

加齢が及ぼす癌微小環境としての修飾核酸モドミクスの変調

[1] 組織

代表者：藤村 篤史

(岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科)

対応者：魏 范研

(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 20 万

[2] 研究経過

本研究は、加齢性の変化を伴う修飾核酸についてのオミクス解析 (nucleotide modomics) を通して、癌の病態を簡便かつ迅速にリアルタイムで捉えるための方法論を確立し、以って癌の病勢判定を行うためのエビデンスの蓄積を目指すものである。癌の特性を理解する上で、癌細胞そのものを理解することと同様に重要であると考えられている要素が「癌の微小環境」である。微小環境の構成要素は、癌組織間質に存在する線維芽細胞や免疫系細胞などの細胞性成分のほか、癌細胞そのものから分泌される液性因子などを含む液性成分などであり、これらが様々に相互作用することで、癌の進展を促進的・抑制的に制御している。

我々は最近、膠芽腫において、修飾核酸が微小環境の重要な構成要素であることを発見した(Yamamotoら,iScience,2019)。例えば膠芽腫においては、tRNA 修飾酵素 TRIT1 によって修飾される N⁶-isopentenyladenosine(i6A)が膠芽腫細胞外へと分泌されるが、この i6A は強力な細胞毒性を有しており、i6A の解毒作用を持つ膠芽腫幹細胞(Glioma Stem Cell: GSC)以外を細胞死へと誘導する。結果的に膠芽腫組織では GSC が enrich され、治療抵抗性の獲得などを通して、予後の不良化に帰結する。GSC は tRNA 修飾酵素 CDK5RAP1 を用いて i6A を 2-methylthio-i6A(ms2i6A)へ無毒化することで細胞死を回避しているが、この機能は低酸素環境で特に増強されることがわかった。このように、修飾核酸は癌の微小環境の構成要素として機能的に重要であるだけでなく、癌細胞のコンディションを如実に反映する重要なマーカーとして使用できる可能性がある。

上記の例の他にも修飾核酸は多岐にわたっており、それらの病態生理的意義はほとんど分かっていない。

修飾核酸はトランスポーターを介して細胞外・血中へと排出されるため、研究代表者の開発した質量分析器ベースの修飾核酸モドミクス技術を用いれば、各種検体中の修飾核酸を網羅的に掌握することが可能である。本研究では難治性がんの代表格である膠芽腫を対象に、de novo 発がんモデルマウスを用いて、修飾核酸モドミクスの解析結果とそれぞれの病態をリンクさせるための基礎実験を行う。この際、若いマウスと老年のマウスとの体組織における修飾核酸モドミクスの解析を並行して実施し、加齢に伴う修飾核酸のランドスケープに変化があるか否かを確認する。さらに、若年マウスと加齢マウスのそれぞれに対して、発がん誘導をかけた際に生じる病態生理上の変化および修飾核酸モドミクスを多角的に評価する。

本研究においては、藤村と魏の間で、ウェブツールを用いたリモート研究打ち合わせを頻回に実施し、マウス検体における RNA モドミクスの実施について協議を行なった。

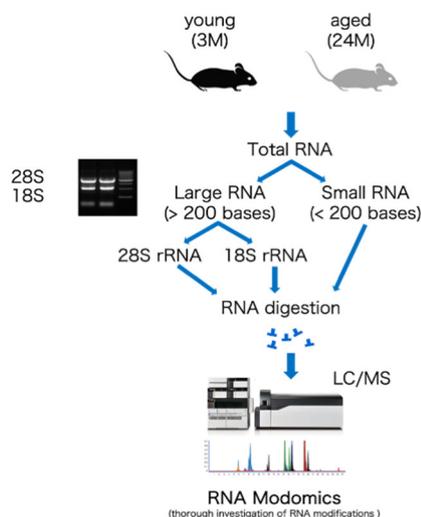
[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

・若齢と老齢マウスからの RNA 精製

加齢研より提供された若齢マウス(3ヶ月齢)と老齢マウス(24ヶ月齢)から肝臓を摘出し、RNA 精製のサンプルとした。摘出した肝臓は TRIzol を用いて全 RNA を精製し、下記のスキームに従い、さらに



RNAの精製を行なった。具体的には、全RNAを核酸精製 Spin Column にアプライし、溶液のエタノール濃度を適切に調節することで、200-nt以下の Small RNA と 200-nt以上の Large RNA に分けた。Small RNA を構成するのは主に tRNA、5S ribosome RNA である。一方、Large RNA については、一部をアガロースゲルにアプライし、蛍光照射下で 18S ribosome RNA と 28S ribosome RNA を切り出した。

・RNA モドミクスの実施

上記で精製した各種の RNA については、RNase を加え、37 度 3 時間保温することで単一ヌクレオシドまで分解した。分解産物は HPLC とトリプル四重極質量分析装置 (LCMS8050) を用いて、RNA 修飾を網羅的に分析した。その結果、リボソームに含まれる特定の RNA 修飾が加齢マウスの肝臓で顕著に低下した (投稿準備中のため、具体名は非表示)。また、同修飾の責任酵素については、定量 PCR を用いて検討した結果、加齢マウスの肝臓において減少傾向が認められた。rRNA に付加される同修飾は翻訳の効率と精度に重要であると知られており、加齢によって特定の RNA 修飾が低下することが本研究によって示された。今後は、他の臓器や例数をさらに増やし再現性を検討する予定である。加齢によるタンパク質恒常性の低下が個体老化の原因の一つであり、癌の促進因子としても報告されているが、その分子機序が不明である。本研究結果は rRNA 修飾の低下が癌微小環境におけるタンパク質恒常性の破綻の原因となりうることを示唆するものである。

(3-2) 波及効果と発展性など

(修飾核酸は、未開拓の「癌の微小環境の構成要素」である。一般的に加齢は癌形成に対して促進的に働くが、それは DNA の mutation に代表されるような変化に起因するものであり、癌の微小環境の構成要素としての意味合いは乏しかったと考える。我々の先行研究により、修飾核酸そのものが癌細胞の選別を促進し、腫瘍組織全体の性質を大きく変化させるといった機能的側面が明らかになったほか、特定の修飾核酸をモニタリングすることで、その腫瘍組織を構成する細胞への酸素供給状態などが掌握できるようになる可能性があることが判明した (Yamamoto ら, *iScience*, 2019)。例として記載した i6A や ms2i6A は、膠芽腫において特に重要な修飾核酸であるが、これら以外にも、細胞に由来する修飾核酸は極めて多岐にわたっており、それぞれが特定の修飾酵素によって合成され、転写や翻訳といった細胞内プロセスに関与していると考えられている。近年、癌の進展に関与する遺伝子群の多くが癌細胞に特有の遺伝子発現様式

に依存していることが明らかになりつつあり、こうした現象を標的とした新たな癌治療法を開発するためにも、癌研究分野において修飾核酸の役割を網羅的に解析する技術を確立することは喫緊の課題である。本研究の遂行により、修飾核酸の病態生理的な位置付けが明確となることで、癌生物学におけるブレークスルーのみならず、創薬に直結するような成果があげられるものと考えている。

[4] 成果資料

本研究成果に関連する共著論文は現在投稿準備である。