

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08922

研究課題名(和文)ステロイド産生細胞における環状構造RNAの意義の解明

研究課題名(英文)Elucidating the significance of circular RNAs in steroid hormone-producing cells

研究代表者

田中 智子 (Tanaka, Tomoko)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：10380528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、次世代シーケンサーによる配列解析から、直鎖状RNAだけでなく環状構造をもつ機能性RNAの存在が明らかにされている。核内受容体NR5A1(別名Ad4BP/SF-1)は、ステロイドホルモン産生の主要な調節因子であり、副腎皮質癌においては、NR5A1の発現量が多いほど、予後が悪い。私達は副腎皮質癌細胞株では検出されず、正常副腎皮質にのみ存在するNR5A1環状RNAを見出した。NR5A1環状RNAが生じる過程や、機能は不明である。本研究では、ステロイド産生調節における環状RNAの意義についてNR5A1に着目して解析し、機能性環状RNAが制御する副腎ステロイド産生メカニズム解明に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

副腎皮質癌は希少な癌で難治性である。本邦における副腎偶発腫瘍3,678例中1.4%にみられ、5年生存率は35-50%と予後不良である。副腎皮質癌においては、NR5A1の発現量が多いほど、予後が悪いとされる。本研究の結果、環状RNAはNR5A1の発現調節に関与しており、副腎腫瘍と正常副腎では、NR5A1環状RNAに違いがあることが明らかになった。NR5A1環状RNAと副腎腫瘍の病態像について解析を進めることで副腎腫瘍の治療法の開発や機序の解明に役立つ。

研究成果の概要(英文)：Recently, sequence analysis of gene transcripts by next-generation sequencers has revealed the presence of functional RNAs with circular structures besides linear RNA. The nuclear receptor NR5A1 (also known as Ad4BP/SF-1) is an essential regulator of steroid hormone production and is present in the nuclei of the normal adrenal cortex and adrenal tumor cells. In adrenocortical carcinomas, the higher the expression of NR5A1, the worse the prognosis. We found a circular NR5A1 RNA (NR5A1 circRNA) not detected in adrenocortical carcinoma cell lines but only in the normal adrenal cortex. Circular RNAs are structurally stable molecules, making them a potential novel biomarker. The making process of NR5A1 circRNA and its function is still unknown. In this study, we analyzed the significance of cyclic RNAs in steroidogenesis, focusing on NR5A1 circRNA, and elucidated the mechanism of adrenal steroidogenesis regulated by functional circular RNAs.

研究分野：内分泌学 分子生物学

キーワード：環状RNA 副腎 ステロイドホルモン NR5A1

1. 研究開始当初の背景

一部の植物で見られる現象と考えられてきた環状構造の RNA (図 1) は、ヒト細胞においても存在することが証明され、microRNA やリボソーム結合タンパクと結合することで、遺伝子の転写調節に関わっている (Menczak S. *et al. Nature* **495**, 2013, Hansen T.B. *et al. Nature* **495**, 2013)。癌細胞において、環状 RNA は、癌遺伝子を分解する miRNA をスポンジのように吸着して、癌遺伝子の発現を増加させて、癌を増悪させたり、一方で、細胞周期複合体タンパクと直接結合して、細胞周期の進行をブロックし、癌化に対して抑制的に作用する (Anastasiadou E. *et al. Nature Reviews Cancer* **18**, 2018)。

核内受容体 NR5A1 は、ほぼすべてのステロイド産生酵素の発現を転写レベルで調節し、副腎・性腺の発生に不可欠な遺伝子である。NR5A1 は正常副腎皮質、副腎腺腫および多くの副腎皮質癌細胞の核に存在する。副腎皮質癌は希少な癌で難治性である。本邦における副腎偶発腫瘍 3,678 例中 1.4% にみられ、5 年生存率は 35-50% と予後不良である (一城貴政, 上芝元: 本邦における 5 年間の継続的副腎腫瘍疫学調査-厚生労働省研究補助金難治性疾患克服研究事業 副腎ホルモン産生異常に関する調査研究, 平成 16 年度研究報告書)。副腎皮質癌においては、NR5A1 の発現量が多いほど、予後が悪い (Sbiera S. *et al. J Clin Endocrinol Metab* **95**, 2010)。

私達は、副腎皮質癌細胞株 H295R を用いた研究で、薬剤によって NR5A1 を低下させることに成功した。スプライシング修飾剤によってスプライシング異常が生じて、短い NR5A1 アイソフォームが作られるため、全長 NR5A1 が低下し、ステロイド産生が抑制されることを明らかにした。また、このスプライシング修飾剤によって、NR5A1 exon2 と exon4 とが連結した環状 circNR5A1ex2-4 が生じた。さらに、副腎皮質癌細胞株では検出されないが、正常副腎皮質においてのみ検出される NR5A1 環状 RNA (circNR5A1ex6-1) を発見した (図 2)。

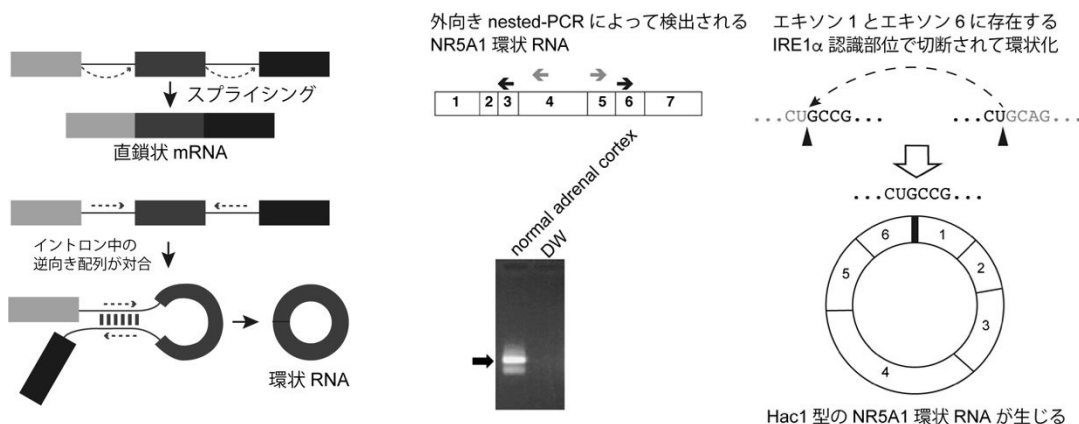


図 1) 環状 RNA の一例
Backsplicing と呼ばれるスプライシングによって生じる環状 RNA

図 2) 正常副腎皮質に発現する NR5A1 環状 RNA の検出 (左) と構造 (右)

2. 研究の目的

環状構造の NR5A1 RNA は、ステロイド産生やステロイド産生細胞の増殖に関与していると推定されるが、NR5A1 環状 RNA がつくられる過程や、その機能は不明である。そのため、ステロイド産生調節における環状 RNA の意義について NR5A1 環状 RNA を主軸に解析し、機能性環状 RNA が制御する副腎ステロイド産生メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

環状 RNA 発現用プラスミド (Liang D. and Wilusz J.E. *Gene & Development* **28**, 2014) を add gene より入手し、逆向き繰返し配列の間に、NR5A1 cDNA の exon2 と exon4 領域を挿入し exon2 の 5' 末端と exon4 の 3' 末端が連結した環状 RNA を発現するプラスミドベクターを構築した。ヒト副腎皮質癌細胞株 H295R 細胞への遺伝子導入を行い、NR5A1 やステロイド合成酵素の発現量に対する影響を qPCR にて解析した。

4. 研究成果

ヒト副腎癌細胞株 H295R に NR5A1 環状 RNA である circNR5A1ex2-4 を過剰発現させた。NR5A1 のエキソン 2 と 3 のジャンクションを挟むプライマーで qPCR すると NR5A1 exon2-3 の発現量は、ctrl と比べて増加したが、NR5A1 のエキソン 6 と 7 のジャンクションを挟むプライマーで qPCR

を行ったところ、ctrl と比べて *NR5A1* の発現量が低下した (図 3)。 *NR5A1 ex2-3* の発現増加は、プラスミドベクターによる環状 RNA *circNR5A1ex2-4* の発現増加によるものと考えられ、この環状 RNA は *NR5A1* の発現を低下させる作用があることが明らかになった。

環状 RNA の過剰発現下では、*STAR*、*CYP11A1* は発現増加したのに対し、*CYP21A2*、*CYP11B1* は発現低下し、*CYP17A1* と *CYP11B2* は変化しなかった。

STAR と *CYP11A1* の発現上昇は *NR5A1* の発現低下との乖離があるため、*NR5A1* 環状 RNA によって *NR5A1* 以外の転写調節機序が活性化された可能性が考えられる。

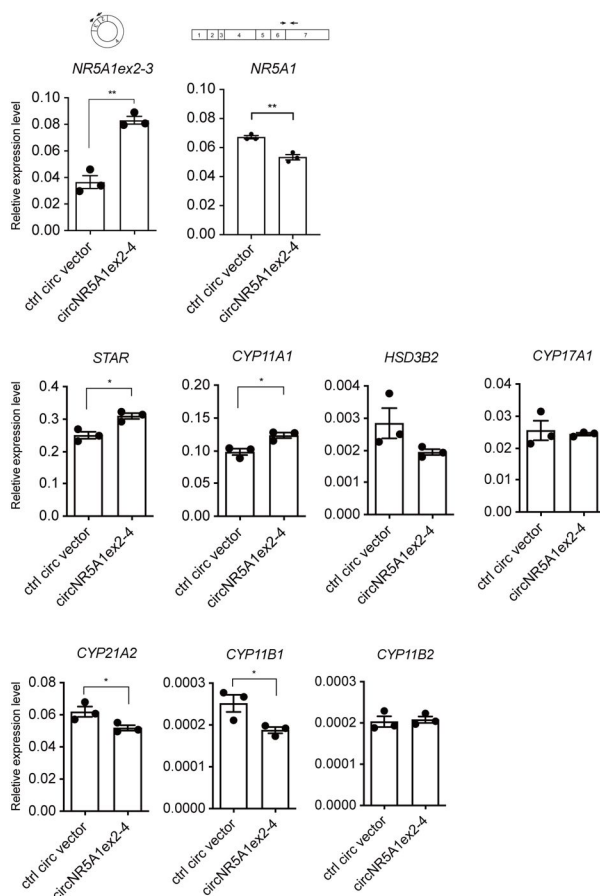


図 3) 環状 RNA *circNR5A1ex2-4* の過剰発現によるステロイド合成酵素の発現量の変化。
ACTB を内因性コントロールとした。

副腎腫瘍検体と付随して得られた正常副腎部より、total RNA を調整して、*NR5A1* の環状 RNA について解析するため、*NR5A1* の exon 4 上に外向きプライマーをデザインし、RT-PCR を行った。ほぼすべての検体において腫瘍部と正常組織とで PCR 産物の泳動パターンが異なるという結果が得られた。このことから、副腎腫瘍部と正常組織では異なる *NR5A1* の環状 RNA が発現している。褐色細胞腫に付随した正常副腎と試薬メーカーから購入した正常副腎では、800 bp 付近に単一のバンドを認めることから、正常副腎特異的に exon4 を含んだ環状 RNA が存在している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 大江 賢治, 堀田 裕太, 田中 智子	4. 巻 53巻1号
2. 論文標題 副腎皮質癌治療の標的分子としての核内受容体NR5A1(SF-1/Ad4BP)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 糖尿病・内分泌代謝科	6. 最初と最後の頁 85-89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 田中智子、大江賢治	4. 巻 47
2. 論文標題 ヒト副腎皮質に発現しているIREタイプの新規環状RNAの発見	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 117-118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Abe Ichiro, Tanaka Tomoko, Ohe Kenji, Fujii Hideyuki, Nagata Mai, Ochi Kentaro, Senda Yuki, Takeshita Kaori, Koga Midori, Kudo Tadachika, Enjoji Munechika, Yanase Toshihiko, Kobayashi Kunihisa	4. 巻 6
2. 論文標題 Inhibition of NR5A1 Phosphorylation Alleviates a Transcriptional Suppression Defect Caused by a Novel <i>NR0B1</i> Mutation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the Endocrine Society	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/jendso/bvac068	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 -

1. 著者名 Yoshihiro Harada, Tomoko Tanaka, Yuriko Hamaguchi, Yuta Horita, Masayoshi Mori, Yusuke Murata, Munechika Enjoji, Kenji Ohe	4. 巻 10
2. 論文標題 Metformin affects alternative splicing of the estrogen receptor alpha gene in breast cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Pharmacy and Health Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Aoyagi Chikao, Tanaka Tomoko, Haga Nobuhiro, Yanase Toshihiko, Kodama Shohta	4. 巻 0
2. 論文標題 Differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells into steroidogenic cells by adenovirus-mediated overexpression of NR5A1 and implantation into adrenal insufficient mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cytotherapy	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcyt.2023.04.002	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 -

〔学会発表〕 計14件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 田中智子、前田幸彦、大江賢治、小玉正太
2. 発表標題 MIN6細胞においてスプライシング操作薬が誘導するPax6スプライシングバリエント
3. 学会等名 第95回 日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中智子、青柳力夫、柳瀬敏彦、小玉正太
2. 発表標題 ヒト脂肪由来間葉系幹細胞からステロイド産生細胞への分化誘導と副腎不全モデルへの移植
3. 学会等名 第22回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 原田 義広, 田中 智子, 大江 賢治
2. 発表標題 低濃度メトホルミンによるエストロゲン受容体アルファ選択的スプライシングのタモキシフェン反応性変化
3. 学会等名 第80回 日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田幸彦, 田中智子, 大江賢治, 小玉正太
2. 発表標題 MIN6細胞においてスプライシング操作薬が誘導するPax6スプライシングバリエント
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tanaka T, Aoyagi C, Yanase T and Kodama S
2. 発表標題 Implantation of Steroidogenic Cells Derived from Human Adipose-derived Stem Cells Extends Survival in a Mouse Model of Adrenal Insufficiency
3. 学会等名 ENDO2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中智子
2. 発表標題 ホルモン依存性がん、副腎癌の新たな展開 副腎皮質癌の新規治療標的としてのNR5A1の複数エキソン除外制御機構
3. 学会等名 第93回 日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中智子, 大江賢治, 小玉正太, 柳瀬敏彦
2. 発表標題 NR5A1 RNAのスプライシング調節を介したNR5A1発現抑制: 各種薬剤の検討
3. 学会等名 第93回 日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中智子、青柳力夫、柳瀬敏彦、小玉正太
2. 発表標題 NR5A1誘導性ステロイド産生細胞の移植による副腎不全モデルのレスキュー
3. 学会等名 第20回 日本再生医療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀田 裕太, 田中 智子, 森 征慶, 村田 雄介, 遠城寺 宗近, 大江 賢治
2. 発表標題 スプライシング操作薬による副腎皮質癌におけるSRSF4機能抑制の検討
3. 学会等名 日本薬学会 第142回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田幸彦, 田中智子, 大江賢治, 小玉正太
2. 発表標題 MIN6細胞においてスプライシング操作薬が誘発するPax6のエクソンスキッピング
3. 学会等名 日本薬学会 第142回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原田 義広, 大江 賢治, 田中 智子, 森 征慶, 村田 雄介, 遠城寺 宗近
2. 発表標題 メトホルミンによる乳癌細胞の選択的スプライシングとタモキシフェン抵抗性への影響
3. 学会等名 日本薬学会 第140回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀田 裕太, 大江 賢治, 原田 義広, 村田 雄介, 遠城寺 宗近, 田中 智子, 柳瀬 敏彦
2. 発表標題 IRE型環状RNAの発見
3. 学会等名 日本薬学会 第140回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀田 裕太, 田中 智子, 森 征慶, 村田 雄介, 遠城寺 宗近, 柳瀬 敏彦
2. 発表標題 副腎皮質癌細胞株H295Rに対するCX-4945の効果はSRSF4を介したNR5A1の異常スプライシングに起因している
3. 学会等名 第30回日本ステロイドホルモン学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 堀田 裕太, 大江 賢治, 田中 智子, 森 征慶, 村田 雄介, 遠城寺 宗近, 大江 賢治
2. 発表標題 副腎皮質細胞において転写因子NR2F1を抑制すると小胞体ストレス応答因子のERN1 (IRE1) は増加する
3. 学会等名 日本薬学会 第143回年会
4. 発表年 2023年

〔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
研究 分担者	大江 賢治 (Ohe Kenji) (30419527)	福岡大学・薬学部・教授 (37111)	

6. 研究組織（つづき）

	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 分 担 者	田邊 真紀人 (Tanabe Makito) (60707305)	福岡大学・医学部・准教授 (37111)	

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