

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16541

研究課題名（和文）多発性骨髄腫細胞におけるRNAメチル化を介したmicro RNA発現異常の解明

研究課題名（英文）Aberrant micro RNA expression via RNA methylation in multiple myeloma cells

研究代表者

笠松 哲光（Kasamatsu, Tetsuhiro）

群馬大学・大学院保健学研究科・助教

研究者番号：60737542

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：多発性骨髄腫（MM）細胞株におけるmature miRNAのm6Aメチル化をmiR-137に着目して解析した。プロテアソーム阻害薬の添加によりmiR-137のm6Aメチル化比率の上昇とmiR-137発現量の発現維持が確認できた。MM細胞株ではm6Aメチル化酵素METTL3のmRNA発現は低発現であり、一方で脱m6Aメチル化酵素FTOおよびALKBH5のmRNAは発現が維持されていた。また、プロテアソーム阻害薬の添加により脱m6Aメチル化酵素のmRNAの低下が認められたことから、MM細胞におけるm6Aメチル化制御は脱m6Aメチル化酵素群の発現により制御されることが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究にて、miRNAの発現が転写後修飾であるm6Aメチル化により制御されることが示唆された。今後、m6Aメチル化修飾を受けるさらなるmiRNAの同定や薬剤耐性との関連を解明することで、腫瘍におけるmiRNAの発現異常解明へとつながることが予想される。さらに、m6Aメチル化を対象とした新たな治療開発およびバイオマーカーとしての応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：We analyzed m6a methylation of mature miRNAs in multiple myeloma (MM) cell lines with a focus on miR-137. Treatment of proteasome inhibitors increased the m6A methylation ratio of miR-137 and maintained the expression level of miR-137. mRNA expression of m6A methyltransferase METTL3 was low in the MM cell line, while mRNA expression of m6A demethylase FTO and ALKBH5 was maintained. In addition, the addition of proteasome inhibitors decreased the mRNA expression of m6A demethylases. Our results suggested that the regulation of m6A methylation in MM cells is regulated by the expression of m6A demethylases.

研究分野：血液検査学

キーワード：micro RNA m6Aメチル化 多発性骨髄腫

1. 研究開始当初の背景

MMは比較的高齢者にみられる形質細胞性腫瘍で、新規治療の導入により50%生存期間が改善してきているが、ほとんどの患者は早晚化学療法に抵抗性となり、未だ治癒が望めない。そこで、さらなる治療成績の向上および予後予測マーカーの開発が社会的に求められている。

miRNAはprimary miRNA(pri-miRNA)からpremature miRNA(pre-miRNA)を経てmature miRNAとなり、他の様々な遺伝子の発現を制御しているが、miRNA自体の調節メカニズムは明らかになっていない。申請者らは、MM細胞において、mature miRNAとpri-miRの発現乖離を認め、miRNAの生成に直接関与するDROSHAやDICERの発現量を検討したが異常を認めなかった。近年miRNAの生成過程にRNAのメチル化が関与しているといった報告があり、MM細胞におけるmiRNA発現異常にm6A RNAメチル化が関与していると推察した。

2. 研究の目的

本研究ではこれらの点をふまえ、MM細胞におけるmiRNA発現制御とRNAメチル化機序の関係について以下の点を解明することを目的とする。

- (1) MM細胞の各miRNA成熟段階におけるメチル化状態の解析と各miRNA発現およびメチル化との関連の解明。
- (2) miRNAメチル化と抗MM腫瘍薬の作用との関係

3. 研究の方法

(1) MM細胞におけるメチル化によるmiRNA発現制御の解析

RNA免疫沈降法(RNA immunoprecipitation; RIP)を応用したqPCRによるN6-メチルアデノシン(m6A)修飾pri-miR・miRNAの解析法の確立とm6A関連酵素mRNAの発現解析

・各MM細胞株より抽出したmiRNAを含むTotal RNA分離し、抗m6A抗体を用いたRNA免疫沈降法(RIP法)にてm6A修飾を受けたRNAを分離した。逆転写後、我々が現在ターゲットとしているmiRNA-29およびmiRNA-34ファミリーのプライマーを用いたqPCR法によりメチル化pri-miRおよびmiRNAを同定する。また、次世代シーケンスを用いて網羅的にmiRNAの発現量を解析した。

また、並行して各MM細胞株のm6Aメチル化転移酵素METTL3、m6A脱メチル化酵素FTO、ALKBH5の発現量をqPCR法にて同定し、非骨髄腫細胞株と比較した。

(2) miRNAメチル化と抗MM腫瘍薬の作用との関係

抗MM腫瘍薬添加によるメチル化pri-miR・miRNAの変化の解析

・現在、MM治療に汎用されているプロテアソーム阻害薬をMM細胞株に添加し、RIP法にてメチル化miRNAの変化を解析した。また、並行してm6Aメチル化転移酵素METTL3、m6A脱メチル化酵素FTO、ALKBH5のmRNA発現量を比較し、プロテアソーム阻害薬によるm6Aメチル化制御への影響を検討した。

m6A脱メチル化酵素FTO、ALKBH5ノックダウンによる薬剤感受性への影響

・siRNAによりFTO・ALKBH5をノックダウンし、プロテアソーム阻害薬感受性への影響を、セルカウンティングキット8(CCK-8)を用いて生細胞率を比較し、検討を行った。

4. 研究成果

miR-29aの発現量とm6aメチル化量を比較したところ、両発現量の間に関連関係は認められなかった。miR-34aについては検討したすべてのMM細胞株でm6aメチル化を認めなかった。miR-34aの配列を再確認したところ、m6A修飾共通配列と考えられる3塩基から4塩基の配列パターンが認められず、m6aメチル化による制御を受けないものと推測される。

引き続き、miR-29aおよびmiR-34aの初期転写物であるprimary miRNA(pri-miR)についても同様に検討を行った。MM細胞株におけるpri-miR-29aおよびpri-miR-34aの発現量とmatureなmiR-29aおよびmiR-34aの発現量を比較したところ、pri-miRが高発現にもかかわらずmature miRが低発現のままであり、乖離があることが確認された。しかし、pri-miRが高いものほど各pri-miRのm6a修飾量も高く、matureなmiR-29a・miR-34aとpri-miR-29a・pri-miR-34aの発現量の乖離にm6a修飾量は関係していないと予測される。

MM細胞株におけるm6aメチル化を媒介するメチル化酵素METTL3および脱メチル化酵素FTO、ALKBH5のmRNAの発現量をqPCR法にて比較した。MM細胞株ではm6Aメチル化酵素であるMETTL3の発現が非MM細胞株に比べ低い株が多く、薬剤添加によりm6Aメチル化量の増加が認められてもののMETTL3には変化が認められなかった。一方で、m6A脱メチル化酵素FTOとALKBH5のmRNA発現量は急性骨髄性白血病細胞株HL-60に比べると高く、ボルテゾミブ添加により減少が認められた。

最も METTL3 発現が高く、FTO・ALKBH5 が比較低発現な MM 細胞株 KMS12BM について m6a 抗体を用いた RNA 免疫沈降を行い、免疫沈降前のものを対照として micro RNA の m6a メチル化量を次世代シーケンスにより網羅的に検討を行った。次世代シーケンスの結果より、免疫沈降前と比較し沈降後のサンプルで 50 倍以上増加し、m6a 修飾が高いと予想された micro RNA は 49 種であった。この中より既報にて多発性骨髄腫と関連が報告された miR-137 について今後の検討を行った。

多発性骨髄腫細胞株での miR-137 の発現量は、急性骨髄性白血病細胞株 HL-60 に比較すると低発現であった。ボルテゾミブ添加における m6A メチル化と miR-137 発現の変化を比較し、m6A メチル化量の増加が miR-137 の発現維持に関与することを確認した。

m6A メチル化がボルテゾミブ感受性に与える影響を確認するため、脱メチル化酵素 FTO・ALKBH5 のノックダウンを行ったところ ALKBH5 のノックダウンによりボルテゾミブ感受性の増加が確認され、m6A メチル化制御の異常が MM 細胞の薬剤感受性に影響することが示唆された。

以上の結果から、MM 細胞における m6A メチル化制御は脱m6A メチル化酵素群の発現により制御されることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 糸井悠晏、笠松哲光、飯田南美、根岸光、松村郁子、半田寛、村上博和、齋藤貴之
2. 発表標題 多発性骨髄腫におけるmicro-RNA メチル化の解析
3. 学会等名 第24回日本検査血液学会学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----

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