

令和元年6月7日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19954

研究課題名(和文) 脳腫瘍幹細胞をターゲットとした悪性脳腫瘍の治療抵抗性機序の解明とその克服

研究課題名(英文) New treatment strategy for resistant brain tumors targeting brain tumor stem cell

研究代表者

田村 郁 (TAMURA, Kaoru)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70629146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳腫瘍の治療抵抗性に脳腫瘍幹細胞が関わることを示唆されているため、脳腫瘍幹細胞で発現低下を認めるmicroRNA7(miR7)に着目した。miR7を脳腫瘍幹細胞に導入すると、脳腫瘍幹細胞の増殖抑制、細胞増殖因子の発現低下、細胞死受容体の発現上昇を認めた。脳腫瘍幹細胞にmiR7を導入しTRAILを作用させると、TRAIL抵抗性脳腫瘍幹細胞にapoptosisが誘導された。脳腫瘍幹細胞を移植した脳腫瘍マウスでmiR7とTRAILによる治療は、腫瘍縮小と生存延長を示した。miR7は細胞増殖やapoptosisの経路に働き、miR7とTRAILの併用が悪性脳腫瘍の治療抵抗性を克服する可能性が示された。

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、脳腫瘍幹細胞で発現が抑制されているmicroRNAとその標的分子を同定した。これにより、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。microRNAとTRAILを用いた治療が、膠芽腫を代表とする悪性脳腫瘍患者の治療効果の改善や新規創薬研究への応用に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)：Recent evidence suggests that a glioma stem cell (GSC) subpopulation may determine the biological behavior of tumors, including resistance to therapy. microRNAs, which have a central role in the regulation of gene expression, might play a fundamental role in tumorigenesis, controlling cell proliferation and apoptosis. We showed that microRNA7 (miR7) is downregulated in GSC and expression of miR7 in glioma cells results in downregulation of EGFR and p-Akt. This leads to an upregulation of DR5, priming resistant GBM cells to TRAIL-induced apoptotic cell death. In vivo, an administration of AAV-miR7 significantly decreases tumor volumes, upregulates DR5, and enables TRAIL to eradicate GBM generated from patient-derived TRAIL-resistant GSC, significantly improving survival of mice. This study identifies the unique role of miR7 in linking cell proliferation to death pathways that can be targeted simultaneously to eliminate GBM, thus presenting a promising strategy for treating GBM.

研究分野：脳神経外科

キーワード：brain tumor glioma stem cell microRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 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を有し、かつ分化多様性を有し、二次腫瘍を形成する元となる細胞である。がん幹細胞は 1997 年に世界で初めて急性骨髄性白血病において同定され、固形腫瘍におけるがん幹細胞は 2003 年に乳がんと同定された。それに引き続き 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た。更に、2006 年に悪性脳腫瘍に対する放射線治療は、脳腫瘍細胞以外の腫瘍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)。我々も膠芽腫患者 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、脳腫瘍幹細胞をターゲット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と考えられる。

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 に着目した。microRNA 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 microRNA 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 microRNA 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, HMGA2 を抑制する microRNA (=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 microRNA の関連を示唆する知見が次々と発表されている。これらの研究成果は microRNA 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。

## 2. 研究の目的

網羅的スクリーニングによって脳腫瘍幹細胞 (brain tumor stem cell) に特異的な microRNA を探索し、その標的分子を同定することにより、悪性脳腫瘍の治療抵抗性の分子機序を解明することを目的とした。更には、microRNA による脳腫瘍幹細胞の制御により、悪性脳腫瘍の治療抵抗性を克服しうる新規治療法を開発することを目的とした。

## 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。

### (2) 脳腫瘍幹細胞における microRNA 発現スクリーニング

脳腫瘍幹細胞とコントロール脳腫瘍細胞において、microRNA 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 microRNA (miRX) を選出する。

(3) miRX 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 miRX を含むレンチウイルスベクター (LV-TetOn-miRX) を作成することで、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。

(4) miRX の標的分子の同定、脳腫瘍治療抵抗性機序の解明

miRX の標的分子の同定するため、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でのチロシンキナーゼシグナル関連蛋白などの発現を Western blotting 等で検討する。

(5) 脳腫瘍幹細胞における miRX の発現制御と *in vitro* 機能解析

脳腫瘍幹細胞における miRX 発現制御を行い、増殖能等を *in vitro* で検討する。

(6) マウスグリオーマモデルを用いた miRX の *in vivo* 機能解析

ヌードマウスの脳内に脳腫瘍幹細胞を移植し、作成されたマウス脳腫瘍内に miRX を過剰発現させる。増殖能、腫瘍形成能等を生体内モニタリング技術を用いて *in vivo* で検討する。

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。

(2) 脳腫瘍幹細胞における microRNA 発現スクリーニング

脳腫瘍幹細胞とコントロール脳腫瘍細胞において、microRNA 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 miRNA を複数選出した。脳腫瘍幹細胞で発現抑制が見られる 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、脳腫瘍幹細胞で発現抑制されている microRNA7(miR7)に着目して以降の解析を行った。

(3) miR7 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 miR7 を含むレンチウイルスベクター (LV-TetOn-miR7) を作成した。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 miR7 の発現制御が可能な膠芽腫細胞を作成した。

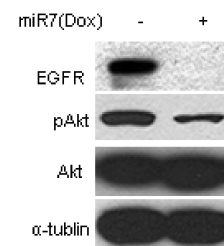


図1

(4) miR7 の標的分子の同定、治療抵抗性機序の解明

膠芽腫細胞(LN229)に LV-TetOn-miR7 を感染させ、テトラサイクリン(Dox)を用いて miR7 を過剰発現させた。miR7 を過剰発現させた膠芽腫細胞では、Western blotting の解析で、EGFR の発現抑制と Akt のリン酸化抑制が観察された(図 1)。また miR7 を過剰発現させた細胞では death receptor の発現が上昇していた(図 2)。miR7 を過剰発現させた細胞に TRAIL を作用させることにより Casepase8 や cleaved PARP の発現が上昇し、アポトーシスが誘導された(図 2)。

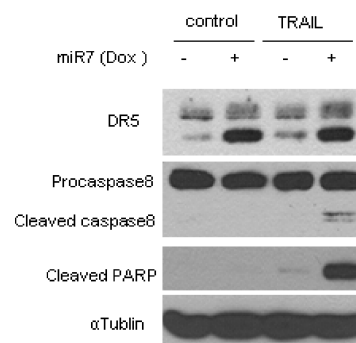
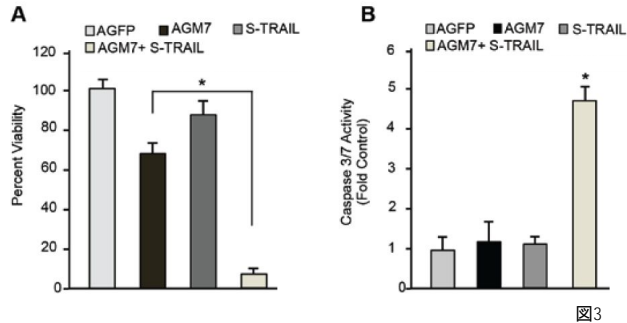


図2

(5) 脳腫瘍幹細胞における miR7 の発現制御と *in vitro* 機能解析

脳腫瘍幹細胞(GBM4)に Adeno-associated virus を用いて miR7 を過剰発現させ(AGM7)、増殖能を *in vitro* で検討した。miR7 を過剰発現させた脳腫瘍幹細胞はコントロール Adeno-associated virus(AGFP)を感

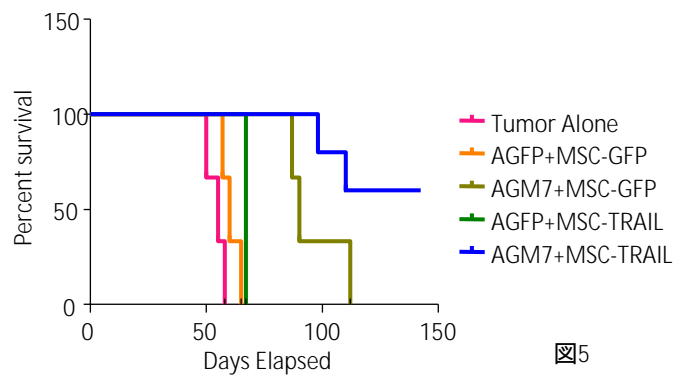
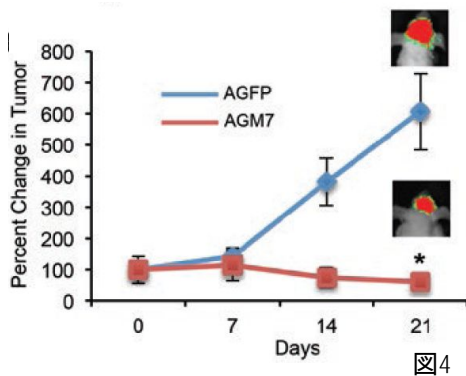
染させた脳腫瘍幹細胞と比較して増殖が抑制されていた。miR7 を過剰発現させた脳腫瘍幹細胞に S-TRAIL を作用させると、腫瘍の増殖がさらに抑制された(図 3A)。また miR7 を過剰発現させ、TRAIL を作用させた細胞 (AGM7+S-TRAIL) では、



Casepase3/7 の活性が上昇しており、apoptosis の誘導が示唆された (図 3B)。

(6) マウスグリオーマモデルを用いた miR7 と TRAIL による膠芽腫の治療効果の検討

脳腫瘍幹細胞(GBM4)をヌードマウスに移植した脳腫瘍マウスモデルで、miR7 の *in vivo* 機能解析を行った。この際、脳腫瘍幹細胞(GBM4)に、レンチウイルスにより蛍ルシフェラーゼ(Fluc)を発現させた。Fluc の発光と細胞数は比例関係にあるため、発光の強度で腫瘍サイズを観察することが可能であった。Adeno-associated virus を用いて miR7 を過剰発現させると(AGM7)、コントロール群(AGFP)と比較し、マウス脳内の腫瘍の増殖が抑制された(図 4)。さらに、miR7 の過剰発現を行なった上で、TRAIL 分泌幹細胞による治療(MSC-TRAIL)を行うと腫瘍の縮小効果がみられ、miR7 と TRAIL による治療によって(図 5、AGM7+MSC-TRAIL 群) 有意な生存延長効果が認められた(p<0.01)。以上より脳腫瘍幹細胞で発現が抑制されている miR7 は cell proliferation や apoptosis の pathway に働き、miR7 と TRAIL による治療が、悪性脳腫瘍の治療抵抗性を克服しうる可能性が示された。



5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

(1)Bhere D\*, Tamura K\*, Wakimoto H, Choi SH, Purow B, Debatisse J, Shah K. microRNA-7 upregulates death receptor 5 and primes resistant brain tumors to caspase-mediated apoptosis. \* Bhere D and Tamura K contributed equally to this work. Neuro Oncol. 2018;20(2):215-224

(2) Nakano T, Tamura K, Tanaka Y, Inaji M, Hayashi S, Kobayashi D, Nariai T, Toyohara J, Ishii K, Maehara T. Usefulness of 11C-Methionine Positron Emission Tomography for Monitoring of Treatment Response and Recurrence in a Glioblastoma Patient on Bevacizumab Therapy: A Case Report. Case reports in oncology. 2018.05; 11 (2): 442-449.

(3)Ogishima T, Tamura K, Kobayashi D, Inaji M, Hayashi S, Tamura, R Tadashi Nariai T, Kenji Ishii K, Maehara T, ATRX Status Correlates with 11C-Methionine Uptake in WHO Grade II and III Gliomas with *IDH1* Mutations Brain Tumor Pathol. 2017;34(1):20-27

(4)Dong X, Tamura K, Kobayashi D, Ando N, Sumita K, Maehara T. LAPT4B-35 is a novel prognostic factor for glioblastoma. J Neurooncol. 2017;132(2):295-303

〔学会発表〕(計 10 件)

(1)田村 郁, Deepak Bhere, Wakimoto Hiroaki, Choi Sung Hugh, Purow Benjamin, Debatisse Jeremy, Shah Khalid, 前原 健寿. TRAIL 分泌幹細胞と microRNA を用いた治療抵抗性グリオーマに対する新規治療法 第 55 回ニューロ・オンコロジーの会 2018 年 7 月 28 日 東京

(2)田村 郁, Deepak Bhere, Wakimoto Hiroaki, Choi Sung Hugh, Purow Benjamin, Debatisse Jeremy, Shah Khalid, 前原 健寿. 治療抵抗性グリオーマに対する TRAIL と microRNA を用いた新規治療法. 第 77 回日本脳神経外科学会学術総会 2018 年 10 月 10-12 日 仙台

(3)田村 郁, 稲次 基希, 小林 大輔, 平 直記, 若林 光, 林志保里, 工藤 琢巳, 壽美田 一貴, 田中 洋次, 成相 直, 石井 賢二, 前原 健寿. 視床グリオーマにおける H3K27M 変異と 11C-methionine-PET 集積、臨床経過の検討. 第 36 回日本脳腫瘍学会学術集会 2018 年 12 月 2-4 日 小田原

(4)田村 郁, 稲次 基希, 林志保里, 荻島 隆浩, 成相 直, 石井 賢二, 豊原 潤, 前原 健寿: WHO2016 改定分類に基づいた神経膠腫の integrated diagnosis と [11C]methionine-PET の関係. 日本脳神経外科学会第 76 回学術総会 10 月 12 日-14 日名古屋

(5)田村 郁, 董 暁書, 小林大輔, 安藤登, 壽美田一貴, 前原健寿: 膠芽腫における LAPT4B-35 の発現と予後因子としての意義. 第 35 回日本脳腫瘍学会学術集会 11 月 26 日-28 日高松

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

### (2)研究協力者

研究協力者氏名: Khalid Shah

ローマ字氏名: Khalid SHAH

研究協力者氏名: 脇本 浩明

ローマ字氏名: Hiroaki WAKIMOTO

研究協力者氏名: 古橋 八重子

ローマ字氏名: Yaeko FURUHASHI

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。