

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791501

研究課題名(和文) マイクロRNAによるmTORC2の制御機構の解明と治療への応用

研究課題名(英文) microRNA regulates mTORC2 activity in glioma cells

研究代表者

田中 一寛 (TANAKA, KAZUHIRO)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70467661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：グリオーマ細胞ではmTORシグナルが活性しており、特定のマイクロRNAによるmTORC2の主要構成タンパクであるRictorの発現制御を検討した。しかし、ヒト由来グリオーマ細胞株U87、U251細胞へのmiR-137および218遺伝子導入によってRictorの発現レベルの低下はなかった。

一方、mTORシグナルがグリオーマ細胞の代謝リモデリングに及ぼす影響は未だ不明な点が多い。mTOR阻害剤の投与が細胞内代謝に及ぼす影響について質量分析計によるメタボローム解析およびreal-time PCRでの代謝酵素のmRNA量の解析を行い、グルコース代謝の抑制と共にグルタミン代謝の亢進が示唆された。

研究成果の概要(英文)：mTOR signaling is frequently deregulated in cancer including malignant gliomas. We analyzed if a specific microRNA(miR) controls the expression of Rictor, a main component of mTOR Complex 2. Unfortunately, over-expression of miR-137 or 218 mimic in U87 and U251 glioma cells didn't affect the level of Rictor.

Although the PI3K/mTOR pathway is a master regulator of aerobic glycolysis and cellular biosynthesis, the effect of modulating mTOR activity on other metabolic processes, such as glutamine metabolism is not well understood. Metabolic profiling using gas chromatography and mass spectroscopy (GC/MS) and gene expression analysis of key enzymes for glycolysis and glutaminolysis using RT-PCR methods demonstrated the mTOR-targeted treatments (rapamycin or PP242) regulated glycolysis and stimulated glutamine utilization to elicit a switch in the pathways used to deliver glutamine carbon to the tricarboxylic acid (TCA) cycle.

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 mTORC2 microRNA がん代謝 グルタミン

### 1. 研究開始当初の背景

神経膠芽腫(悪性グリオーマ)は主に成人大脳半球に発生する最も予後不良な脳腫瘍の一つであり、手術・化学療法・放射線療法が標準治療となっているが、多くは治療抵抗性であり、5年生存率は10%未満と極めて予後不良である。したがって新規治療法の開発が急務に望まれている。

悪性グリオーマを対象とした最近の遺伝子解析では、RTK/RAS/PI3K シグナル系に最も高率に遺伝子増幅や変異を認め、最も重要なシグナル伝達経路であることが報告されている(The Cancer Genome Atlas (TCGA), Nature, 2008)。特に、The mammalian target of rapamycin (mTOR)はPI3Kを介してEGFRなどの成長因子からのシグナルを受け取り、細胞増殖・生存、たんぱく質翻訳、脂質代謝などの多岐にわたる細胞内機構に関与しているため、神経膠芽腫治療の効果的な分子標的の一つとして考えられている。

mTORC1はmTOR、mLST8(別名GβL)、Raptor(regulatory-associated-protein of mTOR)という三つのタンパク質から構成されており、Aktの下流に存在して、p70S6K、4EBP1を介するたんぱく質合成を制御する。一方、mTORC2はmTOR、mLST8、Rictor(rapamycin-insensitive-companion of mTOR)、SIN1(SAPK-interacting protein)、Protor-1(protein-observed with Rictor-1)から成り、Akt、SGK1(serum glucocorticoid-induced protein kinase 1)、PKCをリン酸化することが知られているが、mTORC2の上流の制御の詳細及びmTORC2の機能についてはほとんど知られていない。

### 2. 研究の目的

神経膠芽腫(悪性グリオーマ)は最も予後不良な悪性脳腫瘍の一つである。最近の遺伝子解析においてThe mammalian target of rapamycin (mTOR)は神経膠芽腫治療の効果的な分子標的の一つとして取り上げられている。mTORはEGFRの下流に位置し、複数の蛋白から構成される2種類の複合体として存在しmTORC1およびmTORC2と呼ばれる。mTORC1については最近多くの報告があるが、mTORC2の役割についてはほとんど解明されていない。

申請者は、EGFR遺伝子の増幅・変異を示すグリオーマ細胞ではmTORC2シグナルが活性していることを報告した(Tanaka K et al. Cancer Discovery. 1(6):524-38. 2011)。遺伝子発現の制御メカニズムとしてマイクロRNA(miRNA)の関与が近年注目されている。そこで、本研究では特にEGFR遺伝子の増幅・変異によって引き起こされるmiRNAを同定し、そのmiRNAによるmTORC2制御の可能性と制御機構を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究の計画はEGFR遺伝子の異常によ

て引き起こされるmiRNAを明らかにして、Rictor(mTORC2)に関与すると思われるmiRNAの機能解析をグリオーマ培養細胞およびマウスxenograft、患者サンプルを用いて行うことである。

(1)すでに確立したEGFR/EGFRvIII強制発現グリオーマ培養細胞および患者サンプルを使用して、EGFR/EGFRvIII発現の有無によって変動したmiRNAをマイクロアレイ解析にて明らかにし、miRNAのデータベースよりRictor発現に関与すると予想されるmiRNAを同定する。

(2)グリオーマ培養細胞および患者グリオーマ由来の培養細胞に上記で同定したmiRNAを発現導入・抑制し、細胞増殖能やアポトーシス耐性、mTORC2-NF-κBシグナルなどの生物学的特徴について解析する。

(3)グリオーマ培養細胞あるいはマウスxenograftに分子標的治療薬や化学療法を用いて、上記で同定したmiRNAやmTORC2シグナルの変化と治療効果の相関について解析する。

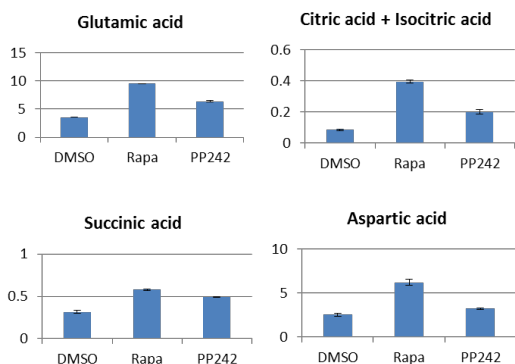
### 4. 研究成果

(1)悪性グリオーマでは様々なmiRNAの発現が特異的に増減している(Silver J et al. BMC medicine, 6:14. 2008)。その中からmiRNA137および218に注目し、mTORC2の主要構成タンパクであるRictorの発現レベルを測定した。しかし、ヒト由来グリオーマ細胞株U87あるいはU251細胞へのmiR-137および218を遺伝子導入によってRictorの発現レベルの低下はなかった。

(2)一方、悪性グリオーマを含む多くのがん細胞のエネルギー代謝が解糖系に依存していることはWarburg効果として明らかである。申請者らはこの間、mTORC2によるc-Mycおよび解糖系の制御はFoxOのアセチル化を介し、miR-34cの発現はmTORC2の活性化の状態と強く相関していることを報告した(Masui K, Tanaka K et al. Cell Metab. 18(5):726-39. 2013)。

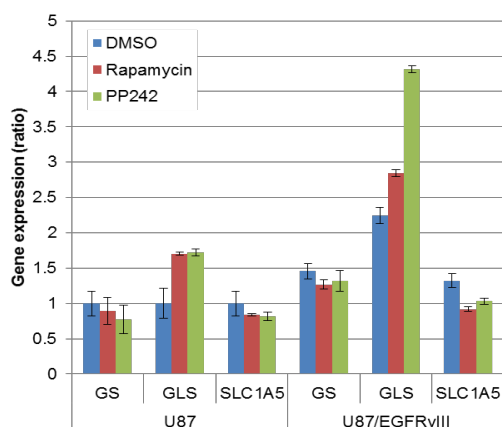
(3)上記のようにmTORシグナルはグルコース代謝に強く関与しているが、他の代謝リモデリングに及ぼす影響については未だ不明である。そこで研究テーマを少し修正して、ラパマイシンまたはPP242を用いたmTOR阻害剤の投与が細胞内代謝に及ぼす影響を解析した。

(4)グリオーマ細胞にmTOR阻害剤(ラパマイシンまたはPP242)を投与後のガスクロマトグラフィー/質量分析計(GC/MS)によるメタボローム解析では細胞内のグルタミン酸の有意な上昇を認め、TCA回路内の代謝物では、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、クエン酸(イソクエン酸)、コハク酸、の有意な上昇を認めた。その他、アミノ酸の中ではアスパラギン酸の上昇を認めた(図1)。



(図1)

(5) 先の結果より、我々はグルタミン代謝に注目して real-time PCR での代謝酵素の mRNA 量の解析を行い、グルタミンからグルタミン酸産生を調節する代謝遺伝子グルタミナーゼ (GLS) の発現亢進を認めた (図 2)。(SLC1A5; グルタミントランスポーター、GLS; グルタミナーゼ、GS; グルタミンシンターゼ)



(図2)

(6) 以上の結果から GLS がグリオーマ細胞の mTOR 阻害剤に対する抵抗性獲得の機序に関連すると考えられ、今後は siRNA による GLS ノックダウンや GLS 阻害剤の投与によってグリオーマ細胞の mTOR 阻害剤に対する感受性、GLS 発現のメカニズム (miRNA の関与) などを検討する予定である。

##### 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 4 件)

- Masui K, Tanaka K, Akhavan D, Babic I, Gini B, Matsutani T, Iwanami A, Liu F, Villa GR, Gu Y, Campos C, Zhu S, Yang H, Yong WH, Cloughesy TF, Mellinghoff IK, Cavenee WK, Shaw RJ, Mischel PS. mTOR

Complex 2 Controls Glycolytic Metabolism in Glioblastoma through FoxO Acetylation and Upregulation of c-Myc. **Cell Metab.** 査読あり 2013;18(5):726-39. doi:

10.1016/j.cmet.2013.09.013.

- Babic I, Anderson ES, Tanaka K, Guo D, Masui K, Li B, Zhu S, Gu Y, Villa GR, Akhavan D, Nathanson D, Gini B, Mareninov S, Li R, Camacho CE, Kurdistani SK, Eskin A, Nelson SF, Yong WH, Cavenee WK, Cloughesy TF, Christofk HR, Black DL, Mischel PS. EGFR Mutation-Induced Alternative Splicing of Max Contributes to Growth of Glycolytic Tumors in Brain Cancer. **Cell Metab.** 査読あり

2013;17(6):1000-8. doi:

10.1016/j.cmet.2013.04.013.

- 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. GC/MS-based metabolomic analysis of cerebrospinal fluid (CSF) from glioma patients. **J Neurooncol.** 査読あり

2013;113(1):65-74. doi:

10.1007/s11060-013-1090-x.

- Tanaka H, Sasayama T, Tanaka K, Nakamizo S, Nishihara M, Mizukawa K, Kohta M, Koyama J, Miyake S, Taniguchi M, Hosoda K, Kohmura E. MicroRNA-183 upregulates HIF-1 $\alpha$  by targeting isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) in glioma cells. **J Neurooncol.** 査読あり 2013;111(3):273-83. doi: 10.1007/s11060-012-1027-9.

[学会発表](計 3 件)

- 田中一寛, 篠山隆司, 西原賢在, 水川克, 甲村英二: 天幕上 low grade glioma 患者の予後規定因子について 第 72 回日本脳神経外科学会学術総会 (2013.10.16-18, 横浜)

研究者番号：

2. Tanaka K, Sasayama T, Takata K, Mizukawa K, Kohmura E: Surgical management of cerebral low-grade gliomas. The 10<sup>th</sup> Annual Meeting of Asian Society for Neuro-Oncology, Mumbai, India (2013.3.21-24, インド)
3. 田中一寛, Paul S. Mischel, 甲村英二: EGF レセプターの恒常的活性化による mTORC2-NF-κB 経路の制御 第30回日本脳腫瘍学会学術集会(2012.11.25-27, 広島)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/neuro/TOP2.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 一寛 (TANAKA, Kazuhiro)  
神戸大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：70467661

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )