

## 緑内障術後の癒痕化に関わる RNA モドミクスの検討

### [1] 組織

代表者：谷原 秀信  
(熊本大学病院)  
対応者：小川 亜希子  
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 15 万円

### [2] 研究経過

【目的】緑内障は我が国における中途失明の主要な原因疾患であり、健康長寿の妨げの大きな要因となっている。薬物の開発や手術器具の発展にもかかわらず、治療に抵抗する難治性緑内障や糖尿病網膜症が存在するため、病態解明および新しい治療アプローチの必要性が叫ばれている。申請者らはこれまで、ヒト結膜線維芽細胞と TGF- $\beta$ 2 を用いた緑内障術後の *in vitro* モデルを確立し、このモデルを用いて線維化に関わる因子として、既存の緑内障治療薬、メカノストレス、あるいは DNA・タンパク質のエピジェネティクスの影響について研究し、報告してきた。DNA あるいはタンパク質の修飾のみならず、RNA も多様に修飾され、様々な作用を及ぼすことが知られるため、RNA 修飾が緑内障術後癒痕化病態に関わる可能性を考え、加齢研のモドミクス医学分野で稼働している質量分析を用いた RNA 修飾のスクリーニングシステムを用いて細胞内外の観点より分析したいと考えた。

【計画】初代ヒト結膜線維芽細胞を 12 時間無血清培地で培養した後にヒトリコンビナント TGF- $\beta$ 2 を投与して 48 時間培養し、線維化能のより強い筋線維芽細胞へ分化させた際の RNA (total RNA あるいは各種分画した RNA) 中あるいは培養上清中の RNA 修飾を網羅的に調べた。

#### 【研究活動状況】

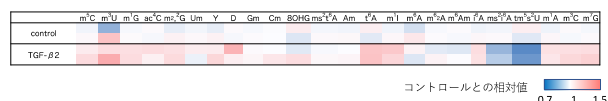
研究代表者は当初加齢医学研究所を訪問して打ち合わせを行う予定であったが、新型コロナウイルス感染拡大の状況下にあったため、主に研究者間で 1 ヶ月ごとにメールで研究の進捗状況確認を行った。



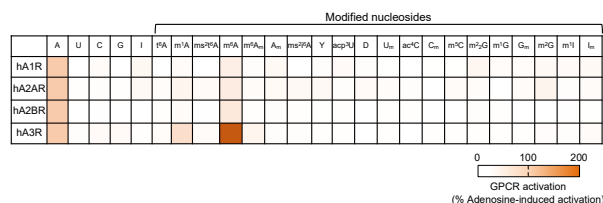
### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

コントロールの線維芽細胞と TGF- $\beta$ 2 刺激により筋線維芽細胞へ分化させた線維化モデル細胞でそれぞれ total RNA を精製し、P1 ヌクレアーゼと alkaline phosphatase の 2 種類の RNA 分解酵素と混合して 37 度 3 時間反応させ、反応液を質量分析装置により網羅的な RNA 修飾スクリーニング (RNA モドミクス解析) を行なった。その結果、RNA 修飾が分化前後で変化しており、中でも特にミトコンドリア tRNA に特異的に存在する RNA 修飾が低下していることがわかった。また、total RNA を分画した結果、tRNA が主体で含まれる small RNA のみでミトコンドリア修飾の低下が認められた。



更に、これらの RNA 修飾は代謝後、修飾が付加されたまま細胞外へ分泌され液性因子修飾ヌクレオシドとなる。アデノシンを代表とする未修飾ヌクレオシドは生理活性作用を持つため、修飾ヌクレオシドの生理活性作用の有無を調べるため、TGF- $\alpha$  shedding assay (Inoue et al., Nat Methods 2012)を用いて、修飾 RNA 由来の修飾ヌクレオシドの 4 種類のサブタイプを有するヒトアデノシン受容体に対する活性性能を評価した。



その結果、N6-methyladenosine (m<sup>6</sup>A)がヒトアデノシン A3 受容体に特異的な活性性能を持つことを見出した。

#### (3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究により、東北大学加齢医学研究所と熊本大学病院との交流が飛躍的に活性化した。また、発表論文(1)はRNA 修飾由来の修飾ヌクレオシドが生理活性物質として機能することを世界で初めて見出し、

RNA 修飾が代謝前だけでなく代謝後にも生体恒常性に影響を与えることを示すものであり大きな反響を得た。誌面掲載前のプレプリント誌(bioRxiv)でも全研究の上位 25%に入るオルトメトリクスを獲得し、掲載された Mol Cell 誌では Featured article として特集され Most read article に認定された。更に Nature Chemical Biology 誌の Research Highlight に選定された(*Nat Chem Biol* 17, 231, 2021)。

本邦の中途失明原因第一位の加齢性疾患であり緑内障病態に関する新たな RNA 修飾知見を得ることができ、社会的意義も大きいと考える。今年度は受容体スクリーニングとしてアデノシン受容体サブタイプ 4 種類のみを検討であったが、今後は本研究を発展させ、リガンド未知の orphan 受容体を含む 300 種類以上の G タンパク質共役受容体(GPCR)に対するスクリーニングへと応用したいと考えており、緑内障に対する新しい視点からの病態解明と治療法開発をもたらすことが期待される。

#### [4] 成果資料

1. Ogawa A, Nagiri C, Shihoya W, Inoue A, Kawakami K, Hiratsuka S, Aoki J, Ito Y, Suzuki T, Suzuki T, Inoue T, Nureki O, Tanihara H, Tomizawa K, Wei FY. N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) is an endogenous A3 adenosine receptor ligand. *Mol Cell*. 2021 Feb 18;81(4):659-674.e7. doi: 10.1016/j.molcel.2020.12.038. Epub 2021 Jan 19.
2. Matsumura T, Fujimoto T, Futakuchi A, Takihara Y, Watanabe-Kitamura F, Takahashi E, Inoue-Mochita M, Tanihara H, Inoue T. TGF- $\beta$ -induced activation of conjunctival fibroblasts is modulated by FGF-2 and substratum stiffness. *PLoS One*. 2020 Nov 18;15(11):e0242626.
3. Futakuchi A, Morimoto T, Ikeda Y, Tanihara H, Inoue T; ROCK-S study group collaborators. Intraocular pressure-lowering effects of ripasudil in uveitic glaucoma, exfoliation glaucoma, and steroid-induced glaucoma patients: ROCK-S, a multicentre historical cohort study. *Sci Rep*. 2020 Jun 25;10(1):10308. doi: 10.1038/s41598-020-66928-4.