

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19975

研究課題名(和文) 髄液中エクソソームのmicroRNA解析によるグリオーマ新規診断マーカーの開発

研究課題名(英文) The development of a novel biomarker using expression profiles of exosomal microRNAs in CSF

研究代表者

山下 大介 (Yamashita, Daisuke)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30750492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、脳脊髄液に含まれるエクソソーム内のmicroRNAプロファイリングと新たな診断マーカーや治療効果判定法の開発である。膠芽腫患者5例と非腫瘍(正常圧水頭症)患者3例より脳脊髄液を採取し、マイクロアレイにて2006個のmicroRNAの発現を網羅的に解析した。非腫瘍患者と比較して膠芽腫患者の脳脊髄液中で有意に発現異常を示したmicroRNAは107個(上昇57個、低下50個)であり、グリオーマ幹細胞培養液中の解析結果と共通して有意な発現異常を示したグリオーマ幹細胞特異的miRNAは3個(上昇：miR-451b、低下：miR-550a-5p、miR-652-5p)であった。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to profile the expression of exosomal microRNAs in CSF and develop a novel biomarker. The exosomal microRNAs were extracted from the CSF of five glioblastoma patients and three non-tumoral volunteers(NPH). Using microRNA microarray, we comprehensively analyzed the 2,006 microRNAs expression profiles. 107 microRNAs (57 up-regulated and 50 down-regulated microRNAs) were aberrantly expressed in glioblastoma patients compared with non-tumoral volunteers. In addition, we defined 3 microRNAs as a Glioma-initiating cells specific exosomal microRNA that were aberrantly expressed in Glioma-initiating cells and glioblastoma patients compared with neuronal stem cells and healthy volunteers.

研究分野：医歯薬学

キーワード：グリオーマ microRNA エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

グリオーマは、頭蓋内原発性腫瘍の約 30% を占め、その 1/3 が最悪性度に分類されている膠芽腫である。現在、悪性のグリオーマに対しては外科的切除、放射線照射、化学療法を組み合わせた集学的治療が行われているが、膠芽腫の生存期間(中央値)は約 14 ヶ月と極めて不良である。この難治性の原因としてグリオーマ幹細胞の関与が考えられており、グリオーマ幹細胞の抗癌剤耐性、放射線治療耐性、浸潤能亢進などの癌幹細胞としての特性が治療抵抗性の要因となっている。

グリオーマでは、薬剤感受性や予後予測因子としての遺伝子発現解析が進んでいるが、それらの解析は摘出組織でのみ評価可能な方法であり、外科的切除後に治療効果を判定する手段は画像検査のみというのが現状である。つまり、現時点で経時的な治療効果の判定や再発を予想し得る診断マーカーは存在せず、グリオーマ幹細胞の存在や活動性などを評価することもできない。この点において、脳脊髄液中のエクソソーム内の microRNA プロファイリングを行うことは、画期的な診断マーカーや治療効果判定法の確立だけでなく、グリオーマ幹細胞の性状解析においても極めて有用である。また、グリオーマを含む様々な腫瘍で microRNA の発現異常が腫瘍形成や悪性化に関与していることが報告されており、脳脊髄液中に含まれるエクソソーム内の microRNA は新たなバイオマーカーとして期待されている。

2. 研究の目的

本研究は、グリオーマの治療効果や再発に関与する microRNA の同定とその臨床への応用を目指し、脳脊髄液中に含まれるエクソソーム内の microRNA プロファイリングを行い、新たな診断マーカーや治療効果判定法の開発を目的とする。また、グリオーマ幹細胞培養液に含まれるエクソソーム内の microRNA プロファイリングの結果を参照し、共通して特異的な発現を認めた microRNA の性状解析を行い、新たな治療法としての可能性についても検討する。

3. 研究の方法

我々は、既にグリオーマ幹細胞株の細胞内の microRNA プロファイリングとその培養液中に含まれるエクソソーム内の microRNA プロファイリングを済ませており、数種類の microRNA の発現異常を確認している。これまでの成果をもとに本研究は、脳腫瘍のメカニズムを解析する上で極めて重要な生体サンプルである脳脊髄液中に含まれるエクソソーム内の microRNA の発現を解析し、新たな診

断マーカーや治療効果判定法の開発を試みる計画である。

脳脊髄液は、腫瘍摘出後の摘出腔に留置したオンマヤリザーバーを利用して採取する。エクソソーム単離・RNA抽出：血清および脳脊髄液中からエクソソームを単離し、RNA 分画を抽出し、マイクロアレイにて microRNA の発現解析を行い、特異的な発現を認める microRNA を同定する。

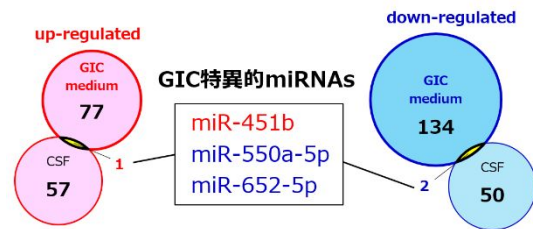
非腫瘍性疾患(正常圧水頭症)患者から採取した脳脊髄液と比較して、特異的な発現を示す microRNA を探索する。その際には、グリオーマ幹細胞株の細胞内および培養液中から抽出したエクソソーム内の microRNA プロファイリング結果も用いて、より特異的な発現を示す microRNA (グリオーマ幹細胞特異的 microRNA) を同定する。

Target scan などを用いて、既知の幹細胞マーカーとの相補配列の有無を確認し、グリオーマ幹細胞に作用し得る“真のグリオーマ幹細胞特異的 microRNA”を同定する。また、特異的な発現を示した microRNA が、マイクロアレイに用いなかった他の検体サンプル内でも同様の発現を示しているかをリアルタイム PCR で再検討する。

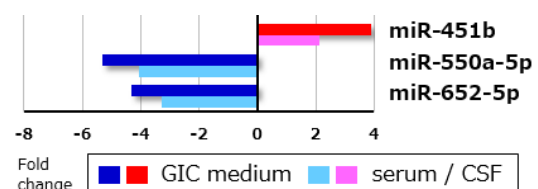
4. 研究成果

今回、非腫瘍性疾患(正常圧水頭症)患者と比較して膠芽腫患者の脳脊髄液中で有意に発現異常を示した microRNA は 107 個(上昇 57 個, 低下 50 個)であり、グリオーマ幹細胞培養液中で共通して有意な発現異常を示したグリオーマ幹細胞特異的 microRNA は 3 個であった。上昇した microRNA は miR-451b で、低下した microRNA は miR-550a-5p および miR-652-5p であった(図 1 および図 2)。

(図 1) マイクロアレイ結果によるグリオーマ幹細胞特異的 microRNA の同定



(図 2) グリオーマ幹細胞特異的 microRNA の発現パターン



同定された3個のグリオーマ幹細胞特異的 microRNA に関して、Target scan を用いて既知の幹細胞マーカーとの相補配列の有無を確認したところ、3 個とも何らかの幹細胞マーカーとの相補配列を有していた(図3)。最も多くの幹細胞マーカーとの相補配列を有し、唯一優位に上昇していた miR-451 は、既にグリオーマに関連する microRNA と報告されており、一部の性状解析は解明されている。しかし、腫瘍マーカーとしての意義は未解明のままである。今後、miR-550a-5p および miR-652-5p の機能解析による新規治療薬の可能性を探求する必要があると考えられた。

(図3) グリオーマ幹細胞特異的 microRNA と相補配列を有する幹細胞マーカー

標的遺伝子(幹細胞マーカー)	
miR-451b	Sox2, Bmi-1, <u>Nanog</u> , L1CAM
miR-550a-5p	CD44
miR-652-5p	CD44, <u>Nanog</u>

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

グリオーマ幹細胞特異的 microRNA の同定と診断・治療への応用における意義
山下 大介, 末廣 諭, 高野 昌平, 大上 史朗, 大西 丘倫
 愛媛医学. 35(1) 6-11 (2016)、査読無し

〔学会発表〕(計4件)

Identification of exosomal miRNAs specific for glioma-initiating cells
山下 大介, 末廣 諭, 近藤 亨, 大西 丘倫
 第75回日本癌学会学術総会
 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)、
 2016/10/6-8

体液中エクソソーム内に存在するグリオーマ幹細胞特異的 microRNA の同定 - 新規診断マーカーおよび治療薬としての可能性 -
山下 大介, 末廣 諭, 西川 真弘, 瀬野 利太, 高野 昌平, 大上 史朗, 國枝 武治, 大西 丘倫

第75回日本脳神経外科学会学術総会
 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡・福岡サンパレス(福岡県福岡市)、
 2016/9/29-10/1

Identification of GIC specific microRNA (miRNA), using miRNA profiling in extracellular vesicles
Yamashita D, Suehiro S, Nishikawa M, Seno T, Kohno S, Ohue S, Kunieda T, Ohnishi T.

13th Asian Society for Neuro-Oncology Meeting & 9th COGNO Annual Scientific Meeting
 Sydney, Australia. 2016/9/11-14

エクソソーム内 microRNA プロファイリングによるグリオーマ幹細胞特異的 microRNA の同定

山下 大介, 近藤 亨, 末廣 諭, 井上 明宏, 高野 昌平, 大上 史朗, 大西 丘倫
 第33回 日本脳腫瘍学会学術集会
 グランドプリンスホテル京都(京都府京都市)、2015/12/6-8

〔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：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況(計0件)

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

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山下 大介 (Yamashita,Daisuke)
愛媛大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30750492

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし