

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16414

研究課題名(和文) RNA修飾情報に基づいたがん原発巣を特定するバイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Development of biomarkers to identify primary cancer sites based on RNA modification information

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)：本研究ではRNA修飾の検出によるがん診断法を様々ながん種に適用するために、単分子シーケンサーによるRNA修飾の検出技術の確立及び様々な臨床検体におけるRNA修飾の計測に取り組んだ。その結果、N6-Methyladenosine (m6A)や5-methylcytosine(5mC)などのRNA修飾のコンダクタンス値を取得し、無修飾拡散との判別技術を確立した。消化器系がん、婦人科系がん、泌尿器系がんなど計138検体におけるRNA修飾を計測済みであり、既存の技術では同定できなかったRNA修飾の同定も成功した。現在、がん種特異的なRNA修飾を解析中であり、その成果を公表する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の計測技術ではRNA修飾を網羅的に計測することは不可能だった。それゆえ、生体内におけるRNA修飾の役割は未だ不明な点が多い。本研究では単分子シーケンサーでRNA修飾技術を確立することで様々なRNA修飾を計測することが可能となり、生命科学の発展に大きく貢献するものである。

また、RNA修飾の検出による癌診断は消化器癌の特定のRNA修飾のみでしか検討されていなかった。本研究で様々なRNA修飾を様々な癌種で計測することで、癌種特異的なRNA修飾を同定し、様々な癌種においてRNA修飾の検出による癌診断を可能にすることは癌治療成績の向上に繋がり、临床上・経済上において波及効果をもたらすものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, in order to apply the cancer diagnostic method by detection of RNA modifications to various cancer types, we worked on establishment of detection technology of RNA modifications by single-molecule sequencing and measurement of RNA modifications in various clinical specimens. As a result, we obtained conductance values of RNA modifications such as N6-methyladenosine (m6A) and 5-methylcytosine (5mC), and established a technique to discriminate them from unmodified nucleic acid. The RNA modifications in a total of 138 samples including gastrointestinal, gynecological, and urological cancers have already been measured, and RNA modifications that could not be detected by existing technologies have been successfully detected. We are currently analyzing cancer-specific RNA modifications and would publish the results.

研究分野：がん

キーワード：RNA修飾 がん バイオマーカー 単分子シーケンサー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) がんにおけるエピトランスクリプトーム

RNA 修飾 (エピトランスクリプトーム) は 130 種類以上存在することが報告されており、これらのエピトランスクリプトームは生理学的機能を有し、疾患の発症・増悪にも関与することが見出されてきた [1]。しかし、それぞれの転写産物上にどんな修飾が存在しているかは未だほとんど明らかになっていない。また、がんにおけるエピトランスクリプトームはがん種によって修飾の種類・位置が異なることも報告されており、がんにおけるエピトランスクリプトームの役割・機能を明らかにするためには、がん種毎にエピトランスクリプトームプロファイルと比較する必要があるが、がん種毎のエピトランスクリプトームプロファイルについては未だ明らかにされていない [2]。

(2) エピトランスクリプトームの検出方法

現在、エピトランスクリプトームを網羅的に検出できる方法は未だ存在しない。一方、我々がこれまでに開発したトンネル電流を応用した単分子シーケンサーは試料中に存在する分子を全て検出可能であるため、塩基配列及びエピトランスクリプトームを網羅的に読むことが可能である [3]。

2. 研究の目的

(1) エピトランスクリプトーム検出技術の確立：単分子シーケンサーによるエピトランスクリプトームの検出技術を確立する。

(2) がん患者試料からエピトランスクリプトームの検出：様々ながん患者の切除腫瘍及び末梢血中の miRNA からトンネルシーケンサーによって修飾を検出する。

(3) エピトランスクリプトームによるがん種横断的プロファイリング：様々ながん種におけるエピトランスクリプトーム情報を統計解析及び機械学習によって、がん種横断的なプロファイリングを行う。

3. 研究の方法

(1) エピトランスクリプトーム検出技術の確立

高精度ながん診断に有用である m6A 及び 5-メチルシトシン (5mC) をはじめとするエピトランスクリプトームの合成核酸を単分子シーケンサーで読んだ際の電位を機械学習することにより、無修飾及び他の修飾と判別する技術を確立する。

(2) がん患者試料からエピトランスクリプトームの検出

様々ながん種の腫瘍及び末梢血から miRNA を抽出し、単分子シーケンサーを用いて、エピトランスクリプトームを検出する。

(3) エピトランスクリプトームによるがん種横断的プロファイリング

統計解析及び機械学習により、様々ながん種毎のエピトランスクリプトーム情報をプロファイリングする。

4. 研究成果

(1) エピトランスクリプトーム検出技術の確立

m6A や 5-メチルシトシン(5mC)などの種々のエピトランスクリプトームの合成核酸を化学合成し、単分子シーケンサーでそれぞれのエピトランスクリプトームのコンダクタンス値を取得した。その結果、m6A だけでなく、5mC をはじめとするその他のエピトランスクリプトームにおいても無修飾核酸と判別することに成功し、エピトランスクリプトームの判別技術を確立した(図1)。

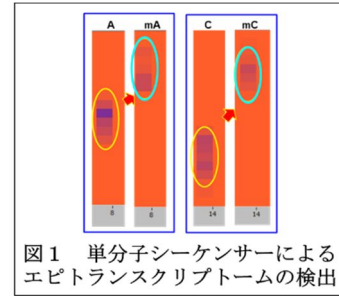


図1 単分子シーケンサーによるエピトランスクリプトームの検出

(2) がん患者試料からエピトランスクリプトームの検出

消化器系がん、婦人科系がん、泌尿器系がんなど計138検体からRNAを抽出し、単分子シーケンサーで様々な転写物に対してコンダクタンス値を取得した。その結果、これまで m6A が存在することで知られていた miR-200c において 5mC 修飾も検出され、1つの転写物上から複数のエピトランスクリプトームが存在することが明らかとなった(図2)。また、以前に我々は質量分析によって let-7a の#19 における

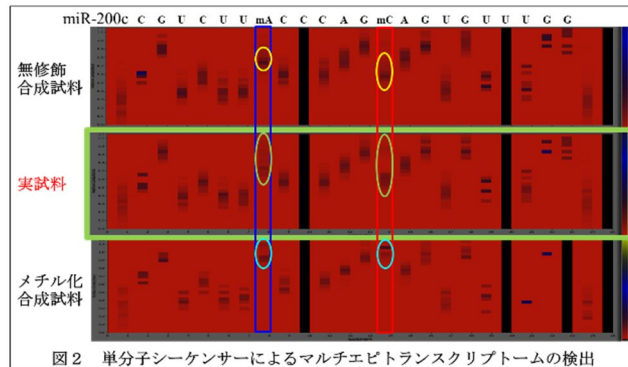


図2 単分子シーケンサーによるマルチエピトランスクリプトームの検出

m6A を同定していたが、今回単分子シーケンサーでエピトランスクリプトームを計測することで、新たに#10, #17 についても m6A を検出することに成功した。このことは単分子シーケンサーが質量分析よりも高感度にエピトランスクリプトームを検出可能であることを示している(図3)。本研究の成果の一部は既に原著論文として公表されている [4]。

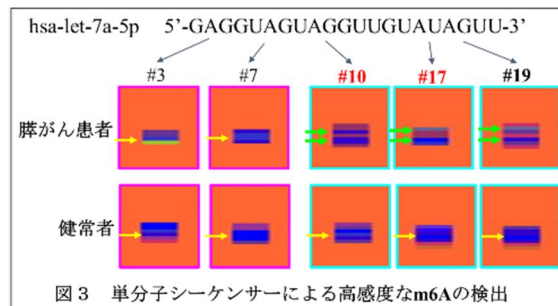


図3 単分子シーケンサーによる高感度なm6Aの検出

(3) エピトランスクリプトームによるがん種横断的プロファイリング

がん患者検体及び健常者から得られたエピトランスクリプトーム情報を解析することで、既に複数のがん患者特異的エピトランスクリプトームを同定している。現在はがん種特異的な RNA 修飾の同定に取り組んでおり、今後、原著論文等で本研究の成果を公表する予定である。

<引用文献>

- [1] Jiang Q, Crews LA, Holm F, et al. RNA editing-dependent epitranscriptome diversity in cancer stem cells. Nat Rev Cancer. (2017) 17(6):381-392. doi: 10.1038/nrc.2017.23.
- [2] Deng X, Su R, Weng H, et al. RNA N6-methyladenosine modification in cancers: current status and perspectives. Cell Res. (2018) 28(5):507-517. doi: 10.1038/s41422-018-0034-6.
- [3] Tsutsui M, Taniguchi M, Yokota K, et al. Identifying single nucleotides by tunnelling current. Nat Nanotechnol. (2010) 5(4):286-90. doi: 10.1038/nnano.2010.42.
- [4] Ohshiro T, Konno M, Asai A, et al. Single-molecule RNA sequencing for simultaneous detection of m6A and 5mC. Sci Rep. (2021) 11(1):19304. doi: 10.1038/s41598-021-98805-z.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Asai Ayumu, Konno Masamitsu, Ozaki Miyuki, Otsuka Chihiro, Vecchione Andrea, Arai Takahiro, Kitagawa Toru, Ofusa Ken, Yabumoto Masami, Hirotsu Takaaki, Taniguchi Masateru, Eguchi Hidetoshi, Doki Yuichiro, Ishii Hideshi	4. 巻 21
2. 論文標題 COVID-19 Drug Discovery Using Intensive Approaches	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2839 ~ 2839
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21082839	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Konno Masamitsu, Asai Ayumu, Kitagawa Toru, Yabumoto Masami, Ofusa Ken, Arai Takahiro, Hirotsu Takaaki, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi, Ishii Hideshi	4. 巻 10
2. 論文標題 State-of-the-Art Technology of Model Organisms for Current Human Medicine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 392 ~ 392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics10060392	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔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
研究協力者	今野 雅允 (Konno Masamitsu)		
研究協力者	大城 敬人 (Ohshiro Takahito)		
研究協力者	小本 祐貴 (Komoto Yuki)		
研究協力者	江口 英利 (Eguchi Hidetoshi)		

6. 研究組織（つづき）

	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	土岐 祐一郎 (Doki Yuichiro)		
研究協力者	谷口 正輝 (Taniguchi Masateru)		
研究協力者	石井 秀始 (Ishii Hideshi)		

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