

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04663

研究課題名(和文) RNA編集とマイクロRNA制御を考慮した高次エピジェネティック薬物代謝制御の解明

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of drug metabolism via RNA editing and microRNA

研究代表者

中島 美紀 (Nakajima, Miki)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：70266162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：アデノシンがイノシンに変換されるRNA編集によって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。ヒト肝組織において、RNA編集を担う酵素ADAR1の発現量に220倍の大きな個人差が存在した。種々の薬物代謝酵素を誘導する転写因子AhRがRNA編集を受けることによりmiR-378結合配列が創出されて発現抑制が起こり、その下流遺伝子であるCYP1A1の発現誘導が影響を受けていること、葉酸代謝を担うDHFRがRNA編集を受けることでmiR-25およびmiR-125a-3p結合配列が喪失するために発現量が増加し、抗がん薬メトトレキサートへの応答性が変化することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We found that there is a large interindividual variability in ADAR1 expression in the human liver. We identified multiple A-to-I RNA editing sites in the 3'-UTR of AhR mRNA in the human liver. Knockdown of ADAR1 by siRNA in hepatoma cells resulted in the increase of AhR protein and CYP1A1 induction. This phenomenon was owing to the fact that miR-378-dependent down-regulation of AhR was abolished by ADAR1 knockdown. Next, we found multiple A-to-I RNA editing sites in the 3'-UTR of DHFR mRNA in the human breast tissue. The knockdown of ADAR1 by siRNA in breast cancer cells resulted in the decrease of DHFR protein. That was due to the creation of binding sites of miR-25 and miR-125-3p. The decreased level of DHFR protein increased the response to methotrexate, an DHFR inhibitor which is used for treatment of cancers. In summary, we could demonstrate that A-to-I RNA editing post-transcriptionally regulates pharmacokinetics and pharmacodynamics.

研究分野：薬物代謝学

キーワード：薬物応答性 個人差 転写後調節 RNA編集 マイクロRNA

## 1. 研究開始当初の背景

薬の効果や副作用の個人差は、体内動態に大きな役割を果たす薬物代謝酵素活性の個人差に起因することが多い。薬物代謝酵素の発現調節については、常在的発現を調節する転写因子や発現誘導に関与する核内レセプターなどの情報がかなり蓄積されてきた。しかし、mRNAの発現量と蛋白質の発現量に相関が認められない例もあり、発現量の差を転写調節のみでは説明できない。申請者は、薬物代謝酵素の発現がmicroRNA (miRNA) によって転写後調節されていることを先駆的かつ継続的に報告してきた。

近年、転写後調節機構としてのRNA編集が注目されるようになってきた。ほ乳類における主なRNA編集はA-to-I RNA編集(アデノシンからイノシンへの変換)であり、adenosine deaminase acting on RNAs (ADAR)によって触媒される。この変換により、コードされるアミノ酸が変化したり、スプライシングまたはmRNA安定性が変化したりすることで当該遺伝子産物の機能変動をもたらすことが示されている。しかし、RNA編集部位は非翻訳領域(untranslated region, UTR)がほとんどであることから、3'-UTRに結合して発現を抑制するmiRNAとの関わりを考慮する必要がある。A-to-I RNA編集は疾患の発症に関わっているものもあり、生体に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつあるが、肝臓におけるRNA編集の意義は明らかになっていない。また、A-to-I RNA編集は二本鎖構造のRNAで生じることから、miRNAの前駆体であるpre-miRNA上で起こり、成熟型miRNAの発現量を変化させたり、標的遺伝子への結合性を変化させたりする可能性が考えられる。しかし、miRNA機能を左右するRNA編集の役割も未解明の点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究では、miRNAによる発現調節機構を考慮しつつ、A-to-I RNA編集が薬物代謝能および薬物応答性の変動要因となっている可能性を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト肝臓中のADAR発現量の解析

ヒトにおける機能的ADAR分子種にはADAR1とADAR2の2種類存在する。正常ヒト肝臓試料28サンプルからホモジネートを調製し、ADAR1とADAR2のタンパク質発現量をウェスタンブロットにより解析した。

### (2) ADARノックダウンによる標的遺伝子の発現変化

ADAR1またはADAR2に対するsiRNAを細胞株に導入し、解析対象のタンパク質発現の変化

をウェスタンブロットにより評価した。

### (3) RNA編集の評価

mRNA上でRNA編集が起こっているかどうか、当該領域をRT-PCRにより増幅し、ダイレクトシーケンス解析を行った。ゲノムDNAを鋳型としたPCR産物の塩基配列と比較することで、RNA編集部位かどうか判定した。編集の程度は、アデノシンとグアノシン(編集後のイノシンはグアノシンとして認識されるため)のピーク高比から算出した。

## 4. 研究成果

### (1) 正常ヒト肝臓中 ADAR 発現量の個人差

正常ヒト肝臓組織にはADAR2タンパク質はほとんど発現していない一方で、ADAR1タンパク質は常在的に発現していることが示された。また32サンプル中でADAR1タンパク質発現量に220倍もの大きな個人差が認められることを明らかにした。

### (2) AhR の RNA 編集と CYP1A1 誘導能への影響

ヒト肝がん由来HepG2細胞にADAR1に対するsiRNA (siARAR1)を導入した時、薬物代謝酵素の発現調節を担うaryl hydrocarbon receptor (AhR)タンパク質発現量が有意に増加することを明らかにした。この時、AhR mRNAには変化が認められなかったことから、転写後調節が関わっていることが示唆された。AhR mRNAのシーケンス解析を行ったところ、3'-UTRに38箇所のRNA編集部位があることが明らかになった。RNA編集を受けることによりmiR-378の結合配列が創出され、AhRはmiR-378による転写後調節を受けるが、siADAR1により編集が妨げられることによりmiR-378による発現抑制が解除されることが、AhR発現量増加の原因となっていることを明らかにした。また、興味深いことに、ADAR1ノックダウンによるAhRの発現増加は、その下流遺伝子であるCYP1A1の誘導能の増加をもたらすことを明らかにした(図1, 2)。

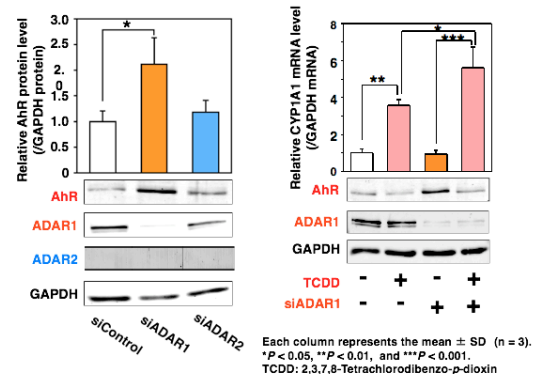


図1. ADAR1のノックダウンによるAhRタンパク質発現量およびCYP1A1誘導能の増加

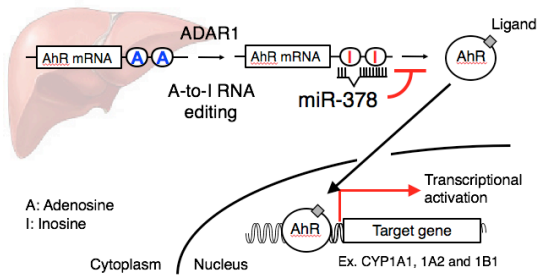


図2. AhRの3'-UTRにおけるRNA編集:miR-378結合配列の創出を介したAhR発現量の変化とその下流遺伝子への影響

### (3) DHFR の RNA 編集とメトトレキサート感受性への影響

Dihydroforate reductase (DHFR)は葉酸代謝を担う酵素である。ヒト乳がん由来MCF-7細胞にADAR1に対するsiRNA (siADAR1)を導入した時、DHFRタンパク質発現量が有意に減少することを明らかにした。DHFR mRNAのシークエンス解析を行ったところ、3'-UTRがRNA編集を受けていることが示された。RNA編集を受けることによりmiR-25およびmiR-125a-3pの結合配列が消失し、DHFR発現が亢進する状態となるが、siADAR1によりRNA編集が妨げられるとmiRNAsによる発現抑制が増強されることが、DHFR発現量減少の原因となっていることを明らかにした(図3)。

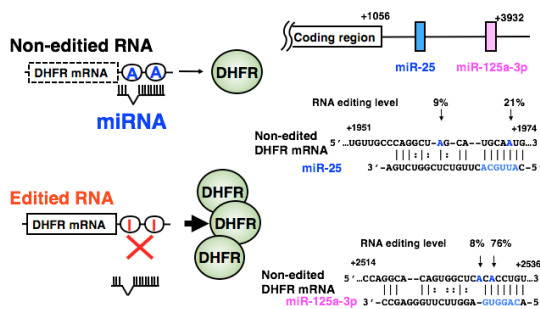


図3. DHFRの3'-UTRにおけるRNA編集:miR-25およびmiR-125a-3の結合配列の喪失を介したDHFR発現量の変化

興味深いことに、MCF-7細胞の増殖能はメトトレキサート処置により抑制されるが、ADAR1ノックダウンによりRNA編集を抑制した状態では、DHFRの発現低下により、メトトレキサートに対する感受性が増加することを明らかにした(図4)。

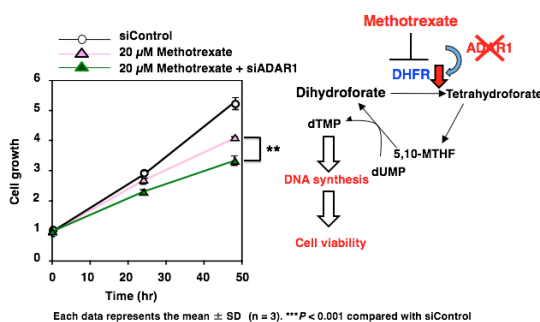


図4. ADAR1のノックダウンによるDHFRタンパク質発現量の減少およびメトトレキサートに対する感受性の亢進

## 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4件)

- ① Nakano M, Nakajima M. Current knowledge of microRNA-mediated regulation of drug metabolism in humans. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, in press (2018), doi: 10.1080/17425255.2018.1472237, 査読有
- ② Nakano M, Nakajima M. Significance of A-to-I RNA editing of transcripts modulating pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacol. Ther.*, 181:13-21 (2018), doi: 10.1080/17425255.2018.1472237, 査読有
- ③ Nakano M, Fukami T, Gotoh S, Nakajima M. A-to-I RNA editing up-regulates human dihydroforate reductase in breast cancer. *J. Biol. Chem.*, 292: 4873-4884 (2017), doi: 10.1074/jbc.M117.775684, 査読有
- ④ Nakano M, Nakajima M. RNA editing modulates human hepatic aryl hydrocarbon receptor expression by creating microRNA recognition sequence. *J. Biol. Chem.*, 291: 894-903 (2016), doi: 10.1074/jbc.M115.699363, 査読有

[学会発表] (計13件)

- ① 瀧澤雅, 中野正隆, 深見達基, 中島美紀, 喫煙によるRNA編集酵素ADAR1の発現低下が参加ストレス応答に与える影響, 日本薬学会第138年会, 2018年3月26日, 石川県立音楽堂(金沢)
- ② 野崎香於利, 中野正隆, 深見達基, 中島美紀, RNA編集が薬物代謝型ヒトCYP各分子種に与える影響, 日本薬学会第138年会, 2018年3月26日, 石川県立音楽堂(金沢)
- ③ Nakano M, Fukami T, Nakajima M, Human CAR is post-transcriptionally regulated by A-to-I RNA editing, 日本薬物動態学会第32回年会, 日本薬物動態学会第32回年会, 2017年11月29日, タワーホール船堀(東京)
- ④ Kishimoto S, Nakano M, Fukami T, Nakajima M, Effects of A-to-I RNA editing on the expression and function of human cytochrome b5, 日本薬物動態学会第32回年会, 2017年11月29日, タワーホール船堀(東京)
- ⑤ Nakajima M, Nakano M, Post-transcriptional regulation of PK/PD-associated genes by A-to-I RNA editing, 20th International Conference on Cytochrome P450, 2017年8月27日, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Germany)

- ⑥ Nozaki K, Nakano M, Fukami T, Nakajima M, Effects of knockdown of RNA editing enzymes, ADARs on P450s expression in human liver cells, 20th International Conference on Cytochrome P450, 2017年8月27日, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Germany)
- ⑦ 中島美紀, 薬物応答性を制御する A-to-I RNA 編集, 日本薬物動態学会第31回年会, 2016年10月13日, キッセイホール (松本)
- ⑧ Nakano M, Fukami T, Gotoh S, Nakajima M, Effects of RNA editing on dihydroforate reductase expression in breast cancer, 日本薬物動態学会第31回年会, 2016年10月13日, キッセイホール (松本)
- ⑨ Nakajima M, Impact of RNA editing on microRNA function and drug-metabolizing enzymes, 20th Microsomes and Drug Oxidation, 2016年10月2日, University of California, Davis (USA)
- ⑩ Nakano M, Fukami T, Gotoh S, Nakajima M, RNA editing modulates human dihydroforate reductase expression in breast cancer, 20th Microsomes and Drug Oxidation, 2016年10月2日, University of California, Davis (USA)
- ⑪ 中野正隆, 深見達基, 後藤紗希, 中島美紀, RNA 編集に着目した薬物代謝関連遺伝子の転写後調節機構の解明, 日本薬学会第136年会, 2016年3月26日, パシフィコ横浜 (横浜)
- ⑫ Nakano M, Fukami T, Gotoh S, Nakajima M, Effects of RNA editing on human P450 expression, 第30回日本薬物動態学会, 2015年11月12日, タワーホール船堀 (東京)
- ⑬ 中野正隆, 深見達基, 後藤紗希, 中島美紀, RNA 編集による miR-378 認識配列形成を介したヒト AhR 発現制御, 第7回日本 RNAi 研究会, 2015年8月29日, グランドプリンスホテル広島 (広島)

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~taisha/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中島 美紀 (NAKAJIMA Miki)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：70266162

### (2) 分担研究者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし

### (4) 研究協力者

中野正隆 (NAKANO Masataka)