

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06269・19K21361

研究課題名(和文) 口腔がん悪性化におけるRNA編集酵素ADAR1の意義解明

研究課題名(英文) Roles of A-to-I RNA editing enzyme ADAR1 in malignant properties of human oral cancer cells

研究代表者

坂田 健一郎 (SAKATA, KENI-CHIRO)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：10826051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：RNA編集酵素ADAR1はRNAに変異を挿入する酵素のため、タンパク質変異体を作り出す。ADAR1は炎症刺激により発現が誘導されることから、「口腔がんではRNA編集が増加し、腫瘍の悪性化を引き起こす」という仮説を立てた。研究成果として口腔がん細胞にてADARの発現を確認した。ゴルジ体から小胞体へのタンパク質の逆輸送を担うCOPAタンパク質が腫瘍悪性化を引き起こすと考えた。COPAタンパクのRNA編集についても解析、一定の割合でRNA編集が生じることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔がんは、進行した病態で発見されることが多く、進展症例に対する分子標的薬も限られており、新たな薬の開発が望まれている。RNA編集は、酵素反応のため可逆的かつ短時間で生じ、がん細胞の多様性や、がん細胞集団の迅速なストレス応答を説明できるため、注目を集めている。口腔がんにおけるRNA編集の一役割を解明することで、新規治療薬の開発が期待される。上記を解明することにより、外科的切除により大きく失われる口腔機能(発音、咀嚼、整容性、嚥下など)を損なうことが防げると期待する。

研究成果の概要(英文)：The RNA editing enzyme ADAR1 is an enzyme that inserts mutations in RNA, and thus produces protein mutants. Since the expression of ADAR1 is induced by irritation, we hypothesized that RNA editing increases in oral cancer and causes malignant transformation of the tumor.

As a result of our research, we confirmed the expression of ADAR in oral cancer cells. We also analyzed the RNA editing of the COPA protein, which was thought to cause the tumor malignant transformation by the COPA protein responsible for the reverse transport of protein from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum, and confirmed that RNA editing occurs at a certain rate.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔がん RNA編集 ADAR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮がん(口腔がん)は、進行した病態で発見されることが多く、進展症例に対する分子標的薬も EGFR 阻害剤があるだけで、新たな薬の開発が望まれている。RNA 編集酵素 ADAR1 は RNA に変異を挿入する酵素であり、発現量に依存して、タンパク質変異体を作り出す。申請者は、頭頸部がんで ADAR1 が高発現し、RNA 編集頻度が高いと生存率は低下するという報告から、口腔がんと ADAR1 の関係性に着目した。ADAR1 は二本鎖 RNA のアデノシン(A)をイノシンへと変換する酵素である。イノシン(I)は翻訳時にグアノシン(G)として認識されるため、RNA 編集を受けた RNA は、タンパク質翻訳時にアミノ酸置換を生じる(図1)。従って RNA 編集は、RNA レベルの点突然変異又は一塩基多型と捉えることができる。RNA 編集は、酵素反応のため可逆的かつ短時間で生じ、がん細胞の多様性や、がん細胞集団の迅速なストレス応答を説明できるため、注目を集めている。ADAR1 は頭頸部がんにおいて高発現し(Han L ら, *Cancer Cell*, 2015)、RNA 編集頻度が高いと生存率は低下する(Paz-Yaacov N ら, *Cell Rep*, 2015)。また RNA 編集は、頭頸部がんのうち HPV 陰性のグループで高くなっている。これらの報告は、口腔扁平上皮がん(口腔がん)における ADAR1 の重要性を示唆しているが、口腔がんにおける ADAR1 の腫瘍生物学的意義はいまだ不明である。

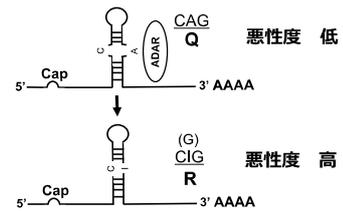


図1 RNA編集によるタンパク質変異

2. 研究の目的

口腔は他の臓器と比べ、熱、アルコール、炎症といったストレスに頻繁に晒される。ADAR1 は炎症刺激により発現が誘導されることから、「口腔がんでは RNA 編集が増加し、腫瘍の悪性化を引き起こす」と考え、「口腔がん悪性化に RNA 編集酵素 ADAR1 が関与する」という仮説を立証することにある。

3. 研究の方法

(1) 口腔がん組織標本における ADAR1 の免疫染色

口腔がんの組織切片を、抗 ADAR1 抗体を用いて免疫染色する。腫瘍組織における ADAR1 発現細胞の同定、正常組織との発現量比較を行う。

(2) ADAR1 欠損細胞株の樹立

口腔がんのリンパ節高転移細胞株 HSC-3-M3 を用いて、ゲノム編集法により ADAR1 遺伝子欠損細胞株を樹立する。

(3) 口腔がん細胞株における ADAR1 基質 RNA の同定

2. で樹立した細胞株に 1xFLAG-ADAR1 を遺伝子導入し、抗 FLAG 抗体を用いて RNA-タンパク質複合体を免疫沈降し、次世代シーケンスにより基質 RNA を解析する。

(4) *In vitro* アッセイを用いた悪性化関連 RNA 編集の同定

3 で明らかにした RNA を、2 で樹立した細胞株に過剰発現させ、細胞増殖能 (MTT Assay)、運動能 (Wound Healing Assay)、浸潤能 (Matrigel Invasion Assay) を解析する。

(5) 口腔がん組織標本における野生型、及び RNA 編集型タンパク質の発現解析

口腔がん組織標本を用いて、正常粘膜組織、前癌病変組織、口腔がん組織間で、RNA 編集型と野生型を識別する抗体を用いて発現を検討する。

4. 研究成果

<口腔癌と ADAR>

条件の異なる細胞培養液を用いて、ADAR1 および ADAR2 の発現を PCR で確認した(Fig1)。ゴルジ体から小胞体へのタンパク質の逆輸送を担う COPI 複合体構成分子の1つである COPA タンパク質が腫瘍悪性化を引き起こす可能性があると考え、RNA 編集についても解析した(Fig2)。

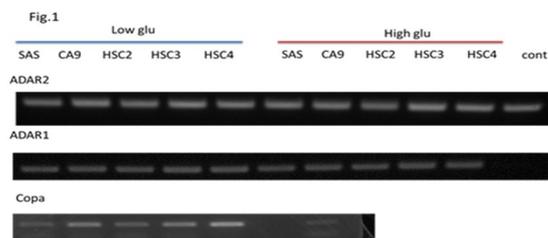
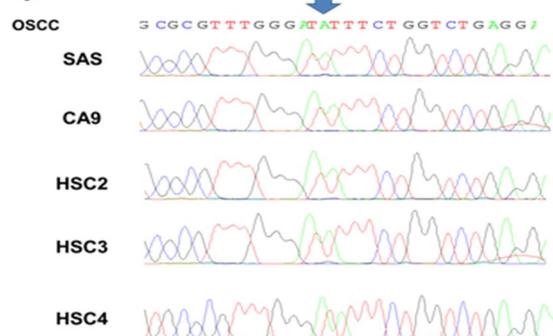


Fig.2



<悪性中皮腫と ADAR2>

悪性中皮腫における腫瘍悪性化因子の研究を行った際、ADAR のファミリータンパク質である ADAR2 が、腫瘍細胞の増殖、運動、および浸潤に重要なことを明らかにし、*Anticancer Res.* 2020 Mar にアクセプトされた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 SAKATA KEN-ICHIRO, MAEDA KOJIRO, SAKURAI NOZOMI, LIANG SHANSHANG, NAKAZAWA SEITARO, YANAGIHARA KAZUYOSHI, KUBO TAKANORI, YOSHIYAMA HIRONORI, KITAGAWA YOSHIMASA, HAMADA JUN-ICHI, IIZASA HISASHI	4. 巻 40
2. 論文標題 ADAR2 Regulates Malignant Behaviour of Mesothelioma Cells Independent of RNA-editing Activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1307 ~ 1314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.14072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 NAKAZAWA Seitaro, SAKATA Ken-ichiro, LIANG Shanshan, YOSHIKAWA Kazuhito, IIZASA Hisashi, TADA Mitsuhiro, HAMADA Jun-ichi, KASHIWAZAKI Haruhiko, KITAGAWA Yoshimasa, YAMAZAKI Yutaka	4. 巻 40
2. 論文標題 Dominant-negative p53 mutant R248Q increases the motile and invasive activities of oral squamous cell carcinoma cells 	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 37 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.40.37	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 Sakata KI, Maeda K, Sakurai N, Liang S, Nakazawa S, Yanagihara K, Kubo T, Yoshiyama H, Kitagawa Y, Hamada JI, Iizasa H.	4. 巻 40
2. 論文標題 ADAR2 Regulates Malignant Behaviour of Mesothelioma Cells Independent of RNA-editing Activity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ANTICANCER RESEARCH	6. 最初と最後の頁 1307-1314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.21873/anticanres.14072.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Seitaro Nakazawa, Ken-ichiro Sakata, Shanshan Liang, Kazuhito Yoshikawa, Hisashi Iizasa, Mitsuhiro Tada, Jun-ichi Hamada, Haruhiko Kashiwazaki, Yoshimasa Kitagawa, Yutaka Yamazaki.	4. 巻 40
2. 論文標題 Dominant-negative p53 mutant R248Q increases the motile and invasive activities of oral squamous cell carcinoma cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 37-49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2220/biomedres.40.37	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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