

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293324

研究課題名(和文) 薬剤耐性遺伝子に関するmicroRNAを用いた悪性脳腫瘍に対する分子治療の研究

研究課題名(英文) Molecular therapy for malignant brain tumors using microRNAs of drug-resistant genes

研究代表者

田宮 隆 (Tamiya, Takashi)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：50252953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,900,000円

研究成果の概要(和文)：今回我々は、microRNAと薬剤耐性遺伝子との関係に着目し、脳腫瘍の治療薬であるTMZに対する薬剤耐性遺伝子であるMGMTの発現量に関わるmicroRNAを同定し、その治療効果への影響および内因性のMGMT発現調節機能として薬剤耐性に関わる重要性を調べた。さらに、近年、膵がんや乳がんにおいて、(pro) renin receptor ((P)RR) 発現の上昇によるWnt receptor complexを介したprogenitor cellからのがん化が報告されている。神経膠腫において、(P)RRが発現し悪性化に伴い亢進していることを明らかとし、分子治療の標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is well known that O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) is related to resistance of aggressive brain tumor glioblastoma (GBM) to DNA alkylating agent Temozolomide (TMZ) therapy. In this study, we searched for microRNA that modulate MGMT expression and give better sensitivity to TMZ. One out of 6 microRNAs (miR-655) down regulated more than 40% MGMT mRNA and protein level in both T98G glioma cell line and primary GBM cell line (GBM30). We will also show that microRNA expressing GBM30 transplanted in nude mice showed better survival with injection of TMZ in vivo. Thus, this endogenous mechanism of suppressing drug resistance gene MGMT will increase chemo-sensitivity to TMZ. This study will provide a new target to enhance efficacy of chemotherapy. In addition, The (pro) renin receptor ((P)RR) as a modular within Wnt receptor complex is essential for early CNS development by the activation of Wnt/  $\beta$ -catenin signaling pathway. Then we examined the role of (P)RR in gliomas.

研究分野：脳神経外科

キーワード：薬剤耐性遺伝子 MGMT MicroRNA 脳腫瘍

## 1. 研究開始当初の背景

神経膠芽腫は原発性脳腫瘍の約 10% を占め、全悪性腫瘍の中でもっとも予後の悪い腫瘍の一つであり、その一年生存率は約 55% である (Neurologia medico-chirurgica Vol. 49 (2009), Supplement)。境界不明瞭なため、手術で全摘出することは不可能で、化学療法や放射線治療も有効でなく、必ず再発する。2006 年に日本で適応開始したテモゾロマイド (TMZ) は、歴史上初めて神経膠芽腫の平均生存期間を、有意差を持って延長した薬剤であるが、それでもそれまでの 12 カ月から 14 カ月に延長した程度であり、早急な薬剤感受性の向上するための追加療法の開発が望まれている (Stupp, N Engl J Med. 2005)。

MicroRNA は平均 22 塩基対程度の短い Non-coding RNA で mRNA の主に 3' -UTR と相補的に結合することで、その翻訳抑制に関わる。すでに数千におよぶ microRNA が同定されているが、一つの microRNA は複数の mRNA をターゲットとしており、逆に一つの mRNA もまた複数の microRNA によってターゲットとされている。このことから、microRNA はほぼすべての mRNA への干渉を行っており、あらゆる蛋白質の内因性発現調節機構として働いている。近年においては発生段階からの細胞極性決定への関与や腫瘍発生への関わりも指摘されており、細胞の運命付けに重要な役割を果たしていることが報告されている (Croce, PNAS, 2006)。

当教室においては、薬剤耐性遺伝子 (MDR1, MRP1, MRP2, MRP3, MRP5, ABCG2, MGMT, Topo など) に注目し研究を行ってきた (Cancer Res 57:5086-92, 1997, Cancer Res 59:8-13, 1999, Genes Chromosomes Cancer 27:110-6, 2000, Jpn J Cancer Res, 92:778-84, 2001, Jpn J Cancer Res. 2001 Sep; 92 (9):968-74, Jpn J Cancer Res 92:1133-7, 2001, Brain Tumor Pathol 21:57-61, 2004、以後研究業績参照)。また、臨床においても患者一人一人の薬剤耐性遺伝子発現プロファイリングを行い、その患者に応じた有効な化学療法の選択および不応薬剤の不使用による副作用の軽減を図るテーラーメイド化学療法で高度先進医療「薬剤耐性遺伝子検索による悪性脳腫瘍の化学療法」を承認されており、以前より薬剤耐性遺伝子に関するノウハウを蓄積している。これらの臨床データから、薬剤耐性の発現を抑制させることが、治療抵抗性を変化させ、予後の改善に繋がる可能性が示唆された。

さらに、近年、膵がんや乳がんにおいて、(pro) renin receptor ((P)RR) 発現の上昇による Wnt receptor complex を介した progenitor cell からのがん化が報告されている。神経膠腫において、Wnt/  $\beta$ -catenin signaling pathway を介した (P)RR の発現とその役割について検討した。

## 2. 研究の目的

以上のような背景から、microRNA と薬剤耐性遺伝子との関係に着目し、脳腫瘍の治療薬である TMZ に対する薬剤耐性遺伝子である MGMT の発現量に関わる microRNA を同定し、その治療効果への影響および内因性の MGMT 発現調節機能として薬剤耐性に関わる重要性を調べる。悪性神経膠腫 (脳腫瘍) の治療薬であるテモゾロマイドに対する薬剤耐性遺伝子 MGMT を標的とする microRNA を同定し、microRNA の関与する脳腫瘍の薬剤耐性取得機構を明らかにする。また、microRNA が mRNA に対し翻訳抑制する性質を利用して、MGMT 発現量を抑制し、唯一、神経膠芽腫患者の生存期間を延長した化学療法であるテモゾロマイドの更なる感受性向上をめざす。さらに血清中の microRNA (循環 microRNA) を測定することにより、非侵襲的に術前よりテモゾロマイドに対する感受性を予測する方法を確立し、感受性に応じて必要最小限な腫瘍摘出を可能にし、侵襲的手術による合併症を可及的に防ぐ方法を開発する。

そして、できるだけ効果的な薬剤耐性を抑制する microRNA の同定と抗腫瘍効果を発揮させる治療法の組み合わせを検討する。これらの研究により将来の悪性脳腫瘍に対するテーラーメイド治療に繋がる新しい molecular therapy を開発する。MGMT 以外の薬剤耐性遺伝子に対して制御をおこなう microRNA はすでにほぼすべて報告されていることから、神経膠芽腫に対して唯一の生存期間を延長させるアルキル化剤のテモゾロマイドに対する薬剤耐性遺伝子のコントロールは社会的にみて非常に重要で喫緊の課題であり、大きな貢献が期待できる。

また、細胞の癌化や増殖に関係している新たな物質として (pro) renin receptor ((P)RR) についてもグリオーマで検討を行っており、新しい分子標的治療として期待ができると考えている。

## 3. 研究の方法

### (1) MGMT を抑制しうる microRNA 候補の絞り込み

まずは種々のデータベースより予想された MGMT の 3' -UTR に対する相補性をもつ microRNA を割り出す。以前に同定した microRNA を用いて、既存の細胞株や患者より得た細胞を含む、種々の脳腫瘍培養細胞にリポフェクション法を用いて強制発現し、Taqman probe を用いて qPCR で RNA レベル、Western blot を用いて蛋白レベルにおいて実際にどの細胞に対しても MGMT に対する発現抑制効果があることを確認する。

### (2) MicroRNA による細胞への影響

次に、選定された microRNA の細胞への性質変化の影響を調べるため、microRNA を遺伝子導入により強制発現させ、増殖能・遊走能・アポトーシスなどへの影響について調べる。増殖能は ATP assay や Alamar blue アッセイ

などのメタボリックアッセイ、遊走能は、Matrigel を用いた Sphere invasion assay、アポトーシスは AnnexinV 標識抗体を用いた FACS など様々な手法を用いて多角的に分析する。

### (3) MicroRNA の MGMT mRNA 3'-UTR への直接結合の確認

MicroRNA と MGMT mRNA が直接結合していることを確認するため、MGMT mRNA 3'-UTR の microRNA 結合部位を変異させた MGMT 発現ベクター (mutMGMT) を用い、結合部位を変異させると microRNA により発現抑制されないことをウエスタンブロット法にて示す。

### (4) MicroRNA による脳腫瘍細胞の TMZ 感受性向上の確認

これまでの研究結果より microRNA の細胞への影響を踏まえたうえで、リポフェクションを用いた一過性の microRNA 過剰発現細胞を用い、MGMT の発現抑制された状態で、実際に TMZ の感受性が向上しているかを *in vitro* にて検討する。ポジティブコントロールとして、MGMT の mRNA に対する siRNA を用いる。

### (5) *In vivo* における TMZ 感受性向上の確認

*In vitro* において microRNA の MGMT 発現抑制効果を確認できたなら、レンチウイルスを用いて microRNA が長期安定的に強制発現している株化患者細胞を樹立し、microRNA が発現上昇していることを確認し、MGMT の mRNA の発現が抑制されていることを RNA レベルおよびタンパクレベルで確認する。以上を確認された細胞株を用いて、免疫不全マウス (Athmic nude) の脳内に定位装置を用いて移植する。この脳腫瘍モデルに PBS を腹腔内投与したコントロール群においては、microRNA がホストマウスの生存期間に悪影響を及ぼさないことを確認しつつ、TMZ 腹腔内投与群においては *in vivo* においても microRNA が TMZ 感受性を向上させ、ホストマウスの生存期間延長を来すことを確認する。感受性の確認方法としては、Kaplan-Meier 法を用いた生存期間の比較や、一定期間ごとの脳組織切片を用いた体積比較をする。

### (6) プロレニン受容体 (pRR) について

また、研究機関中に薬剤耐性候補としてあがった pRR について、(pro) renin receptor ((P)RR) に関しては、knockdown あるいは microRNA を用いて、Wnt/ -catenin signaling pathway の発現を低下させ、増殖抑制効果やテモゾロマイドに対する感受性の増加などの検討を行った。

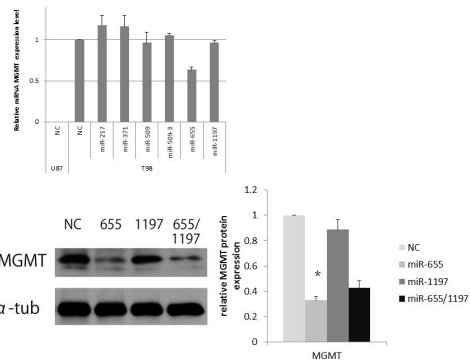
## 4. 研究成果

### (1) MGMT を抑制しうる microRNA 候補の絞り込み

Table 1

miRNA	conserved sites			poorly conserved sites			Total Context score	Aggregate P <sub>CT</sub>
	Total	8mer	7mer-m8	Total	8mer	7mer-1A		
miR-1197	1	0	1	0	0	0	0	<0.1
miR-655	0	0	0	1	1	0	0	<0.1
miR-371-5p	0	0	0	1	0	1	0	<0.1
miR-217	0	0	0	1	0	0	1	<0.1
miR-509-5p/509-3-5p	0	0	0	1	0	0	1	<0.1

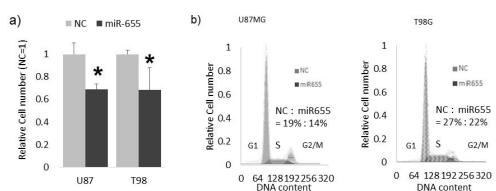
Figure 1



Target scan ver 5.2 より得られた、MGMT の mRNA 3'-UTR をターゲットと推定される microRNA の 6 候補 (Table1) を、内因性に MGMT が発現するグリオーマ細胞株 T98G にそれぞれの microRNA を過剰発現させ、実際に mRNA レベルで MGMT が抑制されるか確認したところ、一つの microRNA (miR-655) が MGMT の mRNA を 6 割程度に発現抑制していた (Figure1 上段)。さらに miR-655 および miR-1197 をそれぞれ過剰発現させると、蛋白レベルでも MGMT の発現抑制が認められた (Figure1 下段)。

### (2) MicroRNA による細胞への影響

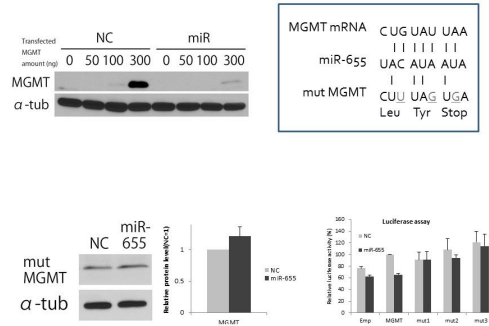
Figure 2



ATPassay 法により、miR-655 が細胞増殖に与える影響を調べたところ、miR-655 は U87MG や T98G などのグリオーマ細胞株に対して、細胞増殖抑制に働くことがわかった (Figure2 左)。また、その一因としてフローサイトメトリーを用いた細胞周期解析では、細胞分裂が阻害されていることがわかった (Figure2 右)。

### (3) MicroRNA の MGMT mRNA 3'-UTR への直接結合の確認

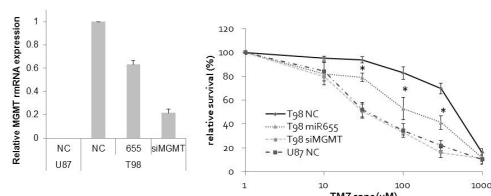
Figure 3



内因性に MGMT を発現しない細胞株 U87MG に、miR-655 を過剰発現させると、スクランブル microRNA を過剰発現させた NC(ネガティブコントロール)に比べ、MGMT 蛋白は発現量依存的に抑制された(Figure3 上段左)。また、MGMT mRNA 3' -UTR の microRNA 結合部位を変異させた MGMT 発現ベクター(mutMGMT)を用い(Figure3 上段右)結合部位を変異させると miR-655 により MGMT 蛋白の発現は抑制されなかった(Figure3 下段左)。また、レポーターアッセイでも同様の結果を確認し、MGMT の mRNA と miR-655 は直接結合していることを確認した(Figure3 下段右)。

(4) MicroRNA による脳腫瘍細胞の TMZ 感受性向上の確認

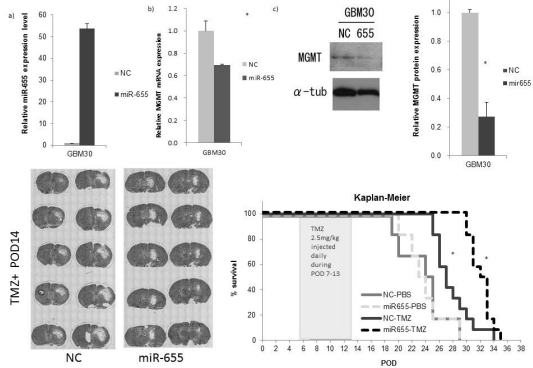
Figure 4



内因性に MGMT を発現する細胞株 T98G に miR-655 を過剰発現させると、TMZ に対する感受性が濃度依存性に亢進した。ポジティブコントロールとして MGMT の mRNA に対する siRNA を過剰発現させた細胞株は、MGMT をほとんど発現しない細胞株 U87MG と同等の TMZ に対する感受性を示したことから、TMZ の感受性は、MGMT の発現量に依存していることがわかった(Figure4)。

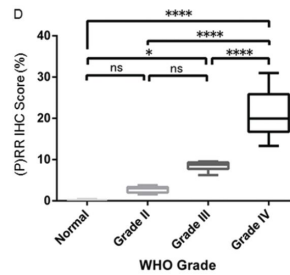
(5) In vivo における TMZ 感受性向上の確認

Figure 5

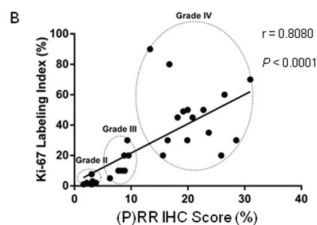


レンチウイルスを用いて miR-655 が長期安定的に強制発現している株化グリオーマ患者細胞(GBM30)を樹立し、miR-655 が発現上昇していることと、MGMT の mRNA の発現が抑制されていることを RNA レベルおよびタンパクレベルで確認した(Figure5 a,b,c)。この GBM30 を免疫不全マウス(Athmic nude)の脳内に定位装置を用いて移植し、この脳腫瘍モデルを用い、PBS を腹腔内投与したコントロール群においては、miR-655 がホストマウスの生存期間に悪影響を及ぼさないことを確認しつつ(Figure5, NC-PBS v.s. miR655-PBS)、TMZ 腹腔内投与群においては in vivo においても miR-655 が TMZ 感受性を向上させ、Kaplan-Meier 法によるホストマウスの生存期間延長を来した(Figure5, NC-TMZ v.s. miR655-TMZ)。また移植後 2 週間後の脳組織切片で腫瘍体積の比較をしたところ、TMZ を投与した miR-655 発現群では NC 群と比較して、明らかに腫瘍径の増大抑制を認めた。

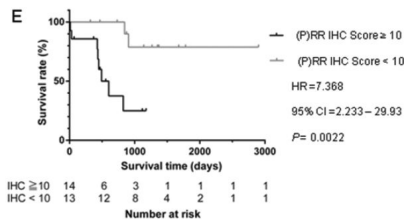
(6) 新規ターゲットのプロレニン受容体について



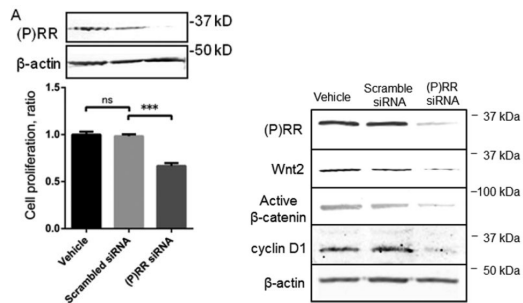
組織における(P)RR の発現量を IHCscore として算出したところ、Grade II~IV の glioma で(P)RR が発現しており、悪性化に伴い(P)RR 発現が亢進した。



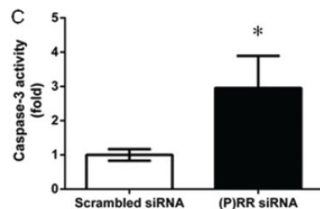
(P)RR 発現量は腫瘍細胞の Ki-67 labeling index と正の相関を示した。



(P)RR 発現量の多い患者群は有意に生存期間が短かった。



(P)RR は Wnt/β-catenin signaling pathway を介して細胞増殖に関与し、knockdown することで、Wnt/β-catenin signaling pathway の発現を低下させ、細胞増殖を抑制した。



また、ノックダウンにより、アポトーシスを誘導した。

## 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 10 件)

(Pro)renin receptor is crucial for glioma development via the Wnt/β-catenin signaling pathway. Kochi M, Shibayama Y, Ogawa D, Miyake K, Nishiyama A, Tamiya T, J Neurosurg (in Press) 査読有

Data on amyloid precursor protein accumulation, spontaneous physical activity, and motor learning after traumatic brain injury in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Kishimoto Y, Shishido H, Sawanishi M, Toyota Y, Ueno M, Kubota T, Kirino Y, Tamiya T, Kawai N. Data Brief. 2016 Aug 26;9:62-7. doi: 10.1016/j.dib.2016.08.041. eCollection 2016 Dec. PMID: 27656663 査読有

Traumatic brain injury accelerates amyloid-β deposition and impairs spatial learning in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Shishido H, Kishimoto Y, Kawai N, Toyota Y, Ueno M, Kubota T, Kirino Y, Tamiya T. Neurosci Lett. 2016 Aug 26;629:62-7. doi:

10.1016/j.neulet.2016.06.066. Epub 2016 Jun 29. PMID: 27373531 査読有

d-Allose Attenuates Overexpression of Inflammatory Cytokines after Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Gerbil. Shinohara N, Nakamura T, Abe Y, Hifumi T, Kawakita K, Shinomiya A, Tamiya T, Tokuda M, Keep RF, Yamamoto T, Kuroda Y. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2016 Sep;25(9):2184-8. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.01.030. Epub 2016 Jun 21. PMID: 27342700 査読有

Usefulness of positron emission tomographic studies for gliomas. Miyake K, Ogawa D, Okada M, Hatakeyama T, Tamiya T. Neurol Med Chir (Tokyo). 2016 Jul 15;56(7):396-408. doi: 10.2176/nmc.ra.2015-0305. Epub 2016 May 31. PMID: 27250577 査読有

Histopathological investigation of glioblastomas resected under bevacizumab treatment. Tamura R, Tanaka T, Miyake K, Tabei Y, Ohara K, Sampetean O, Kono M, Mizutani K, Yamamoto Y, Murayama Y, Tamiya T, Yoshida K, Sasaki H. Oncotarget. 2016 May 17. doi: 10.18632/oncotarget.9387. [Epub ahead of print] PMID: 27244880 査読有

Expression of 58-kD Microspherule Protein (MSP58) is Highly Correlated with PET Imaging of Tumor Malignancy and Cell Proliferation in Glioma Patients. Lin W, Dai SH, Chen T, Kawai N, Miyake K, Okada M, Haba R, Yamamoto Y, Tamiya T, Fei Z. Cell Physiol Biochem. 2016;38(2):635-45. doi: 10.1159/000438656. Epub 2016 Feb 8. MID: 26849376 査読有

Glucose-based regulation of miR-451/AMPK signaling depends on the OCT1 transcription factor. Ansari KI, Ogawa D, Rooj AK, Lawler SE, Krichevsky AM, Johnson MD, Chiocca EA, Bronisz A, Godlewski J. Cell Rep. 12;11(6):902-9. 2015 査読有

Comparison of 4'-[methyl-(11)C]thiothymidine ((11)C-4DST) and 3'-deoxy-3'-[(18)F]fluorothymidine ((18)F-FLT) PET/CT in human brain glioma imaging. Toyota Y, Miyake K, Kawai N, Hatakeyama T, Yamamoto Y, Toyohara J, Nishiyama Y, Tamiya T. EJNMMI Res. 5:7. 2015 査読有

Correlation between <sup>18</sup>F-fluoromisonidazole PET and expression of HIF-1α and VEGF in newly diagnosed and recurrent malignant gliomas. Kawai N, Lin W, Cao WD, Ogawa D, Miyake K, Haba R, Maeda Y, Yamamoto Y, Nishiyama Y, Tamiya T. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 41(10):1870-8, 2014 査読有

[学会発表](計 17 件)

2014 CNS annual meeting, 2014, 10, 20, (Boston, USA) PET studies findings correlate with multi-drug resistant genes in the human gliomas. Tamiya T, Miyake K, Ogawa D, Okada

M, Kawai N

The 4th International CNS Germ Cell Tumor Symposium, (2015. 4, Tokyo)  
Usefulness of 11C-methionine positron emission tomography for detection of germinoma in central nervous system

Miyake K, Kouchi M, Ogawa D, Okada M, Hatakeyama T, Kawai N, Tamiya T

20th Annual Scientific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology (2015. 11, San Antonio, Texas, USA)

Response assessment of bevacizumab for malignant gliomas by using 11C-Methionine and 18F-Fluoromisonidazole PET tracers

Miyake K, Kouchi M, Ogawa D, Okada M, Hatakeyama T, Shinomiya A, Tamiya T

Neuroendocrine carcinoma in the brain  
Okada M, Kanda T, Ogawa D, Hatakeyama T, Shinomiya A, Miyake K, Tamiya T

MicroRNA Targeting MGMT Prolongs Prognosis with GBM in vivo

Ogawa D, Okada M, Miyake M, Tamiya T, EA Chiocca, Jakub Godlewski

21st International Conference on Brain Tumor and Research and Therapy (2016. 4. Okinawa)

Expression of multidrug resistant genes in the human glioblastomas

Tamiya T, Miyake K, Okada M, Ogawa D

The 7th Academic Congress of International Chinese Neurosurgical Science(2016. 5, Tianjin)  
Usefulness of PET studies for the Management of Human Gliomas

Miyake K, Kochi M, Ogawa D, Okada M, Hatakeyama T, Shinomiya A, Tamiya T

13<sup>th</sup> Asian Society for Neuro-Oncology (ASNO) Meeting (2016. 9, Sydney, Australia)

PET studies findings correlate with multi-drug resistant genes in the human gliomas

Tamiya T, Miyake K, Shinomiya A, Okada M, Ogawa D

Glioma cells adapt metabolic stress by regulating mir-451 expression

Ogawa D, Matsumoto A, Kochi M, Okada M, Miyake K, Tamiya T, Chiocca EA, Godlewski J

2016 SNO Annual Meeting - Society for Neuro-Oncology (2016. 11, Scottsdale, AZ, USA)

Response assessment of bevacizumab therapy for glioblastoma treatment by using 11C-methionine, 18F-fluorothymidine and

18F-fluoromisonidazole PET tracers. Miyake K, Kochi M, Ogawa D, Okada M, Hatakeyama T, Shinomiya A, Tamiya T

Neutrophil to lymphocyte count ratio in elderly patients with glioblastoma

Okada M, Ogawa D, Hatakeyama T, Shinomiya A, Miyake K, Tamiya T.

第 33 回日本脳腫瘍病理学会 2015.5  
香川

MicroRNA がグリオーマの遊走能および糖代謝に与える病理学的な影響についての検討

小川大輔, 三宅啓介, 田宮 隆, EA Chiocca, Jakub Godlewski

(社)日本脳神経外科学会第 74 回学術総会 2015.10. 札幌

MicroRNA がグリオーマに与える影響の in vivo における検討

小川大輔, 岡田真樹, 三宅啓介, 田宮 隆, EA Chiocca, Jakub Godlewski

第 33 回日本脳腫瘍学会学術集会 2015.12 京都

MicroRNA がグリオーマに与える影響の in vivo における検討

小川大輔, 岡田真樹, 三宅啓介, 田宮 隆  
神経膠腫における Wnt $\beta$ -catenin を介した

(pro) renin receptor の発現と役割

河内雅章, 柴山弓季, 小川大輔, 三宅 啓介, 西山 成, 田宮 隆

第 17 回日本分子脳神経外科学会 2016.8 東京

神経膠腫における Wnt $\beta$ -catenin を介した (pro) renin receptor の発現と役割

河内雅章, 柴山弓季, 小川大輔, 三宅啓介, 西山 成, 田宮 隆

社団法人日本脳神経外科学会第 75 回学術総会 2016. 9 博多

神経膠腫における Wnt $\beta$ -catenin を介した (pro) renin receptor の発現と役割

河内雅章, 柴山弓季, 小川大輔, 三宅啓介, 西山 成, 田宮 隆

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kms.ac.jp/~neuron/index.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

田宮 隆 (TAMIYA TAKASHI)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：50252953

### (2)研究分担者

三宅 啓介 (MIYAKE KEISUKE)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：40294756

岡田 真樹 (OKADA MASAKI)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40457346

小川 大輔 (OGAWA DAISUKE)

香川大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：70524057