

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 2 5 年 5 月 2 0 日現在

機関番号：17102
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659691
 研究課題名（和文） エキソソーム microRNA 発現解析に基づく新たな脳腫瘍バイオマーカー同定の試み
 研究課題名（英文） Identification of a novel biomarker of brain tumor based on the analysis of exosomal microRNA
 研究代表者
 溝口 昌弘（MIZOGUCHI MASAHIRO）
 九州大学・大学病院・講師
 研究者番号：50380621

研究成果の概要（和文）：

悪性神経膠腫培養液、脳腫瘍患者血清中のエキソソーム分離、分泌型 microRNA の抽出、発現解析法を確立した。培養液中から腫瘍で高発現している microRNA を同定することができた。さらに膠芽腫摘出標本より脳腫瘍幹細胞を樹立し、脳腫瘍幹細胞移植モデルを作成し、その全血清より分泌型 microRNA の分離・同定、定量に成功した。神経膠腫における microRNA 発現と遺伝子発現解析より、miR-128a と miR-504 の形質転換への関与を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We isolated exosomal microRNAs from culture medium of glioma cell and total serum of glioma patients. The expression of secreted microRNA in the culture medium is correlated the microRNA expression of cultured glioma cells. We also established brain tumor stem cells and mouse xenograft models. We successfully analyzed secreted microRNA expression in total serum of xenograft models. We compared microRNA expression and gene expression in primary glioma samples, and revealed that miR-128a and miR-504 are associated with mesenchymal gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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・脳腫瘍学

キーワード：脳腫瘍、神経膠腫、microRNA、エキソソーム

1. 研究開始当初の背景

腫瘍の発生、増悪には様々な遺伝子発現異常が関与することが認識されていたが、研究開始時には、microRNA は新たな遺伝子発現制御機構として注目されていた。腫瘍における

microRNA の重要性が解明されつつあり、様々ながん種において特異的な microRNA 発現異常が同定されていた。また、腫瘍細胞が分泌するエキソソーム内の核酸、蛋白が近隣の腫

瘍細胞の増殖、浸潤のみならず、血管新生、免疫系の制御に関与していることが解明されつつあった。さらにエクソソームには豊富なmicroRNAが含まれており、分泌型microRNAが腫瘍形成過程において重要な役割を担っていることが予測されていた。通常RNAは血清中で速やかに分解されるが、microRNAは血液中、内因性RNAase存在下でも安定して存在する事が報告され、新たな血中バイオマーカーと成りうる可能性が注目されていた。

2. 研究の目的

血清中の分泌型microRNAの分離・同定法に関しては議論が多く、確立された方法は存在しないのが現状である。本研究の第一の目的は血中の分泌型microRNAを分離・同定する方法を確立することである。また、血中の分泌型microRNAが、腫瘍形成と関連しどのように変動するかは未だ詳細は不明であるが、腫瘍由来の分泌型microRNAを反映している可能性は高い。さらに腫瘍におけるmicroRNA発現プロファイルは腫瘍の種類により異なり、診断、悪性度評価に有用であることがわかってきている。血中microRNA発現と腫瘍におけるmicroRNA発現の関連性が解明できれば、血液検査による腫瘍の診断に非常に有用なバイオマーカーとなり得る。脳腫瘍（悪性神経膠腫）には、未だ有用な血中バイオマーカーは同定されておらず、本研究は分泌型miRNA発現解析に基づく新たなバイオマーカー同定を目的とした研究である。

3. 研究の方法

(1) 脳腫瘍幹細胞分離・同定、移植モデル作成：悪性神経膠腫に対し、従来の細胞培養に加え、幹細胞培養を導入し、腫瘍摘出標本より脳腫瘍幹細胞の分離・同定を継続した。樹立した脳腫瘍幹細胞を免疫不全マウスに移植し、脳腫瘍幹細胞脳内移植モデル、皮下

移植モデルを作成し、右心房より全血を採取し、全血清より分泌型microRNAを抽出した。

(2) 細胞培養液中の分泌型microRNAの同定、発現解析：7つ脳腫瘍細胞株の培養液よりエクソソームを分離。細胞株および対応する培養液から分離したエクソソームよりtotalRNAを抽出し、real time PCRを行った。エクソソーム分離にはExoquickキット(System biosciences)と超遠心を使用し、mirVana RNA extraction Kit (Ambion)を用いて、miRNAを含むtotalRNAを抽出した。TaqMan法により、miR-16, miR-21, miR-196a, miR-196bの発現解析を行った。

(3) 脳腫瘍幹細胞移植モデル、脳腫瘍症例血清中のmicroRNAの同定、発現解析：髄膜腫、膠芽腫患者および健常者（髄膜腫6例、膠芽腫7例、健常者5例）の血清よりエクソソームを分離し、同様にTaqMan法により、miR-16, miR-21, miR-196a, miR-196bの発現解析を行った。

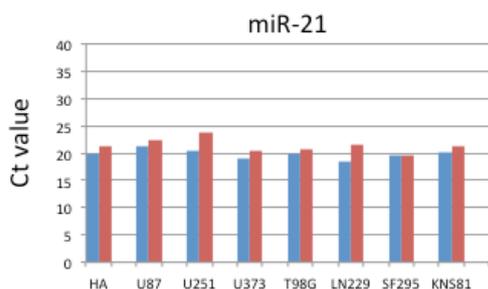
(4) 神経膠腫における遺伝子発現とmicroRNA発現解析：82例のglioma(grade2-4)に対し、21個の脳腫瘍関連候補microRNAとproneuralマーカー、mesenchymalマーカー、幹細胞マーカー計23遺伝子の発現を解析し、その関連を検討した。

4. 研究成果

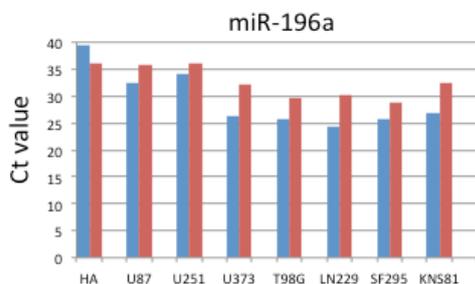
(1) 脳腫瘍幹細胞分離・同定、移植モデル作成：脳腫瘍幹細胞分離を目的に悪性神経膠腫摘出標本より幹細胞培養と通常培養の2系統での培養を継続した。その内、長期培養(20継代以上)が可能であった4細胞株を樹立した。樹立した脳腫瘍幹細胞を免疫不全マウスに移植し、脳腫瘍幹細胞脳内移植モデル、皮下移植モデルを作成した(19バッチ、57匹)。

その内 12 匹 (4 バッチ) に対し、右心房より全血を採取し、全血清より分泌型 microRNA を抽出した。

(2) 細胞培養液中の分泌型 microRNA の同定、発現解析：7 つ脳腫瘍細胞株の培養液より exosome を分離。細胞株および対応する medium から分離したエクソソームより total RNA を抽出し、real time PCR を行った。エクソソーム分離に関しては、Exoquick キット (System biosciences) と超遠心で同等のエクソソーム分離が可能であった。分離されたエクソソームより microRNA を含む total RNA を抽出し、miR-16, miR-21, miR-196a, miR-196b の発現解析を行い、培養液中の microRNA 発現解析が腫瘍における microRNA 発現と相関して発現することを同定した (下図)。



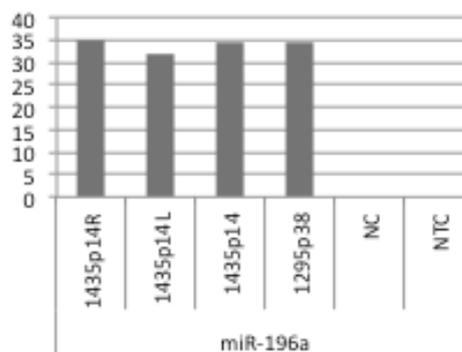
細胞培養液中 miR-21 発現解析 (青：腫瘍、赤：培養液)



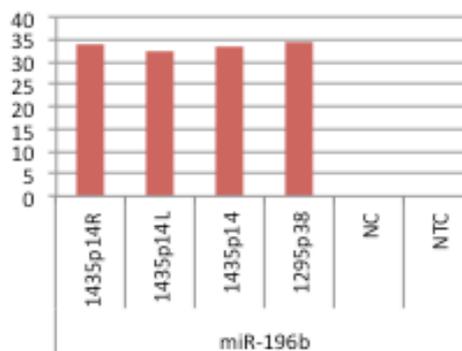
細胞培養液中 miR-196a 発現解析 (青：腫瘍、赤：培養液)

(3) 脳腫瘍症例血清中の microRNA の同定、

発現解析：血清エクソソーム内の microRNA 発現が低い事が確認できた為、超遠心、総血清を用いて microRNA を抽出し、発現解析を行った。その結果、総血清を用いた解析が最も microRNA 発現が高く、血清中の microRNA 発現を同定することができた。



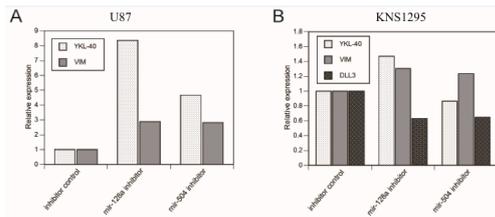
移植モデル血清中 miR-196a 発現解析



移植モデル血清中 miR-196b 発現解析

(4) 神経膠腫における遺伝子発現と microRNA 発現解析：primary glioblastoma では mesenchymal マーカー遺伝子、miR-21, -34a の発現上昇を認め、secondary glioblastoma では proneural マーカー遺伝子、mi-504 発現亢進を認めた。さらに miR-128a, -504, -124, -184 発現は mesenchymal マーカー遺伝子発現と逆相関し、miR-128a, -504 発現制御により mesenchymal マーカー遺伝子発現上昇を誘導し、microRNA 発現が形質転換へ関与する可能性が示唆された。

miR-128a and miR-504 inhibition upregulate mesenchymal marker expression in glioma cell lines



miR-128a, -504 発現抑制による mesenchymal marker 遺伝子発現亢進

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 7 件)

① Clinical implications of microRNAs in human glioblastoma

Mizoguchi M, Guan Y, Yoshimoto K, Hata N, Amano T, Nakamizo A, Sasaki T:

Frontiers in Oncology (査読有) 3:19, 2013 (DOI:10.3389/fonc.2013.00019)

② Complex DNA repair pathways as possible therapeutic targets to overcome temozolomide resistance in glioblastoma
Yoshimoto K, Mizoguchi M, Hata N, Murata H, Hatae R, Amano T, Nakamizo A, Sasaki T
Frontiers in Oncology (査読有) 2: 186, 2012 (DOI:10.3389/fonc.2012.00186)

③ MicroRNAs in Human Malignant Gliomas
Mizoguchi M, Guan Y, Yoshimoto K, Hata N, Amano T, Nakamizo A, Sasaki T
J Oncol (査読有) 2012:732874, 2012 (DOI: 10.1155/2012/732874)

④ Molecular biomarkers of glioblastoma: current targets and clinical implications
Yoshimoto K, Mizoguchi M, Hata N, Amano T, Nakamizo A, Sasaki T
Current Biomarker Findings (査読有) 2012(2):63-76, 2012 (DOI:http://dx.doi.org/10.2147/CBF.S25590)

⑤ Associations between microRNA expression and mesenchymal marker gene expression in glioblastoma

Ma X, Yoshimoto K, Guan Y, Hata N, Mizoguchi M, Sagata N, Murata H, Kuga D, Amano T, Nakamizo A, Sasaki T

Neuro Oncol (査読有) 14(9):1153-62, 2012 (DOI:10.1093/neuonc/nos145)

⑥ Molecular characteristics of glioblastoma with 1p/19q co-deletion

Mizoguchi M, Yoshimoto K, Ma X, Guan Y, Hata N, Amano T, Nakamizo A, Suzuki SO, Iwaki T, Sasaki T.

Brain Tumor Pathol (査読有) 29(3):148-53, 2012 (DOI:10.1007/s10014-012-0107-z)

⑦ Loss of heterozygosity analysis in malignant gliomas

Mizoguchi M, Kuga D, Guan Y, Hata N, Nakamizo A, Yoshimoto K, Sasaki T

Brain Tumor Pathol (査読有) 28(3):191-6, 2011 (DOI:10.1007/s10014-011-0038-0)

[学会発表] (計 10 件)

① 溝口昌弘: グリオーマにおけるmicroRNA発現異常の網羅的解析、第30回日本脳腫瘍学会学術集会、2012年11月25日、グランドプリンス広島(広島)

② 溝口昌弘: グリオーマにおけるmicroRNA網羅的発現解析に基づく新たな知見、日本脳神経外科学会第71回学術総会、2012年10月19日、大阪会議場(大阪)

③ 溝口昌弘: 悪性神経膠腫における網羅的microRNA発現解析、第13回日本分子脳神経外科学会、2012年09月20日、熊本市国際交流会館(熊本)

④ 溝口昌弘: 膠芽腫テモゾロミド放射線同期療法後の早期再手術症例の検討、第17回日本脳腫瘍の外科学会、2012年09月08日、ホテルニューグランド(横浜)

⑤ Masahiro Mizoguchi : Clinical Implications of Loss of Heterozygosity and IDH Mutation in Malignant Glioma, The 4th International Symposium of Brain Tumor Pathology, 2012年05月24日、名古屋国際会議場(愛知)

⑥ Koji Yoshimoto : Diagnostic significance of microRNA and gene expression in glioma patients, The 4th International Symposium of Brain Tumor Pathology, 2012年05月24日、名古屋国際会議場(愛知)

⑦ 溝口昌弘 : 悪性神経膠腫における 1p/19q 欠失の評価, 第 29 回日本脳腫瘍学会 学術集会, 2011 年 11 月 28 日, 水明館 (岐阜県)

⑧ 溝口昌弘 : 遺伝子異常に基づく high grade glioma の治療戦略, 日本脳神経外科学会第 70 回学術総会, 2011 年 10 月 13 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

⑨ 溝口昌弘 : 膠芽腫における腫瘍局在と遺伝子異常、臨床経過に関する検討, 第 16 回日本脳腫瘍の外科学会, 2011 年 9 月 9 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

⑩ 溝口昌弘 : 1p/19q 共欠失 GBM と oligodendroglioma の分子病理学的比較, 第 29 回日本脳腫瘍病理学会, 2011 年 5 月 20 日, タワーホール船堀 (東京)
[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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝口 昌弘 (MIZOGUCHI MASAHIRO)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号 : 50380621

(2) 研究分担者

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

中溝 玲 (NAKAMIZO AKIRA)
九州大学・医学(系)研究科(研究院)・講師
研究者番号 : 80529800

天野 敏之 (AMANO TOSHIYUKI)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号 : 70448413

秦 暢宏 (HATA NOBUHIRO)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号 : 10596034

(3) 連携研究者

なし