

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02913

研究課題名(和文) グリオーマにおける(プロ)レニン受容体をターゲットとした新規分子治療の研究

研究課題名(英文) A new molecular therapy using (pro)Renin Receptor for gliomas

研究代表者

田宮 隆 (Tamiya, Takashi)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：50252953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：神経膠腫(グリオーマ)の中でも膠芽腫は最も予後の悪い腫瘍の一つであり、早急な追加療法の開発が望まれている。申請者らは、(プロ)レニン受容体(p)RRが、Wnt/カテニン経路を介して、がん形成に関わる重要分子であり、これを抑制することで膠芽腫の増殖能が抑えられることを世界に先駆けて報告する。また、本研究計画は、開発した(p)RRに対する抗体を用い、(p)RR抗体が膠芽腫に対して、抗腫瘍効果をきたすか評価し、膠芽腫の真新しい治療法と成り得るか、探索した。総じて、本研究計画は、(p)RRを中心としたグリオーマに対する新たな診断および治療戦略基盤を創出するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究計画においては、(P)RRが神経膠腫において真新しい治療ターゲットと成り得ることを示す内容となっており、本研究計画の(p)RRに対する抗体療法は抗腫瘍効果が見込まれ、新規がん治療の分子ターゲットと成り得る。その結果、膠芽腫の早期発見による、初期段階で治療が開始されることで、患者生命予後の改善および、医療費削減にも貢献することができる。このことから本研究から得られる成果は、社会的に極めて大きなインパクトを与えると想定される。

研究成果の概要(英文)：The prognosis of Glioblastoma (GBM) patients remains one of the worst among all the malignant tumors. Therefore, a novel therapeutic method has been long waited. We report that the pro-renin receptor is related in tumorigenesis of GBM by mediating one of the most important part of Wnt/beta catenin pathway. Hence, by silencing pro-renin receptor, we have successfully suppressed glioblastoma tumorigenesis. Now, this time we have developed the antibody for Glioblastoma, so we planed to seek if this antibody works as a brand new therapy for Glioblastoma.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：Glioblastoma (pro)renin receptor molecular therapy glioma antibody Wnt/ -catenin pathway glioma stem cell gliomagenesis

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫は原発性脳腫瘍の約 25% を占め、境界不明瞭なため、手術で全摘出することは不可能で、化学療法や放射線治療も有効でなく、必ず再発する。2006 年に日本で適応開始したテモゾロマイド (TMZ) は、歴史上初めて神経膠芽腫の平均生存期間を、有意差を持って延長した薬剤であるが、それでもそれまでの 12 カ月から 14 カ月に延長した程度であり、早急な薬剤感受性の向上するための追加療法の開発が望まれている (Stupp, N Engl J Med. 2005)。

(P)RR はレニン・アンジオテンシン系 (RAS) の構成因子として同定されたため、血管障害に関わる数多くの報告がなされてきた。当初、(P)RR は RAS に関与する血圧調節因子として同定されたため、がん形成に携わる重要な分子として気づかれにくかったが、Wnt/ カテニン経路との関係が報告されると、当大学の西山らにより、(P)RR が Wnt/ カテニンシグナル経路を介して核異型性や染色体の増幅など、ゲノムの恒常性を破綻させ、発がんに関与しており、膵癌形成に重要な分子として再発見された。この結果を受け、(P)RR に対する抗体を開発し、膵癌細胞に作用させたところ、抗腫瘍効果を発揮した。これをもとに、我々は、グリオーマにおいても、(P)RR に対する抗体が抗腫瘍効果を発揮するのではないか、と考えた。

当教室においては、薬剤耐性遺伝子 (MDR1, MRP1, MRP2, MRP3, MRP5, ABCG2, MGMT, Topo など) に注目し研究を行ってきた (Cancer Res 57:5086-92, 1997, Cancer Res 59:8-13, 1999, Genes Chromosomes Cancer 27:110-6, 2000, Jpn J Cancer Res, 92:778-84, 2001, Jpn J Cancer Res. 2001 Sep; 92 (9):968-74, Jpn J Cancer Res 92:1133-7, 2001, Brain Tumor Pathol 21:57-61, 2004, など)。また、臨床においても患者一人一人の薬剤耐性遺伝子発現プロファイリングを行い、その患者に応じた有効な化学療法の選択および不応薬剤の不使用による副作用の軽減を図るテーラーメイド化学療法で高度先進医療「薬剤耐性遺伝子検索による悪性脳腫瘍の化学療法」を承認されており、以前より薬剤耐性遺伝子に関するノウハウを蓄積している。これらの臨床データから、薬剤耐性の発現を抑制させることが、治療抵抗性を変化させ、予後の改善に繋がる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究計画の目的は、(P)RR と Wnt/ カテニン経路を抑制することで、グリオーマに対し、抗腫瘍効果を発揮し、膠芽腫に対する真新しい治療法を確立することである。当教室においては、長年にわたって脳腫瘍の研究を継続しており、患者の予後改善に向けて探索をおこなってきた。我々は、今までは心腎の血管障害に関わる分子として研究されてきた (P)RR が、膵癌形成に関わっていることを見出し、さらに、膠芽腫と同様に (P)RR が、グリオーマ形成の初期段階において重要な Key molecule として関わっていることを報告した。本研究計画はその発展として、(P)RR に対する抗体が開発され、膵癌において著名な腫瘍増殖抑制効果を示したため、同様に (P)RR を発現している膠芽腫においても同等の効果が得られれば、これは革新的な治療法になりえると考え、着想した。その結果、膠芽腫患者の予後の改善に寄与することが期待される。

3. 研究の方法

1) 神経膠腫のグレード別における (P)RR 発現率の違いについて

まずは神経膠腫において、(P)RR の発現を調べるため、病理切片を用いて、免疫染色を行った。使用した抗体は、(P)RR に対する抗体である。コントロールとして、正常脳においても (P)RR に対する抗体で免疫染色し、発現の有無を調べた。評価は免疫染色された陽性領域の面積を視野面積で割った (P)RR IHC score (%) を用いた。これを神経膠腫のグレード別に評価し、各グレードにおける (P)RR 発現率の違いを調べた。

2) (P)RR 発現率と細胞増殖の関係について

神経膠腫の連続病理切片を用いて、(P)RR に対する免疫染色および Ki-67 に対する免疫染色をおこなった。検体ごとに (P)RR IHC score (%) と Ki67 Labeling index (%) との陽性率を比較し、

散布図を描いた。またその検体の神経膠腫のグレードを評価し、それぞれの陽性率を比較した。

3) small interference RNA (siRNA)を用いた(P)RR のノックダウンによる Wnt/ カテニン経路の抑制

U87MG, U251, T98G などのグリオーマ細胞株について、Vehicle、Scrambled siRNA をコントロールに用いながら、(P)RR に対する siRNA を用いたノックダウンを行った。それらの培養細胞から蛋白を抽出し、(P)RR、Wnt2、Active カテニン、cyclinD1、アクチンの蛋白発現量についてウェスタンブロッティング法を用いて評価した。

4) siRNA を用いた(P)RR のノックダウンによる細胞増殖抑制効果についての検討

先ほどと同様に U87MG、U251MG、T98G などのグリオーマ細胞株について、Vehicle、Scrambled siRNA をコントロールに用いながら、(P)RR に対する siRNA を用いたノックダウンを行ったのち、48 時間後に WST-1assay を行い、細胞増殖度合いを評価した。また、同様の方法で処理したグリオーマ細胞株群を、直接細胞数をカウントし、経時的に 24hr、48hr、72hr と細胞数を評価した。

5) (P)RR 抗体の細胞増殖抑制効果の検討

U87MG、U251MG、T98G などのグリオーマ細胞株について、培養液に(P)RR 抗体を添加し、48 時間後の細胞数について、WST-1assay を用いて評価した。(P)RR 抗体の濃度については血清を用いたコントロールおよび、(P)RR 抗体の濃度をそれぞれ 100ug/ml、200ug/ml、400ug/ml とした。

6) (P)RR 抗体と TMZ 併用効果についての検討

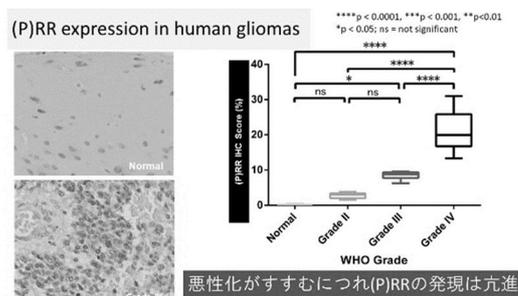
U87MG、U251MG、T98G などのグリオーマ細胞株について、培養液に(P)RR 抗体と TMZ を添加し、48 時間後の細胞数について、WST-1assay を用いて評価した。(P)RR 抗体の濃度については 200ug/ml とし、TMZ の濃度については、DMSO をコントロールとし、TMZ をそれぞれ 10uM、100uM、200uM とした。

7) (P)RR 抗体の Wnt/ カテニン経路への抑制についての評価

(P)RR 抗体が Wnt/ カテニン経路を抑制しているかについて、レポーターアッセイを用いて検討した。U251MG グリオーマ細胞株を用いて、Wnt/ カテニン経路の終末である Wnt target genes を発現するプロモーターとなる TCF/LEF binding site を模した遺伝子配列 (TOP flash) および、これに mutation を加えた遺伝子配列 (FOP flash) に、これらが発現すると Luciferase も発現するようにベクター組み換えを行い、U251MG グリオーマ細胞株に Lipofection 法を用いて遺伝子導入した。培養して 48 時間後に Luciferase の発現量を評価し、(P)RR 抗体が直接的に Wnt/ カテニン経路を抑制しているか評価した。

4. 研究成果

1) 神経膠腫のグレード別の(P)RR 発現量についての検討

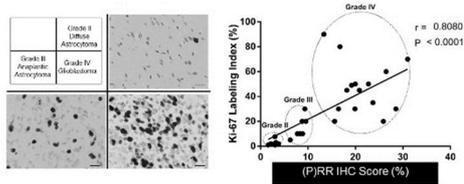


神経膠腫の病理切片を用いて、(P)RR に対する免疫染色を行ったところ、(P)RR は細胞質に染色され、正常脳組織においては、ほとんど染色されなかった。一方で、神経膠腫に関しては、そ

のグレードが高くなるにつれて、染色面積の増加がみられ、(P)RR の発現量が増加していることが示唆された。神経膠腫において、グレードに関わらず(P)RR が恒常的に発現しており、さらに悪性化に伴い(P)RR 発現量が増加していることを確認した。

2) 神経膠腫における(P)RR 発現量と細胞増殖率およびグレードとの関係についての検討

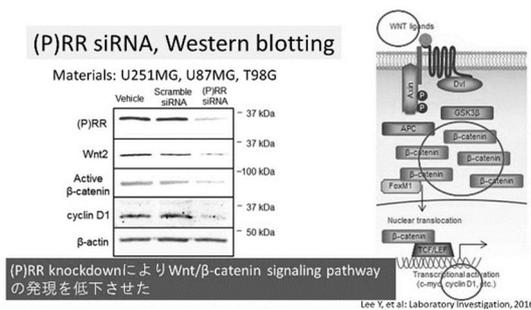
(P)RR expression and Ki-67 labeling index



(P)RRの発現量とKi-67 Labeling Indexは正相関する。

神経膠腫の連続病理切片を用いて、(P)RR に対する免疫染色および Ki-67 に対する免疫染色をおこなったところ、(P)RR の陽性染色面積である(P)RR IHC score(%)が増加するにつれて、Ki67 Labeling index (%)も増加がみられ、(P)RR の発現量と細胞増殖が相関していることが示唆された。また、神経膠腫のグレードとともに、(P)RR IHC score(%)および Ki67 Labeling index (%)も増加しており、3者はそれぞれ相関関係にあると考えられた。

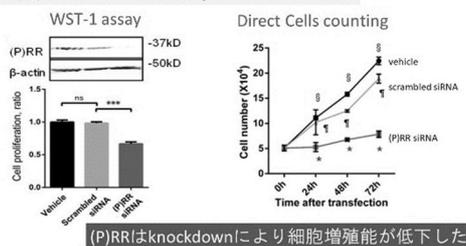
3) siRNA を用いた(P)RR のノックダウンにより、Wnt/ カテニン経路の抑制を蛋白レベルで確認した。



U87MG、U251MG、T98G などのグリオーマ細胞株について、(P)RR を siRNA でノックダウンすると、細胞の蛋白レベルにおいて、Wnt/ カテニン経路の蛋白が発現抑制されており、(P)RR の下流に Wnt/ カテニン経路が存在することが示された。

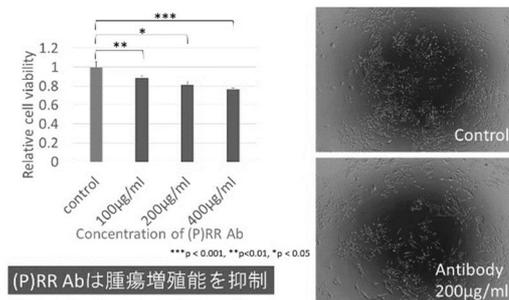
4) siRNA を用いた(P)RR のノックダウンによる、細胞増殖抑制効果の検討

(P)RR siRNA, cell proliferation



U87MG、U251MG、T98G などのグリオーマ細胞株について、(P)RR を siRNA でノックダウンすると、細胞の増殖能は抑制されていた。

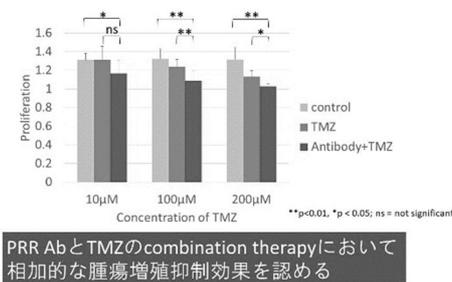
5) (P)RR 抗体は濃度依存性に細胞増殖を抑制した。



次に、(P)RR 抗体を用いて(P)RR の働きを抑制することで、ドライバー分子を失ったグリオーマの腫瘍形成能は失われるか？について解明するために、これらの細胞株を用いて、(P)RR 抗体の抗腫瘍効果を検討した。

U87MG、U251MG、T98G などのグリオーマ細胞株について、(P)RR 抗体は濃度依存性に腫瘍増殖能を抑制しており、(P)RR 抗体が直接的に抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。

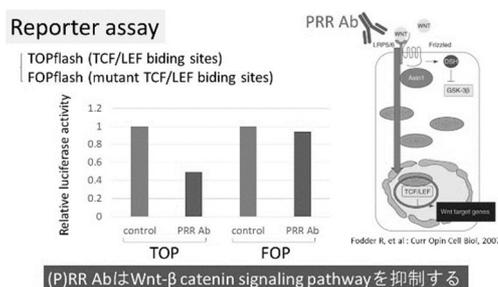
6) (P)RR 抗体は TMZ との併用にて相加効果を認めた。



さらに、U87MG、U251MG、T98G などのグリオーマ細胞株について、(P)RR 抗体と TMZ を併用して培養した検討では、TMZ の濃度依存性に細胞増殖抑制効果を示し、さらに(P)RR 抗体を添加することで、更なる細胞増殖抑制効果を認め、(P)RR 抗体と TMZ による相加効果が認められた。

7) (P)RR 抗体は Wnt/ カテニン経路を直接抑制していた。

U87MG,U251,T98G などグリオーマ細胞株を用いて、Wnt/ カテニン経路の一部である TCF/LEF の発現量にあわせて Luciferase が発光する Reporter assay を行ったところ、(P)RR 抗体を投与した群においては、Luciferase の発光量が減少しており、(P)RR 抗体は TCF/LEF の発現を抑制しており、また、TCF/LEF の Mutant ベクターを用いて同様の実験を行ったところ、同効果はキャンセルされたため、(P)RR 抗体の Wnt/ カテニン経路への作用は直接的であることがわかった。



以上より、グリオーマ細胞株に対する(P)RR 抗体の抗腫瘍効果を確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 小川 大輔、田宮 隆	4. 巻 46
2. 論文標題 (プロ)レニン受容体をターゲットとした脳腫瘍形成能を失わせる抗体およびmicroRNAの探索	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Science Digest (1347-4340)46巻8号 Page532-534(2020.07)	6. 最初と最後の頁 532-534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小川大輔、三宅啓介、田宮隆	4. 巻 3
2. 論文標題 (プロ)レニン受容体に対する抗体およびmicroRNAは脳腫瘍形成能を失わせるか	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 1071-1074
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 藤森 健司1, 小川 大輔1, 菅田峻光、鈴木健太、柴山弓季、三宅 啓介、西山 成、田宮 隆
2. 発表標題 Pro renin receptor antibody regulates glioblastoma stemness
3. 学会等名 第38回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小川 大輔、藤森 健司、豊田 康則、畠山 哲宗、岡内 正信、川西 正彦、三宅 啓介、正木 勉、西山 成、田宮 隆
2. 発表標題 (p)RRを抑制するmicroRNAのグリオーマに対する効果について
3. 学会等名 第38回日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小川 大輔, 藤森 健司, 豊田 康則, 畠山 哲宗, 岡内 正信, 川西 正彦, 三宅 啓介, 正木 勉, 西山 成, 田宮 隆
2. 発表標題 (p)RRを抑制するmicroRNAのグリオーマに対する効果について
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第79回学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤森健司、小川大輔、河内雅章、柴山弓季、岡田真樹、三宅啓介、西山 成、田宮 隆
2. 発表標題 膠芽腫およびグリオーマ幹細胞に対する(Pro)renin receptorを標的とした分子治療の基礎的研究
3. 学会等名 第20回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤森健司、小川大輔、鈴木健太、河内雅章、柴山弓季、岡田真樹、三宅啓介、西山 成、田宮 隆
2. 発表標題 膠芽腫に対する(Pro)renin receptorを標的とした分子治療の基礎的研究
3. 学会等名 第37回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyake K, Ogawa D, Okada M, Hatakeyama T, Tamiya T
2. 発表標題 Our therapeutic strategies for glioblastoma: Intraoperative support systems [intraoperative MRI, PET, 5-aminolevulinic acid (5-ALA)] and neoadjuvant chemotherapy
3. 学会等名 24TH ANNUAL MEETING and EDUCATION DAY OF THE SOCIETY FOR NEURO-ONCOLOGY (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyake K, Ogawa D, Okada M, Hatakeyama T, Okauchi M, Shindo A, Kawanishi M, Tamiya T
2. 発表標題 Usefulness of intraoperative MRI during glioma surgery with preoperative PET scans
3. 学会等名 The 12th ICME international conference on complex medical engineering ; CME2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miyake K, Ogawa D, Okada M, Hatakeyama T, Tamiya T
2. 発表標題 Management of intraoperative MRI and Neuronavigation System with PET for malignant gliomas
3. 学会等名 23RD ANNUAL MEETING and EDUCATION DAY OF THE SOCIETY FOR NEURO-ONCOLOGY (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤森健司、小川大輔、河内雅章、柴山弓季、岡田真樹、三宅啓介、西山 成、田宮
2. 発表標題 (Pro)renin receptorはglioblastomaの治療標的となり得るか
3. 学会等名 第36回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤森健司、小川大輔、河内雅章、柴山弓季、岡田真樹、三宅啓介、西山 成、田宮 隆
2. 発表標題 (Pro)renin receptorはglioblastomaの治療標的となり得るか
3. 学会等名 Neuro-Oncology WEST
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三宅啓介、小川大輔、岡田真樹、畠山哲宗、岡内正信、新堂 敦、川西正彦、田宮 隆
2. 発表標題 悪性神経膠腫に対する術中支援システム（術中MRI、PETおよび5-ALA）を用いた手術の検討
3. 学会等名 第77回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小川 大輔 (Ogawa Daisuke) (70524057)	香川大学・医学部附属病院・助教 (16201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------