾を計測可能な世界初の技術である。

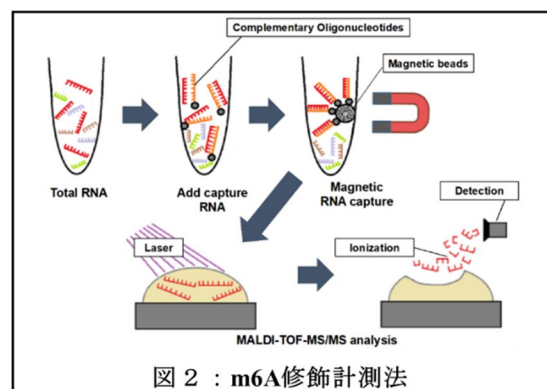
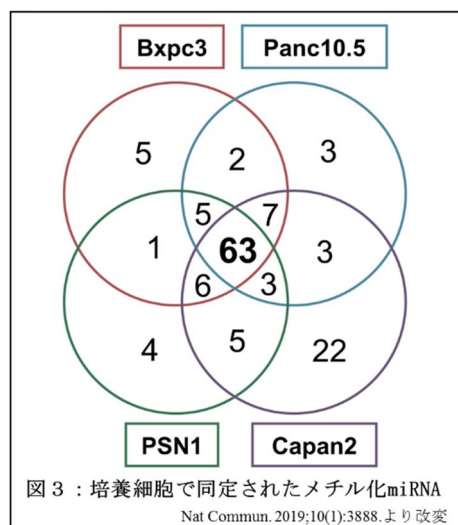


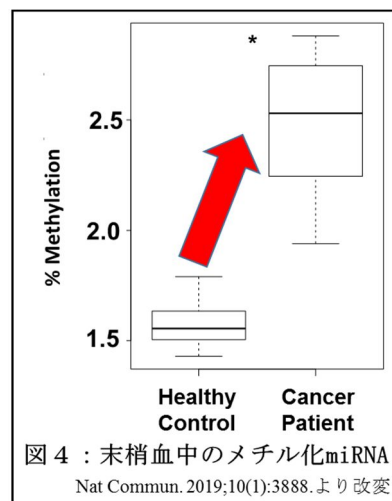
図 2: m6A 修飾計測法

(3) 培養細胞におけるメチル化 miRNA の同定：消化器がんの培養細胞を用いて、メチル化されている miRNA を調べた結果、63 種類の miRNA がメチル化されていることが明らかとなった (図 3)。

(4) 腫瘍組織と正常組織のメチル化 miRNA の比較：培養細胞で同定されたメチル化 miRNA のうち、2 種の miRNA について、消化器がん患者から抽出した腫瘍中で計測したところ、正常組織と比較して、メチル化が増加しており、培養細胞の結果と共通していた。

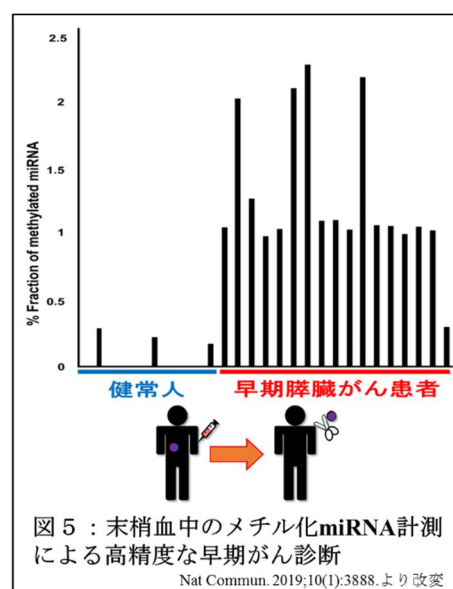


(5) 消化器がん患者と健常人の末梢血におけるメチル化 miRNA の比較：消化器がん患者と健常人の末梢血中の miRNA を比較したところ、腫瘍中の結果と同様に、末梢血中でもメチル化 miRNA が増加していた (図 4)。つまり、末梢血中のメチル化 miRNA を計測することで消化器がん患者と健常人を判別できることが明らかとなった。



(6) 手術前後における末梢血におけるメチル化 miRNA の比較：消化器がん患者において手術前後で末梢血中のメチル化 miRNA を計測したところ、腫瘍摘出後に末梢血中のメチル化 miRNA が減少したことから、メチル化 miRNA は体内に腫瘍が存在する際に増加することが明らかとなった。

(7) 早期がんの判別： Stage0 及び Stage1 の早期がん患者の末梢血に絞ってメチル化 miRNA を解析し、既存の診断マーカーである CEA 及び CA19-9 と比較した。その結果、CEA 及び CA19-9 は早期がんと健常人を判別できなかったが、メチル化 miRNA の計測では早期がんと健常人を判別することに成功した (図 5)。これまでに、早期がんを高精度に判別可能な診断方法は存在しなかったため、我々の成果は今後のがんの早期発見・早期治療に貢献し、臨床的にも経済的にも波及効果をもたらす。



< 引用文献 >

Nat Commun. 2019 Aug 29;10(1):3888. doi: 10.1038/s41467-019-11826-1.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Koseki Jun, Konno Masamitsu, Asai Ayumu, Horie Naohiro, Tsunekuni Kenta, Kawamoto Koichi, Obika Satoshi, Doki Yuichiro, Mori Masaki, Ishii Hideshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Theoretical analyses and experimental validation of the effects caused by the fluorinated substituent modification of DNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-57899-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Asai Ayumu, Konno Masamitsu, Koseki Jun, Taniguchi Masateru, Vecchione Andrea, Ishii Hideshi	4. 巻 470
2. 論文標題 One-carbon metabolism for cancer diagnostic and therapeutic approaches	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 141 ~ 148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2019.11.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Konno Masamitsu, Koseki Jun, Asai Ayumu, Yamagata Akira, Shimamura Teppei, Motooka Daisuke, Okuzaki Daisuke, Kawamoto Koichi, Mizushima Tsunekazu, Eguchi Hidetoshi, Takiguchi Shuji, Satoh Taroh, Mimori Koshi, Ochiya Takahiro, Doki Yuichiro, Ofusa Ken, Mori Masaki, Ishii Hideshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Distinct methylation levels of mature microRNAs in gastrointestinal cancers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-11826-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Toshiyama Reishi, Konno Masamitsu, Eguchi Hidetoshi, Asai Ayumu, Noda Takehiro, Koseki Jun, Asukai Kei, Ohashi Tomofumi, Matsushita Katsunori, Iwagami Yoshifumi, Yamada Daisaku, Asaoka Tadafumi, Wada Hiroshi, Kawamoto Koichi, Gotoh Kunihito, Kudo Toshihiro, Satoh Taroh, Doki Yuichiro, Mori Masaki, Ishii Hideshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Association of iron metabolic enzyme hepcidin expression levels with the prognosis of patients with pancreatic cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 8125 ~ 8133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2018.8357	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 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.	4. 巻 38
2. 論文標題 Poly(ethylene glycol)-poly(lysine) block copolymer-ubenimex conjugate targets aminopeptidase N and exerts an antitumor effect in hepatocellular carcinoma stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 244 ~ 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-018-0406-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Toratani Masayasu, Konno Masamitsu, Asai Ayumu, Koseki Jun, Kawamoto Koichi, Tamari Keisuke, Li Zhihao, Sakai Daisuke, Kudo Toshihiro, Satoh Taroh, Sato Katsutoshi, Motooka Daisuke, Okuzaki Daisuke, Doki Yuichiro, Mori Masaki, Ogawa Kazuhiko, Ishii Hideshi	4. 巻 78
2. 論文標題 A Convolutional Neural Network Uses Microscopic Images to Differentiate between Mouse and Human Cell Lines and Their Radioresistant Clones	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 6703 ~ 6707
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-18-0653	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Asai Ayumu, Koseki Jun, Konno Masamitsu, Nishimura Tatsunori, Gotoh Noriko, Satoh Taroh, Doki Yuichiro, Mori Masaki, Ishii Hideshi	4. 巻 4
2. 論文標題 Drug discovery of anticancer drugs targeting methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e01021 ~ e01021
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2018.e01021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tamari Keisuke, Konno Masamitsu, Asai Ayumu, Koseki Jun, Hayashi Kazuhiko, Kawamoto Koichi, Murai Noriyuki, Matsufuji Senya, Isohashi Fumiaki, Satoh Taroh, Goto Noriko, Tanaka Shinji, Doki Yuichiro, Mori Masaki, Ogawa Kazuhiko, Ishii Hideshi	4. 巻 4
2. 論文標題 Polyamine flux suppresses histone lysine demethylases and enhances ID1 expression in cancer stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41420-018-0117-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takaoka Yuji, Konno Masamitsu, Koseki Jun, Colvin Hugh, Asai Ayumu, Tamari Keisuke, Satoh Taroh, Mori Masaki, Doki Yuichiro, Ogawa Kazuhiko, Ishii Hideshi	4. 巻 110
2. 論文標題 Mitochondrial pyruvate carrier 1 expression controls cancer epithelial mesenchymal transition and radioresistance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1331 ~ 1339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13980	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohshiro Takahito, Komoto Yuuki, Konno Masamitsu, Koseki Jun, Asai Ayumu, Ishii Hideshi, Taniguchi Masateru	4. 巻 9
2. 論文標題 Direct Analysis of Incorporation of an Anticancer Drug into DNA at Single-Molecule Resolution	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3886
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40504-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 浅井歩、今野雅允、小関準、佐藤太郎、後藤典子、土岐祐一郎、森正樹、石井秀始
2. 発表標題 膵がんの悪性化に関わるエピトランスクリプトーム制御
3. 学会等名 第6回がん代謝研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	石井 秀始 (Ishii Hideshi)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	今野 雅允 (Konno Masamitsu)		