

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08943

研究課題名(和文) がん幹細胞を標的とする細菌由来の人工小胞を用いたがんの再発、転移治療法の開発

研究課題名(英文) Development of cancer stem cell specific miRNA delivery system for recurrence and metastasis from cancer by outer membrane vesicles of bacteria.

研究代表者

上田 しのぶ (Ueda, Shinobu)

東京医科大学・医学部・助手

研究者番号：00521874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：再発や転移の原因は、化学療法などにより残存したがん幹細胞が全身の臓器に休眠状態で潜伏することによる。我々はがん幹細胞の維持を抑制する microRNA(miRNA)を見出した。本研究ではがん幹細胞に特異的に結合する分子を膜上に発現させ、がん幹細胞の維持を破壊するmiRNAを内包させた人工型OMVを製作する。この人工型OMVを血中に投与することで、全身に散在しているがん幹細胞への特異的なmiRNAのデリバリーが可能となり、がん幹細胞を選択的に死滅することができると考えた。本研究では乳がん幹細胞を模倣した乳がん培養細胞(スフェア細胞)に高発現する膜タンパク質を標的とするデリバリー法の開発を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の核酸デリバリー法ではがん幹細胞への特異性は低く、その効果も少ない。近年、細菌が放出する外膜小胞(outer membrane vesicles, OMV)ががんを縮小したという報告が注目されている。OMVは遺伝子の伝搬や細胞間輸送に関与していることが明らかになっており、ドラッグデリバリーシステムへの応用が期待されている。本研究では拒絶反応や細菌由来の毒性を軽減する目的で、乳酸菌(L. acidophilus)のOMVを用いることとした。全身に散在し潜伏するがん幹細胞を標的とし、がんの根治を目指す。その結果、核酸医薬としての実用化への発展、臨床への応用が十分に期待できる。

研究成果の概要(英文)：In patients with breast cancer, primary chemotherapy often fails due to survival of chemoresistant breast cancer stem cells (BCSCs) which results in recurrence and metastasis of the tumor. Current hypotheses suggest that these recurrence and metastases arise from residual disseminated tumor cells (DTCs), which disseminate from primary lesions, undergoing an extended period of dormancy in the stroma of metastasized organs. We profiled a series of differentially expressed membrane proteins between paternal adherent breast cancer cells and BCSC-mimicking mammosphere-derived cancer cells. In the mammosphere, we found that hsa-miR-27a were downregulated and TMEM59 was specifically upregulated. These results provide us novel molecular targets for BCSCs and can be a potential therapeutic modality for breast cancer. In this study, we engineered TMEM59 binding protein extracellular vesicles that specifically delivered miR-27a to DTCs.

研究分野：核酸治療

キーワード：がん幹細胞 外膜小胞 核酸デリバリー

1. 研究開始当初の背景

わが国における乳がんの罹患率は罹患年齢の低下とともに年々増加しているが(国立がん研究センター・がん対策情報センター)、一方で早期発見法、治療法の開発が進み、生存率の高いがんであると認識されている。しかし、乳がんは5年さらには10年以上の長い期間を経て、再発、転移が起こる例が多いのも特徴の一つであり、死亡例の90%は転移に起因する。がん組織の中には化学療法や放射線治療に抵抗性であるがん幹細胞が存在し、その一部は、がんの初期段階からすでに骨髄などに散在しており(disseminated tumor cells, DTCs)、休眠状態で長期間生存した後、再び増殖を始めることで再発、転移となる。DTCsは、オートファジーを利用して休眠状態を維持しており、近年、休眠状態の維持や解除に関わる遺伝子の探索や分子メカニズムについての研究が盛んに行われている。しかし、DTCsを含む乳がん幹細胞を標的としたがんの再発および転移に対する予防法や治療法は確立に至っていない。

これまでに我々は、がん治療を目的とした核酸のデリバリー法の開発やがんを抑制する遺伝子の探索を行ってきた(Takanashi *et al*, Gene Ther, 2009)。乳がんでは、乳がん幹細胞培養法(スフェア培養)を用い、スフェア細胞のmiRNAマイクロアレイを行った結果、接着細胞と比較してhsa-miR-27aの発現が低下していることを見出した。さらにhsa-miR-27aを過剰発現させると対照群と比較してスフェアの形成能は低下し、低濃度の抗がん剤で細胞死を誘導した(Ueda, *et al*, Lab. Invest., 2020)。また、我々は、これまでにエクソソームを使ったmiRNAのデリバリー法の開発を行ってきた。エクソソームの膜表面にがん細胞に結合する分子を発現させることで、がんの増殖抑制効果が高まることを示し、治療への応用が可能であることを明らかにした(Ohno *et al*, Mol Ther, 2013)。しかし、核酸医薬は、従来の医薬品では標的にするのが困難な分子に対する切り札として期待される一方、安定性に欠けるという課題を抱えている。現在用いられているmiRNAのデリバリー法にはウイルスベクターやリポソーム、ナノ粒子などによるものがあるが、半減期が短いことや毒性が高いことから、miRNAを用いた治療法の確立には至っていない。そこで、細胞外分泌小胞(エクソソーム)を使ったmiRNAのデリバリー法を確立し、治療への応用が可能であることを明らかにした。しかし、エクソソーム/miRNAを治療に用いる場合の問題点として、(1)エクソソームは、MHC(主要組織適合遺伝子複合体)を持つため自己細胞由来である必要があること、(2)miRNAのエクソソームへの内包率が低いこと、(3)標的細胞と親和性のある分子を発現したエクソソームの作製効率が低いこと、(4)エクソソームの収率が低いこと、などが挙げられる。本研究では、細菌由来の外膜小胞(outer membrane vesicles, OMV)を用いることで(1)抗原性の回避、(2)目的のmiRNA発現ベクターの細菌への導入によるmiRNAのOMVへの内包効率の上昇、(3)OMVへの標的細胞親和性分子の発現効率の上昇、(4)細菌は増殖が早く、大量培養が容易であり、培地も安価であることから精製時間とコストの短縮、が予想され、様々な点でエクソソームを用いた場合の問題点を解決できると考える。本研究では人工型OMVを作製し、これまで困難であったがん幹細胞を特異的に標的とする乳がんの再発、転移治療法の開発を目指す。

近年、細菌が放出するOMVががんを縮小したという報告が注目されている。大腸菌(*E. coli* msbB)由来のOMVを担がんマウスの血中に投与することで、がんの増殖が抑制されたという報告があり(Kim *et al*, Nat Commun, 2017)、同様に*L. acidophilus*のOMVでも効果があることが示されている。

2. 研究の目的

我々はDTCsを含む乳がん幹細胞をターゲットとしたマイクロRNA(miRNA)のデリバリー法を開発し効率良く死滅させることで、再発や転移の治療が可能であると考えた。我々は乳がんスフェア細胞の膜蛋白質のLC-MS解析により、接着細胞と比較してヒトTransmembrane protein 59(hTMEM59)の発現が高いことを見出した。本研究では、乳酸菌(*Lactobacillus acidophilus*, *L. acidophilus*)由来のOMVに、乳がん幹細胞に高発現するhTMEM59に結合する分子を発現させ、さらに乳がん幹細胞の維持を破綻させる機能をもつhsa-miR-27aを内包した人工型OMVを作製する。この人工型OMVを血中に投与することで全身に散在している乳がん幹細胞を特異的に標的とした治療法の開発を行う。

3. 研究の方法

乳がん幹細胞に高発現する hTMEM59 に結合する分子(X)をデータベース上より選択した。まずは X をエクソソーム膜上に発現させ、さらに乳がん幹細胞の維持を破綻させる機能をもつ hsa-miR-27a を内包した人工型エクソソームを作製した。作製した人工型エクソソームの乳がんスフェア培養細胞への増殖抑制効果を検討した。

1) 乳がん幹細胞特異的膜蛋白質(hTMEM59)結合分子(X)の探索

文献及びデータベースから hTMEM59 に結合する分子(X)を探索した。

2) X を発現するエクソソームの作製

CMV プロモーター下に X 配列と GFP 配列を結合した発現ベクターを作製し、HEK293 細胞、及び WI-38 VA13 sub 2 RA (WI-38) 細胞に導入した。さらに CMV プロモーター下に X 配列と HA 配列を結合した発現ベクターを作製し、HEK293 細胞、及び WI-38 細胞に導入した。

さらに、X の細胞外配列部分の一部を pDisplay vector (Invitrogen) に組み込み、HEK293 細胞に導入した。導入した遺伝子の発現解析は pDisplay vector に組み込まれている HA の発現を指標とし、抗 HA 抗体を用いて FACS 解析を行い確認した。

3) X/hsa-miR-27a/エクソソーム の作製

作製した X /HEK293 細胞に hsa-miR-27a を HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen)を用いてトランスフェクションし、翌日エクソソームを除去した FBS (10%)/DMEM 培地に交換した。さらに 4 日後に培養液を回収し、エクソソームを精製した。精製は超遠心法を用いて行い、PBS に浮遊し 4 にて保存した。エクソソームは NanoSight LM10 (Quantum Design, Japan) を用いて粒子数と粒子径を計測した。

4) X/hsa-miR-27a/エクソソームの乳がん細胞増殖抑制効果の検証

Luciferase 導入 MCF-7(Luc/MCF-7)細胞をスフェア培養し、コントロールと X 発現細胞からのエクソソームの粒子数を揃えて加えた。翌日、パクリタキセルを最終濃度 50 および 100 nM になるように加え、10~14 日後に CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay (Promega)を用いて残存している生細胞を測定した。

4. 研究成果

1) 乳がん幹細胞特異的膜蛋白質(hTMEM59)結合分子(X)の探索

MINT、IntAct、Uniprot より TMEM59 結合分子 X として候補から 1 つに絞った。他の候補分子についても今後順に検討していく予定である。

2) X を発現するエクソソームの作製

X-GFP/HEK293 または X-GFP/WI-38 は GFP を指標としてクローニングし、発現細胞を作製した。しかしながら、X の発現はトランスフェクション後数日間は膜上に発現しているものの、一週間を過ぎると細胞が死んでいった。そのため X の細胞外配列の一部のみを pDisplay vector に組み込み、HEK293 細胞にトランスフェクションし、G418 でセレクションした。HA を指標として X の発現を FACS 解析した結果、2 クローンを得ることができた。

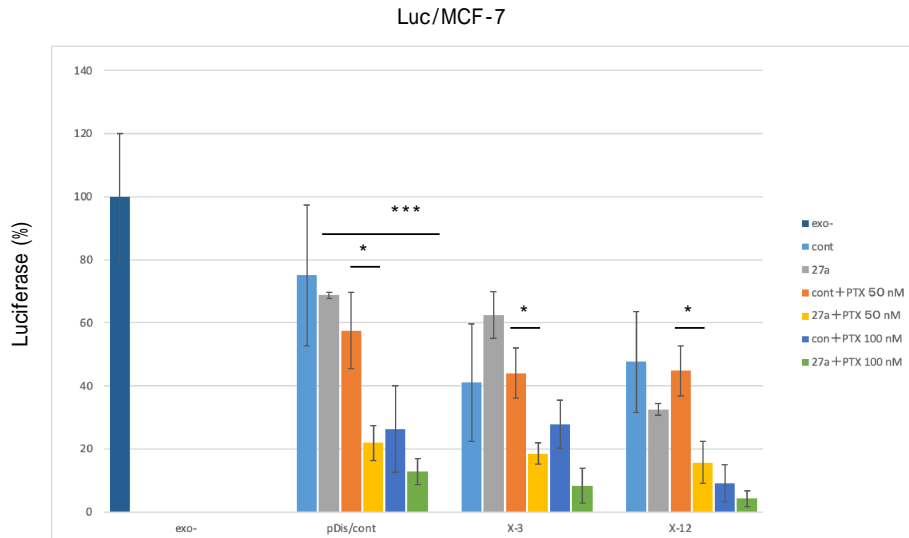
3) X/hsa-miR-27a/エクソソーム の作製

2) で作製した X/HEK293 に hsa-miR-27a を最終濃度 100 nM になるようにトランスフェクションし、培養上清よりエクソソームを精製した。NanoSight LM10 で粒子数と粒子径を計測した結果、90~150 nm を主としたエクソソームを回収することができた。

4) X/hsa-miR-27a/エクソソームの乳がん細胞増殖抑制効果の検証

10⁹ /well のエクソソームを用いた場合、X 発現エクソソームで残存生細胞は減少傾向にあったが、コントロールベクター由来エクソソームを加えた時と比較して、有意差は認められなかった。しかし miR-27a をエクソソームを用いてデリバリーすることで、パクリタキセルによるスフェア細胞の残存数は有意に減少した(図 1)。今回の目標である OMV を用いた検討には至らなかったが、今後更なる検討により、効果的に乳がん幹細胞を標的とした治療法を確立でき、抗がん剤の使用量を減らすことができるようになり、副作用の軽減と乳がんの根治が可能となると考えている。

図1. X発現エクソソームの乳がん幹細胞への効果の検証



TMEM59結合分子X発現細胞由来のエクソソームを用いてmiR-27aをデリバリーすることで、低濃度でのパクリタキセルの効果を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ueda S, Takanashi M, Sudo K, Kanekura K, Kuroda M.	4. 巻 100
2. 論文標題 miR-27a ameliorates chemoresistance of breast cancer cells by disruption of reactive oxygen species homeostasis and impairment of autophagy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lab Invest	6. 最初と最後の頁 863-873
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41374-020-0409-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsujiyama K, Takanashi M, Sudo K, Ishikawa A, Mineo S, Ueda S, Kumagai K, Kuroda M.	4. 巻 15
2. 論文標題 Extracellular microvesicles that originated adipose tissue derived mesenchymal stem cells have the potential ability to improve rheumatoid arthritis on mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regen Ther	6. 最初と最後の頁 305-311
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2020.08.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高梨正勝 須藤カツ子 石川章夫 黒田雅彦
2. 発表標題 樹状細胞由来エクソソームは内包因子をT細胞に伝達することで免疫系を活性化する
3. 学会等名 日本細胞外小胞学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高梨正勝
2. 発表標題 マウス腸内細菌由来の乳酸菌が分泌する小胞が及ぼす腸管への影響
3. 学会等名 第9回日本細胞外小胞学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

research map https://researchmap.jp/178923.res_project 東京医科大学分子病理学分野 https://tmumolpathol.sakura.ne.jp/index.html research map https://researchmap.jp/178923.res_project
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高梨 正勝 (Takanashi Masakatsu) (80312007)	東京医科大学・医学部・講師 (32645)	
研究分担者	須藤 カツ子 (Sudo Katsuko) (50126091)	東京医科大学・医学部・兼任講師 (32645)	
研究分担者	黒田 雅彦 (Kuroda Nasahiko) (80251304)	東京医科大学・医学部・主任教授 (32645)	
研究分担者	土田 明彦 (Tsuchida Akihiko) (50207396)	東京医科大学・医学部・兼任教授 (32645)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------