

令和元年5月22日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15760

研究課題名(和文)造血器腫瘍の薬剤耐性における、小分子RNAによるクロマチン制御の役割の解明

研究課題名(英文) Investigation of the role of chromatin control via small temporal RNA in drug resistance of hematopoietic malignancy

研究代表者

東 剣虹 (Azuma, Kenko)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：80724070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：アザシチジンは骨髄異形成症候群の重要な治療薬であるが、容易に耐性化することが臨床上的問題となっている。本研究は耐性機序の一つとしてDNAとタンパク質複合体であるクロマチンの制御に着目した。その制御における重要な役割を担う2つの遺伝子、PIWIL4とMAELがアザシチジン耐性細胞で恒常的に高発現していることを発見した。中でもPIWIL4が特にアザシチジンの影響を大きく受けていることを突き止めた。このことからPIWIL4が耐性の寄与に大きく関与している可能性が高く、PIWIL4はアザシチジン耐性における新しい分子標的となることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤耐性はがんの化学療法において重要な問題となっている。本研究は「血液のがん」の一つである骨髄異形成症候群という疾患で重要な治療薬であるアザシチジンに着目した。アザシチジンは有効性が高い反面、確実に耐性獲得することが臨床上的問題となっている。本研究の成果として、アザシチジンの耐性機序に関与する因子を特定したことから、耐性獲得後の治療のための新しい分子標的を提示することができた。

研究成果の概要(英文)：Even though azacitidine is known as an effective agent for myelodysplastic syndrome, it is clinical problem that tumor can get drug-resistant easily against azacitidine. In this study, we focused on control of chromatin which is composed by complex of DNA and proteins, that is one of resistance mechanisms against azacitidine. We found that two important chromatin control genes, PIWIL4 and MAEL were over-expressed in azacitidine-resistant cells constantly against azacitidine-sensitive cells. Most especially, PIWIL4 was susceptible to azacitidine specifically in azacitidine-sensitive cells. As a result, the possibility of the function of PIWIL4 which may contributes to acquisition of resistance is higher, and it indicates that PIWIL4 could be a novel molecular target of azacitidine-resistant tumors.

研究分野：分子生物学

キーワード：アザシチジンによるクロマチン制御因子の発現制御 アザシチジン耐性における新規標的



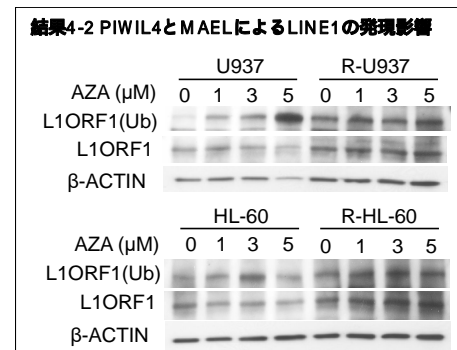
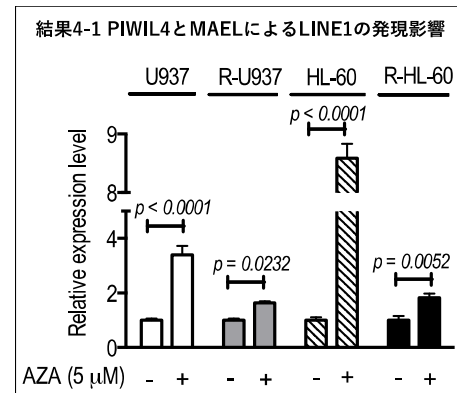
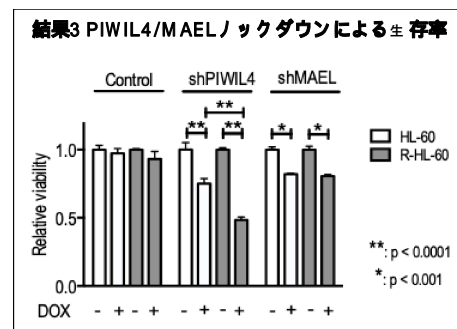
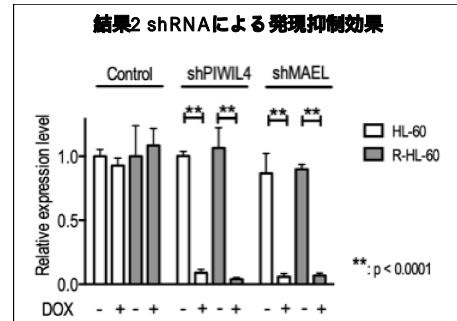
AZA 感受性細胞と AZA 耐性細胞の piRNA 発現プロファイルや 各細胞において AZA 処理前後の piRNA 発現プロファイル比較を実施する。

#### 4. 研究成果

(1) まず白血病由来細胞株(U937)及び AZA 耐性株(R-U937)で実際に PIWIL4 と MAEL の発現をリアルタイム PCR とウエスタンブロット法を用いて解析した。その結果、mRNA とタンパク質の双方において AZA の存在に関わらず、耐性株では PIWIL4 と MAEL の発現が恒常的に高かったこと明らかとなった(結果 1)。また興味深いことに、U937 では PIWIL4 は mRNA レベルでは AZA の濃度依存的に関係なく殆ど一定なのに対して、タンパク質量は反比例した。一方で MAEL は mRNA レベルとタンパク質量ともに AZA に応答して発現が上昇した。当初 PIWIL4 と MAEL それぞれの高発現株の作製を予定していたが、AZA 耐性株で恒常的に高発現していたことから、高発現による影響は直接耐性株を用いて行うことにした。次に PIWIL4 と MAEL をターゲットとした shRNA が発現する tet-on プラスミドをレンチウィルスの系を用いて白血病細胞株(U937, HL-60)と AZA 耐性細胞株(R-U937, R-HL-60)にインフェクションを行なった。ドキシサイクリン(DOX)を用いて shRNA の発現を誘導した結果、著しい抑制効果が認められた(結果 2)。尚、U937 の方はノックダウンにより生育が不安定化したため安定化を務めると同時に、ノックダウン解析は主に HL-60 の方を用いた。

(2) PIWIL4 や MAEL のノックダウンや高発現が細胞にもたらす影響を解析する際、U937 系統では上記の(1)でも述べたように生育がかなり不安定化していたために HL-60 系統をメインに解析を行った。HL-60 系統では、通常の細胞株でも PIWIL4 と MAEL をそれぞれノックダウンすることで生存率の低下が認められたが、AZA 耐性株では PIWIL4 のノックダウンにより著しい生存率低下が認められた(結果 3)。PIWIL4 や MAEL の高発現については「研究の方法(3)」で述べたトランスポゾン LINE1 への影響を調べた。その結果、U937 と HL-60 のいずれも AZA の投与により LINE1 の mRNA 量が著しく上昇したが、それぞれの耐性株ではかなり穏やかな上昇であることが認められた(結果 4-1)。次に LINE1 の翻訳産物である L1ORF1 の発現変動及びユビキチン度を解析した(結果 4-2)。U937 と HL-60 共に通常の細胞株は AZA の投与により濃度依存的に L1ORF1 の発現は上昇しないが、ユビキチン化は上昇することが明らかとなった。しかし AZA 耐性株の方では L1ORF1 のタンパク質量もユビキチン化度も共に AZA の有無と濃度に関わらず殆ど一定であることが明らかとなった。

(3) 平成 31 年度に所属が変わったことで新しい環境(Illumina の系から ABI の系へ)で piRNA の RNAseq の系を立ち上げる必要があった。Total RNA シーケンスから複数の piRNA のデータベースを元に解析用のパイプラインの構築を行った。残念ながら、本解析のための細胞株の安定化と前の所属からの研究試料提供関係の手続きが長引いたため、実際の piRNA の解析までは間に合わなかったが、構築されたパイプラインが存在するため、今後の解析に活かせると考えている。以上の結果から、AZA 感受性の細胞(通常の細胞株)は AZA の投与により PIWIL4 が抑制され、他方で MAEL が上昇しトランスポゾンである L1ORF1 のユビキチン化上昇が認められた。LINE1 はゲノムの不安定化に繋がるが、L1ORF1 のユビキチン化はゲノムの安定性維持に寄与すると考えられる。それに対して、AZA 耐性細胞では PIWIL4 が恒常的に高発現していることで、LINE1 の mRNA の分解とそれに伴う piRNA の合成によるクロマチン制御を介してゲノムの安定性に寄与しているのではないかと考えられた。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Satoshi Imanishi, Kenko Azuma, Tomohiro Umezu, Chiaki Kawana, Kazuma Ohyashiki, Junko Ohyashiki. “5-Azacytidine Targets Chromatin Regulation through piRNA Pathway” 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 大阪国際会議場 P-3075

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。