

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08996

研究課題名(和文)(p)RRを抑制するmicroRNAはグリオーマの腫瘍形成能を失わせるか？

研究課題名(英文)Groping for the epigenetic regulation of gliomagenesis

研究代表者

小川 大輔(Ogawa, Daisuke)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70524057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000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脳腫瘍であり、早急な追加療法の開発が望まれている。本研究計画のターゲットである(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、グリオーマにおいてもグレードに関わらず恒常的に(p)RRが発現しており、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報告する。また、(p)RRの発現を制御するmicroRNAは存在するのか？存在するならば、(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？について解明し、膠芽腫に対する新規治療法の開発を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫の標準治療でさえ、平均生存期間は14カ月であり、早急な追加療法の開発が望まれている。本研究計画の目的は、(p)RRを抑制するmiRを同定し、膠芽腫に対する真新しい治療法を確立することである。申請者らの膠芽腫と(p)RRとの研究は世界をリードしており、そこへ申請者のmiRに関する研究技術が相まって、本研究計画は、この点において学術的独自性と創造性をもっており、(p)RRを用いた膠芽腫の新規治療戦略の基盤を創出することが可能である。その結果、膠芽腫患者の予後の改善に寄与することが十分期待される。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 (P)RR 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 seeked for the microRNA that suppress (P)RR in GBM, so we planed to seek if this microRNA works as a brand new therapy for GBM.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：Glioblastoma (pro)renin receptor molecular therapy glioma microRNA 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)。

MicroRNA (miR) は平均 22 塩基対程度の短い non-coding RNA 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。MiR の抑制効果は一般に他の small interference RNA (siRNA) と比較して弱いものの、siRNA は人工的なもので、新たな脳内投与方法の開発が必要であるが、miR は遺伝子に組み込まれた内在性の因子であるため、その発現量はプロモーター領域に結合する転写因子に依存し、これを解析することにより、miR の発現量を調節するような新薬の開発につながりやすい。申請者は米国ハーバード大学の Dr. Chiocca との共同研究で、miR とグリオーマ幹細胞との関係において、発現制御を失った miR が脳腫瘍発生の原因になるなど、細胞の運命付けに miR が重要なレベルで役割を果たしていることを報告した (Ogawa et al, *Neuro Oncol*, 2013, *Cancer Res*, 2014, *Cell Rep*, 2015 など)。

(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、発がんに直接関与しており、隣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、申請者は、グリオーマにおいても、(P)RR を抑制する miR 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 を抑制する miR を同定し、(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、隣癌形成に重要な分子として再発見された。このため、申請者らの膠芽腫と (P)RR との研究は世界をリードしており、そこへ申請者の miR に関する研究技術が相まって、本研究計画は、この点において学術的独自性と創造性をもっており、(P)RR を用いた膠芽腫の新規治療戦略の基盤を創出することが可能である。その結果、膠芽腫患者の予後の改善に寄与することが十分期待される。

3. 研究の方法

1) 神経膠腫のグレード別における (P)RR および IDH-1mut の発現率の違いについて

まずは神経膠腫において、(P)RR および IDH-1mutation の発現率を調べるため、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 および IDH-1^{R132H} 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 および IDH-1mutation の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。また、各グレードの生存期間を抽出し、相関関係を評価し、さらに(P)RR IHC score(%)と生存期間の関係を Kaplan-Meier 法を用いて評価した。

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ト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) siRNA を用いた(P)RR のノックダウンによるアポトーシスの誘導についての評価

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、120 時間後に FITC-labeled AnnexinV および Propidium Iodide 染色によるセルソーティングを行い、アポトーシスの誘導効果について検討した。

6) (P)RR を抑制する miR 候補の絞り込み

(P)RR を過剰発現、または(P)RR に対する siRNA を用いて発現抑制した細胞群を、東レ 3D-Gene® ヒト miRNA カスタムチップを用いて、microRNA array を行い、2632 種類の microRNA の発現変化をみた。MicroRNA array において、(P)RR の発現上昇と、発現抑制に対して、対向的に発現変化のみられた microRNA を、6 種類のみに絞った。

7) (P)RR を抑制する miR 候補の更なる絞り込み

データベース (Target Scan) を用いて、in silico で(P)RR の mRNA に直接結合し、干渉すると予想された microRNA の 4 候補を絞り込み、それぞれの microRNA について、過去の報告より、わかっている働きについて調べた。

8) 候補となった(P)RR に対する microRNA を強制発現させ、(P)RR 発現抑制効果を見る

MicroRNA array とデータベースより予想された(P)RR の mRNA 3'-UTR に対して相補性をもつ miR を割り出し、グリオーマ細胞株 (U87、U251) にそれぞれの microRNA をリポフェクションし、強制発現することで、(P)RR の発現量を低下させていた microRNA を調べた。

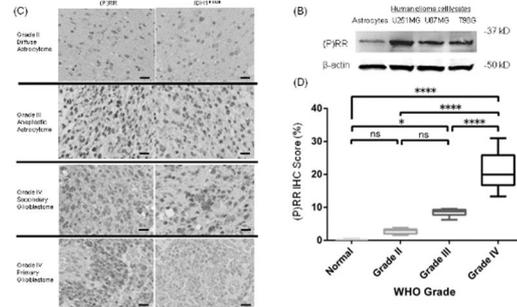
9) (P)RR の発現量を抑制しうる microRNA の生物学的効果についての検証

MiR-128 を強制発現させたグリオーマ細胞株 (U87, U251) において、BrdU 導入率 (増殖能) について比較した。

4. 研究成果

1) 神経膠腫のグレード別における(P)RR および IDH-1mut の発現率の違いについて

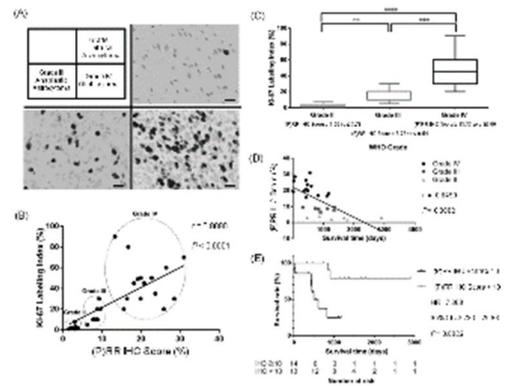
神経膠腫の病理切片を用いて、(P)RR に対する免疫染色を行ったところ、神経膠腫に関しては、そのグレードが高くなるにつれて、(P)RR IHC score(%)の増加がみられ、(P)RR の発現量が増加していることが示唆された。



一方で、IDH-1mutation に関して、PrimaryGBM を除く、Grade ~ のすべての GBM において発現していることを確認した。このことから、脳腫瘍細胞において、グレードやグリオーマの予後規定因子である IDH-1 変異に関わらず(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。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) (P)RR 発現率と神経膠腫のグレード、細胞増殖率、および平均生存期間の関係について

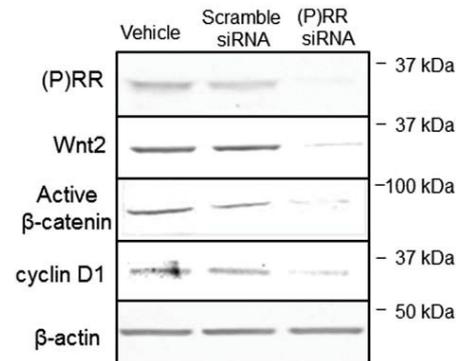
神経膠腫の連続病理切片を用いて、(P)RR に対する免疫染色および Ki-67 に対する免疫染色をおこなったところ、(P)RR の陽性染色面積である (P)RR IHC score(%)が増加するにつれて、Ki67 Labeling index (%)も増加がみられ、(P)RR の発現量と細胞増殖が相関していることが示唆された。



また、神経膠腫のグレードとともに、Ki67 Labeling index (%)および(P)RR IHC score(%)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。(P)RR IHC score(%)の増加に伴い、有意に予後不良であった。(P)RR IHC score(%)のカットオフ値を 10 に設定すると、平均生存期間に有意な差を認めた。

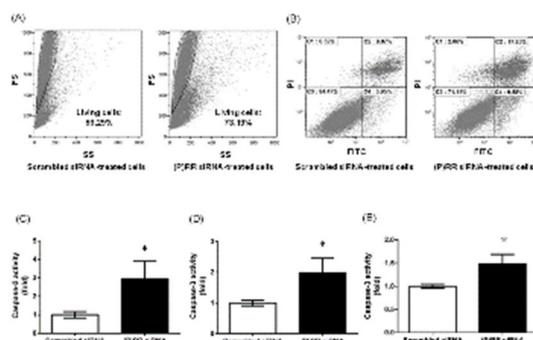
3) Small interference RNA (siRNA)を用いた(P)RR のノックダウンによる Wnt/ カテニン経路の抑制

U87MG、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。

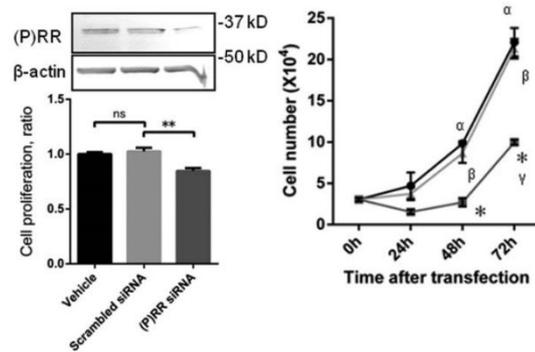


4) siRNA を用いた(P)RR のノックダウンによる細胞増殖抑制効果についての検討

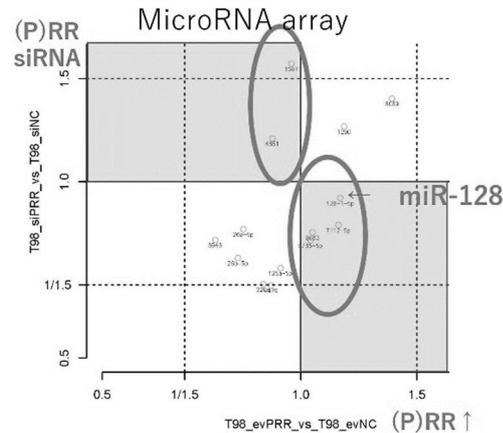
U87MG、U251MG、T98G などのグリオーマ細胞株について、(P)RR を siRNA でノックダウンすると、細胞の増殖能は抑制されていた。このことから、(P)RR がグリオーマの腫瘍形成において、IDH-1 変異以前の初期段階にドライバー分子として重要な働きを担っている可能性が示唆された。



5) siRNA を用いた(P)RR のノックダウンによるアポトーシスの誘導についての評価
 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、120 時間後に FITC-labeled AnnexinV および Propidium Iodide 染色によるセルソーティングを行い、アポトーシスの誘導効果について検討したところ、(P)RR のノックダウンに伴い、GBM のアポトーシスは誘導されていた。



6) (P)RR を抑制する miR 候補の絞り込み
 (P)RR を過剰発現、または(P)RR に対する siRNA を用いて発現抑制した細胞群を、東レ 3D-Gen[®] ヒト miRNA カスタムチップを用いて、microRNA array を行い、2632 種類の microRNA の発現変化をみた。MicroRNA array において、(P)RR の発現上昇と、発現抑制に対して、対向的に発現変化のみられた microRNA を、6 種類のみ絞った。

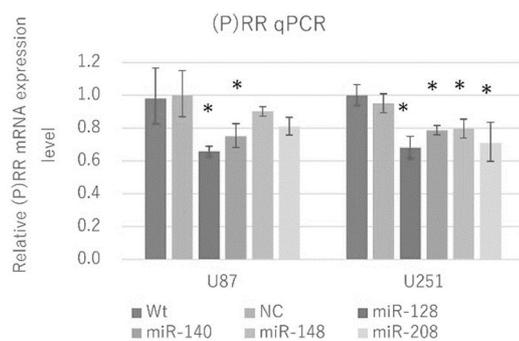


7) (P)RR を抑制する miR 候補の更なる絞り込み
 データベース (Target Scan) を用いて、in silico で(P)RR の mRNA に直接結合し、干渉すると予想された microRNA の 4 候補を絞り込み、それぞれの microRNA について、過去の報告より、わかっている働きについて調べた。

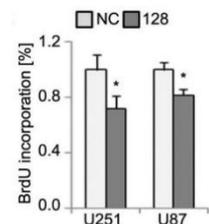
Target scanより(P)RRを抑制すると予想されたmicroRNA

MicroRNAs	Conserved sites	Poorly conserved sites	Description
miR-128	0	2	Reported to suppress Prolactin (Prl) expression (Gomara et al., Neuro Oncol., 2013)
miR-140	0	4	Reported generally as tumor suppressor gene. Suppress proliferation and invasion via down-regulating VEGF alpha in Glioma (Liu et al., Oncol Rep., 2015)
miR-148	1	0	Reported as biomarker for cancer (Yang et al., J. Cancer Biol., 2015)
miR-208	0	2	Reported to promote cancer proliferation and invasion (Liu et al., Exp Cell Res, 2015)

8) 候補となった(P)RR に対する microRNA を強制発現させ、(P)RR 発現抑制効果を見る
 MicroRNA array とデータベースより予想された (P)RR の mRNA 3'-UTR に対して相補性をもつ miR を割り出し、グリオーマ細胞株 (U87、U251) にそれぞれの microRNA をリポフェクションし、強制発現することで、(P)RR の発現量を低下させていた microRNA を調べたところ、4 候補の miR を強制発現したところ、mRNA レベルで (P)RR が抑制された。



9) (P)RR の発現量を抑制する microRNA の生物学的効果についての検証
 (P)RR の発現を抑制した microRNA を強制発現させたグリオーマ細胞株 (U87、U251) において、BrdU 導入率 (増殖能) について比較したところ、導入株で有意に細胞増殖能が抑制されており、(P)RR の発現を抑制した microRNA の抗腫瘍効果を確認した。



(P)RR の mRNA を RNA レベルで抑制する microRNA を同定した。(P)RR を抑制する microRNA が、グリオーマに対する新たな治療標的になり得る、と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1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	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 -

1. 著者名 Ogawa Daisuke, Ansari Khairul, Nowicki Michal, Sali?ska El?bieta, Bronisz Agnieszka, Godlewski Jakub	4. 巻 5
2. 論文標題 MicroRNA-451 Inhibits Migration of Glioblastoma while Making It More Susceptible to Conventional Therapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Non-Coding RNA	6. 最初と最後の頁 25 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ncrna5010025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 小川 大輔 ¹ 、藤森 健司 ¹ 、豊田 康則 ¹ 、畠山 哲宗 ¹ 、岡内 正信 ¹ 、川西 正彦 ¹ 、三宅 啓介 ¹ 、正木 勉 ² 、西山 成 ³ 、田宮 隆 ¹
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 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 ¹ , 藤森 健司 ¹ , 豊田 康則 ¹ , 畠山 哲宗 ¹ , 岡内 正信 ¹ , 川西 正彦 ¹ , 三宅 啓介 ¹ , 正木 勉 ² , 西山 成 ³ , 田宮 隆 ¹
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、柴山 弓季、岡田 真樹、三宅 啓介、西山 成、田宮 隆
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第36回日本脳腫瘍学会（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 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) (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) (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) (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（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 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

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------