

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10335

研究課題名(和文) グリオーマ特異的miRNAの性状解析に基づいた新規治療法および診断マーカーの確立

研究課題名(英文) The establishment of a novel therapy and biomarker based on expression profiles of glioma specific microRNA

研究代表者

高野 昌平 (Kohno, Shohei)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70467851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ヒト血清サンプルを利用してエクソソーム内のグリオーマ幹細胞(GIC)特異的microRNAを同定し、臨床応用を目指す。臨床研究にて膠芽腫患者と健常成人由来の血清内エクソソームにおけるmicroRNAの発現を解析し、GICと正常神経幹細胞の培養液を用いたmicroRNA発現解析結果と照合した。膠芽腫患者の血清中エクソソーム内で有意に発現異常を示したmicroRNAは、初回解析では112個、最終解析では69個であった。さらに、培養液の解析結果と各種GICマーカーとの相互配列を確認し、GIC特異的microRNAとして2個のmicroRNA(miR-30c, miR-128)を同定した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to identify glioma specific microRNAs as novel therapeutic tool and biomarker. Exosomal microRNA were extracted from serum of glioblastoma (GBM) patients and healthy volunteers. We comprehensively analyzed more than 2,000 microRNAs expression profiles and cross-checked the microRNAs expression profiles from both patient serum and medium of glioma-initiating cell (GIC). In first analysis of 16 samples, 112 microRNAs were aberrantly expressed in GBM patients compared with health volunteers. In addition, we defined 69 microRNAs in final analysis of 29 samples. Finally, we identified 2 microRNAs, miR-30c and miR-128, as glioma specific microRNA that were significantly expressed in GIC and GBM patients.

研究分野：医歯薬学

キーワード：グリオーマ microRNA エクソソーム グリオーマ幹細胞 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍による死は、今や国民の死因の約半分を占める。癌克服へのパラダイムシフトを起し得るものとして癌幹細胞が注目を集めており、様々な腫瘍においてその存在を裏付ける知見が集積されつつある。これはグリオーマ(神経膠腫)においても同様であり、グリオーマ幹細胞に焦点を当てた様々な研究が行われている。

グリオーマは、頭蓋内原発性腫瘍の約30%で、最悪性度に分類されているグリオブラストーマ(膠芽腫)がそのうちの約1/3を占める。現在、外科的切除、放射線照射、化学療法を組み合わせた集約的治療が行われているが、有効な治療法は確立しておらず、第一選択薬である抗腫瘍薬のテモゾロマイド(TMZ)を投与してもなおグリオブラストーマの生命予後は依然不良のままである。これらの治療に抵抗性を示す原因として、抗癌剤や放射線に耐性を示すグリオーマ幹細胞の関与が考えられる。

現在、薬剤感受性や予後予測因子としての遺伝子発現解析が進んでいるが、それらの解析は外科的切除にて摘出した組織を用いることでのみ評価可能な方法である。また、現時点で経時的な治療効果の判定や再発を予測し得る診断マーカーは存在せず、グリオーマ幹細胞の存在や活動性などを評価することもできない。この点において、血液中のエクソソーム内の microRNA プロファイリングを行うことは、新たな診断マーカーや治療効果判定法の確立だけでなく、グリオーマ幹細胞の性状解析においても極めて有用である。

また、近年、グリオーマにおいても microRNA に関する研究報告は散見されるようになったが、そのほとんどが細胞内における microRNA の発現解析に基づく研究であり、体液中エクソソーム内の microRNA の解析は非常に少ない。このように、脳腫瘍(特にグリオーマ)に関するエクソソーム内の microRNA 発現を利用した新規診断マーカーや治療薬の開発を目指した研究は、他臓器腫瘍と比べて非常に遅れている。この理由として、国内において治療効果を判定する手段である画像検査(主にMRI)が、国外と比較して非常に容易かつ安価で行える本邦の医療体制が挙げられる。しかし、ほとんどの先進国で画像検査を行うことは、金銭的な理由などにより本邦ほど容易ではなく、頻回に施行できるものではない。このため、グリオーマにおいても多臓器腫瘍と同様に頻回かつ簡便に測定出来る診断マーカーの開発が期待されており、国際的な需要は大きいと考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、グリオーマの治療効果や再発に関与する microRNA の同定とその臨床への応用を目指し、血液中に含まれるエクソソーム内の microRNA プロファイリングを行うことによる新たな診断マーカーや治療効果判

定法の開発を目的とする。また、グリオーマ幹細胞培養液に含まれるエクソソーム内の microRNA プロファイリングの結果を参照し、共通して特異的な発現を認めた microRNA の性状解析を行い、新たな治療法としての可能性についても検討する。

3. 研究の方法

我々は、既にグリオーマ患者の摘出組織より樹立したグリオーマ幹細胞株の細胞内 microRNA プロファイリングとその培養液中に含まれるエクソソーム内の microRNA プロファイリングを済ませており、特異的な発現異常を示す数種類の microRNA を確認している。これまでの成果をもとに本研究は、グリオーマ幹細胞の性状を解析する上で重要な生体サンプルである血液(血清)中に含まれるエクソソーム内の microRNA の発現を解析し、新たな診断マーカーや治療法の開発を試みる計画である。

microRNA プロファイリング

1) 臨床検体(血清)の採取

血清は通常の検査スケジュールで行われる採血時に同意を得て追加採取を行う。

2) エクソソーム単離・RNA抽出

臨床検体からエクソソームを単離し、RNA分画を抽出する。

3) マイクロアレイ解析

約2,000種類の microRNA の発現を網羅的に解析し、特異的な発現を認める microRNA を同定する。

新規診断マーカーおよび治療法の検索

1) 診断マーカー

健康成人(ボランティア)から採取した血清由来のエクソソーム内の microRNA プロファイリングと比較して、グリオーマ患者の血清由来のエクソソーム内で特異的な発現を示す microRNA を探索する。その際には、グリオーマ幹細胞株の細胞内および培養液中から抽出したエクソソーム内の microRNA 発現解析結果とも照合して、グリオーマ幹細胞に特異的な発現を示す microRNA (グリオーマ幹細胞特異的 microRNA) を同定する。

2) 治療法

解析結果を病理学的所見(組織型、悪性度)や臨床経過と照合し、臨床像を反映し得る特異的な microRNA を同定する。

真のグリオーマ幹細胞特異的 microRNA

1) 幹細胞性の確認

Target scanなどのソフトウェアを用いて、各種グリオーマ幹細胞マーカーとの相互配列の有無を確認し、グリオーマ幹細胞に特異的に作用し得る“真のグリオーマ幹細胞特異的 microRNA”を同定する。

2) 発現解析

特異的な発現を示した microRNA について、マイクロアレイに用いなかった他の検体サンプルにおいてもリアルタイム PCR を用いて再評価する。

4. 研究成果

臨床研究にて膠芽腫患者（術前：29 例）とコントロール（健常成人：7 例）より採取した血清からエクソソームを単離し、マイクロアレイにて約 2,000 種類の microRNA の発現を網羅的に解析した。また、ヒトグリオーマ組織から樹立したグリオーマ幹細胞（5 株）と正常神経幹細胞（NSC）の培養液において既に解析していた microRNA の網羅的プロファイリング結果とも照合した。

16 例の臨床検体を用いた初回解析では、コントロールと比較して、膠芽腫患者の血清中エクソソーム内で有意に発現異常を示した microRNA は 112 個（上昇 14 個，低下 98 個）であった。

また、NSC と比較してグリオーマ幹細胞の培養液中で有意に発現異常を示した microRNA は 211 個（上昇 77 個，低下 134 個）であり、血清中と培養液中で共通して有意な発現異常を示したグリオーマ幹細胞特異的 microRNA は 19 個で、全て発現が低下しており、その中には我々がこれまでに報告してきた miR-340 が含まれていた。

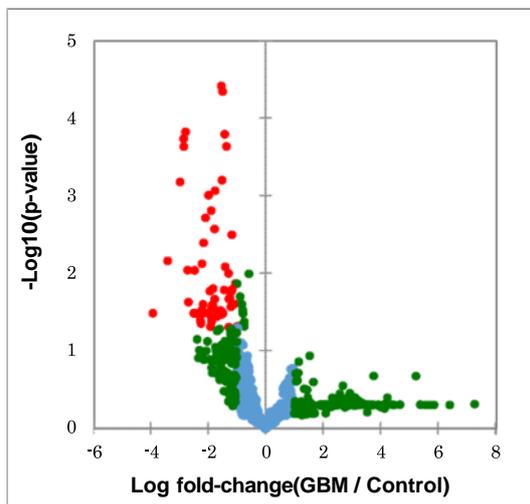
次に、29 例の臨床検体を用いた最終解析では、コントロールと比較して、膠芽腫患者の血清中エクソソーム内で有意に発現異常を示した microRNA は 69 個で、全て発現が低下していた。

これらの microRNA について、TargetScan などを利用してグリオーマにおける幹細胞マーカーと認識されている各種遺伝子

（CD133 や Sox2 など）との相互配列の有無を確認したところ、「真のグリオーマ幹細胞特異的 microRNA」として 2 個の microRNA

（miR-30c, miR-128）が同定できた。この中で、miR-128 は、既にグリオーマに関連する microRNA として報告されており、一部の性状解析は解明されているが、腫瘍マーカーとしての意義は未解明のままである。今後、これらの microRNA の機能解析を行い、新規治療薬の可能性を探求する必要があると考えられた。

（図）マイクロアレイ結果によるグリオーマ幹細胞特異的 microRNA の同定



（表）幹細胞マーカーとの相互配列を有していたグリオーマ幹細胞特異的 microRNA

miR-30c	CD15, Bmi-1
miR-128	Sox2, Bmi-1, Nanog

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 1 件）

- ① 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
山下大介, 末廣諭, 高野昌平, 大上史朗, 大西丘倫
 愛媛医学. 35(1) 6-11 (2016)

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① Identification of exosomal miRNAs specific for glioma-initiating cells
山下大介, 末廣諭, 近藤亨, 大西丘倫
 第 75 回日本癌学会学術総会、横浜、2016/10/6-8
- ② 体液中エクソソーム内に存在するグリオーマ幹細胞特異的 microRNA の同定 — 新規診断マーカーおよび治療薬としての可能性 —
山下大介, 末廣諭, 西川真弘, 瀬野利太, 高野昌平, 大上史朗, 國枝武治, 大西丘倫
 第 75 回日本脳神経外科学会学術総会、福岡、2016/9/29-10/1
- ③ Identification of GIC specific microRNA (miRNA), using miRNA profiling in extracellular vesicles
Yamashita D, Suehiro S, Nishikawa M, Seno T, Kohno S, Ohue S, Kunieda T, Ohnishi T.
 13th Asian Society for Neuro-Oncology Meeting & 9th COGNO Annual Scientific Meeting
 Sydney, Australia. 2016/9/11-14
- ④ エキソソーム内 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
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
 第 33 回 日本脳腫瘍学会学術集会、京都、2015/12/6-8

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 昌平 (Kono, Syohei)
愛媛大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70467851

(2) 研究分担者

大上 史朗 (Ohue Shiro)
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：70213626

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

山下 大介 (Yamashita Daisuke)
愛媛大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30750492

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし