Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-07-06

MicroRNA regulating stanniocalcin-1 is a metastasis and dissemination promoting factor in glioblastoma

Sakata, Junichi

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2019-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第7543号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007543

※ 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。

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

MicroRNA regulating stanniocalcin-1 is a metastasis and dissemination promoting factor in glioblastoma

マイクロ RNA によって制御される Stanniocalcin-1 は膠芽腫の転移や播種を促進する因子である

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
脳神経外科学
（指導教員：甲村 英二　教授）

坂田　純一

【背景】

膠芽腫（glioblastoma multiforme; GBM）の頭蓋外転移は極めてまれであるが、頭蓋内・脊髄転移あるいは転移性播種はしばしばみられる。そして、転移・播種を起こした GBM の予後は極めて不良であり、それ故、転移・播種の抑制が GBM に対する重要な治療戦略となる。

転移・播種の過程は、1）組織からの detachment、2）転移・播種部での細胞外マトリックスへの付着、3）細胞外マトリックスの分解、4）組織内への invasion と migration であり、転移・播種の因子としては他に細胞増殖や抗アポトーシス、血管新生なども重要である。IL-6, IL-8, CD44, MMP-2/-9 など、いくつかのサイトカインやプロテアーゼが神経膠腫において転移・播種を促進することが報告されており、GBM の頭蓋内播種は抗血管内皮増殖因子（VEGF）治療後に頻繁に見られることが知られているが、GBM の他部位への転移・播種の病因は不明である。

microRNA（miR）は small non-coding RNA で、mRNA 3'非翻訳領域の相補的配列を認識してその標的 mRNA と結合し、標的 mRNA を不安定化し、翻訳の制御、タンパク質合成を阻害する。miR は広範囲のターゲットを有し、癌の進行・悪性化に関わる多くの経路を調節している。GBM においてもいくつかの miR が異常な発現パターンを示すことが報告されており、我々の研究室でも以前よりグリオーマにおける miR の異常や悪性化の機能について研究を行ってきた。具体的には、GBM において高発現している miR-10b が invasion を促進すること、また、miR-183 がイソクエン酸脱水素酵素 2 （IDH2） の発現を調節して、グリオーマ細胞の HIF1A、VEGF の発現を亢進させることを報告している。本研究の目的は、GBM において miR により制御される転移・播種促進因子を同定することである。

【対象と方法】

まず、GBM における転移・播種を制御する miR を同定するために、GBM において浸潤、血管新生、増殖を調整することが過去に報告されている 23 個の miR を選択した（Supplemental Figure 2 参照）。miR のターゲット検索は、バイオインフォマティクス web サイト miRanda（http://www.microrna.org/microrna/home.do）を用いて検索した。

2007 年 1 月から 2013 年 7 月の間に当院と他施設（金沢大学、大阪大学、大阪国際がんセンター）で治療および追跡された初発 GBM 患者を対象とした。延髄・脊髄に転移あるいは播種を起こした群（M/D(+)群）およびそれを起こさなかった群（M/D(-)群）の 2 群に分け解析を行った。延髄あるいは脊髄への転移・播種の有無は治療経過中に撮影した造影 MRI T1 強調画像で判断した。ほとんどの患者で GBM の標準的な治療（放射線治療 60Gy＋テモゾロミド）がなされ、外来フォローアップは 1～2 ヶ月間隔で行い、MRI は少なくとも 3~4 ヶ月ごとに実施された。

腫瘍組織中の miR 発現量および mRNA 発現量の解析は、初発時に手術摘出した組織の残余検体を使用し、免疫組織学的解析も初発時の腫瘍組織検体を用いた。

培養細胞を用いた実験は、U87, A172 グリオーマ細胞を用いて、miR mimic, miR inhibitor, siRNA の導入には HiPerFect Transfection Reagent （QIAGEN）を用いた。組織内 miR 発現量および mRNA 発現量の測定は、TaqMan® Gene Expression assays をもちいて real-time RT-PCR にて測定した。細胞増殖実験は WST アッセイを用いて、浸潤能や運動能の解析は matrigel/transwell invasion（migration） assay あるいは wound healing assay を用いて、細胞周期の解析には FACS calibur を用いたフローサイトメトリー解析で施行した。

髄液に関する分析には当院で 2010 年 1 月から 2017 年 12 月に初発 GBM と診断・治療された患者のうち、術前に診断目的で採取した髄液の残余検体が保存されていたものを使用した。生存解析では、手術日から死亡日までを生存期間とし、Kaplan-Meier 法を用いて M/D(+)群と M/D(−)群を比較し、Log-rank テストを用いて検定した。また、The Cancer Genome Atlas （TCGA）のデータ（http://www.cbioportal.org/）を用いて播種因子が予後因子となるかどうかも検討した。

【結果】

転移・播種を伴う GBM 22 例（M/D(+)群）および転移・播種のない GBM 53 例（M/D(−)群）を用いて、23 個の miR の発現量を real-time PCR で解析したところ、8 個の miR （miR-7, miR-29b, miR-34a, miR-101, miR-124, miR-128a, miR-137, miR-218）が転移・播種例で有意に減少していた。

そこで、バイオインフォマティクス web サイト（miRanda）を用いて、これら 8 個の miR の組み合わせに対する最も可能性の高い標的遺伝子を検索すると stanniocalcin-1（STC1）が抽出できた。STC1 は分泌型蛋白で、カルシウムとリンの恒常性を調整している。STC1 は乳がんや卵巣癌などいくつかの癌で高発現し、腫瘍の増殖と転移に関係があることが報告されている。そしてその 8 個のうち 4 個の miR（miR-29b, miR-34a, miR-101, miR-137）は STC1 の mRNA に結合部位を有することが予測された。

リアルタイム RT-PCR 分析によって、これら 4 個の miR mimic により STC1 の mRNA 発現抑制が確認できた。反対に、miR-29b, miR-34a, miR-101 の inhibitor により、STC1 の mRNA 発現量は上昇した。STC1 は分泌蛋白であるため、GBM 細胞の培養液中の STC1 濃度を ELISA で測定すると、時間経過とともに増加がみられたが、miR-29b, miR-34a, miR-101, miR-137 の mimic は培養液中の STC1 濃度を減少させた。一方で、miR inhibitor では miR-29b と miR-34a のみ STC1 の増加を見なかったが、これは U87 細胞中に miR-101 および miR-137 の発現がもともと低いためと考えられた。この結果より、これら 4 個の miR の組み合わせが GBM 細胞における STC1 発現レベルを調整していることが確認できた。

次に、U87 細胞を用いて migration assay および invasion assay を行った。siRNA で STC1 をノックダウンした U87 細胞では、STC1 をノックダウンしなかったコントロールと比較し、migration および invasion を有意に減少させた。

前述の 76 例の GBM について、real-time RT-PCR を用いて転移・播種を伴う GBM と転移・播種を伴わない GBM との間で STC1 の mRNA 発現量を比較した。結果は、転移・播種を伴う GBM では転移・播種を伴わない GBM に比べ STC1 mRNA 発現量が有意に高いことが示された。免疫組織染色においては、転移・播種を伴う GBM の多くが、腫瘍細胞中に STC1 の強発現がみられた。一方で、腫瘍周囲組織においては STC1 蛋白の発現レベルはすべてにおいて低かった。これらの結果より、STC1 が GBM における転移・播種を促進する分子の一つであることが示唆される。

SCT1 は分泌型糖蛋白であるため、様々なグレードの神経膠腫患者において治療前の髄液中の STC1 濃度を測定したところ、低悪性度神経膠腫患者と比較して高悪性度神経膠腫患者では髄液中の STC1 濃度が有意に高いことが分かった。さらに、GBM の中でも、転移・播種を起こした GBM は起こしていない GBM と比較すると髄液中 STC1 レベルは有意に高かった。つまり、STC1 は高悪性度神経膠腫、特に転移・播種を伴う GBM において高値であることが示唆される。したがって、STC1 は GBM の転移・播種に関する有用なバイオマーカーとなる可能性がある。

最後に、GBM 患者を STC1 発現量の中央値によって 2 群（高発現群、低発現群）に分けて、Kaplan-Meier 法で STC1 mRNA 発現レベルと予後との関連を分析したところ、STC1 の高発現群では全生存期間が有意に短かった。The Cancer Genome Atlas （TCGA） においても、STC1 高発現群は有意に生存期間が短かった。

【考察】

転移・播種を伴う GBM の予後は極めて不良であり、これらの患者に対する確立された治療はない。本研究では、延髄あるいは脊髄への転移・播種を認めた 23 例の GBM 患者に対し、GBM に関与するとされる 23 個の miR の発現レベルを分析した。転移・播種のない GBM53 例と比較したところ、転移・播種のある GBM では 8 個の miR で有意な減少が見られた。miR により制御される GBM の転移に関する報告はあるが、その制御のメカニズムの報告例はない。

STC1 は bony fish（硬骨魚）で最初に発見された分泌型糖蛋白ホルモンで、カルシウムとリンの恒常性を調節している。ヒトにおいてホルモン作用はほとんどなく、多くの組織で発現しているものの、その機能は良く分かっていない。STC1 の発現は低酸素状態で増加し、Hypoxia inducible factor-1（HIF-1）により STC1 は活性化される。また、癌細胞において STC1 は、cyclin E1/cyclin- dependent kinase 2 を介して細胞増殖を促進する。また、STC1 は PI3K/Akt および JNK シグナル経路の活性化

を介して転移を促進していることが報告されているが、STC1 による転移のメカニズムについてはほとんど知られていない。

我々は STC1 の発現が miR-29b, miR-34a, miR-101, miR-137 により抑制されることを示した。STC1 が miR によって制御されていることを報告したものは殆どなく、マウスの細胞で STC1 が miR-101b のターゲットであることを報告しているのみである。我々は、STC1 の発現量が正常脳組織と比較し、GBM 細胞において高いことを見出した。Su らは、STC1 の mRNA およびタンパク量が低悪性度神経膠腫よりも高悪性度神経膠腫で有意に高く、STC1 が高発現している症例では予後が不良であることを示しており、我々の結果も同様であった。また、TCGA データベースより STC1 が予後不良因子となっていることも確認できた。

髄液中 STC1 濃度を分析した報告は本研究が初めてであり、高悪性度神経膠腫の髄液中 STC1 濃度は低悪性度神経膠腫のものよりも高いこと、さらには、転移・播種を伴う GBM の髄液中の STC1 濃度は、転移・播種を伴わない GBM よりも有意に高いことが示された。これらの結果を纏めると、GBM 細胞自体が STC1 を分泌し、オートクライン/パラクラインの経路で GBM 細胞自身に作用し、転移・播種を促進していることが示唆される。

本研究ではいくつかの limitation がある。第一に、本研究は後方視的解析でサンプル数が少ないことである。第二に、本研究で調べられたのは 23 個の miR のみであり、他の miR が GBM の転移・播種においてより重要な役割を果たしている可能性がある。3 つめに、生存分析において、GBM に対する標準治療がなされたのは 75 例中 67 例で、治療プロトコルが同一ではなかったことが挙げられる。最後に、STC1 の過剰発現システムによる転移・播種の細胞、動物実験ができなかったことである。今後、過剰発現系を用いて、STC1 の転移・播種のメカニズムを明らかにしたいと考えている。

【結論】

GBM において STC1 が複数の miR により制御される新規の転移・播種促進因子である可能性が示唆された。STC1 は髄液中に分泌され、オートクライン/パラクラインの経路を介して機能するため、STC1 シグナル経路の阻害が将来的に GBM の転移・播種に対する新たな治療戦略となる可能性がある。

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2887号	氏　名	坂田 純一
論文題目 Title of Dissertation	マイクロ RNA によって制御される Stanniocalcin-1 は膠芽腫の転移や播種を促進する因子である MicroRNA regulating stanniocalcin-1 is a metastasis and dissemination promoting factor in glioblastoma		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 掛地吉弘 副　査 Vice-examiner 丹生健一 副　査 Vice-examiner 勾坂敏朗		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

【背景】

転移・播種を起こした膠芽腫（GBM）の予後は極めて不良であり、転移・播種の抑制が GBM に対する重要な治療戦略となるが、GBM の他部位への転移・播種の促進因子は不明である。マイクロ RNA（miR）はメッセンジャーRNA(mRNA)と結合し、標的 mRNA の遺伝子発現を阻害する。miR は腫瘍・癌における発生、悪性化に関与しているが、膠芽腫においても特徴的な miR の発現が報告されている。本研究の目的は、GBM において転移・播種を促進する miR を同定し、その標的分子を同定することである。

【対象と方法】

GBM において浸潤、血管新生、増殖を調節することが過去に報告されている 23 種の miR を選択した。2007 年 1 月から 2013 年 7 月の間に当院と他施設（金沢大学、大阪大学、大阪国際がんセンター）で治療された初発 GBM 患者で、延髄・脊髄に転移あるいは播種を起こした 23 例（M/D(+)群）およびそれを起こさなかった 53 例（M/D(–)群）の 2 群に分け、23 種の miR の発現量を測定した。

また、GBM 培養細胞に miR の mimic, inhibitor を導入し、細胞増殖、浸潤能や運動能、細胞周期の解析を行った。また、膠芽腫の組織を用いて、同定された標的分子の mRNA 発現量を測定し、GBM 患者髄液を用いて、髄液中濃度を ELISA にて測定した。

【結果】

23 種の miR のうち、8 つの miR （miR-7, miR-29b, miR-34a, miR-101, miR-124, miR-128a, miR-137, miR-218）が転移・播種例で有意に減少しており、これらの miR の組み合わせに対する最も可能性の高い標的遺伝子として stanniocalcin-1（STC1）が予測された。そしてそのうち 4 つの miR（miR-29b, miR-34a, miR-101, miR-137）は STC1 の mRNA に結合部位を有することが予測された。

リアルタイム RT-PCR 分析によって、これら 4 つの miR mimic により STC1 の mRNA 発現抑制が確認できた。反対に、inhibitor により STC1 の mRNA 発現量は上昇した。GBM 細胞の培養液中の STC1 濃度は、時間経過とともに増加がみられたが、miR-29b, miR-34a, miR-101, miR-137 の mimic は培養液中の STC1 濃度を減少させた。この結果より、これら 4 つの miR の組み合わせが GBM 細胞における STC1 発現レベルを調整していることが確認できた。さらに、 GBM 細胞に対して siRNA で STC1 をノックダウンすると、細胞の浸潤、移動能が低下した。

前述の 76 例の GBM サンプルを用いて、STC1 の mRNA 発現量を比較した結果、転移・播種を伴う GBM では転移・播種を伴わない GBM に比べ STC1 mRNA 発現量が有意に高いことが示された。免疫組織染色においては、転移・播種を伴う GBM の多くが、腫瘍細胞中に STC1 の強発現がみられた。STC1 は分泌蛋白であるため、髄液中の STC1 濃度を

測定すると、転移・播種を伴う GBM において有意に高値であることが示された。また、STC1 が高発現している GBM は、低発現の GBM に比べて有意に生存期間が短く、予後不良であった。

【考察】

本研究では、延髄あるいは脊髄への転移・播種を認めた 23 例の GBM 患者に対し、GBM に関与するとされる 23 種の miR の発現レベルを分析した。転移・播種のない GBM53 例と比較したところ、転移・播種のある GBM では 8 つの miR で有意な減少が見られた。miR により制御される GBM の転移に関する報告はごくわずかで、複数の miR が同時に低下していることを報告したものはない。

本研究では STC1 の発現が miR-29b, miR-34a, miR-101, miR-137 により制御されることを示した。STC1 は癌の転移に関係するとの報告もあるが、STC1 の機能については未知な部分が多く、STC1 が miR によって制御されていることを報告したものも殆どない。STC1 の発現量が正常脳組織と比較し、GBM 細胞において高発現しており、更に STC1 が予後不良因子となっていることが確認できた。転移・播種を伴う GBM の髄液中の STC1 濃度は非常に高値であり、オートクライン、パラクラインの経路で GBM 細胞に作用して、転移・播種を促進している可能性が考えられた。今後、STC1 が GBM の転移・播種を促進する分子メカニズムを解析する必要がある。

【結論】

GBM において STC1 が複数の miR により制御される新規の転移・播種促進因子である可能性が示唆された。STC1 は髄液中に分泌され、オートクライン/パラクラインの経路を介して機能するため、STC1 シグナル経路の阻害が将来的に GBM の転移・播種に対する新たな治療戦略となる可能性がある。

以上、本研究は、膠芽腫において stanniocalcin-1（STC1）の発現が複数の miR により制御される新規の転移・播種促進因子であることを明らかにした。STC1 シグナル経路の阻害が将来的に膠芽腫の転移・播種に対する新たな治療戦略となる可能性があるなど重要な知見を得ており、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。