

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462266

研究課題名(和文) microRNAプロファイリングによる悪性グリオーマの新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapy for malignant gliomas based on the Comprehensive analysis of microRNA

研究代表者

大西 丘倫 (Onishi, Takanori)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70233210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト悪性グリオーマよりグリオーマ幹細胞(GIC)を樹立し、GICに共通して発現異常が見られるmicroRNAの解析を行い、有意に発現が低下しているmiR-340を新規発見した。miR-340をGICに過剰発現させると、増殖、浸潤、運動性が低下し、マウス脳内に移植したGICは腫瘍形成能が抑制され、マウスは長期間生存した。また、miR-340の標的遺伝子を探索し、新規なものとしてPLAT(組織プラスミノゲン アクティベータ)を同定した。PLATをsiRNAにて発現抑制するとmiR-340の過剰発現時と同様、細胞増殖能、浸潤能、運動能の低下とin vivoでの腫瘍形成が抑制された。

研究成果の概要(英文)：Glioma-initiating cells(GICs) were obtained from the primary culture of human glioma tissues and they were presented for a comprehensive analysis of microRNA(miR) by the miR microarrays. We identified a novel miR-340 that was aberrantly down-regulated in all GICs. To examine the functions of miR-340, miR-340 gene was overexpressed in GICs. The miR-340 overexpressed GICs significantly decreased cell proliferation, invasion, migration in vitro and the GICs transplanted in the mouse brain could not generate a tumor. In addition, we defined PLAT(TPA: tissue plasminogen activator) as the direct target gene for miR-340. Knockdown of PLAT with the shRNA also inhibited cell proliferation, invasion, migration and tumorigenesis in mouse brains. These results indicate that miR-340 can play a role as a tumor suppressor in glioma stem cells through the target gene, PLAT

研究分野：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：悪性グリオーマ 浸潤 癌幹細胞 microRNA

## 1. 研究開始当初の背景

グリオーマは頭蓋内原発性腫瘍の約 30% で、最悪性の膠芽腫がその内の約 1/3 を占めている。標準の集学的治療である外科的切除、放射線・化学療法を行っても、膠芽腫の生存期間中央値は約 15 ヶ月と極めて予後が不良である。その最大の原因は、グリオーマに特有の高度浸潤性の腫瘍細胞による早期腫瘍再発にあると考えられている。

このようなグリオーマの腫瘍病態に癌幹細胞と考えられるグリオーマ幹細胞が深く関わっている可能性が示唆されてきた。一方、グリオーマの幹細胞に関する研究はまだ少なく、幹細胞の様々な悪性形質に対して特異的な microRNA の存在については、ほとんど報告が見られなかった。そこで、本研究において、グリオーマ幹細胞を樹立し、その中に存在し得る未知の microRNA を同定し、グリオーマ幹細胞を標的とした新しい治療の開発を計画した。

## 2. 研究の目的

新規にヒトグリオーマ患者からグリオーマ幹細胞を複数樹立し、それらのグリオーマ幹細胞に共通して特異的な発現をしている microRNA を同定し、その生物学的機能を調べることによってグリオーマの病態解明を行うと共に、新規治療法への開発を進めることを目的とした。

## 3. 研究の方法

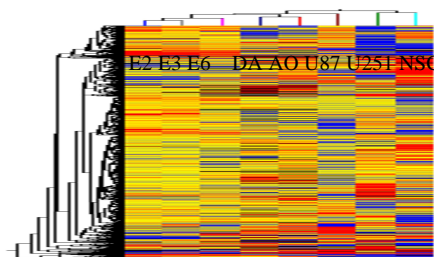
複数のヒトグリオーマ摘出組織よりグリオーマ幹細胞を獲得し、microarray による microRNA の網羅的発現解析を行った。対照のヒト神経幹細胞と比較して、複数のグリオーマ幹細胞に共通して異常発現している microRNA を検索した。同定された新規の microRNA は有意にその発現が低下していたため、グリオーマ幹細胞にこの microRNA を過剰発現させ、その機能解析を行った。機能解析として、細胞の増殖能、浸潤能、遊走能、マウス脳内移植腫瘍の腫瘍形成能への影響を調べた。

また、この microRNA の標的遺伝子についても網羅的解析を行い、その同定を計画した。同定した新規の標的遺伝子の機能解析についても、標的遺伝子に対する shRNA を用いた発現抑制を行い、microRNA と同様に細胞の増殖能、浸潤能、遊走能、マウス脳内移植腫瘍の腫瘍形成能への影響を調べた。

## 4. 研究成果

7 種類のヒトグリオーマ幹細胞を樹立することができ、これら全ての幹細胞に共通して著明に発現低下している 7 種類の microRNA を同定し、その中で新規の microRNA である miRNA-340 を発見した (図 1)。

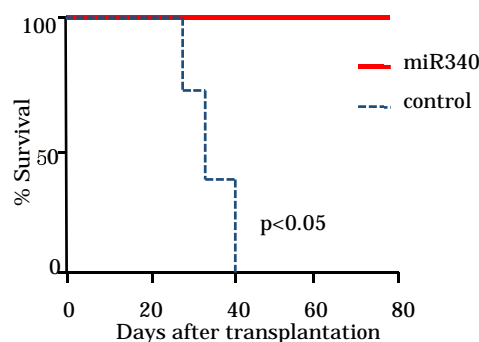
図 1. miRNA の網羅的発現解析



この遺伝子はグリオーマ幹細胞において発現が抑制されているため、miRNA-340 の過剰発現を行った。このことにより、グリオーマ幹細胞では増殖、浸潤、遊走、及び移植腫瘍の形成が抑制され、担腫瘍マウスの生存期間は対照と比べ、極めて長期間となり観察中の期間では腫瘍死は見られなかった (図 2)。この細胞死にアポトーシスの機序が働いていることも判明した。

次に、miRNA-340 の標的遺伝子を探索し、

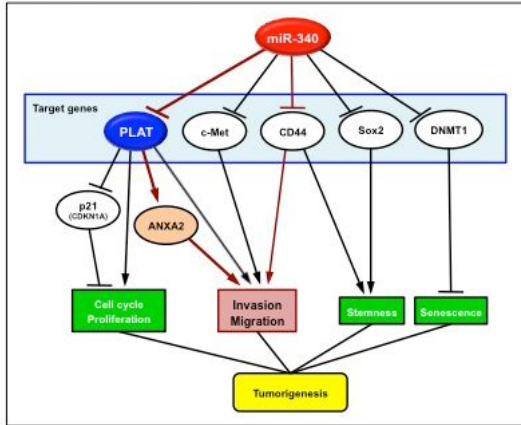
図 2. 担腫瘍マウスの生存率



PLAP (tissue plasminogen activator: TPA) を新規に同定した。PLAP の発現をその shRNA を用いての knock down すると、グリオーマ幹細胞の増殖、浸潤、遊走、マウス脳内での腫瘍形成、全てが抑制された。すなわち、miRNA-340 はグリオーマ幹細胞に対する腫瘍抑制遺伝子 (tumor suppressor) であることが明らかとなった。さらに、miRNA-340 は直接的標的分子である PLAP の他に、c-MET, CD44, Sox2 などの遺伝子の制御や、PLAT を介して p21 や ANXA2 (アネキシン A2) の抑制に関わっており、細胞増殖、腫瘍浸潤、幹細胞性に立脚した強い腫瘍形成能に密接に関与する遺伝子であることが示唆された (図 3)。

図 3 グリオーマ幹細胞の増殖、浸潤、腫瘍形成における miR-340 の役割

グリオーマ浸潤においてmiR-340により制御される遺伝子



以上の成果から、悪性グリオーマの腫瘍摘出後の早期再発を阻止するための治療法として、miRNA-340を用いた核酸医薬は、その効果が充分期待されるところであるが、これまで核酸分子を含めて多くの物質が血液脳関門の存在により、必要とする脳内に到達しない。

最近、我々の教室では、集束超音波(FUS)とマイクロバブル(又はナノバブル)を用いて、特定の場所の血液脳関門を可逆的に開放する方法を開発している。すなわち、ナノバブルをカチオニックリボソームに封入し、miRNA-340を含有するプラスミドをこのバブル表面に結合させ、血液中に投与した後、腫瘍摘出腔、或いは、残存腫瘍を中心に集束超音波を照射する計画を進めている。この新しい薬物輸送法(drug-delivery system)は、さまざまな治療困難な脳の疾患に応用され得ることが予想され、脳疾患の治療における新しいブレイクスルーとなるであろう。

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 2 件)

1. 山下大介、末廣 諭、高野昌平、大上史朗、大西丘倫：グリオーマ幹細胞特異的 microRNA の同定と診断・治療への応用における意義。愛媛医学 35(1):6-11, 2016  
査読あり

2. Yamashita D, Kondo T, Ohue S, Takahashi H, Ishikawa M, Matoba R, Suehiro S, Kohno S, Harada H, Tanaka J, Ohnishi T: miR340 suppresses the stem-like cell function of glioma-initiating cells by targeting tissue plasminogen activator. Cancer Res 75:1123-1133, 2015  
査読あり

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 山下大介、末廣諭、高野昌平、大上史朗、近藤亨、大西丘倫: エキソーム内 microRNA プロファイリングによるグリオーマ幹細胞特異的 microRNA の同定. 第33回日本脳腫瘍学会学術集会. 2015年12月8日(京都府京都市グランドプリンスホテル京都)

2. Yamashita D, Kondo T, Takahashi H, Suehiro S, Kohno S, Ohue S, Ohnishi T: miR-340 acts as a tumor suppressor in tumorigenesis of human glioma-initiating cells by targeting tissue plasminogen activator. 20th Annual Scientific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology, 2015.11.20 (San Antonio, USA)

3. 山下大介、近藤亨、大西丘倫: Identification and functional analysis of miR-340 and target gene PLAT suppressing tumorigenesis of glioma-initiating cells. 第74回日本癌学会学術総会 2015.10.8(愛知県名古屋 名古屋国際会議場)

4. 山下大介、近藤亨、末廣諭、井上明宏、高野昌平、大上史朗、大西丘倫：ヒトグリオーマ幹細胞の腫瘍形成を抑制する microRNA-340 とその標的分子 PLAT の機能解析. 第32回日本脳腫瘍学会学術集会. 2014年12月1日(千葉県千葉市 シェラトングランドベイ トーキョーホテル)

5. 山下大介、近藤亨、大上史朗、高橋寿明、末廣諭、井上明宏、高野昌平、大西丘倫: Glioma 形成に関わる新規 microRNA (miR-X) の機能解析及びその標的遺伝子の同定. 第31回日本脳腫瘍学会学術集会 2013年12月10日(宮崎県宮崎市フェニックスシーガイアリゾート)

6. 山下大介、近藤亨、高橋寿明、末廣諭、井上明宏、高野昌平、大上史朗、大西丘倫：グリオーマ形成に関わる新規 microRNA の同定および性状解析. 第72回日本脳神経外科学会総会 2013年10月18日(神奈川県横浜市パシフィコ横浜)

7. 山下大介、近藤亨、大上史朗、高橋寿明、末廣諭、井上明宏、高野昌平、大西丘倫：ヒトグリオーマ幹細胞の腫瘍形成を抑制する microRNA-340 の同定：機能解析と標的分子の検索. 第32回日本脳腫瘍病理学会 2013年5月23日(徳島県徳島市あわぎんホール)

8. 山下大介、近藤亨、高橋寿明、末廣諭、井上明宏、高野昌平、原田広信、大上史朗、久門良明、田中潤也、大西丘倫：グリオーマ形成に関わる新規microRNAの性状解析。第31回日本脳腫瘍病理学会 2012年5月24日（東京都墨田区 国際ファッションセンター）

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：グリオーマ形成阻害作用を有するmicroRNA

発明者：大西丘倫、山下大介、大上史朗、近藤亨、的場亮

権利者：大西丘倫、山下大介、大上史朗、近藤亨、的場亮

種類：

番号：特願 2013-238279

出願年月日：2013年11月18日

国内外の別：国内

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

大西 丘倫 (Ohnishi, Takanori)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70233210

### (2)研究分担者

大上 史朗 (Oue, Shiro)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70213626

高野 昌平 (Kono, Shohei)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70467851