

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15241

研究課題名（和文）tRNA修飾酵素群が創出する癌の不均一性の分子機構解明とそれに基づく治療戦略構築

研究課題名（英文）Development of anti-cancer strategy by targeting tRNA modification enzymes

研究代表者

藤村 篤史 (Fujimura, Atsushi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10771082

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）：本課題においては、「がん幹細胞性を司る翻訳様式」の要諦として、tRNA修飾の機能に着目し、複数の異なる様式の核酸修飾およびそれを担うtRNA修飾酵素について同定した。特に、tRNA修飾酵素Xについては、悪性脳腫瘍におけるがん幹細胞性の維持に必要な不可欠な修飾核酸であることを見出し、論文として報告できた。さらにtRNA修飾酵素Yについても、酵素Xと同様の修飾様式を呈すること、および酵素Xと同様に種々のがん種の幹細胞性の維持に必要な不可欠であることを見出した。また、tRNA修飾酵素Zについては、上皮系がんの幹細胞性を司ることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で取り組んだ「tRNA修飾酵素群によるがんの翻訳制御機構」は、がん治療の妨げの元凶のひとつとされている「がん組織内の不均一性」を説明するための新しい試みである。今回明らかになったように、特定のtRNAにおける修飾核酸には、がんの進展を促進させたり、阻害させたりする機能があることが判明した。今回私が同定したtRNA修飾酵素群に対する阻害剤が開発できれば、これまで治療を困難にしてきたがん幹細胞を標的化することが可能な抗がん剤が開発される可能性があるという点で、重要な研究であると考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, I focused on the molecular mechanism of "cancer stem cell-related translational manner." I revealed that tRNA modification enzyme X was crucial to sustain the stemness of glioma-initiating cells. I found that enzyme Y, which has similar structure and function of enzyme X, was also important for various kind of cancers. Moreover, I also identified enzyme Z as the other type of tRNA modification enzyme that controlled stemness in carcinoma. These findings prompt me to develop the anti-cancer strategy, especially next-generation anti-cancer drugs, which can target the cancer stem cells.

研究分野：がん生物学

キーワード：がん幹細胞 tRNA修飾酵素 翻訳メカニズム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がんの病態理解を困難にし、治療戦略の構築を困難にする元凶のひとつとして「がんの不均一性」が知られている。その成因は永らくゲノム変異等によるポリクローナルな進化で説明されてきており、その全容を掌握するべくマイクロアレイや RNA シークエンスによる transcriptome 解析等が進められてきたが、未だに「がんの不均一性」を与える本態を完全に説明するには至っていない。近年の Ribosome Profiling 技術の発達により、transcriptome (転写)と translatoome (翻訳)の乖離の存在が明らかにされ、とりわけ「がん関連遺伝子の選択的翻訳制御機構」の重要性が再認識されてきたが、私はこの翻訳制御機構の差異こそが「がんの不均一性の本態」ではないかと仮説を立てた。がんの特異的な翻訳制御機構は、これまでも翻訳開始因子のリン酸化など、種々の説明が試みられてきたが、翻訳プロセスのひとつである elongation については、がん特異的なプロセスが明確に存在することは示されていない。

本課題では、elongation の過程の要である tRNA に着目して、特にその修飾が翻訳プロセス全体に及ぼす影響に焦点をあてて、「がんの特異的な翻訳制御機構」の一端を解明することに専念することにした。

### 2. 研究の目的

tRNA は、細胞内に非常に豊富に存在する RNA 種のひとつであり、多種多様な修飾を受けることでその機能が大きく変化することが知られた分子でもある。本研究においては、これまで私が取り組んできた研究成果をさらに拡張することで、「tRNA 修飾酵素群が多彩なメカニズムで翻訳制御を行うことこそが、がん細胞の分化状態や環境適応性などの不均一性を決定付ける本態である」という挑戦的な仮説をたて、組織内不均一性が著しく難治性がんの代表格である悪性脳腫瘍(GBM)を対象として多角的に検証することを目的とした。特に、GBM の幹細胞性を司る tRNA 修飾酵素および特定の修飾核酸を発見・同定することを第一の目標として設定した。

### 3. 研究の方法

まず、数ある tRNA 修飾酵素群の中から、GBM の予後を規定しうるものを、バイオインフォマティクス的手法によって選別した。そのうちいくつかの候補因子に対して、悪性脳腫瘍幹細胞株におけるノックダウン実験によるスクリーニングを実施し、特定の tRNA 修飾酵素 X、Y、Z を絞り込むことに成功した。

次に、それぞれの tRNA 修飾酵素について、GBM の不均一性の構成に重要であると考えられている「がん幹細胞」に与える影響を検証することとした。具体的には、tRNA 修飾酵素に対する shRNA 発現レンチウイルスを悪性脳腫瘍幹細胞株に感染させ、それぞれの細胞における自己複製能(スフェア形成能)、未分化状態維持能(分化マーカー、未分化マーカーを用いた免疫染色)、造腫瘍能(NOD-SCID マウスにおける腫瘍生着能)を、それぞれ検証した。

さらに、その分子メカニズムを解明すべく、特定の tRNA における修飾核酸がどのように GBM のがん幹細胞性に影響を与えるかを、生化学的・分子生物学的に検証した。

#### 4 . 研究成果

本課題では、「がん幹細胞性を司る翻訳様式の解明」を目標に掲げ、翻訳過程の効率や正確性に深く関わる tRNA の核酸修飾およびそれを担う tRNA 修飾酵素に特に着目して研究を進めてきた。

2018 年度は、GBM における不均一性を創出する tRNA 修飾酵素の第一候補として、酵素 X を同定した。酵素 X は、GBM のがん幹細胞性を調整することで、GBM の組織内不均一性を制御していることがわかった。酵素 X は GBM 細胞のなかでも、とりわけがん幹細胞性の高い細胞集団で強く発現しており、shRNA による酵素 X のノックダウンにより、幹細胞性が著しく減弱することを発見した。酵素 X の生化学的な特徴として、酵素 X を介した特定の tRNA の核酸修飾の効率は、低酸素環境などの腫瘍細胞の周囲の微小環境に大きく左右されることも発見した。特筆すべき発見として、酵素 X は、GBM のがん幹細胞における特異な代謝経路によって蓄積する毒性修飾核酸を解毒させる方向に機能することがわかった。このことは、酵素 X が翻訳プロセスを律するという当初の予想に反して、古典的な役割とは全く異なる様式で GBM の悪性度を増悪させていることを明らかにした点で、極めて重要な知見であると考えられる。また、酵素 X に構造上類似したアミノ酸配列を有する tRNA 修飾酵素 Y についても、GBM のがん幹細胞性を司る重要な因子として機能解析することに成功した。

2019 年度は、2018 年度までに同定した「tRNA 修飾酵素 X による GBM の進展制御メカニズム」について、その詳細な分子メカニズムを解明し、論文報告した。tRNA 修飾酵素 Y については、2019 年度の研究によって、GBM の他にも種々のがん種において、がん幹細胞性を維持するのに必要であることが判明した。酵素 Y についても酵素 X と同様、低酸素環境下で核酸修飾の効率が上昇することが判明したため、がんの悪性化の元凶である低酸素の微小環境を念頭において、今後の研究展開のヒントが得られたと考える。また、酵素 X、酵素 Y と異なる様式で異なる tRNA 種を修飾する酵素 Z が、GBM をはじめとする種々のがん種において、がん幹細胞性を維持することに必要であることを発見した。これまでの解析結果を統合的に勘案すると、酵素 Z については、酵素 X や酵素 Y とは異なり、特定の微小環境によってその活性が大きく左右されることはないようである。しかしながら、酵素 Z の興味深い特性として、がん化シグナルの下流において転写レベルで発現が上昇する因子であることがあげられる。

以上の知見は、当初の研究計画書に基づき追加で立案された実験によって得られたものであり、今後さらなる研究展開・拡張することで、tRNA 修飾酵素を標的とした抗がん剤の開発など、全く新しい制がん戦略の構築に寄与できるよう努めたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamamoto T*, Fujimura A*, Wei FY, Shinojima N, Kuroda JI, Mukasa A, Tomizawa K.	4. 巻 21
2. 論文標題 2-Methylthio Conversion of N6-Isopentenyladenosine in Mitochondrial tRNAs by CDK5RAP1 Promotes the Maintenance of Glioma-Initiating Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 42-56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2019.10.012. Epub 2019 Oct 8.	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 Matsumoto Y, Ichikawa T, Kurozumi K, Otani Y, Fujimura A, Fujii K, Tomita Y, Hattori Y, Uneda A, Tsuboi N, Kaneda K, Makino K, Date I.	4. 巻 8
2. 論文標題 Annexin A2-STAT3-Oncostatin M receptor axis drives phenotypic and mesenchymal changes in glioblastoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Neuropathol Commun.	6. 最初と最後の頁 42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40478-020-00916-7.	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 Uneda A, Kurozumi K, Fujimura A, Kamiya A, Hirose T, Yanai H, Date I.	4. 巻 7
2. 論文標題 Intracranial Mesenchymal Chondrosarcoma Lacking the Typical Histopathological Features Diagnosed by HEY1-NCOA2 Gene Fusion.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 NMC Case Rep J.	6. 最初と最後の頁 47-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2176/nmccrj.cr.2019-0123. eCollection 2020 Apr.	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 1件）

1. 発表者名 Seiji Yasui, Atsushi Fujimura, Hiroyuki Michiue, Yasuaki Ichikawa, Shuichi Furuya, Mitsunobu Kano, Hideki Matsui
2. 発表標題 Defining the molecular characteristics of boron compounds proposes the concept of precision medicine in BNCT field
3. 学会等名 ICNCT 18th (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 (口頭発表) 藤村篤史、山本隆広、魏范研、富澤一仁
2. 発表標題 ミトコンドリアによる細胞障害性修飾核酸の解毒作用は悪性脳腫瘍幹細胞の維持に必須である
3. 学会等名 第97回 日本生理学会(コロナ禍により、誌上開催)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ホウ素中性子捕捉療法の効果を最適化するがん病巣組織評価	発明者 藤村篤史、松井秀樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/005727	出願年 2018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
---------------------------	-----------------------	----