

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293325

研究課題名(和文) microRNAをターゲットとした間葉系幹細胞による神経膠芽腫浸潤抑制療法の開発

研究課題名(英文) Development of anti-invasion therapy in glioblastoma multiforme using MSC transfected with microRNA

研究代表者

中溝 玲 (Akira, Nakamizo)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：80529800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経膠芽腫(glioblastoma multiforme; GBM)に対してtropismを有する間葉系幹細胞(MSC)由来のmicroRNA(miRNA)が、GBMの浸潤能に与える影響を調査した。本研究の結果、miR-145-5p+31-5p過剰発現MSCとU87細胞を共培養すると、hMSCのmiRNAがcontact-dependent mechanismを介してU87へ伝達され、U87細胞の浸潤能を抑制することが明らかとなった。MSCは、miRNAのdelivery vehicleとして有用な可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Human bone marrow derived mesenchymal stem cells (hMSCs) show tropism for brain tumors and may be useful as a vehicle for drug or gene delivery to malignant gliomas. Recently, some microRNAs (miRs) have been shown to suppress the invasiveness of malignant gliomas. The purpose of this study is to test the potential to become vehicles for delivery of miRs to malignant gliomas. The invasion of U87 cells co-cultured with hMSCs co-transfected with hsa-miR-145 and 31-5p was reduced to 60.7% of the control without affecting the tropism of hMSCs for U87 cells in a matrigel invasion assay. When U87 cells were co-implanted into the striatum of organotypic brain slices with hMSCs that were co-transfected with hsa-miR-145 and 31-5p, the relative invasive area was decreased by 37.1%. Our results suggest that hMSCs are applicable as a delivery vehicle for miRs.

研究分野：脳神経外科

キーワード：microRNA 間葉系幹細胞 神経膠芽腫

1. 研究開始当初の背景

神経膠芽腫 (glioblastoma multiforme; GBM) の治療抵抗性の主因は、高い浸潤能と浸潤細胞への access route の欠如である。これまで我々は、正常脳組織内へ浸潤する GBM に対する delivery method の開発を行い、以下のことを証明した。1) 間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell; MSC) は GBM 細胞に対して指向性 tropism を有し、全身投与された MSC は脳内へと浸潤し、GBM 細胞をも感知して集簇する。2) α -IFN を持続的に産生するように遺伝子を改変した MSC は、全身投与により GBM モデルマウスの生存期間を著しく延長させ、MSC が delivery vehicle として利用可能である (Nakamizo et al. Cancer Res 2005)。

近年いくつかの microRNA (miRNA) において、腫瘍細胞への miR の導入により、腫瘍浸潤関連遺伝子の発現が抑制され、腫瘍の浸潤が抑制されることが報告されている。また microRNA は、recipient cell に対し、contact-dependent もしくは contact-independent mechanism を介して伝達されることも報告されている。一方で MSC は、周囲に microRNA を分泌することも報告されている。

そこで我々は、GBM 細胞に対して指向性 tropism を有する MSC において、腫瘍浸潤抑制効果を有する miRNA を過剰発現させることにより、contact-dependent もしくは contact-independent mechanism を介して GBM 細胞に miRNA が伝達され、GBM の浸潤能が抑制される可能性を考えた。

2. 研究の目的

本研究では、MSC を delivery vehicle とした GBM 浸潤抑制療法の開発を目的とする。本研究では、浸潤抑制作用を有する miRNA を同定し、当該 miRNA を delivery vehicle である MSC に選択的に強発現させることにより、浸潤 GBM 細胞への access route の欠如を克服する新たな浸潤抑制療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

1) GBM 細胞である U87 の細胞から miRNA を含む total RNA を、MSC の培養液上清から exosomal miRNA を抽出し、それぞれの網羅的な miRNA の定量 PCR 解析を行った。可能な限り U87 の細胞内の発現が少なく、MSC の exosomal miRNA 内の発現が多い miRNA を選択するために、(U87 の細胞の miRNA の Ct) / (MSC の exosomal miRNA の Ct) の比を算出し、比が -3 以下かつ MSC exosomal miRNA の raw Ct が 33 以下のものを抽出した。

2) 1) で同定した miRNA を U87 に過剰発現させ、transwell invasion assay を行った。

3) 2) で同定された miRNA をそれぞれ組み合わせ、U87 に過剰発現させ、transwell invasion assay を行った。

4) MSC に過剰に発現された miRNA が、MSC が本来有する GBM 指向性へ影響を与えるかを検証するため、3) と同様の組み合わせで当該 miRNA を MSC に過剰発現させ、transwell invasion assay を行った。この際、下の well には、U87 から得られた conditioned medium (serum free) を用いた。

5) 当該 miRNA を過剰に発現した MSC が、U87 細胞の持つ浸潤能に対して contact-dependent あるいは contact-independent に与える影響について、transwell invasion assay を用いて検証した。Contact-dependent な効果を調べるために、miRNA を過剰に発現させた MSC と U87 細胞を共培養して、U87 細胞の浸潤能の変化について検討した。一方、contact-independent な効果を調べるためには、MSC の conditioned medium 内で一定期間培養した U87 細胞の浸潤能を検討した。

6) 1)-5) の結果を基に、可能な限り U87 の浸潤能を抑制し、かつ MSC の tropism に影響を与えない miRNA の組み合わせを選択した。以下の実験は、その miRNA を用いて行なった。7) hMSC 内に強発現した当該 miRNA が、共培養している U87 細胞内へと移動するかどうかについて検証した。alex555-labeled miR-31 を過剰発現させた MSC と Vybrant Dio で染色した U87 細胞を共培養し、24 時間後に蛍光顕微鏡で観察した。

8) 長期間の観察が可能である organotypic culture method を用い、ex vivo の実験を行なった。具体的には、胎児 SD ラットから脳を摘出し、virotope を用いて brain slice を作製した。Green fluorescent protein (GFP) で標識した U87 (GFP-U87) と当該 miRNA を過剰発現させた MSC を 1:1 で混ぜ、大脳基底核に作製した pinhole 内に implant した。U87 の浸潤を 2 日後、4 日後に蛍光顕微鏡で観察し、当該 miRNA 過剰発現 MSC による U87 の浸潤抑制効果を検証した。加えて、MSC の U87 に対する指向性に与える影響も検証した。

9) 当該 miRNA の target となる messenger RNA (mRNA) の発現変化を調べるため、当該 miRNA 過剰発現 U87 より抽出した mRNA を用い、マイクロアレイと RT-PCR を行った。特に、浸潤能に影響を与える可能性のある mRNA を過去の文献より抽出し、それらの mRNA の発現変化に注目した。

4. 研究成果

U87 の浸潤能を抑制させる miRNA の同定

可能な限り U87 の細胞内の発現が少なく、MSC の exosomal miRNA 内の発現が多い miRNA として、miR-154-5p、409-3p、127-3p、193a-5p、145-5p、143-3p、196a-5p、31-5p が同定された。これらの miRNA を U87 に過剰発現させ、transwell invasion assay を行った結果、miR-127-3p、145-5p、31-5p の過剰発現によって、U87 の浸潤能が有意に抑制された。さらに、それらの miRNA を組み合わせると U87 に

過剰発現させると、miR-127-3p、145-5p、31-5p それぞれを単独で過剰発現させた場合と同様に、miR-127-3p+145-5p、miR-127-3p+145-5p、miR-145-5p+31-5p、miR-127-3p+145-5p+31-5p の組み合わせにおいて浸潤能が有意に抑制された(Figure 1A)。

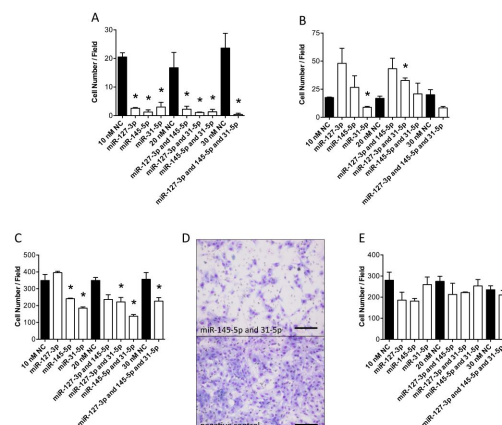
MSC における、GBM 細胞に対する遊走能 (tropism) に影響を与えない miRNA の同定

miR-127-3p、145-5p、31-5p 単独と、それらの miRNA を組み合わせて MSC に過剰発現させた結果、miR-127-3p、miR-127-3p+145-5p、miR-127-3p+145-5p の過剰発現によって、MSC の U87 に対する遊走能が亢進することが明らかとなった。一方、miR-31-5p、miR-127-3p+145-5p+31-5p の過剰発現において、MSC の U87 に対する遊走能が抑制されることが明らかとなった。その他の miRNA の組み合わせでは、MSC の遊走能に有意な変化はなかった(Figure 1B)。

miRNA を過剰に発現した MSC が、U87 細胞の持つ浸潤能に対して contact-dependent あるいは contact-independent に与える影響及び U87 の浸潤能を抑制させる miRNA の同定

Contact-dependent な影響を調べた共培養の実験では、miR-145-5p、miR-31-5p、miR-127+145、miR-145+31、miR-127+145+31 の過剰発現が、U87 細胞の浸潤能を有意に抑制した(Figure 1C)。一方、contact independent では、いずれの miRNA の組み合わせも有意な U87 細胞浸潤抑制効果は見られなかった(Figure 1D)。上記の結果より、hMSC に過剰発現させた miRNA は、contact independent mechanism よりもむしろ、contact dependent mechanism を介して U87 へ移動し、U87 の浸潤能に影響を与えていることが明らかになった。特に miR-145-5p+31-5p の組み合わせは、hMSC に過剰発現させることで、U87 と共培養後、最も強く浸潤能を抑制した(Figure 1C, D)。また実験 4)の結果では、miR-145-5p+31-5p の組み合わせは、hMSC に過剰発現させても U87 に対する指向性に影響がないことを明らかにした(Figure 1B)。それゆえ今後の方向性として、miR-145-5p+31-5p に注目し、研究を進めていくことが妥当であると考えた。

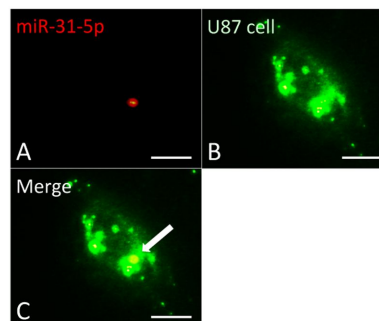
Figure 1



miR-145-5p+31-5p 過剰発現 hMSC から U87 への miRNA 伝達の可視化

alexa555-labeled miR-31 を過剰発現させた MSC と Vybrant Dio で染色した U87 細胞を共培養し、24 時間後に蛍光顕微鏡で観察した結果、alexa555-labeled miR-31 が U87 細胞内に移行していることが観察された(Figure 2)。

Figure 2

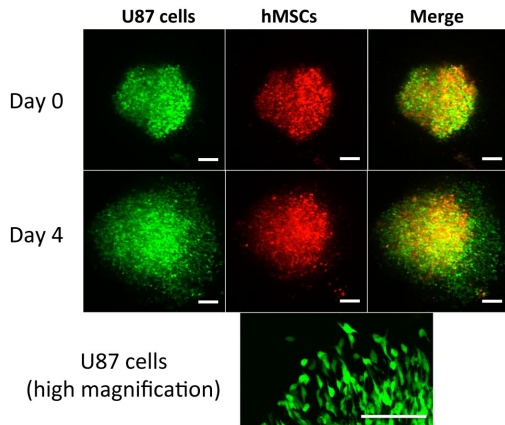


ex vivo における miR-145-5p+31-5p 過剰発現 MSC が U87 の浸潤能に与える影響

brain slice に implant した GFP-U87 と miR-145-5p+31-5p 過剰発現 MSC の mixed cell を蛍光顕微鏡で経時的に観察した。4 日目の U87 の浸潤面積は、negative control 導入 MSC と比較し、37.1%抑制された(Figure 3, 4A)。また、miR-145-5p+31-5p 過剰発現 MSC と混合した GFP-U87 の大部分は、通常 U87 に見られる filopodial formation、cellular protrusion が消失しており、円形の形状を示した(Figure 3)。また、miR-145-5p+31-5p 過剰発現 MSC の浸潤面積は、negative control 導入 MSC と比較し、有意な変化はなかった(Figure 3, 4B)。また、両群間において細胞数に有意な変化はなかった(Figure 4C)。

Figure 3

U87 cells and hMSCs transfected with 20 nM negative control



U87 cells and hMSCs overexpressing hsa-miR-145-5p and 31-5p

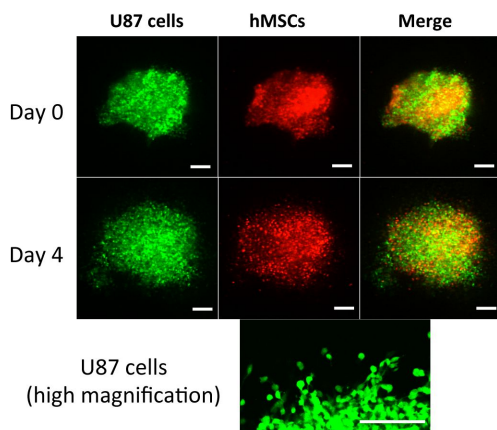
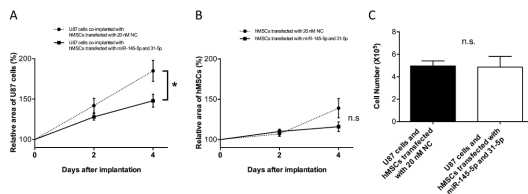


Figure 4



miR-145-5p もしくは 31-5p の標的となり、かつ浸潤抑制に関連した標的 mRNA の同定

miR-145-5p+31-5p 過剰発現 U87 より抽出した mRNA を用いたマイクロアレイを行い、有意な変化のある mRNA を同定した。それらのうち、浸潤能に影響を与える可能性のある mRNA を過去の文献より抽出した結果、*FSCN1* が有意に抑制されていた。*FSCN1* の抑制は、RT-PCR でも確認された。

以上の結果から、MSC に過剰発現させた miR-145-5p+31-5p は、U87 との共培養により contact-dependent に U87 に伝達され、U87 の浸潤能を抑制することが *in vitro*、*ex vivo* にて示された。また、U87 の浸潤能抑制には *FSCN1* の低下が関与していることが示唆された。*Fascin-1* は、腫瘍の形状 (filopodial formation、cellular protrusion) 維持に重要な蛋白質であり、*Fascin-1* の発現低下が腫瘍の浸潤能の低下に関与することが報告さ

れている。miR-145-5p+31-5p の過剰発現は MSC の U87 に対する遊走能 (tropism) を低下させず、MSC を delivery vehicle とした GBM 浸潤抑制療法として有用である可能性が示唆された。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中溝 玲 (NAKAMIZO AKIRA)
九州大学・医学研究院・研究員
研究者番号: 80529800

(2) 研究分担者

溝口 昌弘 (MIZOGUCHI MASAHIRO)
九州大学・医学研究院・研究員
研究者番号: 50380621

吉本 幸司 (YOSHIMOTO KOJI)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号: 70444784

天野 敏之 (AMANO TOSHIYUKI)
九州大学・医学研究院・研究員
研究者番号: 70448413

飯原 弘二 (IIHARA KOJI)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号: 90270727