

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16356

研究課題名（和文）RNAのm6A修飾による翻訳機序を標的とした難治がんの画期的な創薬と応用

研究課題名（英文）Novel drug discovery and application of intractable cancer targeting RNA m6A modification

研究代表者

小関 準（Koseki, Jun）

大阪大学・医学系研究科・特任助教（常勤）

研究者番号：20616669

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）：難治性消化器がんの手術切除試料を用いたRNAメチル化情報に基づくサブクラス分類を進め末梢血のマイクロRNAのメチル化情報を連結させたコンパニオン創薬の基盤を構築した。更に18種類のがん細胞において、オンコプロテインの翻訳系に与える効果を検討し、正常細胞への影響を考慮するため初代培養やオルガノイドおよび3D培養などの正常に近い細胞条件を用いて、ヒット化合物が正常細胞に与える影響をRun-Onアッセイで検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オンコプロテイン翻訳系を標的とした創薬において、特許情報プラットフォームでMettl13、Ythdf1を記載した特許は3件のみで、化合物の特許はない。またModomics DatabaseやNCBI DatabaseやTCGA Databaseにおいても、がんの手術材料からm6A修飾RNAに特化したデータベースとして確立されたものも研究開始当時存在していなかった。そのため、開発リスクが伴う難治がんへの創薬では、アカデミア創薬の役割がとくに重要である。さらに体内の腫瘍と末梢血のリキッドバイオプシーを並列で解析することは、コンパニオン診断として意義がある。本研究でこの創薬基盤を構築した。

研究成果の概要（英文）：Subclass classification based on RNA methylation information was performed using surgically excised samples of intractable gastrointestinal cancer.

Then, we constructed a platform for companion drug discovery by linking the methylation information of microRNA of peripheral blood.

The effect of oncoprotein on the translation system was examined in 18 types of cancer cells. In addition, the effect of hit compounds on normal cells was examined by Run-On assay.

研究分野：計算科学

キーワード：エピゲノム制御因子

1. 研究開始当初の背景

細胞機能の基本はタンパク質であり、その翻訳系の活性化が難治がんの生物学的な悪性形質に深く関わっている。したがって翻訳系が診断や治療の標的であることは広く受け入れられている。たとえば、胆道がん、膵がん、メラノーマ、転移性大腸がんおよび肺がんなどで標的化されている抗 EGF や抗 MEK などの KRAS 経路阻害薬や、抗 BRAF 阻害薬への抵抗性は、「RAS-RAF-MEK-ERK-MAPK 経路」と「PI3K-AKT-mTOR 経路」の双方を介して翻訳系をロバストに維持し、治療に抵抗する Notch, Myc, Bcl2, Kras などの**オンコプロテインの翻訳**を活性化している (Nature, 513, 65, 2014; Nature, 513, 105, 2014)。すなわち、RAS 経路は eIF から翻訳を活性化し、また PI3K 経路は翻訳開始因子 eIF がその結合タンパク質 eIF4EBP との相互作用を介して mRNA の Cap 反応を促進し、ともに翻訳系を活性化する。

そのため既存の分子標的薬への治療抵抗性の克服のためには eIF 複合体を標的化することが有効な戦略の 1 つとして挙げられるが、正常細胞でもこれらの翻訳系は機能しており、有害事象に懸念がある。したがって、**がんで特異的に活性化しているオンコプロテインの翻訳系の機構に焦点をあてて標的化する**画期的な創薬が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、難治性消化器がんの m<sup>6</sup>A を介したオンコプロテインの翻訳を阻害する創薬の Proof-of-Concept (POC) を明らかにすることであり、具体的な成果としてヒット化合物を取得する計画である。

(1) **オンコプロテイン翻訳系を標的としたアカデミア創薬**

特許情報プラットフォーム (J-PlatPat) で Mettl3, Ythdf1 を記載した特許は 3 件のみで、化合物の特許はない。また Modomics Database (2013 年から) や NCBI Database (2015 年から) や TCGA Database (2008 年から) においても、がんの手術材料から m<sup>6</sup>A 修飾 RNA に特化したデータベースとして確立されたものはまだない。開発リスクが伴う難治がんへの創薬では、アカデミア創薬の役割がとくに重要である。

(2) **プレジジョン医療におけるコンパニオン創薬の意義**

体内の腫瘍と末梢血のリキッドバイオプシーを並列で解析することは、コンパニオン診断として意義がある。特に、昨今の高価な免疫チェックポイント阻害剤でバイオマーカーの開発が後手に回っている例を鑑みると、開発の段階からバイオマーカーが可能な標的を選定して進めることも理にかなっており、それが本計画の特徴の 1 つである。

3. 研究の方法

(1) **創薬展開**

インシリコ創薬と AlphaScreen のアッセイ系を組み合わせることでヒット化合物を取得する。ナミキ化合物データベースに登録されている約 700 万化合物と、並行して大阪大学の 15 万化合物ライブラリーから選別した 1 万のコアライブラリーを用いて、段階を踏みながらインシリコスクリーニングとハイスループットスクリーニング、またその結果に対して機械学習を重ね、最適な化合物を探索する。標的は Ythdf1-eIF3 相互作用と、Ythdf1-m<sup>6</sup>A 相互作用部位である。

(2) **POC 確保**

POC(Proof-of-Concept)確保として、標的の阻害が下流に及ぼす影響、正常細胞への影響、標的合理性を検討する。さらに、大阪大学消化器外科(森・土岐・今野ら)と協働して、ステージ別予後診断、層別化サブクラス分類を検討する。

(3) **m<sup>6</sup>A 疾患データベース構築**

大阪大学消化器外科(森・土岐・今野ら)と協働して、手術材料(胆道がん、膵がん年間各 50 症例)、リキッドバイオプシー(胆道がん、膵がん年間各 50 症例)の血清エクソソームから miRNA を抽出する。その分子内の m<sup>6</sup>A を計測し、末梢血の miRNA のメチル化情報から、体の深部の腫瘍の m<sup>6</sup>A メチル化酵素やオンコプロテインの翻訳系の活性化を予測する。データ解析により、コンパニオン創薬の基盤を構築する。

4. 研究成果

RNA 修飾はその 80% が N6-メチル化アデノシン (m<sup>6</sup>A) であり、この m<sup>6</sup>A は疾患で非常に重要な意味を有していることが報告されている。我々の研究室からの報告を含む国内外の研究成果によって、m<sup>6</sup>A はメチル化酵素群 (Mettl3-Mettl4-Wtap 複合体) の働きでメチル基が付加されること、さらにその m<sup>6</sup>A に Ythdf1 等の認識たんぱく質に結合することによって生物学的な機能が発揮されることが明らかになった。Ythdf1 は、KRAS 等のオンコプロテインの翻訳を正に制御することがわかっているため、本研究で Ythdf1 及び m<sup>6</sup>A によるオンコプロテインの翻訳を阻害する化合物探索を実施した。まず初めに、YTHDF1 と Family タンパク質である YTHDF2 の配列上の相違について解析した。この 2 つのタンパク質間における配列は非常に類似している (図 1)。図 1 における赤枠部分が配列として異なる部

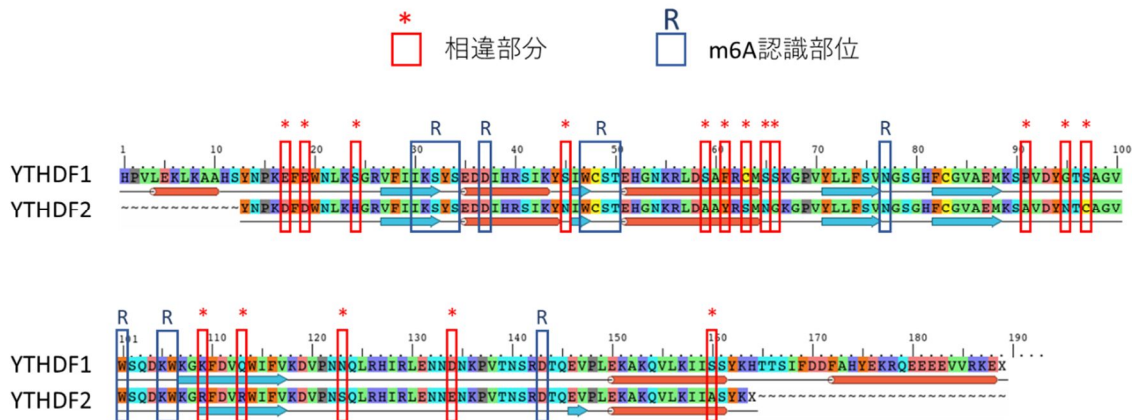


図1 YTHDF1とYTHDF2の配列相違性

分であり、青枠部分が m<sup>6</sup>A 認識部位のアミノ酸を示している。これを見てわかるように相違残基はそれほど多くはなく、m<sup>6</sup>A 認識部位には全く違いはない。PDB データに登録されている両たんぱく質の立体構造 (YTHDF1: 4RCJ, YTHDF2: 4WQN) の違いに着目し、生体内環境下(水相環境下、310 K~36.85 )における分子挙動をシミュレートしても、m<sup>6</sup>A 認識部位に有意な違いは見られなかった(図2)。従って、コンピュータにおけるバーチャル・スクリーニングにおいて、両たんぱく質への選択的特異性を加味することは、難しいと判断された。一方でこのような立体構造解析と生体内熱振動解析の結果から、メチル化を触媒する METTL3 とは、その触媒部位の構造が大きく異なっているため、互いに特異性を有した阻害候補化合物を抽出できる可能性が高いことを見出した。よって本研究では、METTL3 の阻害候補化合物も同時に探索することによって、YTHDF Family への選択的特異性を有したリード化合物の抽出に取り組んだ。

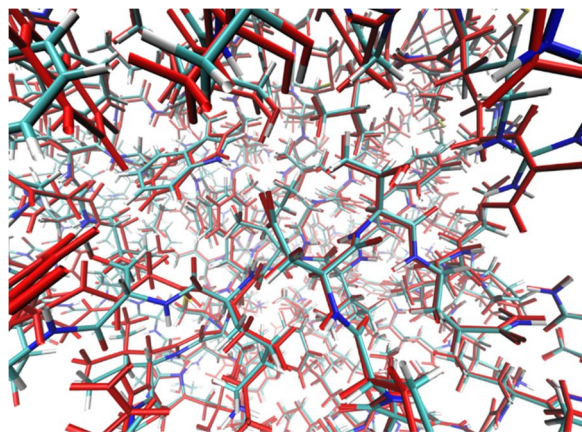


図2 YTHDF1とYTHDF2における m<sup>6</sup>A 認識部位の構造上の相違

YTHDF1: 4RCJ (Color)  
YTHDF2: 4WQN (Red)

本申請研究における候補化合物の抽出には、前述したように YTHDF Family の立体構造が報告されているので、SBDD (Structure Based Drug Design) 技法を採用した。具体的な *in silico* バーチャル・スクリーニングの流れは、図3に示したようなものである。データベース化されている薬物候補の500万化合物が立体空間的に結合可能であるかを判定させた後、たんぱく質-化合物間の結合エネルギーでふるいをかけた。その後、たんぱく質の生体内での熱振動を考慮し、さらに溶媒和による効果を考慮して化合物を抽出した。

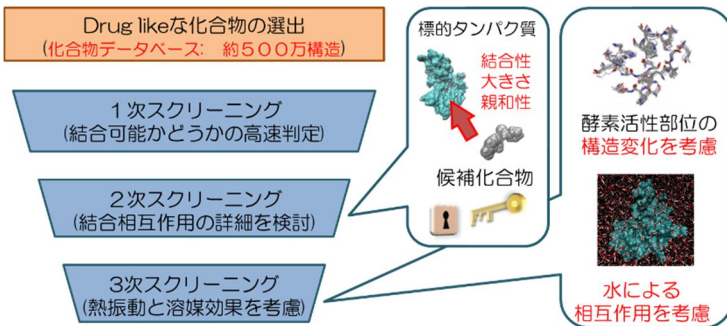


図3 *in silico* バーチャル・スクリーニングの過程と各ステップにおける概要

この私の候補化合物抽出アプローチに従って抽出された、YTHDF Family を効果的に阻害し、METTL3 には強い結合が見込まれない化合物を骨格構造の類似性解析をじっしすることにより、実際の実験的検証に回すべき化合物数を絞り込んだ。本研究結果ではリビンスキーの Rule of Five を満たした 68 化合物を、最終的にリード化合物として抽出した。

また、大阪大学消化器外科（森・土岐・今野ら）と協働することにより、現在までに大腸がんを始めとしてすい臓がんや胃がん等多くのがんから抽出された miRNA で m<sup>6</sup>A が検出された。これは血清中から抽出された let-7a や miR-17 等から、p<0.01 レベルの差を観測することができた。さらに膵がん患者さんの術前術後においても血清中の miRNA のメチル化レベルは p<0.01 の差を観測することができた。

最後に、現段階において抽出した化合物は臨床試験に移行できるレベルではなく、そのためにはまだまだ多くの問題点が存在している。しかしながら、本研究の成果は m<sup>6</sup>A 修飾による翻訳機序を標的とした創薬への足場を確実に構築することは出来た。

## 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 0件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Toshiyama Reishi, Konno Masamitsu, Eguchi Hidetoshi, Asai Ayumu, Noda Takehiro, Koseki Jun, Asukai Kei, Ohashi Tomofumi, Matsushita Katsunori, Iwagami Yoshifumi, Yamada Daisaku, Asaoka Tadafumi, Wada Hiroshi, Kawamoto Koichi, Gotoh Kunihito, Kudo Toshihiro, Satoh Taroh, Doki Yuichiro, Mori Masaki, Ishii Hideshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Association of iron metabolic enzyme hepcidin expression levels with the prognosis of patients with pancreatic cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 8125 ~ 8133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2018.8357	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 Toshiyama, R., Konno, M., Eguchi, H., Takemoto, H., Noda, T., Asai, A., Koseki, J., Haraguchi, N., Ueda, Y., Matsushita, K., Asukai, K., Ohashi, T., Iwagami, Y., Yamada, D., Sakai, D., Asaoka, T., Kudo, T., Kawamoto, K., Gotoh, K., Kobayashi, S., Satoh, T., Doki, Y., Nishiyama, N., Mori, M., Ishii, H.	4. 巻 38
2. 論文標題 Poly(ethylene glycol)-poly(lysine) block copolymer-ubenimex conjugate targets aminopeptidase N and exerts an antitumor effect in hepatocellular carcinoma stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 244 ~ 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-018-0406-x	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 Kawamoto Koichi, Ohashi Tomofumi, Konno Masamitsu, Nishida Naohiro, Koseki Jun, Matsui Hidetoshi, Sakai Daisuke, Kudo Toshihiro, Eguchi Hidetoshi, Satoh Taroh, Doki Yuichiro, Mori Masaki, Ishii Hideshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Cell-free culture conditioned medium elicits pancreatic cell lineage-specific epigenetic reprogramming in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 3255 ~ 3259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2018.9008	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 Toratani Masayasu, Konno Masamitsu, Asai Ayumu, Koseki Jun, Kawamoto Koichi, Tamari Keisuke, Li Zhihao, Sakai Daisuke, Kudo Toshihiro, Satoh Taroh, Sato Katsutoshi, Motooka Daisuke, Okuzaki Daisuke, Doki Yuichiro, Mori Masaki, Ogawa Kazuhiko, Ishii Hideshi	4. 巻 78
2. 論文標題 A Convolutional Neural Network Uses Microscopic Images to Differentiate between Mouse and Human Cell Lines and Their Radioresistant Clones	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 6703 ~ 6707
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-18-0653	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 Baek Sung Jae, Sato Katsutoshi, Nishida Naohiro, Koseki Jun, Hayashi Kazuhiko, Kawamoto Koichi, Konno Masamitsu, Doki Yuichiro, Mori Masaki, Ogawa Kazuhiko, Ishii Hideshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Carbon ion beam radioresistant rodent cells are sensitized to trifluorothymidine exposure	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 3389 ~ 3393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2018.9004	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, Koseki Jun, Konno Masamitsu, Nishimura Tatsunori, Gotoh Noriko, Satoh Taroh, Doki Yuichiro, Mori Masaki, Ishii Hideshi	4. 巻 4
2. 論文標題 Drug discovery of anticancer drugs targeting methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e01021 ~ e01021
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2018.e01021	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 Tamari Keisuke, Konno Masamitsu, Asai Ayumu, Koseki Jun, Hayashi Kazuhiko, Kawamoto Koichi, Murai Noriyuki, Matsufuji Senya, Isohashi Fumiaki, Satoh Taroh, Goto Noriko, Tanaka Shinji, Doki Yuichiro, Mori Masaki, Ogawa Kazuhiko, Ishii Hideshi	4. 巻 4
2. 論文標題 Polyamine flux suppresses histone lysine demethylases and enhances ID1 expression in cancer stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41420-018-0117-7	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 Takaoka Yuji, Konno Masamitsu, Koseki Jun, Colvin Hugh, Asai Ayumu, Tamari Keisuke, Satoh Taroh, Mori Masaki, Doki Yuichiro, Ogawa Kazuhiko, Ishii Hideshi	4. 巻 110
2. 論文標題 Mitochondrial pyruvate carrier 1 expression controls cancer epithelial mesenchymal transition and radioresistance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1331 ~ 1339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13980	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 Ohshiro Takahito, Komoto Yuuki, Konno Masamitsu, Koseki Jun, Asai Ayumu, Ishii Hideshi, Taniguchi Masateru	4. 巻 9
2. 論文標題 Direct Analysis of Incorporation of an Anticancer Drug into DNA at Single-Molecule Resolution	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3886
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40504-x	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 -

[学会発表] 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小関準、今野雅允、浅井歩、佐藤太郎、土岐祐一郎、森正樹、石井秀始
2. 発表標題 新規トランスオミックス法を用いたがん幹細胞のDNAメチル化量及び転写量変化の相関解析
3. 学会等名 第6回がん代謝研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小関準、浅井歩、今野雅允、佐藤太郎、土岐祐一郎、辻川和丈、森正樹、石井秀始
2. 発表標題 消化器がん幹細胞のエピゲノム異常の標的化と制御
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----