

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09525

研究課題名(和文) 髄芽腫発生と抗腫瘍免疫におけるmiR-33の役割解明と免疫治療へ応用

研究課題名(英文) Role of miR-33 in tumorigenesis of medulloblastoma and anti-tumor immunity

研究代表者

峰晴 陽平 (Mineharu, Yohei)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：50716602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウスモデルにおいて、Ptch1+/-は1年間で3割程度に髄芽腫が発生したのに比べて、ptch1+/-; miR-33a-/-では8割以上で腫瘍の発生が認められ、有意に発生頻度が高いことが示された。病理学的検討では、後者の腫瘍で浸潤性が高く、転移巣が認められた。また、採取した腫瘍細胞を免疫不全マウスの皮下に移植したところ、後者(miR-33aとのダブルノックアウト)で有意に生着率が高かった。トランスクリプトーム解析で、miR-33a欠損により腫瘍内のSCD1遺伝子の発現が有意に上昇することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

髄芽腫において、脂質代謝因子のmiR-33aを操作することで、腫瘍の発生や悪性度に影響を与えられることを明らかにした。miR-33は脂質代謝の他、c-Mycなどの増殖因子やPD-L1などの免疫分子にも影響することから、微小環境制御による腫瘍治療への応用が期待される。RNF213遺伝子も同様に脂質制御に関わっており、分子ネットワークを明らかにすることで、より正確な腫瘍制御につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We showed that miR-33a depletion increase the penetrance of tumor formation in ptch1+/- medulloblastoma models. Specifically, around 30% of ptch1+/- mice develop medulloblastoma, while 80% of ptch1+/-; miR-33a-/- mice develop the tumor, indicating that miR-33a deletion increase the chance of developing medulloblastoma. Pathological findings suggest that the tumor was more invasive and we could find metastatic lesions. When the tumors were inoculated subcutaneously in nude mice, ptch1+/-; miR-33a-/- tumors form mass lesions more frequently than ptch1+/- tumors. Transcriptome analysis found scd1 was upregulated in miR-33a depleted tumors.

研究分野：neurooncology

キーワード：medulloblastoma miR-33a lipid metabolism

## 1. 研究開始当初の背景

髄芽腫において、脂質代謝が重要な働きをすることが報告されるようになってきている。しかし、多くの代謝因子は髄芽腫の分子分類ごとに働きが異なり、共通の因子は少ない。また、脂質代謝因子の腫瘍に与える影響について、詳細な分子メカニズムは解明されていない。髄芽腫のすべての分子分類に共通する代謝因子は、脂肪酸合成に関わる SCD、FASN などごく一部に限られており、それらの共通の制御因子である miR-33a に着目した。

miR-33a はまた、免疫チェックポイント分子の PD - L1 の発現に影響することが報告されている。我々は、髄芽腫において、PD-L1 高発現かつ CD8 + T 細胞の浸潤低下は、予後不良と関連することを明らかにしており (Murata et al. J Neurosurg 2017) miR-33a が免疫チェックポイント分子を介して髄芽腫の病勢に影響する可能性も考えられた。脂質代謝および免疫制御の観点で、髄芽腫における miR-33a の役割解明を目指した。

## 2. 研究の目的

本研究では、髄芽腫発生と悪性化における miR-33a の役割を明らかにすることを目的とした。同じ脂質代謝因子である Rnf213 遺伝子についても、同様に検討した。

## 3. 研究の方法

Ptch1 ノックアウトマウス (Ptch1<sup>+/-</sup>) は SHH 型髄芽腫の自然発生モデルであるが、miR-33a のノックアウトを交配することで、腫瘍の発生頻度や悪性度に変化が見られるかどうかを検討した。組織の Ptch1<sup>+/-</sup>および Ptch1<sup>+/-</sup>;miR-33a<sup>-/-</sup>のマウスから発生した髄芽腫細胞を腫瘍をヌードマウスに移植することで、腫瘍の生着や発育に差がないかを検討した。また、Ptch1<sup>+/-</sup>と Ptch1<sup>+/-</sup>; miR-33a<sup>-/-</sup>の髄芽腫細胞遺伝子発現を比較して、悪性化に関連する分子を特定するとともに、それが治療薬として利用可能かを検証した。

Rnf213 についても同様の実験を行った。Ptch1<sup>+/-</sup>および Ptch1<sup>+/-</sup>;Rnf213<sup>-/-</sup>のマウスから発生した髄芽腫細胞を腫瘍をヌードマウスに移植することで、腫瘍の生着や発育に差がないかを検討し、Ptch1<sup>+/-</sup>と Ptch1<sup>+/-</sup>; Rnf213<sup>-/-</sup>由来の髄芽腫細胞の遺伝子発現を比較して、悪性化に関連する分子を探索した。

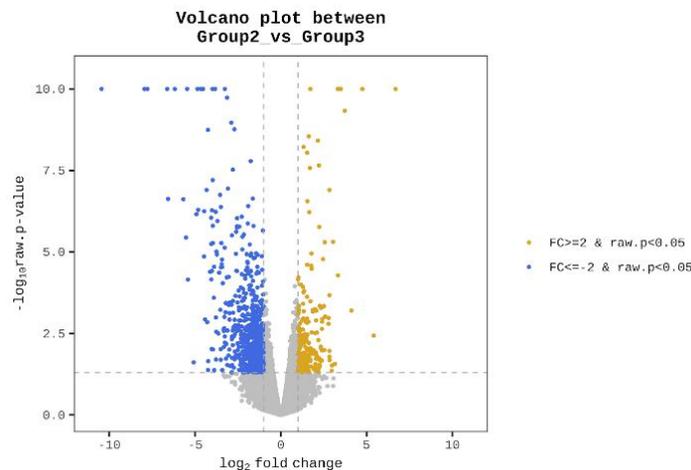
## 4. 研究成果

miR-33a は SREBP2 のイントロンに存在し、両者の発現に正の相関が認められる。Pomeroy のデータベースを解析したところ、miR-33a と相関を示す SREBP2 について、その発現と髄芽腫の病型 (Classic type vs desmoplastic type) に有意差が認められた。より悪性度の高い classic type で発現が低下していた。

マウスモデルにおいて、Ptch1<sup>+/-</sup>は 1 年間で 3 割程度に髄芽腫が発生したのに比べて、ptch1<sup>+/-</sup>; miR-33a<sup>-/-</sup>では 8 割以上で腫瘍の発生が認められ、有意に発生頻度が高いことが示された。病理学的検討を行うと、後者の腫瘍で浸潤性が高く、転移巣が認められた。また、採取した腫瘍細胞を免疫不全マウスの皮下に移植したところ、後者 (miR-33a とのダブルノックアウト) で有意に生着率が高く、病理学的検討と同様に腫瘍の高い浸潤性を示す結果が得られた。Ptch1<sup>+/-</sup>と Ptch1<sup>+/-</sup>; Rnf213<sup>-/-</sup>由来の髄芽腫細胞の遺伝子発現について、RNA シークエンスで確認すると、miR-33a 欠損により腫瘍内の SCD1 遺伝子の発現が有意に上昇することが示された (図 1)。

### 図 1. Ptch1<sup>+/-</sup>と Ptch1<sup>+/-</sup>; miR-33a<sup>-/-</sup>の遺伝子発現比較。

右側が Ptch1<sup>+/-</sup>; miR33a<sup>-/-</sup>で優位に発現が亢進している遺伝子群となっている



Rnf213 遺伝子は、脂質代謝に関与する因子で、申請者らのグループがモヤモヤ病の感受性遺伝子として特定したものである miR-33a と同じく、脂質代謝に関係する因子であること、最近の報告で、がんとの関連が示されていることから、miR-33a と同様に髄芽腫の発生に影響する可能性が考えられた。そこで、Rnf213<sup>-/-</sup>マウスを Ptch1<sup>+/-</sup>マウスと交配し、腫瘍の発生頻度や腫瘍の悪性度がどのように変換するかを検討した。

Rnf213 についても、Ptch1<sup>+/-</sup>は 1 年間で 3 割程度に髄芽腫が発生したのに比べて、ptch1<sup>+/-</sup>; Rnf213<sup>-/-</sup>では 8 割程度で腫瘍の発生が認められ、有意に発生頻度が高いことが示された。発生頻度については、ptch1<sup>+/-</sup>; Rnf213<sup>+/-</sup>と ptch1<sup>+/-</sup>; Rnf213<sup>-/-</sup>で差を認めなかった。病理学的検討を行うと、後者の腫瘍で浸潤性が高く、転移巣が認められた。また、採取した腫瘍細胞を免疫不全マウスの皮下に移植したところ、ptch1<sup>+/-</sup>よりも、ptch1<sup>+/-</sup>; Rnf213<sup>+/-</sup>そして ptch1<sup>+/-</sup>; Rnf213<sup>-/-</sup>の順に生着率が上昇し、gene dose effect が認められ、病理学的検討と同様に腫瘍の高い浸潤性が示された。Ptch1<sup>+/-</sup>と Ptch1<sup>+/-</sup>; Rnf213<sup>-/-</sup>由来の髄芽腫細胞の遺伝子発現について、RNA シークエンスで確認すると、Ptch1<sup>+/-</sup>と Ptch1<sup>+/-</sup>; miR-33a<sup>-/-</sup>の比較で認められた DEG (differentially expressed gene) が複数、共通して確認された。

Ptch1<sup>+/-</sup>と比較して、ptch1<sup>+/-</sup>; miR-33a<sup>-/-</sup>、ptch1<sup>+/-</sup>; Rnf213<sup>-/-</sup>で共通して有意差を認める免疫チェックポイント分子、ptch1<sup>+/-</sup>; miR-33a<sup>-/-</sup>と比べて ptch1<sup>+/-</sup>; Rnf213<sup>-/-</sup>で有意差を認める免疫チェックポイント分子が特定されており、PD-L1 も含まれている。今後はこれらの分子との関連について、解析を進める予定としている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 峰晴陽平	4. 巻 46
2. 論文標題 髄芽腫と脂質代謝因子miR-33	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 488-489
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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yasuzumi Matsui, Yohei Mineharu, Takaaki Morimoto, Yuki Oichi, Takahiko Kamata, Masahiro Tanji, Testushi Nakao, Takahiro Horie, Koh Ono, Yoshiki Arakawa and Susumu Miyamoto
2. 発表標題 Significance of mi-R33 in generation and progression of medulloblastoma
3. 学会等名 19th International Symposium of Pediatric Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yohei Mineharu, Yuki Oichi, Takahiko Kamata, Yasuzumi Matsui, Takaaki Morimoto, Masahiro Tanji, Hatasu Kobayashi, Hiroko Okuda, Kouji H Harada, Akio Koizumi, Yoshiki Arakawa and Susumu Miyamoto
2. 発表標題 Significance of RNF213 in tumorigenicity of medulloblastoma
3. 学会等名 19th International Symposium of Pediatric Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 峰晴陽平、松井恭澄、尾市雄輝、鎌田貴彦、森本貴昭、丹治正大、中尾哲史、堀江貴裕、荒川芳輝、宮本享
2. 発表標題 脂質代謝因子miR-33aは髄芽腫の発生と浸潤を制御する
3. 学会等名 日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 峰晴陽平、松井恭澄、鎌田貴彦、尾市雄輝、寺田行範、森本貴昭、藤原敏孝、丹治正大、荒川芳輝、宮本享
2. 発表標題 脂質制御因子miR-33a欠損は髄芽腫の発生と転移を促進する
3. 学会等名 脳腫瘍病理学会
4. 発表年 2021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