

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861470

研究課題名(和文) ADAR1による子宮内膜症細胞の癌化メカニズムの解析

研究課題名(英文) ADAR1 induced somatic hypermutation in ovarian endometriosis

研究代表者

鶴岡 信栄 (TSURUOKA, Nobuhide)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50375763

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)：子宮内膜症では、明細胞癌の合併が多い。RNA編集機能を持つ Adenosine deaminase acting on RNA1 (ADAR1) は炎症の刺激により発現が誘導される。子宮内膜症細胞および明細胞癌細胞において、ADAR1の発現が亢進していることを明らかにした。ADAR1の発現ベクターを作製し、マウス胎児線維芽細胞(Mouse Embryonic Fibroblast: MEF)に導入した。その結果、1) ARID1A、c-myc に体細胞突然変異が導入されること、2) これらの細胞において、DNA二本鎖節端の指標になる γ -H2AX の発現が亢進していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Ovarian cancer does occur at higher than expected rates in women with endometriosis. ARID1A and c-myc have high frequent mutations in ovarian clear cell carcinoma. The RNA editor gene ADAR1 is induced by inflammatory ligands and buffers stress response. The ADAR1 gene was overexpressed in endometriosis and ovarian clear cell carcinoma cells. Exogenous ADAR1 induced adenosine-targeted DNA mutations in the ARID1A gene and the c-myc gene of wild-type mouse embryonic fibroblasts (MEFs) which have γ -H2AX expression.

研究分野：産婦人科学

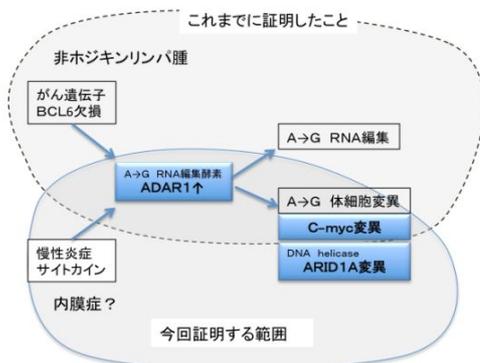
キーワード：体細胞突然変異 卵巣がん

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜症患者では卵巣癌の発生率が高く、逆に卵巣癌（類内膜腺癌・明細胞腺癌）患者では子宮内膜症を高率に合併する。さらに、子宮内膜症から異型内膜症を経て癌へと連続する移行像がみられることがある。このように、子宮内膜症と卵巣癌は深く関連しているが、その分子生物学的メカニズムについては明らかではない。

研究代表者は、転写抑制因子である BCL6 の欠損マウスの免疫グロブリン IgG1 陽性 B 細胞で、野生型マウスと比べて免疫グロブリン遺伝子のスイッチ領域や c-Myc 遺伝子に、DNA レベルで A → G 突然変異が増加していることを見出した。これまでに C → T への RNA 編集を触媒する酵素である activation-induced cytidine deaminase (AID) が、DNA レベルで C → T への体細胞突然変異を誘導することが報告されている。そこで、A → G への RNA 編集機能を示す adenosine deaminase acting on RNA1 (ADAR1) 遺伝子が A → G の体細胞変異の原因ではないかと考えた。

解析の結果、確かに BCL6 欠損マウスでは ADAR1 が過剰発現しており、ADAR1 遺伝子が BCL6 の標的遺伝子であることや、過剰発現の結果抗体遺伝子や c-myc 遺伝子に A → G の体細胞変異を導入することを明らかにした (Tsuruoka, et al., J. Biol. Chem., 2012)。ADAR1 は炎症性サイトカインによって発現誘導される遺伝子で、子宮内膜症ではその発現が高いと推定される。Gene Expression Omnibus などの公開データの解析でもこの推定を支持している。



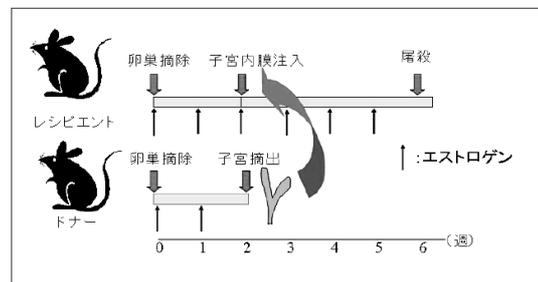
そこで、本研究では子宮内膜症患者からの臨床検体およびマウスを用いた内膜症モデルを作製して以下の点を明らかにする。

(1) 臨床検体を用いた研究

子宮内膜症組織に、ADAR1 が過剰に発現していることを mRNA やタンパクのレベルで明らかにし、かつ ARID1A 遺伝子の変異率を解析する。次に、ADAR1 の発現量と ARID1A 遺伝子の A → G 変異との相関を調べる。

(2) 内膜症モデルマウスを用いた研究

卵巣を摘出したマウスにエストロゲンを投与した後、その子宮内膜を別に卵巣を摘出したレシピエントマウスの腹腔に移植したのちエストロゲンを投与し続けることにより子宮内膜症モデルを作成する。この時の ADAR1 の発現誘導を前項と同様にして解析する。次に、ADAR1 過剰発現マウス (トランスジェニックマウス: 作製済み) を用いて、子宮内膜症モデルを作成し、内膜症細胞における ARID1A 遺伝子や他の癌遺伝子の変異率を解析するとともに、悪性化への進展が見られることを明らかにする。



申請者はこれまでの研究により、RNA 編集酵素である ADAR1 がゲノム DNA に A → G 変異を誘導することを、培養細胞への遺伝子導入やトランスジェニックマウスを用いて明らかにした。さらに、ADAR1 のコンディショナル欠損マウスをもちいて、B リンパ球でみられる抗体遺伝子への体細胞突然変異の導入が著しく減少することも見出している。そして、様々な細胞において ADAR1 遺伝子が INF- γ などの炎症性サイトカインの刺激で発現誘導されることから、子宮内膜症からの発がんに関与するとされる ARID1A 遺伝子の変異が ADAR1 よると仮説した点に特色がある。このように組織の炎症が RNA 編集酵素とである ADAR1 遺伝子の発現を誘導し、その結果 ARID1A 遺伝子のゲノム DNA に変異が誘導され、子宮内膜症からがんが発生するという仮説は、独自の研究と着想に基づくものであり独創的である。

この研究によって、「子宮内膜症 炎症 がん」の係わりが ADAR1 を介させることで、より明らかになる点に特色がある。最近では、「内膜症 出血 Fe 蓄積 酸化ストレス 慢性炎症 がん」というスキームが注目され

ているが、今回の研究はこれに合致するものであり、発がん機序の解明に向けて新しい概念を提示する点にも特色がある。

また、本研究成果は「非ステロイド性消炎剤や黄体ホルモン投与が、炎症反応の抑制を介して ADAR1 を低下させる、ひいては発がん抑制に繋がる」という展開に発展する可能性が高い点で臨床的意義も大きい。

2. 研究の目的

子宮内膜症では、明細胞癌の合併が多い。最近、明細胞癌に ARID1A 遺伝子の変異が高率にみられることが報告されたが、その変異導入メカニズムは明らかではない。申請者らは、RNA 編集機能をもつ Adenosine deaminase acting on RNA1 (ADAR1) が様々な細胞において IFN の刺激により発現誘導され、かつゲノム DNA に A G 突然変異を誘導することを明らかにした。子宮内膜症では、炎症により ADAR1 発現が亢進していると推定され、この発現亢進した ADAR1 が、ARID1A 遺伝子に変異を導入している可能性がある。

そこで本研究では、子宮内膜症患者組織を用いて、ADAR1 の発現が亢進していることや、この亢進と ARID1A 遺伝子の変異率が相関することを明らかにする。

3. 研究の方法

すでに保存されている臨床検体・細胞株を用い、ヒト正常子宮内膜・子宮内膜症・明細胞癌細胞での ADAR1 の mRNA および蛋白の発現を解析する。さらに、ADAR1 の発現と子宮内膜症からの発がんに関与するとされる ARID1A 遺伝子や他の癌遺伝子のゲノム DNA 変異との相関を明らかにする。

4. 研究成果

患者検体の子宮内膜症および明細胞癌細胞において ADAR1 の mRNA および蛋白の発現をリアルタイム PCR 法およびウエスタンブロット法で解析した。その結果、正常子宮内膜組織と比較して亢進している傾向があることを明らかにした。

患者検体の子宮内膜症および明細胞癌細胞において ARID1A、PTEN、c-myc、ras、p53 遺伝子変異を light cycler を用いた遺伝子増幅物の Tm 解析による遺伝子変異の検索とシーケンスによる確認をおこなった。その結果、ADAR1 の発現が多い細胞において c-myc、

ARID1A において体細胞突然変異の頻度が多い傾向があることが明らかになった。

ADAR1 の発現ベクターを作製し、マウス胎児線維芽細胞 (Mouse Embryonic Fibroblast: MEF) に導入した。

その結果、

- 1) ARID1A、c-myc に体細胞突然変異が導入されること、
 - 2) これらの細胞において、DNA 二本鎖節端の指標になる γ -H2AX の発現が亢進していること、
- を明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Metformin potentiates the anticancer effects of cisplatin under normoxic conditions in vitro. Uehara T, Mitsuhashi A, Tsuruoka N, Shozu M. Oncol Rep. 2015 Feb;33(2):744-50. doi: 10.3892/or.2014.3611. Epub 2014 Nov 21 (査読あり)

免疫グロブリンの体細胞高頻度突然変異と adenosine deaminase acting on RNA 1. 鶴岡信栄. 臨床免疫・アレルギー科 61(5), 480-488, 2014-05 (査読あり)

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鶴岡 信栄 (TSURUOKA, Nobuhide)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50375763

(2) 研究分担者

該当なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし

研究者番号：