

令和 2 年 6 月 20 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10564

研究課題名(和文) がんの再発、転移治療を実現するためのがん幹細胞特異的miRNAデリバリー法の開発

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

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：化学療法などにより残存したがん幹細胞は全身の臓器に休眠状態で潜伏し、再発や転移の原因となる。我々はがん幹細胞の維持を抑制するmiRNAをエクソソームに内包し、血中に投与することでがんの根治が可能になると考えた。さらにがん幹細胞に結合する分子をエクソソームの膜上に発現させることで、効率良くがん幹細胞特異的にmiRNAのデリバリーが可能となる。

本研究では、乳がん幹細胞と非幹細胞の膜蛋白質の発現解析を行った。その結果、乳がん幹細胞に高発現する膜蛋白質を3種類見出した。以上の結果から乳がん幹細胞に高発現している膜蛋白質を標的とすることで、効率の良いmiRNAのデリバリーが可能となると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核酸医薬は、従来の医薬品では標的にするのが難しい分子に対する治療法として期待されているが、RNAの安定性やデリバリー法に課題が残されているため、miRNAを用いた治療法の確立には至っていない。我々は、乳がん細胞へのhsa-miR-27aの補充が乳がん幹細胞の維持を破綻させ、抗がん剤への感受性を高めることで、がんの増殖が抑制されることを明らかにした。hsa-miR-27aを内包した乳がん幹細胞特異的エクソソームの有効性を示すことができれば、血中に投与するだけで、全身に散在し潜伏するがん幹細胞を標的とした治療が可能となる。特に再発、転移に対する治療法の実用化に発展し、副作用の軽減に繋がる。

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. However, the factors determining the chemoresistance of BCSCs have remained to be investigated. Here, 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 expression of three proteins were upregulated. These result provides us novel molecular targets for BCSCs and can be a potential therapeutic modality for breast cancer.

研究分野：分子生物学

キーワード：miRNA cancer stem

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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おり、2016年のがん統計予測(国立がん研究センター・がん対策情報センター)においても女性のがんの第一位とされている。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、ごく少数の細胞集団であるにもかかわらず、高い造腫瘍能、自己複製能、多分化能を示すため、がんの再発に大

きく関与している (Fengyan Yu *et al.*, Cell 2007)。さらに、がん幹細胞は骨髄などに移動して、休眠状態(dormancy)で長期間生存し、再び増殖を始めることが報告されている (Sosa MS. *et al.*, Nat Rev Cancer, 2014, Aguirre-Ghiso JA *et al.* Nat Med., 2013)。従って乳がん幹細胞を効率よく死滅させることで、再発や転移は予防可能であると考えられる。これまでに当研究室では、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。さらにエクソソームの膜表面にがん細胞に結合する分子(EGFR 結合ペプチド:GE11)を発現させ、がん幹細胞の複製を抑制するmiRNA(let-7a)を内包させた人工エクソソームを作製した。これを腫瘍移植マウスの血中に投与すると、がんの増殖を抑制することを示した(図1) (Ohno S *et al.*, Mol Ther. 2013)。また、乳がん幹細胞培養法(mammosphere culture)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(図2a)。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(図2b)、低濃度の抗がん剤で細胞死を誘導した(図2c) (Ueda S *et al.*, Lab Invest., 2020)。以上の結果からhsa-miR-27aは乳がん幹細胞の維持の破綻に重要な役割を担っており、hsa-miR-27aの過剰発現は乳がん幹細胞を標的とした治療法として有効であると考えられる。

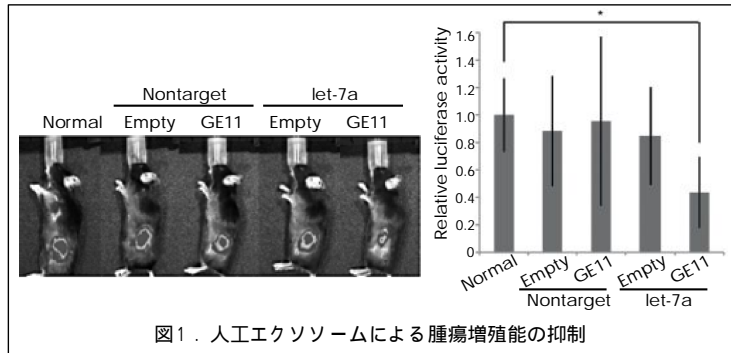


図1. 人工エクソソームによる腫瘍増殖能の抑制

きく関与している (Fengyan Yu *et al.*, Cell 2007)。さらに、がん幹細胞は骨髄などに移動して、休眠状態(dormancy)で長期間生存し、再び増殖を始めることが報告されている (Sosa MS. *et al.*, Nat Rev Cancer, 2014, Aguirre-Ghiso JA *et al.* Nat Med., 2013)。従って乳がん幹細胞を効率よく死滅させることで、再発や転移は予防可能であると考えられる。これまでに当研究室では、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。さらにエクソソームの膜表面にがん細胞に結合する分子(EGFR 結合ペプチド:GE11)を発現させ、がん幹細胞の複製を抑制するmiRNA(let-7a)を内包させた人工エクソソームを作製した。これを腫瘍移植マウスの血中に投与すると、がんの増殖を抑制することを示した(図1) (Ohno S *et al.*, Mol Ther. 2013)。また、乳がん幹細胞培養法(mammosphere culture)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(図2a)。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(図2b)、低濃度の抗がん剤で細胞死を誘導した(図2c) (Ueda S *et al.*, Lab Invest., 2020)。以上の結果からhsa-miR-27aは乳がん幹細胞の維持の破綻に重要な役割を担っており、hsa-miR-27aの過剰発現は乳がん幹細胞を標的とした治療法として有効であると考えられる。

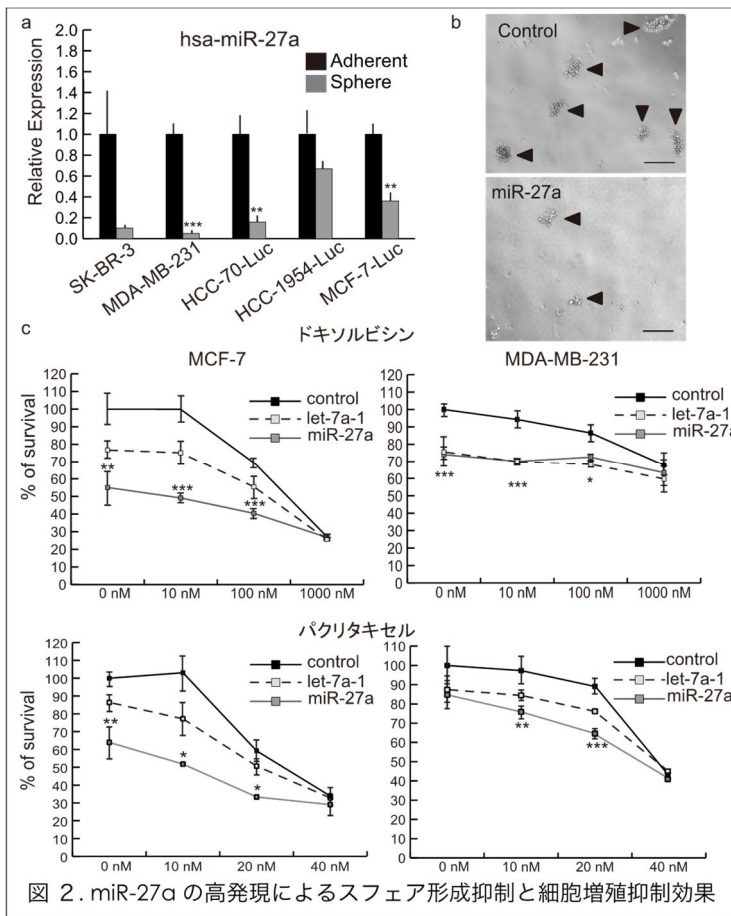


図2. miR-27aの高発現によるスフェア形成抑制と細胞増殖抑制効果

2. 研究の目的

化学療法などにより残存したがん幹細胞は全身の臓器に休眠状態で潜伏し、再発や転移の原

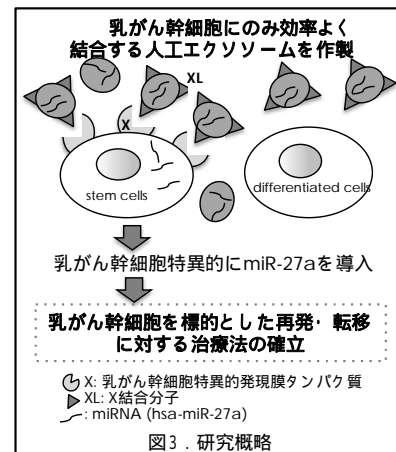
因となる。我々はがん幹細胞の維持を抑制する microRNA(miRNA)を見出したが、現在の核酸デリバリー法ではがん幹細胞への特異性は低く、その効果も少ない。我々は血中の miRNA がエクソソームによって運ばれていることに着目し、がん幹細胞の維持を抑制する miRNA をエクソソームに内包し、血中に投与することでがんの根治が可能になると考えた。さらにはがん幹細胞に結合する分子をエクソソームの膜上に発現させることで、全身に散在しているがん幹細胞特異的に miRNA のデリバリーが可能となる。本研究では再発や転移に対してより効果的で患者に負担の少ない治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

hsa-miR-27a が乳がん幹細胞の維持の破綻に関与していることを利用し、本研究では乳がん幹細胞特異的結合エクソソームに hsa-miR-27a を内包させ、がん抑制効果を検証する (図 3)。

(1) 乳がん幹細胞に特異的に発現するタンパク質の選択

まず、乳がん幹細胞に特異的に発現する膜タンパク質 (X) を探索することとした。アルデヒド脱水素酵素 (ALDH) は幹細胞や前駆細胞に高発現しており、がん幹細胞の指標として用いられている。これを利用して、ヒト乳がん細胞株 (MCF-7) の ALDH を ALDEFLUOR (VERITAS)を用いて染色した。ALDH は FACS Aria III (BD) にて ALDH 陽性細胞と ALDH 陰性細胞に分離した。回収した ALDH 陽性細胞と ALDH 陰性細胞から膜タンパク質の抽出を行い、発現パターンを質量分析法 (MS: Mass Spectrometry, nano-LC/MS/MS) により解析し比較することとした。



乳がん幹細胞と非幹細胞で膜タンパク質の発現パターンの比較を行うため、乳がん細胞株 MCF-7 と MDA-MB-231 より乳がん幹細胞培養 (mammosphere 培養) を行った。Mammosphere 細胞と通常の接着培養細胞から膜タンパク質を抽出し、発現パターンを LC/MS/MS により解析した。MS による発現解析は慶應義塾大学・先端生命科学研究所・森大先生に委託した。

(2) 膜タンパク質 X に結合する分子 (X ligand: XL) の決定

選択した乳がん幹細胞に高発現する膜タンパク質 X に結合するリガンド XL の配列を決定するため、論文検索及びデータベース検索を行ったが、データベースには登録されていなかった。そこで XL を共免疫沈降法 (Co-IP) を用いて明らかにすることとした。膜タンパク質 X に結合した分子を MS 解析に必要な量を回収するために、まず、膜タンパク質 X を乳がん細胞株 (MCF-7 と MDA-MB-231) に高発現させた。X は乳がん幹細胞の維持に関わっている可能性が高く、乳がん細胞株に高発現した場合、増殖能が下がる可能性がある。そこでテトラサイクリン発現誘導システム (Tet-On 3G Bidirectional Inducible Expression System with mCherry, クロンテック) によって発現を制御することとした。Tet-On 調節ベクター (pCMV-Tet3G) を組み込んだ乳がん細胞株 (MCF-7 と MDA-MB-231) を作製し、さらに TRE 応答発現ベクター (TRE-3G-BI-mCherry) に X の塩基配列を組み込んだ乳がん細胞株 (MCF-7 と MDA-MB-231) をクローニングし作製した。X の塩基配列の合成および TRE-3G-BI-mCherry への組み込みはタカラバイオへ受託した。

4. 研究成果

(1) 乳がん幹細胞に特異的に発現するタンパク質の選択

ヒト乳がん細胞株 (MCF-7) を ALDEFLUOR を用いて染色し、がん幹細胞の指標として用いられている ALDH 陽性細胞を FACS Aria III にて ALDH 陰性細胞と分離した。回収した ALDH 陽性細胞と ALDH 陰性細胞から膜タンパク質の抽出を行い、LC/MS/MS により解析し比較する

ことで、ALDH 陽性細胞に特異的、または高発現している膜タンパク質を明らかにすることとした。しかしながら、ALDH 陽性細胞の割合は非常に低く、MCF-7 では約 2 %であった。ALDH 陽性細胞から膜タンパク質だけを分離してタンパク質を抽出することを何度も繰り返した。しかし LC/MS/MS 解析に必要なタンパク質量(20 μ g)に到達するために繰り返し行うことは、ロットの違う ALDH 陰性細胞との比較になってしまうこと、また、MCF-7 のような上皮系の乳がん細胞では ALDH 陽性細胞が高率に含まれるが、MDA-MB-231 のような EMT を起こした転移性の高い細胞株では ALDH は幹細胞の指標とはならないことが報告されており、我々が行った MDA-MB-231 の ALDEFLUOR の染色結果においても、ALDH 陽性細胞は 0 %であった。そのため ALDH 陽性細胞と ALDH 陰性細胞との膜タンパク質発現解析を行った場合、MCF-7 ではがん幹細胞特異的、あるいはがん幹細胞に高発現する膜タンパク質と言えるが、転移性の高い細胞株 (MDA-MB-231 のような細胞) には当てはまらない結果となり得ると考えた。したがって、ALDH 陽性細胞と ALDH 陰性細胞との比較を行うことを取りやめた。

次に、我々はこれまでに、mammosphere 培養細胞と接着培養細胞の miRNA マイクロアレイを行った結果、hsa-miR-27a が乳がん幹細胞の維持に重要であることを明らかにした。この経験から、同様の方法を用いて mammosphere 培養細胞と接着培養細胞より膜タンパク質を抽出し、発現解析を LC/MS/MS を用いて行った。その結果、接着培養細胞と比較して、mammosphere 培養細胞に 2 倍以上高く発現している膜タンパク質を 3 種類見出すことができた。この 3 種類の膜タンパク質に関わる論文を検索し、本研究では幹細胞の維持に重要な Wnt シグナルを増強することが報告されている膜タンパク質 X をエクソソームの標的とすることとした。

(2) 膜タンパク質 X に結合する分子 (X ligand: XL) の決定

膜タンパク質 X に結合する分子 XL を明らかにするため、膜蛋白質 X をテトラサイクリン発現誘導システムによって発現制御できる乳がん細胞株 (MCF-7 と MDA-MB-231) を作製した。TRE-3G-BI-mCherry は Low Copy のプラスミドであるため、収量が上がりず何度もコンピテントセルの培養とベクターの精製を繰り返した。さらに、pCMV-Tet3G または TRE-3G-BI-mCherry を組み込んだ細胞株は、細胞の形が変わりやすいこと、さらには TRE-3G-BI-mCherry と共に Puromycin linear selection maker も導入するため、導入効率が非常に低く、同時にトランスフェクションされた細胞のクローニングに時間を要した。現在、X の発現を確認し、X が乳がん幹細胞の維持に関わるかどうかを確認中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kitamoto K, Taketani Y, Fujii W, Inamochi A, Toyono T, Miyai T, Yamagami S, Kuroda M, Usui T, Ouchi Y	4. 巻 10
2. 論文標題 Generation of mouse model of TGFBI-R124C corneal dystrophy using CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-58876-w	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 Ueda S, Takanashi M, Sudo K, Kanekura K, Kuroda M	4. 巻 -
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 -
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 Ueda A, Oikawa K, Fujita K, Ishikawa A, Sato E, Ishikawa T, Kuroda M, Kanekura K	4. 巻 99
2. 論文標題 Therapeutic potential of PLK1 inhibition in triple-negative breast cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lab Invest.	6. 最初と最後の頁 1275-1286
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 0.1038/s41374-019-0247-4	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 Kurata A, Saito A, Hashimoto H, Fujita K, Ohno SI, Kamma H, Nagao T, Kobayashi S, Yamashina A, Kuroda M	4. 巻 21
2. 論文標題 Difference in immunohistochemical characteristics between Takayasu arteritis and giant cell arteritis: it may be better to distinguish them in the same age.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14397595.2019.1570999	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 Saito S, Ohno SI, Harada Y, Oikawa K, Fujita K, Mineo S, Gondo A, Kanno Y, Kuroda M	4. 巻 23
2. 論文標題 rAAV6-mediated miR-29b delivery suppresses renal fibrosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Exp Nephrol.	6. 最初と最後の頁 1345-1356
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-019-01783-w	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 Umehara R, Kurata A, Takanashi M, Hashimoto H, Fujita K, Nagao T, Kuroda M	4. 巻 38
2. 論文標題 Fascin as a useful marker for identifying neural components in immature teratomas of human ovary and those derived from murine embryonic stem cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Gynecol Pathol.	6. 最初と最後の頁 377-385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PGP.0000000000000528	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 Umehara R, Kurata A, Takanashi M, Hashimoto H, Fujita K, Nagao T, Kuroda M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Fascin as a Useful Marker for Identifying Neural Components in Immature Teratomas of Human Ovary and Those Derived From Murine Embryonic Stem Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Gynecol Pathol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PGP.0000000000000528.	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 -

1. 著者名 Ikehata N, Takanashi M, Satomi T, Watanabe M, Hasegawa O, Kono M, Enomoto A, Chikazu D, Kuroda M.	4. 巻 15
2. 論文標題 Toll-like receptor 2 activation implicated in oral squamous cell carcinoma development.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 2227-2234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.12.098.	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 Kurata A, Yamada M, Ohno SI, Inoue S, Hashimoto H, Fujita K, Takanashi M, Kuroda M.	4. 巻 39
2. 論文標題 Expression level of microRNA-200c is associated with cell morphology in vitro and histological differentiation through regulation of ZEB1/2 and E-cadherin in gastric carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncol Rep.	6. 最初と最後の頁 91-100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2017.6093.	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11件(うち招待講演 6件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 黒田 雅彦
2. 発表標題 The practice of pathological fiagnosis using AI
3. 学会等名 第38回札幌国際がんシンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒田 雅彦
2. 発表標題 核酸医薬品の臨床応用
3. 学会等名 第3回 バイオ医薬 EXPO(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takanashi M, Ueda S, Sudo K, Kuroda M
2. 発表標題 Dendritic cell derived-exosomes activate immune systems by transferring exosome involved factors to T cell.
3. 学会等名 ANNUAL MEETING ISEV 2019(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kuroda M
2. 発表標題 RNA-based Biomarkers
3. 学会等名 ANNUAL MEETING ISEV 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高梨 正勝、上田しのぶ、須藤カツ子、黒田 雅彦
2. 発表標題 樹状細胞由来エクソソームは内包される分子をT細胞に伝達して免疫機構を活性化する
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒田 雅彦
2. 発表標題 Exosome opens new generation of cell therapy.
3. 学会等名 第10回日本RNAi研究会 第5回日本細胞外小胞学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒田 雅彦
2. 発表標題 エクソソームによる細胞治療、再生医療の応用 (Clinical application of exosome therapy)
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒田 雅彦
2. 発表標題 エクソソームの臨床応用
3. 学会等名 第33回日本DDS学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 黒田 雅彦
2. 発表標題 核酸医薬の臨床応用
3. 学会等名 第384回CBI学会講演会 - 核酸医薬 -
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masakatsu Takanashi, Shinobu Ueda, Masahiko Kuroda.
2. 発表標題 Analysis of dendritic cells derived-exosomes suppress tumor growth.
3. 学会等名 American Association Cancer for research Associate / conference on Tumor Immunology and Immunotherapy (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masakatsu Takanashi, Yojiro Makino, Tatsuo Ohira, Norihiko Ikeda, Masahiko Kuroda
2. 発表標題 Analysis of Dendritic Cells Derived exosomes That Suppressed Tumor Growth.
3. 学会等名 World IASLC 18th World Conference on Lung Cancer (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 高梨正勝、黒田雅彦	4. 発行年 2018年
2. 出版社 最新医学社	5. 総ページ数 125
3. 書名 最新医学 エクソソームを用いた疾患治療を標的とした核酸医薬の現状と開発	

1. 著者名 上田しのぶ・高梨正勝・黒田雅彦	4. 発行年 2018年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 100
3. 書名 Bio Clinica 核酸医薬	

1. 著者名 上田しのぶ・高梨正勝・黒田雅彦	4. 発行年 2017年
2. 出版社 医薬ジャーナル社	5. 総ページ数 195
3. 書名 miRNAの最新知識～基礎領域から診断・治療応用まで～	

1. 著者名 黒田 雅彦、高梨 正勝	4. 発行年 2017年
2. 出版社 株式会社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 314
3. 書名 パラダイムシフトをもたらす エクソソーム機能研究最前線 シグナル伝達からがん、免疫、神経疾患との関わり、創薬利用まで	

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京医科大学 分子病理学分野
<https://tokyomed-molpathol.wixsite.com/kuroda>

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	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 Masahiko) (80251304)	東京医科大学・医学部・主任教授 (32645)	
研究 分担者	高梨 正勝 (Takanashi Masakatsu) (80312007)	東京医科大学・医学部・講師 (32645)	