

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07688

研究課題名(和文) RNA修飾によるがん悪性化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the relationship between cancer malignancy and RNA modification

研究代表者

今野 雅允 (Konno, Masamitsu)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・助教

研究者番号：80618207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓がん全症例の5年生存率は7%、診断時からの平均生存期間は14ヶ月と大変深刻な状況にある。従って治療成績向上のために、膵がん悪性化のメカニズムに基づいた新規抗がん剤の開発は喫緊の課題である。我々はこれまでの研究でRNAのメチル化酵素の一つであるMETTL3の発現が膵がんの悪性化に繋がることを明らかにしている。そこで本研究ではRNAのメチル化酵素METTL3の阻害剤開発及びコンパニオン診断薬として忍容性の高い症例を診断するためのマイクロRNAマーカーの開発を目的とした。METTL3阻害剤のスクリーニングおよびマウスを用いた抗腫瘍活性の評価を行った結果、リード化合物数種類取得に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

METTL3の発現が高い膵臓がんマウスの腫瘍は増殖が非常に速く、転移も引き起こし、生存率が非常に悪いことが明らかとなった。さらに詳細なメカニズム解析を行ったところ、METTL3は特に免疫関連遺伝子のmRNAのメチル化を亢進しており、その結果PD1, PDL1を含む免疫関連タンパク質の発現量を増加させ、自己免疫からの攻撃を回避するシステムを獲得していることが明らかとなった。つまり本研究で獲得したMETTL3の阻害剤はPD1, PDL1, CTLA4 抗体に続く新たながん免疫製剤となる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：pancreatic cancer's 5-year survival rate is about 7% and the time to survive from the time of diagnosis is 14 months. So pancreatic cancer is a very serious. Therefore, the development of novel anticancer agents based on the mechanism of pancreatic cancer malignant transformation is an urgent and pressing issue to improve treatment outcomes. In our previous studies, we have shown that the expression of METTL3, an RNA methyltransferase, leads to the malignant transformation of pancreatic cancer. So in this study, we aimed to develop inhibitors of the RNA methyltransferase METTL3. We tried to screening for METTL3 inhibitors and evaluated their antitumor activity in mice. As a result, we succeeded in obtaining several lead compounds that inhibit METTL3.

研究分野：エピトランスクリプトーム

キーワード：膵臓がん エピトランスクリプトーム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

エピトランスクリプトームは膵臓がんの悪性化に必須である

エピトランスクリプトームとは RNA の転写後修飾のことである。真核生物における RNA の転写後修飾の種類は 130 種類以上同定されている。RNA 修飾の中で最も頻度の高い修飾は N6-メチルアデノシン (m6A) である。m6A 修飾は、可逆的な反応であり、ヒトでは METTL3 がメチル化酵素(Writer タンパク質)として機能し、アデノシンからメチル化されて m6A へと変換される。一方で、FTO や ALKBH5 は脱メチル化酵素(Eraser タンパク質)として機能し、m6A がアデノシンへと脱メチル化することが知られている。m6A 修飾は Reader タンパク質によって認識され、スプライシングの変化やタンパク質翻訳の促進または抑制されることが知られている。具体的には HnRNPA1 タンパク質による m6A の認識はスプライシングの変化を引き起こし、YTHDF1 タンパク質による m6A の認識は翻訳促進、YTHDF1 タンパク質による m6A の認識は翻訳抑制を引き起こすことが知られている。近年 mRNA、ncRNA にも RNA 修飾の存在が報告され始めており、様々な疾患と RNA 修飾の関係が盛んに研究されている。しかし、がんの悪性化と RNA 修飾の関係については未だはっきりとした知見が得られていないのが現状であった。

我々はこれまでにエピトランスクリプトームの中でも m6A と消化器がんの悪性化との関係を明らかにするため、RNA メチル化酵素 METTL3 の発現と消化器がんの予後の相関解析を行った。その結果、消化器がんの中でも特に膵臓がんにおいて METTL3 の発現と予後に相関が見られることを明らかにした。すなわち METTL3 の発現が高い膵臓がん患者はその予後が有意に悪いことが示された。次に METTL3 が膵臓がん悪性化を促進させるメカニズムを解明するために膵臓がんの細胞株を用いて検討を行った。その結果、METTL3 低発現の膵臓がん細胞では抗がん剤への感受性が増強し、さらにスフェア形成能が低下することから膵臓がんにおける幹細胞性が低下していることが明らかとなった(Int. J. Oncol. 2018)。さらに生体内における METTL3 の機能を検討するために、膵臓がんの自然発がんマウス(EL マウス)に METTL3 トランスジェニックマウス(Tg マウス)を掛け合わせたマウス(WTg マウス)を作成した。その結果、Tg マウスは発がんしないことから、m6A は発がんには関与しないことが明らかとなった。さらに、EL1 マウスと WTg マウスの腫瘍を比較すると、WTg マウスの腫瘍は増殖が非常に速く、転移も引き起こし、生存率が非常に悪いことが明らかとなった。従って METTL3 はアデニンのメチル化を介して生体内においてもがんの悪性化に寄与することが明らかになった。

### 2. 研究の目的

RNA メチル化酵素 METTL3 の阻害剤開発及びそのコンパニオン診断するためのエピトランスクリプトーム情報の整備を行い、コンパニオン診断薬の開発を目的とする。コンピュータを用いたインシリコスクリーニング及びそれに基づいて無細胞の翻訳系を用いた HTS を行うことで、RNA のメチル化を阻害する化合物を迅速に取得する。具体的にはナミキ商事の 500 万化合物から構造化学に基づく水分子の揺らぎを考慮したインシリコ予測を行う。その予測に基づき無細胞の翻訳系を用いた HTS を行う。HTS は、東京大学の 28 万化合物のライブラリーから開始し、大阪大学の 10 万化合物を適宜くわえながら迅速に進める。候補化合物は、膵臓がん細胞株、免疫不全マウスへ膵臓がん臨床検体移植した PDX モデル、及び膵臓がんの自然発がんマウスを用いて抗腫瘍活性を評価し、化合物の選定を進める。また、コンパニオン創薬を目指して、膵癌臨床検体の末梢血から採血した Exosome から METTL3 のコンセンサス配列を持つ候補マイクロ RNA の抽出を行う。術前、術後検体間での発現比較からコンパニオン診断するためのエピトランスクリプトーム情報の整備を目指す。

### 3. 研究の方法

平成 31 年度：メチル化酵素である METTL3 の蛋白データベース (PDB ID : 5L6D, 5L6E, 5K7M, 5K7U, 5K7W, 5IL0, 5IL1, 5IL2 [全て触媒部位]) を参照にして、構造解析と化合物予測をナミキ商事の 500 万化合物ライブラリーに対して実施した。構造から結合する低分子阻害剤を予測する。共通構造の解析、溶解性考慮、ADME 予測し、候補選定を進めた。インシリコ予測の結果をもとに、コムギ無細胞系を用い、HTS に用いる METTL3 を調製した。無細胞合成蛋白と AlphaScreen を用いて、METTL3-m6A RNA 間の相互作用を検出する HTS アッセイ系を構築した。構築した HTS アッセイ系とスクリーニング設備を用い、東大・阪大の化合物ライブラリーから阻害剤を探索する。続いて、一次スクリーニングで同定した Hit 化合物の検証を行った。各化合物あたり 5 濃度、繰り返し 4 点のタイトレーション試験を AlphaScreen 系で実施し、再現性と濃度依存性を確認した。並行して、Biacore を用いた相互作用阻害カウンターアッセイ系による Hit 化合物のバリデーションを行う。一次スクリーニングの結果次第では、さらに大きな規模で一次スクリーニングを実施した。

令和 2 年度：前年度に引き続き HTS を進めるとともに、がん病巣とリキッドバイオプシーで m6A 修飾の比較検討を行った。膵臓がん臨床検体の末梢血から採血した Exosome から miRNA を抽出し、

CLIP, RIP-seq と MALDI-TOFMS 法で、m6A 修飾を計測した。腫瘍特異的な情報を得るためには、腫瘍で特異的な Exosome を抗体 (CD9, CD63, EpiCAM, CD44EPS8, GPRC5C) で精製し、さらに腫瘍で高い群を選定する。この 2 段階により、95% 以上の標的化が可能であった。また、腫瘍の mRNA、miRNA、Exosome の miRNA から、m5C、m3C、m1A などの RIP、CLIP-seq、Writer (METTL3, Mettl14, Wtap)、Eraser (Eraser: Fto, Alkbh5)、Reader (Ythdf1, Ythdf2, Ythdf3 など) で IP-seq を実施して検討する。FFPE と新鮮材料を比較した。

令和 3 年度：前年度に引き続き、HTS を進め、リード化合物の取得を目指した。タンパク質の揺らぎを考慮したドッキング・シミュレーションにより、METTL3 の触媒ポケットにフィットする化合物の類別化を進める。共通構造の解析、溶解性考慮、ADME 予測し、AlphaScreen とフェノタイプスクリーニングと連携して候補選定を進めた。さらにフェノタイプスクリーニングとして、膵がん細胞を用いて既存の EGF 阻害剤 (セツキシマブ)・Braf 阻害薬 (ダブラフェニブ)・Mek 阻害薬 (トラメチニブ)に加えて新規化合物を暴露して、IC50 から相乗効果を検討した。さらに、これら既存阻害剤を低濃度暴露して薬剤耐性細胞を作成し、そこからオルガノイドを形成して本研究で得られた新規化合物の IC50 を評価した。Notch1, Myc, Bcl2 などの翻訳標的の阻害活性を計測する (Run-on アッセイ)。さらに免疫不全マウスへの移植 (PDX)、自然発がんマウス (PDXCre/LSL-KRAS など)を用いて抗腫瘍活性を評価し、化合物の選定を進めた。化合物の特許調査を実施し、リード化合物を取得した。

#### 4. 研究成果

上記の計画に基づき、METTL3 のタンパク質データベース (PDB) を参照して、構造解析と化合物予測を 500 万化合物ライブラリーに対して実施した。その結果、タンパク質構造から結合する低分子阻害剤の予測に成功した。

また、METTL3-m6ARNA 間の相互作用を検出する HTS アッセイ系の構築に成功した。構築した HTS アッセイ系とスクリーニング設備を用いて、東大・阪大の化合物ライブラリーから阻害剤のスクリーニングを実施した。スクリーニングにより同定された候補化合物は更なる検討を進めた。Biacore を用いた相互作用阻害カウンターアッセイ系による Hit 化合物のバリデーションを行った。さらにインシリコ解析による候補化合物の共通構造の解析、溶媒への溶解性の検討、ADME 予測を行った。また AlphaScreen とフェノタイプスクリーニングとの結果をもとに候補化合物の選定を進めた。並行してマウスを用いた抗腫瘍活性の評価も行い、これらの結果を統合して化合物の選定を進め、METTL3 阻害剤のリード化合物を数種類取得することに成功した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Yanagisawa Kiminori, Konno Masamitsu, Liu Hao, Irie Shinji, Mizushima Tsunekazu, Mori Masaki, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi, Matsusaki Michiya, Ishii Hideshi	4. 巻 9
2. 論文標題 A Four-Dimensional Organoid System to Visualize Cancer Cell Vascular Invasion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 361 ~ 361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biology9110361	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, Kawamoto Koichi, Isotani Ayako, Mori Masaki, Eguchi Hidetoshi, Doki Yuichiro, Arai Takahiro, Ishii Hideshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Hereditary pancreatitis model by blastocyst complementation in mouse	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 2061 ~ 2073
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.27595	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 Yanagisawa Kiminori, Toratani Masayasu, Asai Ayumu, Konno Masamitsu, Niioka Hirohiko, Mizushima Tsunekazu, Satoh Taroh, Miyake Jun, Ogawa Kazuhiko, Vecchione Andrea, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi, Ishii Hideshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Convolutional Neural Network Can Recognize Drug Resistance of Single Cancer Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3166 ~ 3166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21093166	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 Takeda Yu, Kobayashi Shogo, Kitakaze Masatoshi, Yamada Daisaku, Akita Hirofumi, Asai Ayumu, Konno Masamitsu, Arai Takahiro, Kitagawa Toru, Ofusa Ken, Yabumoto Masami, Hirotsu Takaaki, Vecchione Andrea, Taniguchi Masateru, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi, Ishii Hideshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Immuno-Surgical Management of Pancreatic Cancer with Analysis of Cancer Exosomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1645 ~ 1645
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9071645	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 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 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 Tsunekuni Kenta, Konno Masamitsu, Haraguchi Naotsugu, Koseki Jun, Asai Ayumu, Matsuoka Kazuaki, Kobunai Takashi, Takechi Teiji, Doki Yuichiro, Mori Masaki, Ishii Hideshi	4. 巻 9
2. 論文標題 CD44/CD133-Positive Colorectal Cancer Stem Cells are Sensitive to Trifluridine Exposure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14861
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50968-6	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 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 Koseki Jun, Konno Masamitsu, Ishii Hideshi	4. 巻 2
2. 論文標題 Computational analyses for cancer biology based on exhaustive experimental backgrounds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Drug Resistance	6. 最初と最後の頁 419 ~ 427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20517/cdr.2019.33	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 Ueda Yuji, Kawamoto Koichi, Konno Masamitsu, Noguchi Kozo, Kaifuchi Satoru, Satoh Taroh, Eguchi Hidetoshi, Doki Yuichiro, Hirotsu Takaaki, Mori Masaki, Ishii Hideshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Application of <i>C. elegans</i> cancer screening test for the detection of pancreatic tumor in genetically engineered mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 5412 ~ 5418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.27124	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 Matsushita Katsunori, Konno Masamitsu, Eguchi Hidetoshi, Asai Ayumu, Koseki Jun, Satoh Taroh, Doki Yuichiro, Mori Masaki, Ishii Hideshi, Obika Satoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 A Hydrogen Peroxide Activatable Gemcitabine Prodrug for the Selective Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemMedChem	6. 最初と最後の頁 1384 ~ 1391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cmdc.201900324	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 Konno Masamitsu, Taniguchi Masateru, Ishii Hideshi	4. 巻 110
2. 論文標題 Significant Epitranscriptomes in Heterogeneous Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2318 ~ 2327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14095	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7件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 今野雅允
2. 発表標題 RNAメチル化は膵がんの悪性化と密接に関わる
3. 学会等名 第93日本生化学会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今野雅允
2. 発表標題 Epitranscriptome, a new biomarker for early stage pancreatic cancer.
3. 学会等名 第79日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 M. Konno, H. Ishii
2. 発表標題 RNA metabolism can be a novel new bio marker for malignant gastrointestinal cancer
3. 学会等名 Cell Symposia: Regulatory RNAs(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今野 雅允、小関 準、島村 徹平、浅井 歩、石井 秀始
2. 発表標題 RNA 塩基修飾を指標とした早期膵がんの新規バイオマーカー
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今野 雅允、小関 準、島村 徹平、浅井 歩、石井 秀始
2. 発表標題 RNA 代謝ががんの悪性化を生み出す
3. 学会等名 第7回がん代謝研究会 in 仙台
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今野 雅允、石井 秀始
2. 発表標題 エピトランスクリプトーム – 消化器がんの新規バイオマーカー –
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小関 準、今野 雅允、浅井 歩、堀江 尚宏、常國 健太、小比賀 聡、石井 秀始
2. 発表標題 フッ素置換基を有した核酸分子が及ぼすDNA立体構造変化と内部相互作用変化に対する理論解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年
4. 発表年 2019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 分担者	石井 秀始  (Ishii Hideshi)  (10280736)	大阪大学・医学系研究科・特任教授(常勤)   (14401)	
研究 分担者	小関 準  (Koseki Jun)  (20616669)	名古屋大学・医学系研究科・准教授   (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------