

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293311

研究課題名(和文) 腫瘍幹細胞由来エクソソーム解析による脳腫瘍形成機序解明と新規診断・治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of brain tumor derived exosomes; the role in tumorigeneity and therapy

研究代表者

溝口 昌弘 (Mizoguchi, Masahiro)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：50380621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年の分子病理学の進歩により、グリオーマにおいても、より正確な解析が求められる時代となった。我々は、HRM法による高精度な遺伝子解析法、遺伝子発現に基づくより簡便な評価法を確立した。microRNA(miR-9, -10b)と遺伝子発現型の相関を基に、miRNAと形質転換の関連性が示唆された。さらに分泌型microRNA(miR-127, -145, -31)による腫瘍細胞の浸潤能制御の可能性が明らかとなった。また、新たな血中バイオマーカーの可能性として血中で発現が上昇しているmicroRNA(miR-4530, -4294, -4534)を同定した。

研究成果の概要(英文)：Depend on recent advances in molecular pathology of human glioma, more accurate analysis is required for novel therapies. We established more precise genetic analysis by HRM and more simple evaluation method based on gene expression. The correlation between the gene expression type and microRNA(miR-9, -10b) indicated the relevance of microRNA for the mesenchymal-proneural transition. Furthermore analysis of secretory microRNA has revealed the potential role of secretory microRNA(miR-127, -145, -31) for glioms invasion. In addition, based on the expression of serum (plasma) microRNA, we identified potential novel biomarkers(miR-4530, -4294, -4534) for glioma patients.

研究分野：Neurooncology

キーワード：glioma exosome microRNA 分子病理学 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍、特にグリオーマにおける分子病理学の進歩に伴い、その分子遺伝学的背景が明らかになりつつある。我々は、摘出標本の遺伝子解析に加え、「脳腫瘍幹細胞」「microRNA(miRNA)」に着目した研究を継続してきた。

グリオーマの治療抵抗性の機序解明を目的に腫瘍幹細胞に注目した様々な研究が進められている。腫瘍幹細胞の治療抵抗性、幹細胞能維持には、腫瘍幹細胞をとりまく微小環境(ニッチ)が重要な役割を果たしていることが示唆されているが、未だその形成機序、生物学的機能は不明な点が多い。エクソソームは新たな細胞間情報伝達機構として注目されており、腫瘍幹細胞由来のエクソソームが、腫瘍形質転換、血管新生、浸潤(播種)、免疫系制御を介し、腫瘍形成に最適な微小環境形成に関与していることが推測される。腫瘍制御において腫瘍幹細胞能とともに、微小環境形成能を破綻することが重要であり、その為には脳腫瘍幹細胞と微小環境形成細胞の新たな細胞間伝達機構となり得るエクソソームの機能解明が今後重大な課題となる。エクソソームは豊富な miRNA を含有するが、近年、分泌型 miRNA はエクソソーム内のみではなく、特異的蛋白と結合し生体内で安定して存在していることも明らかとなった。本研究ではエクソソームとあわせ分泌型 miRNA にも注目し、研究を進める。エクソソーム内分子は新たな分子マーカー、治療標的となる可能性があり、臨床的意義も極めて高い研究である。

2. 研究の目的

本研究は、グリオーマの分子遺伝学的背景をより詳細に解析し、腫瘍細胞由来のエクソソームに含有される miRNA の腫瘍形成における分子生物学的役割を解明することを目的とする。腫瘍形成能を有する腫瘍幹細胞に由来するエクソソームの腫瘍形成における形

質転換、浸潤への関与、さらには微小環境形成と幹細胞能維持に対する分子生物学的機能を解明し、新たな診断・治療法開発を目指した研究である。

3. 研究の方法

(1)脳腫瘍サンプルの採取、培養

九州大学および関連施設で摘出術が行なわれたグリオーマサンプルの凍結標本および血液サンプルの蓄積を継続した。さらに九州大学でおこなわれた悪性神経膠腫に対しは、幹細胞培養により腫瘍幹細胞を分離する。miRNA 抽出には、mirVana Isolation KIT を用いて miRNA を含有する total RNA を抽出する。

(2)脳腫瘍サンプルの分子病理学的解析

グリオーマ症例に対し、従来のマイクロサテライトマーカーを用いた loss of heterozygosity(LOH)解析に加え、新規グリオーマ関連遺伝子 IDH1/2、BRAF、H3F3A、TERT 遺伝子に対し、direct sequencing 法を用いた解析を行なった。さらに臨床上有用性の高い、簡便な解析法の確立を目指して、新たに high resolution melting (HRM)法を導入し、その精度の検証をおこなった。また、遺伝子発現解析に基づく分類の確立を目指し、proneural-mesenchymal 遺伝子の発現解析をおこない、評価法を検討した。

(3)腫瘍由来エクソソーム、分泌 miRNA の回収

細胞培養液上清、血清、血漿よりエクソソーム、分泌型 miRNA を回収する。エクソソーム分離法には超遠心法、Kit(Exoquick)を用いてエクソソームを回収し、最適な回収方法を再度検証した。miRNA 発現プロファイルを比較検討し、グリオーマ細胞由来 miRNA 同定が可能か検討する。

(4)新規バイオマーカーとしての有用性の検討

エクソソーム内の miRNA 発現を解析することにより、腫瘍細胞における発現変動を同定す

ることが可能か検討する。同定されたバイオマーカー候補に関しては、臨床症例においても、臨床経過と併せ再評価する。さらに分泌型 miRNA を分離し、TaqMan 法、LNA 法、網羅的解析により miRNA 発現の評価を行う。

(5)miRNA の分子生物学的機能解析と分泌型 miRNA による機能制御

腫瘍細胞由来エクソソーム、分泌型 miRNA を培養液中に投与することで腫瘍細胞の増殖、細胞死、浸潤能に変化をもたらすことができるかを検討する。また、投与前後の miRNA、mRNA 発現プロファイルの変化を検討し、分化した腫瘍細胞に形質転換をきたすことが可能か検討する。

脳腫瘍幹細胞と培養上清の発現プロファイルを基に、腫瘍幹細胞内における miRNA 発現制御がエクソソーム、分泌型 miRNA に及ぼす影響を検討する。miRNA に関しては inhibitor、mimic を用いた発現制御により分泌型 miRNA の発現制御が可能か検討する。

(6)分泌miRNA発現制御による腫瘍形成能制御の検討

腫瘍形成能に関与する miRNA の mimic を用いて過剰発現させた細胞から分泌されるエクソソーム、分泌型 miRNA を回収し、グリオーマ細胞を培養し、その機能制御が可能か検討する。さらに共培養により腫瘍形成能を制御しうるかを検討する。

4. 研究成果

(1)脳腫瘍サンプルの採取、培養

当研究期間(2013/4-2016/3)において九州大学脳神経外科および関連施設にて 191 例のグリオーマ症例から抽出腫瘍サンプルおよび血液サンプルを収集した。

悪性神経膠腫、特に膠芽腫に対しては、通常の培養と併せ幹細胞培養の 2 系統での培養を継続した。2 例の長期継代幹細胞を樹立した。18 匹のマウス移植モデル作成に着手した。脳腫瘍細胞株 U87 では腫瘍形成がみられたが、樹立した幹細胞では腫瘍形成がみられな

った。

(2)脳腫瘍サンプルの分子病理学的解析：

新規遺伝子に対する HRM 法を用いた解析法の開発：グリオーマ症例を中心に従来のマイクロサテライトマーカーを用いた LOH 解析に加え、新たな解析法 high resolution melting (HRM)法を導入し、新規グリオーマ関連遺伝子 IDH1/2、BRAF、H3F3A 遺伝子変異に対する簡便かつ高精度な解析法を確立した(図 1)。

TERT プロモーター変異に関しては direct sequencing を用いた解析を行なった。BRAF 遺伝子、H3F3A 遺伝子に関しては、さらに 333 例のグリオーマ症例に対し、後方視的に解析を加え、pilocytic astrocytoma 4/27 例、pleomorphic astrocytoma 2/3 例、ganglioglioma 4/8 例、DNT 1/6 例、GBM 2/122 例に BRAF 変異を認めた。H3F3A 変異は、小児、若年膠芽腫に優位に変異を認めた。

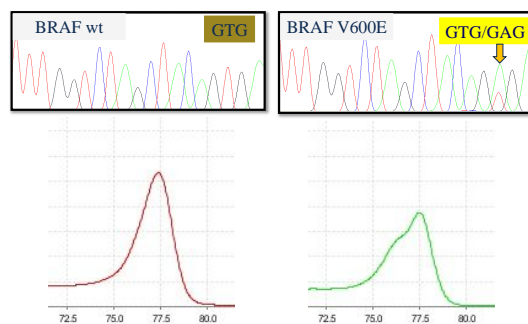


図 1: BRAF sequencing と HRM 比較

Mesenchymal, Proneural marker 遺伝子発現解析：グリオーマ 133 例(grade II: 14 例, grade III: 18 例, grade IV: 101 例)に対し、proneural (BCAN, DLL3, OLIG2, NCAM1, NKX2-2, ASCL1)、mesenchymal (YKL40, VIM, CD44, TRADD, RELB, PDPN)の 12 遺伝子発現解析を行い、その平均発現の差をもって proneural type、mesenchymal type、その他に分類し、グレード悪性化にともない mesenchymal type が優位になることが明らかとなった(図 2)。さらに、Histone demethylase (KDM 1A, 2B, 4C, 5A, 6A, 6B)、Histone deacetylase (HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9)を解析した。その結果、KDM1A は

proneural marker との相関があり、HDAC7 は mesenchymal marker と相関を認めた。

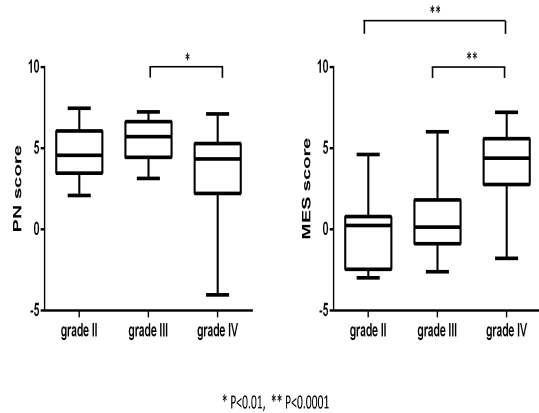


図 2 : グレードと proneural/mesenchymal marker 発現の相関

(3)腫瘍由来エクソソーム、分泌 miRNA の回収

グリオーマ細胞培養液およびグリオーマ症例血清 / 血漿よりエクソソームの分離をおこなった。エクソソーム分離に関しては、超遠心法および Kit(Exoquick)を用いたが、同等の回収が可能であった。

分泌型 microRNA の分離、解析：培養細胞、動物モデル、臨床症例より、分泌型 microRNA の解析を開始した。動物モデルでは、心房穿刺による全血採取後、全血清またはエクソソーム分離後に miRNA を分離した。分泌型 miRNA を含有する血液標本を蓄積できた。新規グリオーマ症例術前の血漿または血清を採取した。血中 miRNA は、全血または Exo-QUICK で抽出したエクソソームを対象に解析をおこなった。同時に摘出腫瘍サンプルの発現解析も同様におこなった。

(4)新規バイオマーカーとしての有用性の検討

対象とした miRNA は、グリオーマにおいて有意に発現変動を認めた 7 つの miRNA (miR-21, -9, -10b, -22, -196a, -196b, -16) の解析を行った。腫瘍における高発現 miRNA が、その発現同定が可能であり、バイオマーカーとしての有用性が示唆された。(図 3)

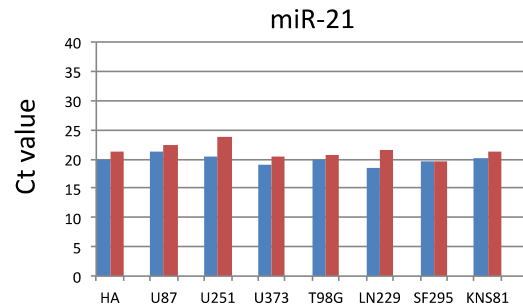


図 3 : 腫瘍細胞と分泌型 miRNA 発現の比較

分子病理学的背景を加味し、5 例の血漿と 3 例の髄液より、エクソソームを分離し、分泌型 miRNA を抽出し、東レ 3D-Gene miRNA Olig chip を用いた網羅的発現解析を行った。正常血漿と比較し発現が上昇しており、髄液中でもその上昇が同定できる miRNA (miR-4530, -4294, -4534) を選定した。蓄積した症例数に対する TaqMan 法を用いた再評価の為、TaqMan プローブを作成した。

(5)miRNA の分子生物学的機能解析と分泌型 miRNA による機能制御

miRNA の形質転換への関与：脳腫瘍における重要な microRNA (miR-9, -10b, -22) の発現解析を追加し、mi-9, 10b 発現が mesenchymal type で有意に低下していた。miRNA が形質転換に関与する可能性が示唆された。遺伝子解析に基づく遺伝子型と microRNA 発現の相関が明らかとなりつつある。

miRNA の浸潤能への関与：miRNA 発現制御による腫瘍形成制御を目的に、浸潤能に着目し、invitro での研究を継続した。miR-127, -145, -31 の過剰発現により、浸潤能が有意に低下することが明らかになった(図 4)

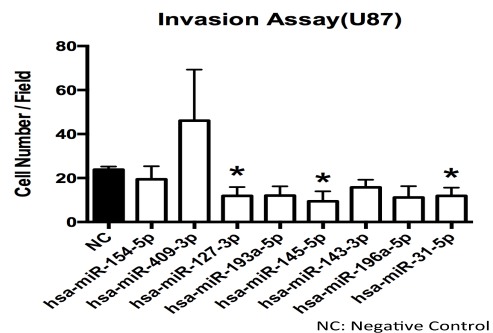


図 4 : miRNA による腫瘍浸潤能制御

(6)分泌型miRNA発現制御による腫瘍形成能制御の検討

エクソソーム内のmiRNAの機能を解明することを目的に、*in vitro*で浸潤能に關与することが明らかとなったmiRNAのmimicをもちいて過剰発現させた細胞と腫瘍細胞(U87)を共培養することにより、分泌型miRNAによりU87の浸潤能を制御できる可能性が示唆された。

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2件)

Detection of proneural/mesenchymal marker expression in glioblastoma: temporospatial dynamics and association with chromatin-modifying gene expression. Murata H, Yoshimoto K, Hatae R, Akagi Y, Mizoguchi M, Hata N, Kuga D, Nakamizo A, Amano T, Sayama T, Iihara K.

J Neurooncol, 査読有、125(1)、2015、pp33-41、DOI: 10.1007/s11060-015-1886-y

分子病理学に基づくグリオーマ分類

溝口昌弘

脳神経外科ジャーナル、査読有、24(6)、2015、pp366-377、

DOI: <http://doi.org/10.7887/jcns.24.366>

[学会発表](計16件)

溝口昌弘、吉本幸司、村田秀樹、波多江龍亮、赤木洋次郎、天野敏之、飯原弘二

第33回日本脳腫瘍病理学会

シンポジウム グリオーマの病理と分子解析

グリオーマ診断における分子病理学の役割、2015年5月29日、香川(高松)

溝口昌弘

日本脳神経外科学会第74回学術総会

ベバシズマブ時代における悪性神経膠腫の診断と治療、2015年10月15日、北海道(札幌)

波多江龍亮、秦暢宏、鈴木諭、赤木洋二郎、

村田秀樹、天野敏之、吉本幸司、

溝口昌弘、飯原弘二

神経膠芽腫症例における BRAF 遺伝子点突然変異解析

第33回脳腫瘍病理学会、2015年5月30日、香川(高松)

波多江龍亮、秦暢宏、赤木洋二郎、村田秀樹、空閑太亮、吉本幸司、溝口昌弘、飯原弘二

IDH/TERT 変異解析による、グリオーマの分子病理学的層別化: 255 症例の検討

第74回脳神経外科学会学術総会、2015年10月14日、北海道(札幌)

波多江龍亮、秦暢宏、赤木洋二郎、村田秀樹、空閑太亮、吉本幸司、溝口昌弘、飯原弘二

pGBM における IDH/TERT promoter/ch10 LOH の解析

第33回日本脳腫瘍学会学術集会、2015年12月7日、京都(京都)

溝口昌弘

分子病理学に基づくグリオーマ分類

第34回日本脳神経外科コンgres総会(プレナリーセッション)2014年5月17日、大阪(大阪)

溝口昌弘、吉本幸司、村田秀樹、波多江龍亮、赤木洋次郎、天野敏之、飯原弘二

分子病理学に基づく悪性神経膠腫の治療戦略

日本脳神経外科学会第73回学術総会、2014年10月9日、東京

波多江龍亮、秦暢宏、赤木洋二郎、村田秀樹、天野敏之、中溝玲、鈴木諭、吉本幸司、溝口昌弘、飯原弘二

Secondary glioblastoma 症例における免疫染色法による IDH1 遺伝子変異同定について～シーケンス法との比較～

第32回脳腫瘍病理学会、2014年5月23日、徳島(徳島)

波多江龍亮、秦暢宏、赤木洋二郎、村田秀

樹、天野敏之、吉本幸司、溝口昌弘、飯原弘二

高解像度融解曲線法(HRM)による BRAF V600E 及び H3F3A 変異解析の試み

第 73 回脳神経外科学会学術総会、2014 年 10 月 9 日、東京

波多江龍亮、秦暢宏、赤木洋二郎、村田秀樹、天野敏之、吉本幸司、溝口昌弘、飯原弘二

Glioma における BRAF 点突然変異の解析

第 32 回日本脳腫瘍学会学術集会、2014 年 11 月 30 日、千葉(浦和)

村田秀樹、波多江龍亮、赤木洋二郎、天野敏之、吉本幸司、溝口昌弘、飯原弘二

神経膠腫における proneural, mesenchymal マーカー発現とその意義

第 73 回脳神経外科学会学術総会、2014 年 10 月 9 日、東京

村田秀樹、波多江龍亮、赤木洋二郎、天野敏之、吉本幸司、溝口昌弘、飯原弘二

膠芽腫における proneural, mesenchymal マーカー発現の検出

第 32 回日本脳腫瘍学会学術集会、2014 年 11 月 30 日、千葉(浦和)

溝口昌弘、吉本幸司、村田秀樹、波多江龍亮、秦暢宏、天野敏之、中溝玲

神経膠腫における microRNA 発現解析の意義

日本脳神経外科学会第 72 回学術総会、2013/10/16、神奈川(横浜)

溝口昌弘、吉本幸司、秦暢宏、村田秀樹、波多江龍亮、天野敏之、中溝玲、鈴木論、岩城徹、佐々木富男

High grade glioma 診断における遺伝子解析の役割

第 31 回日本脳腫瘍病理学会、2013 年 5 月 25 日、東京

溝口昌弘、吉本幸司、村田秀樹、波多江龍亮、赤木洋二郎、天野敏之、中溝玲

神経膠腫における microRNA 発現異常と遺伝子異常の検討

第 31 回日本脳腫瘍学会、2013/12/8、宮崎(宮崎)

吉本幸司、村田秀樹、波多江龍亮、赤木洋二郎、天野敏之、中溝玲、溝口昌弘

膠芽腫における遺伝子発現解析の意義—膠芽腫治療に対して有用な情報を与えるか—

第 31 回日本脳腫瘍学会、2013/12/9、宮崎(宮崎)

〔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・医学(系)研究科(研究院)・研究員

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

天野 敏之 (AMANO TOSHIYUKI)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号: 70448413

中溝 玲 (NAKAMIZO AKIRA)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号: 80529800

(3) 連携研究者

なし