

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462270

研究課題名(和文) マイクロRNA解析と髄膜腫幹細胞の機能制御に基づく悪性髄膜腫の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapy for the malignant meningioma by exploration of specific gene expression

研究代表者

矢野 茂敏 (Yano, Shigetoshi)

熊本大学・その他の研究科・准教授

研究者番号：60332871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、悪性髄膜腫に対する新規治療法を確立するために、悪性髄膜腫に特有の遺伝子(マイクロRNAなど)を探索し、それを遺伝子工学的に操作することで腫瘍細胞の治療効果を検討するものである。本実験では、悪性髄膜腫で高率に発現している2つのマイクロRNA(miR488 and mrR335)が抽出され、培養細胞において増殖抑制効果を検討した。またマイクロアレイにて悪性髄膜腫に高率に発現している3つの遺伝子(ISLR, SDHAP1 and CNTNA P3)を抽出した。今後治療効果を検討する予定である。

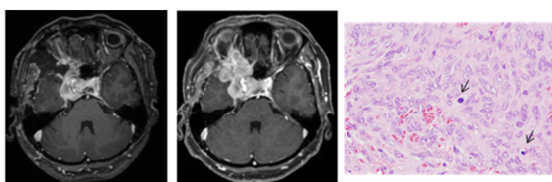
研究成果の概要(英文)：To establish a new therapy for malignant meningioma, the specific gene in malignant meningioma such as micro RNA and specific DNA were explored. Tow microRNA (miR488 and mrR335) and three DNA (ISLR, SDHAP1 and CNTNA P3) were expressed at a high rate.

研究分野：脳神経外科

キーワード：悪性髄膜腫 マイクロRNA 遺伝子発現 マイクロアレイ

## 1. 研究開始当初の背景

髄膜腫は原発性脳腫瘍うち最も多く発生する脳腫瘍であり、大部分は孤発性でゆっくり増大する良性 (WHO grade 1) の腫瘍であるが、手術で残存すると高率に再発する。一割弱の頻度で増大傾向が高い atypical (WHO grade 2) や anaplastic (WHO grade 3) types が存在する。この Grade 2, 3 の髄膜腫 (悪性髄膜腫) は十分な外科的摘出が困難であるばかりか、放射線療法を行っても再発や周辺脳組織や頭皮下に浸潤を起こすために治療困難であり (図 1)、最終的には死にいたる。現時点では生命予後を改善する有効な治療法は全くなく、新たな治療法の開発が切望されている。



腫瘍部分摘出後      ガンマナイフ治療後3カ月 摘出病理標本 矢印は核分裂像を示す

## 2. 研究の目的

本研究は、臨床サンプルを用いて悪性髄膜腫に特異的なマイクロ RNA あるいは DNA を抽出し、これを制御することにより、悪性髄膜腫に対する新たな治療法構築の基盤を作ること

## 3. 研究の方法

1) 髄膜腫臨床サンプルからマイクロ RNA array を行い良性と悪性で発現量比較  
熊本大学で保存している悪性髄膜腫と良性髄膜腫の凍結標本とパラフィン標本から年齢、性別、発生部位が一致した meningotheial meningioma (良性) と atypical or anaplastic meningioma (悪

性) をそれぞれ選出し、small RNA を抽出し、RNA array で発現量を比較した。得られた情報から悪性髄膜腫で有意に増加あるいは減少しているマイクロ RNA の群を選出した。

## 2) 悪性髄膜腫培養細胞を用いたマイクロ RNA の機能解析

- 選出したマイクロ RNA の発現検証  
悪性髄膜腫培養細胞より RNA を抽出し、RT-PCR にてターゲットとするマイクロ RNA が確実に発現しているか調べた。
- アンチセンスオリゴ DNA を投与  
発現が確認されたターゲットのマイクロ RNA に対するアンチセンスオリゴ DNA を合成し、培養悪性髄膜腫に MTT アッセイで細胞増殖率を測定した。

## 3) 悪性髄膜腫に特異的に発現している遺伝子の検索

悪性髄膜腫と良性髄膜腫の患者サンプル間で DNA アレイを行い、悪性髄膜腫に高率に発現している遺伝子を抽出した。それに対する抗体を作成し、悪性髄膜腫細胞での発現部位を比較した。

## 4. 研究成果

### 1) 悪性髄膜腫に発現しているマイクロ RNA の検索

良性髄膜腫 4 例と悪性髄膜腫 4 例の手術摘出標本より RNA を抽出し、悪性髄膜腫に特異的に発現しているマイクロ RNA のプロフィールを RNA アレイにより調べた。悪性髄膜腫で 2 倍以上発現の上昇しているマイクロ RNA は 19 種類、1/2 以下の発現であったものが 31 種類認められた。こ

のうち miR-335 と miR483 を抽出した。  
miR-335 は髄膜腫において増殖を促進する作用があることが近年報告された(1)が、我々の標本においても悪性髄膜腫で発現が有意に上昇していた。一方、miR-200a は発現抑制を行うことにより腫瘍増殖作用を示すことが報告されている(2)が、今回の解析では抽出されなかった。同時に悪性髄膜腫の培養細胞系確立を試み、2例の培養細胞系が作成され、凍結保存された。

## 2) miR-335 と miR-483 に対するアンチセンスオリゴ DNA の細胞内導入

培養悪性髄膜腫に対して miR-335 と miR-483 に対するアンチセンスオリゴ DNA を導入したが、効率が悪く、増殖抑制に至らなかった。

## 3) 悪性髄膜腫に特異的に発現している遺伝子の検索

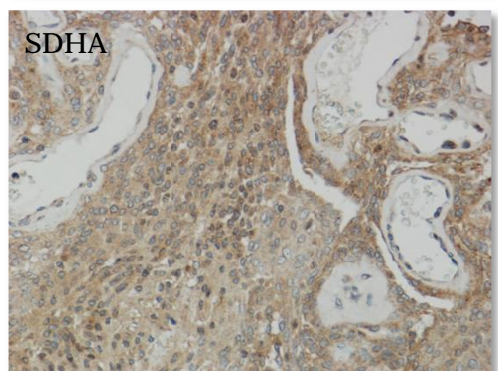
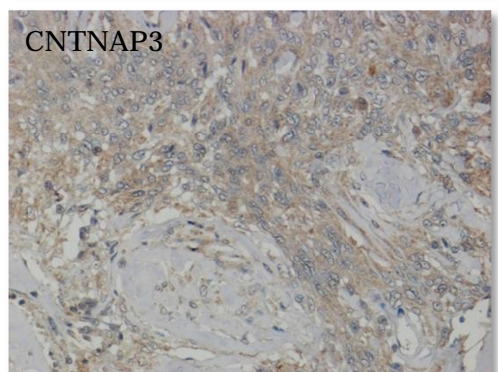
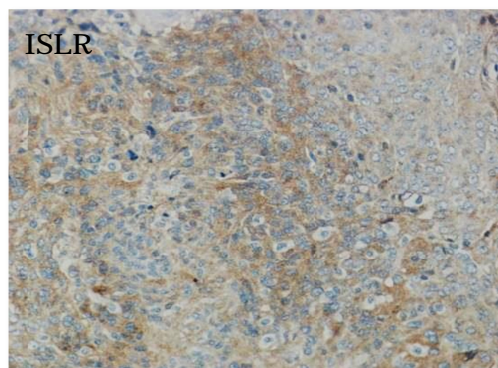
良性髄膜腫 4 例と悪性髄膜腫 4 例の手術摘出標本から RNA を精製し、マイクロアレイにより発現 DNA を比較した。悪性髄膜腫において 2 倍以上発現増加している遺伝子として、

CNTNAP3 (contactin associated protein-like 3) 4.6 倍

ISLR (immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat) 2.1 倍

SDHAP1 (succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein) 2.6 倍が抽出された。

これら 3 種類たんぱく質に対する抗体を作成し、悪性髄膜腫の組織標本を免疫染色したところ、有意な発現を確認できた。症例 8 における各タンパクの発現



## < 引用文献 >

- 1) Shi L, Jianq D, et al. miR-335 promotes cell proliferation by directly targeting Rb1 in meningiomas. *J Neurooncol* 110 (2): 155-162, 2012
- 2) Saydam O, Shen Y et al. Downregulated microRNA-200a in meningiomas promotes tumor growth by reducing E-cadherin and activating the Wnt/beta-catenin

signaling pathway. *Mon. Cell. Biol.* 29 (21): 5923-5940, 2009

## 5 . 主な発表論文

### [学術論文]

- 1) Makino K, Nakamura H, Hide T, Yano S, Kuroda J, Takahashi Y, Iyama K, Kuratsu J. Usefulness of immunohistochemical expression analysis of metabolic-related molecules in differentiating between intracranial neoplastic and non-neoplastic lesions. *Brain Tumor Pathol.* 30(3):144-50. 2013
- 2) Anai S, Hide T, Takezaki T, Kuroda J, Shinojima N, Makino K, Nakamura H, Yano S, Kuratsu J. Antitumor effect of fibrin glue containing temozolomide against malignant glioma. *Cancer Sci.* 105(5):583-91, 2014
- 3) Hide T, Yano S, Shinojima N, Kuratsu J. Usefulness of the indocyanine green fluorescence endoscope in endonasal transsphenoidal surgery. *J Neurosurg.* 122(5):1185-92, 2015
- 4) Yamamoto T, Shinojima N, Todaka T, Nishikawa S, Yano S, Kuratsu J. Meningioma in Down Syndrome. *World Neurosurg.* 84(3):866.e1-6, 2015

### [学会発表]

25th Annual North American Skull Base Society Meeting (Feb. 20-22, Tampa, Florida, USA) Shigetoshi Yano, M.D, Takuichiro Hide, M.D.,

Naoki Shinojima, M.D., Jun-ichi Kuratsu, M.D. Surgical Results of Endoscopic Skull Base Approach for Giant Pituitary Adenomas.

第 22 回日本神経内視鏡学会 (11.5-6 松島) 矢野茂敏、篠島直樹、秀 拓一郎、倉津純一 頭蓋底病変に対する複合内視鏡手術 : Two surgeon simultaneous endoscopic surgery の有用性

第 33 回日本脳腫瘍学会 (12.6-8 京都) 矢野茂敏、篠島直樹、黒田順一郎、秀 拓一郎、浜崎 禎、牧野敬史、中村英夫、倉津純一 Rapid growing meningioma の臨床像

## 6 . 研究組織

### ( 1 ) 研究代表者

矢野茂敏 ( Yano, Shigetoshi )  
熊本大学大学院生命科学研究部・准教授  
研究者番号 : 60332871

### ( 2 ) 研究分担者

倉津純一 ( Kuratsu Jun-ichi )  
熊本大学大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号 : 20145296

中村英夫 ( Nakamura Hideo )  
熊本大学医学部附属病院・講師  
研究者番号 : 30359963

秀 拓一郎 ( Hide Takuichiro )  
熊本大学医学部附属病院・助教  
研究者番号 : 40421820

牧野敬史 (Makino Keishi)  
熊本大学医学部附属病院・講師  
研究者番号： 90381011