九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

Imatinib induces demethylation of miR-203 gene : An epigenetic mechanism of anti-tumor effect of imatinib

澁田, 樹

https://doi.org/10.15017/1441072

出版情報：九州大学, 2013, 博士（保健学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済

KYUSHU UNIVERSITY

博士学位論文

英文題目　Imatinib induces demethylation of miR-203 gene:
An epigenetic mechanism of anti-tumor effect of imatinib

和文題目　imatinibはmiR-203遺伝子の脱メチル化を誘導する
(抗腫瘍薬であるimatinibのエピジェネティックな作用機序)

九州大学大学院医学系学府保健学専攻
医療技術系教育者・研究者養成コース

学生番号：3MD11509K
氏名：澁田　樹

目次

1. 背景 ・・・

1. 背景

慢性骨髄性白血病 (Chronic Myelogenous Leukemia：CML)は BCR-ABL1 キメラ遺伝子を有する造血器悪性腫瘍の１つであり, 本遺伝子により発現する BCR-ABL1 タンパクは恒常的なチロシンキナーゼ活性を示し多様なシグナル伝達を介して細胞増殖を促す。imatinib mesylate (imatinib, 商品名：Glivec®)は BCR-ABL1 タンパクのチロシンキナーゼ活性を特異的に阻害することで CML 細胞の増殖を抑制しアポトーシスを誘導することから，現在 CML 治療の第一選択薬剤として用いられている [1)]。

一方近年では，各種白血病細胞を含め様々な腫瘍細胞において変異や染色体異常の他にエピジェネティックな変化が生じていることが報告されている [2)]。エピジェネティックな変化とは DNA 配列に変化を起こすことなく遺伝子発現のパターンを変化させる現象の総称であり, DNA のメチル化やヒストン修飾の変化などが含まれる [3)]。特に遺伝子のプロモーター領域で生じる DNA のメチル化は遺伝子の発現に対して抑制的に働き，特定の遺伝子発現の抑制と腫瘍化や転移等に関して多くの研究が報告されている [4-6)]。DNA のメチル化とは，CpG 配列(シトシンの次にグアニンが続く 2 塩基配列)中のシトシンのピリミジン環五位炭素原子へのメチル基の付加反応であり, この反応は DNA メチル基転移酵素(DNA methyltransferase：DNMT)によって触媒され，CpG アイランドと呼ばれる CpG 配列が繰り返される部分で生じやすいことが分かっている [7)]。

microRNA (miRNA)は 18～25 塩基程度のノンコーディング RNA であり，標的 mRNA の 3'UTR 領域に結合することで翻訳阻害あるいは mRNA そのものの分解を引き起こし，mRNA の働きを抑制的に制御するものである [8,9)]。miRNA は primary miRNA (pri-miRNA)と呼ばれる長鎖の RNA として DNA より転写され, Drosha 等の複合体によって一部切断され precursor mRNA (pre-miRNA) となる。pre-miRNA は核内から細胞質へと輸送され，Dicer 等の複合体によりヘアピン構造が切断された後に成熟 miRNA として機能する。miRNA は細胞増殖，分化，アポトーシスといった細胞機能の制御に関与する [10)]が，発癌性の miRNA (oncomir)の増加や腫瘍化抑制性の miRNA (anti-oncomir)の低下といった異常な miRNA の発現が腫瘍化に関与しているとの報告がある [11-14)]。また一部の miRNA はプロモーター領域における CpG アイランドのメチル化によって発現が制御されることも報告されており [15)]，エピジェネティックな異常が miRNA 発現異常を引き起こし、造血細胞の腫瘍化に関与することが示唆されている [16,17)]。

DNA メチル化による miRNA の発現抑制と CML との関連についても miR-15/16[18)]や miR-31/155/564 [19)]などについて報告されている [20,21)]。Bueno らは CML 患者の腫瘍細胞及び BCR-ABL1 陽性の白血病細胞株中で miR-203 がエピジェネティックな機序により発現が抑制されていることを報告した [16)]。miR-203 は ABL1 の 3'UTR を標的として機能する miRNA であり CML 細胞中では BCR-ABL1 mRNA を標的とするため，miR-203 のエピジェネティックな発現抑制は BCR-ABL1 陽性白血病細胞の病因の１つと考えられている。

imatinib は BCR-ABL1 mRNA 及びそのタンパクの発現を減少させ [22,23)]BCR-ABL1 陽性白血病細胞の増殖を阻害するが，miRNA の発現に与える影響についての報告は少ない。本研究は，imatinib によりプロモーター領域に CpG アイランドを有する miRNA の発現が imatinib により増加し，エピジェネティックに発現が抑制されていた miR-203 が再発現した後，BCR-ABL1 mRNA の抑制に機能していることを示す。

2. 方法

2-1. 細胞培養

慢性骨髄性白血病由来細胞株 K562 及び急性前骨髄球性白血病由来細胞株 HL-60 は American Type Culture Collection (MD, USA)より，慢性骨髄性白血病由来細胞株 KU812 は RIKEN Cell Bank (茨城, 日本)より購入した。各細胞は 10% Fetal Bovine Serum (FBS)および RPMI1640 (GIBCO, NY, USA)を用いて 37℃, 100%湿度の下，2×10^5 cell/mL の濃度でディッシュに播種し維持培養した。薬剤による細胞処理は 1μM の imatinib (Novartis 社より供与)もしくは 1μM の 5-Azacytidine (Sigma, USA)で 72 時間行い，トリパンブルー染色により細胞数及び生細胞率を測定した。

2-2. 遺伝子発現解析

5×10^5 cell の細胞を RNAlater (Applied Biosystems (ABI), CA, USA)に浮遊させ−20℃で保存した後, 全検体同時に RNA 抽出を行った。RNA の抽出には mirVana Isolation Kit (ABI)を用いた。

mRNA 及び pri-miRNA については RNA PCR Kit (Takara, 日本)を用いて逆転写反応を行い，SYBR Premix Ex Taq (Takara)を用いて qRT-PCR 法により遺伝子発現の定量解析を行った。解析に用いた primer set は，BCR-ABL1 (forward: 5′-CAGACTGTCCACAGCATTC-3′，reverse: 5′-CTGAGGCTCAAAGTCAGAT-3′)，glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (forward: 5′-TCACCACCATGGAGAAGGC-3′, reverse: 5′-GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA-3′), pri-miR-203 (forward: 5′-GCTGGGTCCAGTGGTTCTTA-3′ , reverse: 5′-GACTGTGACTCTGACT-CCA-3′)である。BCR-ABL1 mRNA の発現量はハウスキーピング遺伝子である GAPDH の発現量により補正した。

miRNA については High-Capacity cDNA Transcription Kit (ABI)および各 miRNA に特異的に反応する Looped-RT primer (TaqMan MiRNA Assays Kit, ABI)を用いて逆転写反応を行った。その後，Universal Master Mix (ABI)および TaqMan MiRNA Assays Kit 付属の TaqMan プローブを用いて qRT-PCR 法による遺伝子発現の定量解析を行った。各 miRNA の発現量は内在性コントロール遺伝子である U6B の発現量により補正した。

全ての遺伝子解析実験は 3 回以上の繰り返し実験を実施し，平均の Threshold Cycle 値 (CT 値)を使用して比較 CT 値法により遺伝子の相対発現量を解析した。

2-3. miR-203 プロモーター領域のメチル化解析

1×10^6 cell の細胞から TRIzol (Invitrogen, CA, USA)を用いて DNA を抽出した後，EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen, CA, USA)を使用して非メチル化シトシンをウラシルへと変換した。下記のプライマーを設計し, miR-203 のプロモーター領域に対するメチル化特異的 PCR を行った。

methylated-MSP: forward; 5′-TTTAGACGAGACGGTTCGGGC-3′,
reverse; 5′-AAAATAACCCTAACTCAACGACCG-3′

unmethylated-MSP: forward; 5′ -TTTAGATGAGATGGTTTGGGT-3′
reverse, 5′ -AAAATAACCCTAACTCAACAACCA-3′

増幅産物を精製後，ABI PRISM 3130xl Genetic analyzer (ABI)を用いてダイレクトシークエンスを実施して配列の変化を確認した。

2-4.　miRNA マイクロアレイ

K562 細胞から抽出した RNA を使用して miRNA マイクロアレイを行った。RNA のクオリティは Agilent 2100 bioanalyzer systems (Agilent Technology, CA, USA)で確認し，RNA 量は Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop Technologies, DE, USA)を使用して測定した。miRNA マイクロアレイは東レ社 (3D-gene miRNA Oligo Chip)に解析委託した。本法はマイクロチップ上に約 900 の miRNA アンチセンスプローブがスポットされており，蛍光ラベル化された検体中の miRNA がハイブリダイズすることにより検出される。各プローブは 2 つずつスポットされているため平均の蛍光強度が miRNA の発現量として測定された。

2-5. BCR-ABL タンパク発現量解析

ウエスタンブロット法を用いて BCR-ABL1 タンパク量を解析した。各細胞はプロテアーゼインヒビターカクテル (Roche Applied Science, IN, USA)及び Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)のプロテアーゼ阻害剤の存在下で radio-immunoprecipitation assay (RIPA)バッファーを用いて溶解し，10,000 x g, 15 分の遠心分離後の上清を−20℃で保存した。BCA- protein assay (Pierce, IL, USA)を使用してタンパク濃度を測定し，20μg のタンパクを 10%SDS-PAGE により分離した後に Polyvinylidene difluoride (PVDF)メンブレンに転写した。メンブレンは 5%のスキムミルクで室温 1 時間マスキング処理し，anti-c-Abl 一次抗体(Cell Signaling, MA, USA)については 4℃で一晩静置，anti-GAPDH 一次抗体(Cell Signaling)については室温で振盪しながら 2 時間インキュベートした。反応終了後，PBS-Tween 20 で 3 回メンブレンを洗浄し，HRP 標識抗ウサギ二次抗体(Cell Signaling)を用いて室温で振盪しながら 2 時間インキュベートした。PBS-Tween 20 で 3 回メンブレンを洗浄し，ECL Plus Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, NJ, USA)により化学発光させ LAS-4000 (GE Healthcare)を使用して撮影した。尚，各抗体はいずれも 1,000 倍に希釈し使用した。

2-6. anti-miR-203 トランスフェクションによる miR-203 loss of function アッセイ

25nM の anti-miR-203 及び anti-miR-NC (Ambion/ABI)をトランスフェクション試薬 Xfect®を使用して K562 及び KU812 細胞にトランスフェクションした。anti-miRNA と Xfect®試薬を混和したものを 24 穴のマイクロプレートに分注し，1 ウェルあたり各細胞 2 x 10^5cell を播種した。48 時間培養した後，細胞を回収し RNA の抽出や薬剤処理等の実験に使用した。

2-7. 統計学的解析

統計学的解析は同一細胞株における各種処理の有意差の有無を確認するために実施し，t 検定(両側)により $p<0.05$ の P 値が得られた場合に有意差があると判断した。

3. 結果

3-1. BCR-ABL1 mRNA を標的とする miRNA の絞込み

imatinib 処理により K562 細胞中の miRNA がどのように変化するかマイクロアレイ法(3D-gene miRNA Oligo Chip により 886 の miRNA を解析)を用いて解析を行ったところ，886 の miRNA 中 448 の miRNA について発現を認め、95 の miRNA が 2 倍以上の上昇を示し，23 の miRNA が 2 倍以上の減少を示した (図 1)。

次に TargetScan 6.2 (http://www.targetscan.org)を用いて BCR-ABL1 及び ABL1 mRNA を標的とする miRNA (miR-30a-3p/125a-5p/125b-5p/196b-5p/203)を抽出した後(図 2A), qRT-PCR 法により発現量を確認し，マイクロアレイ法の結果との比較を行った (図 2B)。これらの miRNA のうち miR-203 のみ発現量が増加しており，他の miRNA はいずれも発現量が低下していた。

3-2. プロモーター領域に CpG アイランドを有する miRNA の発現変化

miR-203 はプロモーター領域に CpG アイランドを有し，CML 細胞中ではエピジェネティックに発現が抑制されていることが報告されている(文献)が，図 2 で示したように imatinib 処理後には発現しておりエピジェネティック制御に変化が生じていることが示唆される結果であった。そこでプロモーター領域に CpG アイランドを有する miRNA の発現に対し imatinib がどのような影響を与えているかを調べるために，これらの miRNA に着目しマイクロアレイ結果の再解析を行った。3-1.で解析対象とした 886 の miRNA 中，212 (23.9%)の miRNA はプロモーター領域に CpG アイランドを有しており, 今回のマイクロアレイ法により 114 の miRNA については K562 細胞中での発現が認められた (図 3A)。これらの miRNA のうち 48 (22.6%)の miRNA について，imatinib 処理後に 2 倍以上の上昇が見られた。この数は，3-1.で 2 倍以上の上昇が見られた 95 の miRNA (図 1)の半数(50.5%, 48/95)にあたり(図 3B)，プロモーター領域に CpG アイランドを有する miRNA の発現量が増加していることが示唆された。

3-3. メチル化特異的 PCR 及び qRT-PCR による miR-203 の発現確認

図 1 で示したように，エピジェネティックに発現が抑制されていると考えられる miR-203 が imatinib 処理後に発現が見られたため，miR-203 のプロモーター領域におけるメチル化状態が imatinib により変化しているかメチル化特異的 PCR 及びダイレクトシークエンスにより確認した。BCR-ABL1 陽性白血病細胞 2 株 (K562, KU812)，BCR-ABL1 陰性白血病細胞 1 株 (HL-60)を用いた。imatinib 未処理の状態ではいずれもメチル化状態が確認され，imatinib 処理後 BCR-ABL1 陽性白血病細胞では部分的な脱メチル化が見られた (図 4)。一方で，BCR-ABL1 陰性白血病細胞では imatinib によってメチル化状態は変化せず，脱メチル化剤 (5-Azacytidine)によって全ての細胞株で脱メチル化が見られた。

次に白血病細胞株 3 株中の miR-203 の発現量を qRT-PCR により解析した。imatinib 処理により BCR-ABL1 陽性白血病細胞 (K562, KU812)では miR-203 の発現量が上昇しており，BCR-ABL1 陰性白血病細胞 (HL-60)では miR-203 の発現は見られなかった (図 5A)。5-Azacytidine 処理によって全ての細胞株で miR-203 の発現が見られ, 以上の結果は図 4 のメチル化特異的 PCR 及びダイレクトシークエンスの結果と一致した。

miR-203の発現が脱メチル化により新たに生じたものかどうかを確認するためpri-miR-203の発現状態を解析した (図 5B)。K562 細胞では imatinib 処理により pri-miR-203 の発現が誘導されていた。KU812 では未処理の状態でも pri-miR-203 の発現が弱く見られたが，これは図 4 のダイレクトシークエンスで不完全なメチル化が生じていることと相関していると考えられ, 本細胞株においても imatinib 処理後に miR-203 の発現量増加が確認された。miRNA の生合成に関与する酵素群 (Dicer, Drosha)及び分解に関与する酵素(MCPIP1[24])の発現量を mRNA レベルで確認したが変化は見られなかった (図6)。imatinibによりmiR-203のプロモーター領域のCpGアイランドが脱メチル化するだけでなく，miR-203 の発現が誘導され成熟 miR-203 の発現が増加した。

3-4. imatinib 処理後の BCR-ABL1 mRNA 及びタンパクの発現

miR-203 の標的となる BCR-ABL1 mRNA の発現量を qRT-PCR 法を用いて解析したところ，imatinib処理によってK562細胞では52%, KU812細胞では26%まで発現量が低下していた (図 7A)。またウエスタンブロット法により BCR-ABL1 タンパク量を解析したところ，K562 細胞では 30.8%，KU812 細胞では 70.3%発現量が低下していた (図 7B)。細胞の増殖はこれらの結果と相関しており，K562 細胞では 46%，KU812 細胞では 20%まで抑制された (図 7C)。

3-5. imatinib 処理による DNMT1 及び DNMT3B mRNA の発現量低下

DNAのメチル化を触媒する酵素群であるDNMT (DNMT1及びDNMT3A/3B) mRNAの発現量を qRT-PCR 法によって解析した (図 8)。BCR-ABL1 陽性白血病細胞 (K562, KU812)中の DNMT1 及び DNMT3B mRNA の発現量は imatinib 処理によって大きく低下していたが，DNMT3A mRNA では変化は見られなかった。DNMT1 mRNA の発現量は 14.3% (K562 細胞), 32.4% (KU812 細胞)まで低下し, DNMT3B mRNA の発現量は 10.7% (K562 細胞), 10.8.% (KU812 細胞)まで低下していた。一方，BCR-ABL1 陰性白血病細胞株である HL-60 ではいずれにおいても変化は認められなかった。

3-6. anti-miR-203 transfection による miR-203 loss of function

imatinib 処理後に発現が上昇した miR-203 が BCR-ABL1 に対し機能しているかどうかを確認するため，anti-miR-203 を K562 細胞に transfection し BCR-ABL1 mRNA の発現量を qRT-PCR 法により測定した (図 9A)。imatinib 処理後, BCR-ABL1 mRNA の発現量は 45.5%まで低下し，さらに anti-miR-NC (Negative Control)を transfection した細胞では 40.6%まで低下した。一方，anti-miR-203 を transfection した後に imatinib 処理した細胞では BCR-ABL1 mRNA の低下は 68.1%にとどまり有意な差が見られた (p <0.05)。anti-miR-203 の transfection による細胞学的な影響を観察するため transfection 後に imatinib 処理し，生細胞数及び死細胞率を測定した (図 9B)。anti-miR-203 の transfection により生細胞数は Negative Control の 1.3 倍増加し，死細胞率は 9.7% (Negative Control = 25.6%)と大きく低下していた。

4. 考察・展望

miRNA は細胞増殖や分化、アポトーシスなどの機能において重要な役割を担っている。近年、miRNA の発現異常と発癌の関係について多数報告されており、癌抑制性 miRNA の発現低下が癌化につながることが明らかにされている。miR-34a は p53 によって発現が制御される miRNA であるが、固形癌での発現低下が報告されており [25)]、Chim らは miR-34a が慢性リンパ性白血病、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫で発現が低下していることを報告した [26)]。miR-193a は非小細胞肺癌 [27)]及び一部の急性骨髄性白血病 [28)]で発現低下の報告がある。miR-203 についてはエピジェネティックな発現抑制が口腔癌 [29)]、肝細胞癌 [30)]、多発性骨髄腫 [31)]、MALT リンパ腫 [32)]で報告されており、CML ではこの miR-203 の発現抑制に加え miR-150/151 の発現低下が報告されている [33)]。

本研究では、CML 細胞においてプロモーター領域での CpG アイランドメチル化により発現が抑制される miRNA が imatinib によりどのような影響を受けるかということに着目した。CpG アイランドのメチル化は DNA メチル基転移酵素 (DNMT)により制御されるが、DNMT1 は細胞分裂期の DNA 複製におけるメチル化パターンの維持、DNMT3A/B は de novo なメチル基転移に機能するとされている [7)]。これらの DNMTs は BCR-ABL 陽性 CML 細胞中で異常発現することが報告されており [34)]、本研究においては imatinib によって BCR-ABL の機能を阻害することで DNMT1 及び 3B の発現を mRNA レベルで低下させることを証明した(図 8)。この結果は miR-203 のプロモーター領域が脱メチル化した機序の一部であると考えられる。一方で、Drosha や Dicer といった miRNA の生合成に機能するタンパクの発現は mRNA レベルでは変動がなく(図 6)、imatinib 処理による miR-203 の発現上昇が生合成経路の活性化のためではなく、プロモーター領域の脱メチル化に起因したものであることを示した。西岡らの報告でも FIP1L1/PDGF α 陽性慢性好酸球性白血病を使用し 1nM の imatinib が DNMTs mRNA の発現を低下させることを示しているが，低濃度(0.1nM)の imatinib 処理では耐性株が出現することにより DNMTs mRNA の発現が上昇することも同時に示している [35)]。本研究における imatinib 処理条件は前者の条件に近く同様の結果が見られていると考えられるが、条件次第で imatinib による影響は大きく異なると思われる。

miR-203 の発現上昇に伴い、BCR-ABL1 mRNA の発現は低下していた(図 7)。ABL1 mRNA の 3’ UTR 領域には miR-203 の他 miR-196s, miR-30s, miR-125 の結合部位が存在するが、miR-30s 及び miR-125 の発現は imatinib により低下し、miR-196 については imatinib による発現量の変化はみられなかった。以上の結果から、miR-203 は ABL1 及び BCR-ABL1 mRNA を制御する重要な miRNA であると考えられ、imatinib が miR-203 プロモーター領域の脱メチル化及びその発現を誘導することは BCR-ABL1 陽性白血病細胞の増殖を抑制するメカニズムの１つであると考えられた。これらの結果は Bueno らの miR-203 強制発現系による ABL1 及び BCR-ABL1 mRNA 制御の報告と一致する。加えて、多発性骨髄腫においては miR-203 がエピジェネティックに発現抑制されると生存率が低下することが報告されており [31)]、miR-203 のメチル化と脱メチル化が診断や治療の対象となる可能性が考えられた。

DNA 脱メチル化剤である 5-Azacitidine (Vidaza®)は骨髄異形成症候群の治療に用いられるようになったが、急性骨髄性白血病においてもバルプロ酸や all-trans retinoic acid とともに 5-Azacitidine

を使用した臨床試験が行われている[36,37]。造血器腫瘍の治療では、DNA 脱メチル化剤が次世代の治療薬となりつつある。本研究における miRNA マイクロアレイでは imatinib がプロモーター領域に CpG アイランドを保有する miRNA の発現を上昇させることを示しており、また発現が上昇した全 miRNA のうち 56 の miRNA は癌化抑制機能が報告されているものであった。imatinib は BCR-ABL1 陽性白血病細胞においては BCR-ABL1 タンパクの阻害剤であるとともに脱メチル化誘導剤として作用していることが示唆された。

プロモーター領域に CpG アイランドを保有する miRNA の中には癌化を抑制する機能を持つ miRNA が多く含まれており、異常メチル化による miRNA の発現変化は癌化にも関連していると考えられる。imatinib は CML 細胞中でチロシンキナーゼ活性を阻害するだけでなく miR-203 プロモーター領域の脱メチル化を促し発現を上昇させるが、CML 治療における脱メチル化誘導の意義及び有用性についてはさらなる検討が必要である。

5. 参考文献

[1] Branford S. Chronic myeloid leukemia: molecular monitoring in clinical practice. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2007;376-83.

[2] Florean C, Schnekenburger M, Grandjenette C, Dicato M, Diederich M. Epigenomics of leukemia: from mechanisms to therapeutic applications. Epigenomics. 2011;3(5):581-609.

[3] Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. Science. 1999;286(5439):481-6.

[4] San José-Eneriz E, Agirre X, Jiménez-Velasco A, Cordeu L, Martín V, Arqueros V, et al. Epigenetic down-regulation of BIM expression is associated with reduced optimal responses to imatinib treatment in chronic myeloid leukaemia. Eur J Cancer. 2009;45(10):1877-89.

[5] Kusy S, Cividin M, Sorel N, Brizard F, Guilhot F, Brizard A, et al. p14ARF, p15INK4b, and p16INK4a methylation status in chronic myelogenous leukemia. Blood. 2003;101(1):374-5.

[6] Yang H, Liang H, Yan JS, Tao R, Hao SG, Ma LY. Down-regulation of hematopoiesis master regulator PU.1 via aberrant methylation in chronic myeloid leukemia. Int J Hematol. 2012;96(1):65-73.

[7] Wu SC, Zhang Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010;11(9):607-20.

[8] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. Nat Rev Genet. 2010;11(9):597-610.

[9] Suzuki HI, Miyazono K. Emerging complexity of microRNA generation cascades. J Biochem. 2011;149(1):15-25.

[10] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004;116(2):281-97.

[11] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. Nat Rev Cancer. 2006;6(4):259-69.

[12] Osada H, Takahashi T. MicroRNAs in biological processes and carcinogenesis. Carcinogenesis. 2007;28(1):2-12.

[13] Fabbri M, Garzon R, Andreeff M, Kantarjian HM, Garcia-Manero G, Calin GA. MicroRNAs and noncoding RNAs in hematological malignancies: molecular, clinical and therapeutic implications. Leukemia. 2008;22(6):1095-105.

[14] Kong YW, Ferland-McCollough D, Jackson TJ, Bushell M. microRNAs in cancer management. Lancet Oncol. 2012;13(6):e249-58.

[15] Kozaki K, Inazawa J. Tumor-suppressive microRNA silenced by tumor-specific DNA hypermethylation in cancer cells. Cancer Sci. 2012;103(5):837-45.

[16] Bueno MJ, Pérez de Castro I, Gómez de Cedrón M, Santos J, Calin GA, Cigudosa JC, et al. Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. Cancer Cell. 2008;13(6):496-506.

[17] Agirre X, Vilas-Zornoza A, Jiménez-Velasco A, Martin-Subero JI, Cordeu L, Gárate L, et al. Epigenetic silencing of the tumor suppressor microRNA Hsa-miR-124a regulates CDK6 expression and confers a poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. Cancer Res. 2009;69(10):4443-53.

[18] Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik SE, Shimizu M, et al. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(13):5166-71.

[19] Rokah OH, Granot G, Ovcharenko A, Modai S, Pasmanik-Chor M, Toren A, et al. Downregulation of miR-31, miR-155, and miR-564 in chronic myeloid leukemia cells. PLoS One. 2012;7(4):e35501.

[20] Pelosi E, Labbaye C, Testa U. MicroRNAs in normal and malignant myelopoiesis. Leuk Res. 2009;33(12):1584-93.

[21] Scholl V, Hassan R, Zalcberg IR. miRNA-451: A putative predictor marker of Imatinib therapy response in chronic myeloid leukemia. Leuk Res. 2012;36(1):119-21.

[22] Radujkovic A, Schad M, Topaly J, Veldwijk MR, Laufs S, Schultheis BS, et al. Synergistic activity of imatinib and 17-AAG in imatinib-resistant CML cells overexpressing BCR-ABL--Inhibition of P-glycoprotein function by 17-AAG. Leukemia. 2005;19(7):1198-206.

[23] Kasper B, Fruehauf S, Schiedlmeier B, Buchdunger E, Ho AD, Zeller WJ. Favorable therapeutic index of a p210(BCR-ABL)-specific tyrosine kinase inhibitor; activity on lineage-committed and primitive chronic myelogenous leukemia progenitors. Cancer Chemother Pharmacol. 1999;44(5):433-8.
[24] Suzuki HI, Arase M, Matsuyama H, Choi YL, Ueno T, Mano H, et al. MCPIP1 ribonuclease antagonizes dicer and terminates microRNA biogenesis through precursor microRNA degradation. Mol Cell. 2011;44(3):424-36.
[25] Wong KY, Yu L, Chim CS. DNA methylation of tumor suppressor miRNA genes: a lesson from the miR-34 family. Epigenomics. 2011;3(1):83-92.
[26] Chim CS, Wong KY, Qi Y, Loong F, Lam WL, Wong LG, et al. Epigenetic inactivation of the miR-34a in hematological malignancies. Carcinogenesis. 2010;31(4):745-50.
[27] Heller G, Weinzierl M, Noll C, Babinsky V, Ziegler B, Altenberger C, et al. Genome-wide miRNA expression profiling identifies miR-9-3 and miR-193a as targets for DNA methylation in non-small cell lung cancers. Clin Cancer Res. 2012;18(6):1619-29.
[28] Gao XN, Lin J, Li YH, Gao L, Wang XR, Wang W,et al. MicroRNA-193a represses c-kit expression and functions as a methylation-silenced tumor suppressor in acute myeloid leukemia. Oncogene. 2011;30(31):3416-28.
[29] Kozaki K, Imoto I, Mogi S, Omura K, Inazawa J. Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. Cancer Res. 2008;68(7):2094-105.
[30] Furuta M, Kozaki KI, Tanaka S, Arii S, Imoto I, Inazawa J. miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. Carcinogenesis. 2010;31(5):766-76.
[31] Wong KY, Liang R, So CC, Jin DY, Costello JF, Chim CS. Epigenetic silencing of MIR203 in multiple myeloma. Br J Haematol. 2011;154(5):569-78.
[32] Craig VJ, Cogliatti SB, Rehrauer H, Wündisch T, Müller A. Epigenetic silencing of microRNA-203 dysregulates ABL1 expression and drives Helicobacter-associated gastric lymphomagenesis. Cancer Res. 2011;71(10):3616-24.
[33] Agirre X, Jiménez-Velasco A, San José-Enériz E, Garate L, Bandrés E, Cordeu L, et al. Down-regulation of hsa-miR-10a in chronic myeloid leukemia CD34+ cells increases USF2-mediated cell growth. Mol Cancer Res. 2008;6(12):1830-40.
[34] Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, Akashi K, Fukumaki Y, Niho Y, et al. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. Blood. 2001;97(5):1172-9.
[35] Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Udaka K, Yokoyama A. Imatinib causes epigenetic alterations of PTEN gene via upregulation of DNA methyltransferases and polycomb group proteins. Blood Cancer J. 201;1(12):e48.
[36] Soriano AO, Yang H, Faderl S, Estrov Z, Giles F, Ravandi F, et al. Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. Blood. 2007;110(7):2302-8.
[37] Raffoux E, Cras A, Recher C, Boëlle PY, de Labarthe A, Turlure P, et al. Phase 2 clinical trial of 5-azacitidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in patients with high-risk acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome. Oncotarget. 2010;1(1):34-42.

6. 図表

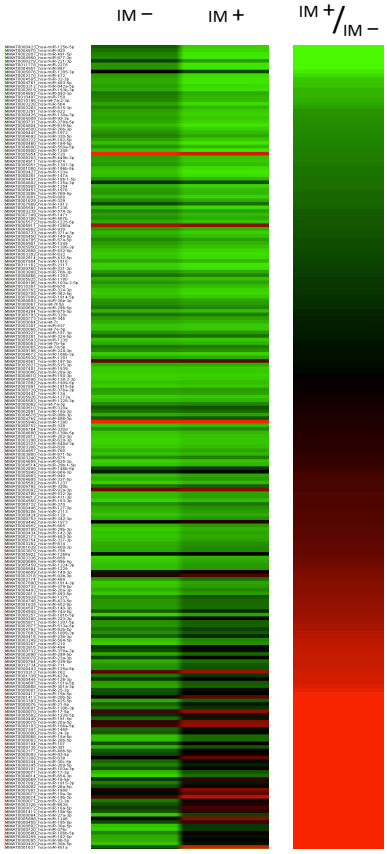
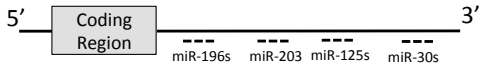


図 1　imatinib 処理による K562 細胞内 miRNA 発現変化についてのマイクロアレイ解析

K562 細胞を imatinib 処理したもの及び未処理のものについてそれぞれ RNA を抽出しマイクロアレイ解析を行った。3D-gene miRNA Oligo Chip (東レ社)の解析対象となる 886 の miRNA 中，imatinib 処理の前後でシグナルが確認されなかったものを除いた miRNA についてヒートマップを作成した。赤の明度が高いほど発現が高く，緑の明度が高いほど発現が低いことを示している。(IM-：imatinib 未処理，IM+：imatinib 72 時間処理，IM+/IM-：発現量比)

A



B

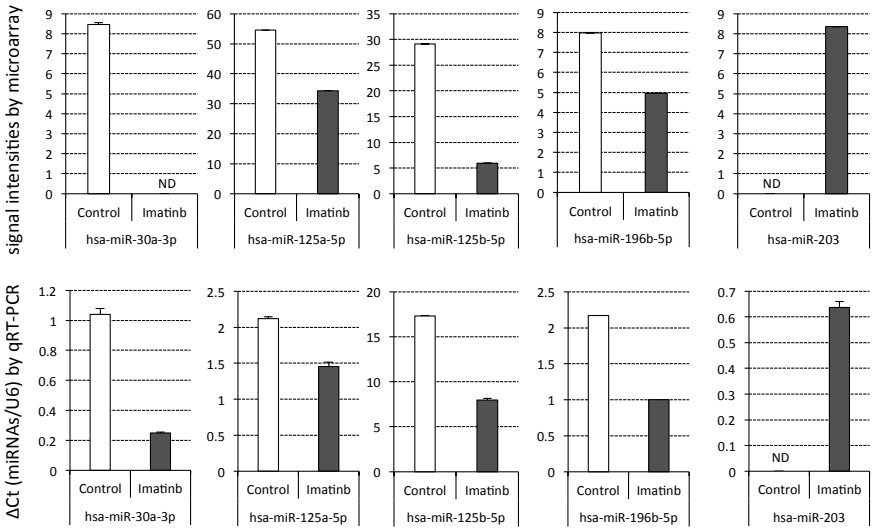


図 2　BCR-ABL mRNA を標的とする miRNA の発現変化

(A)TargetScan による in silico 解析で得られた BCR-ABL mRNA を標的とする miRNA の種類と標的となる部位の模式図を示す。

(B)72 時間の imatinib 処理後，K562 細胞内における BCR-ABL mRNA を標的とする miRNA の発現変化を示している(黒棒)。上段はマイクロアレイ解析による蛍光強度を, 下段は qRT-PCR 法により解析した結果を示しており, qRT-PCR 法では内在性コントロール遺伝子である U6B により発現量を補正した結果を示している。(ND：Not Detected)

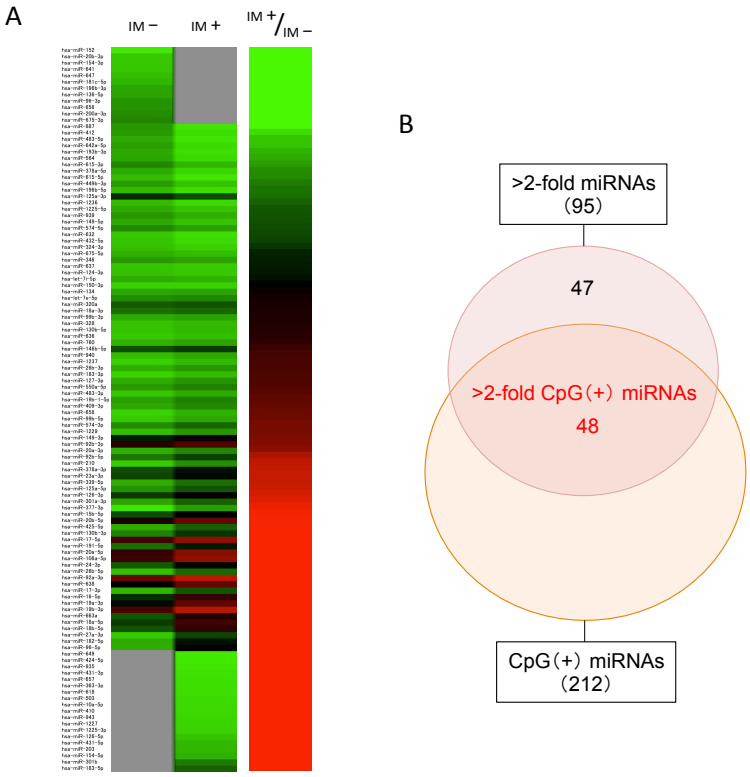


図 3　imatinib 処理による K562 細胞内 CpG アイランド保有 miRNA 発現変化についてのマイクロアレイ解析

(A)プロモーター領域に CpG アイランドを保有する miRNA のうち K562 細胞中で発現が認められた 114 の miRNA についてヒートマップを作成した。赤の明度が高いほど発現が高く，緑の明度が高いほど発現が低いことを示している。

(IM-：imatinib 未処理，IM+：imatinib 72 時間処理，IM+/IM-：発現量比)

(B)マイクロアレイで解析対象となった 886 miRNA 中, プロモーター領域に CpG アイランドを保有する 212 の miRNA と，imatinib により 2 倍以上の発現量を示した miRNA の関係をベン図として表したものである。

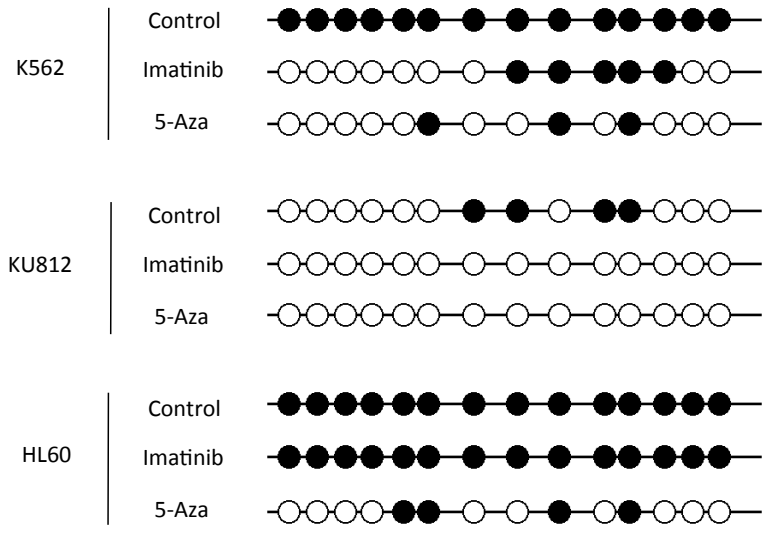


図 4　miR-203 プロモーター領域における DNA メチル化解析

それぞれの細胞株を imatinib, 5-Azacytidine (5-Aza)で 72 時間処理した後，DNA を抽出しバイサルファイト処理を行なって非メチル化シトシンを変換した。反応後の DNA を鋳型としてメチル化特異的 PCR 及びダイレクトシークエンスを行い，メチル化状態を解析した。黒丸はメチル化シトシン，白丸は非メチル化シトシンを示している。

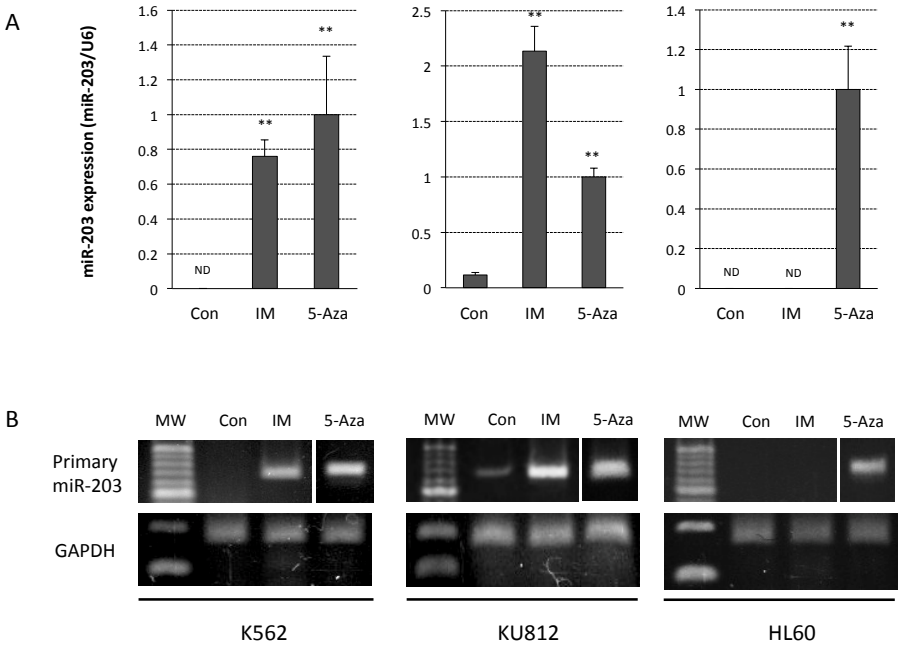


図 5　3 細胞株における成熟 miR-203 及び primary miR-203 (pri-miR-203)の発現解析

(A)imatinib 及び 5-Azacytidine で 72 時間処理した後の miR-203 の発現を解析した。miR-203 の発現量は内在性コントロール遺伝子である U6B により補正し, 5-Azacytidine 処理時の発現量に対する相対発現量として示している。(**p<0.01：Control に対しての p 値)

(B)RT-PCR 法による pri-miR-203 の発現解析結果を示している。内在性コントロールとして GAPDH も合わせて解析した。

(Con：Control，IM：imatinib，5-Aza：5-Azacytidine)

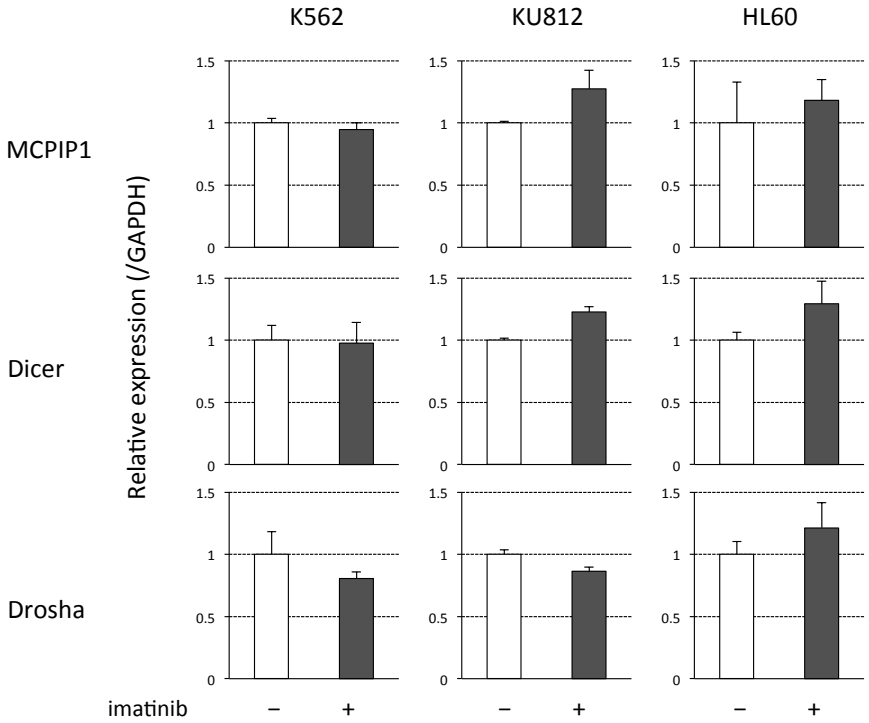


図 6　3 細胞株における imatinib 処理後の miRNA 代謝及び生合成関連遺伝子の発現量解析

72 時間の imatinib 処理後，miRNA の代謝(MCPIP1)及び生合成(Dicer，Drosha)に関わる遺伝子の発現を qRT-PCR 法により解析した。各遺伝子の発現量は内在性コントロール遺伝子である GAPDH により補正し，imatinib 未処理細胞の発現量に対する相対発現量として示している。

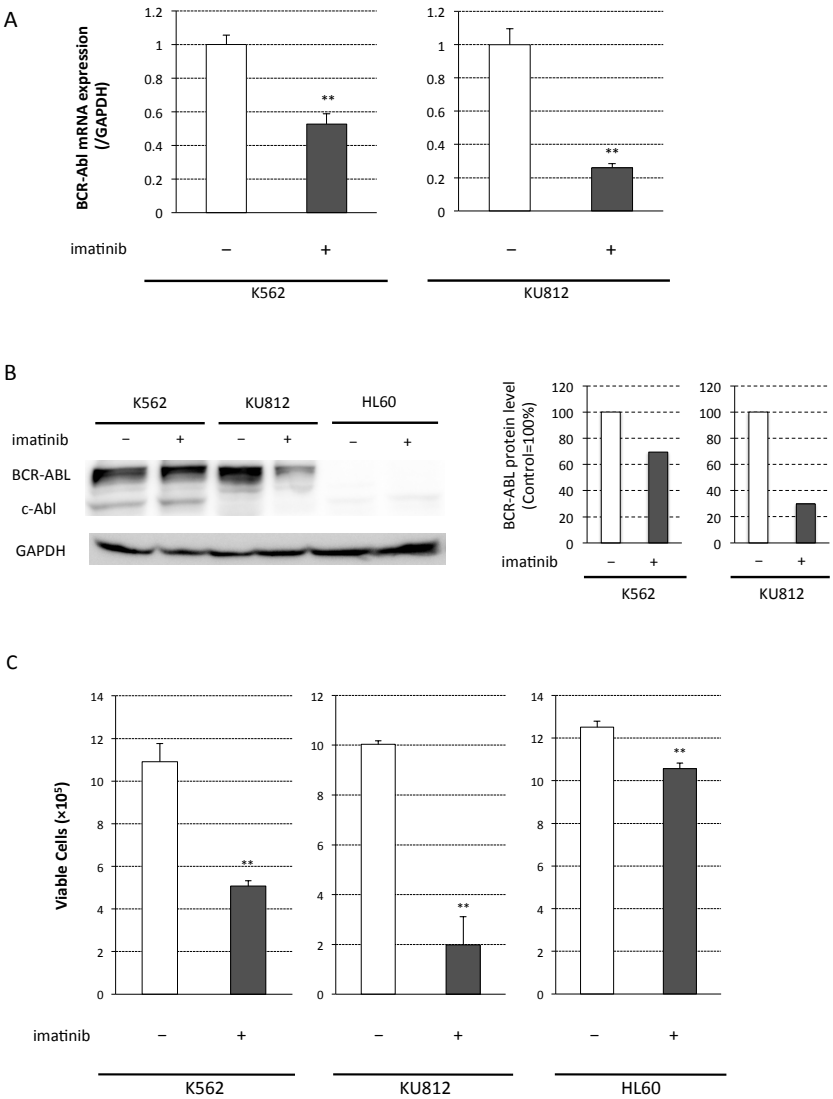


図 7　imatinib 処理後の BCR-ABL1 mRNA 及びタンパクの発現量解析

72 時間の imatinib 処理後，下記の解析を行った。

(A)BCR-ABL1 mRNA の発現量を qRT-PCR 法によって解析した。発現量は内在性コントロール遺伝子である GAPDH により補正し，imatinib 未処理細胞の発現量に対する相対発現量として示している。(**p<0.01：imatinib 未処理細胞に対しての p 値)

(B)BCR-ABL1 タンパクの発現量をウエスタンブロット法及び画像解析ソフト Image J を使用して解析した。画像解析は imatinib 未処理細胞での発現量に対する相対発現量として示している。

(C)トリパンブルー染色によって生細胞数を測定した。

(**p<0.01：imatinib 未処理細胞に対しての p 値)

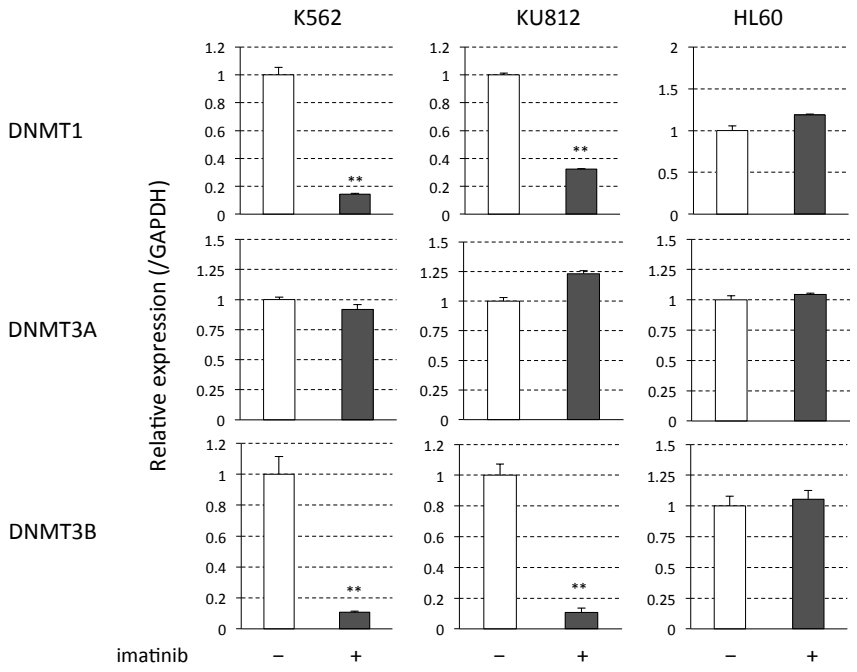


図 8　3 細胞株における imatinib 処理後の DNA メチル化酵素遺伝子の発現量解析

72 時間の imatinib 処理後，DNA メチル化酵素遺伝子(DNMT1, 3A, 3B)の発現を qRT-PCR 法により解析した。各遺伝子の発現量は内在性コントロール遺伝子である GAPDH により補正し，imatinib 未処理細胞の発現量に対する相対発現量として示している。(**p<0.01：imatinib 未処理細胞に対しての p 値)

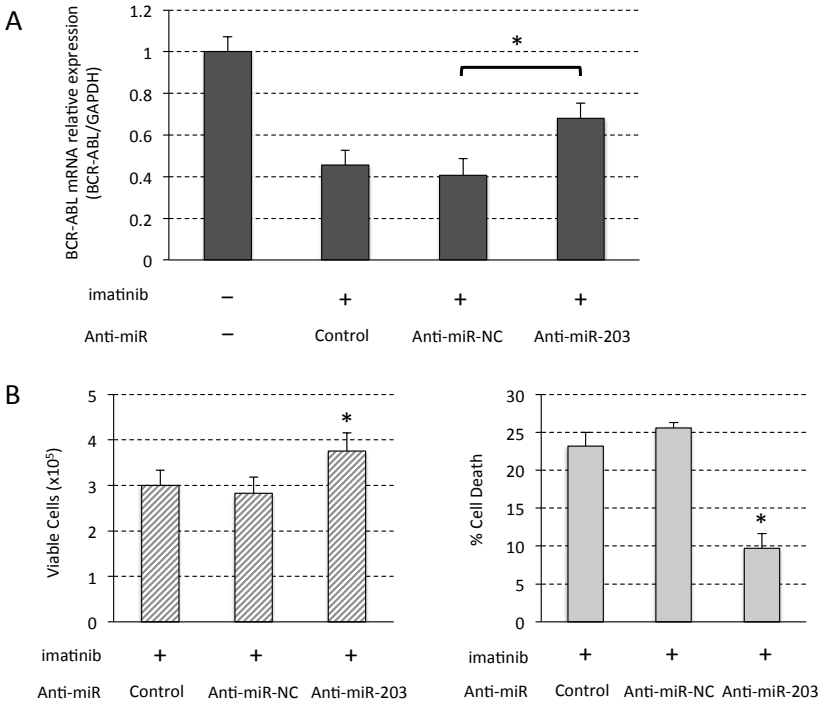


図 9　K562 細胞への anti-miR-203 トランスフェクションによる miR-203 の loss of function

anti-miR-203 及び anti-miR-NC(Negative Control)を 48 時間のトランスフェクション後，72 時間 imatinib 処理し下記の解析を行った。

(A)BCR-ABL mRNA の発現量を qRT-PCR 法により解析した。発現量は内在性コントロール遺伝子である GAPDH により補正し，imatinib 未処理細胞の発現量に対する相対発現量として示している。

(B)トリパンブルー染色によって生細胞数，死細胞数を測定し、死細胞率を算出した。

(*p<0.05：anti-miR-NC 導入細胞に対しての p 値)

Imatinib induces demethylation of miR-203 gene: An epigenetic mechanism of anti-tumor effect of imatinib

by

Tatsuki Shibuta

Submitted to Faculty of Medical Sciences of Kyushu University
in fulfillment for the degree of Doctor in Philosophy

Department of Health Sciences, Faculty of Medical Sciences,
Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

January 2014

Contents

1. Introduction P.1

2. Material & Methods

2.1 Cells culture and cell viability P.2

2.2 Analysis of gene expression P.3

2.3 Analysis of miR-203 promoter hypermethylation P.3

2.4 miRNA microarray P.4

2.5 Western blotting P.4

2.6 Transfection of anti-miR-203 . . . . . P.5

2.7 Statistical analysis P.5

3. Results

3.1 Prediction of miRNAs targeting *BCR-ABL1* mRNAs P.5

3.2 Microarray analysis of the CpG islands-associated miRNA expression P.5

3.3 Validation of miR-203 expression by Methylation-Specific PCR and RT-qPCR P.6

3.4 Modulation of BCR-ABL1 mRNA and BCR-ABL1 protein expression after imatinib treatment in CML cells P.7

3.5 Downregulation of *DNMT1* and *DNMT3B* after imatinib treatment in CML cells

3.6 Functional assay for loss of function of miR-203 . . . . . P.7

4. Discussion P.8

5. References P.10

6. Figures & Legends P.13

Abstract

MicroRNA (miRNA) is an important regulator of cellular proliferation, differentiation and death. Leukemia-specific signature of miRNAs suggests that epigenetic dysregulation of miRNAs is important for leukemogenesis. We focused on the role of DNA methylation of miR-203 which targets *BCR-ABL1* mRNA. The microarray analysis showed that 48 miRNAs of CpG-rich 212 miRNAs were upregulated over 2-fold after imatinib treatment. Imatinib induced the demethylation of the miR-203 promoter region, resulting in low expression of targeted *BCR-ABL1* gene, and loss of proliferation of leukemic cells. In conclusion, demthylation of miR-203 is one of the molecular mechanisms of imatinib-induced inhibition of BCR-ABL1-positive leukemic cells.

Keywords
CML, microRNA, miR-203, methylation, DNA methyltransferase

1. Introduction

Leukemia has been considered as the consequence of genetic alterations of oncogenes, antioncogenes, proliferation- or cellular death-related genes, and genes encoding transcription factor. These alterations are induced by mutations, translocations or deletions, and lead to the defects of gene functions, such as proliferation, differentiation and apoptosis. Chronic myelogenous leukemia (CML) is characterized by the chimeric gene, *BCR-ABL1*, which codes for a protein with constitutively increased tyrosine kinase activity. The signal transduction downstream of BCR-ABL1 protein promotes the cell proliferation. A tyrosine kinase inhibitor, imatinib mesylate (imatinib), suppresses the proliferation of CML cells by inhibiting specifically the activity of BCR-ABL1 proteins [1].

In the past several years, there are many reports demonstrating that epigenetic alterations correlate to the characteristics of tumor cells, including leukemia [2]. Epigenetic alteration is defined as the changes in the patterns of gene expression that occur without a change in the primary DNA sequence, including DNA methylation and histone modifications [3]. Most reports are about gene silencing caused by promoter methylation, and these epigenetic changes affect tumor progression [4-6]. DNA methylation is a covalent modification of adding a methyl group to the number 5 carbon of the cytosine in a CpG dinucleotide and inhibits the transcription of genes, and this reaction is catalyzed by DNA methyltransferase (DNMT) [7].

MicroRNAs (miRNAs) are noncoding RNAs 18 to 25 nucleotides in length that regulate a variety of biological processes by post-transcriptionally silencing target mRNA [8,9]. MiRNAs are first transcribed from the genome as long primary transcripts (pri-miRNAs). Pri-miRNAs are cleaved into hairpin-structured precursors (pre-miRNAs) by the complex composed of Drosha, DGCR8 and cofactors. Pre-miRNAs are then transported into the cytoplasm and processed by Dicer to become mature miRNAs. MiRNAs regulate several cellular functions including cell proliferation, differentiation, and apoptosis [10]. Thus, aberrant miRNAs expression, including upregulation of oncogenic miRNAs (oncomir), downregulation of tumor suppressor miRNAs (anti-oncomir), and miRNA deletion, contributes to tumorigenesis [11-14]. MiRNAs are also regulated by methylation of CpG islands within the promoter region of miRNAs [15]. The epigenetic disturbance causes the dysregulation of miRNAs and contributes to malignant transformation during leukemogenesis [16, 17].

There are several reports about correlation between CML and DNA methylation. The silencing or downregulation of miRNAs such as miR-15/16 [18], miR-31/155/564 [19], are involved in pathogenesis of CML [20, 21]. MiR-203 is epigenetically silenced in human *BCR-ABL1*-positive leukemic cell lines and primary CML cells by the methylation of promoter region [16]. Since miR-203 negatively regulates the expression of the ABL1 gene, which has a binding site to miR-203 in a 3′-untranslated region (3′UTR). The silencing of miR-203 by the methylation is a putative mechanism associated with the pathogenesis of *BCR-ABL1*-positive leukemias. Imatinib is highly effective to suppress *BCR-ABL1*-positive leukemic cells growth by down-regulating the expression of *BCR-ABL1* mRNA and protein [22, 23], however little is known about the effect of imatinib on miRNA expression profile.

In this study, our data show that imatinib upregulated expression of miRNAs which have CpG islands in its promoter and induced expression of epigenetically silenced miR-203. This is the first report showing that imatinib induces demethylation of miRNA involved in leukemogenesis of CML.

2. Materials and Methods

2.1 Cells culture and cell viability

The K562 and HL-60 cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (MD, USA), and the KU812 cell line was purchased from RIKEN Cell Bank (Ibaraki, Japan). Cells were plated at 2×10^5 cells/ml and maintained in RPMI 1640 (GIBCO, NY, USA) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO), and stored at 37˚C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2. These cells were treated with 1 μM imatinib mesylate (provided by Novartis Pharmaceutical Co., Ltd (Basel, Switzerland)). 5-Azacytidine was purchased from Sigma and used as the control for DNA demethylation at the 1μM concentration. At 72h, the viability was evaluated by cell counting following trypan blue exclusion method.

2.2 Analysis of gene expression

For RNA, 5×10^5 cells were suspended in RNAlater (Applied Biosystems (ABI), CA, USA) and stocked at -20°C. Total RNAs were extracted from these cell pellets using the mirVana miRNA Isolation Kit (ABI) according to the manufacturer's instructions. For mRNA and primary miRNA, cDNAs were synthesized using the RNA PCR Kit (Takara, Shiga, Japan). For a quantitative analysis of each gene expression, the amplification of cDNAs by the qRT-PCR method was done using SYBR Premix Ex Taq (Takara) and each primer (*BCR-ABL1*: forward primer, 5´-CAGACTGTCCACAGCATTC-3´, reverse primer, 5´-CTGAGGCTCAAAGTCA-GAT-3´, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): forward primer, 5´-TCACCAC-CATGGAGAAGGC-3´, reverse primer, 5´-GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA-3´, pri-miR-203: forward primer, 5´- GCTGGGTCCAGTGGTTCTTA-3´, reverse primer, 5´-GACTGTGACT-CTGACTCCA-3´) with a Thermal Cycler Dice (Takara). The amounts of *BCR-ABL1* expression were normalized with the level of GAPDH expression.

MiRNAs were transcribed to cDNAs using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ABI). Looped RT- primers specific for each miRNA were purchased and used according to the manufacturer's instructions (TaqMan MicroRNA Assays Kit, ABI). For detecting miRNAs, the amplification was done using Universal PCR Master Mix (ABI), and Thermal Cycler Dice (Takara). The amounts of each miRNA were normalized with the level of U6B. All experiments were run in triplicate and the average CTs were used for quantification. The relative quantification was analyzed by using a comparative CT method.

2.3 Analysis of miR-203 promoter hypermethylation

DNA from cells (1×10^6 cells) were extracted using TRIzol (Invitrogen, CA, USA). Conversion of unmethylated cytosine to uracil was performed with EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen, CA, USA). The methylation specific PCR (MSP) for the promoter of pri-miR-203 was done by using specific primers; methylated-MSP: forward, 5´-TTTAGACGAGACGGTT-CGGGC-3´, reverse, 5´-AAAATAACCCTAACTCAACGACCG-3´, unmethylated-MSP: forward, 5´-TTTAGATGAGATGGT TTGGGT-3´, reverse, 5´-AAAATAACCCTAACTCAA-CAACCA-3´. The direct sequencing of PCR products was done by capillary electrophoresis

using ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (ABI).

2.4 miRNA microarray

Microarray analysis was performed on the K562 cells. MiRNAs were extracted from K562 cells using the mirVana miRNA Isolation Kit (ABI). RNA quality and quantity was assessed using the Agilent 2100 bioanalyzer systems (Agilent Technologies, CA, USA) and Nanodrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, DE, USA), respectively. The miRNA microarray experiments were performed by using 3D-Gene miRNA Oligo Chip (Toray, Kamakura, Japan). Labeled miRNAs were hybridized with around 900 miRNA antisense probes spotted on the chip. Two biological replicates were done for each treatment, and the average intensity was calculated to represent the expression value of the miRNA. Each miRNAs quantity was calculated as relative values to the mixture of treated and non-treated sample.

2.5 Western blotting

Cells were lysed in radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer in the presence of proteinase inhibitor and phenylmethylsulfonyl fluoride. After centrifugation of lysates, supernatants were collected and stored at –20°C. Protein concentrations were determined with the BCA protein assay (Pierce, IL, USA). Twenty μg of proteins in the cell lysate was separated by 10% SDS-PAGE gel and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, MA, USA). The membrane was blocked at room temperature for 1 h in 5% skimmed milk diluted with PBS-Tween 20. The membrane was then incubated with anti-c-Abl primary antibody (1:1000) (Cell signaling, MA, USA) at 4°C overnight and anti-GAPDH primary antibody (1:1000) (Cell signaling) at room temperature for 2 h with shaking. After washing three times with PBS-Tween 20, the membrane was incubated with anti-rabbit horseradish peroxidase conjugate secondary antibody (1:1000) (Cell signaling) at room temperature for 2 h. The signals were visualized with an ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, NJ, USA), and analyzed LAS-4000 system (GE Healthcare).

2.6 Transfection of anti-miR-203

The anti-miR-203 and anti-miR-NC as a negative control (Ambion/ABI) at 25nM were transfected into K562 and KU812 cells using Xfect (Takara) followed by manufacture's protocol. The mixture of RNAs and reagent were dispensed into an empty 24-well plate (BD Biosciences, MA, USA). K562 and KU812 cells were then added into each well at a concentration of $2x10^5$ cells per well. After 48 h of cultures, transfected cells were used for the analysis.

2.7 Statistical analysis

The statistical analysis was performed by Student's paired two-tailed t-test, and *p*-values < 0.05 were considered to have statistical significance

3. Results

3.1 Prediction of miRNAs targeting *BCR-ABL1* mRNAs

Imatinib is very effective to suppress BCR-ABL-positive leukemic cells growth, and expression of *BCR-ABL1* mRNA and protein in vivo as well as in vitro, however little is known about the effect of imatinib on miRNA expression profile. We analyzed expression profiles of 886 miRNAs in K562 cells using the microarray method (supplementary Fig. 1). 95 miRNAs were upregulated and 23 were downregulated over 2-fold with imatinib treatment. We searched TargetScan 6.2 (http://www.targetscan.org) for candidate miRNAs that regulate *BCR-ABL1* mRNA (Fig. 1A), and validated its expressions by qRT-PCR. Interestingly, only miR-203 was obviously upregulated in these miRNAs, although other miRNAs were downregulated (Fig. 1B)

3.2 Microarray analysis of the CpG islands-associated miRNA expression

MiR-203 has CpG islands and is epigenetically silenced in CML [16]. To examine the effect of imatinib on the expression of miRNA, which have CpG islands in its promoter region,

we analyzed the expression of these miRNAs by microarray method. Out of 886 miRNAs, 212 (23.9%) have CpG islands within 5 kb upstream of the pre-miRNAs sequence by bioinformatic analysis (miRBase::Genomics), and 114 were confirmed its expression (Fig. 2A) Microarray analysis showed that 48 (22.6%) of these 212 miRNAs were upregulated over 2-fold with imatinib treatment (Fig. 2B). These data show miRNAs correlated to CpG islands were mainly upregulated, because 48 (50.5%) of 95 miRNAs that were upregulated over 2-fold has CpG island in their promoter region (Fig. 2B and supplementary Fig. 1).

3.3 Validation of miR-203 expression by Methylation-Specific PCR and RT-qPCR

As shown Fig.1C, epigenetically-silenced miR-203 was reexpressed after imatinib treatment, so we tested whether imatinib affects the methylation status of CpG islands in its promoter region. In two *BCR-ABL1*-positive leukemic cell lines (K562, KU812) and a *BCR-ABL1*-negative cell line (HL-60), CpG islands were heavily methylated in control culture (Fig. 3).

Imatinib demethylated CpG islands in the two *BCR-ABL1*-positive cell lines, K562 and KU812. On the other hand, the methylation status of CpG islands did not change in *BCR-ABL1*-negative HL-60 cells after imatinib treatment. DNA demethylating agent, 5-Azacytidine, induced demethylation in all cell lines.

We confirmed the expression of mature miR-203 in three cell lines (Fig. 4). In the presence of imatinib, the expression of mature miR-203 in K562 and KU812 cells was upregulated significantly ($p < 0.05$) compared to the control cultures (Fig. 4A). In HL-60 cells, correlated to the result of MSP direct sequence, imatinib did not induce miR-203 expression. 5-Azacytidine induced the expression of mature miR-203 in all cell lines. We analyzed the expressions of pri-miR-203 to confirm that mature miR-203 was newly produced by the demethylation of CpG islands. In K562 cells, imatinib induced pri-miR-203 expression (Fig. 4B). In KU812 cells, pri-miR-203 was expressed slightly in control cells, correlation to incomplete promoter methylation (Fig. 2), and imatinib upregulate pri-miR-203 expression. Furthermore, we analyzed the gene expressions of enzymes responsible to biogenesis and degradation of miRNAs. There are no changes in the expression of Dicer and Drosha (miRNA

biogenesis protein), and MCPIP1 (miRNA degradation protein [24]) (supplementary Fig. 2). Imatinib was not merely inducing DNA demethylation but upregulating mature miRNA expression.

3.4 Modulation of *BCR-ABL1* mRNA and BCR-ABL1 protein expression after imatinib treatment in CML cells

We analyzed the expression of the *BCR-ABL1* gene which is the target gene of miR-203. The expression of *BCR-ABL1* was inhibited with imatinib to 52% and 26% of the level in control cultures in K562 cells and KU812 cells, respectively (Fig. 5A). In accordance with *BCR-ABL1* mRNA levels, the proliferation of CML cells was inhibited to about 46% and 20% in K562 cells and KU812 cells, respectively (supplementary figure 3). Significant reductions of BCR-ABL1 protein levels after imatinib treatment in K562 cells and KU812 cells were confirmed using Western blot analysis, 30.8% and 70.3%, respectively (Fig. 5B, C).

3.5 Downregulation of *DNMT1* and *DNMT3B* after imatinib treatment in CML cells

We also analyzed the expression of *DNMT* mRNAs (*DNMT1*, *DNMT3A/3B*) that cause DNA methylation. The expressions of *DNMT1* and *DNMT3B* were significantly decreased after imatinib treatments in CML cell lines, and whereas *DNMT3A* was not changed (Fig. 6). The expression of *DNMT1* was decreased to 14.3% (K562 cells) and 32.4% (KU812 cells) of the level in control culture, and the expression of *DNMT3B* was decreased to 10.7% (K562 cells) and 10.8% (KU812 cells) of the level in control culture. In HL-60 cell lines, there were no changes in the expression of *DNMT* mRNAs.

3.6 Functional assay for loss of function of miR-203

To test the direct effect of miR-203 on BCR-ABL1 suppression after imatinib treatment, we used the loss of function analysis, using anti-miR-203. The levels of *BCR-ABL1* mRNA decreaesed to 45.5% and 40.6% with imatinib alone and imatinib plus anti-miR-NC, respectively (Fig. 7A). The addition of anti-miR-203 significantly increased the expression level to 68.1% ($p < 0.05$) in the K562 cell culture with imatinib treatment. To investigate of the cytological effect

of anti-miR-203 transfection, we measured viable and dead cells. The numbers of viable cells were increased 1.3 folds by transfection of anti-miR-203 compared to anti-miR-NC (Fig.7B), and dead cell ratio was significantly decreased by transfection of anti-miR-203 (9.7%) compared to anti-miR-NC (25.6%) (Fig.7C).

4. Discussion

MiRNAs play crucial roles in many processes in normal cells, such as proliferation, development, differentiation and apoptosis. Recently, many researchers have reported about the correlation between dysregulation of miRNAs and oncogenesis and demonstrated downregulation of tumor suppressor miRNA leads to oncogensis. MiR-34a is tumor suppressor miRNA regulated by p53 protein and often reported to be silenced in solid cancer [25]. Chim et al reported that miR-34 is also silenced in hematopoietic malignancies (chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma) [26]. MiR-193a was demonstrated to be silenced in non–small cell lung cancers [27] and acute myeloid leukemia (AML) [28]. Aberrant miR-203 silencing has reported in various tissues; oral cancer [29], hepatocellular carcinoma [30], multiple myeloma [31], MALT lymphoma [32]. In CML cells, miR-150, 151 are downregulated [33] and miR-203 is silenced by DNA methylation [16]. However, the regulation mechanisms of miRNA expression are little known.

In this study, we focused on the effect of imatinib on the expression of miRNA regulated by CpG islands. Methylation of CpG islands is regulated with the enzymes, DNA methyltransferase (DNMTs). DNMT1 maintains methylation status during cell divisions, while DNMT3A and DNMT3B are responsible for *de novo* methylation [7]. These DNMTs were aberrantly expressed under the presence of BCR-ABL1 protein in CML cells [34]. We observed that *DNMT1* and *DNMT3B* mRNA was decreased after imatinib treatment in CML cell lines (Fig. 6), probably resulted in demethylation of miR-203. On the other hand, the expression of Drosha and Dicer was not influenced with imatinib. We showed, for the first time, that imatinib up-regulated miR-203 by inducing demethylation of the promoter region of miR-203 in CML cells (Fig. 3, 4). Recently Nishioka et al. reported that low dose of imatinib (0.1nM) induced the expression of DNMT family in *FIP1L1/PDGFRα*-positive chronic eosinophilic leukemia cell

line (EOL-1), and they also showed high dose of imatinib (1nM) decreased its expression in short period (within 72 hours) [35]. These observations suggest the multiple pathways of imatinib effects.

The upregulation of miR-203 inversely related to *BCR-ABL1* mRNA level (Fig. 4, 5). On the 3' UTR of *ABL1* mRNA, there is the target sequence to be bound with miR-203. *ABL1* and *BCR-ABL1* mRNA are also targeted by miR-196s, miR-30s, miR-125, but the expression of miR-125 was decreased by imatinib (supplemental Fig.1) and the expression of miR-196 did not change after imatinib treatment (data not shown). Thus, miR-203 is the important miRNA to inhibit *ABL1* and *BCR-ABL1* mRNA, and imatinib-induced demethylation of miR-203 is the possible mechanism to suppress growth of BCR-ABL1-positive leukemic cells. This result corresponds to Bueno's report that miR-203 targets *ABL1* and *BCR-ABL1* mRNA. In addition, the relation between miR-203 silencing and survival ratio in multiple myeloma was reported [31], therefore methylation of miR-203 can be a target for cancer therapy as well as for diagnosis.

DNA demethylating agent, 5-azacytidine (Vidaza®), has been used for the therapy of myelodysplastic syndromes. In AML, clinical trials were performed by using 5-azacytidine and valproic acid or all-trans retinoic acid [36, 37]. For the hematopoietic malignancy, the therapy using DNA demethylating agent is a new era. In our microarray analysis, miRNAs relating to CpG islands, including miR-203, were upregulated with imatinib treatment (Fig. 2). Furthermore, we found 56 miRNAs of these upregulated miRNAs were tumor suppressor miRNAs previously reported. These data shows that imatinib is the inducer of DNA demethylation as well as the inhibitor of BCR-ABL1 protein in BCR-ABL1-positive leukemic cells.

In conclusion, miRNAs regulated by CpG islands include a number of tumor suppressor genes. Our results indicate the relation between aberrant DNA methylation of miRNAs and oncogenesis. Imatinib not only inhibits the activity of tyrosine kinase but induces DNA demethylation of miR-203 in CML cells. Further studies are needed about the availability of DNA demethylating agents as the treatment for CML.

5. References

[1] Branford S. Chronic myeloid leukemia: molecular monitoring in clinical practice. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2007;376-83.

[2] Florean C, Schnekenburger M, Grandjenette C, Dicato M, Diederich M. Epigenomics of leukemia: from mechanisms to therapeutic applications. Epigenomics. 2011;3(5):581-609.

[3] Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. Science. 1999;286(5439):481-6.

[4] San José-Eneriz E, Agirre X, Jiménez-Velasco A, Cordeu L, Martín V, Arqueros V, et al. Epigenetic down-regulation of BIM expression is associated with reduced optimal responses to imatinib treatment in chronic myeloid leukaemia. Eur J Cancer. 2009;45(10):1877-89.

[5] Kusy S, Cividin M, Sorel N, Brizard F, Guilhot F, Brizard A, et al. p14ARF, p15INK4b, and p16INK4a methylation status in chronic myelogenous leukemia. Blood. 2003;101(1):374-5.

[6] Yang H, Liang H, Yan JS, Tao R, Hao SG, Ma LY. Down-regulation of hematopoiesis master regulator PU.1 via aberrant methylation in chronic myeloid leukemia. Int J Hematol. 2012;96(1):65-73.

[7] Wu SC, Zhang Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010;11(9):607-20.

[8] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. Nat Rev Genet. 2010;11(9):597-610.

[9] Suzuki HI, Miyazono K. Emerging complexity of microRNA generation cascades. J Biochem. 2011;149(1):15-25.

[10] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004;116(2):281-97.

[11] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. Nat Rev Cancer. 2006;6(4):259-69.

[12] Osada H, Takahashi T. MicroRNAs in biological processes and carcinogenesis. Carcinogenesis. 2007;28(1):2-12.

[13] Fabbri M, Garzon R, Andreeff M, Kantarjian HM, Garcia-Manero G, Calin GA. MicroRNAs and noncoding RNAs in hematological malignancies: molecular, clinical and therapeutic implications. Leukemia. 2008;22(6):1095-105.

[14] Kong YW, Ferland-McCollough D, Jackson TJ, Bushell M. microRNAs in cancer management. Lancet Oncol. 2012;13(6):e249-58.

[15] Kozaki K, Inazawa J. Tumor-suppressive microRNA silenced by tumor-specific DNA hypermethylation in cancer cells. Cancer Sci. 2012;103(5):837-45.

[16] Bueno MJ, Pérez de Castro I, Gómez de Cedrón M, Santos J, Calin GA, Cigudosa JC, et al. Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. Cancer Cell. 2008;13(6):496-506.

[17] Agirre X, Vilas-Zornoza A, Jiménez-Velasco A, Martin-Subero JI, Cordeu L, Gárate L, et al. Epigenetic silencing of the tumor suppressor microRNA Hsa-miR-124a regulates CDK6 expression and confers a poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. Cancer Res. 2009;69(10):4443-53.

[18] Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik SE, Shimizu M, et al. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(13):5166-71.

[19] Rokah OH, Granot G, Ovcharenko A, Modai S, Pasmanik-Chor M, Toren A, et al. Downregulation of miR-31, miR-155, and miR-564 in chronic myeloid leukemia cells. PLoS One. 2012;7(4):e35501.
[20] Pelosi E, Labbaye C, Testa U. MicroRNAs in normal and malignant myelopoiesis. Leuk Res. 2009;33(12):1584-93.
[21] Scholl V, Hassan R, Zalcberg IR. miRNA-451: A putative predictor marker of Imatinib therapy response in chronic myeloid leukemia. Leuk Res. 2012;36(1):119-21.
[22] Radujkovic A, Schad M, Topaly J, Veldwijk MR, Laufs S, Schultheis BS, et al. Synergistic activity of imatinib and 17-AAG in imatinib-resistant CML cells overexpressing BCR-ABL--Inhibition of P-glycoprotein function by 17-AAG. Leukemia. 2005;19(7):1198-206.
[23] Kasper B, Fruehauf S, Schiedlmeier B, Buchdunger E, Ho AD, Zeller WJ. Favorable therapeutic index of a p210(BCR-ABL)-specific tyrosine kinase inhibitor; activity on lineage-committed and primitive chronic myelogenous leukemia progenitors. Cancer Chemother Pharmacol. 1999;44(5):433-8.
[24] Suzuki HI, Arase M, Matsuyama H, Choi YL, Ueno T, Mano H, et al. MCPIP1 ribonuclease antagonizes dicer and terminates microRNA biogenesis through precursor microRNA degradation. Mol Cell. 2011;44(3):424-36.
[25] Wong KY, Yu L, Chim CS. DNA methylation of tumor suppressor miRNA genes: a lesson from the miR-34 family. Epigenomics. 2011;3(1):83-92.
[26] Chim CS, Wong KY, Qi Y, Loong F, Lam WL, Wong LG, et al. Epigenetic inactivation of the miR-34a in hematological malignancies. Carcinogenesis. 2010;31(4):745-50.
[27] Heller G, Weinzierl M, Noll C, Babinsky V, Ziegler B, Altenberger C, et al. Genome-wide miRNA expression profiling identifies miR-9-3 and miR-193a as targets for DNA methylation in non-small cell lung cancers. Clin Cancer Res. 2012;18(6):1619-29.
[28] Gao XN, Lin J, Li YH, Gao L, Wang XR, Wang W,et al. MicroRNA-193a represses c-kit expression and functions as a methylation-silenced tumor suppressor in acute myeloid leukemia. Oncogene. 2011;30(31):3416-28.
[29] Kozaki K, Imoto I, Mogi S, Omura K, Inazawa J. Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. Cancer Res. 2008;68(7):2094-105.
[30] Furuta M, Kozaki KI, Tanaka S, Arii S, Imoto I, Inazawa J. miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. Carcinogenesis. 2010;31(5):766-76.
[31] Wong KY, Liang R, So CC, Jin DY, Costello JF, Chim CS. Epigenetic silencing of MIR203 in multiple myeloma. Br J Haematol. 2011;154(5):569-78.
[32] Craig VJ, Cogliatti SB, Rehrauer H, Wündisch T, Müller A. Epigenetic silencing of microRNA-203 dysregulates ABL1 expression and drives Helicobacter-associated gastric lymphomagenesis. Cancer Res. 2011;71(10):3616-24.
[33] Agirre X, Jiménez-Velasco A, San José-Enériz E, Garate L, Bandrés E, Cordeu L, et al. Down-regulation of hsa-miR-10a in chronic myeloid leukemia CD34+ cells increases USF2-mediated cell growth. Mol Cancer Res. 2008;6(12):1830-40.
[34] Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, Akashi K, Fukumaki Y, Niho Y, et al. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. Blood. 2001;97(5):1172-9.

[35] Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Udaka K, Yokoyama A. Imatinib causes epigenetic alterations of PTEN gene via upregulation of DNA methyltransferases and polycomb group proteins. Blood Cancer J. 201;1(12):e48.
[36] Soriano AO, Yang H, Faderl S, Estrov Z, Giles F, Ravandi F, et al. Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. Blood. 2007;110(7):2302-8.
[37] Raffoux E, Cras A, Recher C, Boëlle PY, de Labarthe A, Turlure P, et al. Phase 2 clinical trial of 5-azacitidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in patients with high-risk acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome. Oncotarget. 2010;1(1):34-42.

6. Figures & Legends

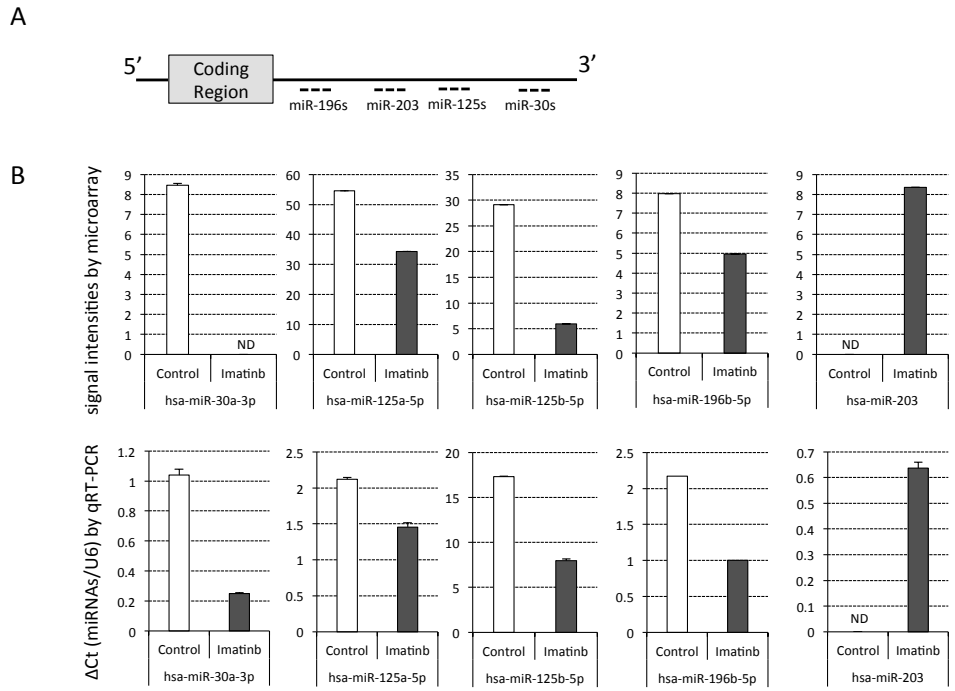


Figure 1

The expression change of miRNAs targeting *BCR-ABL1* mRNA after imatinib treatment in K562 cells. (A) The map of putative miRNA-binding sites in BCR-ABL1 3′UTR. TargetScan was used to predict miRNA-binding sites. (B) Comparison between microarray and qRT-PCR data in K562 cells after 72 h imatinib treatment (black column) and control (white column). Signal intensities by microarray and $2^{-\Delta Ct}$ (ΔCt = Ct target gene - Ct U6B) by qRT-PCR are shown. (ND; not detected)

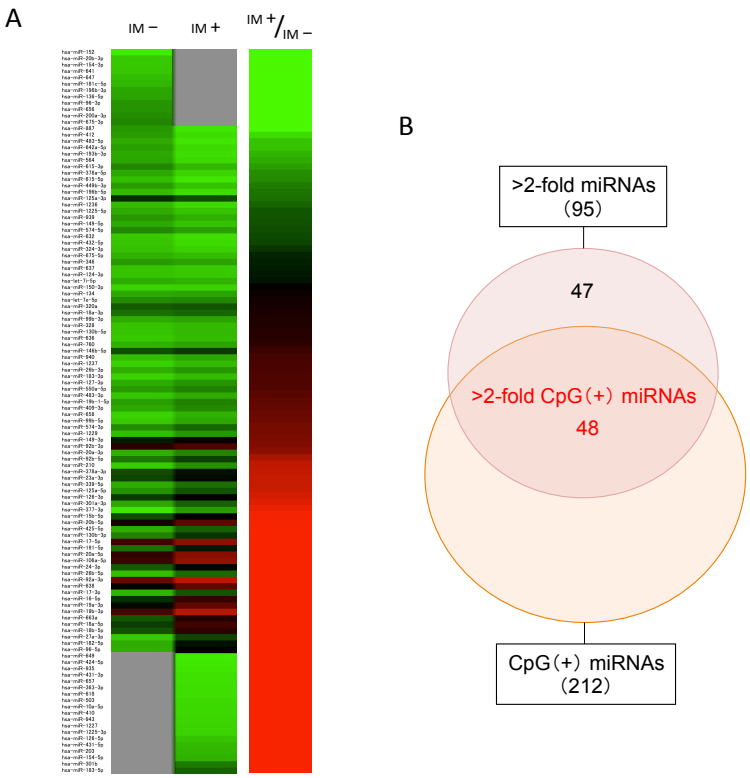


Figure 2

Microarray analysis of CpG island-associated miRNA after imatinib treatment in K562 cells.(A) The expression profiles of miRNA in K562 cells. Heatmap of 114 miRNA found expressed in control or imatinib-treated sample is depicted by color bars. Red and green colors indicate upregulated or downregulated, respectively. IM -, no-treated K562 cells; IM +, 72h imatinib-treated K562 cells; IM +/IM -, relative expression ratio (B) Venn-diagram of miRNAs upregulated over 2-fold and related to CpG islands.

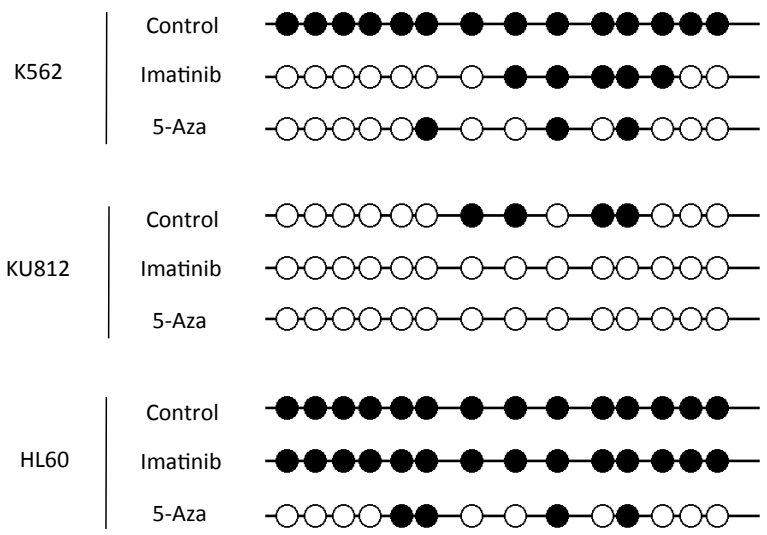


Figure 3

Methylation status at CpG dinucleotides in miR-203 promoter region. Two CML cell lines (K562, KU812) and AML cell line (HL-60) were treated by 1μM imatinib (IM) for 72 hours. 5-Azacytidine (5-Aza) is the reference compound for demethylation. After each treatment, bisulfite sequencing of the miR-203 upstream region was done. Black and white circles represent methylated and unmethylated CpG islands, respectively.

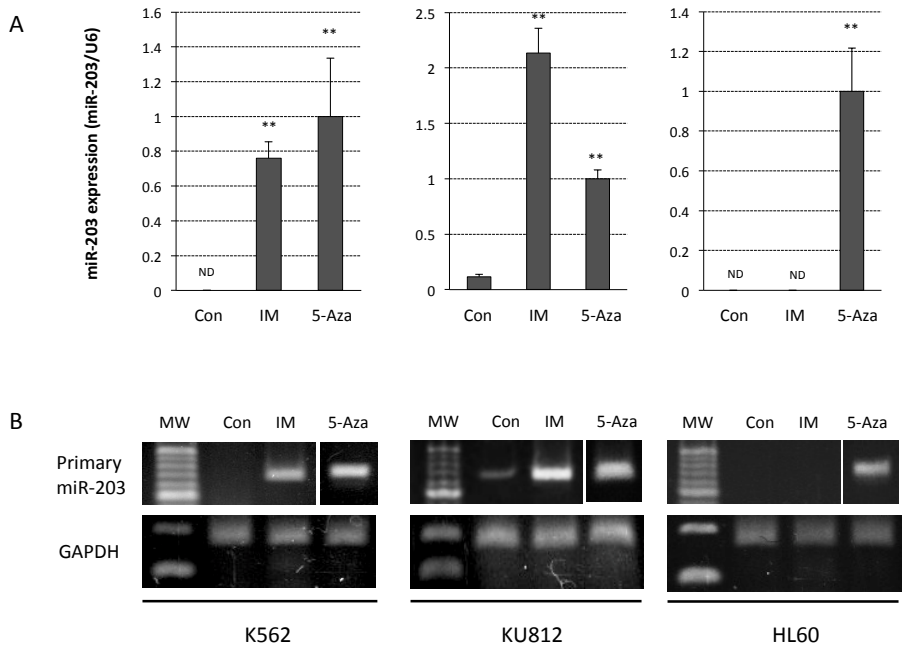


Figure 4

miR-203 was upregulated after imatinib treatment in CML cell lines. Two CML cell lines (K562, KU812) and AML cell line (HL-60) were treated by 1μM imatinib (IM) for 72 hours. 5-Azacytidine (5-Aza) is the reference compound for demethylation. After each treatment, total RNA was extracted and converted to cDNA. (A) Mature miR-203 was confirmed by qRT-PCR, and the expression level of miR-203 was normalized by U6B (ND; not detected). Data show the value relative to the level in the culture treated by 5-azacytidine (5-Aza) and as the mean ± SD from three experiments. Statistical analysis was performed using Student's two-tailed *t*-test. (**$p < 0.01$, compared with expression in control culture) (B) Pri-miR-203 was confirmed by RT-PCR. GAPDH is internal control.

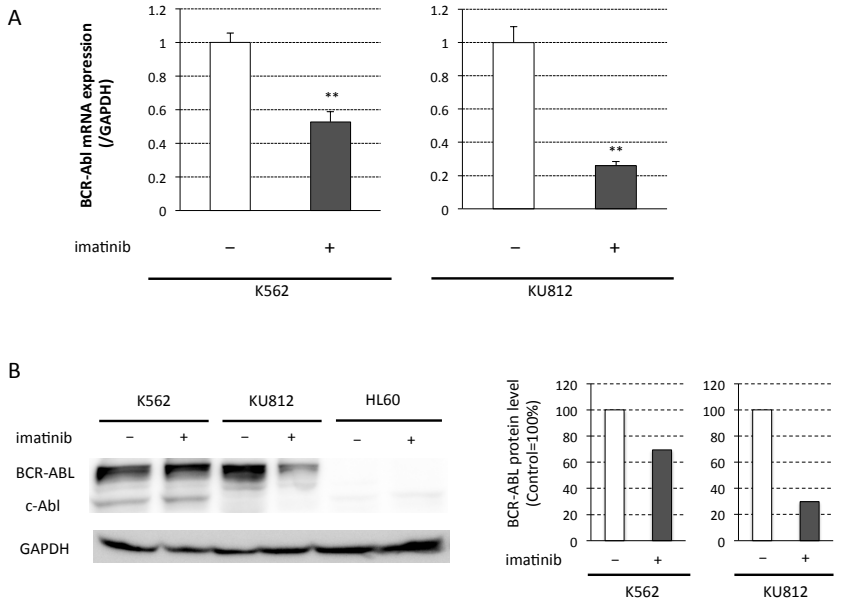


Figure 5

Down-regulated expression of BCR-ABL1 after imatinib treatment. Two CML cell lines (K562, KU812) were treated by 1μM imatinib for 72 hours. (A) After each treatment, total RNA was extracted and converted to cDNA. *BCR-ABL1* mRNA was confirmed by qRT-PCR, and the expression level of *BCR-ABL1* mRNA was normalized with GAPDH. Data show relative values to the level on the control culture and as the mean ± SD from three experiments. Statistical analysis was performed using Student's two-tailed *t*-test. (**$p < 0.01$, compared with expression in control culture) (B) Protein expression of BCR-ABL1, c-Abl and GAPDH were quantified by Western blot analysis. Total proteins were prepared from each sample, and each lane was loaded with the equal quantity (20μg) of protein sample. (C) The quantification of BCR-ABL1 protein was carried out using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

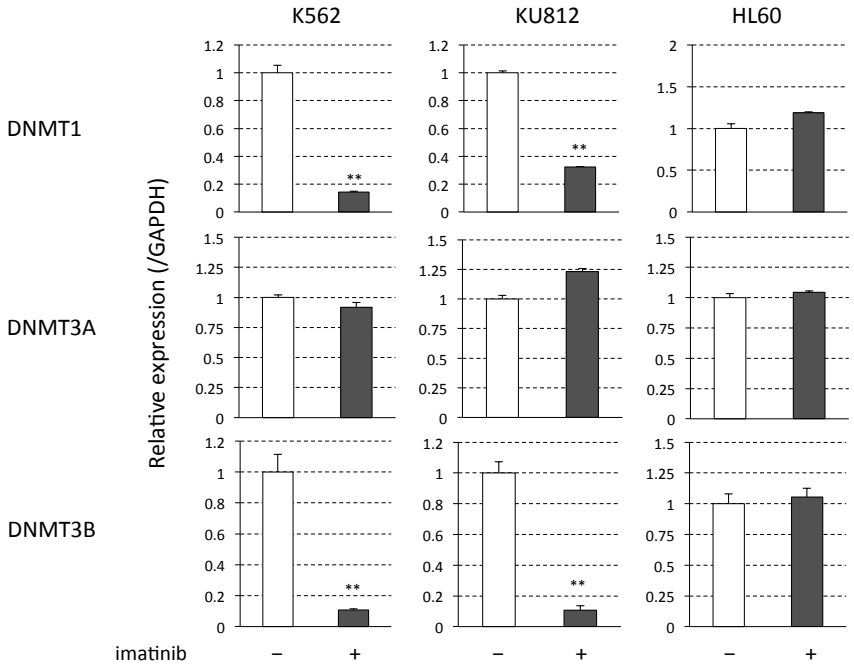


Figure 6

DNMTs (DNMT1, 3A, 3B) mRNA expression after imatinib treatment. Two CML cell lines (K562, KU812) and AML cell line (HL-60) were treated by 1μM imatinib for 72 hours. After each treatment, total RNA was extracted and converted to cDNA. Each mRNA was confirmed by qRT-PCR, and the expression level was normalized by GAPDH. Data show relative values to the level on the control culture and as the mean ± SD from three experiments. Statistical analysis was performed using Student's two-tailed *t*-test. (**$p < 0.01$, compared with expression in control culture)

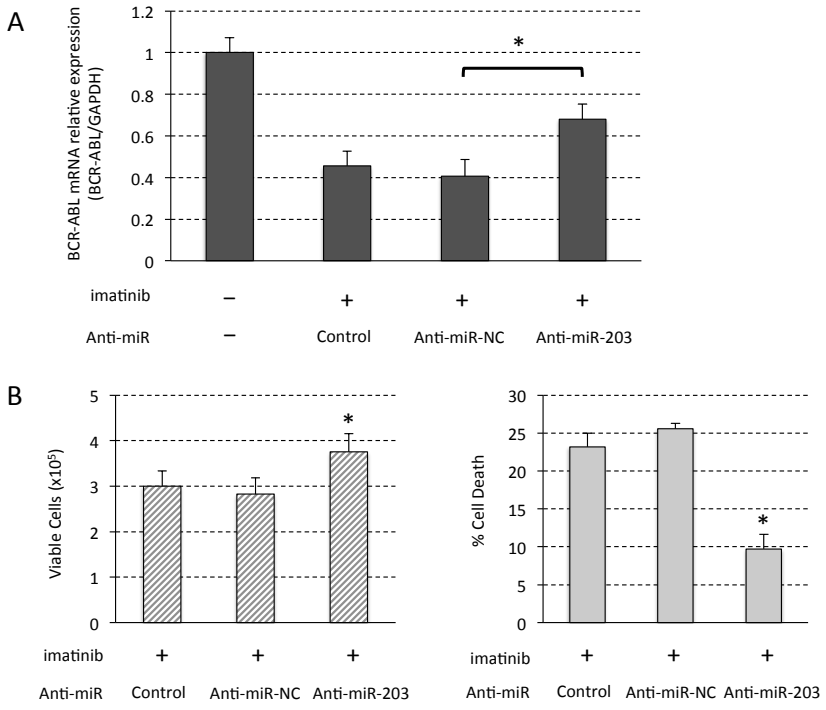
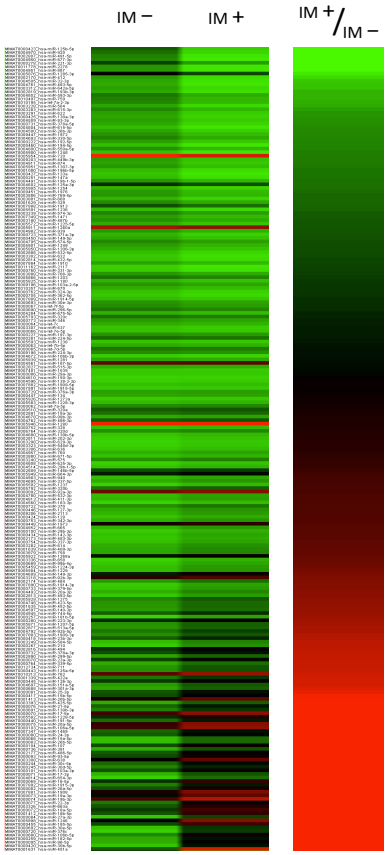


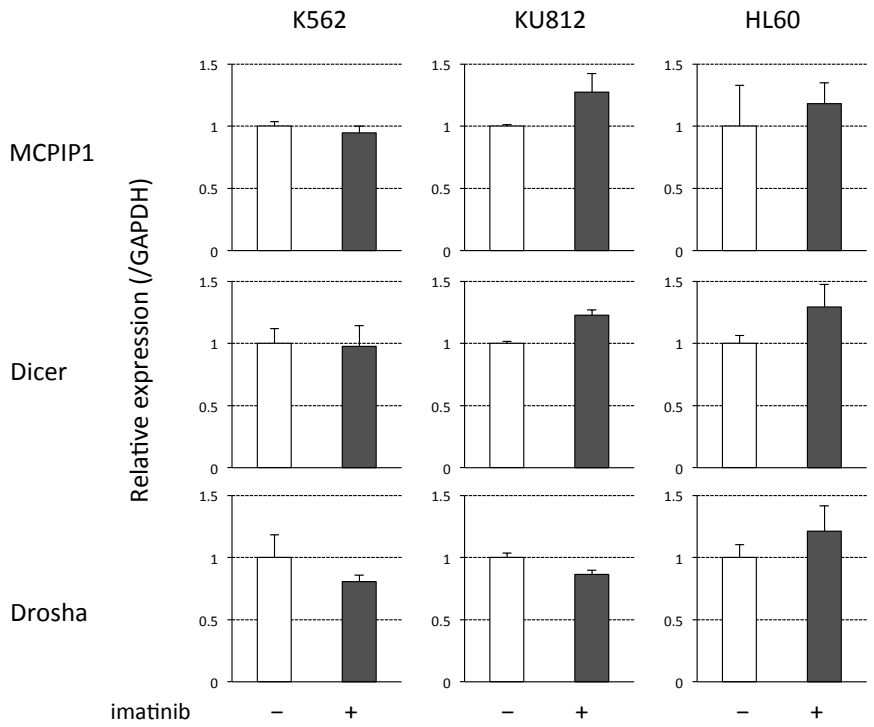
Figure 7

The effects of anti-miR-203 on K562 cells. K562 cells were transfected with anti-miR-NC or anti-miR-203 (25 nM) for 48 h, and were treated by imatinib for 72 h. (A) The expression of *BCR-ABL1* mRNA was analyzed after anti-miRNA transfection. The levels of *BCR-ABL1* mRNA of each sample were normalized with GAPDH and the relative values to the level on the control culture were shown. (B) Viable cell count and the ratio of dead cells after transfection. Data show as the mean ± SD from two experiments. Statistical analysis was performed using Student's two-tailed *t*-test. (*$p < 0.05$)



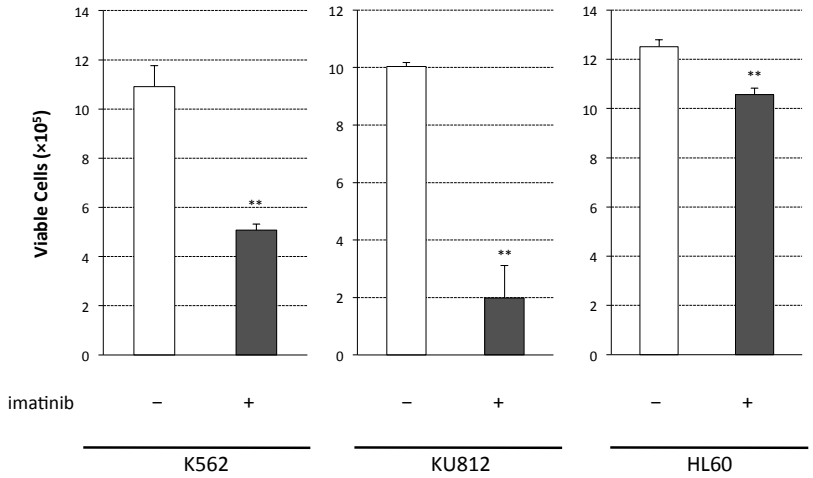
Supplemental figure 1

Microarray analysis of whole miRNAs after imatinib treatment in K562 cells. The expression profiles of miRNA in K562 cells. Heatmap of 448 miRNA found expressed in control and imatinib-treated sample is depicted by color bars. Red and green colors indicate upregulated or downregulated, respectively. IM -, no-treated K562 cells; IM +, 72h imatinib-treated K562 cells; IM +/IM -, relative expression ratio.



Supplemental figure 2

The mRNA expression of miRNA biogenesis-related enzymes. Two CML cell lines (K562, KU812) and AML cell line (HL-60) were treated by 1μM imatinib (IM) for 72 hours. After each treatment, total RNA was extracted and converted to cDNA. (A) MCPIP1 (miRNA degradation protein), (B) Dicer and (C) Drosha (miRNA biogenesis protein). Each mRNA was confirmed by qRT-PCR, and the expression level was normalized by GAPDH. Data show relative values to the level on the control culture and as the mean ± SD from three experiments.



Supplemental figure 3

Viable cell counts after imatinib with/without HDIs. The viable cells of three leukemia cell lines were counted after imatinib (IM) treatment for 72 hours by using the trypan blue exclusion method. Data are shown as the mean ± SD from three experiments. Statistical analysis was performed using Student's two-tailed t-test. (**$p < 0.01$, compared with expression in control culture)