

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19973

研究課題名(和文) ストレス受容性を制御するmicroRNAは脳腫瘍の治療感受性を向上させられるか？

研究課題名(英文) MicroRNA regulating metabolic stress enhances therapeutic sensitivity in glioma

研究代表者

小川 大輔(Ogawa, Daisuke)

香川大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：70524057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究計画では、microRNAの一種であるmiR-451という分子が、脳腫瘍細胞に対し、治療感受性を向上させるか検討し、その発現を増やす因子を同定する。MiR-451は代謝性ストレスに対するスイッチとしての働きをもっており、脳腫瘍細胞が治療に対し、よりストレスを感じさせることで、治療効果を増強させるものである。実験結果から、腫瘍細胞にmiR-451を発現させた状態で治療すると、より多くの細胞死が誘導された。またそのmiR-451を発現させる因子としてOct1を同定した。さらに高糖状態におけるラットの脳ではmiR-451の発現上昇が確認された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to see if miR-451, a one of microRNAs which regulates metabolic stress, will increase therapeutic sensitivity of brain tumor cells. Upregulation of miR-451 in brain tumor cells increased chemo-sensitivity and radiation sensitivity causing brain tumor cells to death. We found Oct1 as a positive transcription factor to increase expression level of miR-451. We also found that miR-451 expression level was increased in high blood glucose model rats.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：microRNA miR-451 脳腫瘍 グリオーマ AMPK Oct1

1. 研究開始当初の背景

神経膠芽腫患者の平均生存期間は 14 カ月程度と、最も予後の悪い悪性腫瘍の一つであり、治療感受性を向上するための追加療法の開発が喫緊の課題である。MicroRNA (MiR) は平均 22 塩基対程度の短い non-codingRNA で、messenger RNA (mRNA) の主に 3'-UTR と相補的に結合することで、その翻訳抑制に関わる。

申請者は低グルコース等の代謝性ストレス環境下において、miR-451 の発現が抑制され、ターゲットである CAB39 と AMPK が活性化し、不必要な増殖を抑制することで、ATP の無駄遣いを抑えて細胞生存を図っていることを明らかにした (2010, Mol Cell)。いわば、低糖状態において miR-451 が抑制されることで AMPK が活性化されるのは細胞生存のためには必須の生理機能であると考えられた。このため、低糖状態で miR-451 を強制発現させると、AMPK が抑制され、細胞は低糖状態にも関わらず ATP の消費が亢進するため、エネルギーの枯渇により細胞死へ導かれる。

これまで、治療後に腫瘍細胞は AMPK を活性化すると報告してきた。つまり AMPK 活性は腫瘍細胞の環境適応を図っていると考えられ、前述の低糖状態と同じように治療後の腫瘍細胞に miR-451 を強制発現させることで、細胞はストレス環境に適応できなくなり、死滅すると推測される。以上より、miR-451 は、治療感受性を向上しうると着想し、これを証明する。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究計画では microRNA-451 (miR-451) が AMPK を抑制することで、脳腫瘍のストレス環境への適応性を阻害し、より多くの細胞をアポトーシスに導くことにより、テモゾロマイド療法 (TMZ) や放射線療法 (以下、併せて "治療") に対する感受性を向上させることを目的とする。低グルコース等の代謝性ストレス環境下において AMPK が活性化することは、細胞を生存させる上で必須であるが、最近、治療によっても腫瘍細胞の AMPK 上昇が示され、治療に対する生存にも関与していると着想した。このことから、miR-451 が治療後の AMPK 活性化を抑制し、脳腫瘍の治療感受性を向上させることで、神経膠芽腫患者の生命予後を改善することを目指す。

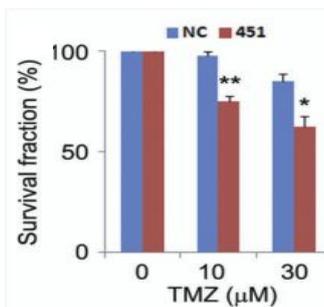
3. 研究の方法

本研究計画では、miR-451 が治療感受性を向上させるか検討し、その発現を制御する転写因子を同定したのち、in vivo においても同様の結果が得られるか調べる。進め方としては、以下とする。

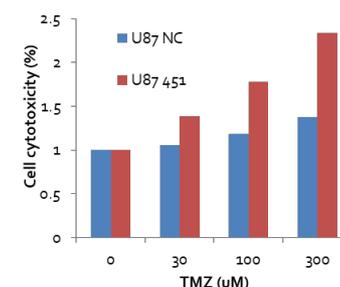
- A) MiR-451、AMPK の発現・抑制系を用いて、治療感受性を調べる
- B) MiR-451 と同様の効果を持つ AMPK 阻害剤の Compound C を用いて、治療感受性を調べる。
- C) 発現制御因子の PPAR や Oct1 がプロモーターとして働いているか発現・抑制系を用いて確認する
- D) ChIP assay を用いて、発現制御因子が miR-451 の遺伝子上流に結合しているか確認する
- E) 高血糖あるいは低血糖マウスを作成し、miR-451 の脳における発現量を比較する

4. 研究成果

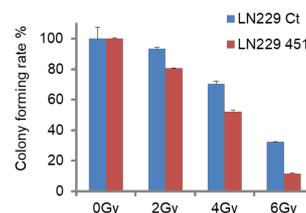
- A) MiR-451 の脳腫瘍の化学療法・放射線療法感受性向上効果の検討



MiR-451 の強制発現が脳腫瘍抗がん剤であるテモゾロマイド (以下 TMZ) 治療感受性を向上していることが示された。



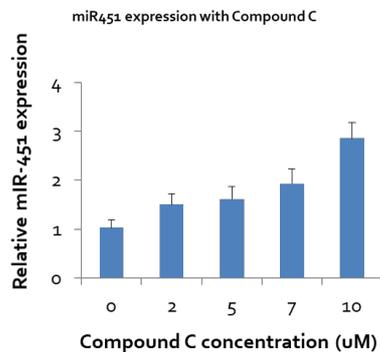
MiR-451 の強制発現が脳腫瘍細胞の細胞毒性を強めていることが示された (LDH assay)。



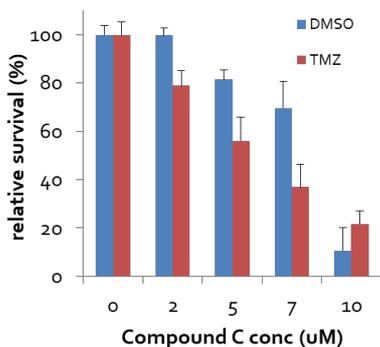
さらに、MiR-451 の強制発現は脳腫瘍細胞に対する放射線感受性も強めていることが示された。

- B) MiR-451 と同様の効果をもつ薬剤である AMPK 阻害剤 (Compound C) を投与し、化学療法 (TMZ) と放射線療法の各組み合わせで治

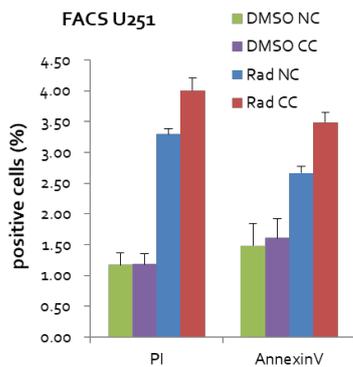
療ストレスをかけ、細胞の生存率を比較した。



Compound C によって、濃度依存的に miR-451 は発現上昇していた。



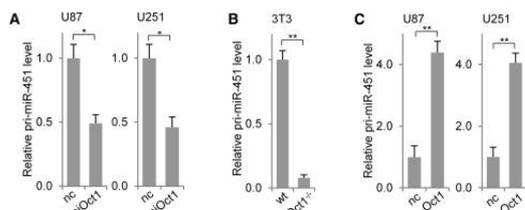
脳腫瘍細胞は Compound C 濃度依存的に TMZ に対して治療感受性が向上していた。



Compound C を投与した状態で放射線照射を行ったところ、フローサイトメトリーで AnnexinV の発現が上昇しており、Compound C が放射線感受性も向上させ、脳腫瘍細胞にアポトーシス誘導していたことがわかった。

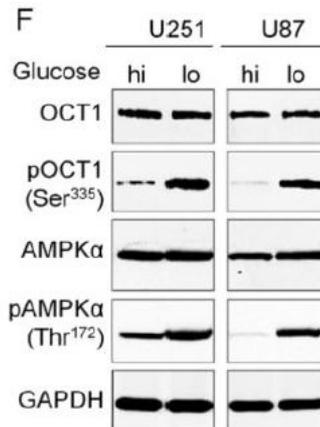
C) MiR-451 を発現制御する転写因子の解明

データベースを用いて、miR-451 の転写因子として Oct1 を予想し、実証実験を行った。

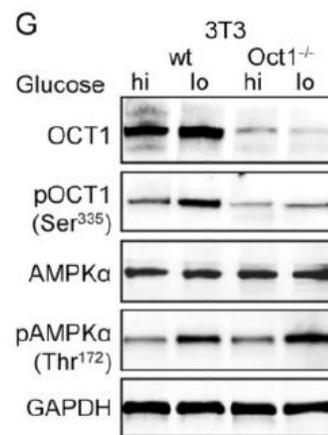


発現ベクターや siRNA、Oct1 ノックアウト細胞を用いて miR-451 がどのように動くか観察した。

miR-451 は Oct1 発現ベクターによる強制発現で上昇し、siRNA やノックアウト細胞では発現低下していたため、Oct1 は miR-451 のポジティブプロモーターとして作用していることが分かった。

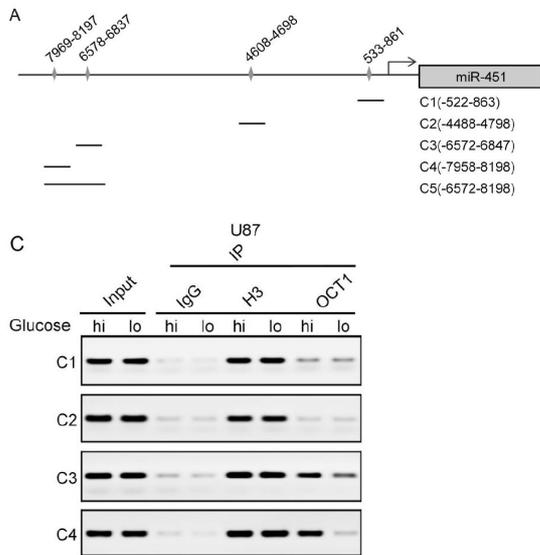


逆に低糖状態において Oct1 の発現がどのように変化するか調べたところ、低糖状態では、Oct1 がリン酸化され、不活化されることで、miR-451 が低発現となっていることがわかった。(Oct1 は脱リン酸化されることで活性化されることが知られている)



Oct1 ノックアウト細胞を用いて同様の実験を行ったところ、リン酸化はおこななかった。つまり、糖濃度依存的に Oct1 のリン酸化がおこり、miR-451 の発現制御されていることが分かった。

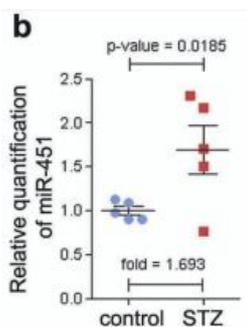
D) Oct1 が MiR-451 のプロモーター領域に直接結合しているか、ChIPassay を用いて調べた。



データベースを参考に予想した結合領域 C1-C4のうち、C4領域において、高糖時に OCT1 が結合し、低糖時には OCT1 が結合していないことが確認された。

これらのことから、高糖時には、Oct1 が脱リン酸化され、活性化するため、miR-451 のプロモーター領域である C4 領域に結合し、miR-451 の発現は上昇する、と考えられた。

E) In vivo における miR-451 の効果の検討
In vivo における miR-451 の動態はほとんど知られていないため、まず糖依存性を確認する。



ストレプトゾトシン (STZ) は膵臓の細胞特異的に破壊する作用を持ち、糖尿病モデルマウスを作成するのに利用されている (Benette, 1972, Science)。これと持続インスリンポンプを用いて、それぞれ高血糖と低血糖マウスを作成し、その脳における miR-451 の発現量を比較することで、in vivo においても糖依存性に miR-451 の発現がコントロールされていることを示す。

高血糖 STZ ラットの脳における miR-451 の発現上昇がみられ、in vivo においても、糖依存性に発現調節がされていることがわかった。

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 6 件)

1. Serial blood lactate measurements and its prognostic significance in intensive care unit management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage patients. Okazaki T, Hifumi T, Kawakita K, Shishido H, Ogawa D, Okauchi M, Shindo A, Kawanishi M, Inoue S, Tamiya T, Kuroda Y. *J Crit Care*. 2017 Jun 1;41:229-233. 査読有

2. Target Serum Sodium Levels During Intensive Care Unit Management of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. Okazaki T, Hifumi T, Kawakita K, Shishido H, Ogawa D, Okauchi M, Shindo A, Kawanishi M, Tamiya T, Kuroda Y. *Shock*. 2017 May 11. 査読有

3. (Pro)renin receptor is crucial for glioma development via the Wnt/ β -catenin signaling pathway. Kouchi M, Shibayama Y, Ogawa D, Miyake K, Nishiyama A, Tamiya T. *J Neurosurg*. 2017 Jan 6:1-10. 査読有

4. Blood Glucose Variability: A Strong Independent Predictor of Neurological Outcomes in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. Okazaki T, Hifumi T, Kawakita K, Shishido H, Ogawa D, Okauchi M, Shindo A, Kawanishi M, Tamiya T, Kuroda Y. *J Intensive Care Med*. 2016 Sep 14. 査読有

5. Usefulness of positron emission tomographic studies for gliomas. Miyake K, Ogawa D, Okada M, Hatakeyama T, Tamiya T. *Neurol Med Chir*. 2016 Jul 15;56(7):396-408. 査読有

6. Glucose-based regulation of miR-451/AMPK signaling depends on the OCT1 transcription factor. Ogawa D (Co-first author), Ansari KI, Rooj AK, Lawler SE, Krichevsky AM, Johnson MD, Chiocca EA, Bronisz A, Godlewski J. *Cell Rep*. 2015 May 12;11(6):902-909. 査読有

7. Correlation between ^{18}F -fluoromisonidazole PET and expression of HIF-1 and VEGF in newly diagnosed and recurrent malignant gliomas. Kawai N, Lin W, Cao WD, Ogawa D, Miyake K, Haba R, Maeda Y, Yamamoto Y, Nishiyama Y, Tamiya T. *Eur*

J Nucl Med Mol Imaging. 2014 Oct;41(10):1870-8. 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 第 35 回日本脳腫瘍学会学術集会 デジタルポスター(高松、2017/11/26-11/28) グリオーマ形成に関わるエピジェネティックな制御についての検討、小川 大輔、柴山 弓季、岡田 真樹、三宅 啓介、西山 成、田宮 隆

2. The 14th Meeting of the Asian Society for Neuro-Oncology (ASNO 2017)October 29-31, 2017, Osaka, Japan, Groping for the epigenetic regulation of gliomagenesis, Daisuke Ogawa, Yuki Shibayama, Masaki Okada, Keisuke Miyake, Akira Nishiyama, Takashi Tamiya

3. 第 6 回 Neuro-Oncology WEST 招待講演、演題名「神経膠腫における Wnt-catenin を介した (pro) renin receptor の発現と役割」、河内雅章、小川 大輔、岡田 真樹、三宅 啓介、田宮 隆、大阪、2017 年 10 月 21 日(土) 16:25 ~ 16:45

4. The 5th Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology Societies (WFNOS 2017) May 3-7, 2017 - Zurich, Switzerland. Rapid adaptation to metabolic stress depend on microRNA expression in Glioma, Daisuke Ogawa, Khairul I. Ansari, Masaki Okada, Keisuke Miyake, Takashi Tamiya, EA Chiocca, Agnieszka Bronisz, Jakub Godlewski

5. 第 39 回日本分子生物学会年会 シンポジウム招待講演 3PS18-2 セッション「がんとかん幹細胞の代謝特性」、演題名「グリオーマの microRNA 発現調整による微小環境適応のための代謝制御について」、小川 大輔、岡田 真樹、三宅 啓介、田宮 隆、EA Chiocca、Jakub Godlewski、神奈川、2016 年 12 月 2 日(金) 13:30-15:00

6. 第 17 回日本分子脳神経外科学会学会賞受賞講演 演題名「Glucose-Based Regulation of miR-451/AMPK Signaling Depends on the OCT1 Transcription Factor」、Ogawa D (Co-first author), Ansari KI, Rooj AK, Lawler SE, Krichevsky AM, Johnson MD, Chiocca EA, Bronisz A, Godlewski J.、東京、2016 年 8 月 27 日(土) 12:40~13:10

7. 第 4 回 Neuro-Oncology WEST 招待講演、演題名「ストレス制御された miR-451/AMPK シグナルと Oct-1 との関連」、小川 大輔、岡田 真樹、三宅 啓介、田宮 隆、大阪、2015 年 10 月 3 日(土) 16:45 ~ 17:05

8. 第 33 回日本脳腫瘍病理学会 ポスター受賞、演題名「MicroRNA がグリオーマの遊走能および糖代謝に与える病理学的な影響についての検討」、小川大輔、三宅啓介、田宮隆、EA Chiocca、Jakub Godlewski、香川、2015 年 5 月 30 日(土)

〔図書〕(計 0 件)

〔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
小川 大輔 (OGAWA, Daisuke)
香川大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号：70524057

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()