

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390087

研究課題名(和文)がん幹細胞を標的とするmiRNA含有エクソソームによる革新的がん治療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel cancer therapy using miRNA containing exosome

研究代表者

黒田 雅彦(Kuroda, Masahiko)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：80251304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円、(間接経費) 4,080,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らは、癌患者血清中のmiRNAが変化すること、miRNAがエクソソーム(二重膜脂質タンパク質)に包まれ癌細胞内に取込まれることを明らかにした。本研究では、癌幹細胞の増殖を抑制するmiRNAを単離し、エクソソームを用いて血中に取込むことで、癌幹細胞を標的とする革新的な治療法を目指した。具体的には、癌細胞に強く発現するEGFRに着目、EGFRに高親和性に結合するGE11ペプチドをエクソソームの膜表面に発現させ、癌細胞選択的なmiRNAの導入を行った。miRNA補充療法で効率的にRISCに取込まれるための最適化配列にも成功した。今後このmiRNAやエクソソームを用いて分子標的医薬品の開発を目指す。

研究成果の概要(英文)：Despite the therapeutic potential of nucleic acid drugs, their clinical application has been limited in part by a lack of appropriate delivery systems. Exosomes or microvesicles are small endosomally derived vesicles that are secreted by a variety of cell types and tissues. Here, we show that exosomes can efficiently deliver microRNA to epidermal growth factor receptor (EGFR)-expressing breast cancer cells. Targeting was achieved by engineering the donor cells to express the transmembrane domain of platelet-derived growth factor receptor fused to the GE11 peptide. Intravenously injected exosomes delivered let-7a microRNA to EGFR-expressing xenograft breast cancer tissue in Rag2<sup>-/-</sup> mice. Furthermore, we developed mimic miRNA that have efficient loading activity of the RISC complex. Our results suggest that exosomes can be used therapeutically to target EGFR-expressing cancerous tissues with nucleic acid drugs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：エクソソーム microRNA EGFR 分子標的治療

## 1. 研究開始当初の背景

近年疾患の原因分子に直接的に作用する分子標的医薬が注目されている。がん治療においても、既にハーセプチン、グリベック、イレッサ等の分子標的治療薬が開発され、臨床での有効性を示すエビデンスが蓄積している。しかしながら、既存の分子標的治療薬が有効な腫瘍は限られており、Ras など細胞内伝達物質や、c-Myc などの転写因子に対しては、既存の抗体医薬、低分子化合物では、完全に作用を阻害できないため、miRNA を含めた核酸の新たな治療薬のイノベーションが必要である。一方で研究代表者らは、(1)RNase 活性のある血清中に安定的に miRNA が存在すること、(2)種々の癌患者血清中で miR-92a の発現が低下すること、(3)血清中の miRNA はエクソソームに存在し RNase に抵抗性であること、(4)細胞で作成した人工エクソソームは他の細胞にも取り込まれ、取り込んだ細胞の形質を変化させること、を明らかにし、マウスにおいても外来性のエクソソームの効果を示すことが出来た。このような事実から miRNA は血管内をエクソソームに包まれて、ホルモンの様に振る舞っていることが推定される。したがって、抗体医薬などの生物製剤と同様に、人為的に培養細胞を用いてがんの原因となる遺伝子を標的とした miRNA をエクソソーム化することで、新規のドラッグデリバリーシステムが可能となる。また、過剰量の miRNA は生体内で分解されることから、非腫瘍部分である正常組織の影響は極めて少ないと予測される。

## 2. 研究の目的

(1)がん治療において重要な、がん幹細胞を選択的に標的にする anti-oncogenic miRNA を単離する。  
(2)がん細胞特異的に miRNA をデリバリーするエクソソームを開発する。  
(3) 遺伝子導入の操作を用いない特異的エクソソーム導入法を開発する。  
(4)マウス個体を用いてエクソソームの体内動態の検証と安全性の確認をする。  
(5)治療薬として特許化可能な microRNA の開発を行う。  
これらの研究を通じて、miRNA を用いた革新的ながん治療が発展する。

## 3. 研究の方法

### (1) がん幹細胞を標的する miRNA の同定

いくつかの癌腫において、がん幹細胞が分離同定されている。研究代表者のグループも、乳がん細胞株 MCF-7, HCC-1954, HCC-70 の CD24-/CD44+細胞画分によるがん幹細胞モデルを構築してきた。今回、具体的には、現在我々が準備しているウイルス miRNA ライブラリーを用いて、効果的に乳がん幹細胞様細胞集団

(CD24-/CD44+) の増殖を抑制ないし、apoptosis を誘導する miRNA を同定する。

### (2) 標的細胞への効率的なエクソソーム導入法の確立

従来のリポソームは、粒子のサイズが 100nm であることから、肝臓の網内系においてトラップされてしまう。また、リポソーム自体に特別なマーカがないことから全身のすべての臓器に取り込まれることも問題であった。一方、エクソソームの細胞内への侵入には、エクソソーム表面抗原を介した標的細胞への結合が重要な役割をしていることが明らかとなっている。このような背景から、我々は、EGFR の特異的に結合する GE11 ペプチドないし、EGF の変異体を、PDGFR の膜ドメインを用いて、エクソソーム膜表面に ligand を発現させ、がん細胞特異的に標的とするエクソソームの作製を検討する。

### (3) 遺伝子導入の操作を用いない特異的エクソソーム導入法の開発

エクソソームの膜表面上に GE11 を発現させるためには、遺伝子導入が必要である。しかし、プラスミド導入は臨床応用を考慮すると問題がある。そこで、本研究において、エクソソーム膜表面に発現するテトラスパニンを用いることで特異的に EGFR 発現細胞に、エクソソームを導入する手法を開発する。

### (4) in vivo マウス実験による抗腫瘍効果及び安全性の検討

#### がん細胞移植モデルの検討：

各種ヒト肺がん培養細胞株、ユーイング肉腫細胞株を RAG マウスに移植したモデルを作製し、miRNA の効果を検討する。

#### Luciferase トランスジェニックマウス (Tg) の作製とエクソソームの安全性、生体内代謝の検討：

Luciferase Tg マウスを作製する。Luciferase siRNA を含有したエクソソームを作製し、全身の各臓器における、発現抑制効果を検討する。

### (5) 治療薬として特許化可能な microRNA の開発

miRNA の細胞内での活性化効率は、導入する miRNA の形状によって左右される。本項目では、効率良く細胞内で活性化される miRNA を開発する。

## 4. 研究成果

### (1) がん幹細胞を標的する miRNA の同定

乳がん幹細胞分画および大腸がんの幹細胞を用いて miRNA の単離を行った。具体的には、miRNA アレイ法によってスクリーニングを行った。その結果数種の miRNA を単離した。

## (2) 効率的な標的細胞へのエクソソームの導入法の確立

今回我々は、EGFR の特異的に結合する GE11 ペプチドないし、EGF の変異体を、PDGFR の膜ドメインを用いて、エクソソームの膜表面上に発現させる事に成功した。さらに、EGFR を高発現する乳がん細胞の移植モデルを用いることで、GE11 発現エクソソームが、効率的にがん細胞に取り込まれることを証明した。

## (3) 遺伝子導入の操作を用いない特異的エクソソーム導入法の開発

エクソソーム膜表面に発現するテトラスパニンの 1 つに CD81 がある。この CD81 には、HCV の E2 抗原が特異的に結合する。今回我々は、この E2 抗原に GE11 を結合させたキメラペプチドの合成に成功した。このペプチドをエクソソームと混合することで、遺伝子導入の手法を用いずに特異的エクソソームを作製できる技術を開発した。

## (4) in vivo マウス実験による抗腫瘍効果及び安全性の検討

### がん細胞移植モデルの検討：

各種ヒト肺がん培養細胞株、ユーイング肉腫細胞株を RAG マウスに移植したモデルを作製し、EWS-Fli1, let-7, miR-34 の効果を検討した。

### Luciferase トランスジェニックマウス (Tg) の作製とエクソソームの安全性、生体内代謝の検討：

Luciferase siRNA を含有したエクソソームを作製し、全身の各臓器におけるエクソソームの発現抑制効果を検討した。その結果、エクソソームは脳組織にも効率的に集積することが明らかになった。また、細胞毒性に関しては、肝、腎、肺、心、脾臓の検討を行った。エクソソーム投与群 (1mg/kg 3 回投与) において、病理組織学的に壊死や炎症反応は観察されなかった。

## (5) 治療薬として特許化可能な microRNA の開発

本項目においては、miRNA 補充療法を目指して、loop 配列を含め様々な形状の miRNA を合成し、標的遺伝子のノックダウン効率、安定性を指標に検討を行った。その結果、guide 鎖と passenger 鎖が完全に相補である構造が最も血清中で安定性が高く、またノックダウン効率が高いことを明らかにした。現在これらの構造が、細胞内の TLR や RIG-I/MDA5 を活性化するかどうか検討している。

最終的には、以上の結果を踏まえて、分子標的医薬品の開発を目指していく。

## 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 20 件) 全件 査読有

1. Nakaya T, Ogawa S, Fukayama M, Kuroda M, Nagai R. (12 名 11 番目) KLF5 regulates the integrity and oncogenicity of intestinal stem cells. *Cancer Res.* 2014; 74(10):2882-91. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2574.
2. Yoon JH, Sudo K, Kuroda M. (18 名 15 番目) Activin receptor-like kinase5 inhibition suppresses mouse melanoma by ubiquitin degradation of Smad4, thereby derepressing eomesodermin in cytotoxic T lymphocytes. *EMBO molecular Medicine.* 2013. 5(11):1720-39 doi: 10.1002/emmm.201302524
3. Nishi H, Kuroda M, Isaka K. Estrogen and estrogen receptor induce matrix metalloproteinase (MMP)-26 expression in endometrial carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2013. 30(2):751-6. doi: 10.3892/or.2013.2527.
4. Nakaya M, Tajima M, Kuroda M. (18 名 16) GRK6 deficiency in mice causes autoimmune disease due to impaired apoptotic cell clearance. *Nature Communications.* 2013. 4:1532. doi: 10.1038/ncomms2540.
5. Murakami Y, Kuroda M. (14 名 14 番目) The expression level of miR-18b in hepatocellular carcinoma is associated with the grade of malignancy and prognosis. *BMC Cancer.* 2013 4;13:99. doi: 10.1186/1471-2407-13-99.
6. Katsuda T, Tsuchiya R, Kosaka N, Kuroda M, Ochiya T. (10 名 9 番目) Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. *SCIENTIFIC REPORTS.* 2013. 3:1197. doi: 10.1038/srep01197.

7. Ohno S, Takanashi M, Sudo K, Ohgi T, Ochiya T, Kuroda M. (12 名 9 番目) Systemically Injected Exosomes Targeted to EGFR Deliver Antitumor MicroRNA to Breast Cancer Cells. *Molecular Therapy*. 21(1):185-191. 2013. doi: 10.1038/mt.2012.180.
  8. Umezu T, Ohyashiki K, Kuroda M, Ohyashiki JH. Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs. *Oncogene*. 2013 32(22):2747-55. doi:10.1038/onc.2012.295
  9. Kobayashi S, Yamada-Okabe H, Suzuki M, Natori O, Kato A, Ochiya T, Kuroda M. (22 名 20 番目) LGR5-positive colon cancer stem cells interconvert with drug-resistant LGR5-negative cells and are capable of tumor reconstitution. *Stem Cells*. 2012. 30(12):2631-44. doi: 10.1002/stem.1257.
  10. Ohno S, Ishikawa A, Kuroda M. Roles of exosomes and microvesicles in disease pathogenesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013. 65(3):398-401. doi: 10.1016/j.addr.2012.07.019.
  11. Hamasaki T, Suzuk H, Morser J, Kuroda M, Ochiya T, Gabazza EC, Ohgi T. (19 名 15 番目) Efficacy of a Novel Class of RNA Interference Therapeutic Agents. *PLoS One*. 2012;7(8):e42655. doi: 10.1371/journal.pone.0042655.
  12. Yamaguchi G, Takanashi M, Tanaka M, Fujita K, Ohira T, Kuroda M, Ikeda N. Isolation of miRNAs that target EGFR mRNA in human lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 420(2):411-6. 2012. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.008.
  13. Hamasaki T, Suzuki H, Gabazza CN, Mizutani T, Kuroda M, Ochiya T, Gabazza EC, Ohgi T. (19 名 15 番目) Efficacy of a Novel Class of RNA Interference Therapeutic Agents. *PLoS One*. 2012.7(8):e42655. doi:10.1371/journal.pone.0042655
  14. Yamaguchi G, Takanashi M, Tanaka M, Fujita K, Ohira T, Kuroda M, Ikeda N. Isolation of miRNAs that target EGFR mRNA in human lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 420(2):411-6. 2012. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.008.
  15. Tsuchida A, Ohno S, Wu W, Borjigin N, Fujita K, Aoki T, Ueda S, Takanashi M, Kuroda M. miR-92 is a key oncogenic component of the miR-17-92 cluster in colon cancer. *Cancer science*. 2011: 102(12):2264-71. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.02081.x
- 〔学会発表〕(計 42 件)
1. Kuroda M. Novel RNAi agent can control HCV replication. AACR Annual Meeting 2014, San Diego, CA, April 5-9, 2014
  2. 黒田 雅彦. 肺がんを効果的に抑制する Mimic microRNA の新規形状の探索. 第 103 回日本病理学会総会、広島、2014 年 4 月 26 日
  3. 黒田 雅彦. 自己由細胞由来のエクソソームによるドラッグデリバリーシステムへの応用. 第 103 回日本病理学会総会、広島、2014 年 4 月 26 日
  4. 黒田 雅彦. <招待講演> Significance and applications of novel class of RNA for cancer therapy. Drug Discovery World Asia 2014 3/11-12 @Suntec Singapore Convention & Exhibition Centre.
  5. Kuroda M. Novel RNAi agent can control HCV replication. RNA Silencing(A9) Keystone symposia. Seattle Washington, USA, Jun.31-Feb.5, 2014
  6. 黒田 雅彦. <招待講演> 核酸医薬品の開発 日本がん分子標的治療学会、東京、2014 年 1 月

- 17日
7. 黒田 雅彦. 特別講演 miRNA 医薬品の開発 第6回岐阜大学先端創薬医療シンポジウム、東京(コクヨホール)、2013年11月29日
  8. 黒田 雅彦. <教育講演2>疾患関連 miRNA を標的にした臨床医薬品の開発 . 第40回日本臓器保存生物医学学会学術集会、東京、2013年11月10日
  9. 黒田 雅彦. シンポジウム 6. 新規の lipid conjugate RNA を用いたがん治療法の開発 . 第72回日本癌学会学術総会、横浜、2013年10月5日
  10. 黒田 雅彦. <基調講演>核酸医薬品の開発のためのトランスレーショナルリサーチ. 日経バイオテクオンラインプロフェッショナルセミナー、東京、2013年9月24日
  11. 黒田 雅彦. Exosome によるがん特異的 miRNA デリバリー法の開発. 第29回日本DDS学会学術集会、シンポジウム(招待講演)、京都、2013年7月5日
  12. 黒田 雅彦. ワークショップ12 バイオマーカーの病理研究・治療への応用 microRNA の病理研究・治療への応用 . 第102回日本病理学会総会、札幌、2013年6月7日
  13. 黒田雅彦. KLF5 functions as the master regulator of the integrity and oncogenicity of intestinal stem cells. 第102回日本病理学会総会、札幌、2013年6月7日
  14. 黒田 雅彦. 前立腺癌における microRNA-200c の発現解析 . 第102回日本病理学会総会、札幌、2013年6月7日
  15. 黒田 雅彦. 細気管支肺胞上皮癌における RAS と let-7 の発現の特徴 . 第102回日本病理学会総会、札幌、2013年6月7日
  16. Kuroda M. Development of nucleic acid therapy. RNAi, MicroRNAs & Single Cell Biology-2013 Meeting, Waltham USA, May 1-2, 2013 (招待講演)
  17. Kuroda M. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver anti-tumor microRNA to breast cancer cells. Keystone Symposia Conference - Noncoding RNAs in Development and Cancer(A7) January 20-25,2013 Vancouver, British Columbia, CA
  18. Kuroda M. KLF5 is essential for oncogenesis of intestinal tumors and control of intestinal stem cells. AACR Annual Meeting 2013, Washington, DC, April 6-10, 2013
  19. 黒田 雅彦. 大腸癌発生における形態異常と miRNA . 第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月21日
  20. 黒田 雅彦. EGFR リガンド発現エクソソームを用いた新規ドラッグデリバリーシステムの開発 . 第101回日本病理学会総会、東京、2012年4月27日
  21. Kuroda M . Delivery of miRNA to the EGFR-expressed tumor by systemic injection of target exosomes . International Society for the EGFR-extracellular Vesicles (ISEV), Gothenburg, Sweden 2012. 4.18
  22. Kuroda M. Novel type of small RNA exhibit RNA interference effect without activation of Toll-like receptor 3. キーストンシンポジウム (Nucleic Acid Therapeutics:From Base Pairs to Bedsides (A2), Santa Fe, New Mexico USA 2012 January 10-15 2012
  23. Kuroda M. Selective target delivery of miRNA using EGF expressing exosomes. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. Santa Fe, New Mexico USA 2012.1.12
  24. 黒田 雅彦 The infection of hepatitis C virus activates the exosomes and microvesicles secretion pathway of host cells 第4回日本RNAi研究会(2012.8.30-9.1)広島
  25. 黒田 雅彦. マウスに経口投与したエクソソーム

- ムの生体内での安定性と分布 . 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌、2012 年 9 月 19～21 日
26. 黒田 雅彦 . 大腸癌発生における形態異常と miRNA . 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌、2012 年 9 月 19～21 日
27. 黒田 雅彦 . 核酸創薬の現状と課題、今後の方向 . 日経バイオテックプロフェッショナルセミナー 東京、2012 年 5 月 28 日
28. 黒田 雅彦 . 胃低分化癌における in situ hybridization 法を用いた miRNA-92a および 200c の発現低下の意義 . 第 101 回日本病理学会総会、東京、2012 年 4 月 26 日
29. Kuroda M. Delivery of antitumor molecules to the EGFR expressing cancer using EGF expressing exosomes. 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、2011 年 12 月 16 日
30. 黒田 雅彦 . 人工型エクソソームを用いた新規肺癌治療の開発 . 第 52 回日本肺癌学会総会、大阪、2011 年 11 月 4 日
31. 黒田 雅彦 . 乳がん幹細胞の維持に關与する microRNA の探索 . 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、2011 年 10 月 5 日
32. 黒田 雅彦 . 血管内皮細胞による癌細胞由来 exosomal miRNA の取り込み機構の解明 . 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、2011 年 10 月 5 日
33. 黒田 雅彦 . リガンド修飾エクソソームによる EGF receptor 発現細胞を標的としたドラッグデリバリーシステムの開発 . 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、2011 年 10 月 3 日-5 日
34. 黒田 雅彦 . CD63-GFP を発現したエクソソームのマウス生体内での安定性と分布について . 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋、2011 年 10 月 5 日
35. 黒田 雅彦 . 疾患マーカーとしての細胞外核酸

(分泌型 miRNA). 第 84 回日本生化学会大会 (シンポジウム)、京都、2011 年 9 月 24 日

36. 黒田 雅彦 . 乳がん幹細胞に対する核酸医薬の開発 . 第 2 回久留米核酸医薬研究会、福岡、2011 年 5 月 11 日
37. 黒田 雅彦 . 人口型 exosome の生体内分布と安定性についての研究 . 第 100 回日本病理学会総会、横浜、2011 年 4 月 30 日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tokyo-med.ac.jp/molpathol/>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

黒田 雅彦 (Kuroda Masahiko )  
東京医科大学・医学部・教授  
研究者番号：80251304

### (2) 研究分担者

落谷 孝広 (Ochiya Takahiro )  
独立行政法人国立がん研究センター・研究所・  
分野長  
研究者番号：60192530

### (3) 研究分担者

須藤 カツ子 (Sudo Katsuko )  
東京医科大学・医学部・兼任講師  
研究者番号：50126091