

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22848

研究課題名（和文）血中マイクロRNA編集を用いた大腸癌の新規リキッドバイオプシー技術の確立

研究課題名（英文）Establishment of a Novel Liquid Biopsy Technique for Colorectal Cancer Using MicroRNA Editing in Blood

研究代表者

武田 正（Takeda, Sho）

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：20872980

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：癌細胞は治療の過程で性質が変化していくため、原発巣の情報がそのまま転移巣でも同じ確証はない。我々は、これまでのRNA編集の解析結果から、リキッドバイオプシーの概念がDNAのみならずRNA編集にも応用できるのではないかと考えた。しかし、次世代シーケンサーを使用したRNA編集解析は高価なうえ、RNAが多くないと解析できず、血液に含まれている腫瘍由来の微量な編集型miRNAを検出することはできなかった。我々は、TaqmanPCR primerを新規に開発することで、この技術的な課題を克服することができた。微量のRNAからでも、腫瘍細胞のマイクロRNAのRNA編集を検出することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化器癌では、RNA編集酵素のAdenosine deaminase acting on RNA 1 (ADAR1)の発現が上昇し、標的となるRNAの塩基置換が促進されることで、癌の悪性度が増す。RNA編集は主にlong RNAにつき解析されてきたが、近年、癌におけるマイクロRNA編集の上昇が注目され始めた。マイクロRNAは血液中でも安定して存在しており、リキッドバイオプシーの対象として最適である。我々は、血液中でも安定して存在するマイクロRNAのRNA編集の解析をTaqmanPCRで行う方法を完成させた。大腸癌患者の血液におけるmiRNA editingを実際に解析できるようになった。

研究成果の概要（英文）：Since cancer cells change their properties during the course of treatment, there is no assurance that the information from the primary tumor is the same in the metastases as it is in the metastases. Based on the results of our previous RNA editing analysis, we thought that the concept of liquid biopsy could be applied not only to DNA but also to RNA editing. However, RNA editing analysis using next-generation sequencers is expensive and requires a large amount of RNA to be analyzed, making it impossible to detect the small amount of edited miRNAs derived from tumors in blood.

We were able to overcome this technical challenge by developing a novel TaqmanPCR primer. It is now possible to detect RNA editing of microRNAs in tumor cells even from minute amounts of RNA.

研究分野：大腸癌のエピジェネティクス

キーワード：RNA編集 大腸癌 PCR 上皮間葉形質転換

1. 研究開始当初の背景

近年、大腸癌の治療において、遺伝子プロファイルに基づく抗癌剤の選択がガイドラインに収載され、特に分子標的薬の選択に用いられている。たとえば、RAS/BRAF 遺伝子変異のない左側大腸癌でのみ、抗 EGFR 抗体を使用することで予後の延長が図れることが、FIRE-3 試験の結果で明らかになった。しかし、癌細胞は治療の過程で性質が変化していくため、原発巣の情報がそのまま転移巣でも同じ確証はない。このため、血中 DNA を用い、遺伝子変異を経時的に解析することで転移巣の癌細胞の性質の変化を捉える「リキッドバイオプシー」が提唱されてきた。我々は、これまでの RNA 編集の解析結果から、この概念が DNA のみならず RNA 編集にも応用できるのではないかと考えた。

原発巣や転移巣から血中に遊離される RNA の編集を解析すれば、原発巣や転移巣で生じている RNA 編集を、低侵襲かつ経時的に解析できる。

long RNA は RNA 分解酵素に対し不安定で、リキッドバイオプシーには不向きなため、20-25 塩基対のマイクロ RNA 編集を対象とする。long RNA と違い、マイクロ RNA は安定しており、血液中からも検出可能である。

2. 研究の目的

発癌には多彩な epigenetic な変化が関わっており、RNA 編集はその一つである。RNA 編集によって RNA 転写後の塩基の修飾が行われ、タンパクの構造変化を引き起こす。消化器癌では、RNA 編集酵素の一つである Adenosine deaminase acting on RNA 1 (ADAR1) の発現が上昇し、標的となる RNA の塩基置換が促進されることで、癌の悪性度が増す。RNA 編集は主に long RNA につき解析されてきたが、近年、癌におけるマイクロ RNA 編集の上昇が注目され始めた。マイクロ RNA は血液中でも安定して存在しており、リキッドバイオプシーの対象として最適である。我々は、血液中で安定して存在するマイクロ RNA の RNA 編集に着目し、大腸癌における新規リキッドバイオプシーの技術を確立したいと考えた。

3. 研究の方法

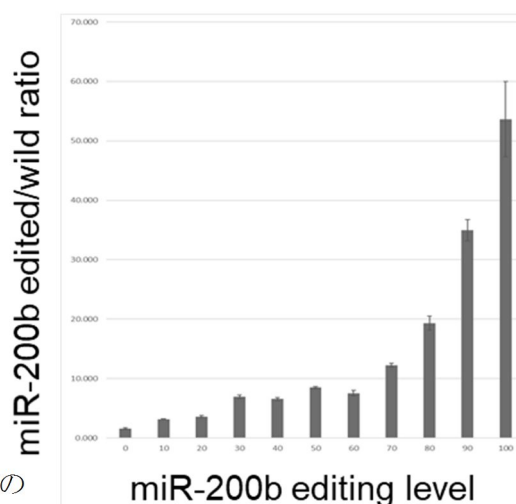
最も問題になるのは、再現性のある簡便な RNA 編集の解析方法である。通常、RNA 編集を網羅的に解析するには次世代シーケンサー (NGS) を用いた deep sequencing が必須である。本研究では、より安価で再現性の高い、RNA editing site specific qPCR (RESS-qPCR) を用い、RNA 編集の解析を行う。RESS-qPCR はリアルタイム PCR ベースの技術であり、安価で高感度であるため、ターゲットが決まっている場合の RNA 編集の解析には最適な技術である。

4. 研究成果 プライマー設計

我々はまず、上皮間葉形質転換において重要な miR-200b の RNA 編集解析用プライマーの設計を行った。miR-200b は EMT を抑制する働きがあるが、RNA 編集が加わるとその活性が落ち、EMT が促進される。これを血液で確認することで、原発巣や転移巣の RNA 編集の変化や EMT の強度を非侵襲的に得ることができる。

Taqman PCR プライマーによる miR-200b の editing level の計測を行った。AZIN1 の RESS-qPCR ほどの editing の識別能力は発揮できないものの、editing level の定量には耐えられる結果であった (右図)。

しかし、低レベルの editing level の定量には課題が残る結果である。さらなるプライマーの改良が必要と思われた。



そこで、代替手段として、Two-tailed PCR を用いて、miR-200b の editing の計測が可能か検討した。Wild type と edited type の交差反応性を計測してみると、Cq 値の差が 4.9 であった。つまり、1/32 が識別の限界値であるから、editing level の計測には

耐えられないものと判断した（下図）。

以上の結果をもとに、今後は Taqman PCR をもとに miR-200b の RNA 編集の解析を進めることとした。

hsa-miR-200b-3p_wild_Fw6+Rv2				
	Cq	Cq	Average	Δ Cq
Correct template	22.48	23.36	22.9	
Cross-reaction	27.15	26.88	27.0	4.1

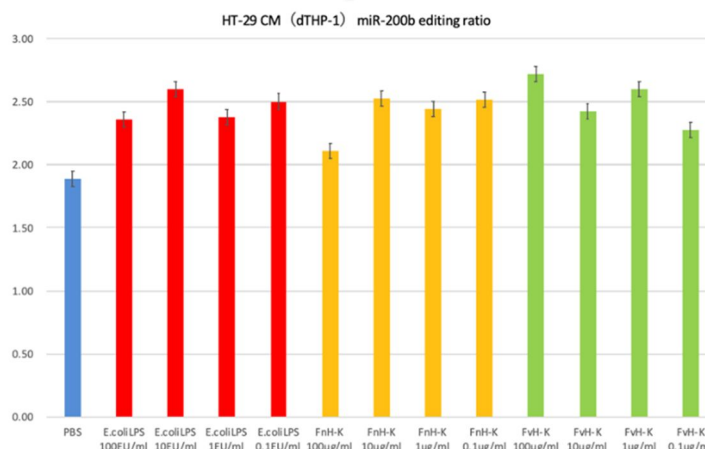
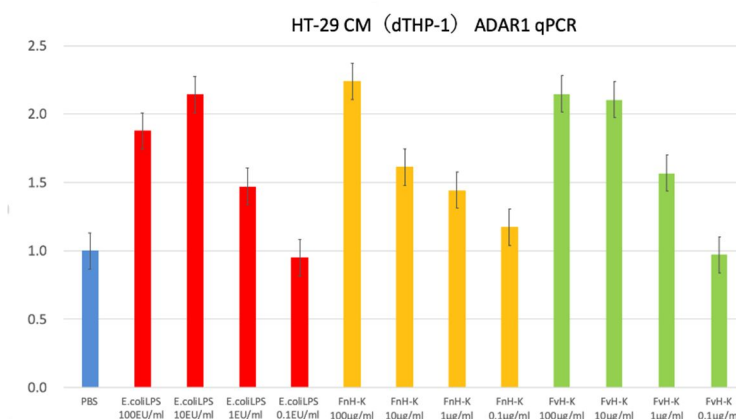
プライマーの性能試験

次に、実際に EMT を生じているがん細胞におけるマイクロ RNA の RNA 編集を検出できるか解析してみた。

EMT 誘導方法には、TGF を加える、抗がん剤を加えるなどの方法があるが、我々は最近、microbiome からの液性因子による EMT 誘導に注目している。このため、単球系腫瘍細胞 THP-1 に Fusobacterium 属由来の LPS を添加し、その培養上清をがん細胞株 HT29 に加えた。（我々はこれまでの報告で、この方法でがん細胞に EMT を生じることを報告している）

すると、RNA 編集酵素 ADAR1 の発現が誘導された。これはおそらく、THP1 から分泌された 1 型インターフェロンによるものであろう。

ADAR1 は miR-200b の editing を行うことがすでに知られているが、我々の設計した新型プライマーは、miR-200b の editing の上昇を検出することができた。LPS を加えた THP1 上清は、RNA 編集をおおよそ倍にすることができた。



結論

これまで、マイクロ RNA の RNA 編集の研究は、long RNA と比較し逆転写プロセスが複雑であることが問題となり、ほとんど進んでこなかった。NGS を使用した RNA 編集解析は RNA が多くないと解析できず、血液に含まれている腫瘍由来の編集型 miRNA を検出することはできなかった。

我々は、TaqmanPCR primer を新規に開発することで、この技術的な課題を克服することができた。

課題としては、様々なプライマーパターンを試したことで時間と資金を消費してしまい、ヒト血液サンプルでの解析に手間取ってしまった。現在、大腸がん患者の血液をバイオバンクから取り寄せ、RNA を抽出し、マイクロ RNA と long RNA の RNA 編集を解析している。進行がん患者の血液では RNA 編集レベルが高まっている感触を得ているため、さらに症例数を増やして解析しているところである。データ解析が終了次第、論文化する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 重安 邦俊, 奥川 喜永, 畑 七々子, 梅田 響, 武田 正
2. 発表標題 腸内細菌が誘導するRNA編集は炎症関連発癌におけるfield cancerizationを促進する
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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