

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月17日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11265

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌におけるRNA編集異常と悪性化進展機構への関与

研究課題名(英文) Altered RNA editing and malignant progression in oral squamous carcinoma.

研究代表者

奥村 一彦 (Okumura, Kazuhiko)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：60194510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌は口腔領域で最も多い悪性腫瘍で、様々な性格を有した遺伝的变化やDNAの配列変化によらない遺伝子発現であるエピジェネティックな変化によって形成される腫瘍である。最近、アデノシン(A)をイノシン(I)に変換するA-to-I編集を担うADARsが、ヒトの癌における潜在的なエピジェネティックな変化に関与していることが示されている。そこで、我々は悪性化進展におけるRNA編集酵素ADARとADARによるRNA編集異常の役割について検討した。

その結果、口腔扁平上皮癌ではADAR1の過剰発現によってAZIN1とFLNBに編集異常を起こし、悪性化進展を促進していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

A-to-I編集を担うADARsが、ヒトの癌における潜在的なエピジェネティックな変化に関与していることが示されている。そこで、我々は悪性化進展におけるRNA編集酵素ADARとADARによるRNA編集異常の役割について検討した。その結果、口腔扁平上皮癌ではADAR1の過剰発現によってAZIN1とFLNBに編集異常を起こし、悪性化進展を促進していることが示された。これらの結果から、ADARの異常発現がRNA編集異常の頻度を高め悪性化進展に関与することを示した。

本研究によって、RNA編集異常を標的とした診断法や治療法の開発に向けての基盤研究が確立できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recently, adenosine (A)-to-inosine (I) RNA editing, as it is catalyzed by adenosine deaminases on acting on RNA (ADAR) has been shown to be a potential epigenetic event in human cancers. Here we investigated that role of RNA editing enzyme ADARs and altered RNA editing in oral squamous carcinoma (OSCC) malignant progression. Among the three ADAR enzymes expressed in human cells, only ADAR1 was expressed in OSCC cells. We used to modulate the expression of ADAR1 by overexpressing, or silencing ADAR1 reinstating a specific altered edited transcript. As a result of the overexpression of ADAR1 in OSCC cells, led to the increased editing frequencies of antizyme inhibitor 1 (AZIN1) and filamin B (FLNB) transcripts. Consistently, silencing ADAR1 by shRNA targeting ADAR1 gene in OSCC cells resulted in the reduced editing level of AZIN1 and FLNB.

These results suggest that the upregulation of ADAR1 in OSCC contributes to the gene specific altered editing pattern.

研究分野：口腔外科学

キーワード：エピジェネティック ADAR1 AZIN1 FLNB 口腔扁平上皮癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類では DNA が RNA へ転写される際に、様々な修飾を受けている。これらの RNA 修飾は、RNA の機能や発現量に影響を与え RNA の多様性を生み出している。RNA 修飾の一つとして、二本鎖 RNA のアデノシンをイノシンに変換する A-to-I 編集を担う adenosine deaminase acting on RNAs (ADARs) が転写後の塩基の書き換えを行うことで、タンパク質の一次構造の変化をきたすことが知られている。ADARs は、遺伝子の異なる ADAR1 から ADAR3 まで存在するが、ADAR1 は普遍的にどの細胞でも発現し、ADAR2 と ADAR3 は神経細胞に強く発現するが、ADAR3 は RNA 編集能力がなく ADAR1 や ADAR2 による編集を阻害することが示めされている。ADAR1 や ADAR2 は二本鎖 RNA に結合してアデノシンをイノシンに変換するが、DNA を基質としないのでアデノシンから変換されたイノシンはグアノシンと構造が類似するので翻訳されるとグアノシンとみなされてしまう。このことで、アミノ酸をコードしている部分に RNA 編集がおり、DNA の変異がないのにアミノ酸置換が生じることになる。したがって、RNA 編集がおこる場所によってタンパク質の機能変化や選択的スプライシング(タンパク質の情報を持たないイントロンを取り除いて情報を持っているエクソンを結合すること)、遺伝子発現を抑制する miRNA に作用して翻訳されたアミノ酸配列の変化をもたらすことになる。なかでも、ADAR1 による RNA 編集によって異常なタンパク質の発現量や機能異常がおこり、癌細胞の増殖能、遊走能、浸潤能といった悪性化進展に関与する性質が促進されることが示唆されている<sup>1)</sup>。また、ADAR1 によって RNA 編集される標的として知られているアンチザイム阻害 1 タンパク質(AZIN1)、フィラミン B (FLNB)、膀胱癌関連タンパク質(BLCAP)、グリオーマ関連癌遺伝子タンパク質(GLI1)が高頻度に修飾されることによって細胞増殖や浸潤・転移を誘導する可能性がある。そこで、ADAR1 の過剰発現細胞を用いて、これら標的タンパク質の RNA 編集の頻度をみることで中心的な役割を持つタンパク質を同定できることが期待される。

1) Peng, X. Xu, X. Wang, Y. Hawke, D.H. Yu, S. Han, L. Zhou, Z. Mojumdar, K. Jeong, K.J. Labrie, M. et al. A-to-I RNA Editing Contributes to Proteomic Diversity in Cancer. Cancer Cell 2018, 33, 817-828.e17.

### 2. 研究の目的

RNA 編集酵素 ADARs における口腔扁平上皮癌細胞の浸潤・転移促進を中心とした悪性化進展機構への関与を明らかにする。この結果から、ADAR を標的とした新しい診断法や治療法の基盤研究を確立する。

### 3. 研究の方法

**細胞:** ヒト口腔扁平上皮癌から樹立された 10 株(SAS, SAS-H1, SAS-L1, HSC2, HSC3, HSC4, IT-GA, IS-FOM, OSC19, OSC20)を用いた。

**ADAR1 過剰発現細胞の樹立:** ADAR1p110 の cDNA 全長を PCR で得た後、レンチウイルス発現ベクターに挿入したものと、コントロールとして cDNA 挿入なしの LacZ レンチウイルスベクターを使用した。ウイルスベクターは各々 293LTV 細胞株に感染させた。得られたウイルス粒子を細胞に導入して ADAR1p110 過剰発現細胞を作製した。得られた導入細胞はピューロマイシン選択培地で 10 日間培養を行い、高発現安定化細胞を得た。

**ADAR1 ノックダウン細胞の樹立:** ADAR1 特異的 shRNA レンチウイルス粒子とノンターゲット shRNA コントロール粒子を購入した(MISSION shRNA, Sigma)。レンチウイルス粒子を添加した培養液で細胞を 24 時間培養し導入を試みた。得られた導入細胞の 1/2 を RT-PCR で発現抑制を確認した。残りの細胞はピューロマイシン選択培地で 10 日間培養を行い、高発現安定化細胞を得た。

**リアルタイム PCR 法による遺伝子発現量測定:** 細胞から Total RNA を抽出し逆転写反応で cDNA を合成し、これを鋳型にしてリアルタイム RT-PCR による遺伝子発現量を測定した。

**標的タンパク質がコードされた遺伝子の RNA 編集異常の解析:** PCR 産物のダイレクトシーケンシング法によって RNA 編集頻度を検討した。

**ウェスタンブロット法によるタンパク質の発現:** 細胞を SDS-PAGE サンプルバッファーで溶解し、100、5 分処理した。試料は SDS-PAGE ゲルで電気泳動後、PVDF 膜に転写した。この転写膜に対して 1 次抗体として Abcam 社のマウス抗 ADAR1 抗体とマウス抗 AZIN1 抗体を反応させた。その後、HRP 結合 2 次抗体と反応させ、化学発光によってタンパク質を検出した。

**細胞増殖活性:** 細胞は、96 穴プレートに播種した。細胞増殖は Cell Counting Kit-8(DOJINDO) を使用して測定した。

**細胞遊走能と基底膜浸潤能:** 細胞遊走能はトランスウェルチャンバー法で 8 $\mu$ m のポアを有する PET 膜の通過した細胞を測定した。基底膜浸潤能は、同様のトランスウェルチャンバー法で Matrigel をコートした 8 $\mu$ m のポアを有する PET 膜を通過した細胞を測定した。

**フォーカス形成による造腫瘍形成能:** 6 穴プレートに 1x10<sup>3</sup> 個の細胞を播種し、14 日後にクリスタルバイオレット染色し形成されたコロニー数を測定した。

**ヌードマウスを用いた造腫瘍性の検討:** ADAR1 高発現安定化細胞とコントロール L1-CTL 細胞を生後 4 週のヌードマウスの皮下に 2 x 10<sup>6</sup> 個移植した。その後、移植後 4 週まで発育した腫瘍の容積を各週で測定した。

#### 4. 研究成果

##### 口腔扁平上皮癌細胞の ADARs 発現

ヒト口腔扁平上皮癌から樹立された10株について、ADARsの発現を検討した。その結果、ADAR1 mRNA はすべての細胞株で発現を確認したが、発現強度については様々であった。ADAR2 と ADAR3 の mRNA はすべての細胞株で発現していなかった。そこで、ADAR1 mRNA の発現量についてリアルタイム PCR 法で確認したところ、高浸潤性癌細胞である SAS-H1 の発現量が高かった。なお、対照株として低浸潤性癌細胞である SAS-L1 を用いた。SAS-H1 ならびに SAS-L1 の ADAR1 タンパク質発現について、ウエスタンブロット法で検討した。その結果、ADAR1p110 と ADAR1p150 を認めたが ADAR1p150 の発現は両者で差を認めなかったが、ADAR1p110 は SAS-L1 と比べ SAS-H1 で発現タンパク質量の上昇がみられた。

##### 口腔扁平上皮癌細胞の ADAR1 の機能

ADAR1 の発現が亢進している癌細胞では、細胞増殖能や浸潤能が高くなっていることから、悪性形質の獲得に関与することが示されている。そこで、ADAR1p110 をコードする cDNA 全長を PCR で得た後、レンチウイルス発現系で SAS-L1 細胞に導入して、ADAR1 高発現細胞 (L1-AR1) を得た。なお、コントロールとして cDNA 挿入なしの LacZ レンチウイルス (L1-CTL) を用いて検討した。その結果、ADAR1 高発現細胞 L1-AR1 は、L1-CTL 細胞と比較し ADAR1 mRNA と ADARp1110 タンパク質の発現量がともに亢進したことを確認した。そこで、この2つの細胞を用いて、細胞増殖活性と細胞遊走能および基底膜浸潤能を検討したところ、L1-AR1 細胞で L1-CTL 細胞と比較していずれも亢進していた。また、フォーカス形成による造腫瘍形成能も促進していることが示された。このことは、ヌードマウスを用いた造腫瘍性の検討でも、L1-AR1 細胞が L1-CTL 細胞と比べ短時間で腫瘍容積と腫瘍重量が増大した。

そこで、これらの実験結果を検証するため RNA 干渉法を用いた。SAS-H1 細胞と L1-AR1 細胞からレンチウイルス発現系で ADAR1 特異的 shRNA 高発現安定化細胞を作製して、細胞内の ADAR1 のノックダウンを行った。その結果、ADAR1 ノックダウン細胞はいずれも10タンパク質の発現量がともに亢進したことを確認した。そこで、この2つの細胞を用いて、細胞増殖活性と細胞遊走能および基底膜浸潤能が低下した。さらに、フォーカス形成の検討でも腫瘍形成能が低下した。

このことから、ADAR1 が細胞増殖や浸潤・転移といった悪性化進展機構に深く関与していることが示された。

##### ADAR1 編集酵素の標的タンパク質の探索

ADAR1 編集酵素の標的としてアンチザイム阻害1タンパク質 (AZIN1)、フィラミン B (FLNB)、膀胱癌関連タンパク質 (BLCAP)、グリオーマ関連癌遺伝子タンパク質 (GLI1) が高頻度に修飾されることが知られている。そこで、本研究では AZIN1 と FLNB の mRNA について検討した。高浸潤性 SAS-H1 細胞と ADAR1 高発現 L1-AR1 細胞でダイレクトシーケンシング法による AZIN1 と FLNB の RNA 編集頻度を解析した。その結果、AZIN1 と FLNB の mRNA は、アデノシンをイノシンに変換する A-to-I 編集が高頻度におきていた。両者を比較すると、FLNB と比べて AZIN1 で編集頻度が増加していた。そこで、これらの実験結果を検証するため RNA 干渉法を用いた。SAS-H1 細胞と L1-AR1 細胞からレンチウイルス発現系で ADAR1 特異的 shRNA 高発現安定化細胞を作製して、細胞内の ADAR1 のノックダウンを行ったところ、いずれも AZIN1、FLNB とともに編集頻度が抑制された。

このことから、ADAR1 が AZIN1 と FLNB を標的としてアデノシンをイノシンに変換する A-to-I 編集が高頻度におきていることが示された。

#### 5. 主な発表論文等

Saga, R., Hasegawa, K., Murata, K., Chiba, M., Nakamura, T., Okumura, K., Tsuruga, E., Hosokawa, Y. Regulation of radiosensitivity by 4 methylumbelliferone via the suppression of interleukin 1 in fibrosarcoma cells. *Oncology Letters* 17: 3555-3561, 2019. DOI: 10.3892/ol.2019.9990

Kuroda K., Fukuda T., Krstic-Demonacos, M., Demonacos, C., Okumura, K., Isogai, H., Hayashi, M., Saito, K., Isogai, E. miR-663a regulates growth of colon cancer cells, after administration of antimicrobial peptides, by targeting CXCR4-p21 pathway. *BMC Cancer* 17: 33, 2017 DOI: 10.1186/s12885-016-3003-9

Kuroda, K., Fukuda, T., Isogai, H., Okumura, K., Krstic-Demonacos, M., Isogai, E. Antimicrobial peptide FF/CAP18 induces apoptotic cell death in HCT116 colon cancer cells via changes in the metabolic profile. *Int J Oncol* 46: 1516-1526, 2015.

Kuroda, K., Okumura, K., Isogai, H., Isogai, E. The human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 and mimics are potential anticancer drugs. *Front Oncol* 30 June 2015. [chttps://doi.org/10.3389/fonc.2015.00144](https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00144)

[雑誌論文](計4件)

[学会発表](計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：磯貝 恵美子  
ローマ字氏名：(ISOGAI, emiko)  
所属研究機関名：東北大学  
部局名：大学院農学研究科  
職名：教授  
研究者番号(8桁)：80113570

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：なし  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。