OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	大腸癌放出細胞外小胞に内包される特徴的 RNA 修飾体による腫瘍免疫制御機構の解明
Author(s)	物江, 祐弥
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105579
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　　名　（　　物江　祐弥　　）	
論文題名	大腸癌放出細胞外小胞に内包される特徴的 RNA 修飾体による腫瘍免疫制御機構の解明

論文内容の要旨

大腸癌は、患者数が 3 位、死亡者数が 2 位と代表的な癌腫の 1 つである。元より免疫に富んだ臓器であることから腫瘍免疫の微小環境は大腸癌の進展に大きく関与すると言われており、癌免疫療法として免疫チェックポイント阻害剤が臨床応用もされているが、奏功率は 30-40% と限定的である。RNA 修飾は、細胞内プロセスにおいて非常に重要な機能を有しており、これらの異常が癌をはじめとした疾患の悪性化に寄与することが知られている。m6A (N6-methyladenosine), Ψ (pseudouridine) に代表される修飾体は、哺乳類の RNA で頻繁に施されており、Toll-like receptors (TLRs) による宿主 RNA に対する自然免疫応答を抑制的に制御している。一方で、ウイルスや細菌由来の RNA では修飾レベルが低く、TLRs はRNA 修飾体の頻度によって自己と非自己を識別することが示されている。細胞外小胞 (EVs: extracellular vesicles) は、癌細胞を含むあらゆる細胞より放出される小胞の総称であり、細胞間コミュニケーションツールとして注目されている。EVs 中にも RNA 修飾体は存在すると考えられているが、内包する RNA 量が微量ゆえに検出が困難であり、その機能も不明である。本研究では UHPLC-MS/MS の測定系を用いて大腸癌 EVs 中の RNA 修飾体を半網羅的に解析し、特徴的な修飾体を同定するだけでなく、その修飾体の大腸癌における病的意義を解明することを目的に検討を行った。

まず、大腸癌 EVs 中の RNA 修飾プロファイルを解析するため、先行研究で開発した組織滲出 EVs（Te-EVs: tissue-exudative EVs）回収法 を用いて、正常大腸 Te-EVs（normal Te-EVs） および 大腸癌 Te-EVs（tumor Te-EVs）を回収した。次に、Te-EVs から精製した RNA を ヌクレオシド単位に分解し、UHPLC-UniSpray-MS/MS を用いて半網羅的 RNA 修飾解析を行ったところ、22 種の RNA 修飾体の同定に成功した。この中で、tumor Te-EVs で顕著に減少し、再発と相関の見られる修飾体として、N6-methyladenosine (m6A) を同定した。マウス大腸癌細胞株 colon26 において m6A 修飾体の脱修飾酵素である Alkbh5 (alkB homolog 5) ノックアウト細胞株を作成したところ、EVs-m6A レベルが上昇し、*in vivo* において大腸癌腫瘍の形成が抑制された。

EV-m6A レベルの変化が免疫細胞にもたらす作用を検討するため、末梢血単核球 (PBMCs) に Te-EVs を作用させたところ、単球が顕著に EVs を取り込んでおり、サイトカインアレイによる網羅的サイトカイン解析では単球およびマクロファージにおいて、NF-κB 経路下流の TNF-α, IL-6 といった炎症性サイトカイン産生が顕著に亢進することが明らかになった。また、この時のマクロファージ培養上清を用いて大腸癌細胞の増殖能を評価したところ、tumor Te-EVs 処理マクロファージ上清で顕著な増殖促進が見られた。この表現型は、Alkbh5 ノックアウト細胞株 EVs をマクロファージに作用させた際には見られなかった。さらに、リコンビナント ALKBH5 タンパク質を用いて m6A レベルを減少させた EVs-RNA をマクロファージに導入すると炎症応答が亢進した。

次に、EVs-m6A がマクロファージ活性化させる炎症経路を明らかにするため、siRNA を用いて RNA を認識する TLR ファミリーである TLR3, TLR8 をノックダウンしたマクロファージに対する作用を検討した。TLR3 ノックダウンでは同様の炎症応答が見られる一方で、TLR8 ノックダウンにより大腸癌 EVs による炎症応答がキャンセルされた。この変化はリコンビナント ALKBH5 タンパク質をした EVs-RNA を用いた検討でも同様に見られた。

ここで EVs 中で m6A 修飾が施されている RNA を同定するために大腸癌 Te-EVs RNAseq を実施した。Te-EVs を占める RNA 種として tRNA が最も多く、その 90% 以上が 5’ 末端側が断片化された配列を主に内包していることが明らかになった。そのうち大腸癌 Te-EVs 特徴的に内包される配列として 5’-half-GlyGCC を同定した。この 5’-half-GlyGCC 上の m6A 修飾レベルを解析したところ、正常大腸 Te-EVs に内包される 5’-half-GlyGCC に比べ、m6A レベルの顕著な減少が見られた。

5’-half-GlyGCC の TLR8 を介した炎症応答誘導能および腫瘍促進作用を検証するために、m6A 修飾が施されていない 5’-half-GlyGCC 配列を大腸癌 EVs に内包させ、マクロファージに作用させたところ、顕著な炎症応答の亢進が見られた。この表現型は TLR8 ノックダウンによりキャンセルされた。さらに、in vivo 担癌マウスに 5’-half-GlyGCC 濃縮 EVs を投与したところ、顕著な腫瘍の増大が見られた一方で、クロドロン酸によるマクロファージ枯渇マウスで

は腫瘍の成長がキャンセルされた。この時の腫瘍内の炎症状態を評価したところ、5’-half-GlyGCC 濃縮 EVs 投与マウスで TNF-α, IL-6 の発現が顕著に亢進していた。

以上の結果より、大腸癌 EVs は 5’-half-GlyGCC が濃縮されているだけでなく、m6A 修飾レベルが減少することで、マクロファージの TLR8 を介した炎症応答を誘導し、腫瘍優位に機能することが明らかとなった。この成果は EVs 中の癌特徴的な RNA 修飾変化が免疫制御を介して腫瘍の進展に寄与することを提示するものであり、EVs における RNA 修飾体の病的意義を示した研究である。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（物江 祐弥）			
	（職）		氏　名
論文審査担当者	主 査	教授	深田 宗一朗
	副 査	教授	水口 裕之
	副 査	教授	荒井 雅吉

論文審査の結果の要旨

本学位論文は、細胞外小胞（extracellular vesicles: EVs）に内包されるRNA修飾の網羅的解析を通じて、大腸癌の進展機構におけるRNA修飾の新たな役割を明らかにしたものである。

RNA修飾は細胞内プロセスの制御に重要な役割を担い、その異常は癌をはじめとする多くの疾患の悪性化に関与することが知られている。一方、EVsには多様なRNAが含まれ、修飾RNAも存在すると考えられてきたが、EVs中のRNA量は極めて微量であるため、修飾体の定量的解析は困難であった。申請者はultra-HPLC-MS/MS測定系を確立し、EVs中に存在する22種類のRNA修飾体の同定に成功した。

本解析により、大腸癌組織由来EVs（tissue-exudative EVs: Te-EVs）において顕著に減少し、かつ再発と相関する修飾体としてN6-methyladenosine（m6A）を同定した。さらに、m6A脱修飾酵素Alkbh5ノックアウト大腸癌細胞株由来EVsではm6Aレベルが上昇し、*in vivo*における腫瘍形成が抑制されることを示した。機序解析の結果、EVs中のm6Aレベル低下がマクロファージのTLR8を介した炎症応答を誘導し、TNF-αおよびIL-6の産生を増加させることで大腸癌細胞の増殖促進に寄与することを明らかにした。

さらに、EVsに内包されているRNAの網羅的解析により、大腸癌Te-EVsに豊富に搭載される分子として5’-half-tRNA fragment（5’-half）-GlyGCCを同定した。大腸癌Te-EVs中の5’-half-GlyGCC上のm6Aレベルは正常大腸由来Te-EVsに比べ有意に低下していた。m6A修飾を受けていない5’-half-GlyGCCを搭載したEVsは*in vivo*において腫瘍成長を促進し、この効果はマクロファージ枯渇モデルで消失したことから、免疫細胞を介した腫瘍進展機構の存在が示唆された。

以上、本研究はEVs中の癌特異的なRNA修飾変化が免疫応答制御を介して腫瘍進展に寄与することを明らかにし、腫瘍生物学およびRNA修飾研究分野に新たな知見を提供したものであり、学術的独創性および将来的発展性を有することにより、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。