

平成 22 年 3 月 1 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18390400

研究課題名（和文）

脳腫瘍幹細胞における microRNA 発現とシグナル伝達異常

研究課題名（英文）

MicroRNA expression and signaling pathway in brain tumor stem cells

研究代表者 溝口 昌弘 (MIZOGUCHI MASAHIRO)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号 50380621

研究成果の概要：

脳腫瘍、特に悪性神経膠腫における microRNA(miRNA)発現異常の網羅的解析を行い、悪性度に関与する 16 個の miRNA を同定した。さらに予後との比較により miR-196 発現亢進が神経膠芽腫における独立した予後規定因子であることを証明した。シグナル伝達系の評価を行い、予後規定因子であった EGFRvIII 発現に伴う、miRNA 発現を網羅的に解析し、発現に有意差のある 4 個の miRNA を同定した。無血清幹細胞培養を導入し、神経膠芽腫 3 例において脳腫瘍幹細胞を分離、同定し、継代した。幹細胞マーカー(CD133, Nestin, SOX2 など)、EGFRvIII の発現が維持されていること、原発腫瘍の遺伝子異常が維持されていることを確認した。脳腫瘍幹細胞継代に伴い、発現変動をきたした miRNA を網羅的に同定した。遺伝子解析法に関しては、SNP アレイを導入し、ゲノムワイドにコピー数と LOH(loss of heterozygosity)を同時に解析し、神経膠芽腫においてコピー数の変化を伴わない LOH が高頻度に存在することを証明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	7,200,000	0	7,200,000
2007 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2008 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	2,190,000	16,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、脳神経外科学

キーワード：脳腫瘍学/グリオーマ/脳腫瘍幹細胞/microRNA/シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

腫瘍が遺伝子の異常により発生することが認識され、脳腫瘍においても多くの遺伝子異常が報告された。当時、miRNA の発見により遺伝子発現制御の新たな機序が提唱された。miRNA は複数の遺伝子発現を制御し発生、分化、増殖、細胞死等に関わっていることが解明されつつあった。当時、約 230 種類の miRNA が同定されており（現在 700 種類以上）、1/3

以上ものヒト遺伝子が miRNA 分子により制御を受けていることが推測されていた。一方、治療抵抗性の機序を裏付ける概念として種々の腫瘍で cancer stem cell (CSC) の存在が報告された。CSC は腫瘍において少数存在し、自己複製、増殖、分化能を維持し、治療抵抗性であることが報告された。脳腫瘍においても脳腫瘍幹細胞 brain tumor stem cell (BTSC) の存在が同定され、治療抵抗性への関

与が示唆された。miRNA は幹細胞における自己複製、分化に関わる遺伝子発現の制御を担うのみならず、腫瘍においても重要な役割を果たすことが解明されつつあった。

2. 研究の目的

本研究は miRNA と BTSC という新たな概念に基づき、新たな視点から脳腫瘍の発生機序を解明することを目的とした研究である。さらに BTSC における miRNA 発現を含む遺伝子異常を解明することにより脳腫瘍、特に悪性神経膠腫の分類、治療法の確立を目指す。BTSC に関しては、その分離、同定法を確立し、その評価を行える実験系の構築を第一の目的とした。microRNA に関しては、未知の領域であり、様々な評価法を検討し、正確な発現解析が可能かどうかという基礎的な段階から miRNA 発現制御へと発展させ miRNA の機能を解明することを目的とした。発現解析に関してはまず、悪性神経膠腫に特異的な miRNA 同定を目的に実験系を構築し、さらに BTSC に特異的な miRNA 同定を行い、miRNA 制御による機能解析へと発展させることを目的とした。また、我々が継続している遺伝子解析法、シグナル伝達解析法についても新たな手法を取り入れ再検討し、正確な解析法確立を目指した。

個々の実験系を確立させ、BTSC における miRNA の機能を解明し、最終的に miRNA と BTSC という新たな2つの概念に基づいた悪性神経膠腫の新たな診断、治療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍幹細胞の分離・同定・評価

従来の細胞培養に加え、幹細胞培養を導入し、摘出腫瘍標本より BTSC の分離、同定を行った。幹細胞マーカーである CD133 を用いた sorting を行い、さらに幹細胞を濃縮させる。幹細胞評価には SOX2、Nestin、Bmi-1 を用いた免疫染色による評価を行った。

(2) miRNA 抽出、発現解析

mirVava miRNA Isolation Kit を用いて、miRNA を含む total RNA を抽出した。個々の miRNA に対する stem loop primer を用いた TaqMan 法を導入し、miRNA 発現解析を行った。さらに TaqMan miRNA array (365miRNA)、Agilent miRNA array (723miRNA) を用いた網羅的 miRNA 発現解析を導入した。12 例の悪性神経膠腫に対し、TaqMan miRNA array を用いた網羅的発現解析を行い、候補遺伝子に関しては個々の primer を用いた TaqMan 法を用い 105 例の神経膠腫を解析し、再評価した。培養細胞に関しては、通常培養、幹細胞培養

(P3, 6, 9) に対し、Agilent miRNA array を用いて解析を行った。

(3) 遺伝子解析

当施設において継続してきた LOH (loss of heterozygosity) 解析を再評価し、個々の脳腫瘍の遺伝子背景 (genotyping) を同定した。従来使用してきた複数の microsatellite marker による評価を継続するとともに、独自に開発した一塩基多型 (SNP) を用いた解析の有用性を検討した。さらには SNP array による網羅的解析を導入し、従来の PCR 法、FISH 法との比較検討を行った。

(4) シグナル伝達異常の評価

悪性神経膠腫、特に神経膠芽腫において重要である EGFR シグナル伝達系の評価を行った。EGFR 遺伝子増幅、変異 EGFR (EGFRvIII) 発現の評価を PCR、RT-PCR を用いて評価した。その下流シグナルである PI3K/AKT、RAS/MAPK、JAK/STAT3 の活性化を免疫染色にて評価した。今回、同定した miR-196 の標的遺伝子である HOX 遺伝子についても RT-PCR を用いた発現解析を行った。

(5) 遺伝子異常、シグナル伝達系異常に伴う miRNA 発現解析

発現異常の認められた miRNA に関して LOH の存在の有無を検討した。逆に主な LOH 部位に存在する miRNA の発現変動の有無を検討した。また EGFR シグナル伝達系の遺伝子異常に伴う、miRNA 発現変動を網羅的に解析した。

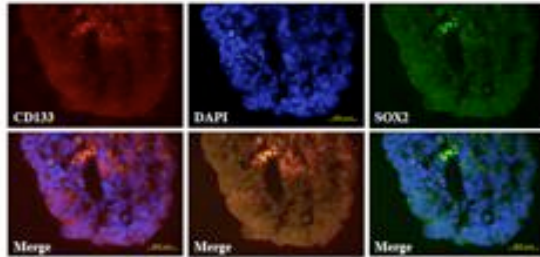
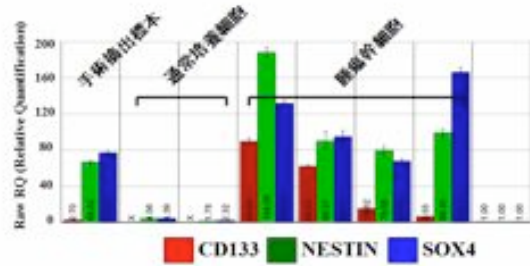
(6) miRNA 発現制御

今回同定された miR-196 に対し、anti-miRNA inhibitor を用いた発現制御を in vitro で行い、その有効性を評価した。さらに標的遺伝子である HOX 遺伝子発現の評価も同時に行った。

4. 研究成果

(1) 腫瘍幹細胞の分離・同定・評価

悪性神経膠腫手術症例に対し、摘出標本を用いた幹細胞培養を継続した。神経膠芽腫 3 例において、sphere 形成を確認し、2 例において幹細胞培養下に継代に成功し、P3、P6、P9 にて核酸抽出を行った。RT-PCR を用いて EGFRvIII 発現が維持されていることを確認し、1 例で LOH 解析を行い genotype が維持されていることを確認した。Stem cell marker (CD133, Nestin SOX2) 発現を免疫染色、RT-PCR にて確認し、1 例は幹細胞マーカーの発現を維持できたが、1 例は徐々にその発現が低下し、幹細胞の分化が示唆された。

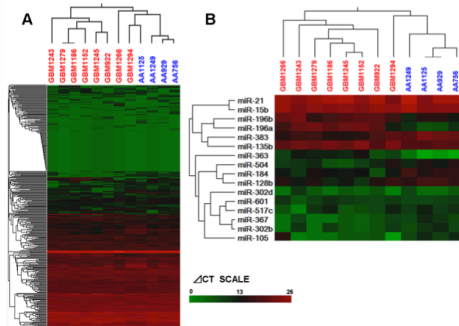


RT-PCR、免疫染色による幹細胞マーカー発現解析による分化過程評価

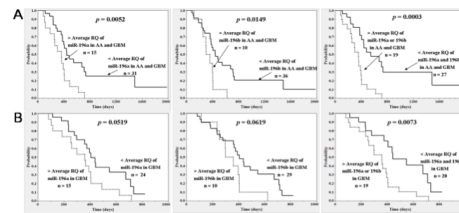
(2) miRNA 抽出、発現解析

genotype を基に glioblastoma (GB) 8 例、anaplastic astrocytoma (AA) 4 例を選択し、TaqMan MicroRNA array を用いて、365 個の microRNA の網羅的発現解析を行った。GB-AA 間で有意に発現の異なる 16 個の microRNA を同定した。その中で最も有意に差がみられた miR-196a と miR-15b、さらに miR-196b、miR-21 の 4 分子に対して、105 例の glioma サンプルを用い、発現解析を行ない、これらの miRNA が悪性度に伴い発現が変動している事を同定した。また、GB 症例においては miR-196a、miR-196b のいずれかが高発現している症例は予後不良であり、miR-196 発現が神経膠腫の悪性度に関与していることを証明した。(現在投稿中)

悪性神経膠腫における microRNA 網羅的発現解析



miR-196発現と悪性神経膠腫予後



抽出標本、幹細胞培養 (P3, 6, 9) に対し、Agilent miRNA array を用いて解析し、比較検討すると幹細胞において 33 個の miRNA が高発現しており、101 個の miRNA が低発現していることが同定できた。

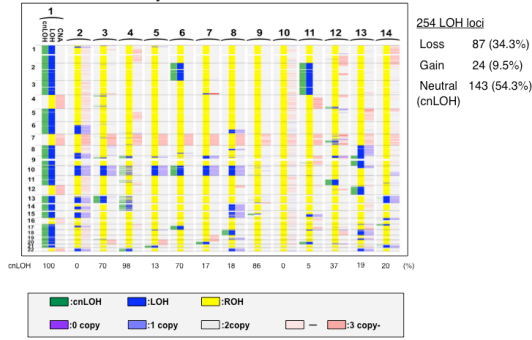
脳腫瘍幹細胞における microRNA 発現

高発現群 (33miRNA)										低発現群 (101miRNA)									
miRNA	GBM	AA	GBM	AA	GBM	AA	GBM	AA	GBM	AA	miRNA	GBM	AA	GBM	AA	GBM	AA	GBM	AA
miR-15b	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	miR-196a	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
miR-196a	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	miR-196b	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
miR-21	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	miR-383	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
miR-383	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	miR-135b	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
miR-135b	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	miR-363	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
miR-363	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	miR-504	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
miR-504	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	miR-154	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
miR-154	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	miR-129b	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
miR-129b	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	miR-302b	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
miR-302b	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	miR-601	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
miR-601	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	miR-517c	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
miR-517c	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	miR-367	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
miR-367	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	miR-302b	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
miR-302b	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	miR-15b	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
miR-15b	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0									

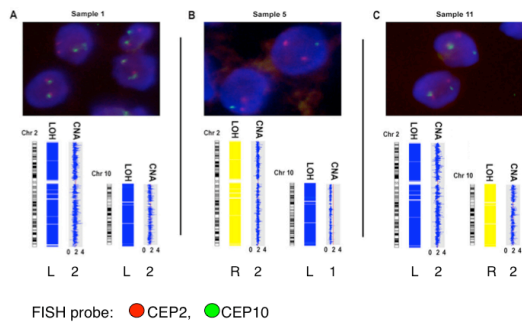
(3) 遺伝子解析

新たな遺伝子マーカーである SNP に注目し、遺伝子解析を行うことにより、飛躍的に高密度、高感度の解析を行うことが可能となった。我々は、SNP を用いた、LOQUS (LOH estimated by quantitative SSCP assay) 法という独自の解析法を開発した。今回さらに対照 DNA がなくても average control (AC) を用い解析可能とする LOQUS-AC 法を開発し、実用化した。さらに神経膠芽腫 14 例に対し、SNP array を用いてゲノムワイドに LOH、コピー数の評価を行った。54.3% の LOH 部位がコピー数の変化を伴わない、copy neutral LOH であることを同定した。FISH 法、PCR 法との比較を行い、FISH 法にて 2 コピー同定できる場合でも、LOH が存在することを証明し、コピー数解析のみでは LOH を正確に同定できないことを報告した。複数 microsatellite marker を用いた LOH 解析は正確に LOH 部位を同定することができた。本法を用い、54 例の神経膠芽腫の予後解析を行い 1p/19q 共欠失を示す神経膠芽腫が予後良好であることを報告した。

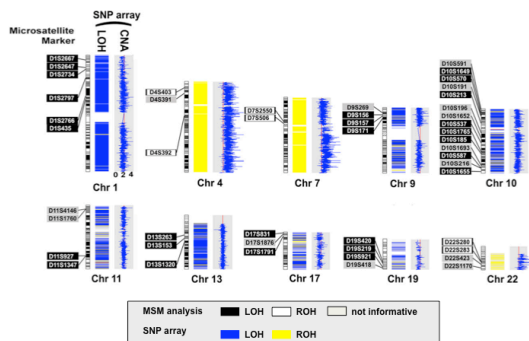
SNP array法によるLOH、コピー数の網羅的解析



SNP array法とFISH法の比較



SNP array法とPCR法の比較



(4) シグナル伝達異常の評価

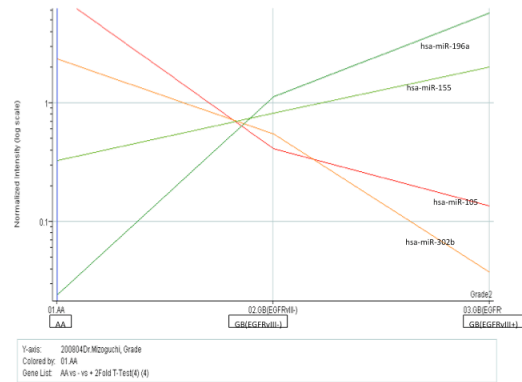
悪性神経膠腫に対し、RT-PCR法を用いたEGFRvIII発現解析、免疫染色を用いたAKT活性化の評価を行った。EGFRvIII発現は25.8%、AKT活性は68%の症例で認められ、AKT活性は予後不良因子であった。

(5) 遺伝子異常、シグナル伝達系異常に伴うmiRNA発現解析

GBにおいてEGFRvIIIの発現に伴い、miR-196a, miR-155, miR-105, miR-302b発現の有意な変化が認められた。また、miR-196aの下流標的分子であるHOXB8発現の検討も行ったが、miR-196a発現に伴う有意差は認められなかった。

神経膠腫で異常を来す1番染色体短腕(1p)、10番染色体、19番染色体長腕(19q)上のmiRNAをデータベースより同定したがLOHに伴い有意に発現変動するmiRNAは同定できていない。

EGFRvIII発現に基づくmicroRNA網羅的発現解析



(6) miR-196 inhibitorを用いた、miRNA発現制御

神経膠芽腫を通常培養下にanti-miRNA inhibitorを用いた発現制御を行い、miR-196発現低下を認めた。発現制御が不安定であり、下流遺伝子であるHOX遺伝子の発現に変動は認められなかった。miRNA発現制御に関しては、今後に課題を残す結果となった。

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3件)

溝口昌弘、庄野禎久

悪性神経膠腫の遺伝子解析とその臨床応用、脳神経外科(査読無)36(1): 83-91, 2008

Kuga D, Mizoguchi M, Guan Y, Hata N, Yoshimoto K, Shono T, Suzuki SO, Kukita Y, Tahira T, Nagata S, Sasaki T, Hayashi K. Prevalence of copy number neutral LOH in glioblastomas revealed by genome-wide analysis of laser-microdissected tissues. Neuro Oncol(査読有)10(6):995-1003, 2008

Guan Y, Hata N, Kuga D, Yoshimoto K, Mizoguchi M, Shono T, Suzuki SO, Tahira T, Kukita Y, Higasa K, Yokoyama N, Nagata S, Iwaki T, Sasaki T, Hayashi K. Narrowing of the regions of allelic losses of chromosome 1p36 in meningioma tissues by an improved SSCP analysis. Int J Cancer(査読有) 122(8):1820-1826, 2008

〔学会発表〕(計 12 件)

溝口昌弘、成人神経膠芽腫 temozolomide 使用例の分子病理学的検、第 26 回日本脳腫瘍病理学会、2008 年 5 月 24 日、東京

溝口昌弘、グリオーマにおける multiple microsatellite markers を用いた LOH 解析、第 67 回日本脳神経外科学会総会、2008 年 10 月 2 日、岩手

官彦雷、溝口昌弘、悪性神経膠腫における EGFRvIII 発現の意義、第 67 回日本脳神経外科学会総会、2008 年 10 月 2 日、岩手

溝口昌弘、遺伝子異常に基づく悪性神経膠腫治療戦略、第 13 回日本脳腫瘍の外科学会、2008 年 10 月 20 日、大阪

溝口昌弘、悪性グリオーマにおける複数マイクロサテライトマーカーを用いた LOH 解析の意義、第 26 回日本脳腫瘍学会、2008 年 11 月 30 日、愛媛

官彦雷、溝口昌弘、神経幹細胞培養下でのグリオーマ培養とその遺伝子異常、第 26 回日本脳腫瘍学会、2008 年 12 月 1 日、愛媛

溝口昌弘、九州大学における脳腫瘍遺伝子解析の現状、第 27 回日本脳腫瘍病理学会、2009 年 5 月 9 日、福岡

溝口昌弘、Genomewide Analysis of Loss of Heterozygosity in Glioblastoma using the SNP mapping array and the PCR with multiple microsatellite markers, The 3rd Quadrennial Meeting of the world federation of neuro-oncology、2009 年 5 月 13 日、横浜

官彦雷、溝口昌弘、MicroRNA-196a and 196b are up-regulated in glioblastoma and have prognostic significance, The 3rd Quadrennial Meeting of the world federation of neuro-oncology、2009 年 5 月 13 日、横浜

溝口昌弘、Low-grade glioma悪性転化の検討、第 68 回日本脳神経外科学会総会、2009 年 10 月 16 日、東京

官彦雷、溝口昌弘、悪性神経膠腫における microRNA の発現とその意義、第 68 回日本脳神経外科学会総会、2009 年 10 月 15 日、東京

溝口昌弘、1p/19q 共欠失神経膠芽腫の分子病理学的検討、第 27 回日本脳腫瘍学会、2009 年 11 月 9 日、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝口 昌弘 (MIZOGUCHI MASAHIRO)
九州大学・大学病院・講師
50380621

(2) 研究分担者

庄野 禎久 (SHONO TADAHISA)
九州大学・医学研究院・准教授
003767930

松角宏一郎 (MATSUKADO KOUICHIROU)
九州大学・大学病院・講師
80304799 (2006 年度)

(3) 連携研究者

なし