

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

氏 名：濫田 樹

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

(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))

区 分：甲

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

microRNA (miRNA)は 18~25 塩基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 そのものを分解し、mRNA の働きを抑制的に制御する。近年、慢性骨髄性白血病(CML)細胞中で miR-203 がプロモーター領域のメチル化により発現が抑制されていることが報告され、エピジェネティックな機序による miRNA の発現異常が造血器腫瘍の病態に影響を与えていると考えられている。

本研究では CML の第一選択薬剤である imatinib(Glivec[®])が CML 由来株化細胞の miRNA 発現に与える影響を解析し、miRNA プロモーター領域のメチル化に焦点を当て、抗腫瘍性 miRNA、特に miR-203 の発現に対して imatinib が及ぼすエピジェネティック制御変動を解析した。

【方法】

CML 由来株化細胞である K562 及び KU812 を 1 μ M の濃度の imatinib で 72 時間処理し、細胞数をトリパンブルー染色でカウント後、DNA 及び RNA をそれぞれ抽出した。K562 細胞から抽出した total RNA は miRNA microarray 解析を行い、miRNA 全体の発現量変化を確認した。さらに BCR-ABL mRNA を標的とする複数の miRNA を選別し、それぞれの発現量を RT-qPCR 解析によって解析した。抽出した DNA はバイサルファイト処理及びメチル化特異的 PCR を行った後、DNA シークエンス解析によって miR-203 のプロモーター領域における DNA メチル化状態の解析を行った。miR-203 の標的となる BCR-ABL mRNA 及びそのタンパクについて imatinib 処理後の発現量の変化を RT-qPCR 及びウエスタンブロッティングによって解析した。K562 及び KU812 細胞に anti-miR-203 を導入し imatinib 処理することで miR-203 の機能を阻害し BCR-ABL の発現に与える影響について評価した。

【結果】

1 μ M の imatinib による K562 細胞の処理後に実施した miRNA microarray 解析によって 95 の miRNA が 2 倍以上の上昇、23 の miRNA が 2 倍以下の低下を示していた。さらに BCR-ABL mRNA を標的とする miRNA を in silico 解析(TargetScan)により抽出した後、RT-qPCR 解析を行い microarray 解析の結果と比較した。抽出した miRNA のうち miR-203 でのみ発現の上昇が確認され、imatinib によって miR-203 の発現制御状態が変化していることが予測された。miR-203 は CML においてプ

ロモーターメチル化により発現が抑制されていると報告されていたためメチル化状態の解析を行ったところ、imatinib 処理後に部分的に脱メチル化が生じていることが確認された。

imatinib 処理後の BCR-ABL mRNA 及びタンパクの発現量を解析したところ、いずれも CML 細胞では発現低下が確認された。また同様に処理した細胞に anti-miR-203 を導入することにより BCR-ABL mRNA の発現量が 28%回復した。

DNA メチル化を触媒する DNA methyltransferase (DNMT)タンパク群に焦点を当て mRNA レベルで発現量を解析したところ、DNMT1 及び 3B において有意な発現低下が見られた。

【考察】

チロシンキナーゼの阻害剤である imatinib が miR-203 の発現制御状態を変化させ、さらに発現が上昇した miR-203 が BCR-ABL mRNA を標的として機能していることを示した。本研究結果から、miR-203 は BCR-ABL mRNA を制御する重要な miRNA であり、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。

imatinib による脱メチル化機序の解明についてはさらなる検討が必要であるが、CML 細胞中で miR-203 同様に DNA メチル化の影響を受ける miRNA や mRNA についての解析や、さらには他の腫瘍細胞でも生じている DNA メチル化と miRNA の関連の解析は、今後の腫瘍診断・治療に新たな展開をもたらすと期待される。

【結語】

imatinib がチロシンキナーゼを阻害した後の作用メカニズムの 1 つとして miR-203 の発現上昇を示し、BCR-ABL mRNA を標的として機能することを明らかにした。miR-203 は CML における新たな診断・治療法の開発の標的として有用であると考えられた。