

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 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791355

研究課題名（和文）

microRNA による癌治療抵抗性機構の解明と悪性脳腫瘍の診断法・治療法の開発

研究課題名（英文）

MicroRNA-222 is a potential target for developing blood-based diagnostic methods and treatment of malignant glioma

研究代表者

植田 良 (UEDA RYO)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：30317143

研究成果の概要（和文）:

最近、悪性神経膠芽腫細胞の研究において、がん細胞が mRNA や microRNA (miRNA) やタンパク質を含むエクソソームを放出し、がんの進行に関わる可能性が報告された。我々は、ヒト脳腫瘍細胞で高発現している特定の miRNA が、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) による細胞傷害の感受性を低下させ、抗腫瘍免疫応答における免疫効果相で免疫抵抗性をもたらすことを報告した。さらに、脳腫瘍患者血清から抽出したエクソソームはこの miRNA を含んでおり、そのレベルは健常人血清に比較して有意に高く、血清 miRNA 検出による脳腫瘍診断開発の可能性が示唆された。また、この miRNA を含有する脳腫瘍細胞由来のエクソソームは、樹状細胞に取り込まれ、樹状細胞上でも、T 細胞活性化に重要な因子を低下させる可能性を見いだした。したがって、がん細胞由来エクソソームに含まれる miRNA は、担がん生体の免疫抑制病態に関与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）:

We previously reported that microRNA (miR) -222 over-expressed in cancer cells down-regulates ICAM-1, thereby reducing cancer cell susceptibility to cytotoxic T lymphocytes (CTLs). In this study, we found that miR-222 was up-regulated in some of human glioma tissues. Inhibition of miR-222 led to recovery of ICAM-1 expression in glioma cell lines, resulting in restoration of their susceptibility to CTL-mediated cytolysis. Thus, the increased miR-222 expression may contribute to glioma escape from the host immune surveillance. We then found that miR-222 could be detected by quantitative PCR in serum of glioma patients. Moreover, the elevated miR-222 expression was associated with disease progression and poor prognosis of the patients, suggesting possible development of new diagnostic methods for malignant characteristics of glioma and prognosis of the patients. Interestingly, miR-222 containing exosomes secreted from glioma cells may be uptaken by dendritic cells (DCs), and decreased ICAM-1 expression on DC, which is important for T cell activation. These results indicate that miR-222 may be a potential target for developing novel diagnostic and therapeutic methods for glioma patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫（グリオーマ）に対する抗癌剤として、唯一その有効性が示された薬剤 Temozolomide (TMZ) 投与と放射線療法を併用した治療施行患者の生存期間中央値は 14.6 ヶ月、2 年生存率は 26.5% であり、特筆すべき治療成績ではなく、依然としてグリオーマの新たな治療法の開発が望まれている。これまでに申請者は、難治性グリオーマに対する新たな治療法として抗原特異的免疫療法の開発を目指し、グリオーマに高発現する新規腫瘍抗原、およびその抗原由来 T 細胞エプーブ同定、同抗原ワクチンが担癌マウスにおいて抗原特異的免疫を誘導して抗腫瘍効果を発揮することを明らかにし、同定したグリオーマ抗原を標的とする免疫療法がグリオーマの新たな治療法として有用である可能性を見いだした。

一方、近年癌免疫療法の臨床試験が実施・評価され、単純な癌抗原ワクチンでは十分な抗腫瘍効果を得るに至らないことが明らかになったが、担癌生体の免疫抑制状態の解除などの免疫制御法の改良により、癌免疫療法的大幅な治療効果増強の可能性があることが示された。そこで我々は、グリオーマに対する癌免疫療法効果増強に向けて、担癌生体で産生され、強力な免疫抑制作用をもつ TGF- β の阻害が、グリオーマ抗原ペプチドワクチン療法の効果を増強することを明らかにするなど、グリオーマによる抗腫瘍免疫抑制誘導機構の解明と克服法の開発を進めてきた。さらに、近年、内在性 non-coding RNA の一つである microRNA (miRNA) が、癌の形成に関与することが分かってきたが、申請者は、グリオーマや大腸癌で高発現する複数の miRNA を同定し、その中の一つ hsa-miR-222 (miR-222) は癌細胞の ICAM-1 分子を低下させることにより、癌抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) による細胞傷害活性を回避して癌細胞を免疫抵抗性とする機序を解明した。これらの学術的背景・研究成果に基づき、本研究において、癌免疫抑制因子として作用する miRNA を阻害して癌細胞によって誘導される免疫抑制環境を解除することにより、癌抗原を標的とする免疫療法の効果を増強し、グリオーマおよび癌に対する新規免疫療法の開発・改良を着想するに至った。

一方、内在性 RNA が、血液循環中で安定に、かつ検出可能なレベルで存在していることが証明されたが、癌細胞に発現する miRNA がどのような形で循環血液内に存在し、癌微小環境に存在するどの細胞で生理的作用を發揮しているのか、その詳細な分子機構は解明されていない。また、これまでにグリオーマの性質・存在を評価しうる有用な診断マーカー

の発見には至っておらず、血液循環中に安定して存在する癌特異的 miRNA の生物学的・臨床医学的意義を明らかにすれば、血液中の癌特異的 miRNA は新たな診断マーカーとして有用となる可能性がある。そこで本研究では、(1) グリオーマ細胞 miRNA による新たな免疫抑制機構の解明、(2) グリオーマや他の癌患者血清中に存在する miRNA 検出による、癌の性質や存在の診断法の開発を目的とする。本研究の成果は、miRNA を介した癌細胞の免疫回避機構の解明とその克服法の開発と、miRNA による新規グリオーマおよび癌診断法の開発につながり、癌生物学だけでなく、癌医療に貢献できる可能性が高い。

2. 研究の目的

我々はこれまで、難治性である神経膠腫（グリオーマ）に対する免疫療法の開発に向けて、グリオーマ抗原を標的とする画期的な免疫療法の可能性を見いだしてきた。癌免疫療法の効果を増強するには、癌微小環境を構築する細胞集団が産生する抗腫瘍免疫抑制因子を除去・阻害することが重要であるが、本研究では、癌細胞に発現して免疫抑制的に作用する miRNA に注目し、グリオーマを中心に癌における miRNA による免疫抑制的癌微小環境構築の分子機構を解明する。さらに、免疫抑制性 miRNA の阻害とグリオーマ抗原を標的とした免疫療法を併用した、新規グリオーマ免疫療法の有用性を検証する。また、検体として汎用性の高い癌患者血清において、癌特異的免疫抑制性 miRNA の検出を試み、グリオーマ患者血清中に存在する miRNA の発現レベルと、患者の様々な臨床的特徴との相関関係を統計学的に解析して、新規グリオーマ診断マーカーとしての臨床応用の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 血清 miRNA 検出、およびその発現レベルと患者臨床情報の相関関係の評価

グリオーマ患者 (56 人) 健常人 (36 人)、脳腫瘍以外の頭蓋内疾患患者 (12 人) から採取された 250 μ L の血清において、グリオーマの形成・進展に関与することが示されているグリオーマ関連 miR (miR-10b、miR-21、miR-222) の発現レベルを定量的 RT-PCR により測定した。さらに、測定した血清 miR 発現レベルと対応する患者の臨床病理的因子との相関性を統計学的に解析した。グリオーマ細胞株に内在性に発現する miR を miR

inhibitor を用いて抑制し、抑制細胞の細胞増殖能、浸潤能、遊走能を評価した。

(2) 血清 miRNA の存在形態、生理的機能の検討

内在性 miRNA は、血液循環中や凍結保存血清中で安定に、かつ検出可能なレベルで存在していることが証明されている。しかし、どのような機構で血液中に分泌され、安定に存在しているのかについては未だに不明である。血清中で miRNA がどのような形（エクソソーム、分泌小胞や蛋白複合体など）で存在するかについて、超遠心法や抗体による検出法を用いて検討する。

4. 研究成果

(1) 血清 miRNA 検出、およびその発現レベルと患者臨床情報の相関関係の評価

解析された miR のうち、血清 miR-222 値は健常人に比べてグリオーマ患者において有意に上昇しており、さらに腫瘍悪性度および腫瘍組織における miR-222 発現レベルと正の相関を示した。また、血清 miR-222 低値患者は、高値患者に比べて有意に生存期間が延長していた。多変量解析の結果、血清 miR-222 値は腫瘍摘出度とともに、腫瘍摘出度と独立した強い予後因子であることが判明した。さらに、複数のグリオーマ細胞株において内在性 miR-222 発現を抑制したところ、これらの細胞はコントロール群に比してその浸潤能および遊走能が低下した。以上より、血清 miR-222 値測定により腫瘍組織 miR-222 発現レベル、グリオーマの性質・存在を評価できる可能性が示唆された。また、miR-222 発現が低いグリオーマでは、浸潤能および遊走能が比較的減弱するために良好な経過をたどる傾向があると推測され、血清 miR-222 検出によるグリオーマ診断開発の可能性が示唆された。

(2) 血清 miRNA の存在形態、生理的機能の検討

最近、悪性神経膠芽腫細胞の研究において、がん細胞が mRNA や miRNA や血管新生促進タンパク質を含むエクソソームを放出し、がんの進行に関わる可能性が報告された。そのエクソソームは血清中で検出可能であり、エクソソーム中 RNA の分析により、脳腫瘍細胞がもつ遺伝子変異を解析できることが明らかになっている。そこで、これまでほとんどわかっていない分泌型マイクロ RNA の存在形態、その生理作用について、検証を加えた。

癌細胞内の miR-222 は、がん細胞の ICAM-1 分子を低下させることにより、がん細胞を抗腫瘍免疫抵抗性とする機序を明らかになっている。前述の我々の研究結果でグリオーマ

患者血清中存在することが明らかとなった分泌型 miRNA の miR-222 が、実際にエクソソーム分画中存在し、がん細胞以外の細胞（たとえば樹状細胞）に取り込まれて、標的遺伝子（この場合は ICAM-1）の発現抑制という本来の生理機能を発揮するかどうかを invitro 実験により解析した。

はじめに、グリオーマ細胞株培養上清および患者血清サンプルからエクソソーム分画を超遠心法によって抽出したところ、miR-222 は検出可能なレベルでそれぞれに存在していることが確認された。次に、miR-222 を人為的に高・低発現させたグリオーマ細胞株を作製、それぞれの培養上清からエクソソーム分画を抽出し、このエクソソームをヒト末梢血 CD14 陽性細胞から樹立した樹状細胞に投与したところ、より多く miR-222 を含んだエクソソームを投与した場合には miR-222 の標的遺伝子の一つである ICAM-1 が抑制された。つまり、miR-222 を含有するグリオーマ細胞由来のエクソソームは、樹状細胞に取り込まれ、樹状細胞上でも、T 細胞活性化に重要な ICAM-1 を低下させる可能性が示唆された。これらの結果から、グリオーマ細胞を一つの例として解析したが、がん細胞由来エクソソームは、がん組織内で樹状細胞に取り込まれたり、リンパ管を介してセンチネルリンパ節に流入して樹状細胞に取り込まれて、抗腫瘍免疫誘導の場として重要なセンチネルリンパ節で、すなわち免疫誘導相でも抗腫瘍免疫誘導を抑制する可能性が考えられる。さらなるがん細胞と免疫細胞の相互作用におけるエクソソームの意義の解明は、がん形成機構の解明だけでなく、がんの診断・治療法の開発に有用と考えられる。

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0件)

[学会発表](計3件)

植田 良、厲倩、谷口智恵、岡田秀穂、小坂展慶、落谷孝広、河上 裕。グリオーマに発現する MicroRNA-222 は新規診断法と治療法開発に有用である。2010年11月28日、日本脳腫瘍学会学術総会、軽井沢

植田 良、厲倩、谷口智恵、岡田秀穂、小坂展慶、落谷孝広、河上 裕。MicroRNA-222 is a potential target for developing blood based diagnostic methods and treatment of malignant glioma. 2010年9月23日、日本癌学会学術総会、大阪

植田 良、厲倩、谷口智慧、岡田秀穂、小坂展慶、落谷孝広、河上 裕。MicroRNA-222 is a potential target for developing blood-based diagnostic methods and treatment of malignant glioma. 2010年7月20日、日本遺伝子治療学会学術総会、宇都宮

〔図書〕(計1件)

植田 良、Li Qian、中村公子、谷口智慧、宮崎潤一郎、川村直、河上裕： 癌細胞由来エクソソームによる免疫系への作用とその臨床応用. 実験医学 29巻、3号、5ページ、羊土社、2011年2月発行

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田 良 (UEDA RYO)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：30317143