

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02573

研究課題名(和文)薬物代謝能制御におけるRNA編集の意義と医薬品によるADARの機能変動の解析

研究課題名(英文)Significance of RNA editing on regulation of drug metabolism

研究代表者

中島 美紀(Nakajima, Miki)

金沢大学・ナノ生命科学研究所・教授

研究者番号：70266162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト肝臓における主な薬物代謝酵素であるシトクロムP450 (P450, CYP)の発現が、RNA編集によって影響を受けることで、薬物応答性に個人差が生じている可能性を明らかにすることを目的とした。ヒト肝がん由来細胞を用いて、RNA編集を担うADARの発現量低下により、CYP2B6 mRNAが不安定性して、CYP2B6タンパク質発現量が低下すること、転写因子HNF4aが低下することで、CYP2C8を含む複数のP450分子種の発現量が低下する一方で、転写因子PXRが増加することでCYP3A4の発現量が増加することを見だし、RNA編集は薬物代謝能に変動をもたらす要因となっていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬物代謝酵素は、医薬品有効成分の血中濃度を規定し、薬効や副作用発症を左右する因子として重要であり、その発現変動要因を解明する研究は、医薬品開発の効率化および医薬品適正使用の観点から社会的ニーズが高い。ヒト全遺伝子の約40%がRNA編集を受けていることが示されており、RNA編集の異常がいくつかの疾患の発症に関わっている例も知られているが、肝臓における役割はほとんど解明されていなかった。本研究では、肝臓に発現している主な薬物代謝酵素の発現制御におけるRNA編集の寄与を明らかにし、創薬や適切な薬物治療に役立つ基礎情報を提供できた。

研究成果の概要(英文)：Using several human hepatocarcinoma-derived cell lines, HepaRG, Huh-7, and HepG2 cells, we found that the knockdown of ADAR1 or ADAR2 by siRNA resulted in a significant decrease in CYP2B6 protein level, owing to the decreased stability of CYP2B6 mRNA. The knockdown of ADAR1 or ADAR2 resulted in a significant decrease in CYP2C8 protein level, owing to the decreased expression of HNF4a, a major transcription factor for P450s. The decrease in the HNF4a expression was considered to be a reason of the decrease in CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP2E1 by the knockdown of ADARs. Interestingly, the knockdown of ADAR1 resulted in a significant increase in CYP3A4 protein level, owing to the increased expression of PXR, a transcription factor regulating the induction of CYP3A4. In summary, we found that A-to-I RNA editing post-transcriptionally regulates the expressions of multiple P450s, affecting pharmacokinetics and drug response.

研究分野：薬物動態学

キーワード：RNA編集 転写後調節 薬物代謝 シトクロムP450 核内受容体

## 1. 研究開始当初の背景

RNA 編集とは、主に核内において転写産物が酵素反応により修飾される事象であり、ほ乳類、特にヒトではアデノシンがイノシンに変換される A-to-I RNA 編集が最も高頻度に認められる。イノシンはグアノシンとして認識されることから、A-to-I RNA 編集によりアミノ酸が変化したり、スプライシングや mRNA 安定性が変化したりする可能性がある。A-to-I RNA 編集は 1987 年に発見されたが、編集部位が非翻訳領域に多いことから生理学的意義に関する研究は進んでいなかった。2000 年代になり、遺伝子発現調節に microRNA (miRNA) が重要な役割を果たすことが明らかになって以降、mRNA の 3'-非翻訳領域 (3'-UTR) に miRNA 結合領域が多く、かつ編集部位が多く存在すること、また、pre-miRNA も RNA 編集を受け、mature miRNA の発現量や機能が変化する可能性があることから、転写後調節機構としての A-to-I RNA 編集の重要性が再認識されるようになってきた。

近年の次世代シーケンズ解析の進歩により、RNA 編集部位が網羅的に解析され、ヒト全遺伝子の約 40% が RNA 編集を受けていることが示されている。A-to-I RNA 編集の異常が筋萎縮性側索硬化症や神経変性疾患など、いくつかの疾患の発症に関わっている例も知られている。RNA 編集を担う酵素が脳に高く発現していることから、A-to-I RNA 編集の研究は神経組織や脳を対象としたものが多く、肝臓における意義は未解明である。申請者らの研究により、RNA 編集を担う酵素 ADAR の肝臓中の発現量に数百倍もの大きな個人差があることが明らかになっている (Nakano et al., J. Biol. Chem., 291: 894-903, 2016)。RNA 編集能に変動をもたらす要因の解明は、疾病リスクだけでなく薬物治療効果の予測、個別化医療の最適化にもつながる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、肝臓に発現するシトクロム P450 (P450, CYP) などの薬物代謝酵素の発現制御における RNA 編集の寄与を明らかにし、ADAR の発現量や機能が変化する要因を解明することにより、創薬や薬物治療に役立てるための情報基盤を構築することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト肝がん由来細胞への ADAR1 または ADAR2 に対する siRNA の導入

ヒト肝がん由来 HepaRG 細胞または HepG2 細胞を 6 ウエルプレートに播種し、Lipofectamine RNAiMAX を用いて siRNA を導入した。72 時間後、細胞を回収し、total RNA およびホモジネートを調製した。

### (2) 各 P450 分子種の発現量の評価

それぞれの P450 分子種に特異的なプライマーを用いて mRNA 発現量はリアルタイム RT-PCR により評価した。また、各 P450 分子種のタンパク質発現量は、特異的な抗体を用いてウェスタンブロッティングにより評価した。

### (3) mRNA 安定性の評価

細胞を播種して 24 時間後に、転写阻害剤である  $\alpha$ -アマンチンを 10  $\mu$ g/mL の濃度で処置し、経時的に RNA を回収し、P450 mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR により評価した。

### (4) ルシフェラーゼアッセイ

ルシフェラーゼ遺伝子の下流に 3'-UTR を組み込んだプラスミド、またはルシフェラーゼ遺伝子の上流に 5'-上流領域を組み込んだプラスミドを、ADAR に対する siRNA を導入した Huh-7 細胞または HepG2 細胞に導入し、Nano-Glo Dual-Luciferase Reporter Assay System を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) CYP2B6 発現に及ぼす RNA 編集の影響

薬物代謝酵素の発現がヒト肝臓レベルに比較的維持されているヒト肝がん由来 HepaRG 細胞を用いて、siRNA を導入することにより ADAR1 または ADAR2 をノックダウンしたところ、CYP2B6 mRNA およびタンパク質発現量が有意に減少した (図 1) ことから、ADAR は CYP2B6 発現を正に

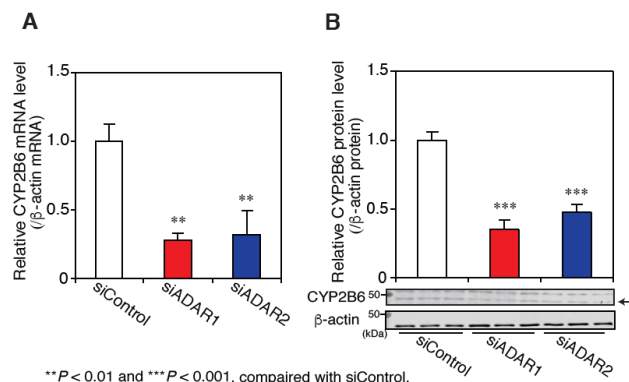
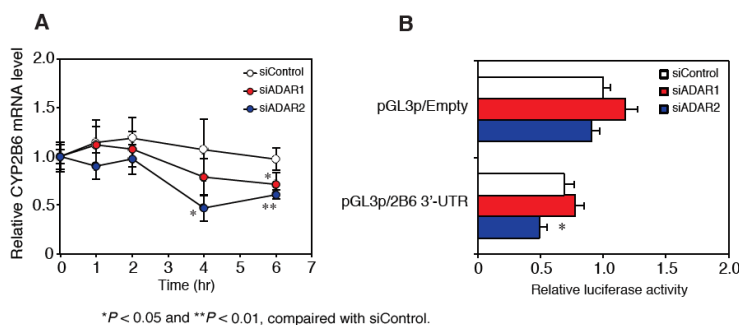


図 1. ADAR のノックダウンが CYP2B6 の発現量に与える影響

制御していることが示された。

ADAR ノックダウンによる CYP2B6 mRNA の発現低下が mRNA の安定性の低下によるものか、転写阻害剤  $\alpha$ -アミニチン処置条件下で経時的に CYP2B6 mRNA 発現量を測定したところ、ADAR1 または ADAR2 をノックダウンした細胞では、より低値を示したことから、ADAR は CYP2B6 の安定化に働いていることが示唆された(図 2A)。この安定性の変化に 3'-UTR が関わっているかルシフェラーゼアッセイを行った。HepaRG 細胞には効率的にプラスミドを導入できなかったことから、このアッセイにおいては Huh-7 細胞を用いた。CYP2B6 の 3'-UTR を含むプラスミドのルシフェラーゼ活性は ADAR1 ノックダウンで変化しなかったものの、ADAR2 ノックダウンで有意に低下したことから、ADAR2 による mRNA 安定性の変化は 3'-UTR を介していることが示された(図 2B)。

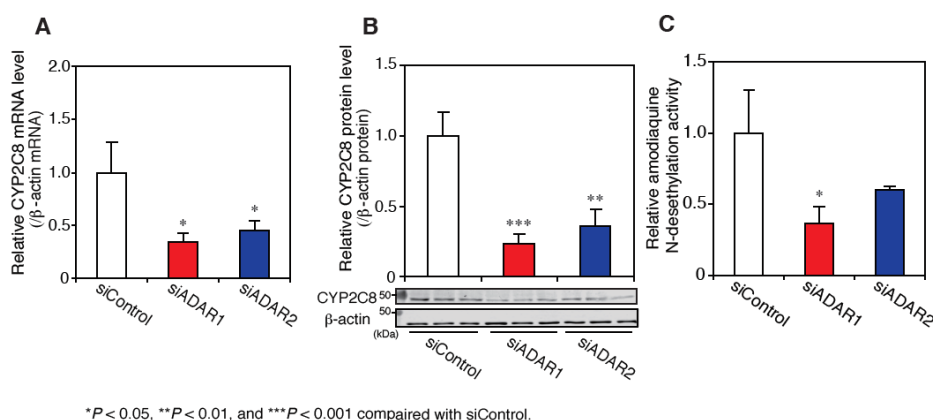


\* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ , compared with siControl.

図 2. ADAR のノックダウンが CYP2B6 mRNA の安定性に与える影響

## (2) CYP2C8 発現に及ぼす RNA 編集の影響

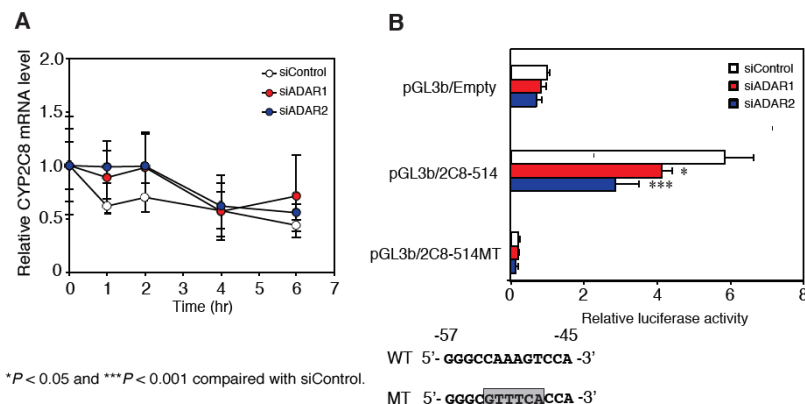
HepaRG 細胞における CYP2C8 mRNA およびタンパク質発現量が、ADAR1 または ADAR2 ノックダウンにより有意に減少し、CYP2C8 酵素活性も有意に低下した(図 3)ことから、ADAR は CYP2C8 発現を正に制御していることが示された。



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  compared with siControl.

図 3. ADAR のノックダウンが CYP2C8 の発現量に与える影響

ADAR ノックダウンによる CYP2C8 mRNA の発現低下が mRNA の安定性の低下によるものか、転写阻害剤  $\alpha$ -アミニチン処置条件下で経時的に CYP2C8 mRNA 発現量を測定したところ、CYP2B6 とは異なり、CYP2C8 mRNA の安定性は ADAR1 または ADAR2 をノックダウンによって変化しなかった(図 4A)。次に、ADAR ノックダウンによる CYP2C8 の発現減少が転写活性の低下によるものか、5'-上流領域約 500 bp を組み込んだプラスミドを用いてルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、ルシフェラーゼ活性が ADAR1 または ADAR2 のノックダウンにより有意に低下した(図 4B)ため、CYP2C8 mRNA 発現量の減少は転写活性の低下によるものであることが示された。CYP2C8 の転写活性化を担う転写因子



\* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$  compared with siControl.

図 4. ADAR のノックダウンが CYP2C8 mRNA の安定性および転写活性化に与える影響

hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ )の結合領域に変異を導入したプラスミドでは、ADAR ノックダウンによる転写活性の低下が認められなかった。

最後に HNF4 $\alpha$ タンパク質発現量を評価したところ、ADAR1 または ADAR2 ノックダウンにより有意に減少していた(図 5)。以上より、ADAR ノックダウンにより HNF4  $\alpha$  タンパク質発現量が減少することで、CYP2C8 発現量が減少することを明らかにした。

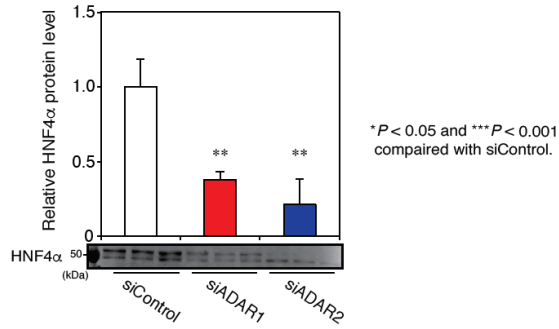


図 5. ADAR のノックダウンが HNF4 $\alpha$  の発現量に与える影響

### (3) その他の P450 分子種の発現に及ぼす RNA 編集の影響

HNF4 $\alpha$ は CYP2C8 や CYP2B6 以外にも CYP2A6、2C9、2C19、2D6、2E1 および 3A4 の転写制御にも関わっている。ADAR ノックダウンにより HNF4 $\alpha$ 発現量が減少したことから、これらの P450 分子種の発現も変化するか調べた。その結果、一部有意差が認められなかったものの、CYP1A2、2A6、2C9、2C19、2D6、2E1 および 3A5 mRNA 発現量は ADAR ノックダウンにより減少した(図 6)。したがって、ADAR ノックダウンによる HNF4 $\alpha$ 発現量の減少が複数の P450 分子種の発現減少をもたらしていることが示された。興味深いことに CYP3A4 mRNA 発現量は ADAR2 ノックダウンにより減少したのに対し、ADAR1 ノックダウンにより有意に増加した(図 6)。これは HNF4 $\alpha$ 以外の要因の寄与が大きいと考えられた。

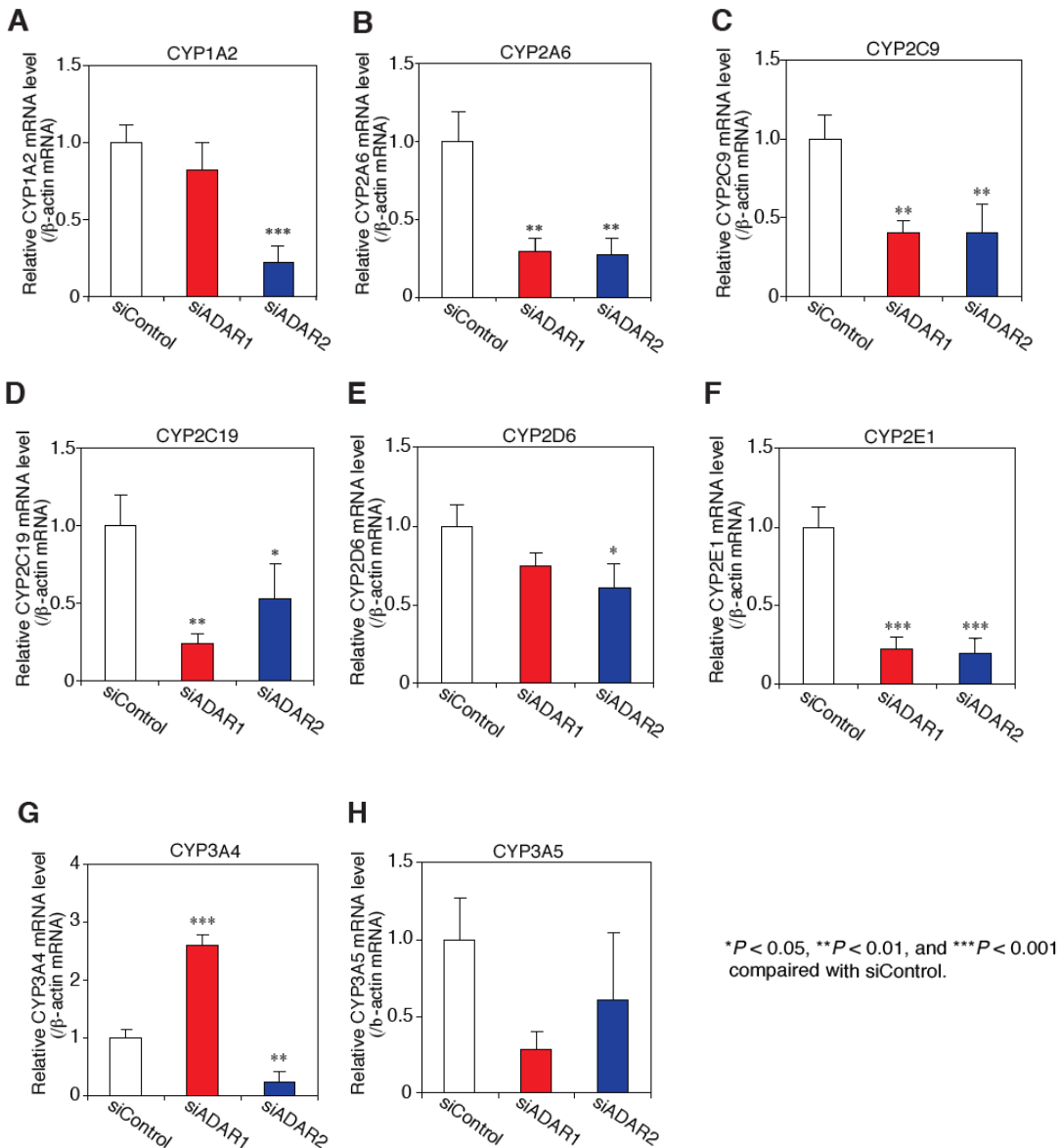


図 6. ADAR のノックダウンが各 CYP 分子種の発現量に与える影響

(4) Pregnane X receptor (PXR) 発現に及ぼす RNA 編集の影響

CYP3A4 の転写活性化を主に担っている転写因子である PXR の発現が ADAR ノックダウンにより変化するかどうか評価した。その結果、PXR タンパク質発現量は ADAR1 または ADAR2 どちらのノックダウンによっても有意に増加した (図 7A)。同じ結果が、HepG2 細胞でも認められた (図 7B) ため、以降の実験は HepG2 細胞を用いた。

ADAR1 ノックダウンによる CYP3A4 mRNA の発現増加が PXR の発現増加によるものかどうか調べるため、PXR に対する siRNA を導入したところ、ADAR1 ノックダウン下における CYP3A4 mRNA の増加程度が減少した (図 8A)。また、CYP3A4 遺伝子上流の PXR 応答配列を組み込んだプラスミドにおけるルシフェラーゼ活性が、ADAR1 ノックダウンにより有意に増加した (図 8B)。以上より、ADAR1 ノックダウンによる CYP3A4 の発現増加は PXR の発現増加によるものであることを明らかにした。

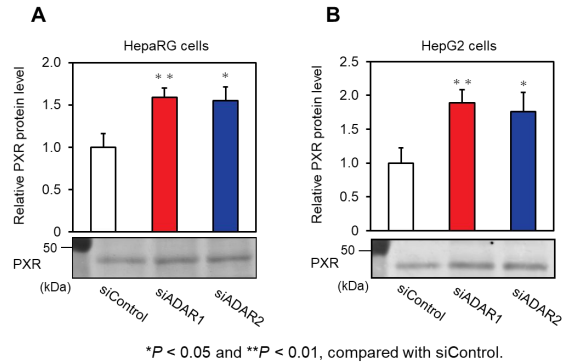


図7. ADARのノックダウンがPXRの発現量に与える影響

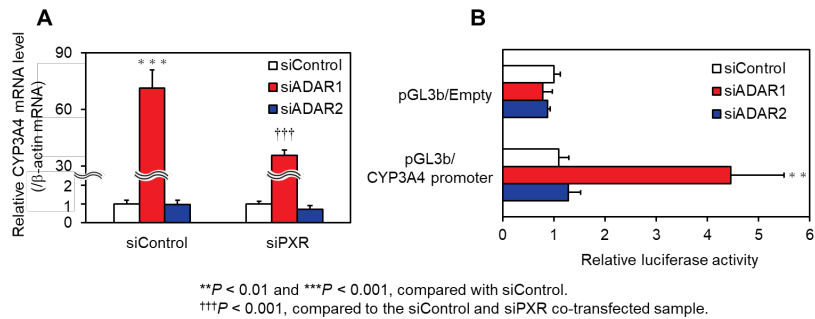


図8. ADARのノックダウンがCYP3A4の転写活性化に与える影響

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takemoto S, Nakano M, Fukami T, Nakajima M.	4. 巻 37
2. 論文標題 Adenosine deaminases acting on RNA modulate the expression of the human pregnane X receptor.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug Metab Pharmacokinet	6. 最初と最後の頁 1000367
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dmpk.2020.11.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takizawa M, Nakano M, Fukami T, Nakajima M.	4. 巻 331
2. 論文標題 Decrease in ADAR1 expression by exposure to cigarette smoke enhances susceptibility to oxidative stress.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxicol Lett	6. 最初と最後の頁 22-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.toxlet.2020.05.019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakano M, Fukami T, Nakajima M.	4. 巻 370 (3)
2. 論文標題 Adenosine deaminases acting on RNA downregulate the expression of constitutive androstane receptor in the human liver-derived cells by attenuating splicing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pharmacol Exp Ther	6. 最初と最後の頁 408-415
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/jpet.119.260109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nozaki K, Nakano M, Iwakami C, Fukami T, Nakajima M.	4. 巻 47 (7)
2. 論文標題 RNA editing enzymes modulate the expression of hepatic CYP2B6, CYP2C8, and other cytochrome P450 isoforms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Drug Metab Dispos	6. 最初と最後の頁 639-647
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/dmd.119.086702	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中野 正隆、中島 美紀	4. 巻 -
2. 論文標題 microRNAによる薬物代謝制御の最新知見	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 28-34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.154.28.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masataka Nakano and Miki Nakajima	4. 巻 14
2. 論文標題 Current knowledge of microRNA-mediated regulation of drug metabolism in humans.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.	6. 最初と最後の頁 493-504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/17425255.2018.1472237.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masataka Nakano and Miki Nakajima	4. 巻 181
2. 論文標題 Significance of A-to-I RNA editing of transcripts modulating pharmacokinetics and pharmacodynamics.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pharmacol Ther	6. 最初と最後の頁 13-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pharmthera.2017.07.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 磯野元輝、中野正隆、深見達基、中島美紀
2. 発表標題 RNAメチル化がヒト肝におけるCYP2B6発現量に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹本誠也、中野正隆、深見達基、中島美紀
2. 発表標題 ヒト肝臓におけるCES2の発現はRNAメチル化により制御される
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Koki Morita, Keito Amai, Masataka Nakano, Tatsuki Fukami, and Miki Nakajima
2. 発表標題 Effects of RNA editing on expression and function of human aldo-keto reductase family 1 member C (AKR1C)
3. 学会等名 12nd International ISSX meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Seiya Takemoto, Masataka Nakano, Tatsuki Fukami, and Miki Nakajima
2. 発表標題 A-to-I RNA editing modulates the expression of human pregnane X receptor
3. 学会等名 12nd International ISSX meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀内陽生、中野正隆、片山浩樹、深見達基、中島美紀
2. 発表標題 RNA編集酵素ADAR1によるヒトCYP7A1発現制御
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第131回例会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Seiya Takemoto, Masataka Nakano, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima
2. 発表標題 Cytochrome P450 3A4 is down-regulated by RNA editing enzymes-mediated post-transcriptional repression of human pregnane X receptor expression
3. 学会等名 日本薬物動態学会第34回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masataka Nakano and Miki Nakajima
2. 発表標題 Regulation of human drug-metabolizing enzymes by two prevalent post-transcriptional modifications, A-to-I editing and methylation of adenosine
3. 学会等名 日本薬物動態学会第34回年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀内陽生、片山浩樹、中野正隆、深見達基、中島美紀
2. 発表標題 RNA編集酵素ADAR1がヒトCYP7A1の発現に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹本誠也、中野正隆、深見達基、中島美紀
2. 発表標題 RNA編集がヒトpregnane X receptorの発現に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田倅規、中野正隆、深見達基、中島美紀
2. 発表標題 RNA編集がアルド-ケド還元酵素AKR1C分子種の発現および酵素活性に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miki Nakajima
2. 発表標題 microRNA-SNPs as biomarkers of drug response and toxicity.
3. 学会等名 18th Word Congress of Basic and Clinical Pharmacology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miki Nakajima
2. 発表標題 Significance of post-transcriptional regulation of drug-metabolizing enzymes: perspective insight into future pharmacotherapy.
3. 学会等名 22nd Microsomal and Drug Oxidation/33rd JSSX (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koki Morita, Masataka Nakano, Tatsuki Fukami, and Miki Nakajima
2. 発表標題 ERa is positively regulated by A-to-I RNA editing in breast cancer.
3. 学会等名 22nd Microsomal and Drug Oxidation/33rd JSSX (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kaori Nozaki, Masataka Nakano, Tatsuki Fukami, and Miki Nakajima
2. 発表標題 Regulation of drug-metabolizing cytochrome P450s by adenosine deaminases acting on RNA (ADAR) enzymes.
3. 学会等名 22nd Microsomal and Drug Oxidation/33rd JSSX (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masashi Takizawa, Masataka Nakano, Tatsuki Fukami, and Miki Nakajima
2. 発表標題 Degadation of RNA editing enzyme ADAR1 by cigarette smoke would be a factor of increase in H0-1 expression.
3. 学会等名 22nd Microsomal and Drug Oxidation/33rd JSSX (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野崎香於利、中野正隆、深見達基、中島美紀
2. 発表標題 RNA編集酵素ADARによる薬物代謝型ヒトP450分子種の制御
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第130回例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 瀧澤雅、中野正隆、深見達基、中島美紀
2. 発表標題 喫煙によるRNA編集酵素ADAR1の発現低下が及ぼす酸化ストレス感受性亢進メカニズムの解明
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第130回例会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学薬学系薬物代謝安全性学研究室  
<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~taisha/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中野 正隆  (Nakano Masataka)		
研究協力者	野崎 香於利  (Nozaki Kaori)		
研究協力者	竹本 誠也  (Takemoto Seiya)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------