

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 20日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390280

研究課題名（和文） microRNAによる脳腫瘍幹細胞能制御機構の解明と治療への応用

研究課題名（英文） Functional analysis of microRNA in the regulation of brain tumor stem cell

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（和文）：

悪性神経膠腫摘出標本より長期継代脳腫瘍幹細胞株を樹立し、脳腫瘍幹細胞移植モデルを作成した。網羅的 microRNA 発現解析を行い幹細胞細胞において、膠芽腫で高発現している miR-196 の高発現が保持されており、miR-196 強制発現により、増殖能が促進され、細胞死が抑制された。さらに、神経膠腫における遺伝子発現型と miRNA の発現を比較検討し、miR-128a、-504 が形質転換へ関与する可能性を見いだした。

研究成果の概要（英文）：

We established brain tumor stem cells and mouse xenograft models. Global microRNA expression analysis revealed that miR-196, which is associated with malignant transformation of glioma, is also overexpressed in brain tumor stem cells. Functional assays showed that miR-196 could increase proliferation and inhibit apoptosis in glioma cell lines. In addition, comparison between gene expression and microRNA expression indicated that miR-128a and miR-504 are associated with mesenchymal gene expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2012年度	2,800,000	840,000	3,640,000
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

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・脳腫瘍学

キーワード：脳腫瘍幹細胞、microRNA、神経膠腫

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫は原発性脳腫瘍において最も頻度の高い腫瘍の一つであり、近年の診断・治療技術の進歩にも関わらず、未だ十分な治

療成績が得られていないのが現状である。特に最も悪性度の高い神経膠芽腫に関しては現在でも平均生存期間が1年前後とヒト悪性腫瘍の中で最も難治性の腫瘍の一つである。研

究開始当初、これらの治療抵抗性の機序を裏付ける概念として腫瘍幹細胞の存在が注目されていた。腫瘍幹細胞に特異的なgenetic、epigeneticな異常を標的とした治療により、腫瘍幹細胞能を破壊させることが新たな治療法開発に繋がる可能性が示唆されていた。また、microRNAは、新たな遺伝子発現の制御機構として注目されており、腫瘍においても重要な役割を果していることが解明されつつあり、腫瘍幹細胞における幹細胞能維への関与が示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究では脳腫瘍幹細胞の分化過程におけるmicroRNAを網羅的に解析し、脳腫瘍幹細胞能維持に重要なmicroRNA及びその標的分子（標的シグナル伝達系）を同定する。最適な腫瘍幹細胞培養法の改良、適切な幹細胞マーカーによる濃縮、免疫不全マウスによるin vivo評価を再度検討し、臨床上有用な腫瘍幹細胞の分離、同定、評価システムを構築する。腫瘍幹細胞能に関与するmicroRNAおよびその標的分子の発現制御による腫瘍幹細胞能（自己複製能、多分化能、腫瘍形成能）制御が可能か検討する。

3. 研究の方法

(1) 脳腫瘍幹細胞分離同定、移植モデル作成：悪性神経膠腫に対し、従来の細胞培養に加え、幹細胞培養を導入し、腫瘍摘出標本より脳腫瘍幹細胞の分離・同定を継続した。樹立した脳腫瘍幹細胞を免疫不全マウスに移植し、脳腫瘍幹細胞脳内移植モデル、皮下移植モデルを作成した。移植前後での遺伝子発現、miRNA発現変動を検討した。

(2) 幹細胞マーカー、分化・増殖マーカー、microRNAの発現解析：摘出標本、幹細胞培養下に分離した脳腫瘍幹細胞に対し、Agilent

miRNA arrayを用いて幹細胞関連候補miRNAを同定した。脳腫瘍悪性度に関与が示唆された21種類のmiRNA(miR-196a, b, 21, 105, 124a, 128a, 135b, 15b, 184, 200a-c, 203, 302a-d, 34a, 363, 367, 504)の発現解析を長期培養した4細胞株を用いて行った。各々TaqMan法を用いて、その発現レベルを評価した。さらに幹細胞マーカー(CD133, Nestin, Sox2, Bmi1)と分化・増殖マーカー(YKL40, CD44, PCNA, TOP2A, Olig2, DLL3, GFAP)の発現解析を行った。

(3) 神経膠腫組織型におけるmicroRNA発現解析：oligodendroglioma(OD), anaplastic oligodendroglioma(AO), anaplastic astrocytoma(AA)に対し、167個のmicroRNA発現解析をTaqMan Human microRNA panelを用いて解析を行った。さらに128例のglioma(grade2-4)に対して、21個の脳腫瘍関連候補microRNAの解析を行い、腫瘍型とmicroRNA発現の関連を検討した。

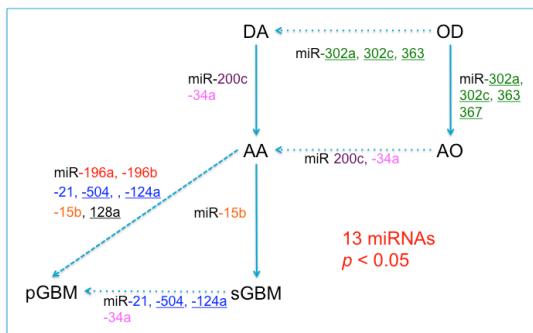
(4) 悪性神経膠腫における遺伝子発現とmicroRNA発現関連の検討：82例のglioma(grade2-4)に対し、21個の脳腫瘍関連候補microRNAとproneuralマーカー、mesenchymalマーカー、幹細胞マーカー計23遺伝子の発現を解析し、その関連を検討した。

(5) 脳腫瘍関連miRNA導入による分子生物学的検討：神経膠腫悪性化、幹細胞能に関連が示唆されたmiR-196とmesenchymalタイプとの関連を示したmiR-128a, miR-504をmimicとinhibitorを用いて発現制御を行い、神経膠腫細胞株に対する分子生物学的機能の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 脳腫瘍幹細胞分離・同定、移植モデル作

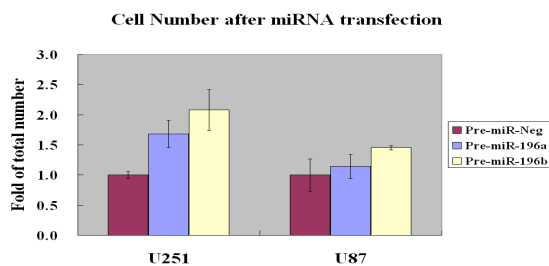
り、miR-21, -196 が悪性化に伴い有意に発現が高く、miR-128a, -504 の発現が低いことが明らかとなった (下図)。



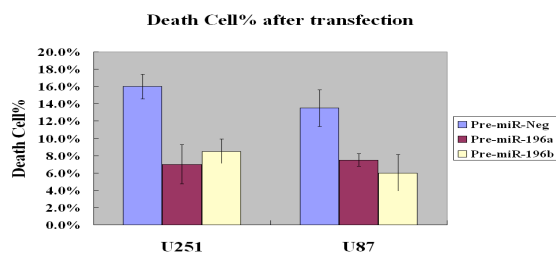
各組織型間で有意に発現の異なる microRNA

(4) 悪性神経膠腫における遺伝子発現と microRNA 発現関連の検討: 神経膠腫における遺伝子発現と microRNA 発現解析: 神経膠腫 82 例に対し、mesenchymal marker、proneural marker、stem cell marker 計 23 遺伝子と神経膠腫関連 microRNA 21 個の発現を比較検討した。primary GBM では mesenchymal marker 遺伝子、miR-21, -34a の発現が高く、secondary GBM では proneural marker 遺伝子、mi-504 発現が高いことが明らかとなった。さらに miR-128a, -504, -124, -184 発現は mesenchymal marker 発現と逆相関することを同定した。

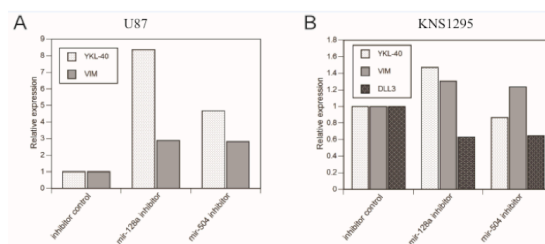
(5) 脳腫瘍関連 microRNA 導入による分子生物学的検討: miR-196 低発現細胞株に miR-196 を強制発現させると増殖能があがり、細胞死が抑制され、神経膠腫の悪性化に関与する miR-196 の生物学的機能を解明した。また、mesenchymal marker 発現と逆相関した miR-128a, -504 発現制御により mesenchymal marker 遺伝子発現の上昇を誘導し、特異的 miRNA 発現の形質転換への関与が示唆された (下図)。



miR-196 導入による細胞増殖能の促進



miR-196 導入による細胞死の抑制



miR-128a, -504 発現抑制による mesenchymal marker 遺伝子発現亢進

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 8 件)

① Clinical implications of microRNAs in human glioblastoma

Mizoguchi M, Guan Y, Yoshimoto K, Hata N, Amano T, Nakamizo A, Sasaki T:

Frontiers in Oncology (査読有) 3:19, 2013 (DOI:10.3389/fonc.2013.00019)

② Complex DNA repair pathways as possible therapeutic targets to overcome temozolomide resistance in glioblastoma
Yoshimoto K, Mizoguchi M, Hata N, Murata H, Hatae R, Amano T, Nakamizo A, Sasaki T
Frontiers in Oncology (査読有) 2: 186,

2012 (DOI:10.3389/fonc.2012.00186)

③ MicroRNAs in Human Malignant Gliomas
Mizoguchi M, Guan Y, Yoshimoto K, Hata N,
Amano T, Nakamizo A, Sasaki T

J Oncol (査読有) 2012:732874, 2012 (DOI:
10.1155/2012/732874)

④ Molecular biomarkers of glioblastoma:
current targets and clinical implications
Yoshimoto K, Mizoguchi M, Hata N, Amano T,
Nakamizo A, Sasaki T

Current Biomarker Findings (査読有)
2012(2):63-76, 2012(DOI:http://dx.doi.or
g/10.2147/CBF.S25590)

⑤ Associations between microRNA
expression and mesenchymal marker gene
expression in glioblastoma

Ma X, Yoshimoto K, Guan Y, Hata N,
Mizoguchi M, Sagata N, Murata H, Kuga D,
Amano T, Nakamizo A, Sasaki T

Neuro Oncol (査読有) 14(9):1153-62, 2012
(DOI:10.1093/neuonc/nos145)

⑥ Molecular characteristics of
glioblastoma with 1p/19q co-deletion

Mizoguchi M, Yoshimoto K, Ma X, Guan Y,
Hata N, Amano T, Nakamizo A, Suzuki SO,
Iwaki T, Sasaki T.

Brain Tumor Pathol (査読有) 29(3):148-53,
2012 (DOI:10.1007/s10014-012-0107-z)

⑦ Loss of heterozygosity analysis in
malignant gliomas

Mizoguchi M, Kuga D, Guan Y, Hata N,
Nakamizo A, Yoshimoto K, Sasaki T

Brain Tumor Pathol (査読有) 28(3):191-6,
2011 (DOI:10.1007/s10014-011-0038-0)

⑧ MiRNA-196 is upregulated in
glioblastoma but not in anaplastic
astrocytoma and has prognostic
significance

Guan Y, Mizoguchi M, Yoshimoto K, Hata N,
Shono T, Suzuki SO, Araki Y, Kuga D,
Nakamizo A, Amano T, Ma X, Hayashi K,
Sasaki T

ClinCancer Res (査読有) 16(16):4289-4297,
2010(DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0207)

[学会発表] (計 15 件)

① 溝口昌弘: グリオーマにおけるmicroRNA
発現異常の網羅的解析、第30回日本脳腫瘍学
会学術集会、2012年11月25日、グランドプリ
ンス広島(広島)

② 溝口昌弘: グリオーマにおけるmicroRNA
網羅的発現解析に基づく新たな知見、日本脳
神経外科学会第71回学術総会、2012年10月19
日、大阪会議場(大阪)

③ 溝口昌弘: 悪性神経膠腫における網羅的
microRNA発現解析、第13回日本分子脳神経外
科学会、2012年09月20日、熊本市国際交流会
館(熊本)

④ 溝口昌弘: 膠芽腫テモゾロミド放射線同
期療法後の早期再手術症例の検討、第17回日
本脳腫瘍の外科学会、2012年09月08日、ホテ
ルニューグランド(横浜)

⑤ Masahiro Mizoguchi: Clinical
Implications of Loss of Heterozygosity and
IDH Mutation in Malignant Glioma, The 4th
International Symposium of Brain Tumor
Pathology、2012年05月24日、名古屋国際会
議場(愛知)

⑥ Koji Yoshimoto: Diagnostic
significance of microRNA and gene
expression in glioma patients, The 4th
International Symposium of Brain Tumor
Pathology、2012年05月24日、名古屋国際会
議場(愛知)

⑦ 溝口昌弘: 悪性神経膠腫における
1p/19q 欠失の評価、第 29 回日本脳腫瘍学会

学術集会, 2011年11月28日, 水明館(岐阜県)

⑧ 溝口昌弘: 遺伝子異常に基づく high grade glioma の治療戦略, 日本脳神経外科学会第70回学術総会, 2011年10月13日, パシフィコ横浜(神奈川県)

⑨ 溝口昌弘: 膠芽腫における腫瘍局在と遺伝子異常、臨床経過に関する検討, 第16回日本脳腫瘍の外科学会, 2011年9月9日, パシフィコ横浜(神奈川県)

⑩ 溝口昌弘: 1p/19q 共欠失 GBM と oligodendroglioma の分子病理学的比較, 第29回日本脳腫瘍病理学会, 2011年5月20日, タワーホール船堀(東京)

⑪ 官彦雷、溝口昌弘: 乏突起膠腫における microRNA 発現プロファイル, 第28回日本脳腫瘍学会学術集会, 2010年11月29日, 軽井沢プリンスホテル(長野)

⑫ 吉本幸司: 無血清培地で長期培養したグリオーマの遺伝子発現解析, 第28回日本脳腫瘍学会学術集会, 2010年11月28日, 軽井沢プリンスホテル(長野)

⑬ 溝口昌弘: 分子病理学に基づく悪性神経膠腫の診断と治療, 第69回日本脳神経外科学会学術総会, 2010年10月27日, 福岡国際会議場(福岡)

⑭ 溝口昌弘: LOH 解析に基づく悪性神経膠腫の分子病理学的検討, 第28回日本脳腫瘍病理学会, 2010年5月22日, 大阪市中央公会堂(大阪)

⑮ 吉本幸司: Glioblastoma における成長因子受容体、脳腫瘍幹細胞マーカーの発現解析とその相関, 第28回日本脳腫瘍病理学会, 2010年5月21日, 大阪市中央公会堂(大阪)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

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

研究者番号: 50380621

(2) 研究分担者

吉本 幸司 (YOSHIMOTO KOJI)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号: 70444784

天野 敏之 (AMANO TOSHIYUKI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 70448413

(3) 連携研究者

なし