

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06997

研究課題名(和文) 精密医療における修飾核酸プロファイリング法の開発

研究課題名(英文) Development of modified nucleoside profiling methods in precision medicine

研究代表者

松本 洋太郎 (Matsumoto, Yotaro)

東北大学・薬学研究科・講師

研究者番号：90420041

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)：LC-MS/MSを用いた修飾核酸プロファイルによる新たな疾患診断法の開発を目指した。まず、修飾核酸標品および安定同位体の合成を行った。これにより、以前まで定量ができなかった修飾核酸についても検量線を作成することができ、さらにはヒト血漿中において精密定量を実現した。構築した定量系を肺がん患者血漿サンプルに適用し、修飾ヌクレオシド定量値をロジスティック回帰分析に付した結果、既存の肺がんバイオマーカーと比べて優れた診断モデルであることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LC-MSを用いた修飾核酸の分析では、生体試料のマトリックス効果の影響が避けられず、分析適用範囲が限られていた。本研究によりこの問題を克服した修飾核酸一斉定量系を用いることで、バイオマーカー探索や病態把握が可能であることが示唆された。修飾核酸メタボロミクスに新たな方法を提案できるものと考えている。修飾核酸と生体内機能や疾患との関連の研究が多く進められており、網羅性およびハイスループット性の高い本定量系は様々な研究において重要な役割を担うと期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose is to develop a new disease diagnostic method by modified nucleosides profile using LC-MS/MS. Modified nucleosides for standard and its stable isotopes for internal standard were synthesized in this study. As a result, it was possible to prepare a standard curve for modified nucleosides, which could not be quantified before, and to achieve precise quantification in human plasma.

The constructed quantitative system was applied to lung cancer patient plasma samples. A logistic regression analysis of the modified nucleoside quantification values showed a superior diagnostic model compared to existing lung cancer biomarkers.

This quantitative system for modified nucleosides with high comprehensiveness and high throughput is expected to play an important role in biomarker research and elucidation of pathology.

研究分野：分析化学

キーワード：修飾核酸 修飾ヌクレオシド LC-MS/MS プロファイリング 安定同位体 バイオマーカー 肺がん R
OC曲線

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

修飾ヌクレオシド(修飾核酸)は、RNAを構成するアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルの基本的な核酸に対し、メチル化やアセチル化、チオ化など様々な転写後修飾が加わることで生じる。8割以上の修飾核酸が存在するとされる tRNAをはじめ、mRNA や rRNA、miRNA においても見出されており、140種類を超える修飾核酸が報告されている (<http://modomics.genesilico.pl/>)。修飾核酸は RNA の構造、輸送、安定性、スプライシングなど、様々な RNA 機能調節に関与することが徐々に明らかにされつつある一方で、疾患メカニズムの一端を担う分子であることが指摘されている。例えば、がんにおいて tRNA のターンオーバーが亢進することや、がん患者の尿中修飾核酸量ががんの進行度に応じて変動することが示されている。他にも、固形がん・血液がんの診断マーカー、あるいは酸化ストレス・アルキル化ストレスに関連する疾患のマーカー候補として現在までに報告されている(図1)。このように修飾核酸は身体の状態を反映し、種々の疾患と関連することが示唆されており、修飾核酸の包括的な分析は診断や鑑別、バイオマーカーの開発に有用な手段となると期待されている。

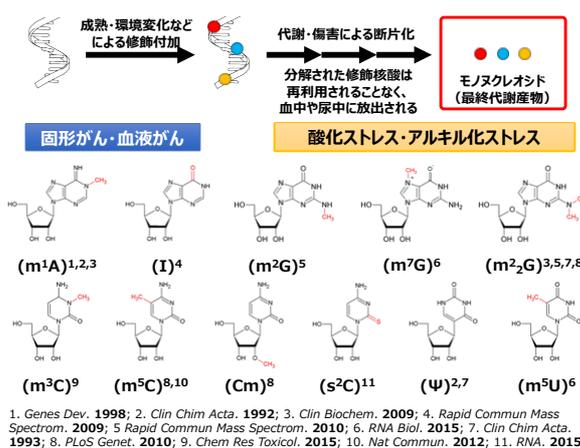


図1 バイオマーカー候補としての修飾核酸

修飾核酸の定量手法としては、その優れた汎用性・選択性の点から LC-MS あるいは LC-MS/MS が用いられ、これまでに複数の研究グループから修飾核酸一斉定量法が報告されている。しかし、分離選択性、定量範囲の実用性、迅速性において課題があり、修飾核酸に関する詳細な解析に応用できていなかった。

この様な背景から、申請者は LC-MS/MS を用いた 15 種類修飾核酸同時分析法を構築し(*J Anal Sci Tech.* 2017)、既報と比べて迅速性と、特に異性体分離に優れた方法を報告したが、血液由来マトリックスの影響を補正できず、生体試料に本法を適用するには制限があった。生体内の修飾核酸一斉定量に向けてはマトリックス効果の影響は避けられないことが予想される。一般に内因性物質の定量には内部標準物質として安定同位体を用いることが望ましく、これらの問題を解決するためにはすべての修飾核酸の安定同位体を用意することが必要であった。

2. 研究の目的

修飾核酸の標品の合成、およびその安定同位体を合成し内部標準物質として用いることで、生体試料に適用可能な修飾核酸高感度一斉定量系を構築することを目指した。

3. 研究の方法

既知の修飾核酸の合成法を参考に、修飾核酸およびそれらの安定同位体合成を行う。化合物同定には NMR、HRMS、および標品との HPLC 溶出時間にて確認する。測定項目である修飾核酸の LC 分離条件および MS 検出条件の最適化を行う。得られた安定同位体を用いて修飾核酸の定量系を構築する。LC は ACQUITY UPLC I-Class System (Waters)、MS は TSQ Endura (Thermo Fisher Scientific) を使用する。開発した LC-MS/MS による修飾核酸一斉定量系を肺がん患者血漿検体に適用する。東北大学病院の肺がん患者 101 人とボランティアによる健康者 70 人の血漿サンプル 20 μL を測定し、修飾核酸血中濃度についてロジスティック回帰分析を行う。

4. 研究成果

入手困難な安定同位体について有機合成を行い、修飾核酸は 9 種(D, m³U, Am, m¹I, m⁷I, ac⁴C, m¹G, g⁶A, t⁶A)、安定同位体については 17 種(C-d₃, D-d₃, Cm-d₃, m³C-d₃, m⁵C-d₃, m³U-d₃, m⁵U-d₃, Am-d₃, m¹I-d₃, m⁷I-d₃, ac⁴C-d₃, m¹G-d₃, m²G-d₃, m⁷G-d₃, m²-²G-d₆, g⁶A-¹³C₂, ¹⁵N, t⁶A-¹³C₄, ¹⁵N)、すべてにおいて NMR、HRMS にて化合物同定を行い、単一化合物であることを確認した。合成化合物を用いて MS 検出条件ならびに

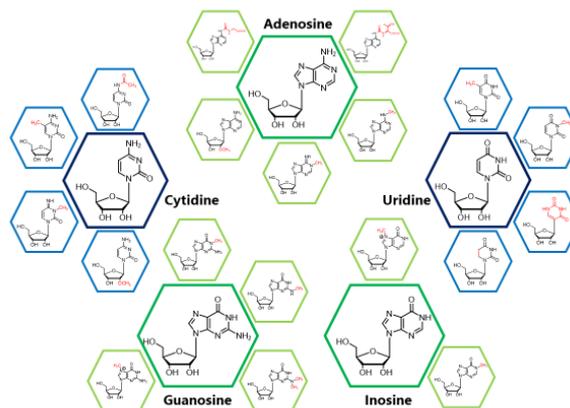


図2 分析対象の修飾核酸とその安定同位体

LC 分離条件の最適化を行い、各修飾核酸及び安定同位体は良好な分離およびクロマトグラムを示した(図2、図3)。これらの化合物を用いて修飾核酸一斉定量系を構築した。その結果、安定同位体を内標準物質として使用することで直線性の高い検量線を作成することができた。また、ヒトプール血漿で添加回収試験を行い、19種の修飾核酸がバリデーションガイドライン要件を満たした。

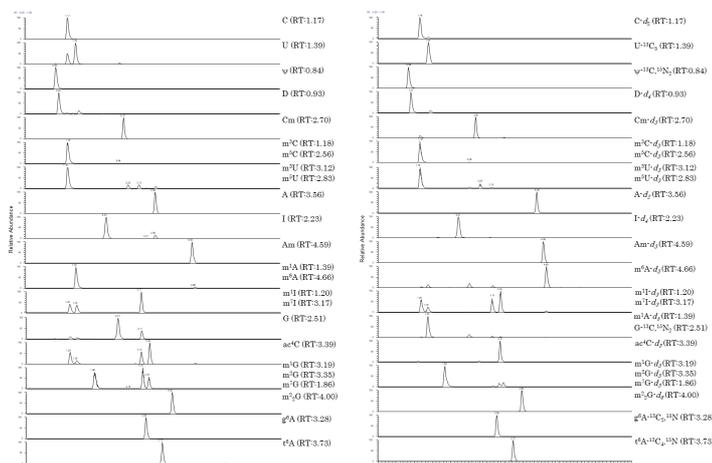


図3 修飾核酸とその安定同位体の LC-MS/MS クロマトグラム

開発した一斉定量系を肺がん患者血漿検体に適用した。測定した19種の修飾核酸のうち、患者群と健常者群を区別できる肺がんバイオマーカー候補となりうるものを、変数増減法 (Stepwise procedure) によって選定した解析を行ったところ、1-Methyladenosine、N4-Acetylcytidine、N2,N2-Dimethylguanosine、N6-Methyladenosine の4つの修飾核酸が選択された。

続いて、選択された4種の修飾核酸を用いてロジスティック回帰分析を行った。トレーニングセットを用いた肺がん診断モデルの予測式は (1) (2) となった。

$$p = 1 / (1 + e^{-(-5.37 + a)}) \dots \dots \dots (1)$$

$$a = 0.0531 \times (m1A) + 0.00952 \times (ac4C) + 0.349 \times (m2m2 G) - 22.8 \times (m6A) + 0.0861 \times (年齢) + (性別) (F=0.370, M=-0.370) + (喫煙歴) (有=1.22, 無=-1.22) \dots \dots \dots (2)$$

ここで、感度が陽性的中率、特異度が陰性的中率、精度が陽性および陰性的中率といえ、精度の値が最も高くなる点での閾値をカットオフ値とする (カットオフ値=0.5395)。

トレーニングセットにて構築された診断モデル式およびカットオフ値をバリデーションセットへと当てはめる。すなわち、バリデーションセットサンプルの測定値から (1) 式の p 値を算出し、p 値が 0.5464 以上の時、肺がん患者であると判定される。この判定の正解率から感度、特異度、精度、AUC が求められ、これが本診断モデルの評価となる。結果として、本診断モデルの感度、特異度、精度、AUC はそれぞれ 84.0% (21/25)、88.9% (16/18)、86.0% (37/43)、0.936 となった。バリデーションセットにおける ROC 曲線を図4に示す。

本研究で構築した肺がん診断モデルは、感度、特異度、精度、AUC すべてのパラメーターで既存のがんバイオマーカーと比べて遜色がなく、特に AUC に関して、0.9 を上回る診断法はとて優れていると評価される。現在肺がんバイオマーカーとして報告されている CEA、SCAA、bFGF、CYFRA 21-1、それぞれの判別能と比べても、本診断モデルが有用であることがいえる。

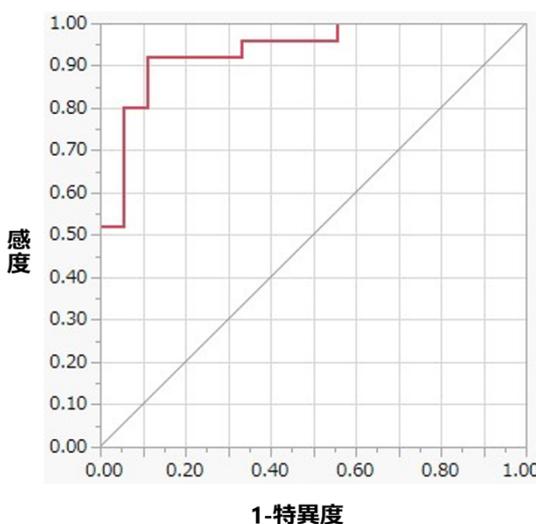


図4 肺がん診断モデル式から算出した ROC 曲線

(1-Methyladenosine、N4-Acetylcytidine、N2,N2-Dimethylguanosine、N6-Methyladenosine の4つの修飾核酸の濃度を診断モデル式に代入し、カットオフ値=0.5395を閾値として判定する。感度 84.0%、特異度 88.9%、精度 86.0%、AUC 0.936)

以上、構築した分析系が19種の修飾核酸量を高精度に評価できること、そして新たな肺がん診断の可能性を示すことができた。今後は本測定系を用いてがんをはじめ様々な疾患の診断法への応用を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------