

## 末梢血の細胞外分泌小胞に含まれるマイクロ RNA 分子内メチル化を制御する

### 分子機構の解明と臨床応用のための開発研究

石井秀始

大阪大学大学院医学系研究科

#### 【研究の背景】

臨床腫瘍教室としてヒト材料から高い精度で DNA および RNA の高速シーケンスや、蛋白の質量分析を行うことにより、がん患者の初診とともに治療後の再発や転移をいち早く診断するための末梢血バイオマーカーの開発研究を実施してきた。特に、2012 年頃から、マイクロ RNA のメチル化修飾を解読するために、新しい方法として質量分析法とトンネル電流シーケンス法を応用して RNA のシーケンスとメチル化修飾を高速で読む方法を開発してきた。マイクロ RNA は 22 塩基前後の短鎖 RNA であり、通常の免疫沈降ベースの RIP 法や高速シーケンスでは、メチル化修飾の正確な位置情報を決定することができない。類似の別方法としてオックスフォードナノポア社のイオンシーケンサーがあるが、それでは RNA 修飾の解読には不正確(60%の正確さ)である。それに対して、私たちのトンネル電流シーケンス法では原理的に直接読むので低コストで RNA 修飾解読はより正確に読める(機械学習で 95%以上)。すでに消化器がんの患者のサンプル 200 例を解読し、バイオマーカーとしての重要性を明らかにしてきた。本研究では、さらに他疾患サンプルを含めてデータバリデーションを進めるとともに、マイクロ RNA メチル化修飾の原因となる酵素に関して、その由来となる組織と細胞を明らかにしていく計画である。

#### 【目 的】

私たちが開発した質量分析およびトンネル電流シーケンス法で解読が可能となってきた、末梢血の細胞外分泌小胞(エクソソーム)に含まれるマイクロ RNA のメチル化の情報のプロファイリングを進め、その修飾の原因となるマイクロ RNA メチル化酵素複合体の高分子蛋白としての機能を明らかにして、疾患バイオマーカーの性能を最高精度化するための技術を確認する。

#### 【方 法】

##### (1) 13 がん種でのマイクロ RNA メチル化修飾の検討

日本人に多い 13 種類のがん(胃がん、大腸がん、食道がん、膵臓がん、肝がん、胆道がん、肺がん、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、膀胱がん、神経膠腫、肉腫)で、エクソソームに含まれるマイクロ RNA のメチル化の情報のプロファイリングを進め、各疾患に特徴的なマイクロ RNA 番号で、特異的な位置のメチル化修飾の情報を明らかにする。研究分担者の落谷(国立がん研究センター、東京医科大学)と協力して、各疾患で 80 例、合計で 1000 例程の解析を行う。計測システムはすでに確立しており、消化器がんでの計測データ実績がある。チップは低コストであり、研究期間内に実施可能である。喫煙、飲酒、脂質異常症等の影響を明らかにする。

##### (2) マイクロ RNA メチル化酵素を同定し、その組織細胞でメチル化修飾が発生するか究明する:

マイクロ RNA のメチル化修飾は、Mettl3, Mettl14, Wtap の高分子複合体で[CH<sub>3</sub>-]が付加され、FTO, ALKBH5 で脱メチルの平衡で反応し、hnRNP や Ythdf1 等の RNA 結合蛋白で標的の翻訳制御といった機能を発揮することが明らかとなっている(Cancer Science 110(8)2318-2327, 2019)。本研究では、条件付き発現を可能とした Mettl3, Mettl14,

Wtap のゲノム編集でノックアウトしたマウスを用いて、細胞組織レベルのシングル細胞解析を実施し、末梢血エクソソーム内のマイクロ RNA のメチル化修飾がどの細胞に原因があるのかを明らかにする。Mettl3, Mettl14, Wtap に加えて、FTO, ALKBH5、および hnRNP や Ythdf1 等は、各組織で特徴的な RNA 結合蛋白の複合体として、免疫沈降で把握できる。またヒトとマウスでマイクロ RNA のメチル化修飾の機構は対応しているため、マウスを用いたメカニズム解析が有効である。

## 【結 果】

### (1) 13 がん種でのマイクロ RNA メチル化修飾の検討

大阪大学、関連施設のサンプルでの解析、および TCGA 等の public database の検討から、特に消化器がんをはじめとして腫瘍の特異的な低酸素環境が強いサンプルにおいて、マイクロ RNA メチル化修飾も強い傾向が示され、現在統計的な解析を実施中である。そのメカニズム解析として、イメージング質量分析顕微鏡で検討した結果、低酸素を特徴づける複数の代謝産物と、RNA メチル化修飾の触媒反応の局所とがよく一致した結果が観察され、「現場検証」においてもマイクロ RNA メチル化修飾のがんにおける重要性が確認された。

### (2) マイクロ RNA メチル化酵素を同定し、その組織細胞でメチル化修飾が発生するか究明する

腫瘍におけるマイクロ RNA メチル化修飾の重要性を明らかにするために条件付き発現を可能とした Mettl3, Mettl14, Wtap のゲノム編集でノックアウトしたマウスを用いて、細胞組織レベルのシングル細胞解析を実施し、末梢血エクソソーム内のマイクロ RNA のメチル化修飾がどの細胞に原因があるのかを検討した。その結果、ルシフェラーゼを用いて局所を体外から観察する方法により、コンディショナルに誘導されたノックアウト環境は、腫瘍の細胞死を特異的に誘導することが示され、そのイベントはカスパーゼ特異的なプロドラッグを用いて確認することができた。さらに将来の創薬展開を図るためにメチル化酵素の阻害剤を合成展開し、純度を高めた化合物をマウスに投与して、上記のノックアウト環境で見られたのと同様の結果が得られることを確認し、創薬展開の標的として「適切である」ことを確認した。

## 【考 察】

DNA メチル化に比較して、RNA メチル化の研究は後塵を拝しているのが現状であったが、最近の数年間において、中国の研究グループを中心として盛んに研究が進められているところである。私たちが用いているマイクロ RNA メチル化修飾の計測技術は大阪大学の知的財産として登録したわが国発の技術であり、この技術を用いてマイクロ RNA メチル化修飾を計測することにより、研究のユニーク性とアドバンテージを確保して大きな成果を得ることができた。知財は周辺特許で強靱にしているため、ベンチャーへの展開が容易であると期待される。さらにマウス等の研究リソースも企業とコラボレーションを進めることにより、産学連携の導出を促進するように努めている。本財団の支援に厚く御礼申し上げる。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

難治がんである膵がん等の早期診断技術を開発することができた。膵がんの予後は極めて不良であり、5 年間の平均生存率は 10%に満たない。本研究成果により、難治がんの早期診断を可能とし、早期の治療介入を実現し、さらに治療の経過中に再発をモニターすることに繋げることにより、全体としての生存率を底上げし、治療成績の向上を通じて疾病の制御に貢献することができた。成果の一部は論文化とともに、新聞等で報道された。

## 【参考・引用文献】

1. Tatekawa, S., Ofusa, K., Chijimatsu, R., Vecchione, A., Tamari, K., Ogawa, K., Ishii, H. Methylosystem for Cancer Sieging Strategy. *Cancers (Basel)*, 13(20):5088, 2021. doi.org/10.3390/cancers13205088
2. 石井秀始, 谷口正輝, 鷲尾隆:『大阪大、マイクロ RNA における 2 種類の化学修飾の直接同時検出に成功 難治性消化器がんの早期診断法の開発』、2021.9.30、日経バイオテク ONLINE.

3. 石井秀始、落谷孝広:『東京医大発新興や東芝、東レなど、膵臓がん、微小物質で早期発見。』、2021.11.24、日本経済産業新聞
4. 石井秀始、落谷孝広、谷口正輝:『膵臓がん、微小物質で早期発見 東京医大発新興など』2021.11.25、日本経済新聞 電子版