

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14901

研究課題名(和文)薬物動態制御因子PXRおよびCARの発現に与えるRNA編集の影響

研究課題名(英文)RNA editing-mediated regulation of PXR and CAR

研究代表者

中野 正隆(Nakano, Masataka)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：00816225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：薬物治療において、期待される薬効や副作用には大きな個人差が認められ、その個人差は、肝臓に発現するシトクロムP450などの薬物代謝酵素の活性や発現量の差による場合が多い。本研究では、薬物代謝酵素の発現を制御することが知られている核内受容体であるpregnane X receptor (PXR) と constitutive androstane receptor (CAR) の発現が、転写後塩基置換であるA-to-I RNA編集によって制御され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

薬物治療において認められる薬効や副作用には大きな個人差の原因なりうる、adenosine deaminases acting on RNA (ADAR) 1とADAR2が触媒するA-to-I RNAによる核内受容体PXRとCARの発現制御を明らかにした。個別化医療の実現に向けた基盤情報となる、ヒト薬物代謝能の新規制御メカニズムを明らかにすることが出来た。

研究成果の概要(英文)：Adenosine deaminases acting on RNA (ADAR) 1 and ADAR2 enzymes-catalyzing A-to-I RNA editing possibly modulates gene expression and function. In this study, we found that ADAR regulate the expression of human pregnane X receptor and constitutive androstane receptor, which controls the expression of various drug-metabolizing enzymes. RNA editing enzymes ADAR1 and ADAR2 would be novel regulatory factors of drug metabolism potencies in the human liver.

研究分野：薬物代謝学

キーワード：薬物代謝 RNA編集 転写後修飾

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

### 1. 研究開始当初の背景

薬物治療において、期待される薬効や副作用には大きな個人差が認められる。それは医薬品成分の血中濃度や反応性代謝物生成など、薬物動態の個人差に起因する場合が多い。薬物動態を規定する薬物代謝酵素や薬物トランスポーターの発現量や機能には大きな個人差が認められ、特に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活性や発現量の差が薬物動態に与える影響が大きい。転写レベルでの発現制御メカニズムに関して、pregnane X receptor (PXR) や constitutive androstane receptor (CAR) などの核内受容体が P450 や UDP-グルクロン酸転移酵素、グルタチオン S-トランスフェラーゼなどの薬物代謝酵素や P-糖タンパク質、multidrug resistance associated protein などの薬物トランスポーターの発現を誘導することが明らかになっている。しかし、これら核内受容体自身がどのように発現制御されているかはほとんど解明されていない。

真核生物において、転写された RNA 上の特定の箇所において RNA 編集と呼ばれる塩基置換が起こる。RNA 編集にはいくつかのタイプが存在するが、ヒトで最も頻繁に認められるのはアデノシンがイノシンに変換される A-to-I RNA editing である。この反応は、主に核内において adenosine deaminase acting on RNA (ADAR) 1 もしくは ADAR2 によって触媒される。イノシンはグアノシンとして認識されるため、この塩基置換によってタンパク質のアミノ酸配列やスプライシング、microRNA を介した発現制御が変化する可能性がある。申請者は、ヒト肝臓における RNA 編集の機能的意義を明らかにすることを目的に、RNA 編集研究に着手し、複数検体のヒト肝試料において RNA 編集酵素 ADAR1 のタンパク質発現量に 200 倍以上の大きな個人差が存在することを見出した (Nakano et al., J. Biol. Chem., 291: 894-903, 2016)。肝臓は薬物・異物代謝に重要な臓器であることから、ADAR1 機能の個人差による RNA 編集レベルの差異が薬物代謝関連遺伝子の発現や機能に影響を与えている可能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

薬物動態のマスターレギュレーターともいえる核内受容体 PXR と CAR の発現や機能に与える A-to-I RNA 編集の影響を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

ヒト肝由来 HepaRG 細胞もしくは HepG2 細胞に、ADAR1 もしくは ADAR2 に対する siRNA を導入し、PXR、CAR ならびに下流の薬物代謝酵素 CYP2B6、CYP3A4、UGT1A1 の mRNA とタンパク質発現量を real time RT-PCR と Western blotting によって評価した。PXR、CAR mRNA の安定性を転写阻害剤 actinomycin D もしくは  $\alpha$ -amanitin 存在下で評価した。PXR 3'-非翻訳領域 (3'-UTR) を下流に含むレポータープラスミドを用いてルシフェラーゼアッセイを行った。ADAR ノックダウンが CAR のスプライシングに与える影響を real time RT-PCR によって評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) ADAR1 と ADAR2 による PXR 発現制御

ADAR1 と ADAR2 が PXR の発現に与える影響を調べるために、HepaRG 細胞もしくは HepG2 細胞における ADAR1 もしくは ADAR2 発現をノックダウンしたところ、PXR の mRNA とタンパク質発現量は増加した。この時、PXR の標的遺伝子である CYP3A4 と UGT1A1 mRNA の発現増加が認められた。したがって、ADAR1 と ADAR2 は PXR の発現を負に制御し、その下流の薬物代謝酵素の発現にまで影響を及ぼすことが示された。

ADAR1 と ADAR2 が PXR mRNA の安定性を変化させることで、CAR の発現を制御するか調べるために、actinomycin D を HepG2 細胞に処置した上で、ADAR1 もしくは ADAR2 のノックダウンを行った。Actinomycin D 存在下で PXR mRNA の分解が認められ、その分解は ADAR1 もしくは ADAR2 のノックダウンによって遅延した (図 1)。したがって、ADAR1 と ADAR2 は PXR mRNA の分解を促進することで、その発現を負に制御することが示された。

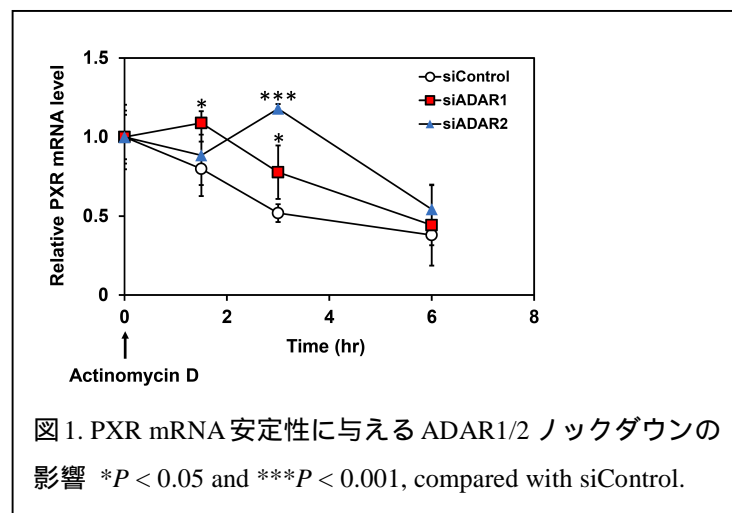


図 1. PXR mRNA 安定性に与える ADAR1/2 ノックダウンの影響 \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$ , compared with siControl.

この mRNA 安定性の変化が、PXR 3'-UTR を介して引き起こされているか調べるために、ルシフェラーゼ遺伝子の下流に PXR 3'-UTR を含んだレポータープラスミドを作製し、ルシフェラーゼアッセイを行った。ADAR1 もしくは ADAR2 ノックダウンによって、ルシフェラーゼ活

性の増加が認められたことから、ADAR1 と ADAR2 は 3'-UTR を介して PXR を負に制御することを明らかにした。

本研究成果は、国際学術雑誌 Drug Metabolism and Disposition に投稿した。

## (2) ADAR1 による CAR 発現制御

ADAR1 と ADAR2 が CAR の発現に与える影響を調べるために、HepG2 細胞における ADAR1 発現をノックダウンしたところ、CAR の mRNA とタンパク質発現量は増加した一方、ADAR2 ノックダウンでは変化しなかった。この時、CAR の標的遺伝子である CYP2B6 と CYP3A4 mRNA の発現増加が認められた。したがって、ADAR1 は CAR の発現を負に制御し、その下流の薬物代謝酵素の発現にまで影響を及ぼすことが示された。

ADAR1 と ADAR2 が CAR mRNA の安定性を変化させることで、CAR の発現を制御するか調べるために、 $\alpha$ -amanitin を HepG2 細胞に処置した上で、ADAR1 もしくは ADAR2 のノックダウンを行った。 $\alpha$ -Amanitin 存在下で CAR mRNA の分解が認められ、その分解は ADAR1 のノックダウンによって遅延した。したがって、ADAR1 は CAR mRNA の分解を促進することで、その発現を負に制御することが示された。

ADAR1 が CAR のスプライシングを変化させるか real time RT-PCR によ

って検討した。CAR intron 3 におけるスプライシングは、ADAR1 ノックダウンによって促進された (図 2)。したがって、ADAR1 は CAR のスプライシング異常を引き起こすことで、その発現を負に制御することが示された。

本研究成果は、Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 370: 408-415, 2019 において発表した。

以上の研究成果より、A-to-I RNA 編集酵素 ADAR1 と ADAR2 が、PXR と CAR の発現を mRNA 安定性やスプライシングを変化させることで、それらの発現を制御することが示され、ヒト薬物代謝能の新たな制御因子を世界に先駆けて明らかにすることが出来た。今後、ADAR1 ならびに ADAR2 自身が受ける発現制御メカニズムを明らかにすることで、A-to-I RNA 編集による薬物代謝制御が起因する薬物応答性の個人差についての有用な知見を得ることが期待できる。

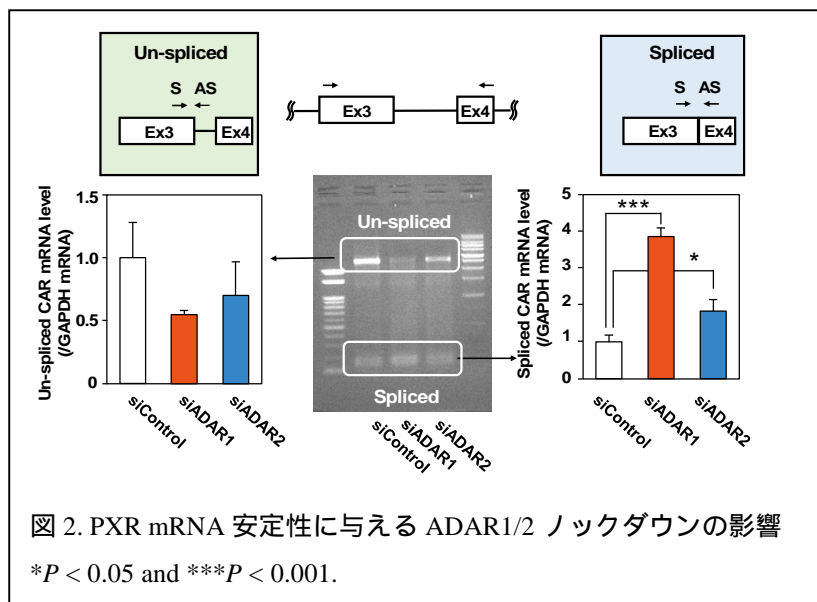


図 2. PXR mRNA 安定性に与える ADAR1/2 ノックダウンの影響

\* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$ .

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Nakano Masataka, Nakajima Miki	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 Pharmacology & Therapeutics	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) <a href="https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.07.003">https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.07.003</a>	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 Kaori, Nakano Masataka, Iwakami Chika, Fukami Tatsuki, Nakajima Miki	4. 巻 47
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 Metabolism and Disposition	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) <a href="https://doi.org/10.1124/dmd.119.086702">https://doi.org/10.1124/dmd.119.086702</a>	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 Masataka, Fukami Tatsuki, Nakajima Miki	4. 巻 370
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 Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics	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) <a href="https://doi.org/10.1124/jpet.119.260109">https://doi.org/10.1124/jpet.119.260109</a>	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 Masashi, Nakano Masataka, Fukami Tatsuki, Nakajima Miki	4. 巻 印刷中
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 Toxicology Letters	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.05.019">https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.05.019</a>	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15件(うち招待講演 1件/うち国際学会 6件)

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 第34回日本薬物動態学会年会(招待講演)
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 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 第34回日本薬物動態学会年会
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 Koki Morita, Masataka Nakano, Tatsuki Fukami, 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 12th International ISSX Meeting(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Seiya Takemoto, Masataka Nakano, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima.
2. 発表標題 A-to-I RNA editing modulates the expression of human pregnane X receptor.
3. 学会等名 12th International ISSX Meeting (国際学会)
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 2018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 2018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-ケト還元酵素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 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

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 RNA編集酵素ADAR1の発現が喫煙によって低下する機構と生体に与える意義の解明
3. 学会等名 第45回日本毒性学会学術年会
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 deaminase acting on RNA (ADAR) enzymes.
3. 学会等名 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX (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 ER is positively regulated by A-to-I RNA editing in breast cancer.
3. 学会等名 International Meeting on 22nd MDO and 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 Degradation of RNA editing enzyme ADAR1 by cigarette smoke would be a factor of increase in H0-1 expression.
3. 学会等名 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masataka Nakano, Tatsuki Fukami, and Miki Nakajima.
2. 発表標題 RNA methylation and demethylation enzymes modulate CYP2C8 expression in human liver.
3. 学会等名 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>金沢大学医薬保健研究域薬物代謝安全性学研究室ウェブページ  <a href="http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~taisha/">http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~taisha/</a></p>
--



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
--	---------------------------	-----------------------	----