

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05664

研究課題名(和文)高精度がん診断ためのマイクロRNAメチル化機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of microRNA methylation mechanism for high precision cancer diagnosis

研究代表者

西田 尚弘(NISHIDA, Naohiro)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50588118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,400,000円

研究成果の概要(和文)：最近のRNAメチル化機構の研究からRNAはDNAやヒストン同様そのメチル化状態をダイナミックに変換させ、これが遺伝子発現の重要な調節因子として機能していることが知られるようになった。本研究ではさらに癌におけるメチル化miRNAの包括的プロファイリングによりその臨床的意義を明らかにし、メチル化を考慮することでmiRNAの癌バイオマーカーとしての精度向上を図った。その結果、マイクロRNAメチル化機構を明らかにし高精度がん診断のための基盤を構築した。

研究成果の概要(英文)：By recent studies of the RNA methylation mechanism, it has been known that the RNA functions as an important regulator of gene expression by dynamically converting its methylation state as the DNA and histone do. In the present study, we then clarified the clinical significance of methylated miRNAs by the comprehensive profiling in cancer and improved accuracy of miRNAs as cancer biomarkers by studying the methylation. As a result, the mechanism of microRNA methylation was clarified and we constructed further the foundation for accurate diagnosis in the precision medicine.

研究分野：遺伝子機能解析

キーワード：癌 臨床 遺伝子 核酸

1. 研究開始当初の背景

最近の RNA メチル化機構の研究から RNA は DNA やヒストン同様そのメチル化状態をダイナミックに変換させ、これが遺伝子発現の重要な調節因子として機能していることが知られるようになった。さらに 2013 年以降、RNA メチル化は ES 細胞における幹細胞性の維持や、分化細胞においても mRNA の核外輸送、選択的スプライシング など多くの重要な細胞機能に関わる事が次々と報告されている(Y.Wang et al, Nat cell Biol. 2014)(X. Wang et al, Nature 2014)。一方で miRNA のメチル化に関してはいまだ詳細が明らかにされていない。われわれはすでに生体内において miRNA を含む small RNA が様々なメチル化修飾(N1,6 位アデニン、3,5 位シトシン)を受ける事を見だしている(図 1)。miRNA 自身は AGO 蛋白を始めとする関連分子を標的に誘導するガイド役に過ぎない。タンパク複合体に内包された形で機能を発揮する miRNA の作用動態を明らかにするためには、従来のトランスクリプトーム解析のような RNA 発現量のプロファイリングのみでは不十分で、定量を超えた機能の推察が要求される。つまり、RNA の存在だけでなく、それが実際に機能しているかどうかを別のアプローチにより調べる必要があると考え、miRNA のメチル化に焦点をあてるという着想にいたった。

2. 研究の目的

本研究では、miRNA そのもののメチル化に着目し、メチル化による miRNA の機能変化とその臨床的意義を追求する。近年、RNA メチル化は DNA、ヒストンメチル化に続く重要なエピジェネティック修飾として注目されているが、短鎖非翻訳 RNA である miRNA のメチル化に関しては詳しく検討されていない。われわれの研究から miRNA も様々なメチル化修飾を受け、その機能を大きく変化させ得ることがわかってきた。本研究ではさらに癌におけるメチル化 miRNA の包括的プロファイリングによりその臨床的意義を明らかにし、メチル化を考慮することで miRNA の癌バイオマーカーとしての精度向上を図った。

3. 研究の方法

培養細胞株からの TotalRNA 抽出の後、PAGE 法により miRNA の各成熟段階にある pri-miRNA(100 塩基以上)、pre-miR(70-90 塩基)、成熟 miRNA (20-25 nt) 画分を分離したサンプルを用い、RNA のサイズフラクション毎のメチル化解析を行う。メチル化の検出方法としては液体クロマトグラフ質量分析(LC-MS/MS)を用い miRNA メチル化を網羅的に解析する。また各種メチル化抗体(m5C、m6A 抗体など)を用いた RNA 免疫沈降(RIP)の後に small RNA 高処理 RNA シークエンス解析 (small RNA

RIP-seq)(Dominissini et al. Nature 2012)を応用]することで RNA メチル化状態を包括的に解析した。

4. 研究成果

メチル化がもたらす miRNA の機能変化を明らかにするために、in vitro/ in vivo の実験に併行して、in silico の解析を進めた。当研究室にすでに完備されたクラスターマシン(高性能生体分子シミュレーションシステム用 HPC5000-XH216R2S HPC systems 社)を用い、miRNA と標的 mRNA、関連タンパク(GW182、AGO2、DROSHA、DICER など)との結合性を in silico でシミュレーションを行った。前項目で同定された各種メチル化(5mC/6mA/1mA/3mC)、同定された修飾部位にメチル化を加える前後でエントロピーコストの変化を求め、メチル化修飾が相互作用に変化をもたらすと予測された miRNA について実際の miRNA の機能変化をメチル化修飾を付加した人工合成オリゴを用いた強制発現の実験系で検証した。大阪大学内のデータベース・公共データベース(NCBI など)を用いて、RNA・タンパクの全体の結晶構造の情報を入手、AGO2 タンパクに関してはすでに miRNA 結合溝を含めた完全な結晶構造が得られており、miRNA との結合シミュレーションを行った。また、以上の実験により、基礎レベルでの Proof of concept が得られれば、臨床サンプルにおけるメチル化 miRNA の定量を行い、メチル化 miRNA の臨床病理学的意義を明らかにした。臨床サンプルの収集・取り扱いに関しては倫理規定を遵守して施行、大阪大学倫理委員会の承認のもとに採取した約 50 症例の大腸癌臨床検体とそれに対応する正常組織において small RNA のサイズ分離の後 miRNA のメチル化状態を LC-MS/MS で網羅的解析を行うことで、正常部と癌部でのメチル化の違い、また miRNA メチル化と臨床病理学的因子、予後との関連を調べた。腫瘍以外にも手術前後・化学療法施行前後など、時系列での血液サンプルの解析を行った。質量分析による微量 miRNA 検出手法を、メチル化体の検出が可能になるレベルにまで最適化し、さらに精度の高いバイオマーカーとしての利用を目指す。具体的にはイオン化効率の向上や、サンプルに含まれる塩などの不純物の除去に関する手法の再検討を行った。有力なバイオマーカー候補となるメチル化体を同定された場合は、臨床サンプルにおけるメチル化の定量を行うことで、それぞれの候補のがんバイオマーカーとしての性能を検証した。臨床サンプルの収集・取り扱いに関しては倫理規定を遵守して施行、大阪大学倫理委員会の承認のもとに採取した約 50 症例の消化器がん臨床検体とそれに対応する正常組織において、メチル化酵素の発現・メチル化状態を計測した。十分なメチル

化体が検出された場合には、正常部とがん部でのメチル化の比較、また miRNA メチル化と臨床病理学的因子、予後との関連を調べた。In vitro では、メチル化酵素の発現変化によるがん細胞の増殖・浸潤能の変化や、薬剤耐性への影響に関して調べることで、RNA メチル化が造腫瘍性やがんの悪性化に果たす役割を明らかにした。in vitro のみでは予測困難なメチル化をもたらす miRNA の機能変化を検証するために、in silico でのメチル化 miRNA の解析を進めた。コンピュータシミュレーションシステムを用い、miRNA と標的 mRNA、関連タンパク (AGO2、DROSHA、DICER 等) との結合性を in silico でシミュレーションを行った。メチル化修飾が相互作用に変化をもたらすと予測された miRNA について、実際にメチル化修飾を付加された人工合成オリゴを強制発現する実験系を用い、メチル化体導入によるトランスクリプトームの変化を網羅的に調べた。これにより、メチル化 miRNA ががん細胞の表現型に与える影響を明らかにできる可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 19 件)

- 1) Koseki, J., Konno, M., Asai, A., Colvin, S. H., Kawamoto, K., Nishida, N., Sakai, D., Kudo, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii H. Enzymes of the one-carbon folate metabolism as anticancer targets predicted by survival rate analysis. *Sci. Rep.*, 8(1):303, 2018.
DOI: 10.1038/s41598-017-18456-x
- 2) Konno, M., Matsui, H., Koseki, J., Asai, A., Kano, Y., Kawamoto, K., Nishida, N., Sakai, D., Kudo, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Computational trans-omics approach characterised methylomic and transcriptomic involvements and identified novel therapeutic targets for chemoresistance in gastrointestinal cancer stem cells. *Sci. Rep.*, 8(1):899, 2018.
DOI: 10.1038/s41598-018-19284-3
- 3) Nishizawa, Y., Konno, M., Asai, A., Koseki, J., Kawamoto, K., Miyoshi, N., Takahashi, H., Nishida, N., Haraguchi, N., Sakai, D., Kudo, T., Hata, T., Matsuda, C., Mizushima, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Hypoxia stimulates the cytoplasmic localization of oncogenic long noncoding RNA LINC00152 in colorectal cancer. *Int. J. Oncol.*, 52(2):453-460, 2018.
DOI: 10.3892/ijo.2017.4218
- 4) Nishizawa, Y., Konno, M., Asai, A., Koseki, J., Kawamoto, K., Miyoshi, N., Takahashi, H., Nishida, N., Haraguchi, N., Sakai, D., Kudo, T., Hata, T., Matsuda, C., Mizushima, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Oncogene c-Myc promotes epitranscriptome m⁶A reader YTHDF1 expression in colorectal cancer. *Oncotarget*, 9(7):7476-7486, 2017.
DOI: 10.18632/oncotarget.23554
- 5) Asukai, K., Kawamoto, K., Eguchi, H., Konno, M., Asai, A., Iwagami, Y., Yamada, D., Asaoka, T., Noda, T., Wada, H., Gotoh, K., Nishida, N., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Micro-RNA-130a-3p regulates gemcitabine resistance via PPARG in cholangiocarcinoma. 24(8):2344-2352, *Ann. Surg. Oncol.*, 2017.
DOI: 10.1245/s10434-017-5871-x
- 6) Konno, M., Asai, A., Kawamoto, K., Nishida, N., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. The one-carbon metabolism pathway highlights therapeutic targets for gastrointestinal cancer. *Int. J. Oncol.*, 50(4):1057-1063, 2017.
DOI: 10.3892/ijo.2017.3885
- 7) Miyo, M., Konno, M., Colvin, S. H., Nishida, N., Koseki, J., Kawamoto, K., Tsunekuni, K., Nishimura, J., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. The importance of mitochondrial folate enzymes in human colorectal cancer. *Oncol. Rep.*, 37(1):417-425, 2017.
DOI: 10.3892/or.2016.5264
- 8) Nishizawa, Y., Nishida, N., Konno, M., Kawamoto, K., Asai, A., Koseki, J., Takahashi, H., Haraguchi, N., Nishimura, J., Hata, T., Matsuda, C., Mizushima, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Clinical significance of histone demethylase NO66 in invasive colorectal cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, 24(3):841-849, 2017.
DOI: 10.1245/s10434-016-5395-9
- 9) Miyo, M., Konno, M., Nishida, N., Sueda, T., Noguchi, K., Matsui, H., Colvin, H., Kawamoto, K., Koseki, J., Haraguchi, N., Nishimura, J., Hata, T., Gotoh, N., Mastuda, F., Satoh, T., Mizushima, T., Shimizu, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Metabolic adaptation to nutritional stress in human colorectal cancer. *Sci. Rep.*, 6:38415, 2016.
DOI: 10.1038/srep38415
- 10) Colvin, S. H., Nishida, N., Konno, M., Haraguchi, N., Takahashi, H., Nishimura, J., Hata, T., Kawamoto, K., Asai, A., Tsunekuni, K., Koseki, J., Mizushima, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Oncometabolite D-2-hydroxyglurate

- directly induces epithelial-mesenchymal transition and is associated with distant metastasis in colorectal cancer. *Sci. Rep.*, 6:36289, 2016.
DOI: 10.1038/srep36289
- 11) Baek, S.J., Sato, K., Nishida, N., Koseki, J., Azuma, R., Kawamoto, K., Konno, M., Hayashi, K., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H., Ogawa, K. MicroRNA miR-374, a potential radiosensitizer for carbon ion beam radiotherapy. *Oncol. Rep.*, 36(5):2946-2950, 2016.
DOI: 10.3892/or.2016.5122
 - 12) Hasegawa, S., Nagano, H., Konno, M., Eguchi, H., Tomokuni, A., Tomimaru, Y., Asaoka, T., Wada, H., Hama, N., Kawamoto, K., Marubashi, S., Nishida, N., Koseki, J., Mori, M., Doki, Y., Ishii, H. A crucial epithelial to mesenchymal transition regulator, Sox4/Ezh2 axis is closely related to the clinical outcome in pancreatic cancer patients. *Int. J. Oncol.*, 48(1):145-152, 2016.
DOI: 10.3892/ijo.2015.3258
 - 13) Koseki, J., Matsui, H., Konno, M., Nishida, N., Kawamoto, K., Kano, Y., Mori, M., Doki, Y., Ishii, H. A trans-omics mathematical analysis reveals novel functions of the ornithine metabolic pathway in cancer stem cells. *Sci. Rep.*, 6:20726, 2016.
DOI: 10.1038/srep20726
 - 14) Koseki, J., Colvin, S. H., Fukusumi, T., Nishida, N., Konno, M., Kawamoto, K., Tsunekuni, K., Matsui, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Mathematical analysis predicts imbalanced IDH1/2 expression associates with 2-HG-inactivating β -oxygenation pathway in colorectal cancer. *Int. J. Oncol.*, 46(3):1181-1191, 2015.
DOI: 10.3892/ijo.2015.2833
 - 15) Konno, M., Ishii, H., Koseki, J., Tanuma, N., Nishida, N., Kawamoto, K., Nishimura, T., Nakata, A., Matsui, H., Noguchi, K., Ozaki, M., Noguchi, Y., Shima, H., Gotoh, N., Nagano, H., Doki, Y., Mori, M. Pyruvate kinase M2, but not M1, allele maintains immature metabolic states of murine embryonic stem cells. *Regen. Therap.*, 1, 63-71, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.reth.2015.01.001>
 - 16) Ogawa, H., Wu, X., Kawamoto, K., Nishida, N., Konno, M., Koseki, J., Matsui, H., Noguchi, K., Gotoh, N., Yamamoto, T., Miyata, K., Nishiyama, N., Nagano, H., Yamamoto, H., Obika, S., Kataoka, K., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. MicroRNAs induce epigenetic reprogramming and suppress malignant phenotypes of human colon cancer cells. *PLoS One*, 10(5):e0127119, 2015.
DOI: 10.1371/journal.pone.0127119
 - 17) Baek, S.J., Ishii, H., Tamari, K., Hayashi, K., Nishida, N., Konno, M., Kawamoto, K., Koseki, J., Fukusumi, T., Hasegawa, S., Ogawa, H., Hamabe, A., Miyao, M., Noguchi, K., Seo, Y., Doki, Y., Mori, M., Ogawa, K. Cancer stem cells: The potential of carbon ion beam radiation and new radiosensitizers (Review). *Oncol. Rep.*, 34(5):2233-2237, 2015.
DOI: 10.3892/or.2015.4236
 - 18) Noguchi, K., Eguchi, H., Konno, M., Kawamoto, K., Nishida, N., Koseki, J., Wada, H., Marubashi, S., Nagano, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Susceptibility of pancreatic cancer stem cells to reprogramming. *Cancer Sci.*, 106(9):1182-1187, 2015.
DOI: 10.1111/cas.12734
 - 19) Konno, M., Koseki, J., Kawamoto, K., Nishida, N., Matsui, H., Dewi, D.L., Ozaki, M., Noguchi, Y., Mimori, K., Gotoh, N., Tanuma, N., Shima, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Embryonic microRNA-369 controls metabolic splicing factors and urges cellular reprogramming. *PLoS One*, 10(7): e0132789, 2015.
DOI: 10.1371/journal.pone.0132789
- 〔学会発表〕(計 11 件)
- 1) 西田尚弘、他：長鎖ノンコーディング RNA の大腸癌におけるエピゲノム制御、第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月 29 日、パシフィコ横浜(神奈川)
 - 2) 西沢 佑次郎、西田尚弘、他：大腸癌進展におけるヒストン脱メチル化酵素 NO66 の重要性、第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月 29 日、パシフィコ横浜(神奈川)
 - 3) 西沢 佑次郎、西田尚弘、他：大腸がんにおけるヒストン脱メチル化酵素 NO66 の臨床的意義の解明、第 26 回日本がん転移学会学術集会・総会、2017 年 7 月 27 日、大阪国際会議場 (大阪)
 - 4) 西田尚弘、他：ヒストンメチル化酵素 KDM5B の消化器がん進展への関わり、第 26 回日本がん転移学会学術集会・総会、2017 年 7 月 27 日、大阪国際会議場 (大阪)
 - 5) 西田尚弘、他：Epigenetic modifications on non-coding RNAs in cancer、2017 Cellular and Molecular Bioengineering Annual Conference、2017 年 1 月 6 日、Hapuna Beach Prince Hotel | Big Island of Hawaii, (アメリカ)
 - 6) 西田尚弘、他：臨床情報が裏付けるノンコーディング RNA エピゲノム修飾の意義、第 39 回日本分子生物学会年会、2016

- 年 12 月 1 日、パシフィコ横浜(神奈川)
- 7) 西田尚弘、他：消化器癌におけるヒストン脱メチル化酵素の標的化、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 7 日、パシフィコ横浜(神奈川)
 - 8) 西田尚弘、他：ノンコーディング RNA の消化器癌進展への関わり、第 26 回日本消化器癌発生学会総会、2015 年 11 月 19 日、米子全日空ホテル(鳥取)
 - 9) 西田尚弘、他：ヒストン脱メチル化酵素 KDM5B の大腸癌進展機構への関わり、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 9 日、名古屋国際会議場(愛知)
 - 10) 西田尚弘、他：Cell cycle regulation of KDM5B and its involvement in cancer progression、Cell Symposia Multifaceted Mitochondria、2015 年 7 月 19 日、Hyatt Regency McCormick Place (アメリカ、シカゴ)
 - 11) 西田尚弘、他：KDM5B plays a central role in esophageal cancer progression、American Association for Cancer Research AACR Annual Meeting 2015、2015 年 4 月 19 日、PENNSYLVANIA CONVENTION CENTER PHILADELPHIA PA ・ AACR . ORG ・ #AACR15 (PHILADELPHIA アメリカ)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田尚弘 (NISHIDA Naohiro)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50588118