

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22658

研究課題名(和文)細胞外小胞のRNAメチル化計測によるがんバイオマーカーの最高性能化と実用化

研究課題名(英文)Maximum performance and practical application of cancer biomarkers by measuring RNA methylation of extracellular vesicles

研究代表者

石井 秀始 (ISHII, Hideshi)

大阪大学・医学系研究科・特任教授(常勤)

研究者番号：10280736

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文):近年の内外の研究成果で、RNAのメチル化修飾(エピトランスクリプトーム)の解読することが精密な医療の実現のために必要であることが明らかにされてきた。本研究では、そのエピトランスクリプトームの情報を1塩基レベルの高い解像度と網羅性でプロファイリングする技術の整備に向けて開発研究を実施した。本研究では、特に、尿や血液に含まれる細胞外小胞(エクソソーム[EV])に着目した研究を進めた。すなわち、EVの『殻』(EV脂質膜)と『中身』(RNAメチル化)を微小流路で連結して検討し、画期的ながん診断法の開発に向けて技術の最適化を推進した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本技術では、『殻』はナノ細線(NW)と抗体で選別し、また『中身』はトンネル電流シーケンス(TS)と質量分析(MS)でRNAメチル化を解読するものである。In vitro 及びin vivoの検討結果を踏まえて、単一EV集団の1塩基の解像度のエピトランスクリプトーム情報まで掘り下げて検討し、臨床応用のための基盤を構築し、わが国アカデミア発の知的財産として整備した。エピトランスクリプトームを精密に解読する技術は世界的にも開発の途上にあるのが現状であった。本研究の成果により、わが国アカデミア発の知的財産として本技術の拡充を進め、画期的なバイオマーカー開発のための基盤を構築することができた。

研究成果の概要(英文):Recent studies have revealed that decoding RNA methylation modifications (epitranscriptome) is necessary for the realization of precise medical treatment. In this study, we performed the development research toward the development of technology for profiling the epitranscriptome information with high resolution and comprehensiveness at the level of one base. We here focused on extracellular vesicles (exosomes [EV]) contained in urine and blood; i.e., EV "shells" (EV lipid membranes) and "contents" (RNA methylation) are linked and examined through microchannels, and technology is optimized for the development of epoch-making cancer diagnostic methods. By utilizing the methods, the "shell" is sorted by nanowires (NW) and antibodies, and the "contents" are decoded RNA methylation by tunneling current sequence (TS) and mass spectrometry (MS).

研究分野：医学

キーワード：RNAメチル化 エピトランスクリプトーム シークエンス

1. 研究開始当初の背景

(1) RNA のメチル化修飾（エピトランスクリプトーム）の重要性

RNA は、DNA の情報を転写し、スプライシングと蛋白質の翻訳の制御を通じて、多彩な機能を発揮している。RNA では、塩基（A、U、G、C）の順列に加えて塩基部分に対するメチル基（CH₃-）が RNA の構造を大きく変化させて、遺伝子の「暗号」を加筆している（Nature 2015）。主としてアデニンの 6 位がメチル化されて「m6A」となり、RNA のスプライシング、翻訳、安定性、結合する蛋白質の構造、機能を大きく変化させる。RNA のメチル化は、がんや生活習慣病、精神神経疾患および心不全などにおける核酸の代謝を反映する生理応答の指標（バイオマーカー）である。この RNA 修飾の解析には、特殊な技術が必要である。

(2) エピトランスクリプトームの解読

RNA のメチル化修飾（エピトランスクリプトーム）を 1 塩基レベルの高い解像度と網羅性で明らかにすることを目的として本研究開発を実施した。特に、尿や血液に含まれる細胞外小胞（エクソソーム [EV]）に着目した。すなわち、EV の『殻』（EV 脂質膜）と『中身』（RNA メチル化）を微小流路で連結して検討し、画期的ながん診断法を開発するものである。この『殻』はナノ細線（NW）と抗体で選別し、また『中身』はトンネル電流シーケンス（TS）と質量分析（MS）で RNA メチル化を解読する技術である。

予備的検討の結果を踏まえながら、単一 EV 集団の 1 塩基の解像度のエピトランスクリプトーム情報まで掘り下げて検討し、臨床応用のための基盤を構築していくことを目指して研究を実施した。

2. 研究の目的

(1) 技術基盤の構築

本計画では、がん等に特異的な抗体とナノ細線（NW）を用いて多様な EV からサブpopulationを選別・濃縮し、RNA 鎖一分子を計測できるトンネル電流シーケンス（TS）と RNA 一塩基を計測できる質量分析（MS）を組み合わせることを目的とする。

(2) 応用に向けた最適化

本技術の成果は、血液や尿など体液の EV の RNA の m6A を正確に計測し、有用なバイオマーカーの開発に応用するために技術を最適化していく。

3. 研究の方法

(1) トンネル電流シーケンス（TS 法）

一分子単位の RNA の塩基の順列（アライメント）を読める。電子が通り抜ける時に生じるトンネル効果を利用した大阪大学発の量子技術である（特願 2014-

31084)。TS 法から微小流路を介して、MS 法と直結できる。

(2)質量分析 (MS 法)

Maldi in-source decay を応用し、1 塩基単位で化学修飾を読む。いわば、横軸(TS 法)と縦軸(MS 法)で、RNA 鎖内・塩基内で最先端計測した。

(3)ナノ細線技術 (NW 法)

微小流路の液相中での安定性と静電的な結合を達成し、EV の分離を行う。この技術は従来の超遠心法より多種類の miRNA (1000 種類) のレパートアを解析できる。

4. 研究成果 (図1)

(1) EV 選別から miRNA のメチル化計測に連結する技術の確立：

大阪大学の倫理委員会に申請して既に承認が得られたので (承認番号 664)、

患者の尿や血清を用いて、EV 膜表面上のがん特異抗原 (特許申請中) に対する抗体を搭載した NW 法により単一のサブポピュレーションの EV を『選別』し、miRNA のメチル化を計測する技術を完成させる。miRNA から開始し、ncRNA (100 塩基より長鎖の非コード RNA) の m6A メチル化

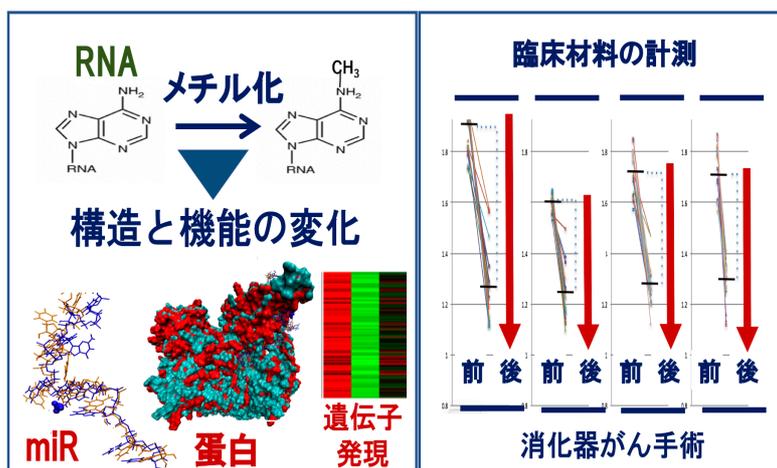


図1

を TS 法と MS 法で計測し、バイオマーカーの有用性として開発した。

(2) 患者の RNA メチル化解読により最高性能のバイオマーカーを開発：

NM+TS+MS 法の連結により、アンメット・ニーズが高い膵がん、胆道がん、大腸がん、食道がん (各々50 症例)、および乳がん、肺がん、糖尿病、精神神経疾患および心不全等の初診時や再発の血清・尿・原発病巣で RNA 修飾を『解読』を進めた。

(3) 医療への反映と応用：

解析する症例を増やし、疾患診療ガイドラインに反映することで臨床応用を目指す。早期診断、長期予後、再発および補助療法 (抗がん剤など) の効果と耐性の予測として、有用性を検討した。さらに未診断疾患における新たな診断ツールとしての性能を検討した。喫煙、炎症など、バイオマーカーに影響を与える潜在的な因子を検討した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 9件）

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 -

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 C. elegans 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...19名略...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 -

1. 著者名 Lin Yingsong, Nakatochi Masahiro, Hosono Yasuyuki, et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Genome-wide association meta-analysis identifies GP2 gene risk variants for pancreatic cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-16711-w	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

[学会発表] 計8件(うち招待講演 5件/うち国際学会 1件)

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 石井 秀始
2. 発表標題 転移とEMT・がん幹細胞
3. 学会等名 第28回 日本がん転移学会学術集会・総会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井 秀始、曾我 朋義
2. 発表標題 代謝を利用した診断
3. 学会等名 第7回がん代謝研究会 in 仙台 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井 秀始
2. 発表標題 がんエピトランスクリプトームを活用した新しい診断と治療
3. 学会等名 第11回日本RNAi研究会(The 11th JARI Annual Meeting) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井 秀始、Chwee Teck Lim
2. 発表標題 Innovative technology for next generation liquid biopsy 次世代リキッドバイオプシーのための新技術
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会 (招待講演)
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 石井 秀始
2. 発表標題 がんプレシジョン医療における機能性核酸シーズの新しい展開
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会、国際シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計6件

産業財産権の名称 トンネル電流を使用したマイクロRNA解析	発明者 谷口正輝、石井秀始、大城敬人、今野雅允	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-85805	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 トンネル電流を使用したマイクロRNA解析	発明者 谷口正輝、石井秀始、大城敬人、今野雅允	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/ 017654	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 核酸医薬による癌治療	発明者 石井秀始、今野雅允、小比賀聡、森正樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-085789	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 核酸医薬による癌治療	発明者 石井秀始、今野雅允、小比賀聡、森正樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/ 017659	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 エピジェネティックスを標的とした新規医薬	発明者 石井秀始、他	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-086330	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 エピジェネティックスを標的とした新規医薬	発明者 石井秀始、他	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/ 017607	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	土岐 祐一郎 (DOKI Yuichiro) (20291445)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	
研究分担者	江口 英利 (EGUCHI Hidetoshi) (90542118)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	
研究分担者	今野 雅允 (KONNO Masamitsu) (80618207)	大阪大学・医学系研究科・寄附講座講師 (14401)	
研究分担者	浅井 歩 (ASAI Ayumu) (40783262)	大阪大学・産業科学研究所・特任助教(常勤) (14401)	

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