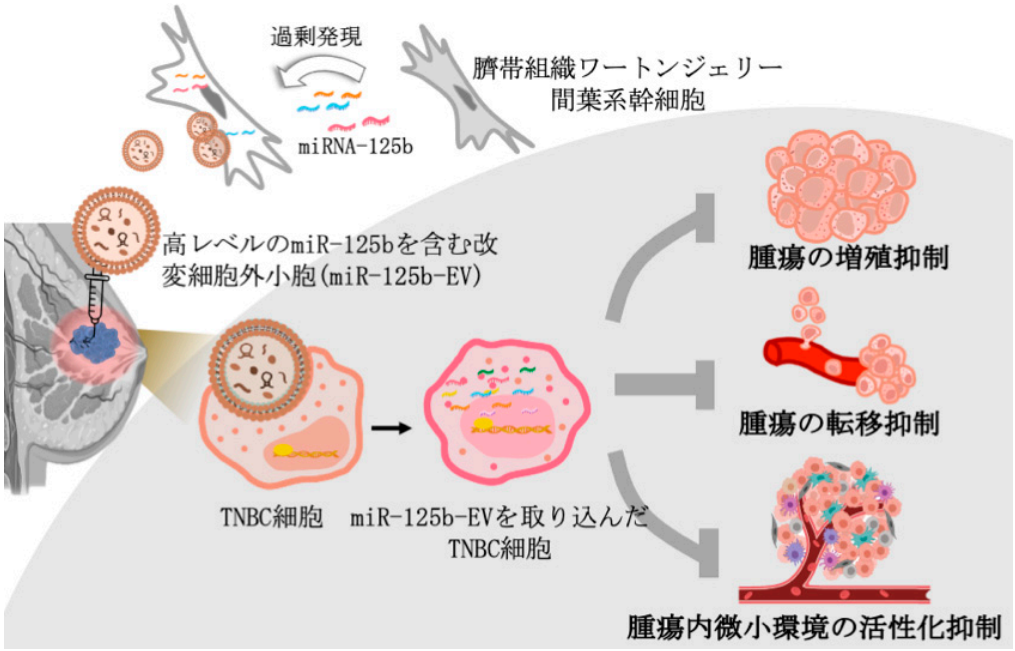
144　乳がんの新規治療法に役立つ高機能細胞外小胞の開発	Vuong Cat Khanh

【目的】トリプルネガティブ乳がん（TNBC）に対する効果的な治療は確立されておらず、そのため TNBC は予後が悪く、死亡率が高い。ほとんどの乳がん治療は癌細胞を直接標的としているが、マーカーの欠如と高い再発率により、TNBC の治療への応用は限られている。TNBC のような進行性のがんの場合、がん細胞を標的とするだけでなく、腫瘍内微小環境の発達を阻害する効果的な方法を見つける必要がある。我々はこれまでの研究で、臍帯のウォートンゼリー（WJ）部分から単離された間葉系幹細胞（MSC）に由来する細胞外小胞（EV）の能力を明らかにした。そこで本研究では、1）ウォートンゼリーMSC 由来の EV（WJ-EV）により取り込まれた乳がん細胞（BCC）が腫瘍内微小環境に関与する数種類の細胞に及ぼす影響を明らかにすること、2）TNBC 治療の新たな戦略として、高い抗がん能力を持つ WJ-EV を開発することを目的とした。

【方法】WJ-EV は、臍帯のウォートンゼリー部分に由来する MSC から分離されたものである。癌関連線維芽細胞および内皮細胞などの腫瘍内微小環境に関与する様々な細胞に対する BCC を取り込んだ WJ-EV の影響を検査した。さらに、重要な miRNA とそれに関連した WJ-EV が BCC の発症を阻害するメカニズムを明らかにした。MSC におけるこの miRNA の過剰発現により、高レベルの重要な miRNA を有する改変 WJ-EV が単離され、BCC を阻害する誘導効果を元の WJ-EV と比較した。

【結果】WJ-EV を取り込んだ BCC（wBCC）が、TNBC の生体内での発生や転移能力、内皮細胞の血管新生能力、癌関連線維芽細胞の生成を減少させることを示した。注目すべきことに、BCC に対する WJ-EV の阻害効果は、HIF1α の発現を下方制御する WJ-EV から BCC への miRNA-125b の移動に関係している。さらに、WJ-MSC における miRNA-125b の過剰発現により、高レベルの miRNA-125b を含む改変 WJ-EV を生成した。これらの改変された WJ-EV を BCC が取り込むことにより、BCC の増殖および幹細胞性に対する、より強力な阻害効果がもたらされた。以上のことから我々の研究は、BCC を阻害し、腫瘍内微小環境における細胞クロストークを遮断することで TNBC の進行を阻害する、高い抗がん能力を持つ改変 WJ-EV を miRNA-125b の過剰発現により生成する可能性があることを示唆した。

TNBC の増殖および転移を阻害する「高機能型 WJ-EV」の作製



144. 乳がんの新規治療法に役立つ高機能細胞外小胞の開発

Vuong Cat Khanh

筑波大学医学医療系 再生医学・幹細胞生物学研究室

Key words：トリプルネガティブ乳がん，間葉系幹細胞，細胞外小胞，腫瘍内微小環境，治療法

緒　言

トリプルネガティブ乳がん（TNBC）は、転移性や悪性度が高く、治療の困難なタイプの乳がんである［1］。今のところ標準治療は化学療法であるが、治療反応が短く、その後急速な再発や転移が起こるなど、効果は限定的である。そのため、TNBC に対する効果的な治療法の開発が求められている［2］。

腫瘍内では、がん細胞が多数の種類の非がん細胞と相互作用して変化し、腫瘍の発生や転移を促進する環境を作り出している。たとえばがん細胞は、内皮細胞（EC）を活性化し、血管新生によって栄養素を供給し、がん細胞の侵入経路を作り出す。さらに、がん細胞は間葉系幹細胞（MSC）などの前駆細胞からがん関連線維芽細胞（CAF）の生成を誘導し、がん細胞の増殖、上皮間葉転換（EMT）、転移を促進する。いくつかの研究は、腫瘍内部の細胞の働きを修正することが、TNBC などの悪性度の高いがんに対する効果的な治療法につながる新しい戦略であることを示唆している［3］。

最近の研究では、MSC に由来する細胞外小胞（EV）が、多くの疾患に対する無細胞療法の有望な薬剤として応用できることを示唆している。EV は、タンパク質、mRNA、マイクロ RNA（miRNA）などの生物学的メッセージを運ぶ細胞由来の膜小胞の集まりであり、標的細胞に取り込まれてこれらのレシピエント細胞の遺伝子型と表現型を調節することができる。したがって、EV は、がん治療における細胞の働きを変更するための有望な候補として機能する［4，5］。我々はこれまでの研究で、ウォートンゼリー（WJ）の MSC 由来 EV（WJ-EV）が TNBC の増殖と転移を阻害することを示し、TNBC に対する治療を開発するための EV 資源として WJ-EV が使用できることを示唆した［6］。しかしながら、WJ-EV の抗がん能力に関連する重要な要素とメカニズムについては今のところ不明である。

本研究の目的は、BCC の増殖と転移を阻害する WJ-EV の重要な因子を明らかにすることである。さらに、乳がん腫瘍内微小環境の進行を抑制する治療法を開発するために、高い抗がん能力を備えた改変型 WJ-EV を作製することである。

方法および結果

1. WJ-EV を取り込んだ BCC（wBCC）は、生体内で腫瘍内微小環境を損なう機能を示した

まず WJ-EV を分離し、BCC に取り込ませた。次に、BCC と WJ-EV を取り込んだ BCC（wBCC）をマウスに注射し、腫瘍の増殖と腫瘍内微小環境の発達を調べた。結果、癌細胞注射の 60 日後、BCC によって形成された腫瘍に比べて、wBCC によって形成された腫瘍がより小さかった（図 1A）。さらに、BCC または wBCC の肺への転移を分析した結果、BCC を注射したマウスの肺では多くの腫瘍病巣が観察されたのに対して、wBCC を注射したマウスの肺では腫瘍病巣の数が少なかった（図 1B）。

次に、腫瘍組織の組織学的分析を行った。結果、wBCC によって形成された腫瘍は、BCC によって形成された腫瘍と比べて、CD31（＋）細胞の数が少なかった（図 1C）。加えて、wBCC によって形成された腫瘍には、がん関連線維芽細胞（CAF）マーカー（α-SMA、ビメンチン、FAP）の遺伝子発現が少ないことから（図 1D）、CAF の数が少ないことを示唆している。

これらのデータから、wBCC が BCC よりも低い腫瘍形成能および転移能を有することが示唆された。注目すべきことは、wBCC によって形成された腫瘍内微小環境において、血管新生と CAF の生成が減少したことである。

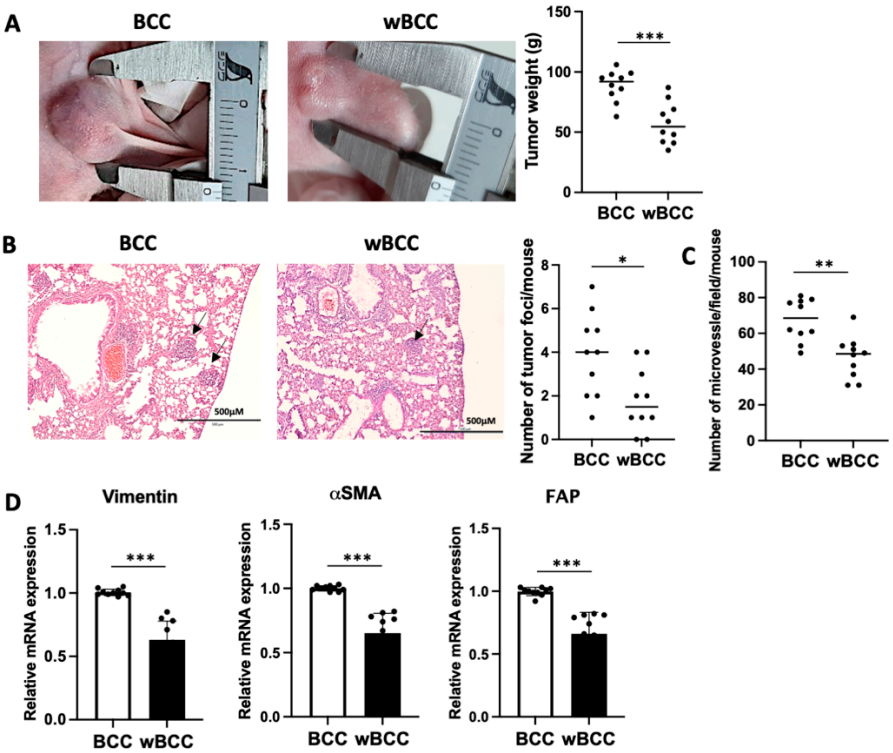


図 1. wBCC は生体内で腫瘍内微小環境を損なう機能を示した

A) ヌードマウスにおいて、癌細胞注射の 60 日後 BCC および wBCC によって形成された腫瘍重量。

B) 癌細胞注射の 60 日後 BCC および wBCC によって形成された腫瘍から肺への転移したがん細胞数（スケールバー：500 μm）。

C) 腫瘍の血管数。

D) 腫瘍から回収した細胞の CAF マーカーの遺伝子発現。

*P＜0.05、**P＜0.01、***P＜0.001（Mann-Whitney U test）。

2. miR-125b の WJ-EV から wBCC への移動によって HIF1α が下方制御され、細胞の遊走能が阻害された

最近の研究では、細胞挙動の制御における miRNA の重要な役割が報告されている［7］。そのため、miRNA シーケンシングを実行して、BCC と wBCC の miRNA プロファイルを比較した。まず、BCC と wBCC における miRNA の異なる発現を調べるために、有意（$p<0.01$）に発現差のある miRNA を階層的クラスタリングによって調べた（図 2A）。その結果、wBCC では mir-548d-1、mir-2682、mir-5094 の発現量が相対的に高いことがわかった。これら 3 つの miRNA のうち、mir-2682 および mir-5094 は、それぞれ腫瘍抑制因子および増殖抑制因子であることがこれまでの研究で示唆されている［8, 9］。

腫瘍発生の阻害における重要な miRNA を調査するために、BCC および wBCC の発生に関連するシグナル伝達経路を、KEGG 分析を使用した Ingenuity Pathway Analysis（IPA）によって決定した。KEGG 経路分析により、wBCC には mRNA を標的とする miRNA が HIF1α シグナル伝達経路に関与していることが示された（図 2B）。

HIF1α は、腫瘍内微小環境における低酸素条件下でのがん細胞の挙動を制御する重要な因子である。したがって、HIF1α シグナル伝達経路の制御に関連する miRNA に焦点を当てた。IPA の前処理手順では、14 個の miRNA（mir-21、mir-100、mir-191、mir-125b、mir-30c、mir-17、mir-7a、let-7a、mir-221、mir-146a、mir-503、mir-9、mir-504、および mir-132）は、HIF1α シグナル伝達経路に関与していた。これら 14 個の miRNA のうち、7 個の

miRNA（mir-21、mir-100、mir-191、mir-125b、mir-30c、mir-17、mir-7a）が BCC と wBCC の両方で高度に発現していることが判明した。次に、これら 7 つの miRNA の標的遺伝子（標的スコア＞90）を、miRNA 標的予測および機能アノテーションデータベース miRDB（http://mirdb.org/）でスクリーニングした。結果は、miR-125b のみが HIF1α 阻害を直接制御することを示した（図 2C）。

wBCC における miR-125b の上方制御が WJ-EV からの移動によるものであるかどうかを調べるために、WJ-EV の miRNA 配列決定を行った。結果は、miR-125b が WJ-EV に含まれていることを示した（図 2D）。さらに、wBCC における HIF1α シグナル伝達経路の役割を決定するために、wBCC と低酸素条件下の BCC における HIF1α の発現を比較した。その結果、低酸素条件下では、BCC と比較して、wBCC は HIF1α の発現障害を示した（図 2E）。

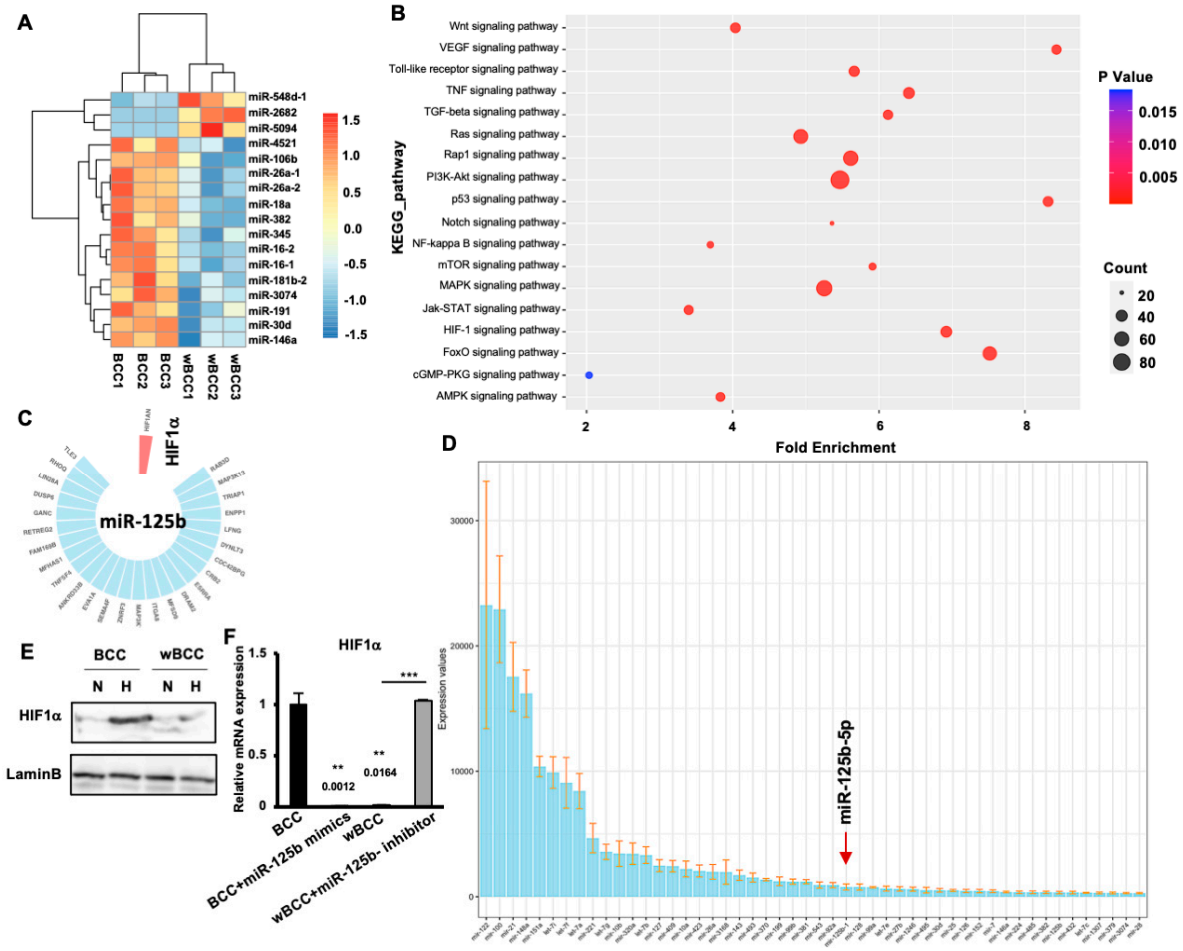


図 2. miR-125b の WJ-EV から wBCC への移動によって HIF1α が下方制御され、細胞の遊走能が阻害された

A) 階層的クラスタリングによって BCC と wBCC における miRNA の異なる発現。

B) Ingenuity Pathway Analysis（IPA）によって KEGG 分析。

C) miRNA 標的予測および機能アノテーションデータベース miRDB でスクリーニングした結果により、miR-125b のみが HIF1α 阻害を直接制御することを示した。

D) miRNA シーケンシングによって、miR-125b が WJ-EV に含まれていることを示した。

E) ウェスタンブロット解析により、低酸素条件下では、BCC と比較して、wBCC は HIF1α の発現障害を示した。

F) miR-125b を過剰発現させた BCC および miR-125b 阻害剤で処理した wBCC において、ウェスタンブロットにより、HIF1α の発現解析。**P＜0.01、***P＜0.001（(Mann-Whitney U test）。

その上、HIF1α の発現の調節における miR-125b の役割を決定するために、BCC で miR-125b を過剰発現させた。miR-125b の過剰発現は、BCC における HIF1α の発現を有意に阻害した（図 2F）。注目すべきことに、miR-125b 阻害剤で処理した wBCC は、HIF1α の下方制御を有意に逆転させた。miR-125b 阻害剤で処理した wBCC では HIF1α の発現が誘導され（2.1 倍増加、p＜0.001）（図 2F）、miR-125b が wBCC における HIF1α 発現の直接阻害剤であることが示唆された。

これらのデータは、wBCC の変化した行動が、HIF1α の下方制御による低酸素応答障害に関与している可能性を示唆した。注目すべきことに、miR-125b は wBCC における HIF1α の発現を阻害する重要な因子であり、miR-125b は WJ-EV から標的細胞に移動する。

3. 高レベルの miR-125b を含む改変 WJ-EV を収集するために必要な WJ-EV における miR-125b の過剰発現

WJ-EV の miR-125b レベルを増加させるために、WJ-MSC で miR-125b の過剰発現を実行し、これらの細胞から改変された EV（mi125-EV）を収集した。改変された mi125-EV の miR-125b レベルを元の WJ-EV と比較した。結果は、mi125-EV が元の WJ-EV よりも多量の miRNA-125 を示した（図 3A）。

次に mi125-EV を BCC に取り込み、レシピエント BCC の腫瘍形成能および転移能に対する影響を調べた。結果は、mi125-EV を取り込んだ BCC は、元の WJ-EV を取り込んだ BCC よりも少ない増殖（図 3B）および少ない球形成（図 3C）を示すことを示した。さらに、mi125-EV を取り込んだ BCC をマウスに注射し、腫瘍の増殖を元の BCC および WJ-EV を取り込んだ BCC と比較した。結果として、45 日後、元の BCC を注射したマウスは最大の腫瘍を示し、一方、mi125-EV を取り込んだ BCC を注射したマウスは最小の腫瘍を示した（図 3D）。

これらのデータは、WJ-MSC における miR-125b の過剰発現によって、BCC の増殖と転移を阻害する高い能力を持つ改変 WJ-EV が生成され、この改変 WJ-EV は TNBC の腫瘍内微小環境を標的とした新しい治療の有望なソースであることを示唆した。

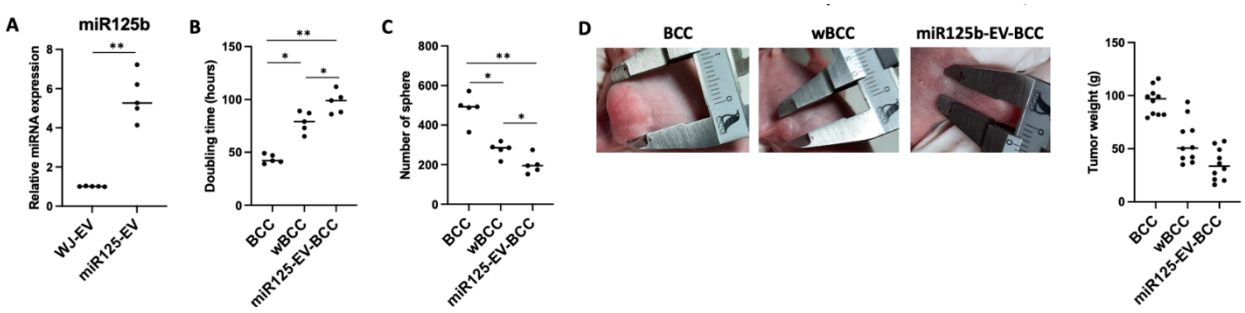


図 3. 高レベルの miR-125b を含む改変 WJ-EV を収集するために必要な WJ-EV における miR-125b の過剰発現

A） 改変された mi125-EV の miR-125b レベルを元の WJ-EV と比較の結果により、mi125-EV が元の WJ-EV よりも多量の miRNA-125 を示した。

B） 乳がん細胞の倍加時間。

C） 形成したスフェア数。

D） ヌードマウスにおいて、癌細胞注射の 60 日後 BCC、wBCC、および miR125-EV-BCC によって形成された腫瘍重量。

*P＜0.05、**P＜0.01、***P＜0.001（Mann-Whitney U test）。

考　察

HIF1α は、腫瘍の増殖と転移に好ましい環境を提供する上で重要な役割を果たしている。これまでの研究では、非 TNBC 患者の腫瘍と比較して、TNBC 患者の腫瘍では HIF-1α の発現が高いことが示された［10］。したがって、HIF1α シグナル伝達経路を標的とすることは、TNBC の重要な治療戦略であると考えられている。本研究では、低酸素条件下での BCC における HIF1α シグナル伝達経路の下方制御に WJ-EV が有効なツールであることを示唆した。我々の研究は、WJ-EV が miR-125b を BCC に移動させることによって wBCC の表現型を変化させ、その結果 HIF1α の発現障害が生じることを示唆した。さらに、wBCC の腫瘍形成能障害における miR-125b／HIF1α シグナル伝達経路の役割についても明らかにした。

腫瘍形成能力の低下に加えて、wBCC がパラクリン効果を有し、それが元の BCC の腫瘍形成能力および転移能力を損なうことを示し、WJ-EV を取り込むことによってがん細胞も形質転換されたことを示唆している。最近の研究では、がん細胞の挙動を変化させて本来の恒常性を遮断し、腫瘍の発生を調節することが、将来のがん治療法として有望であるとされている。血管新生に対する阻害効果に加えて、wBCC は腫瘍内微小環境における CAF 生成を阻害した。CAF は腫瘍内微小環境における最大の不均一細胞集団の 1 つであり、腫瘍の進行と転移をサポートする多様な機能を持っている。したがって、BCC と比較して、wBCC は、乳がん腫瘍の発生を軽減する対照的な細胞連動や細胞間コミュニケーションを示した。

元の WJ-MSC の遺伝子改変が、WJ-EV における miR-125b などの標的 miRNA のレベルの誘導につながり、これらの改変された mi125-EV は BCC の増殖と転移を阻害する能力を強化することを示した。しかしながら、mi125-EV を腫瘍抑制に適用するには、これらの EV が腫瘍部位を特異的に標的にできるかどうかを調べる必要がある。したがって、次のステップとして、乳房腫瘍内の BCC を直接標的にすることができる特定の因子で mi125-EV の膜を改変することが求められる。

文　献

1） Won, K. A., Spruck, C. Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives. Int. J. Oncol. 57, 1245–1261 (2020). PMID: 33174058. DOI: 10.3892/ijo.2020.5135. Epub 2020 Oct 16.

2） Yin, L., Duan, J. J., Bian, X. W., Yu, S. C. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. Breast Cancer Res. 22 (2020). PMID: 32517735. DOI: 10.1186/s13058-020-01296-5.

3） Quail, D. F. & Joyce, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Nat. Med. 19, 1423–1437 (2013). PMID: 24202395. DOI: 10.1038/nm.3394

4） Maacha, S., Bhat, A., Jimenez, L., Raza, A., Haris, M., Uddin, S., Grivel, J., Extracellular vesicles-mediated intercellular communication: Roles in the tumor microenvironment and anti-cancer drug resistance. Mol. Cancer 18 (2019). PMID: 30925923. DOI: 10.1186/s12943-019-0965-7

5） Wang, B., Yan, X., Wei, Y., Lv, L., Liu, N., Lin, R., Wang, X., Shi, B., Human mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNA-143 promotes apoptosis and suppresses cell growth in pancreatic cancer via target gene regulation. Front. Genet. 12 (2021). PMID: 33643376. DOI: 10.3389/fgene.2021.581694

6） Chang YH, Vuong CK, Ngo NH, Yamashita T, Ye X, Futamura Y, Fukushige M, Obata-Yasuoka M, Hamada H, Osaka M, Hiramatsu Y, Sakurai T, Ohneda O. Extracellular vesicles derived from Wharton's Jelly mesenchymal stem cells inhibit the tumor environment via the miR-125b/HIF1α signaling pathway. Sci Rep. 2022 Aug 8;12(1):13550. PMID: 35941273. DOI: 10.1038/s41598-022-17767-y.

7） Li, W., Li, G., Fan, Z. & Liu, T. Tumor-suppressive microRNA-452 inhibits migration and invasion of breast cancer cells by directly targeting RAB11A. Oncol. Lett. 14, 2559–2565 (2017). PMID: 28781694. DOI: 10.3892/ol.2017.6426

8) Mao, G., Mu, Z. & Wu, D. Exosome-derived miR-2682-5p suppresses cell viability and migration by HDAC1-silence-mediated upregulation of ADH1A in non-small cell lung cancer. Hum. Exp. Toxicol. 40, S318–S330 (2021). PMID: 34477002. DOI: 10.1177/09603271211041997

9) Ding, N., Hua, J. , He, J., Lu, D., Wei, W., Zhang, Y., Zhou, H., Zhang, L., Liu, Y., Zhou, G., Wang, J., The role of miR-5094 as a proliferation suppressor during cellular radiation response via downregulating STAT5B. J. Cancer 11, 2222–2233 (2020). PMID: 32127949. DOI: 10.7150/jca.39679

10) Emami Nejad, A. Najafgholian, S., Manian, M., The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment. Cancer Cell Int. 21 (2021). PMID: 33472628. DOI: 10.1186/s12935-020-01719-5