

RNA 由来新規内分泌因子の探索による緑内障病態解明

東北大学 加齢医学研究所 モドミクス医学分野

小川 亜希子

【概要】

緑内障術後に生じ予後不良因子となる線維化のメカニズムは解明されておらず、特異的な治療法もない。RNA 修飾は従来眼内で研究されていない新しい因子として緑内障病態に寄与する可能性があるため、本研究ではこの RNA 修飾の緑内障病態への関与を解析することによって、新たな標的分子の同定と、次世代修飾 RNA 創薬への応用を目指す。

【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いて社会的重要性が増している。研究代表者は TGF- β や VEGF 等の眼内生理活性（液性）因子の観点から Rho-ROCK シグナルやエビジェネティクスと緑内障術後予後不良因子である術後線維化の研究を行ってきたが¹⁾³⁾、既存の因子や機序だけで病態を理解することが困難であり、新たな切り口から病態に迫る必要がある。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、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った。RNA には 150 種にも及ぶ多彩な化学修飾が存在し⁴⁾、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⁵⁾、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。更に、RNA はセントラルドグマの根幹を成す分子であるにもかかわらず、その修飾は解析方法が特殊であり、眼病態、中でも緑内障と RNA 修飾については報告がない。

【方法】

(1) RNA 修飾代謝の網羅的検出法の確立

質量分析を用いて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) 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- α shedding assay 法⁶⁾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 α (AP-TGF α)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 α 量を測定した。

(3) RNA 修飾代謝物の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り行った。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) 緑内障予後不良モデルを用いた RNA 修飾変動の網羅的検討

緑内障術後癒痕化において研究代表者が確立した予後不良モデル⁷⁾を用い、RNA 修飾の変動を網羅的に検討した。更に、RNA 種の中でも被修飾率の最も高い tRNA をアミノ酸ごとに単離し、細胞質・ミトコンドリアごとに検討を行った。

(5) リパスジル (K115) 処理を行った際のミトコンドリア特異的 RNA 修飾変動とミトコンドリア機能変動の検討

緑内障癒痕化モデルにおいて抗線維化作用を持つとして研究代表者が報告した緑内障点眼薬リパスジル⁸⁾は Rho キナーゼ (ROCK) 阻害剤である。ROCK 阻害剤は mitophagy 経路を活性化することで神経保護作用を示すという報告があるが、リパスジルのミトコンドリア特異的 RNA 修飾への影響やミトコンドリア機能に対する影響については不明な点が多い。そこで本研究ではヒト初代結膜線維芽細胞にリパスジル処置を行った際のミトコンドリア特異的 RNA 修飾の変動や酸化的リン酸化、膜電位を検討することで、ミトコンドリア RNA 修飾の観点から緑内障術後線維化の分子機序の解明を行った。RNA 修飾の変動は質量分析を用い、酸化的リン酸化はウエスタンブロット法で、ミトコンドリア膜電位は JC-1 を用いた免疫染色法で、それぞれ検討した。

【結果】

(1) RNA 修飾代謝の網羅的検出法の確立

生体サンプルは採取後-80°C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た(図1)。

(2) 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活性スクリーニングを行った。その結果、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することを同定した(図2)。m6Aは眼房水中にも含まれている修飾ヌクレオシドである。

(3) RNA 修飾代謝物の活性機構の解明と生理作用の同定

m6Aの強力な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結合に特異的な疎水性アミノ酸残基を同定した。次にm6Aの制御機構を調べるため様々な外的刺激を加えて変動を調べたところ、細胞傷害時特異的なRNA分解がリソソームで起こることでm6Aが

細胞外で増えることが修飾酵素のノックアウト細胞株作成により分かった。さらにこのm6A-アデノシン A3受容体の下流シグナル伝達により生体内で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。

(4) 緑内障予後不良モデルを用いたRNA修飾変動の網羅的検討

研究代表者が確立した緑内障術後線維化モデルを用い、ヒト初代結膜線維芽細胞からtotal RNAを抽出してRNA修飾を質量分析により網羅的に解析すると、線維化素因であるTGF-β刺激で低下するRNA修飾として修飾XとYを同定した(図3)。これらの修飾はXとYはいずれもミトコンドリアtRNA特異的に存在し、ミトコンドリア品質管理に関わるRNA修飾であり、TGF-βによるミトコンドリア機能低下が示唆された。

(5) リパスジル(K115)処理を行った際のミトコンドリア特異的RNA修飾変動とミトコンドリア機能変動の検討

まずヒト初代結膜線維芽細胞に対してTGF-β刺激を行う前にリパスジル(K115)処理を行うと、TGF-βによるα-smooth muscle actin (α-SMA)陽性の筋線維芽細胞への分化転換が抑制されることをウエスタンブロットおよび免疫染色で確認した(図4A, B)。次に質量分析法によるRNA修飾量定量により、K115はTGF-β刺激による修飾XとYの低下をほぼコントロールレベルまで改善することを見出した(図3)。次にミトコンドリア膜電位変化を調べた。JC1染色を行うと、ミトコンドリアが正常で膜電位差が保たれている状態ではJC-1が重合してポリマーになり赤色蛍光を示すが、K115の前処理によりTGF-β単独時より有意にミトコンドリアが高い膜電位を示しており、拮抗作用があることが示された。

ミトコンドリア機能は生体代謝レベルに直接影響するため、次に細胞内代謝の比較検討を行った。TGF-β刺激をしたヒト初代結膜線維芽細胞をK115前処理の有無によりメタノールで抽出し、クロロホルムを含む有機溶媒で精製し、濃縮遠心後に質量分析によってまずノンターゲットのメタボロミクス解析を行った。主成分分析(Principal component analyses: PCA)解析の結果、無処理群とTGF-β刺激群ではプロット上明確に区別でき、TGF-βにより代謝プロファイルが大きく変動するが、K115の前処理によって変動が軽減されることが分かった。(図5)なお第一主成分(PC1)の寄与率は30.2%、第二主成分(PC2)の寄与率は22.4%であった。

【考察】

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。本研究ではRNA修飾代謝に着目し、その網羅的検出の最適化を行い、更にこの手法を用いて様々な検体を解析することにより成果を得た(業績2-3)。更に眼内に存在し受容体を特異的に活性化するm6Aを同定しており、このm6Aの緑内障病態への関与についても現在解析を進め、投稿準備中である(未発表データは本報告書には未記載)。緑内障関連の業績としては、分子シグナル、あるいは新規点眼薬の臨床研究に貢献した(業績4-6、うち多施設臨床研究については筆頭責任著者)。また、世界的パンデミックCOVID-19ワクチンのRNA修飾動態(業績7)あるいは核酸治療薬の副作用の受容体活性についても明らかにすることができた(業績1, in press)。末筆ながら、本研究の遂行に際して支援していただいた公益財団法人アステラス病態代謝研究に厚く御礼申し上げる。

【文献】

1) Futakuchi A, et al., The effects of ripasudil (K-115), a Rho kinase inhibitor, on activation of human conjunctival fibroblasts. *Exp Eye Res.* 149: 107-115 (2016).

- 2) Futakuchi A, et al., Molecular Mechanisms Underlying the Filtration Bleb-Maintaining Effects of Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA). *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 58: 2421- 2429 (2017).
- 3) Futakuchi A, et al., YAP/TAZ Are Essential for TGF- β 2-Mediated Conjunctival Fibrosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 59: 3069-3078 (2018).
- 4) Boccaletto, P. et al. MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic Acids Res.* 46, D303–D307 (2018).
- 5) Suzuki T. The expanding world of tRNA modifications and their disease relevance. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 22(6):375-392 (2021).
- 6) Inoue A, et al., TGF α shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation. *Nat Methods*, 9(10): 1021-9, (2012).

【業績】

研究代表者(小川(二口)亜希子) 原著論文 全て査読あり、*責任著者

1. **Ogawa A**, Ohira S, Kato Y, Ikuta T, Yanagida S, Mi X, Ishii Y, Kanda Y, Nishida M*, Inoue A*, Wei FY*. Activation of the urotensin-II receptor by remdesivir induces cardiomyocyte dysfunction.

Communications Biology, 2023, in press.

preprint available at: *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2022.08.08.503256>, 2022.

2. **Ogawa A*** and Wei FY.

Protocol for preparation and measurement of intracellular and extracellular modified RNA using liquid chromatography-mass spectrometry.

STAR Protocols, 2: 100848, 2021.

3. **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^6 -methyladenosine (m^6A) is an endogenous A3 adenosine receptor ligand.

Molecular Cell, 81: 1-16, 2021. 掲載誌 Most Read Article に選出

別誌の Research Highlight として選出 (*Nature Chemical Biology*, 17: 231, 2021)

4. Watanabe-Kitamura F, **Ogawa A**, Fujimoto T, Iraha S, Inoue-Mochita M, Watanabe T, Takahashi E, Tanihara H, Inoue T*.

Potential roles of the IL-6 family in conjunctival fibrosis.

Experimental Eye Research. 210: 108708, 2021.

5. **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.

Scientific Reports. 25: 10(1):10308, 2020.

6. Matsumura T, Fujimoto T, **Futakuchi A**, Takihara Y, Watanabe-Kitamura F, Takahashi E, Inoue-Mochita M, Tanihara H, Inoue T*.

TGF- β -induced activation of conjunctival fibroblasts is modulated by FGF-2 and substratum stiffness.

PLoS One. 15: e0242626, 2020.

7. **小川亜希子**, 松尾紀孝, 齋藤一創, 魏范研:

「COVID-19 ワクチン接種後の RNA 修飾代謝物排泄の変動」

痛風と尿酸・核酸 (日本痛風・尿酸核酸学会学会誌) 46 巻 2 号 (2022).

【主要な招待講演】

1. 第 126 回 日本眼科学会総会 シンポジウム RNA モドミクスが開拓する新しい眼内病態生理学.
2. 第 31 回 日本緑内障学会 シンポジウム 濾過手術後の創傷治癒抑制薬物治療の可能性.

【受賞歴】

1. 2023 年 9 月 第 82 回日本癌学会学術総会 JCA2023 Woman Scientist Plenary Symposium Award (内定)
2. 2023 年 3 月 第 3 回北澤克明記念緑内障学研究助成 (北澤賞)
3. 2023 年 2 月 第 56 回日本痛風・尿酸核酸学会総会 最優秀演題賞、座長推薦演題
4. 2022 年 9 月 2022 年度アステラス病態代謝研究会 優秀発表賞
5. 2022 年 7 月 第 15 回資生堂女性研究者サイエンスグラント
6. 2022 年 4 月 第 25 回眼科分子生物学研究会 ベストプレゼンテーション
7. 2022 年 1 月 東北医学会奨学賞(A)
8. 2021 年 1 月 第 28 回加齢医学研究所研究奨励賞
9. 2020 年 7 月 第 154 回 IDAC biannual meeting 第 1 位

【主な外部資金獲得状況】 (代表)

2023 年度 - 2025 年度 創発的研究支援事業「エピトランスクリプトームが開拓する新しい眼内病態生理学」

2022 年度 - 2026 年度 科研費 基盤研究(B)「修飾 RNA 代謝を基軸とする生体恒常性ネットワークの解明」

2022年度 - 2023年度 新学術領域研究（研究領域提案型）（公募研究）「新規修飾 RNA メタボライトによるオートファジー経路の解明」
 2020年度 - 2022年度 科研費 若手研究「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」

【図】

図 1

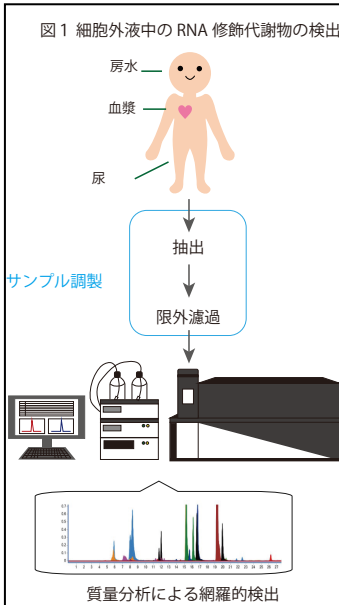


図 2

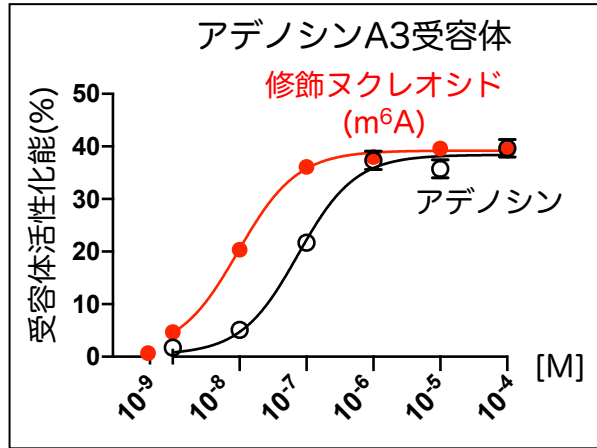


図 3

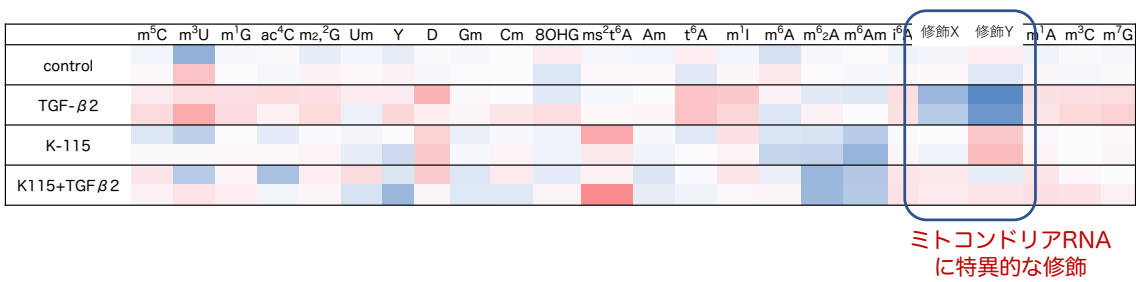


図 4

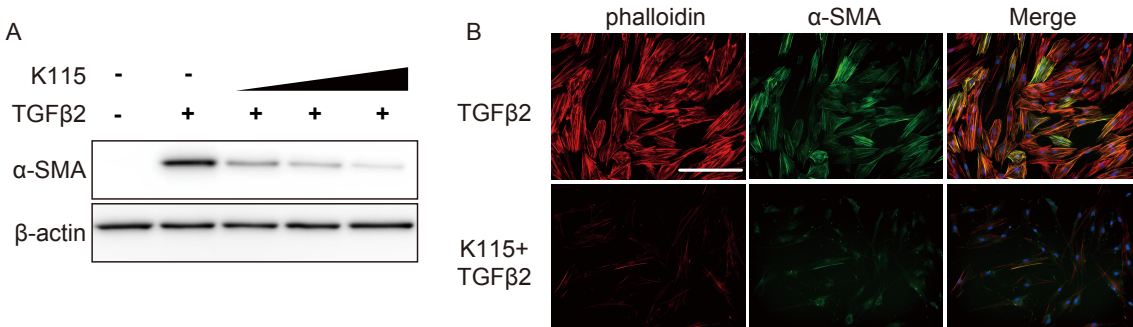


図 5

