

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861260

研究課題名(和文) 悪性脳腫瘍治療抵抗性克服の為に、microRNAと幹細胞を用いた新規治療法の開発

研究課題名(英文) Combination therapy with micro RNA and therapeutic stem cells expressing TRAIL overcomes resistant brain tumor

研究代表者

田村 郁 (Tamura, Kaoru)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70629146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：TRAIL分泌幹細胞は悪性脳腫瘍(膠芽腫)へ強い遊走能を持ち、膠芽腫治療に有効だと示されてきたが、一部の膠芽腫細胞はTRAIL分泌幹細胞に抵抗性で再発の原因となる。そこで治療抵抗性克服の為に、TRAIL抵抗性膠芽腫で発現抑制がみられるmicroRNA(=miRX)を同定した。治療抵抗性膠芽腫細胞でmiRXを過剰発現させTRAIL治療を行うと、アポトーシス誘導と増殖抑制がみられた。miRXとTRAIL分泌幹細胞による治療は、マウス脳内の治療抵抗性膠芽腫の増殖を抑制した。miRXとTRAIL分泌幹細胞による新規治療法が、膠芽腫の治療抵抗性克服に貢献できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Despite the development of new glioma therapies that allow for tumor-targeted in situ delivery of cytotoxic drugs, tumor resistance to apoptosis remains a key impediment to effective treatment. Recent evidence indicates that microRNAs, which have a central role in the regulation of gene expression, might play a fundamental role in tumorigenesis, controlling cell proliferation and apoptosis. We hypothesized that modulation of microRNA (miRX) might sensitize gliomas for cytotoxic tumor therapy. In this study, we show that the combination of miRX modulation and therapeutic stem cells expressing cytotoxic agent tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) leads to a synergistic increase in caspase activity and significantly decreased cell viability in resistant glioma in vitro and in vivo. Our findings provide the basis for developing combination therapies using microRNA modulation and therapeutic stem cells expressing cytotoxic agent.

研究分野：脳神経外科

キーワード：悪性脳腫瘍 幹細胞 microRNA

## 1. 研究開始当初の背景

近年の外科的治療、化学療法、放射線治療の目覚ましい発展にもかかわらず、依然として膠芽腫を代表とする悪性脳腫瘍の予後は悪く、膠芽腫の中間生存率は未だ 14 ヶ月である。脳機能温存に伴う外科的摘出度の制約、膠芽腫の脳内へ浸潤する性質、脳血液関門の存在などが膠芽腫の治療を困難にしている。また、膠芽腫が一度は治療に反応しても必ず再発してしまう理由は、膠芽腫の Heterogeneity にある。多くの膠芽腫細胞が治療に反応したとしても、治療抵抗性の一部の腫瘍が治療後も残存し、この治療抵抗性の腫瘍細胞が再増大してしまう。このような悪性脳腫瘍の治療抵抗性を克服する新しい治療法の開発が急務である。

iPS 細胞の発見に代表されるように、幹細胞研究が急速に進んでいる。我々のグループでは、これまでに生体内イメージング技術を用いて、マウス脳内に移植した幹細胞の動態をモニタリングし、幹細胞が膠芽腫へ向かう強い遊走能を持つことを証明してきた。幹細胞のこの性質を利用すれば、脳内に浸潤する膠芽腫細胞に抗腫瘍物質を効果的に運搬できると示唆される。TRAIL (tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand) は細胞死受容体への結合を介してアポトーシスを誘導するサイトカインで、腫瘍細胞特異的にアポトーシスを誘導するため、分子標的治療薬のひとつとして期待されている。我々のグループは遺伝子改変技術を用い、TRAIL を分泌する神経幹細胞や骨髄由来幹細胞を作成し、これら幹細胞が膠芽腫治療に有効であることをマウスモデルを使って示してきた。しかし、膠芽腫は Heterogenous な細胞集団であり、TRAIL 抵抗性を示す細胞の存在が指摘されている。

一方、ゲノム情報発現系の新たな調節・制御分子として注目されている microRNA (miRNA) は、蛋白質へは翻訳されない non-coding RNA であるが、標的分子の蛋白発現を転写後の配列特異的な RNA サイレncing によって抑制する機能性低分子 RNA である。miRNA は細胞増殖、アポトーシス、分化などの生物にとって欠かすことのできない生命現象に深く関わっており、膠芽腫においても miRNA の発現異常が報告され、腫瘍形成や悪性化との関連が指摘されている。悪性脳腫瘍の治療抵抗性に関与する miRNA を同定し、それに基づいた新規治療法の開発は、悪性脳腫瘍の予後改善に結びつく可能性がある。

## 2. 研究の目的

TRAIL 治療抵抗性を克服しうる miRNA を探索することにより、悪性脳腫瘍の治療抵抗性機序を解明することを目的とした。さらに、TRAIL を分泌する幹細胞と miRNA を用い、治療抵抗性を克服しうる新規治療法を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) TRAIL 抵抗性膠芽腫細胞で発現抑制がみられる microRNA (=miRX) の同定

TRAIL 抵抗性膠芽腫細胞と TRAIL 感受性膠芽腫細胞で過剰発現、発現抑制がみられる microRNA をスクリーニングし、TRAIL 抵抗性膠芽腫細胞で発現抑制がみられる microRNA (=miRX) を同定した。

### (2) miRX の発現制御が可能な膠芽腫細胞の作成

テトラサイクリン反応性プロモーターの下流に GFP と miRX を含むレンチウイルスベクター (LV-TetOn-miRX) を作成した。これを膠芽腫細胞に感染させることでテトラサイクリンの On/Off により miRX の発現制御が可能な膠芽腫細胞を作成した。

### (3) miRX の標的分子の同定

miRX の標的分子の同定をするため、miRX を過剰発現させた膠芽腫細胞とコントロール膠芽腫細胞でのチロシンキナーゼシグナル関連蛋白や細胞周期関連蛋白の発現を Western blotting で検討した。

### (4) TRAIL に誘導されるアポトーシスシグナルにおける miRX の役割

miRX を過剰発現させた膠芽腫細胞とコントロール膠芽腫細胞に TRAIL 分泌幹細胞の上清を作用させ、アポトーシス関連蛋白の発現を Western blotting を用いて検討した。

### (5) miRX と TRAIL 分泌幹細胞による膠芽腫の治療

膠芽腫細胞における miRX 発現制御と TRAIL 分泌幹細胞を用いる治療の効果を in vitro で検討した。

### (6) マウスグリオーマモデルを用いた miRX と TRAIL 分泌幹細胞による膠芽腫の治療効果の検討

ヌードマウスの脳内に膠芽腫を移植し、作成されたマウス脳腫瘍内に miRX を過剰発現させ、TRAIL 分泌幹細胞 (骨髄由来幹細胞) とコントロール幹細胞で治療を行った。miRX の発現制御と TRAIL 分泌幹細胞を用いる治療効果を生体内モニタリング技術を用いて検討した。

## 4. 研究成果

### (1) TRAIL 抵抗性膠芽腫細胞で発現抑制がみられる microRNA (=miRX) の同定

TRAIL 抵抗性膠芽腫細胞と TRAIL 感受性膠芽腫細胞で過剰発現 microRNA, 発現抑制 microRNA を同定した。microRNA が TRAIL 抵抗性膠芽腫で発現抑制されている場合、microRNA を量的に補うことで、「microRNA replacement therapy」として治療薬として応用可能と考えられるため、発現抑制がみられる microRNA を miRX とした。

## (2) miRXの発現制御が可能な膠芽腫細胞の作成

TRAIL 抵抗性膠芽腫における、miRX と TRAIL の相乗効果を確認するため、テトラサイクリン発現誘導系を用いて、miRNAX の発現誘導が可能な膠芽腫細胞を作成した。まずテトラサイクリン反応性プロモーターの下流に GFP と miRX を含むレンチウイルスベクター (LV-TetOn-miRX) を作成した。生体内モニタリングを行うため、TRAIL 抵抗性膠芽腫細胞である LN229 にレンチウイルスにより蛍光シフェラーゼ (Fluc) を発現させた (LN229-Fluc)。Fluc の発光と細胞数は比例関係にあるため、発光の強度で腫瘍サイズを観察することが可能である。LN229-Fluc 細胞に LV-TetOn-miRX を感染させると、テトラサイクリン存在下で miRX が過剰発現される膠芽腫細胞 (LN229-Fluc-TetOn-miRX) となった。テトラサイクリンの On/Off により、膠芽腫細胞での miRX の恒常的発現調節が可能で、miRX の有無が TRAIL アポトーシスに与える影響を調べることが容易になる。緑色蛍光蛋白である GFP もテトラサイクリン反応性プロモーターの下流に存在するので、テトラサイクリン入り培地では GFP 陽性となり、発現誘導系が機能していることを確認した。

## (3) miRX の標的分子の同定

TRAIL 抵抗性膠芽腫細胞 (LN229) に miRX を過剰発現させ、EGFR、PAK1 の発現、Akt のリン酸化を調べた。miRX を発現させた膠芽腫細胞では、EGFR、PAK1 の発現と Akt のリン酸化抑制が観察された。

## (4) TRAIL に誘導されるアポトーシスシ-ナルにおける miRX の役割

TRAIL 抵抗性膠芽腫細胞 (LN229) に miRX を過剰発現させ、TRAIL 分泌幹細胞の上清を作用させると Cleaved-Caspase8 の発現上昇、Cleaved-PARP の発現上昇がみられ、TRAIL 抵抗性膠芽腫細胞にアポトーシスが誘導されることが示唆された。

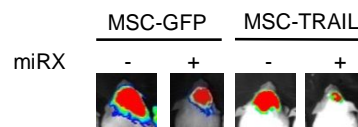
## (5) miRX と TRAIL 分泌幹細胞による膠芽腫の治療

TRAIL 抵抗性膠芽腫細胞 (LN229) に miRX を過剰発現させ、TRAIL 分泌幹細胞の上清を作用させると TRAIL 抵抗性膠芽腫細胞 (LN229) の増殖が抑制された。

## (6) マウスグリオーマモデルを用いた miRX と TRAIL 分泌幹細胞による膠芽腫の治療効果の検討

TRAIL 抵抗性膠芽腫細胞 (LN229-Fluc-TetOn-miRX) をマウス脳内に移植した。7 日後に生体内モニタリングで Fluc の発光を確認することにより、脳腫瘍の生着を確認後、テトラサイクリン入り飲料水の投与を開始し、膠芽腫で miRX を過剰発現

させた。miRX の発現誘導は病理組織切片における GFP の発現で確認した。テトラサイクリン飲料水投与後に TRAIL 分泌幹細胞 (MSC-TRAIL) またはコントロール幹細胞 (MSC-GFP) をマウス脳内に移植し、マウス脳腫瘍の大きさを Fluc の発光を計測することにより、経時的に観察した。マウス脳内の LN229 膠芽腫は TRAIL 分泌幹細胞による治療に抵抗性であったが、miRX 過剰発現群では、TRAIL 分泌幹細胞による治療で腫瘍の縮小が観察された (図)。



(図) miRX と TRAIL 分泌幹細胞による膠芽腫増殖抑制

治療後 7 日目のマウス脳内膠芽腫 (LN229 Fluc-TetOn-miRX) の大きさを Fluc の発光により計測した。miRX と TRAIL 分泌幹細胞による治療群では、マウス脳内膠芽腫の縮小が観察された。

以上より miRX と TRAIL 分泌幹細胞による新規治療法は、悪性脳腫瘍の治療抵抗性を克服する新規治療法となりうる可能性が示された。

## 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 6 件)

1. Choi SH\*, Tamura K\*, Rajiv Kumar Khajuria R, Bhere D, Nesterenko I, Jack Lawler J, Shah K: Anti-angiogenic variant of TSP-1 targets TRAIL-resistant brain tumor cells. \*Choi SH and Tamura K contributed equally to this work. Mol Ther. 23(2):235-43 2015. doi:10.1038/mt.2014.214 (査読あり)
2. Duebgen M, Martinez-Quintanilla J, Tamura K, Hingtgen S, Redjal N, Wakimoto H, Shah K: Stem cells loaded with multimechanistic oncolytic herpes simplex virus variants for brain tumor therapy. J Natl Cancer Inst 106:dju090, 2014. doi:10.1093/jnci/dju090 (査読あり)
3. Tamura K, Aoyagi M: CD133-positive stem cells. Response. J Neurosurg 120:1012, 2014 (査読なし)
4. Tamura K, Aoyagi M: Stem cells and the origin of different glioma subtypes. Response. J Neurosurg 120:1010-1011, 2014 (査読なし)

5. Tamura K, Wakimoto H, Agarwal AS, Rabkin SD, Bhere D, Martuza RL, Kuroda T, Kasmieh R, Shah K: Multimechanistic tumor targeted oncolytic virus overcomes resistance in Brain tumors. *Molecular Therapy*. 21(1): 68-77, 2013. doi: 10.1007/s10384-012-0130-y (査読あり)
6. Tamura K, Aoyagi M, Ando N, Ogishima T, Wakimoto H, Yamamoto M, Ohno K: Expansion of CD133-positive glioma cells in recurrent de novo glioblastomas after radiation and chemotherapy. *Journal of Neurosurgery*. 119: 1145-1155, 2013. doi: 10.3171/2013.7.JNS122417 (査読あり)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Tamura K., Inaji M., Nariai T., Tamaki M., Hirai S., Saigusa K., Tanaka Y., Maehara T.: Monitoring of biological response to bevacizumab in malignant glioma patients based on L-[methyl-11C] methionine-positron emission tomography. 19<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Society for Neuro-Oncology, November 13-16, 2014, Miami, Florida, USA
2. 田村 郁, 稲次基希, 成相 直, 玉置正史, 平井作京, 三枝邦康, 田中洋次, 前原健寿. Malignant glioma における Bevacizumab の抗腫瘍効果の Methionin-PET による検討. 2014年10月9-11日 第73回日本脳神経外科学会総会 東京
3. Thamamongood Thiparpa, 田村 郁, 稲次基希, 前原 健寿. Effect of TMZ combined with radiation therapy in elderly with GBM. 2014年10月9-11日 第73回日本脳神経外科学会総会 東京
4. タンマモングッド ティブアーパー, 田村 郁, 小林大輔, 稲次基希, 前原健寿. 当院における高齢者グリオブラストーマの治療成績. 2014年8月10日 第47回 ニューロ・オンコロジーの会 東京
5. 田村 郁, 青柳 傑, 安藤登, 荻島 隆浩, 脇本浩明, 山本昌昭, 大野喜久郎, 前原健寿: 放射線治療後の悪性神経膠腫における腫瘍血管障害と腫瘍幹細胞の増殖 2013年12月8日-10日 第31回日本脳腫瘍学会学術集会 宮崎
6. Tamura K, Aoyagi M, Ando N, Ogishima T, Yamamoto M, Ohno K, Maehara T: Tumor vascular damage and glioma stem-like cell expansion after radiotherapy in malignant gliomas, 4<sup>th</sup> Quadrennial meeting of the World Federation of Neuro-Oncology Meeting and the 18<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Society for Neuro-Oncology, San

- Francisco, USA, November 21-24, 2013
7. 川並麗奈, 田村 郁, 小林大輔, 河野能久, 稲次基希, 田中洋次, 成相直, 前原健寿 テモダール導入後の膠芽腫の予後とMGMTの発現についての検討 2013年10月15-17日 第72回日本脳神経外科学会総会 横浜

〔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:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

田村 郁 (TAMURA, Kaoru )  
東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 1000070629146

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: