

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16323

研究課題名(和文) Studying the dynamics of a novel small RNA (tiRNA) generation in glioma;  
possible new therapy研究課題名(英文) Studying the dynamics of a novel small RNA (tiRNA) generation in glioma;  
possible new therapy

研究代表者

Rashad Sherif (Rashad, Sherif)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00824088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、in vitroおよびin vivoで起こる非正規のアンジオネニン非依存性tRNA切断パターンを特定することができました。さらに、tRNA修飾酵素であるAlkbh1が神経膠腫の病態に果たす役割を明らかにしました。Alkbh1は、神経膠腫患者の予後不良と関連しています。Alkbh1を過剰発現させると、神経膠腫の幹細胞が誘導され、神経膠腫の免疫機能や神経細胞との相互作用に関連する様々な遺伝子がアップレギュレーションされるようになりました。また、Alkbh1の過剰発現は、活性酸素による老化に対する抵抗性を高め、酸化的ストレス因子に対する抵抗性を高めることにつながった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Understanding the epitranscriptional processes that govern cellular responses to oxidative stress are important for understanding many diseases, including cancer. The results of this work can help design novel therapies to manipulate tRNA modifications and cleavage and improve glioma outcome.

研究成果の概要(英文)：In this work, I was able to identify a non-canonical Angionenin-independent tRNA cleavage pattern that occurs in vitro and in vivo. I was also able to identify the role of tRNA methylation in driving this tRNA cleavage pattern. Further, I identified the role of a tRNA modifying enzyme, Alkbh1, in glioma pathology. Alkbh1 is associated with worse outcomes in glioma patients. Overexpressing Alkbh1 led to induction of glioma stemness, and upregulation of various genes associated with immune functions of glioma and interaction with neurons. Alkbh1 overexpression also led to more resistance to ROS induced senescence and resistance to oxidative stressors. These findings indicate that Alkbh1 is an important target for glioma therapy that should be targeted to improve outcome.

研究分野：Molecular Neurobiology

キーワード：tRNA modifications Glioma oxidative stress tRNA cleavage Stroke

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

tiRNA は、アンジオジェニンによる細胞ストレスで tRNA が切断されることで生成される新しい低分子ノンコーディング RNA 分子です。我々は、tiRNA が in vivo および in vitro で脳虚血のバイオマーカーとして利用できることを明らかにした。また、グリオーマ細胞株における酸化ストレスに伴う tiRNA の生成も検出しました。tiRNA は悪性腫瘍患者の血漿から検出されましたが、神経膠腫や他の悪性腫瘍では、その機能的役割はまだ検討されていません。私は、tiRNA の生成機構を標的とすることで、神経膠腫の治療標的として価値があると仮説を立てています。本研究の目的は、神経膠腫細胞における tiRNA の動態と機能、および化学療法に対する応答について研究することである。第二の目標は、神経膠腫細胞における tiRNA の安定性を標的とした新しい治療法開発の可能性を探ることです。

この研究は、新規の薬理的標的の発見につながり、神経膠腫だけでなく、さまざまな悪性腫瘍における tiRNA の役割に関する生物医学的・産業的研究を刺激することになるでしょう。

## 2. 研究の目的

- □ tRNA 切断の生物学と、神経膠腫および酸化ストレス応答におけるその役割を解明する。
- □ tRNA のメチル化と tRNA の切断の関連を明らかにする。
- □ 神経膠腫を治療の標的とするために使用できる tRNA 修飾酵素を同定する。
- □ 神経膠腫やその他の疾患のバイオマーカーとしての tRNA 切断に関する将来の臨床および前臨床研究の基礎を作る。

## 3. 研究の方法

この研究開発プロジェクトでは、tRNAの切断やtRNAの生成を研究するために、様々なツールや技術を用いました。ここでは、フェロブターシス誘導剤やその他の酸化ストレスに細胞をさらすなど、ストレスを与える細胞モデルを使用しました。tRNAの切断はノーザンブロットングやシーケンス技術で評価し、tRNAの修飾はイムノーザンブロットングや質量分析で解析しました。

#### 4. 研究成果

##### 1. ストレス下におけるアンジオジェニン非依存的tRNA切断の存在を解明する

In この研究では、in vitro および in

vivo での tRNA 切断のダイナミクスを研究したいと考えました。そのために、強い tRNA の切断を誘導することが知られている脳虚血再灌流ラットモデルを用いました (Sato, Rashad, et al, Neuroscience, 2020)。tRNA に対する DIG 標識プローブを用いて、in vivo では一部の tRNA が非カノニカルに (すなわち、従来考えられていたアンチコドン部位ではなく) 切断されることが明らかになった。これらの tRNA は、ほとんどがミトコンドリアに存在していました (図 1)。このことは、in vitro でも観察された。また、アンジオジェニンを過剰発現させてもこれらの tRNA の切断には影響しなかつたが、Alkbh1 の過剰発現による tRNA の脱メチル化は、この観察された非正規 tRNA 切断に影響を与えた。これらの結果は公表されています (Rashad et al, J Cell Phys, 2020)。Alkbh1 に関する私の以前の観察結果 (Rashad et al, RNA

Biol, 2020) に加えて、これらのデータは、明確なストレス応答中の非カノニカル

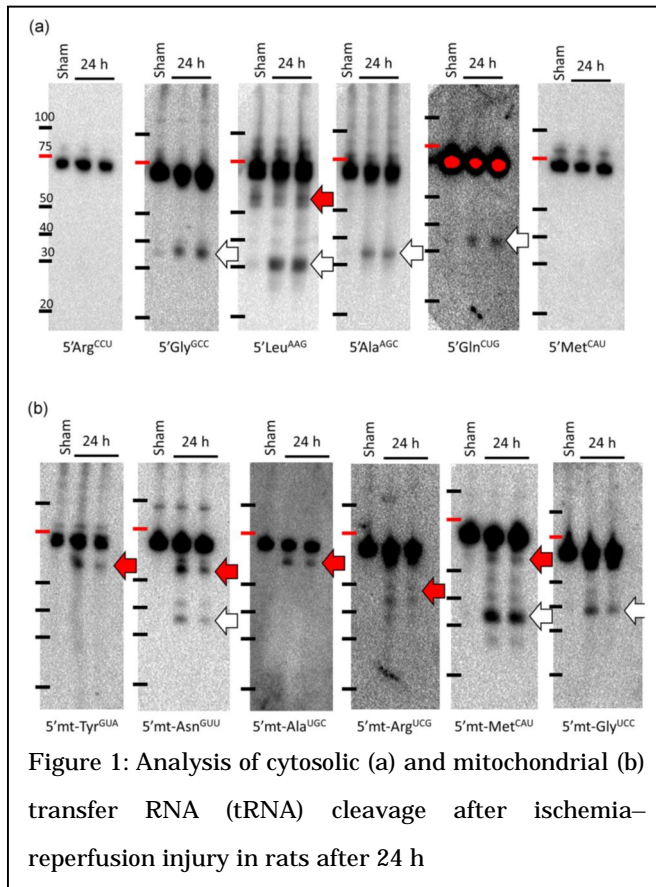


Figure 1: Analysis of cytosolic (a) and mitochondrial (b) transfer RNA (tRNA) cleavage after ischemia-reperfusion injury in rats after 24 h

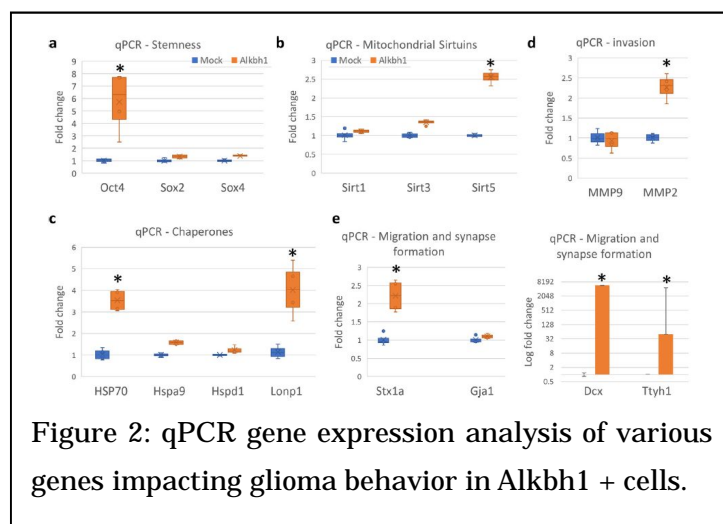


Figure 2: qPCR gene expression analysis of various genes impacting glioma behavior in Alkbh1 + cells.

に加えて、これらのデータは、明確なストレス応答中の非カノニカル

tRNA 切断を制御する tRNA メチル化の不可欠な役割を示しています。

## 2. 神経膠腫の病態における ALKBH1 の役割を解明する

本研究では、神経膠腫患者の予後を悪化させることが知られている Alkbh1 を、神経膠腫細胞で過剰発現させました。Alkbh1 を過剰発現させると、増殖率が低下し、逆説的に幹細胞が増加し、酸化ストレスや老化に対する抵抗性が向上しました(図2)。RNA-seq により、免疫反応に関連する複数の経路の活性化、および強力な代替スプライシングプログラムが確認された(図3)。これらのこと

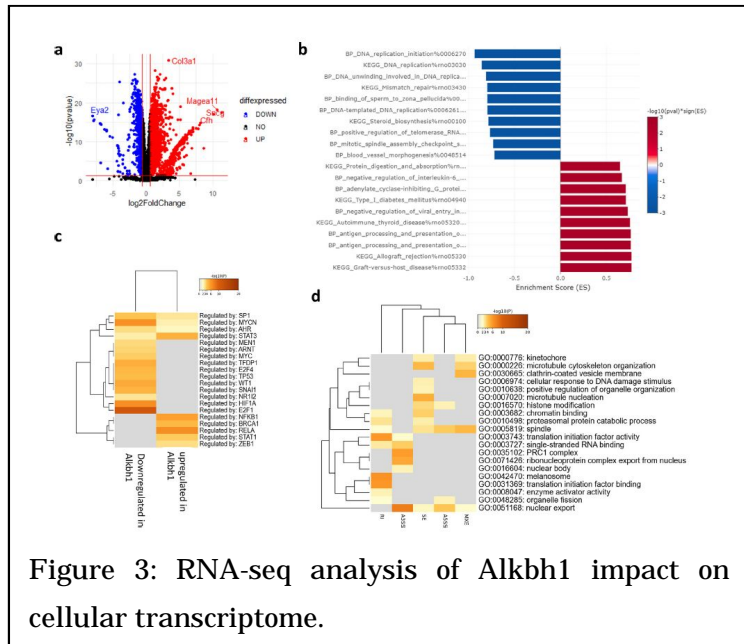


Figure 3: RNA-seq analysis of Alkbh1 impact on cellular transcriptome.

から、Alkbh1 は、転帰を改善するために標的とすべき、神経膠腫治療の重要なターゲットであることがわかりました。これらの結果は、Rashad et al, Neuroscience, 2022 に掲載されました。

## 3. 継続的・継続的な作業

4. この研究開発プロジェクトでの研究に基づき、神経膠腫の病態に影響を与える複数の tRNA 修飾酵素を特定することができました。これらの酵素は、本プロジェクトの成果に基づいて授与される日本学術振興会科研費 B の支援を受けて、現在研究中です。また、アンジオジェニンを介した tRNA 切断と酸化ストレス応答との関連性をさらに明らかにすることにも取り組みました。tRNA 切断とミトコンドリアストレス応答を結びつけるストレス経路を特定しました。また、アンジオジェニンと tRNA の修飾との関連も明らかにしました。この研究結果は現在、出版準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sherif Rashad, Teiji Tominaga, Kuniyasu Niizuma	4. 巻 236
2. 論文標題 The cell and stress specific canonical and noncanonical tRNA cleavage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 3710&-3724
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcp.30107	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yuan Zhou, Sherif Rashad, Teiji Tominaga, Kuniyasu Niizuma	4. 巻 -
2. 論文標題 Mature Neurons' sensitivity to oxidative stress is epigenetically programmed by alternative splicing and mRNA stability	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biorxiv preprint	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.12.25.472549	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sherif Rashad, Shane R Byrne, Daisuke Saigusa, Jingdong Xiang, Yuan Zhou, Liyin Zhang, Thomas J Begley, Teiji Tominaga, Kuniyasu Niizuma	4. 巻 501
2. 論文標題 Codon Usage and mRNA Stability are Translational Determinants of Cellular Response to Canonical Ferroptosis Inducers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 103-130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2022.08.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sherif Rashad
2. 発表標題 Codon usage and mRNA stability are translational determinants of cellular response to canonical ferroptosis inducers
3. 学会等名 29th annual conference of the Society for Redox Biology and Medicine, Orlando, Florida, USA. (国際学会)
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------