

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09321

研究課題名(和文) microRNA解析に基づく悪性脳腫瘍の新規治療法とバイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Development of novel therapy and biomarkers for malignant brain tumors based on microRNA analysis

研究代表者

田村 郁 (Tamura, Kaoru)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：70629146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫は最も悪性度の高い脳腫瘍で、治療抵抗性の克服が課題である。近年、膠芽腫の治療抵抗性に脳腫瘍幹細胞が大きく関わることを示唆されるようになった。脳腫瘍幹細胞に特異的なmicroRNA(=miR)を同定することにより、悪性脳腫瘍の新規治療法およびバイオマーカーを探索することを目的に本研究を行った。Neurosphere法による培養で分離した脳腫瘍幹細胞と血液サンプルを用いてmiR arrayによる発現スクリーニングを行い、脳腫瘍幹細胞特異的かつ悪性脳腫瘍のバイオマーカーとなりうるmiRXを同定した。miRXの発現制御を行うと膠芽腫の増殖抑制がみられ、新規治療法につながる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳腫瘍の治療抵抗性に関わることを示唆されている脳腫瘍幹細胞をターゲットとして研究を行い、脳腫瘍幹細胞と脳腫瘍患者血液サンプルで過剰発現ならびに発現抑制されているmicroRNAとその標的分子を同定した。このことにより、悪性脳腫瘍の治療抵抗性の分子機序の一端を解明することができた。また、新規のバイオマーカーとしての可能性が示唆された。microRNAと脳腫瘍幹細胞をtargetとすることで、膠芽腫を代表とする悪性脳腫瘍の新規バイオマーカー開発、治療開発研究へ大きく貢献できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop novel therapy and biomarkers for malignant brain tumors by analyzing brain tumor stem cell specific microRNA. Brain tumor stem cells and blood samples were subjected to microRNA array and we identified microRNA(=miRX) that are specific to brain tumor stem cells and can serve as biomarkers. We showed controlling miRX expression inhibited the growth of malignant glioma, thus presenting a promising strategy for treating malignant brain tumors.

研究分野：脳神経外科

キーワード：Glioma cancer stem cell microRNA

## 1. 研究開始当初の背景

近年の悪性脳腫瘍に対する外科的治療、化学療法、放射線治療の発展は目覚ましいものがあるが、依然として膠芽腫を代表とする悪性脳腫瘍の予後は悪く、膠芽腫の中間生存率は未だ 14.6 ヶ月である。膠芽腫をはじめとする悪性脳腫瘍を根治できない理由に脳腫瘍幹細胞が大きく関わっていることが、近年注目を集めるようになった。脳腫瘍幹細胞は、不均一な細胞集団である悪性脳腫瘍内に存在する少数の細胞で、自己を複製する能力と腫瘍を構成するさまざまな系統の細胞を生み出す能力をもち、二次腫瘍を形成する元となる細胞である。2003 年に、複数のグループから脳腫瘍幹細胞を同定した論文が発表され、更に、2006 年に悪性脳腫瘍に対する放射線治療は、脳腫瘍幹細胞以外の脳腫瘍細胞（非幹細胞）には効果があるものの、放射線治療後も幹細胞マーカー CD133 を発現する脳腫瘍幹細胞は残存し再発の原因となるという基礎実験の結果が報告された (Bao et al, Nature 2006)。それ以降複数のグループから脳腫瘍幹細胞が放射線や化学療法に抵抗性で、悪性脳腫瘍再発の原因であることを示唆する報告が発表された。申請者らも膠芽腫患者 42 例の病理切片の検討から、放射線・化学療法後の膠芽腫の再発時には CD133 陽性の細胞分画が初発時に比較して著明に増加していることを示し、CD133 陽性の膠芽腫幹細胞が治療抵抗性の原因となることを示唆する報告を発表した (Tamura et al, Journal of Neurosurgery 2010, Tamura et al Journal of Neurosurgery 2013)。以上のことから、悪性脳腫瘍の予後改善のためには、脳腫瘍幹細胞を標的として治療抵抗性機序を解明し、それに基づいた治療法を確立することが急務である。

そこで、ゲノム情報発現系の内在性制御機序を担う新たな機能性低分子 RNA として注目されている microRNA (miRNA) に着目した。miRNA は、蛋白質へは翻訳されない non-coding RNA であるが、標的分子の蛋白発現を転写後の配列特異的な RNA サイレンシングによって抑制する機能性低分子 RNA である。miRNA は細胞増殖、アポトーシス、分化などの生物にとって欠かすことのできない生命現象に深く関わっており、悪性脳腫瘍においても miRNA の発現異常が報告され腫瘍発生や悪性化との関連が指摘されている。がん幹細胞と miRNA の関連に初めてメスをいれたのは 2007 年の Liberman らの報告で、乳癌の癌幹細胞分画では、より分化の進んだ癌細胞と比較し、癌遺伝子である Ras, HMG2 を抑制する miRNA (=let-7) の発現が抑制されていることを見出した。それ以降、がん幹細胞と miRNA の関連を示唆する知見が次々と発表されている。また、神経幹細胞の分化能が特定の miRNA によって制御されていること、ES 細胞などの正常幹細胞の発現プロファイルが成熟体細胞とは異なる miRNA プロファイルであること、p65 などの幹細胞維持に必須の分子を制御する miRNA が存在すること等、正常幹細胞と miRNA の関連を示唆する知見も次々と発表されている。これらの研究成果は miRNA による腫瘍幹細胞を標的とした治療法の有用性を示唆するものと考えられる。

さらに、現時点で悪性脳腫瘍の診断、経時的な治療効果の判定や再発を予測し得る診断マーカーは存在せず、外科的切除にて切除した組織を用いずに脳腫瘍幹細胞の存在や活動性を評価する方法は存在しない。そのため、血液サンプルを用いた脳腫瘍幹細胞特異的 microRNA のプロファイリングは、新たな診断マーカーや治療法の確立のみならず、非侵襲的にがん幹細胞の増減を評価できるバイオマーカーとして有用であることが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究は、脳腫瘍幹細胞特異的 microRNA を同定することにより、悪性脳腫瘍の新規治療法およびバイオマーカーの確立を行うことを目的としている。具体的には、血液サンプルと脳腫瘍幹細胞を用いた網羅的スクリーニングによって脳腫瘍幹細胞特異的 microRNA を探索することにより、悪性脳腫瘍の治療抵抗性機序を解明し、悪性脳腫瘍の治療抵抗性を克服する新規治療法と悪性脳腫瘍幹細胞特異的なバイオマーカーを開発することをめざす。

## 3. 研究の方法

### (1) 膠芽腫患者手術検体からの脳腫瘍幹細胞の樹立

膠芽腫患者の手術検体から Neurosphere 法による培養で脳腫瘍幹細胞を分離し、特異的に増幅させることで脳腫瘍幹細胞を樹立する。脳腫瘍幹細胞マーカーである CD133 分画が通常の細胞より増加していることを確認する。一方、血清を加えた通常の培養液での細胞培養も行い、これをコントロール脳腫瘍細胞（非幹細胞）とする。

### (2) 脳腫瘍幹細胞を用いた microRNA プロファイリング

樹立した脳腫瘍幹細胞とコントロール脳腫瘍細胞から RNA を抽出し GeneChip miRNA 4.0 Array による発現スクリーニングを行う。脳腫瘍幹細胞およびコントロール脳腫瘍細胞の結果を比較し、脳腫瘍幹細胞において過剰発現または発現抑制がみられる miRNA を選出する。

### (3) 悪性脳腫瘍患者血液サンプルを用いた microRNA プロファイリング

脳腫瘍患者血液サンプルは通常の検査スケジュールで行われる採血時に同意を得て追加採血を行う。血漿サンプルから RNA を抽出し GeneChip miRNA 4.0 Array による発現スクリーニングを行う。血漿サンプルで過剰発現または発現抑制がみられる miRNA を選出する。

#### (4)脳腫瘍幹細胞特異的 microRNA の同定

前項(2)と(3)のプロファイリングの結果を統合的に解析し、脳腫瘍幹細胞を規定する microRNA 並びに、バイオマーカーとなりうる microRNA を同定する。

#### (5)microRNA の発現制御が可能な膠芽腫細胞の作成

テトラサイクリン反応性プロモーターの下流に GFP と脳腫瘍幹細胞を規定する microRNA(=miRX)を含むレンチウイルスベクター(LV-TetOn-miRX)を作成する。これを膠芽腫細胞に感染させることでテトラサイクリンの On/Off により miRX の発現制御が可能な膠芽腫細胞を作成する。

#### (6)miRX の標的分子の同定と治療抵抗性機序の解明

miRX の標的分子を同定するため、miRX を過剰発現させた膠芽腫細胞とコントロール膠芽腫細胞を用い、Western-blot 解析等の手法を用いて miRX の標的分子を同定し、治療抵抗性機序の解明を試みる。

#### (7)miRX による悪性脳腫瘍の増殖抑制の検討

脳腫瘍細胞株並びに脳腫瘍幹細胞で miRX 発現制御を行い、増殖能等が変化するかを検討し、新規治療法の候補となりうるか検討する。

### 4. 研究成果

#### (1)膠芽腫患者手術検体からの脳腫瘍幹細胞の樹立

膠芽腫患者の手術検体から Neurosphere 法による培養で脳腫瘍幹細胞を分離し、特異的に増幅させることで脳腫瘍幹細胞を樹立した。Neurosphere 法で培養した細胞は脳腫瘍幹細胞マーカーである CD133 分画が通常の細胞より増加していることを確認した。血清を加えた通常の培養液での細胞培養も行い、これをコントロール脳腫瘍細胞(非幹細胞)とした。

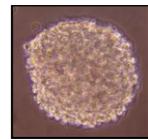


図1 Neurosphere法で培養した脳腫瘍幹細胞

#### (2)腫瘍幹細胞における microRNA 発現スクリーニング

前項で樹立した脳腫瘍幹細胞とコントロール脳腫瘍細胞から total RNA を抽出し、GeneChip miRNA 4.0 Array による発現スクリーニングを行った。脳腫瘍幹細胞およびコントロール脳腫瘍細胞の結果を比較し、脳腫瘍幹細胞において過剰発現または発現抑制がみられる microRNA を複数選出した。

#### (3)膠芽腫患者血液サンプルを用いた microRNA プロファイリング

膠芽腫患者(n=3)、低悪性度神経膠腫患者血漿(n=3)から LMW RNA を抽出した。これらの血漿サンプル由来 RNA を用いて GeneChip miRNA 4.0 Array による発現スクリーニングを行った。この結果から、膠芽腫患者血漿で過剰発現または発現抑制がみられる microRNA を同定した。

#### (4)脳腫瘍幹細胞特異的 microRNA の同定

前項(2)と(3)の結果に基づき、脳腫瘍幹細胞と膠芽腫患者血液サンプルで過剰発現または発現抑制がみられる microRNA を比較検討した。脳腫瘍幹細胞と膠芽腫患者血液サンプルの両方で発現抑制がみられる microRNA、過剰発現が見られる microRNA が存在し、腫瘍の発生、治療抵抗性のバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。また、脳腫瘍幹細胞で発現抑制されている microRNA は microRNA を量的に補うことで、「microRNA replacement therapy」として治療薬として応用可能と考えられるため、発現抑制がみられる microRNA を miRX とした。

#### (5)microRNA の発現制御が可能な膠芽腫細胞の作成

テトラサイクリン反応性プロモーターの下流に GFP と脳腫瘍幹細胞を規定する microRNA(=miRX)を含むレンチウイルスベクター(LV-TetOn-miRX)を作成した。これを膠芽腫細胞株(LN229, U87)に感染させ、テトラサイクリン(=Doxycycline)の On/Off により miRX の発現制御が可能な膠芽腫細胞を作成した。miRX が発現したかどうかを GFP の発現で確認した(図2)。

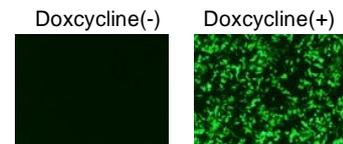


図2 microRNA 発現誘導システム

#### (6) miRX の標的分子の同定と治療抵抗性機序の解明

miRX の標的分子を同定するため、前項(5)で作成した miRX 発現誘導系を用いて、miRX を発現させた膠芽腫細胞とコントロール 膠芽腫細胞でのチロシンキナーゼシグナル関連蛋白や細胞周期関連蛋白の発現を Western blotting で検討した。miRX を発現させた膠芽腫細胞では EGFR の発現抑制と Akt のリン酸化抑制、PAK1 の発現抑制が観察された。

#### (7)miRX による悪性脳腫瘍の増殖抑制の検討

膠芽腫細胞株(LN229, U87)並びに脳腫瘍幹細胞で前項(5)で作成した miRX 発現誘導系による miRX 過剰発現を行い、増殖能の変化を検討した。膠芽腫細胞株(LN229, U87)、脳腫瘍幹細胞のいずれにおいても、増殖抑制され(図3. U87 による結果) miRX が悪性脳腫瘍の治療抵抗性を克服する新規治療法の候補となる可能性が示唆された。

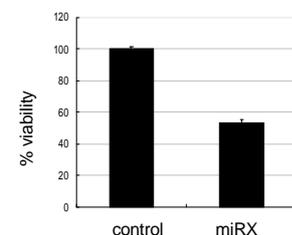


図3. miRXによる増殖抑制

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shimizu K, Tamura K, Hara S, Inaji M, Tanaka Y, Kobayashi D, Sugawara T, Wakimoto H, Nariai T, Ishii K, Sakuma I, Maehara T	4. 巻 14
2. 論文標題 Correlation of Intraoperative 5-ALA-Induced Fluorescence Intensity and Preoperative 11C-Methionine PET Uptake in Glioma Surgery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1449
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers14061449	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田村 郁, 稲次基希, 小林大輔, 菅原貴志, 田中洋次, 成相 直, 石井賢二, 前原健寿
2. 発表標題 分子診断に基づいて再分類したグリオーマにおけるMethionine PETと臨床経過の検討
3. 学会等名 第44回日本脳神経CI学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田村 郁, 稲次 基希, 小林大輔, 原 祥子, 唐鎌 淳, 菅原貴志, 田中洋次, 成相 直, 石井賢二, 前原健寿
2. 発表標題 分子診断で再分類した神経膠腫におけるMethionine PETと治療経過の検討
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第80回学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田村 郁, 稲次基希, 小林大輔, 原 祥子, 唐鎌 淳, 菅原貴志, 田中洋次, 成相直, 石井賢二, 前原健寿
2. 発表標題 分子診断で再分類したDiffuse gliomaにおけるMethionine PETと治療経過の検討
3. 学会等名 第39回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kaoru Tamura, Mai Fujioka, Masae Kuroha, Motoki Inaji, Yoji Tanaka, Tadashi Nariai, Taketoshi Maehara
2. 発表標題 Analysis of pediatric gliomas in our institute
3. 学会等名 The 19th International symposium on Pediatric Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村 郁、稲次 基希、小林 大輔、菅原 貴志、田中 洋次、成相 直、石井 賢二、前原 健寿
2. 発表標題 分子診断に基づいて再分類したグリオーマにおけるMethionine PETと臨床経過の検討
3. 学会等名 第44回日本脳神経C I学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田村 郁、稲次 基希、小林 大輔、原 祥子、唐鎌 淳、菅原 貴志、田中 洋次、成相 直、石井 賢二、前原 健寿
2. 発表標題 遺伝子変異で再分類したDiffuse gliomaにおけるMethionine PETの検討
3. 学会等名 第51回神経放射線学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田村 郁、山村 俊弘、小林 大輔、菅原貴志、稲次 基希、田中 洋次、前原 健寿
2. 発表標題 当院の小児グリオーマ症例における2021WHO脳腫瘍分類に基づいた統合診断と臨床像
3. 学会等名 第50回日本小児神経外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田村 郁、田中 洋次、稲次 基希、菅原 貴志、唐鎌 淳、清水一秀、原 祥子、阿部大数、金瑛仙、前原健寿
2. 発表標題 外視鏡とナビゲーション、術中蛍光診断を用いたグリオーマ手術
3. 学会等名 第81回日本脳神経外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田村 郁、田中 洋次、稲次 基希、菅原 貴志、唐鎌 淳、清水一秀、原 祥子、阿部大数、金瑛仙、前原 健寿
2. 発表標題 安全かつ最大限の摘出を目指した外視鏡下グリオーマ手術における工夫
3. 学会等名 第27回日本脳腫瘍の外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田村 郁、田中 洋次、稲次 基希、菅原 貴志、唐鎌 淳、清水一秀、原 祥子、阿部大数、前原 健寿
2. 発表標題 Maximal safe resectionを目指した外視鏡下グリオーマ手術における工夫
3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------