

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009年度～2010年度

課題番号：21890192

研究課題名（和文） 神経膠芽腫の薬剤耐性を誘導するマイクロRNAの探索および機能解析

研究課題名（英文） Search and functional analysis of micro RNA deriving the drug resistance of the glioblastoma

研究代表者

鎌田 健作 (KAMADA KENSAKU)

長崎大学・神経病態制御外科学・助教

研究者番号：30549655

研究成果の概要（和文）：

神経膠芽腫の標準治療薬であるテモゾロマイド(TMZ)において、腫瘍再発や薬剤耐性については十分に明らかになっていない。ここではマイクロRNA(miRNA)が腫瘍の薬剤耐性の獲得に関与するという仮説のもと、以下の結果を得た。

U251MGをはじめとする数種類の神経膠芽腫細胞株にTMZを負荷し、薬剤耐性株を樹立した。Methylation specific PCR法にてTMZ耐性に関与するMGMT promotorのmethylation statusも検討した。Microarrayにて耐性獲得前後のmiRNA発現profileを比較したところmiR-195、miR-455-3p、miR-10a\*がup-regulateされていた。これらのmiRNAを特異的にknock-downするLocked Nucleic Acid(LNA)を組み込んだanti-sense LNA-DNA oligonucleotideをデザインし標的miRNAのknock downによる効果を検討したところ、U251MGおよびその耐性株に、TMZ負荷と併せて、殺細胞効果を確認した。また、樹立した耐性株のMGMT methylation statusに変化を認めなかった。これらの結果よりTMZ耐性克服の新たな分子標的として上記miRNAが重要な役割を果す可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To identify microRNAs (miRNAs) specifically involved in the acquisition of temozolomide (TMZ) resistance in glioblastoma multiforme (GBM), we first established a resistant variant, U251R cells from TMZ-sensitive GBM cell line, U251MG. We then performed a comprehensive analysis of miRNA expressions in U251R and parental cells using miRNA microarrays. miR-195, miR-455-3p and miR-10a\* were the three most up-regulated miRNAs in the resistant cells. To investigate the functional role of these miRNAs in TMZ resistance, U251R cells were transfected with miRNA inhibitors consisting of DNA/LNA hybrid oligonucleotides. Suppression of miR-455-3p or miR-10a\* had no effect on cell growth, but showed modest cell killing effect in the presence of TMZ. On the other hand, knockdown of miR-195 alone displayed moderate cell killing effect, and combination with TMZ strongly enhanced the effect. In addition, using *in silico* analysis combined with cDNA microarray experiment, we present possible mRNA targets of these miRNAs. In conclusion, our findings suggest that those miRNAs may play a role in acquired TMZ resistance and could be a novel target for recurrent GBM treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	950,000	285,000	1,235,000
2010年度	1,050,000	315,000	1,365,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：マイクロ RNA、神経膠腫、脳腫瘍、薬剤耐性

### 1. 研究開始当初の背景

脳原発悪性腫瘍である神経膠腫のうち、最も悪性度の高い神経膠芽腫は5年生存率約7%、生存中央値14.6ヶ月と予後不良である。浸潤能が非常に高いため、脳実質が機能を保っているのに神経膠芽腫細胞の浸潤を受けている症例がほとんどである。したがって、神経膠芽腫の手術治療においては、術後神経脱落症状を起こさない範囲で最大限に腫瘍を摘出することが大原則であり、その結果として腫瘍残存は避けられない。ゆえに術後治療法としての放射線療法、化学療法が必要不可欠である。

神経膠芽腫に対する放射線治療は、現時点で拡大局所照射が原則である。当施設では定位放射線治療装置の更新に伴い、強度変調放射線治療 (intensity modulated radiation therapy: IMRT) が平成20年1月から可能となった。神経膠芽腫への応用を試みているが、浸潤性の腫瘍であるため、照射法の改良のみで治療効果を向上させることには異論もある (The use of hypofractionated intensity-modulated irradiation in the treatment of glioblastoma multiforme: preliminary results of a prospective trial. Sultanem K et al. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2004 Jan 1;58(1):247-52)。

化学療法については、2006年に新薬 temozolomide (TMZ) が認可されて以降、臨床経験が積み、報告どおりの予後改善効果が認められる。生存中央値がわずかに約2ヶ月向上したという結果であるが、ここ2~30年の研究成果の中で最も大きな進歩である (Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. Stupp et al. N Engl J Med. 2005 Mar 10;352(10):987-96)。

これらのような治療法の進歩が認められる

にも関わらず、従来の放射線化学療法でも認められていたとおり、腫瘍再発の問題、および再発した時点でほとんどの腫瘍が放射線抵抗性、薬剤耐性を獲得しているという問題は解決していない。

### 2. 研究の目的

マイクロ RNA (miRNA) とは、平均22塩基からなる一本鎖 RNA である。タンパク質に翻訳されない機能的 RNA 分子で、標的メッセンジャー RNA (mRNA) の3'側の非翻訳領域に結合して、翻訳を阻害、あるいは mRNA を分解することにより、遺伝子の発現を負に制御する (RNA in brain disease: no longer just "the messenger in the middle". Nelson PT et al. JN.J Neuropathol Exp Neurol. 2007 Jun;66(6):461-8. Review)。近年、miRNA が腫瘍発生を初めとした多くの生命現象に関与していることが判明し、新たな治療ターゲットとなる可能性がある分子として注目されている (MicroRNA and brain tumors: a cause and a cure? Mathupala SP, Mittal S, Guthikonda M, Sloan AE. DNA Cell Biol. 2007 May;26(5):301-10. Review)。

神経膠芽腫の薬剤耐性と miRNA の関連性を明らかにすることを目的とした。

### 2. 研究の方法、および4. 研究成果

神経膠芽腫細胞株 U251MG に TMZ を負荷し、耐性株 (U251R) を樹立した (図 1A)。その耐性株と野生株を MSP で比較した検討では、MGMT 遺伝子プロモーター領域のメチル化の程度に変化は認められなかった (図 1B)。これより、少なくとも MGMT 遺伝子のエピジェネティックな不活性化は、TMZ 獲得耐性の主要な原因ではない、と考えた。

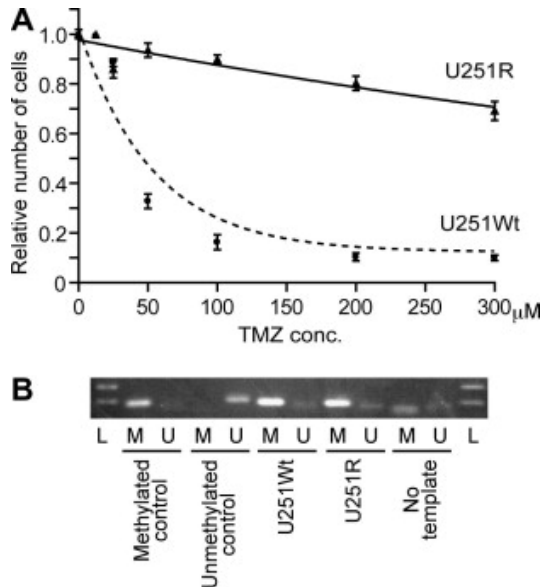


図 1

次に、TMZ 獲得薬剤耐性に寄与する miRNA の同定に焦点を絞り、miRNAmicroarray にて耐性獲得前後の miRNA 発現 profile を比較したところ miR-195、miR455-3p、miR-10a\* が主に up-regulate されていた。(表 1)

Differentially expressed miRNAs between U251Wt and U251R cells.

miRNA	Fold change (R/Wt)
hsa-miR-455-3p	5.477
hsa-miR-195	4.281
hsa-miR-10a*	3.597
hsa-miR-502-3p	3.564
hsa-miR-193b*	3.447
hsa-miR-584	3.253
hcmv-miR-US25-2-5p	3.078
hsa-miR-500*	2.906
hsa-miR-193a-5p	2.824
hsa-miR-452	2.755
hsa-miR-132	2.334
hsa-miR-503	2.062
hsa-miR-106b*	0.3765
hsa-miR-210	0.3715

表 1

U251MG の耐性株にこれらの miRNA を特異的に knock-down する Locked Nucleic Acid (LNA) を組み込んだ anti-sense LNA-DNA oligonucleotide をデザインし、標的 miRNA の knock down による効果を検討したところ、miR455-3p、miR-10a\* の knock down では TMZ 非負荷時には腫瘍増殖にほとんど影響なく、TMZ 負荷にて中等度殺細胞効果を示したが、miR-195 の knock down においては、TMZ 非負荷時にも殺細胞効果を認め、TMZ 負荷と併せると、さらなる殺細胞効果を確認した。(図 2)

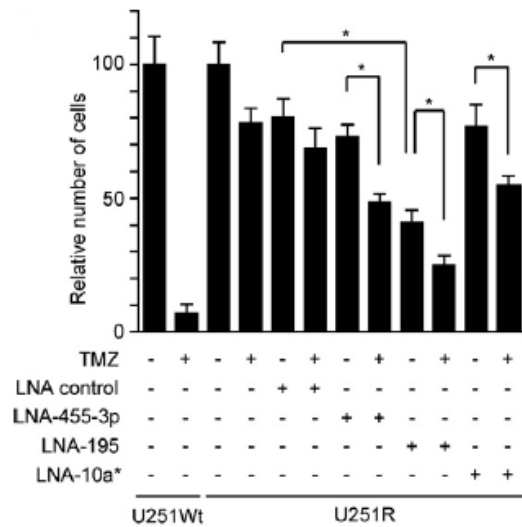


図 2

以上より、TMZ の薬剤耐性獲得においては miRNA が関与していることが確認できた。また、TMZ の薬剤耐性細胞株から対象となった miRNA を knock down することで TMZ の薬剤耐性を低下させることが可能となった。さらに miR-195 においては miRNA を knock down させることのみで殺細胞効果を発揮し、TMZ に対する薬剤耐性をもつ膠芽腫に対して miRNA は新たな治療ターゲットとなりうる可能性が示された。

### 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)

- ① Kenta Ujifuku, Kensaku Kamada, miR-195, miR-455-3p and miR-10a\* are implicated in acquired temozolomide resistance in glioblastoma multiforme cells, *Cancer Lett.* 査読有, Vol.296, 2011, 241-248
- ② Kensaku Kamada, Yuko Tanaka, A case of multinodular high-grade neuroepithelial tumor with ependymal differentiation, *Brain Tumor Pathol.* 査読有, 2011, In press
- ③ 鎌田健作 松尾孝之 永田泉, 脳動静脈奇形の定位放射線治療において nidus 描出に DynaCT が有用であった一例, 査読無, Vol.15, 2011, 159-163

〔学会発表〕(計 8件)

- ① 鎌田健作、直線加速器を用いた定位放射線治療後、当院にて10年以上の経過観察を行っている聴神経腫瘍例の検討、日本脳神経外科学会第68回学術総会、2009年10月14日、
- ② 鎌田健作、頭蓋外多発転移をきたした atypical meningioma における転移機序の考察、第27回日本脳腫瘍学会、2009年11月8日、大阪
- ③ 鎌田健作、脳内嚢胞性病変摘出における 5-aminolevulinic acid (5-ALA)を用いた術中蛍光診断の応用、第5回長崎光線力学療法研究会、2010年2月16日、長崎
- ④ 鎌田健作、診断に苦慮している左側頭一島-前頭部、腫大性脳腫瘍の一例、第28回日本脳腫瘍病理学会、2010年6月12日、大阪
- ⑤ 鎌田健作、脳内嚢胞性病変摘出における 5-aminolevulinic acid (5-ALA)を用いた術中蛍光診断の有用性、第6回日本脳神経外科光線力学研究会、2010年6月12日、福井
- ⑥ 鎌田健作、脳動静脈奇形の nidus 描出に DynaCT が有用であった一例、第19回日本定位放射線治療学会、2010年7月30日、滋賀
- ⑦ 鎌田健作、髄膜腫の grade 診断における ADC 値の有用性と MIB-1 index との比較、第69回脳神経外科学会学術総会、2010年10月28日、福岡
- ⑧ 鎌田健作、テモゾロミド加療中にサイトメガロウイルス感染症を来した2症例、第28回日本脳腫瘍学会、2010年11月28日、長野

〔図書〕(計 1件)

宮本享 永田泉 鎌田健作, EBM 脳神経外科疾患の治療, 中外医学社, 2010, 101-105

〔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  
鎌田 健作 (KAMADA KENSAKU)  
長崎大学・神経病態制御外科学・助教  
研究者番号：30549655