

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18371

研究課題名（和文）修飾RNAを主体とする新規液性因子による緑内障病態の解明

研究課題名（英文）The emerging role of RNA modifications in the regulation of glaucoma pathology

研究代表者

小川 亜希子 (Ogawa, Akiko)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：00868565

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）：生体内の液性因子のうち、核酸型液性因子はアデノシンやATPに集約されており、他の液性因子と比べて多様性が極端に乏しい。近年、RNAには150種にも及ぶ多彩な化学修飾が存在することが発見された。RNA修飾は転写後の遺伝子発現制御を担い、修飾異常が疾患発症原因となることが明らかになりつつあるが、分解後にどのように振る舞い、細胞機能に影響を与えるか不明であった。本研究ではRNA修飾由来代謝物が眼房水や血清中に豊富に含まれることを示し、さらにその中には液性因子として受容体を強力に活性化して下流のシグナルを誘導し、生体機能を調節するものが存在することを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNA修飾の代謝産物が眼房水中や血液といった細胞外液に豊富に含まれていることを示した。その中でもN6-methyladenosine (m6A) が生体内で受容体を強力に活性化して生理作用・病的作用を起こすことを明らかにした。本研究成果により、新しい液性因子としてRNA修飾由来の代謝物が生体機能に関わることが示された。本研究成果が基盤となり新しい核酸医薬開発への発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study presents biochemical and structural evidence that extracellular m6A is generated from modified-RNA catabolism and is a potent and selective ligand of adenosine A3 receptor. This study provides a framework for understanding the roles played by the complex pantheon of extracellular modified nucleosides.

研究分野：核酸医学、緑内障

キーワード：RNA修飾 液性因子

## 1. 研究開始当初の背景

緑内障は本邦中途失明原因一位の加齢性疾患であり、高齢化が加速する現代における社会的重要性が増している。房水は様々な生理活性物質を含み、緑内障病型や外的環境要因によって組成が変化し病態に影響する。申請者は以前より TGF- $\beta$  や VEGF を含む眼内液性因子の不均衡に着目し、Rho-ROCK シグナル、メカニカルストレス、あるいはエピジェネティクスと緑内障術後癒痕化との関連について報告した。しかし緑内障病態は未解明の部分が多く、新たな切り口が必要である。

近年、DNA やタンパク質だけでなく、RNA もメチル化やアセチル化といった化学修飾を受けることが明らかになり、RNA 修飾がエピジェネティクスに次ぐ新たな研究分野として定着しつつある。RNA はセントラルドグマの根幹を成す分子であるにも拘らず、その修飾は解析手法が特殊であるために緑内障との関連については過去に報告がなく全くの未知であった。

## 2. 研究の目的

本研究では眼房水を含む細胞外液中における RNA 修飾の代謝物の網羅的検出法の確立と、RNA 修飾の観点から新たな緑内障病態に関わる分子の同定を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) RNA 修飾の網羅的検出法の確立とヒト眼房水中での定量評価

質量分析を用い、房水や血清、尿などの細胞外液に含まれる RNA 修飾の代謝物を安定して測定する手法の確立を目指して比較検討を行った。また、この系を用いてヒト眼房水や血漿、尿中の代謝物の定量評価を行った。

### (2) 眼内に存在する RNA 修飾代謝物の生理活性の検討

ヒト細胞外液中に存在する RNA 修飾の代謝物の液性因子としての活性評価を TGF- $\beta$  shedding assay 法 (Inoue et al., Nature Methods, 2012) を用いて行った。各種 G タンパク質共役受容体 (GPCR) の発現ベクターとアルカリフォスファターゼ融合 TGF (AP-TGF) を一過性に HEK293A 細胞に強制発現させ、代謝物を添加した際に GPCR を介した活性化が起こると細胞膜から培養上清中に遊離する AP-TGF 量を測定した。

### (3) RNA 修飾代謝物の GPCR 活性機構の解明と生理作用の同定

GPCR 活性が明らかになった RNA 修飾代謝物の活性機構の解明を in silico モデルと変異体作成によって行った。更に外的環境に応じた RNA 修飾代謝物の生体内での変動の有無を質量分析によって測定し、その変動の機序について核酸分解と核酸代謝の観点から検討を行った。更に受容体を介した代謝物の生理作用・病的作用について、生体モデルを用いて検討した。

## 4. 研究成果

### (1) RNA 修飾の網羅的検出法の確立

細胞外液は採取後 -80 で保存し、測定日に解凍し、有機溶媒を加えて除タンパクした後に水を添加して液層を 2 層に分け、そのうちの水層を限外濾過を行った後に回収した。回収した水層を遠心濃縮して超純水に再溶解し、質量分析装置により RNA 修飾代謝物を検出し、標準物質を用いてピーク面積を定量し、濃度測定を行った (図 1)。

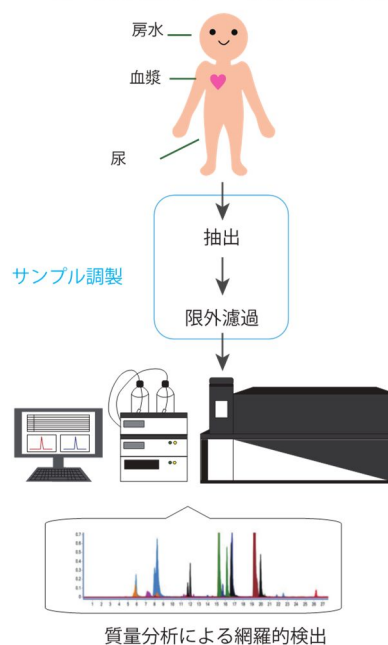
本成果は 2021 年に STAR Protocols 誌に掲載された。

### (2) 眼内に存在する RNA 修飾代謝物の生理活性の検討

上記検出法を用いてヒトを含む様々な生物種の細胞外液 (房水や血清・血漿、尿など) 中の RNA 代謝物の分布を測定したところ、多種の代謝物が検出された。これらの代謝物はヌクレオシドの修飾体であるため、液性因子として機能する可能性があると考え活性スクリーニングを行った。

その結果、アデノシン修飾体である N6-methyladenosine (m6A) がアデノシン A3 受容体に対して特異的な活性を有していることを同定した。m6A のアデノシン A3 受容体に対する活性はこれまで内在性リガンドとして知られていた

図 1 細胞外液中の RNA 修飾代謝物の検出



未修飾アデノシンの約 10 倍も強力であった。

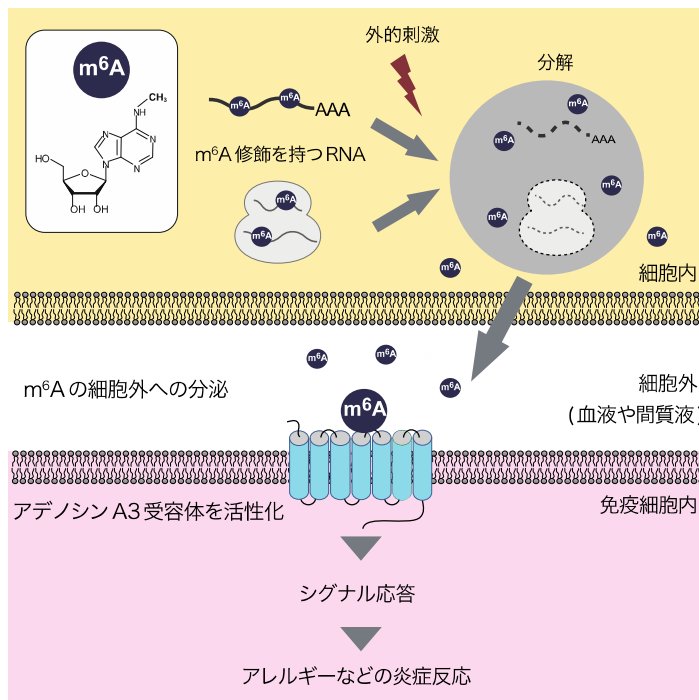
### (3) RNA 修飾代謝物の GPCR 活性機構の解明と生理作用の同定

m6A の強力なアデノシン A3 受容体活性機構を解明するためにホモロジーモデリングによる

予測構造を調べ、さらに変異体アッセイを行うことで裏付けを取り、m6A のメチル基とより強い分子間力で結合するアデノシン A3 受容体に特異的な疎水性アミノ酸残基を同定した。次に新規液性因子 m6A の制御機構を調べるため様々な外的刺激を加えることによる変動を調べたところ、細胞傷害時に特異的に、rRNA あるいは mRNA の分解がリソソームで起こることで m6A が細胞外で増えていることが分かった。さらにこの m6A-アデノシン A3 受容体の下流で ERK のリン酸化や細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が起こり、生体内で I 型アレルギーあるいは局所的な炎症性サイトカインの産生が増えることが分かった (図 2)。

本研究成果は 2021 年に Molecular Cell 誌に掲載された。

図 2 新規液性因子 m6A による生体内のシグナル変動



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ogawa Akiko, Nagiri Chisae, Shihoya Wataru, Inoue Asuka, Kawakami Kouki, Hiratsuka Suzune, Aoki Junken, Ito Yasuhiro, Suzuki Takeo, Suzuki Tsutomu, Inoue Toshihiro, Nureki Osamu, Tanihara Hidenobu, Tomizawa Kazuhito, Wei Fan-Yan	4. 巻 81
2. 論文標題 N6-methyladenosine (m6A) is an endogenous A3 adenosine receptor ligand	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 659 ~ 674.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2020.12.038	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 -
1. 著者名 Matsumura Tomoyo, Fujimoto Tomokazu, Futakuchi Akiko, Takihara Yuji, Watanabe-Kitamura Fumika, Takahashi Eri, Inoue-Mochita Miyuki, Tanihara Hidenobu, Inoue Toshihiro	4. 巻 15
2. 論文標題 TGF- $\beta$ -induced activation of conjunctival fibroblasts is modulated by FGF-2 and substratum stiffness	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 242626 ~ 242626
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0242626	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 -
1. 著者名 Futakuchi Akiko, ROCK-S study group collaborators, Morimoto Takeshi, Ikeda Yoko, Tanihara Hidenobu, Inoue Toshihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Intraocular pressure-lowering effects of ripasudil in uveitic glaucoma, exfoliation glaucoma, and steroid-induced glaucoma patients: ROCK-S, a multicentre historical cohort study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-66928-4	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 -
1. 著者名 Ogawa Akiko, Wei Fan-Yan	4. 巻 2
2. 論文標題 Protocol for preparation and measurement of intracellular and extracellular modified RNA using liquid chromatography-mass spectrometry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100848 ~ 100848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100848	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 Watanabe-Kitamura Fumika, Ogawa Akiko, Fujimoto Tomokazu, Iraha Satoshi, Inoue-Mochita Miyuki, Watanabe Takahiro, Takahashi Eri, Tanihara Hidenobu, Inoue Toshihiro	4. 巻 210
2. 論文標題 Potential roles of the IL-6 family in conjunctival fibrosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 108708 ~ 108708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2021.108708	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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小川亜希子
2. 発表標題 濾過手術後の創傷治癒制御治療の可能性
3. 学会等名 第31回日本緑内障学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小川亜希子
2. 発表標題 RNAモドミクスが開拓する新しい眼内病態生理学
3. 学会等名 第126回日本眼科学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小川亜希子
2. 発表標題 緑内障術後線維化におけるRNA修飾の変動
3. 学会等名 第32回日本緑内障学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川亜希子
2. 発表標題 RNA修飾由来の新しい核酸型液性因子とその生理的意義について
3. 学会等名 第55回 日本痛風・尿酸核酸学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小川亜希子
2. 発表標題 N6-methyladenosine (m6A) is an endogenous A3 adenosine receptor ligand.
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川亜希子
2. 発表標題 N6-methyladenosine (m6A) is an endogenous A3 adenosine receptor ligand.
3. 学会等名 第22回日本RNA学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川亜希子
2. 発表標題 シグナル伝達液性因子としてのRNA修飾
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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
---------	---------