

学位論文の要約

三 重 大 学

所 属	三重大学大学院医学系研究科 乙 生命医科学専攻 病態解明医学講座 小児発達医学分野	氏 名	まぐらい なおと 櫻井 直人
-----	---	-----	-------------------

主論文の題名

Role of microRNAs in glucocorticoid-resistant B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia

(B 前駆細胞性急性リンパ性白血病のグルココルチコイド耐性におけるマイクロ RNA の役割)

NAOTO SAKURAI, YOSHIHIRO KOMADA, RYO HANAKI, MARI MORIMOTO, TAKAHIRO ITO, DAISUKE NAKATO and MASAHIRO HIRAYAMA

Oncology Reports

Received: November 27, 2018

Accepted: May 14, 2019

主論文の要約

【研究の背景および目的】

急性リンパ性白血病 (ALL) は小児がんのうち約 30% で例年最多を占める。医学・医療の進歩により治療成績は向上し、5 年生存率は 85% を超える。ALL の治療において、グルココルチコイド (GC) は重要な治療薬であり、治療初期の反応性が予後に影響してくる。そのメカニズムに関してはまだ不明な点が多い。GC の白血病細胞の細胞死誘導の機序として、GC がグルココルチコイドレセプター ($GR\alpha$) に結合することでアポトーシスを誘導することが知られている。また、ミトコンドリアでアポトーシスの制御を行う Bcl-2 蛋白ファミリーである BIM を介して、カスパーセなどが活性化されアポトーシスを誘導することが知られている。GC 耐性の原因として、 $GR\alpha$ や BIM の発現の低下が考えられている。MicroRNA (miRNA) は遺伝子の発現の調節に関与している。miR-142-3p は $GR\alpha$ の発現に関与し、miR-17~92 クラスターは BIM の発現に関与していることが知られている。本研究では、B 前駆型白血病細胞株 (697, MB-YU, REH) を用いて GC による細胞死誘導機序を検討した。

【方法】

B 前駆型白血病細胞株である 697, MB-YU, REH 細胞株を使用した。

デキサメタゾン (DEX) 投与後のアポトーシスの割合を propidium iodide (PI) を用いてフロー

サイトメトリーで解析した。

GR α 、BIM の mRNA の発現量を RT-PCR 法で解析した。

GR α 、BIM の蛋白の発現量をウエスタンブロットで解析した。

DEX 投与後の GR α 、BIM、Caspase3、Cleaved PARP の変化をウエスタンブロットで解析した。

DEX 感受性のある 697 細胞株に少量の DEX を加えて培養し、その薬剤濃度を徐々に上昇させることにより DEX 耐性株を樹立し 697DR と名付けた。

697DR 細胞株の GR α や BIM の mRNA の発現量や GR α 蛋白の発現量を RT-PCR やウエスタンブロットで 697 細胞株と比較した。

697DR と REH 細胞株の miR-142-3p、miR-17-5p、miR-18a-5p、miR-19a-5p、miR-19b-3p、miR-20a-5p、miR-92a-3p の発現量を RT-PCR 法で解析し、697 細胞株の発現量と比較した。

DEX 感受性のある MB-YU 細胞株から同様に DEX 耐性である MB-YUDR 細胞株を樹立した。MB-YUDR 細胞株でも、GR α 、BIM の mRNA の発現量、GR α の蛋白発現量を MB-YU と比較した。また、MB-YUDR 細胞株の miR-142-3p、miR-17-5p、miR-18a-5p、miR-19a-5p、miR-19b-3p、miR-20a-5p、miR-92a-3p の発現量を MB-YU 細胞株と比較した。

【結果】

697 細胞株にデキサメタゾン (DEX) の投与を行ったところ、100nM 以上の濃度でアポトーシスを認めた。REH 細胞株では、1 μ M 投与しても増殖の抑制は認めなかった。697 細胞株は DEX 感受性細胞であり、REH 細胞株は DEX 耐性細胞であった。

DEX 感受性である 697 細胞株に DEX の投与を行ったところ、GR α 、BIM の mRNA や蛋白の発現量は時間と共に上昇した。BIM を介して、カスパーゼなど活性されアポトーシスの誘導を認めた。DEX 耐性である REH 細胞株では、DEX 投与後も GR α 、BIM の mRNA、蛋白の発現量は上昇を認めず、アポトーシスの誘導も認めなかった。

DEX 感受性である 697 細胞株に少量の DEX を加えて培養し、その薬剤濃度を徐々に上昇させることにより樹立できた DEX 耐性である 697DR 細胞株の GR α や BIM の mRNA の発現量や GR α 蛋白の発現量を調べたところ、697 細胞株に比べ mRNA や蛋白の発現量は低下していた。

697DR 細胞株と REH 細胞株の miR-142-3p、miR-17-5p、miR-18a-5p、miR-19a-5p、miR-19b-3p、miR-20a-5p、miR-92a-3p の発現量を 697 細胞株と比較してみた。697DR 細胞株では、miR-142-3p、miR-17-5p、miR-18a-5p、miR-19a-5p、miR-19b-3p、miR-20a-5p、miR-92a-3p 全ての miRNA で発現の上昇を認めた。REH 細胞株では、miR-17-5p、miR-18a-5p、miR-19a-5p では発現の上昇を認めたが、miR-142-3p、miR-19b-3p、miR-20a-5p、miR-92a-3p で発現の上昇は認めなかった。

DEX 感受性のある MB-YU 細胞株から同様に樹立できた DEX 耐性である MB-YUDR 細胞株でも、GR α 、BIM の mRNA の発現、GR α の蛋白発現は低下していた。同様に miR-142-3p、miR-17-5p、miR-18a-5p、miR-19a-5p、miR-19b-3p、miR-20a-5p、miR-92a-3p の発現量を MB-YU 細胞株と比較したところ、すべての miRNA の発現量が増加していた。

【考察】

本研究でも、GC 感受性 B 前駆型白血病細胞では、GC の治療により、GR α の mRNA や蛋白の発現量を上昇することで、BIM を介してアポトーシスを誘導することが確認できた。逆に GC 耐

性 B 前駆型白血病細胞では、GR α の mRNA や蛋白の発現量は低下しており、GC の治療を行っても発現量は低下したままで、アポトーシスは誘導されなかった。697 細胞株や MB-YU 細胞株から樹立した GC 耐性である 697DR、MB-YUDR 細胞株でも同様に GR α の mRNA や蛋白の発現量は低下していた。697DR 細胞株の miR-142-3p、miR-17-5p、miR-18a-5p、miR-19a-5p、miR-19b-3p、miR-20a-5p、miR-92a-3p の発現量を 697 細胞株と比較したところ、明らかに 697DR 細胞株で全ての miRNA の発現量の上昇を認めた。同様に MB-YUDR 細胞株でも MB-YU 細胞株に比べ発現量の上昇を認めた。miR-142-3p、miR-17~92 クラスターの発現の上昇が、GR α 、BIM の発現量の低下に関与している可能性があると考えられた。

【結論】

本研究にて B 前駆型白血病細胞で認める GC 耐性の原因として、miR-142-3p、miR-17~92 クラスターの発現が関与している可能性があることが示唆された。