

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591610

研究課題名（和文）

グリオーマの予後を規定するマイクロRNAの同定と新たな治療戦略の構築

研究課題名（英文）

MicroRNA associated with prognostic factor in glioma

研究代表者

篠山隆司（SASAYAMA TAKASHI）

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10379399

研究成果の概要（和文）：近年、クエン酸代謝関連酵素であるイソクエン酸脱水素酵素（IDH）の異常がグリオーマの予後に関与している可能性が報告されている。今回我々はグリオーマで発現が亢進しているmicroRNA-183（miR-183）がIDH2の発現を抑制しているかを検討し、さらにIDH2制御によるHIF-1 α への影響について検討した。

（対象および方法）同一患者で膠芽腫組織及び腫瘍周囲脳組織を採取して、腫瘍におけるIDH2、HIF-1 α のmRNAおよびmiR-183の相対的発現量をリアルタイムPCRを用いて比較検討した。また、多数のグリオーマ組織及び腫瘍周囲脳組織を用いて、腫瘍におけるIDH2、HIF-1 α のmRNAおよびmiR-183の相対的発現量をリアルタイムPCRを用いて比較検討した。また、グリオーマ細胞株（A172、U87MG、T98G、U251）に対して、miR-183 mimicを細胞内に導入し、IDH2およびHIF-1 α のmRNA量および蛋白量の変化を検討した。また、ルシフェラーゼアッセイにてmiR-183とIDH2のmRNAとの直接的な関係を検討した。

（結果）同一患者の膠芽腫組織と腫瘍周囲脳組織との比較では、腫瘍において、miR-183の発現は有意に亢進し、IDH2 mRNA量は有意に低下し、HIF-1 α mRNA量は有意に上昇していた。miR-183をグリオーマ細胞に導入すると、IDH2 mRNAの量が著明に低下し、HIF-1 α mRNA量は有意に上昇した。88例のグリオーマで腫瘍周囲脳組織と比較してmiR-183発現が上昇し、IDH2発現は低下し、HIF-1 α 発現は上昇していた。グリオーマ細胞株へmiR-183 mimicを導入すると、導入前と比べてIDH2のmRNAおよび蛋白は著明に低下した。ルシフェラーゼアッセイでは、miR-183を導入した細胞ではIDH2 3' UTRを組み込んだものかルシフェラーゼ活性が低下し、さらに変異型IDH2 3' UTRでは変わりなかったことから、miR-183が直接的にIDH2 3' UTRに作用していることが示された。また、miR-183 mimic導入によりHIF-1 α のmRNAおよび蛋白発現は、コントロールRNAを導入した場合と比べて共に上昇した。さらに、miR-183を導入した細胞ではHIF-1 α の下流のGLUT1、VEGFの発現が亢進していた。

（結論）悪性グリオーマではmiR-183の発現が著明に亢進しており、miR-183によりIDH2発現が抑制している可能性が示唆された。また、miR-183によるIDH2の低下よりHIF1 α の発現が亢進している可能性が示唆され、miR-183がグリオーマの予後規定因子となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：MicroRNAs (miRs) are small, non-coding RNAs that regulate gene expression and contribute to cell proliferation, differentiation and metabolism. Our previous study revealed the extensive modulation of a set of miRs in malignant glioma. In that study, miR microarray analysis demonstrated the upregulation of microRNA-183 (miR-183) in glioblastomas. Therefore, we examined the expression levels of miR-183 in various types of gliomas and the association of miR-183 with isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2), which has complementary sequences to miR-183 in its 3' untranslated region (3' UTR). In present study, we used real-time PCR analysis to demonstrate that miR-183 is upregulated in the majority of high-grade gliomas and glioma cell lines compared with peripheral, non-tumorous brain tissue. The mRNA and protein expression levels of IDH2 are downregulated via the overexpression of miR-183 mimic RNA in glioma cells. Additionally, IDH2 mRNA expression is upregulated in glioma cells expressing anti-miR-183. We verified that miR-183 directly affects IDH2 mRNA levels in glioma cells using luciferase assays. In malignant glioma specimens, the expression levels of IDH2 were lower in tumors than in the peripheral, non-tumorous brain tissues. HIF-1 α levels were upregulated in glioma cells following transfection with miR-183 mimic RNA or IDH2 siRNA. Moreover, vascular endothelial growth factor (VEGF) and glucose transporter 1 (GLUT1), which are downstream molecules of HIF-1 α , were upregulated in cells transfected with miR-183 mimic RNA. These results suggest that miR-183 upregulation in malignant gliomas induces HIF-1 α expression by targeting IDH2 and may play a role in glioma biology.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、脳神経外科学

キーワード：グリオーマ、マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

グリオーマは外科的治療が不可能であり、放

射線療法と化学療法に多くを頼らざるを得ない。これらの集学的治療を施行しても、依然予後不良であり、特にグリオブラストーマは悪性脳腫瘍の中で最も予後不良の疾患である。グリオブラストーマを始めとするグリオーマにおいてはここ十数年間予後の進展が殆ど見られず、治療の最も遅れた腫瘍の1つである。しかし、近年の精力的な遺伝子・染色体解析により、1番染色体短腕(1p)、19番染色体長腕(19q)の欠失(Loss of heterozygosity, LOH)が存在するグリオーマは、化学療法や放射線療法にきわめて高感受性を示し、経過が良好であることが明らかとなってきた。グリオーマの予後を規定するいくつかの因子は同定されているが、予後を規定するマイクロRNAの同定は無い。

2. 研究の目的

マイクロRNA (microRNA) は、低分子量のノンコーディングRNAであり、遺伝子発現を制御して細胞増殖、細胞死、分化および代謝に寄与している。IDH (Isocitrate dehydrogenase) は、クエン酸回路内で酸化的脱炭酸反応によるイソクエン酸から α -ケトグルタル酸への反応を触媒している。IDHには1~3のサブタイプがあり、IDH1は細胞質およびペルオキシソームに存在するのに対してIDH2, 3はミトコンドリア内に存在する。ヒトの癌で変異していることが知られているのはIDH1, 2のみで、これらはグリオーマや急性骨髄性白血病などのがんで変異の報告がある。非常に興味深いのは、IDH変異が予後に関連しているということである。我々は以前に、microRNAのマイクロアレイ解析によって、グリオブラストーマではmicroRNA -10b, 21, 183, 92b, 106bが正常脳組織と比べて高発現していることを報告した。miR-183はIDH2 mRNAの3' 非翻訳領

域(3' UTR)に相補的な配列を有するとされているため、IDH2とmiR-183の関連性を臨床標本ならびに培養細胞を用いて検索した。

3. 研究の方法

腫瘍組織と腫瘍周囲脳組織でのIDH2, miR-183の発現を比較するため、6症例のグリオブラストーマ症例において同一患者の膠芽腫組織と腫瘍周囲脳組織を術中に採取しリアルタイムPCRを用いてそれぞれの発現を比較検討した。また、グリオーマ88例(glioblastoma: 53例、anaplastic astrocytoma: 14例、anaplastic oligodendroglioma: 3例、diffuse astrocytoma: 10例、oligodendroglioma: 5例、pilocytic astrocytoma: 3例)および腫瘍周囲脳組織6例を用いて、腫瘍におけるmicroRNAの相対的発現量をリアルタイムPCRを用いて比較検討した。さらに、悪性グリオーマ43例および腫瘍周囲脳組織5例を用いて、腫瘍におけるIDH2 mRNAの相対的発現量をリアルタイムPCRを用いて比較検討した。グリオーマ細胞(U251, U87MG, T98G, A172, SF126)およびヒト星状細胞の細胞株(SVGp12)に対して、miR-183 mimicを細胞内に導入し、IDH2, HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α)のmRNA量および蛋白量の変化を検討した。さらに、IDH2 3' UTRをプラスミドに組み込んだルシフェラーゼレポーターアッセイにて、IDH2とmiR-183の関係を検討した。

4. 研究成果

6症例のグリオブラストーマにおいて、腫瘍組織と腫瘍周囲脳組織を用いてmiR-183の発現を比較したところ、全ての症例において腫瘍組織でmiR-183の発現が高かった。また、グリオーマ88例の解析でも腫瘍周囲組織と比べて腫瘍組織でmiR-183発現が亢進してお

り、さらに low-grade glioma (grade I-II) と high-grade glioma (grade III-IV) で比較すると、後者で有意に miR-183 発現は亢進していた。また、グリオーマ細胞とヒト星状細胞の細胞株で miR-183 の発現を解析すると、A172, SF126, T98G, SVGp12 では、腫瘍周囲組織と比べて miR-183 の発現は亢進していた。

miR-183 は IDH2 3' UTR に相補的な配列を有する。グリオーマ細胞株での IDH2 mRNA の発現を調べるため、リアルタイム PCR を行ったところ、A172, SF126, T98G, U87, U251 でそれぞれ腫瘍周囲組織の 0.27, 0.45, 1.07, 1.6, 1.83 倍の IDH2 mRNA 発現を認めた。U251, U87, T98G, SF126, SVGp12 では、miR-183 導入により IDH2 mRNA の発現は有意に低下した。また、U87, T98, A172 で、miR-183 導入による IDH2 蛋白の発現低下を認めた。さらに、U251, T98, A172, SF126 に anti-miR-183 inhibitor を導入することにより、IDH2 mRNA の発現亢進を認めた。

野生型 IDH2 3' UTR または変異型 IDH2 3' UTR を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドを作成し、ルシフェラーゼアッセイを行った。U251, U87, A172, T98, SF126 では、miR-183 を導入することにより、野生型 IDH2 3' UTR が組み込まれたプラスミドを導入した場合の方が、変異型 IDH2 3' UTR を組み込まれたプラスミドを導入した場合よりもルシフェラーゼ活性は有意に抑制された。また、同 5 種類の細胞株に miR-183 inhibitor を導入すると、野生型 IDH2 3' UTR が組み込まれたプラスミドを導入した場合の方が、変異型 IDH2 3' UTR を組み込まれたプラスミドを導入した場合よりもルシフェラーゼ活性は有意に増加した。

次に、グリオーマ患者における IDH2 の発現について検討した。上述のグリオブラストーマ 6 症例において、それぞれの腫瘍組織と

腫瘍周囲組織で IDH2 の発現をリアルタイム PCR で解析したところ、全例で IDH2 の発現は腫瘍周囲組織よりも腫瘍組織で低下していた。また、悪性グリオーマ 43 症例と腫瘍周囲組織 5 例でリアルタイム PCR により IDH2 発現を調べたところ、腫瘍周囲組織と比べて悪性グリオーマで有意に IDH2 発現は低下していた。さらに、グリオブラストーマ 4 症例において、腫瘍組織と腫瘍周囲組織の IDH2 蛋白をウエスタンブロッティングにより比較したところ、4 症例全てで腫瘍組織の方が IDH2 発現は少なかった。

IDH2 はイソクエン酸を α -ケトグルタル酸 (α -KG) へ変換する機能を有する。 α -KG は prolyl hydroxylases (PHDs) の基質であり、PHDs は HIF-1 α の発現を抑制するとされている。そのため我々は、miR-183 の HIF-1 α 発現に与える影響を調べるために、グリオーマ細胞株に miR-183 を導入し、HIF-1 α 発現の変化を解析した。U87, T98G, A172 に miR-183 を導入したところ、コントロールに比べて HIF-1 α 蛋白は増加した。次に、IDH2 を抑制することによる HIF-1 α 発現の変化をみるために、同 3 種類の細胞株に IDH2 に対する siRNA を導入してウエスタンブロッティングを行い HIF-1 α の発現を解析したところ、3 種類全ての細胞で IDH2 siRNA 導入による HIF-1 α の発現亢進を認めた。miR-183 の HIF-1 α に対する影響を mRNA レベルでも確認するため、同細胞に miR-183 を導入して HIF-1 α の発現をみたところ、3 種類全ての細胞で miR-183 による HIF-1 α 発現の亢進を認めた。さらに、T98G, A172 に対して miR-183 を導入してリアルタイム PCR を行い、シグナル伝達経路で HIF-1 α の下流にある vascular endothelial growth factor (VEGF), glucose transporter 1 (GLUT1) の発現を解析したところ、miR-183 導入により VEGF, GLUT1 の発

現は共に増加した。

以上より、グリオーマ細胞では、miR-183を高発現させることにより IDH2 発現抑制を介して HIF-1 α 発現が亢進することが示された。

(考察)

我々は、悪性グリオーマの大多数で miR-183 が高発現しており、IDH2 は発現が低下していることを発見し、細胞株を用いた実験において、miR-183 の発現を亢進させることによって TCA サイクル内のミトコンドリア酵素の 1 つである IDH2 が抑制されること、さらに miR-183 の発現亢進により HIF-1 α は mRNA および蛋白レベルで発現が亢進することを示した。miR-183 が HIF-1 α を高発現させるということは、miR-183 がグリオーマの発生または増殖に関与している可能性を強く示唆した。また、グリオーマ細胞株を用いてルシフェラーゼアッセイを行うことにより、グリオーマにおける miR-183 と IDH2 の直接的な関係が証明されたが、ヒト星状細胞の細胞株での実験においても miR-183 は IDH2 を抑制したため、この関係は腫瘍に特異的なものではないと考えられた。リアルタイム PCR により、miR-183 の発現亢進によって HIF-1 α およびその下流にある VEGF および GLUT1 の発現が亢進することも示しており、これらの経路を通じて miR-183 はグリオーマの代謝や血管新生に関与していることが示された。ただし、miR-183 が HIF-1 α mRNA の発現をどのような機序で亢進させるかについてはさらなる解析が必要である。

(結語)

悪性グリオーマでは IDH2 の発現が低下し、HIF-1 α の発現は亢進している。その機序として、microRNA-183 による発現制御が関与している可能性が示唆された。microRNA-183 はグリオーマの予後に関与するかは今後の解

析が必要である。

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 9 件)

1. Nakamizo S, Sasayama T, Shinohara M, Irino Y, Nishiumi S, Nishihara M, Tanaka H, Tanaka K, Mizukawa K, Itoh T, Taniguchi M, Hosoda K, Yoshida M, Kohmura E. J Neurooncol. 2013 May;113(1):65-74. doi: 10.1007/s11060-013-1090-x. 査読有
2. Tanaka H, Sasayama T, Tanaka K, Nakamizo S, Nishihara M, Mizukawa K, Kohta M, Koyama J, Miyake S, Taniguchi M, Hosoda K, Kohmura E. J Neurooncol. 2013 Feb;111(3):273-83. doi: 10.1007/s11060-012-1027-9. 査読有
3. Taniguchi M, Nishihara M, Sasayama T, Takahashi Y, Kohmura E. Neuropathol Appl Neurobiol. 2013 Jun;39(4):445-8. doi: 10.1111/nan.12000. 査読有
4. Akhavan D, Pourzia AL, Nourian AA, Williams KJ, Nathanson D, Babic I, Villa GR, Tanaka K, Nael A, Yang H, Dang J, Vinters HV, Yong WH, Flagg M, Tamanoi F, Sasayama T, James CD, Kornblum HI, Cloughesy TF, Cavenee WK, Bensinger SJ, Mischel PS. Cancer Discov. 2013 May;3(5):534-547. 査読有
5. Ishii T, Mizukawa K, Sasayama T, Sasaki H, Hayashi S, Nakamizo S, Tanaka H, Tanaka K, Hara S, Hirai C, Itoh T, Kohmura E. Neuropathology. 2013 Jun;33(3):299-305. doi: 10.1111/j.1440-1789.2012.01349.x.

査読有

6. Nakamizo S, Sasayama T, Kondoh T, Inoue S, Shiomi R, Tanaka H, Nishihara M, Mizukawa K, Uehara K, Usami Y, Kohmura E. J Clin Neurosci. 2012 Oct;19(10):1453-5. doi: 10.1016/j.jocn.2011.09.039. 査読有
7. Sasayama T, Nakamizo S, Nishihara M, Kawamura A, Tanaka H, Mizukawa K, Miyake S, Taniguchi M, Hosoda K, Kohmura E. Neuro Oncol. 2012 Mar;14(3):368-80. doi: 10.1093/neuonc/nor203. 査読有
8. Nishihara M, Sasayama T, Kudo H, Kohmura E. Kobe J Med Sci. 2011 Jan 21;56(4):E148-53. 査読有
9. Ozawa T, Brennan CW, Wang L, Squatrito M, Sasayama T, Nakada M, Huse JT, Pedraza A, Utsuki S, Yasui Y, Tandon A, Fomchenko EI, Oka H, Levine RL, Fujii K, Ladanyi M, Holland EC. Genes Dev. 2010 Oct 1;24(19):2205-18. doi: 10.1101/gad.1972310. 査読有

[学会発表] (計3件)

1. Tanaka H, Sasayama T et al. Regulation of IDH2 and HIF-1alpha by microRNA in malignant glioma, 9th Annual Meeting of Asian Society for Neuro-Oncology, 2012. 4. 21, Taipei Taiwan
2. 田中宏知、篠山隆司、西原賢在 他、悪性グリオーマにおける IDH2 発現とマイクロ RNA による発現制御、日本脳神経外科学会第 70 回学術総会、2011. 10. 12, 横浜
3. 田中宏知、篠山隆司、西原賢在 他、悪性グリオーマにおける IDH2 発現とマイクロ RNA による発現制御、第 12 回日本分子脳神経外科学会、2011. 10. 14, 横浜

[図書] (計0件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠山隆司 (SASAYAMA TAKASHI)
神戸大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10379399

(2) 研究分担者

西原賢在 (NISHIHARA MASAMITSU)
神戸大学・医学部・医学研究員
研究者番号：20452493