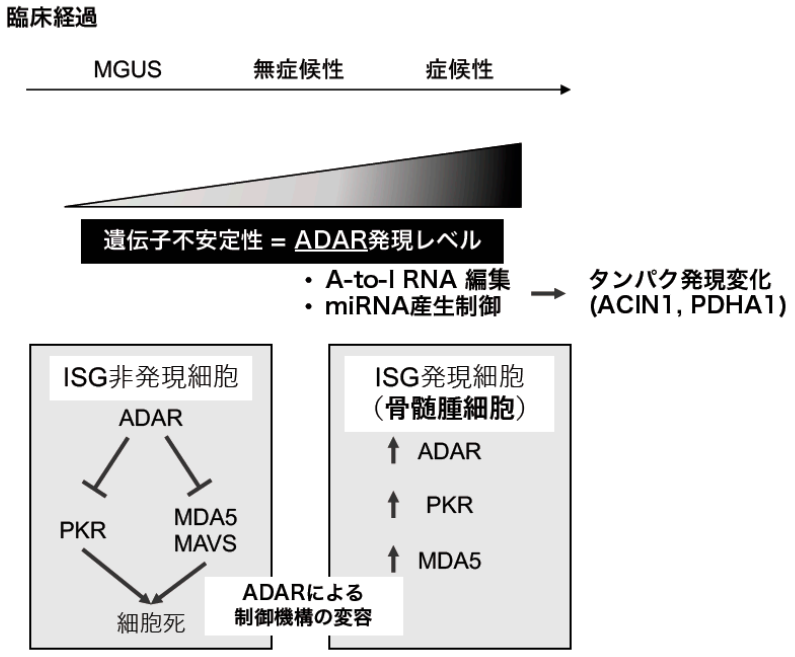
182　RNA編集酵素ADARによる腫瘍の遺伝子不安定性惹起機序	原田　武志

【目的】多発性骨髄腫（multiple myeloma：MM）は、骨髄内で前癌状態の意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症（monoclonal gammopathy of undetermined significance：MGUS）から無症候性、症候性骨髄腫、次いで形質細胞白血病へと遺伝子発現異常を積み重ね治療抵抗性を獲得しつつ進展する難治性造血器悪性腫瘍である。MM において、遺伝子発現の不安定性は MM 細胞が持つ細胞遺伝学的因子や腫瘍微小環境、抗がん薬による外的ストレスなどにより惹起されると考えられるが、その遺伝子不安定性が惹起される分子機序は未だ不明である。MM はその進展や治療抵抗性の獲得とともに、1 番染色体の増幅（1q gain）が高頻度に出現する。RNA 編集酵素 adenosine deaminases acting on RNA（ADAR）は染色体 1q21.3 座に存在し、遺伝子発現を大きく変化させる原因因子と考えられる。MM の進展機序および遺伝子不安定性を惹起する分子機序を解明するために、本研究では、MM における ADAR の治療標的としての意義を明らかにすることを目的とした。

【方法】ヒト MM 細胞株、MM 患者検体および健常人由来の末梢血単核細胞を用いて、免疫組織化学およびウエスタンブロット法により ADAR のタンパク発現解析を行った。MM 細胞株 RPMI 8226 や JJN3 において、shRNA による *ADAR* 遺伝子発現抑制を行い、アポトーシスの誘導や ADAR 関連経路の変化をフローサイトメトリーおよびウエスタンブロット法で解析した。また、*ADAR* 発現抑制 JJN3 を使用して、LC-MS/MS 解析により ADAR が制御するタンパクの同定を試みた。

【結果】ヒト MM 細胞では、ADAR が高発現しており、ADAR の発現抑制は MM 細胞にアポトーシスを誘導させ、治療標的因子になり得ることが明らかとなった。抗 MM 薬の中でも、細胞傷害活性の高い HDAC 阻害薬やプロテアソーム阻害薬は、ADAR の発現抑制を来すとともに、DNA 損傷マーカー γ-H2A.X の増加と逆相関するように MDA5 や PKR の発現低下を認めた。また、MM 細胞において ADAR の発現抑制は、アポトーシス制御に関わる ACIN1 やメタボリズムに関わる PDHA1 などの発現変化をきたし、ADAR が制御する候補分子として抽出できた。

ADAR-miRNA/mRNA-タンパク発現制御機構による MM の進展



182. RNA 編集酵素 ADAR による腫瘍の遺伝子不安定性惹起機序

原田　武志

*徳島大学病院 血液内科

Key words：多発性骨髄腫，ADAR，抗骨髄腫薬，HDAC

緒　言

がん細胞はその遺伝子不安定性から遺伝子発現の変化を来しながら、薬剤耐性クローンへの進化やがんの進行・劇症化へ変貌を遂げる。多発性骨髄腫（multiple myeloma：MM）は、骨髄内で前癌状態の意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症から無症候性、症候性骨髄腫、次いで形質細胞白血病へと遺伝子発現異常を積み重ね治療抵抗性を獲得しつつ進展する難治性造血器悪性腫瘍である。MM において、遺伝子発現の不安定性は MM 細胞が持つ細胞遺伝学的因子や腫瘍微小環境、抗がん薬による外的ストレスなどにより惹起されると考えられるが、その遺伝子不安定性が惹起される分子機序は未だ不明である。

骨髄腫患者において進展・治療抵抗性例では、1 番染色体の増幅（1q gain）が高頻度に出現する［1］。この 1q gain を有する MM 細胞では、染色体 1q21.3 座に存在する *ADAR* 遺伝子（ADAR：adenosine deaminases acting on RNA）の発現亢進が示唆される。ADAR は二本鎖 RNA に含まれるアデノシンをイノシンへと塩基修飾（A-to-I RNA 編集）するデアミナーゼであるが、miRNA 前駆体の RNA 編集とともに Dicer とヘテロ二量体を形成し miRNA の産生を促進することより、遺伝子発現を大きく変化させる原因因子と考えられる［2］。

MM の進展機序および遺伝子不安定性を惹起する分子機序を解明するために、本研究では、MM における ADAR の治療標的としての意義を明らかにすることを目的とした。MM 細胞における ADAR の発現を検討し、ADAR が MM 細胞で高発現し、*ADAR* 発現抑制がアポトーシスを誘導すること、また DNA 損傷を引き起こす細胞傷害活性の高い抗 MM 薬は ADAR を標的とし得ることを見出した。さらに、LC-MS/MS 解析を利用し、MM 細胞での ADAR が制御する因子としてアポトーシス制御因子 ACIN1 やメタボリズムに関わる PDHA1 などを同定した。

方　法

1.　細胞および臨床検体

ヒト MM 細胞株は RPMI 8226、MM.1S、U266、NCI-H929、KMS-11、INA-6 を使用した。ヒト末梢血単核細胞（peripheral blood mononuclear cells：PBMCs）は健常人の末梢血から単離した。患者検体については、MM と診断された患者から採取された骨髄液あるいは骨髄組織を使用した。患者検体は、ホルマリン固定後、パラフィンブロックを作製し、組織アレイ標本へ使用した。また、一部の骨髄液は、CD138 磁気ビーズで分離し、CD138 陽性 MM 細胞としてタンパク抽出を行った。検体の採取は、徳島大学病院医学系研究倫理審査委員会の承認を得た臨床研究に基づいて行った。

2.　試薬

抗 MM 薬として、プロテアソーム阻害薬 bortezomib（BTZ）、免疫調節薬 pomalidomide（POM）、ヒストン脱アセチル化酵素（histone deacetylase：HDAC）阻害薬 panobinostat（LBH）、アントラサイクリン系抗がん薬 doxorubicin（DOX）を使用した。ADAR 発現増強のポジティブコントロールとして、サイトカイン IFN-α を使用した。

*現在の所属：徳島大学 大学院医歯薬学研究部 血液・内分泌代謝内科学分野

3. *ADAR* 遺伝子発現抑制

ADAR を標的とする shRNA を組み込んだレンチウイルスベクターを用いて、MM 細胞株の *ADAR* 遺伝子発現抑制を行った。*ADAR* 発現抑制 MM 細胞株は puromycin による薬剤選択後に各種実験で使用した。

4. LC-MS/MS 解析

MM 細胞株 JJN3 において、*ADAR* 遺伝子発現抑制を行い、タンパク抽出を行った。サンプルは本学先端研究推進センターで解析を行った。有意差は（|Ratio shADAR/shControl [Log2]| ＞ 2）をもって、有意とした。

結　果

1. 患者由来 MM 細胞での ADAR の発現の実態

患者検体での ADAR 発現の実態を解析するために、パラフィンブロックから組織アレイ標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）、CD138 と ADAR を染色した（図 1A）。CD138 は MM 細胞で高発現しており、CD138 発現部位に一致して、ADAR の発現を認めた。ADAR には恒常発現型（p110）と誘導型（p150）のアイソフォームがあるが、いずれの ADAR アイソフォームも、健常人 PBMCs と比較して、MM 細胞株と患者由来 CD138 陽性細胞で高発現していることが明らかとなった（図 1B）。

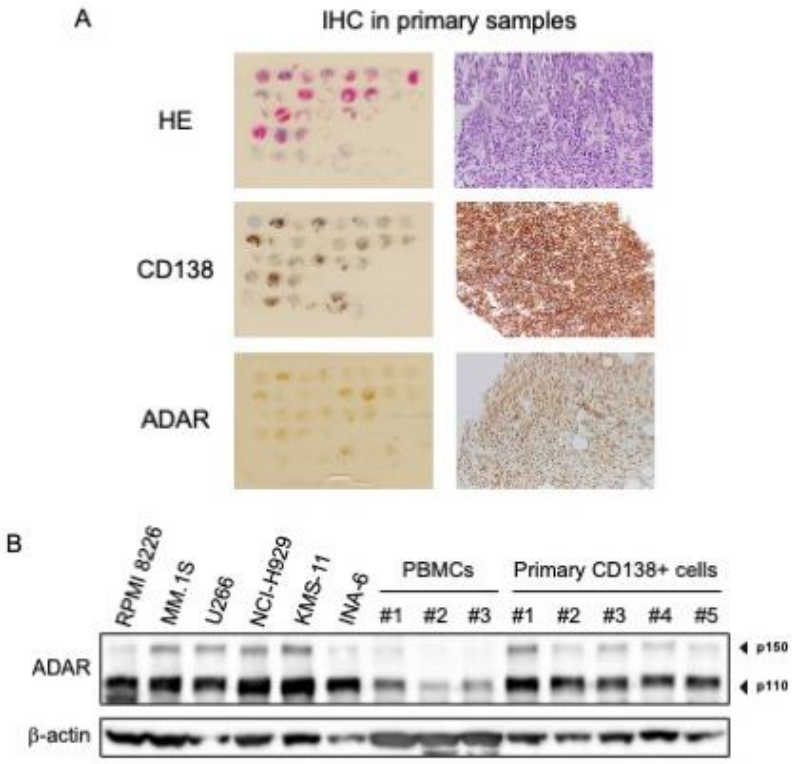


図 1. 骨髄腫細胞における ADAR の発現

A) 患者骨髄検体（骨髄液または骨髄組織）を用いて、組織アレイ標本を作製し、免疫染色により ADAR の発現を確認した（左：×0.5、右：×40）。MM 細胞は CD138 陽性細胞で確認した。

B) MM 細胞株、健常人 PBMCs、患者由来 CD138 陽性細胞からタンパクを抽出し、ADAR の発現をウエスタンブロット法で解析した。

2. ADAR を標的とする治療法の探索

ADAR が治療標的となり得るかを検証するために、MM 細胞株 RPMI 8226 を用いて、*ADAR* 発現抑制によるアポトーシスをウエスタンブロット法およびフローサイトメトリーを用いて確認した（図 2A、B）。また、MM 細胞株 JJN3 においても同様の結果を得た（データ未掲載）。次に、抗 MM 薬が ADAR の発現に及ぼす影響について検討を行った（図 2C）。ADAR は I 型インターフェロン誘導性遺伝子（IFN-stimulated gene：ISG）として分類され、IFN-α による発現増強が報告されていることから、IFN-α 処理条件を ADAR 発現のポジティブコントロールとした。ADAR の発現抑制は、double strand RNA（dsRNA）の蓄積により、melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5)／mitochondrial antiviral signaling protein（MAVS）経路や protein kinase R（PKR）の活性化を介して細胞死が誘導される［3, 4］。しかし、抗 MM 薬、特に汎 HDAC 阻害薬 panobinostat（LBH）では ADAR の発現低下のみならず、MDA5 や PKR の発現抑制も認め、DNA 損傷マーカーになる γ-H2A.X の増加を認めた。それとは反対に、IFN-α 刺激では、ADAR や MDA5、PKR の発現が増強していた。

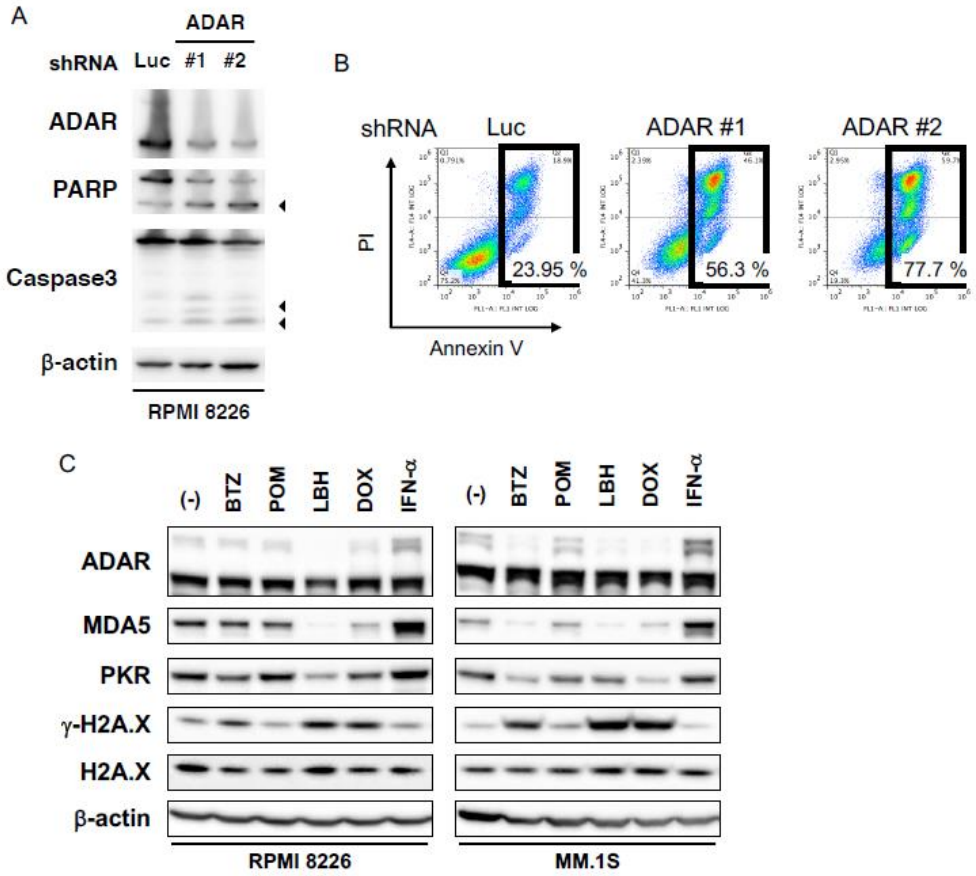


図 2. 抗 MM 薬の ADAR 発現への影響

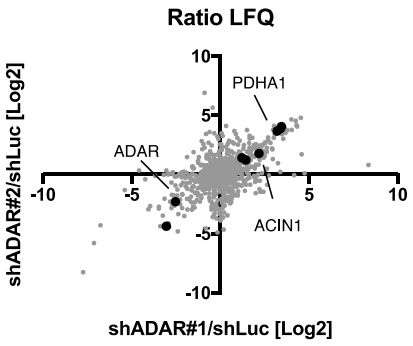
A) MM 細胞株 RPMI 8226 において、*ADAR* を発現抑制し、アポトーシス関連因子である poly（ADP-ribose）polymerase（PARP）、caspase-3 の cleaved form（◂）をウエスタンブロット法で確認した。

B) *ADAR* 発現抑制 RPMI 8226 において、フローサイトメトリーによる Annexin V-PI アッセイを用いて、Annexin V 陽性細胞あるいは Annexin V×PI 陽性細胞の増加（アポトーシス誘導）を確認した。

C) 抗 MM 薬あるいは IFN-α で MM 細胞株を 24 時間処理し、ADAR や MDA5、PKR、γ-H2A.X の発現変化をウエスタンブロット法で確認した。IFN-α は ADAR 発現を亢進させるポジティブコントロールとして使用した。BTZ：5 nM、POM：1 μM、LBH：15 nM、DOX：1 μM、IFN-α 100 U/mL。

3. MM 細胞における ADAR による制御因子の同定

ADAR を標的とする治療法の開発を進めるために、MM 細胞での ADAR による制御因子の同定を行った。*ADAR* 発現抑制 MM 細胞株 JJN3 を用いて、LC-MS/MS 解析を行い、アポトーシス制御に関わる ACIN1 やメタボリズムに関わる PDHA1 などを ADAR が制御する候補分子として抽出した（図 3）。



Symbol	Ratio [Log2]	
	shADAR2 /shLuc	shADAR3 /shLuc
ACIN1	2.187	1.773
ADAR	-2.528	-2.295
PAICS	1.438	1.231
PDHA1	3.204	3.672
RCN1	-3.038	-4.376
RRBP1	3.389	3.880
TAPBP	1.220	1.413
VPS26A	3.446	4.053

図 3. MM 細胞における ADAR が制御する標的因子の同定

ヒト MM 細胞株 JJN3 において、*ADAR* を発現抑制させ、LC-MS/MS 解析でタンパクの発現変化を解析した。ADAR shRNA は 2 種類（shADAR #1、#2）、コントロールには shLuc を使用した。同定したタンパク質の発現変化の全体像を左図に表し、2 倍以上の増減を shADAR #1 と#2 で共に示したタンパクは●で示し、タンパク名と発現変化割合は右表に列挙した。

考　察

MM 細胞では ADAR は高発現しており、その治療標的としての意義が本研究で明らかとなった。ADAR を含む ISG 群は形質細胞へ分化傾向のある細胞に高発現していると考えられる。ADAR 発現抑制は、dsRNA 蓄積から MDA5／MAVS 経路や PKR の活性化を介して細胞死が誘導されるが、MM 細胞を用いた本研究では、抗 MM 薬、特に細胞傷害性の高いプロテアソーム阻害薬や汎 HDAC 阻害薬は MDA5 や PKR の発現低下を認めながら、ADAR の発現抑制を来すことが確認された。この結果は、γ-H2A.X の発現が強い薬剤処理条件ほど、ADAR の発現抑制が強い傾向にあったことから、DNA 損傷による dsDNA の蓄積と dsRNA 蓄積の関係に着目した制御機構の解明について、今後検討を進める必要がある。

これまでの我々あるいは他の研究グループからの報告で、MM に対する HDAC 阻害は、HDAC アイソフォームの中でも、特に HDAC1、HDAC3、HDAC6 が重要であることが明らかにされている［5］。エピゲノム調節因子である HDAC と ADAR の関係は、今後 HDAC アイソフォーム別に比較しながら、タンパクレベルと mRNA レベル、あるいは翻訳後修飾の観点からの検討を要する。

ADAR は A-to-I RNA 編集酵素であると同時に、miRNA の産生制御にも関わる因子である。本研究で明らかとなった ADAR による制御因子が RNA 編集による制御か、miRNA 産生制御によるものであるのかは検討を進めている。miRNA microarray 解析を行い（データ未掲載）、LC-MS/MS 解析結果と照らし合わせ、MM 細胞における ADAR を中心とする miRNA／mRNA／タンパク制御機構の解明を行い、MM 細胞が有する遺伝子不安定性の惹起機序の一端を解明していく。

共同研究者・謝辞

本研究においては、徳島大学医歯薬学研究部血液内分泌代謝内科学分野の安倍正博教授にご指導を賜りました。末筆となりましたが、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文　献

1) Hanamura I, Stewart JP, Huang Y, Zhan F, Santra M, Sawyer JR, Hollmig K, Zangarri M, Pineda-Roman M, van Rhee F, Cavallo F, Burington B, Crowley J, Tricot G, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr. Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. Blood. 2006 Sep 1;108(5):1724-32. Epub 2006 May 16. PMID 16705089

2) Jiang Q, Crews LA, Holm F, Jamieson CHM. RNA editing-dependent epitranscriptome diversity in cancer stem cells. Nat Rev Cancer. 2017 Jun;17(6):381-392. PMID 28416802 DOI: 10.1038/nrc.2017.23. Epub 2017 Apr 18.

3) Liu H, Golji J, Brodeur LK, Chung FS, Chen JT, deBeaumont RS, Bullock CP, Jones MD, Kerr G, Li L, Rakiec DP, Schlabach MR, Sovath S, Growney JD, Pagliarini RA, Ruddy DA, Maclsaac KD, Korn JM, McDonald ER 3rd. Tumor-derived IFN triggers chronic pathway agonism and sensitivity to ADAR loss. Nat Med. 2019 Jan;25(1):95-102. Epub 2018 Dec 17. PMID: 30559422 DOI: 10.1038/s41591-018-0302-5

4) Gannon HS, Zou T, Kiessling MK, Gao GF, Cai D, Choi PS, Ivan AP, Buchumenski I, Berger AC, Goldstein JT, Cherniack AD, Vazquez F, Tsherniak A, Levanon EY, Hahn WC, Meyerson M. Identification of ADAR1 adenosine deaminase dependency in a subset of cancer cells. Nat Commun. 2018 Dec 21;9(1):5450. PMID 30575730 DOI: 10.1038/s41467-018-07824-4

5) Harada T. Role of HDAC isoforms and development of treatment of multiple myeloma using isoform-specific HDAC inhibitors. Rinsho Ketsueki. 2019;60(9):1265-1274. PMID 31597852 DOI: 10.11406/rinketsu.60.1265