



MicroRNA-183 upregulates HIF-1 α by targeting isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) in glioma cells

Tanaka, Hirotomo

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2013-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第5912号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005912>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



学位論文の内容要旨

MicroRNA-183 upregulates HIF-1 α by targeting isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) in glioma cells

悪性グリオーマにおける IDH2 および HIF-1 α 発現とマイクロ RNA による発現制御

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
外科系講座 脳神経外科学分野
田中 宏知

(指導教員：甲村 英二 教授)

序論：

マイクロ RNA (microRNA) は、低分子量のノンコーディング RNA であり、遺伝子発現を制御して細胞増殖、細胞死、分化および代謝に寄与している。

IDH (Isocitrate dehydrogenase) は、クエン酸回路内で酸化的脱炭酸反応によるイソクエン酸から α -ケトグルタル酸への反応を触媒している。IDH には 1 ~3 のサブタイプがあり、IDH1 は細胞質およびペルオキシソームに存在するのに対して IDH2, 3 はミトコンドリア内に存在する。ヒトの癌で変異していることが知られているのは IDH1, 2 のみで、これらはグリオーマや急性骨髓性白血病などのがんで変異の報告がある。

我々は以前に、microRNA のマイクロアレイ解析によって、グリオblastoma では microRNA-10b, 21, 183, 92b, 106b が正常脳組織と比べて高発現していることを報告した。miR-183 は IDH2 mRNA の 3' 非翻訳領域 (3' UTR) に相補的な配列を有するとされているため、IDH2 と miR-183 の関連性を臨床標本ならびに培養細胞を用いて検索した。

対象および方法：

腫瘍組織と腫瘍周囲脳組織での IDH2, miR-183 の発現を比較するため、6 症例のグリオblastoma 症例において同一患者の膠芽腫組織と腫瘍周囲脳組織を術中に採取しリアルタイム PCR を用いてそれぞれの発現を比較検討した。また、グリオーマ 88 例 (glioblastoma: 53 例、anaplastic astrocytoma: 14 例、anaplastic oligodendrogloma: 3 例、diffuse astrocytoma: 10 例、oligodendrogloma: 5 例、pilocytic astrocytoma: 3 例) および腫瘍周囲脳組織 6 例を用いて、腫瘍における microRNA の相対的発現量をリアルタイム PCR を用いて比較検討した。さらに、悪性グリオーマ 43 例および腫瘍周囲脳組織 5 例を用いて、腫瘍における IDH2 mRNA の相対的発現量をリアルタイム PCR を用いて比較検討した。

グリオーマ細胞 (U251, U87MG, T98G, A172, SF126) およびヒト星状細胞の細胞株 (SVGP12) に対して、miR-183 mimic を細胞内に導入し、IDH2, HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α) の mRNA 量および蛋白量の変化を検討した。さらに、IDH2 3' UTR をプラスミドに組み込んだルシフェラーゼレポーターアッセイにて、IDH2 と miR-183 の関係を検討した。

結果：

6 症例のグリオblastomaにおいて、腫瘍組織と腫瘍周囲脳組織を用いて miR-183 の発現を比較したところ、全ての症例において腫瘍組織で miR-183 の発現が高かった。また、グリオーマ 88 例の解析でも腫瘍周囲組織と比べて腫瘍

組織で miR-183 発現が亢進しており、さらに low-grade glioma (grade I-II) と high-grade glioma (grade III-IV) で比較すると、後者で有意に miR-183 発現が亢進していた。また、グリオーマ細胞とヒト星状細胞の細胞株で miR-183 の発現を解析すると、A172, SF126, T98G, SVGp12 では、腫瘍周囲組織と比べて miR-183 の発現は亢進していた。

miR-183 は IDH2 3' UTR に相補的な配列を有する。グリオーマ細胞株での IDH2 mRNA の発現を調べるために、リアルタイム PCR を行ったところ、A172, SF126, T98G, U87MG, U251 でそれぞれ腫瘍周囲脳の 0.27, 0.45, 1.07, 1.6, 1.83 倍の IDH2 mRNA 発現を認めた。U251, U87MG, T98G, SF126, SVGp12 では、miR-183 導入により IDH2 mRNA の発現は有意に低下した。また、U87MG, T98G, A172 で、miR-183 導入による IDH2 蛋白の発現低下を認めた。さらに、U251, T98G, A172, SF126 に anti-miR-183 inhibitor を導入することにより、IDH2 mRNA の発現亢進を認めた。

野生型 IDH2 3' UTR または変異型 IDH2 3' UTR を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドを作成し、ルシフェラーゼアッセイを行った。U251, U87MG, A172, T98G, SF126 では、miR-183 を導入することにより、野生型 IDH2 3' UTR が組み込まれたプラスミドを導入した場合の方が、変異型 IDH2 3' UTR が組み込まれたプラスミドを導入した場合よりもルシフェラーゼ活性は有意に抑制された。また、同 5 種類の細胞株に miR-183 inhibitor を導入すると、野生型 IDH2 3' UTR が組み込まれたプラスミドを導入した場合の方が、変異型 IDH2 3' UTR を組み込まれたプラスミドを導入した場合よりもルシフェラーゼ活性は有意に増加した。

次に、グリオーマ患者における IDH2 の発現について検討した。上述のグリオプラストーマ 6 症例において、それぞれの腫瘍組織と腫瘍周囲脳組織で IDH2 の発現をリアルタイム PCR で解析したところ、全例で IDH2 の発現は腫瘍周囲組織よりも腫瘍組織で低下していた。また、悪性グリオーマ 43 症例と腫瘍周囲組織 5 例でリアルタイム PCR により IDH2 発現を調べたところ、腫瘍周囲組織と比べて悪性グリオーマで有意に IDH2 発現は低下していた。さらに、グリオプラストーマ 4 症例において、腫瘍組織と腫瘍周囲組織の IDH2 蛋白をウエスタンプロットティングにより比較したところ、4 症例全てで腫瘍組織の方が IDH2 発現は少なかった。

IDH2 はイソクエン酸を α -ケトグルタル酸 (α -KG) へ変換する機能を有する。 α -KG は prolyl hydroxylases (PHDs) の基質であり、PHDs は HIF-1 α の発現を抑制するとされている。そのため我々は、miR-183 の HIF-1 α 発現に与える影響を調べるために、グリオーマ細胞株に miR-183 を導入し、HIF-1 α 発現の変化を解析した。U87MG, T98G, A172 に miR-183 を導入したところ、コントロ

ールに比べて HIF-1 α 蛋白は増加した。次に、IDH2 を抑制することによる HIF-1 α 発現の変化をみるために、同 3 種類の細胞株に IDH2 に対する siRNA を導入してウエスタンプロットティングを行い HIF-1 α の発現を解析したところ、3 種類全ての細胞で IDH2 siRNA 導入による HIF-1 α の発現亢進を認めた。miR-183 の HIF-1 α に対する影響を mRNA レベルでも確認するため、同細胞に miR-183 を導入して HIF-1 α の発現をみたところ、3 種類全ての細胞で miR-183 による HIF-1 α 発現の亢進を認めた。さらに、T98G, A172 に対して miR-183 を導入してリアルタイム PCR を行い、シグナル伝達経路で HIF-1 α の下流にある vascular endothelial growth factor (VEGF), glucose transporter 1 (GLUT1) の発現を解析したところ、miR-183 導入により VEGF, GLUT1 の発現は共に増加した。以上より、グリオーマ細胞では、miR-183 を高発現させることにより IDH2 発現抑制を介して HIF-1 α 発現が亢進することが示された。

考察：

我々は、悪性グリオーマの大多数で miR-183 が高発現しており、IDH2 は発現が低下していることを発見し、細胞株を用いた実験において、miR-183 の発現を亢進させることによって TCA サイクル内のミトコンドリア酵素の 1 つである IDH2 が抑制されること、さらに miR-183 の発現亢進により HIF-1 α は mRNA および蛋白レベルで発現が亢進することを示した。miR-183 が HIF-1 α を高発現させるということは、miR-183 がグリオーマの発生または増殖に関与している可能性を強く示唆した。

また、グリオーマ細胞株を用いてルシフェラーゼアッセイを行うことにより、グリオーマにおける miR-183 と IDH2 の直接的な関係が証明されたが、ヒト星状細胞の細胞株での実験においても miR-183 は IDH2 を抑制したため、この関係は腫瘍に特異的なものではないと考えられた。

リアルタイム PCR により、miR-183 の発現亢進によって HIF-1 α およびその下流にある VEGF および GLUT1 の発現が亢進することも示しており、これらの経路を通じて miR-183 はグリオーマの代謝や血管新生に関与していることが示された。ただし、miR-183 が HIF-1 α mRNA の発現をどのような機序で亢進させるかについてはさらなる解析が必要である。

結語：

悪性グリオーマでは IDH2 の発現が低下し、HIF-1 α の発現は亢進している。その機序として、microRNA-183 による発現制御が関与している可能性が示唆された。

神戸大学大学院医学(系)研究科 (博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2358 号	氏名	田中 宏知
論文題目	悪性グリオーマにおける IDH2 および HIF-1 α 発現とマイクロ RNA による発現制御		
Title of Dissertation	MicroRNA-183 upregulates HIF-1 α by targeting isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) in glioma cells		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner	南 博信	
	副査 Vice-examiner	寺鳥 俊雄	
	副査 Vice-examiner	井上 伸一	

(要旨は 1,000 字~2,000 字程度)

クエン酸回路内でイソクエン酸から α -ケトグルタル酸への反応を触媒する IDH (Isocitrate dehydrogenase) には 1~3 のサブタイプがあり、Glioblastoma (GBM) や急性骨髓性白血病などでは IDH1, 2 が変異していることが知られている。GBM で発現が亢進していることが知られている microRNA-183 (miR-183) は IDH2 mRNA の 3' 非翻訳領域 (3' UTR) に相補的な配列を有するとされており、本研究では IDH2 と miR-183 の関連を臨床検体および細胞株を用いて検討した。

【方法】

6 例の GBM 患者において腫瘍組織と腫瘍周囲脳組織での IDH2, miR-183 の発現をリアルタイム PCR を用いて比較した。また、GBM53 例を含むグリオーマ 88 例の腫瘍における microRNA の相対的発現量を 6 例の腫瘍周囲脳組織と比較した。さらに、悪性グリオーマ 43 例および腫瘍周囲脳組織 5 例を用いて、腫瘍における IDH2 mRNA の相対的発現量を比較した。

グリオーマ細胞株 (U251, U87MG, T98G, A172, SF126) およびヒト星状細胞株 (SVGP12) に対して、miR-183 mimic を細胞内に導入し、IDH2, HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α) の mRNA 量および蛋白量の変化を検討した。さらに、IDH2 3'UTR をプラスミドに組み込んだルシフェラーゼレポーターアッセイにて、IDH2 と miR-183 の関係を検討した。

【結果】

GBM 6 例の全ての腫瘍組織で腫瘍周囲脳組織より miR-183 の発現が亢進していた。グリオーマ患者 88 例でも腫瘍組織で亢進しており、さらに low-grade glioma (grade I-II) より high-grade glioma (grade III-IV) で高発現であった。細胞株においても腫瘍周囲組織より亢進していた。

miR-183 は IDH2 の 3' UTR に相補的な配列を有する。miR-183 の導入によりグリオーマ細胞株において IDH2 mRNA および蛋白の発現が有意に低下した。さらに、anti-miR-183 inhibitor を導入すると IDH2 mRNA の発現が亢進した。野生型 IDH2 3' UTR または変異型 IDH2 3' UTR を組み込んだルシフェラーゼアッセイでは、各種細胞株に miR-183 を導入することにより、野生型 IDH2 3' UTR では変異型 IDH2 3' UTR よりも有意に抑制された。また、これらの細胞株に miR-183 inhibitor を導入すると、野生型では変異型よりも活性は有意に増加した。

GBM 6 例すべてで腫瘍周囲組織よりも腫瘍組織で IDH2 の mRNA および蛋白の発現は低下していた。IDH2 はイソクエン酸を α -ケトグルタル酸 (α -KG) へ変換し、 α -KG は prolyl hydroxylases (PHDs) の基質であり、PHDs は HIF-1 α の発現を抑制する。そこでグリオーマ細胞株に miR-183 を導入し HIF-1 α 発現を解析したところ、HIF-1 α 蛋白は増加した。次に、これらの細胞に IDH2 に対する siRNA を導入して IDH2 を抑制したところ、HIF-1 α の発現が亢進した。同様に miR-183 の導入により全ての細胞で HIF-1 α の発現が亢進した。さらに、miR-183 を導入してリアルタイム PCR により HIF-1 α の下流にある vascular endothelial growth factor (VEGF), glucose transporter 1 (GLUT1) の発現を解析したところ、VEGF, GLUT1 の発現は共に増加した。以上より、グリオーマ細胞では、miR-183 を高発現させることにより IDH2 発現抑制を介して HIF-1 α 発現が亢進することが示された。

【考察】

悪性グリオーマの大多数で miR-183 の発現が亢進し IDH2 の発現は低下していることが明らかとなった。細胞株を用いた実験において、miR-183 の発現亢進により IDH2 が抑制され、さらに HIF-1 α は mRNA および蛋白レベルで発現が亢進することが示された。これは miR-183 がグリオーマの発生または増殖に関与していることを示唆する。

また、グリオーマ細胞株を用いたルシフェラーゼアッセイにより、miR-183 と IDH2 の直接的な関係が示されたが、ヒト星状細胞株でも miR-183 は IDH2 を抑制したため、これは腫瘍に特異的なものではないと考えられた。

miR-183 の発現亢進により HIF-1 α およびその下流にある VEGF および GLUT1 の発現が亢進することも示され、これらの経路を通じて miR-183 はグリオーマの代謝や血管新生に関与していることが示された。ただし、miR-183 が HIF-1 α mRNA の発現をどのような機序で亢進させるかについてはさらなる解析が必要である。

【結論】

悪性グリオーマでは IDH2 の発現が低下し、HIF-1 α の発現は亢進している。その機序として、miR-183 による発現制御が関与している可能性が示唆された。本研究は、グリオーマの発癌機序を考える上で示唆に富む発見をした価値ある業績であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。