

## Point

当社と大阪大学大学院医学系研究科等との共同研究によって、マイクロRNAのメチル化率の測定が、がんの検出に有効であることがわかりました。この成果は、2019年8月29日、英国科学誌「Nature Communications」に掲載されました。この技術を活用、発展させることにより、がんの早期診断と治療過程において広範かつ高感度な指標となることが期待されます。

## マイクロRNAを用いた早期がん診断技術の開発

食品・生命科学研究所 大房 健

※この技術開発は、大阪大学大学院医学系研究科の今野雅允寄附講座講師(先進薬物療法開発学寄附講座)、石井秀始特任教授(疾患データサイエンス学共同研究講座)らとの共同研究によるものです。

### はじめに

マイクロRNA(以下、miRNA)は、1993年に見いだされた極めて短いRNAです。当初はRNAが切断されたものであり、特別な機能は無いものと考えられていましたが、解析が進み、機能を有することが判明しました。特に2000年にヒトのmiRNAの一つであるlet7aが、がんや細胞の初期化に関連が深い遺伝子の制御をしていることが判明してからは、研究者の注目を集める存在となりました。

石井秀始教授の研究室では、消化器系がんの先進的治療・診断法の開発のため、さまざまな研究が行われています。その一環としてmiRNAの発現量を増やしたがん細胞について、当社に解析などのご依頼をいただいたことから、共同研究を開始しました。

### 質量分析計によるDNA/RNA解析

食品・生命科学研究所では、高性能な質量分析計(MALDI-TOF/TOF)であるBruker ultrafleXtreme(写真1)を導入し、タンパク質の網羅的な解析(プロテオーム解析)などに活用しています。この質量分析計では、分子量数千の分子まで配列情報が得られます。

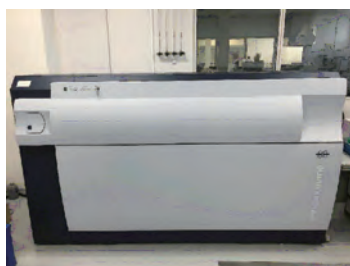


写真1 Bruker ultrafleXtreme

筆者は、短いDNA、RNAであれば質量分析計を用いた解析の余地があると考えていましたが、比較的短いとされるRNAでもその分子量は3万前後であり、質量分析計による測定・解析は困難でした。

### 質量分析計によるmiRNA解析

RNAは核酸で、塩基が糖と結合したヌクレオシドと呼ばれる化合物に、リン酸が結合した基本構造(ヌクレオチド)を持ちます。RNAを構成する塩基は、表1の4種類です。

表1 RNAを構成する塩基とヌクレオシドおよびヌクレオチド

塩基	ヌクレオシド	ヌクレオチド
アデニン	アデノシン	アデニル酸(AMP)
ウラシル	ウリジン	ウリジル酸(UMP)
グアニン	グアノジン	グアニル酸(GMP)
シトシン	シチジン	シチジル酸(CMP)

miRNAは、他のRNAと同様にDNAを鋳型にして転写されます。前駆体として転写されたのち、17-30塩基ほどの短い成熟型miRNAとなります。その分子量は小さく、Bruker ultrafleXtremeによる分析が可能であることがわかりました。

### miRNAのメチル化

#### (1)核酸のメチル化

核酸のメチル化は、細胞内に存在しているメチル化酵素の働きにより、核酸を構成している塩基の水素(-H)がメチル基(-CH<sub>3</sub>)に置き換えられることで生じます(メチル化修飾、図1)。DNAのメチル化は、塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現制御の一つとして広範に研究対象となっています。一方、RNAは、転移RNA(tRNA)では詳細な研究がなされていますが、他のRNAについて修飾に関する研究は進んでおらず、特にmiRNAを含む低分子RNAの修飾解析は全く進んでいません。

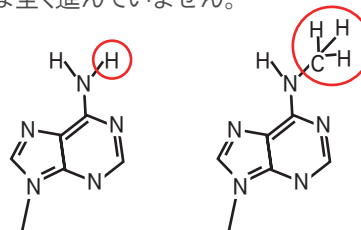


図1 アデノシン塩基のメチル化例

#### (2) miRNAの測定とメチル化塩基の確認

石井教授のチームでは、メチル化を受けたRNA塩基に着目した分析を行い、メチル化塩基の多くが転移RNAよりも小さいRNAに多く存在していることを明らかにしました。

Bruker ultrafleXtremeによるmiRNA分析では、図2の赤い線で示した位置での切断が多く、y<sub>n</sub>イオンが強く観察されました。このy<sub>n</sub>イオンの質量数を算出することにより、それぞれのヌクレオチドの質量数を測定し、RNAを構成して

いる塩基を確認することが可能です。このとき、メチル化修飾を受けて質量数が変化しているかを確認することも可能であることがわかりました。

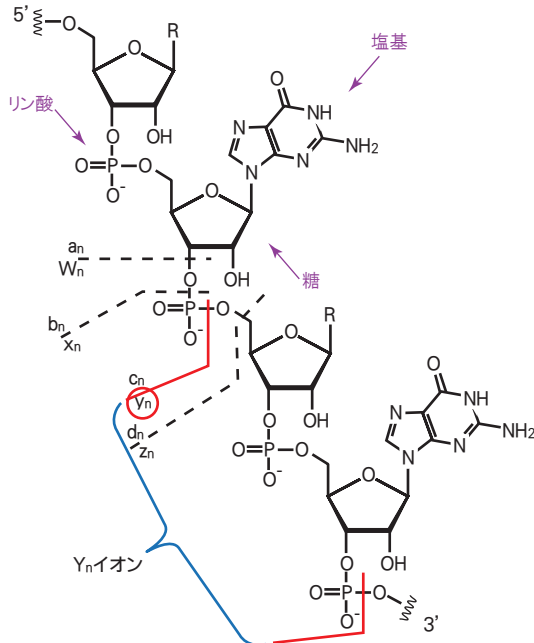


図2 質量分析計によるRNA配列の同定

図1の例では、左側の-NH<sub>2</sub>が-NH-(CH<sub>3</sub>)に変化しています。これにより質量が増えることとなります。質量はダルトン(Da)という単位で測定されます。

検証のために、核酸合成装置により合成したmiRNAの測定を試みました。図3のとおり、メチル化アデノシンを合成した部分では、質量が14Da増加しており、miRNAのメチル化の測定が可能であることを確認しました(表2)。

表2 RNAを構成しているヌクレオシドの質量

ヌクレオシド	質量(Da)
アデノシン (A)	329
メチル化アデノシン(mA)	343
ウリジン (U)	306
グアノシン (G)	345
シチジン (C)	305

次に、がん患者血清より抽出したmiRNAを確認したところ、メチル化アデノシンが見いだされたため、がん患者と健常者でメチル化率を比較することで、指標(診断マーカー)として利用可能であるか、確認作業を行いました。

その結果、miRNAのメチル化率による判定は、従来のがん診断マーカーと比較して、感度(がん患者検体を正しく陽性=がんでであると診断する確率)、特異度(がんでない検体を正しく陰性=がんでないと診断する確率)が優れていることが明らかとなりました。特に、従来の技術では検出が困難であった超早期肺がんの患者の血清においても、高い感度を得ることができました。

### Nature Communications誌掲載

血清中のmiRNA量の変化を指標としてがんを診断する手法はこれまでも開発が進められていますが、メチル化率による判定はmiRNAの状態の変化に着目した独自性・新規性の高いものです。

このことから石井教授がNature Communications誌への掲載に向けてご尽力され、2019年の7月に掲載が決定し、8月29日に掲載されました。

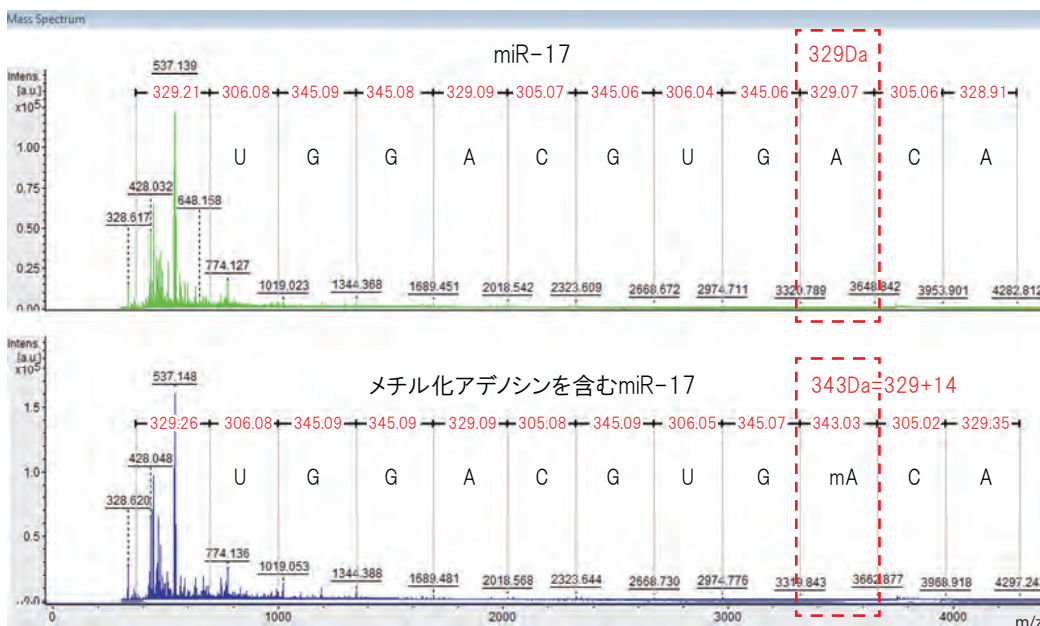


図3 miRNAのマススペクトログラム例

### おわりに

本件は大阪大学との共同研究のなかで生まれた技術であり、特許についても共同出願となります。

今後、この技術の応用、発展により、早期がんが高感度で診断されるようになるとともに、手術や抗がん剤の効果を予測・確認するうえで優れた指標となり、がん治療に貢献することが期待されます。

Nature Communications誌に掲載された成果は、以下のURLから無料でアクセスが可能です。  
<https://rdcu.be/bP04k>