

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution

研究開発課題名： (日本語) マイクロ RNA メチル化を検出する革新的がんバイオマーカーの創出
(英語) Development of biomarkers to detect microRNA methylation

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 大学院医学系研究科 助教 西田尚弘
所属 役職 氏名： (英語) Departments of Surgery, Osaka University School of Medicine
Assistant professor

実施期間： 平成 28 年 9 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) miRNA メチル化機構の解明・メチル化 miRNA 包括的プロファイリング
開発課題名： (英語) Elucidation of miRNA methylation mechanism / Comprehensive
profiling of miRNA methylation

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 大学院医学系研究科 助教 西田尚弘
所属 役職 氏名： (英語) Departments of Surgery, Osaka University School of Medicine

分担研究 (日本語) miRNA メチル化機構の解明・メチル化 miRNA 包括的プロファイリング
開発課題名： (英語) Elucidation of miRNA methylation mechanism / Comprehensive profiling
of miRNA methylation

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 大学院医学系研究科 特任教授(常勤) 石井秀始
所属 役職 氏名： (英語) Department of Medical Data Science, Osaka University
Professor

分担研究 (日本語) in silico メチル化 miRNA 機能解析・がんバイオマーカーとしての臨床的
意義の確立

開発課題名： (英語) Elucidation of miRNA methylation mechanism / Comprehensive profiling
of miRNA methylation

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 大学院医学系研究科 特任助教(常勤) 小関 準

所属 役職 氏名： (英 語) Department of Medical Data Science, Osaka University
Assistant professor

分担研究 (日本語) in silico メチル化 miRNA 機能解析・がんバイオマーカーとしての臨床的
意義の確立

開発課題名： (英 語) Elucidation of miRNA methylation mechanism / Comprehensive profiling
of miRNA methylation

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 大学院医学系研究科 寄附講座助教 今野雅允

所属 役職 氏名： (英 語) Department of Frontier Science for Cancer and Chemotherapy
Assistant professor

分担研究 (日本語) miRNA メチル化機構の解明・メチル化 miRNA 包括的プロファイリング

開発課題名： (英 語) Elucidation of miRNA methylation mechanism / Comprehensive profiling
of miRNA methylation

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 大学院医学系研究科 特任助教(常勤) 川本弘一

所属 役職 氏名： (英 語) Departments of Surgery, Osaka University School of Medicine
Assistant professor

II. 成果の概要 (総括研究報告)

本課題研究では、大阪大学疾患データサイエンス学 (旧癌創薬プロファイリング学) 石井秀始教授・小関準助教、大阪大学先進癌薬物療法開発学 今野雅允講師、大阪大学消化器外科 川本弘一助教とともに、マイクロ RNA を始めとする小分子核酸の化学修飾を検出する手法を応用して、膵がんなど難治がんを始めとするがんの早期診断に役立つバイオマーカーの開発を目指している。マイクロ RNA に起こる化学修飾の検出のためには、従来行われてきた PCR 等の定量法では不十分で、質量分析を用いた、わずかな質量差でも検出できる高精度のシステムが必要である。平成 28 年度は、標的とするマイクロ RNA の精製手法や、その質量分析による検出の方法に関して段階的な最適化を行い、細胞株ならびに臨床検体から得られた RNA を用いて、本手法の性能を検証してきた。具体的には RNA サンプルのアフィニティークロマトグラフィーを用いた精製技術の改善、イオン化効率の向上などによる検出感度の向上である。その結果、人工合成したマイクロ RNA オリゴに関しては、質量分析により RNA 全体の 5%以下に起こる化学修飾まで検出できるレベルにまで精度を高めることに成功している。これにより、生細胞で起こりうるごく微量のメチル化 RNA 分画を検出することが技術的に可能となった。がんの原発巣や、血液を始めとする体液でのマイクロ RNA メチル化の測定に向けて、さらに手法の最適化を進めていく。

これらメチル化検出手法の研究開発に並行して、バイオマーカーとしてのメチル化 RNA の POC (proof of concept) の取得のために、がん細胞株における化学修飾によるマイクロ RNA の機能変化について調べてきた。化学修飾が特定のマイクロ RNA 機能に影響を及ぼす時、その化学修飾されたマイクロ RNA は、生体内で機能する重要なバイオマーカーとなる可能性が高いからである。具体的には、メチル化修飾に関わる RNA メチル化酵素・脱メチル化酵素が、がんの発生・進展に果たす役割を明らかにすることに取り組んできた。平成 28 年度は、がん細胞株を用いて、RNA メチル化酵素

のレンチウイルスによる強制発現・ノックダウンの実験系を樹立し、これらの細胞の造腫瘍性の変化、並びに抗がん剤に対する薬剤耐性能への関わりを明らかにした。これらの所見は、メチル化 RNA が、がんの診断マーカー・サロゲートマーカーとして有用である可能性を示すのみならず、一連の反応に関わる RNA メチル化酵素群が、がん抑制や治療抵抗性改善のための重要な治療標的となりうることを示唆している。RNA メチル化のがん治療抵抗性への関わりに関しては、標的となるアポトーシス関連タンパクの同定も進めており、一連の反応が明らかとなれば、RNA メチル化を介した治療抵抗性獲得のメカニズムを明らかにできる可能性がある。また、これまでがんで高発現するマイクロ RNA の中から選んでいた候補マイクロ RNA を、さらに網羅的に調べるため、各種 RNA メチル化抗体を用いた RNA 免疫沈降法 (meRIP-seq) により、包括的にプロファイリングするための準備を行ってきた。より高頻度に化学修飾を受けるマイクロ RNA が同定されれば、これまでの候補よりも精度の高いがんの診断・進行予測が可能となる。RNA に起こる化学修飾の種類は、核酸分子の中で修飾が入る塩基位置、さらに化学修飾の種類 (メチル化、アセチル化など) により膨大な多様性が予想される。また 2500 種類を超えるマイクロ RNA が独自のメチル化パターンを持つことから、その機能変化を *in vitro* の実験系で把握するのは極めて困難であるため、本研究では細胞株でのメチル化 miRNA プロファイリングと *in vitro* の機能解析をつなぐアプローチとして *in silico* バーチャルスクリーニングを導入してきた。小関助教らを中心とした、コンピューターシミュレーションの結果、一部のマイクロ RNA においては、化学修飾が加わることで、AGO2 などのマイクロ RNA 結合タンパクとの相互親和性が大きく変化し、標的メッセンジャー RNA の抑制機構に影響を与える可能性があることが明らかとなった。以上のように、平成 28 年度は最終的ながん早期診断のためのバイオマーカーの開発に向けて、基礎レベルでのマイクロ RNA の化学修飾の POC 取得と臨床検体での検証との両面から研究を進めてきた。

英文

This study is aimed for an early detection of intractable cancers such as pancreatic cancer using our own developed measurement system to detect chemical modifications on microRNAs.

Conventional detection technique including RT-PCR can only detect the quantity of microRNAs, and not appropriate for the detection of chemical modifications on microRNAs. In the last financial year, we have developed both purification method of microRNAs and detection technique using mass spectrometry. These include the development of target enrichment method using affinity chromatography and improvement of ionization efficiency in mass spectrometry. This enabled the detection of very small amount of chemical modification (less than 5%) on microRNA oligonucleotides. The goal of this optimization is to detect chemical modification on microRNAs in clinical samples including tumor tissues, blood and urine. In addition to improvement of detection technique, we have investigated the relationship between chemical modifications and functional alterations of microRNAs using cancer cell lines. If these chemical modifications are proved to be biologically important, they could be useful biomarkers. We have investigated the functional alterations including growth inhibition, resistance to chemotherapeutic agents after manipulation of the expression of RNA methylation and demethylation enzymes. These findings suggest that chemical modifications on microRNAs are not only useful as diagnosis and surrogate biomarkers, but also the methylation and demethylation enzymes could be crucial therapeutic targets. The targets of methylation/demethylation enzymes include apoptosis related

genes, which could be involved in chemoresistance. We have also prepared the samples for methylated RNA immunoprecipitation followed by sequencing (**MeRIP-Seq**), which is useful to comprehensively identify methylation target RNAs. These methylation target RNAs could be useful biomarkers for the detection of chemical modifications on RNAs. Because there are a wide variety of microRNA species and various kinds of modifications, it is difficult to comprehensively reveal functional changes after the induction of all kinds of chemical modifications. Therefore, we have performed in silico virtual screening to predict microRNA function with or without chemical modifications. The result showed that microRNAs changes their target inhibition efficiency after induction of chemical modifications through changes of binding affinity between microRNAs and RNA-induced silencing complex (**RISC**) proteins. These findings support the notion that methylation on RNA molecules is biologically important, and could be useful biomarkers to detect cancer initiation and progression.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0件、国際誌 8件)

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Ogawa, H., Konno, M., Kawamoto, K., Nishida, N., Koseki, J., Mizushima, T., Satoh, T., Eguchi, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Fetal hepatocyte derived culture medium elicits adipocyte differentiation to bile duct cell lineages in mouse. *Biomedical, Reports*, 2016. (in Press)
- 4) Noguchi, K., Konno, M., Eguchi, H., Kawamoto, K., Mukai, R., Nishida, N., Koseki, J., Wada, H., Akita, H., Satoh, T., Marubashi, S., Nagano, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. c-Met affects gemcitabine resistance over carcinogenesis in a mouse model of pancreatic cancer. *Oncol. Lett.*, 2016. (in Press)
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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., Saato, 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.

- 8) Sakatani, A., Doi, Y., Kitayama, T., Matsuda, T., Sasai, Y., Nishida, N., Sakamoto, M., Uenoyama, N., Kinoshita, K. Pancreaticoduodenal artery aneurysm associated with coeliac artery occlusion from an aortic intramural hematoma. *World. J. Gastroenterol.*, 22(16):4259-4263, 2016.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 消化器癌におけるヒストン脱メチル化酵素の標的化, English Oral Sessions, 西田尚弘, 小関 準, 今野雅允, 川本弘一, 太田勝也, 土岐祐一郎, 森正樹, 石井秀始, 第 75 回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜, 2016/10/7, 国内.
2. 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, ポスター, 西田尚弘, 大房 健, 山縣彰, 小関 準, 今野雅允, 川本弘一, 浅井歩, 水島恒和, 江口英利, 瀧口修司, 佐藤太郎, 三森功 士, 落谷孝広, 土岐祐一郎, 森正樹, 石井秀始, 第 39 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 2016/12/1, 国内.
3. Epigenetic modifications on non-coding RNAs in cancer, Poster, Nishida, N., Konno, M., Koseki, Jun., Kawamoto, K., Asai, A., Mizushima, T., Eguchi, H., Takiguchi, S., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H., 2017 Cellular and Molecular Bioengineering Annual Conference, Hapuna Beach Prince Hotel, 2017/1/6, 国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし