

表 題 MicroRNA 医薬を用いた新規消化器癌腹膜播種治療法の確立

論文の区分 博士課程

著 者 名 木村 有希

担当指導教員氏名 佐田 尚宏 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
専攻 地域医療学
専攻分野 消化器疾患学
専攻科 消化器外科学

2023年1月10日申請の学位論文

(背表紙)

MicroRNA 医薬を用いた新規消化器癌腹膜播種治療法の確立

木村 有希



注：冊子にした時に下5センチ必ず空けてください。

目次

略語一覧	4
1. 序文	7
2. 実験材料と方法	13

2-1. miR-29b の腹膜中皮細胞への作用の検討

使用した実験材料試薬と抗体

2-1-1. 細胞の培養

2-1-2. 腹膜中皮細胞の分離・培養法

2-1-3. 腹膜中皮細胞の中皮間葉転換の誘導

2-1-4. 細胞へのマイクロ RNA 導入

2-1-5. サンプルからの RNA 抽出とデジタル PCR 法

2-1-6. 免疫染色とウェスタンブロット法による中皮間葉転換関連マーカーの評価

2-1-7. 細胞の増殖能・遊走能に対する作用の評価

2-1-8. 胃癌細胞の腹膜中皮細胞に対する接着能への作用の評価

2-1-9. マウス胃癌腹膜播種モデルにおける miR-29b による播種抑制実験

2-2. 骨髄間葉系幹細胞由来エクソソームを用いた miR-29b 投与法の検

討

2-2-1. マウス骨髄間葉系幹細胞の分離・培養と同定

2-2-2. 骨髄間葉系幹細胞からのエクソソーム抽出と同定

2-2-3. 骨髄間葉系幹細胞由来エクソソームへのマイクロ RNA 導入と
miR-29 発現の確認

2-2-4. 骨髄間葉系幹細胞由来 miR-29 内包エクソソームによる腹膜中皮
細胞の中皮間葉転換の抑制

2-2-5. マウス胃癌腹膜播種モデルにおける miR-29b 内包エクソソーム
による播種抑制実験

2-3. データの統計処理

3. 結果 29

3-1. miR-29b の腹膜中皮細胞への作用の検討

3-1-1. 細胞の miR-29b 発現レベル

3-1-2. ヒト腹膜中皮細胞の miR-29b の導入効率

3-1.3. ヒト腹膜中皮細胞の TGF- β 1 刺激による変化と miR-29b の作用

3-1-4. ヒト腹膜中皮細胞の TGF- β 1 刺激による増殖能や遊走能の変化
に対する miR-29b の抑制作用

3-1-5. ヒト腹膜中皮細胞の TGF- β 1 刺激による胃癌細胞の接着能の変化に対する miR-29b の抑制作用

3-1-6. ヒト腹膜中皮細胞の TGF- β 1 刺激による Fibronectin1 発現の変化に対する miR-29b の抑制作用

3-1-7. 胃癌細胞株の増殖能や遊走能に対する miR-29b の抑制作用

3-1-8. ヒト腹膜中皮細胞の胃癌細胞浸潤に対する miR-29b の抑制作用

3-1-9. マウス腹膜中皮細胞の TGF- β 1 刺激に対する miR-29b の抑制作用

3-1-10. マウス胃癌腹膜播種に対するアテロコラーゲンを用いた miR-29b 腹腔内局所投与の作用

3-2. 骨髄間葉系幹細胞由来エクソソームを用いた miR-29b 投与法の検討

3-2-1. ヒト骨髄間葉系幹細胞由来エクソソームへの miR-29b 導入

3-2-2. ヒト腹膜中皮細胞の TGF- β 1 刺激による形態や細胞マーカー変化や Fibronectin1 発現に対するヒト骨髄間葉系幹細胞由来エクソソーム内包 miR-29b の抑制作用

3-2-3. ヒト腹膜中皮細胞の TGF- β 1 刺激による増殖能・遊走能に対するヒト骨髄間葉系幹細胞由来エクソソーム内包 miR-29b の抑制作用

3-2-4. ヒト腹膜中皮細胞の TGF- β 1 刺激による胃癌細胞との接着能に
対するヒト骨髄間葉系幹細胞由来エクソソーム内包 miR-29b による抑
制作用

3-2-5. 胃癌細胞株の増殖能と遊走能に対するヒト骨髄間葉系幹細胞由
来エクソソーム内包 miR-29b の抑制作用

3-2-6. マウス骨髄間葉系幹細胞の分離培養と同定

3-2-7. マウス骨髄間葉系幹細胞由来エクソソームの抽出と同定

3-2-8. マウス骨髄間葉系幹細胞由来エクソソームへの miR-29b 導入

3-2-9. マウス胃癌腹膜播種に対する骨髄間葉系幹細胞由来エクソソ
ームを用いた miR-29b 腹腔内局所投与の抑制作用

4. 考察	54
5. 結語	61
6. 謝辞	62
7. 参考文献	62

略語一覧

略語	名称
APC	Allophycocyanin
BMSCs	Bone-marrow derived mesenchymal stem cells
BSA	Bovine serum albumin
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	Epidermal Growth factor receptor
EMT	Epithelial to mesenchymal transition
FBS	Fetal bovine serum
FCM	Flow cytometry
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FN	Fibronectin1
HPF	High power field
HPMCs	Human peritoneal mesothelial cells
miRNA	マイクロ RNA
miR-29b	マイクロ RNA-29b

miR-NC	ネガティブコントロール miRNA
MMT	Mesothelial-to-mesenchymal transition
MPMCs	Mouse peritoneal mesothelial cells
NTA	Nano-tracking analysis
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PMCs	Peritoneal mesothelial cells
OS	Overall survival
7-AAD	7-Amino-Actinomycin D

1. 序文

腹膜播種は消化器癌において頻度の高い転移・再発様式であり、予後を規定する重要な因子である(1)。近年の薬物療法の進歩により、根治切除不能・再発消化器癌患者の治療成績は著しく向上したが、腹膜播種に関しては未だに顕著な改善を得られていない(2-4)。特に、胃癌や膵癌では肉眼的根治手術を施行したものの、術後に腹膜播種再発をきたし、予後不良な転帰をとる症例を多数経験する(5-7)。したがって、患者の予後改善には、腹膜播種再発の予防および治療方法の確立が極めて重要である。

腹膜は、臓器や腹壁など腹腔内を被覆する単層の中皮細胞とその下層の薄い結合織からなり、腹膜播種の成立において重要な役割を担うとされている。通常の腹膜中皮細胞は細菌の侵入や腫瘍の接着に対するバリアとして働く。しかし、機械的損傷や腹膜透析など様々な刺激を受けると、腹膜中皮細胞は中皮間葉転換（Mesothelial-to-mesenchymal transition：MMT）をきたして腹膜播種の成立・進行を助長するといわれている(8-11)（図1）。中皮間葉転換は、腹膜中皮細胞の細胞間結合を失わせ、遊走性を亢進させて、細胞外マトリックスや炎症性因子、線維化促進因子、血管新生因子を産生させることで、腹膜播種の発生過程において非常に重要なステップを担うと考えられている(12-14)。

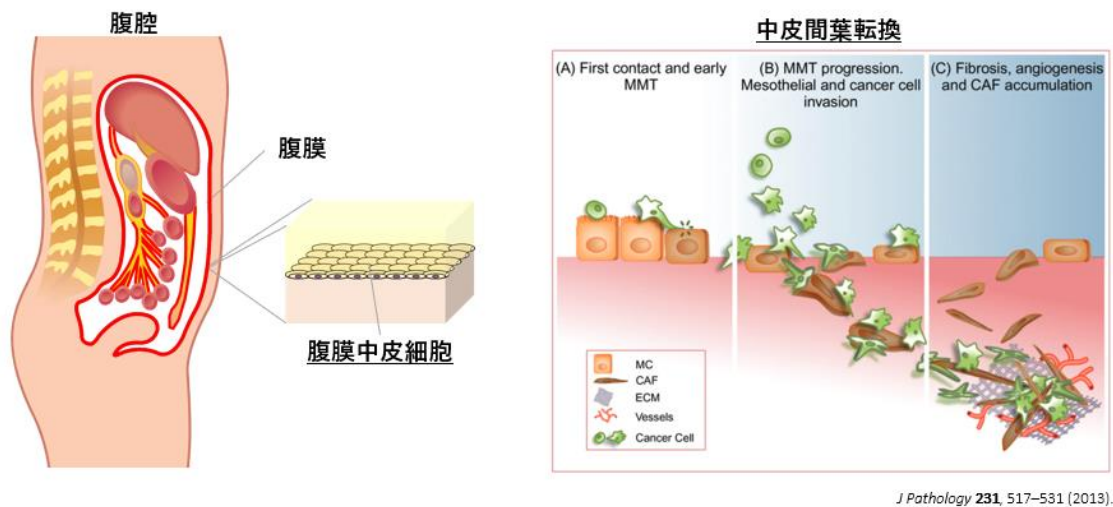


図1 腹膜中皮細胞の中皮間葉転換

癌の転移形成には免疫を含めた宿主側の微小環境が重要な役割を果たしている。近年の研究で、癌患者の血中にはがん特異的な機能分子を多量に含有したエクソソームが存在し、標的臓器の微小環境を癌細胞の生育に適した環境に変換することにより、血行性転移の成立を可能にしていることが解ってきた(15)。特に、マイクロRNA (miRNA) はエクソソーム中に豊富に存在する機能性核酸で、複数の分子発現を同時に制御することで微小環境を大きく変化させ、癌転移のカギとなる役割を果たしていることが指摘されている(15-17) (図2)。腹膜播種においても、転移の成立を促す miRNA を内包したエクソソームが腹腔内に放出され、腹膜組織に前転移ニッチを形成して播種性転移を助長する同様のシナリオが存在すると推測される。しかし、良質な動物モデルがない

ことやヒトサンプルの採取の困難さから、腹腔内エクソソーム中のマイクロRNAの発現や分子機能については十分な解析がされておらず、腹膜播種の病態における意義については不明な点が多い。

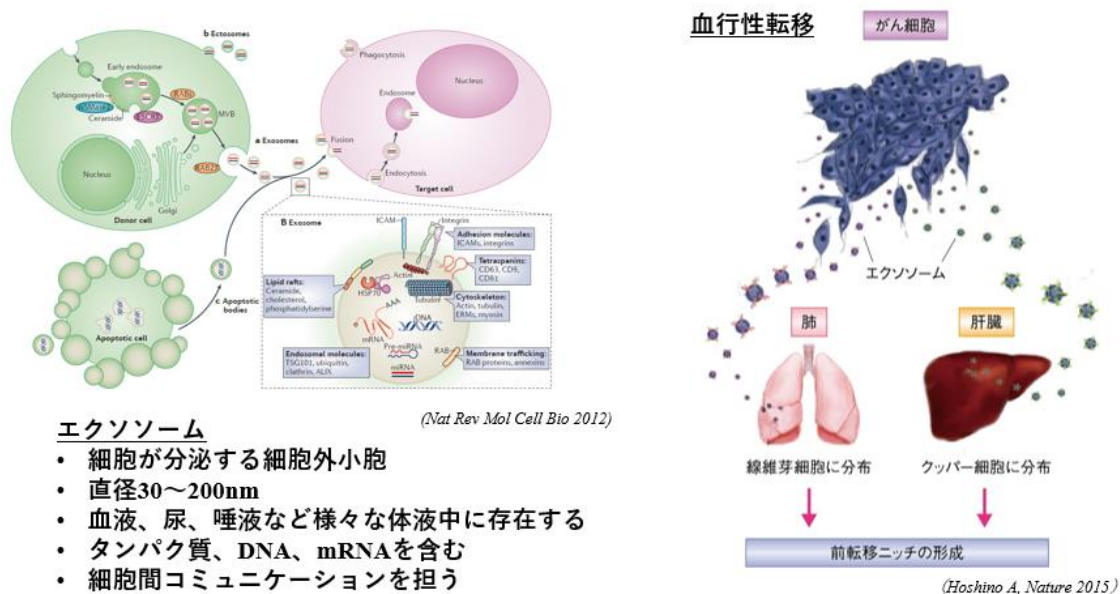


図2 がんの血行性転移におけるエクソソームの役割

当研究室では、これまでに腹腔内液中のRNA成分に注目した新規バイオマーカーを探索する基礎的研究を施行し、腹膜播種患者の腹腔内エクソソーム中で発現の変化がみられるマイクロRNA群を同定した(18)。その中でもマイクロRNA-29 (miR-29) family は播種患者で顕著に低下しており、そのうち特に miR-29b は、根治手術を施行した T4 胃癌症例における手術時の洗浄液中で発現が低下している症例で腹膜播種再発が多く、術後の播種再発の予測マーカーとなることを報告してきた(19) (図3)。

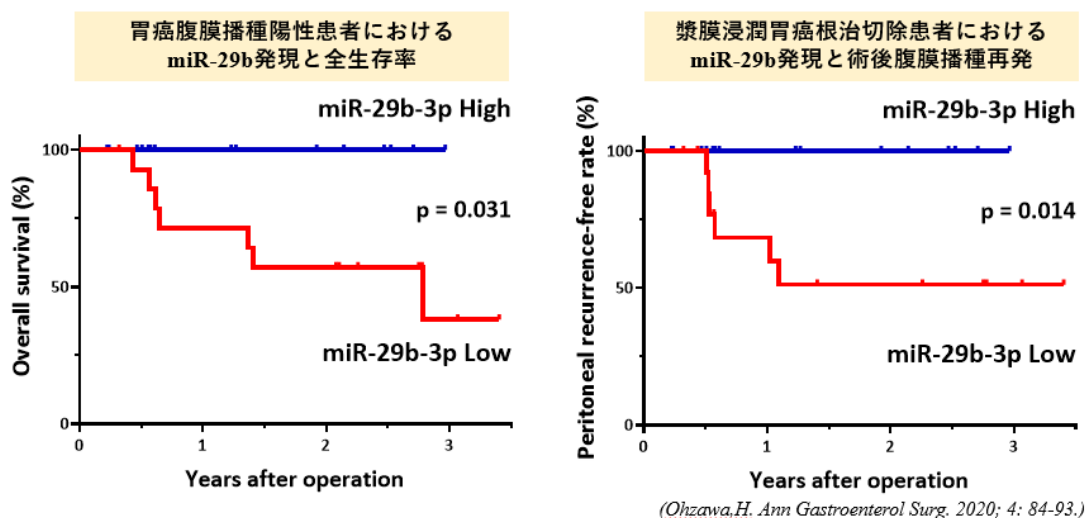
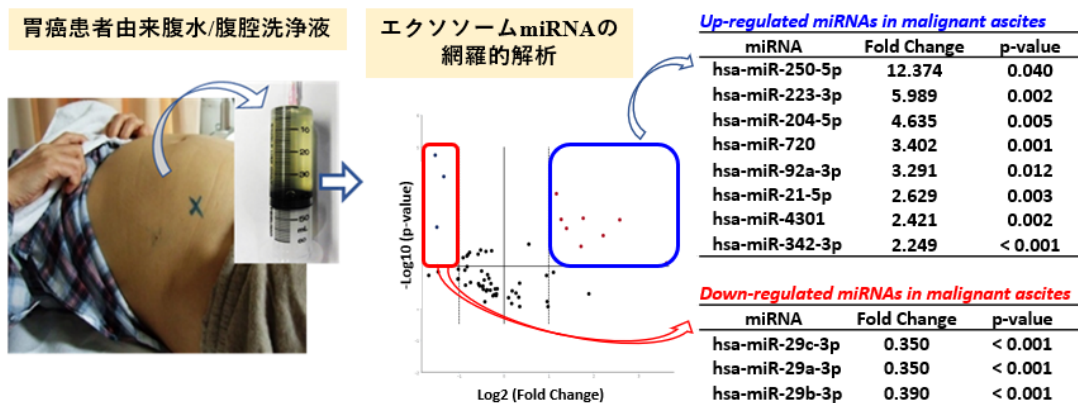


図3 胃癌腹膜播種患者の腹腔内エクソソーム中miRNAの発現

miR-29b は、様々な癌種において細胞周期の休止による細胞増殖の抑制(20)やアポトーシスの誘導(21)、血管新生(22)や線維化(23)を抑制し、腫瘍抑制性に働くことが多くの研究により報告されている(24)。これまで miR-29b の腹膜中皮細胞に対する作用や胃癌腹膜播種の成立・進展における役割は明らかになっていない。しかし、miR-29b はカテニン、 β -インテグリン、マトリックスメタロプロテアーゼを含む様々な遺伝子を標的としてがん細胞の上皮間葉転換

(Epithelial to mesenchymal transition ; EMT) を強く抑制すると報告されており (24-26) (図 4)、これらの EMT によって生じる上皮細胞の変化は、腹膜中皮細胞に生じる変化と共通することから、miR-29b は腹膜中皮細胞の中皮間葉転換 (Mesothelial to mesenchymal transition ; MMT) も抑制する可能性があると考えられる (27)。



図4 これまで報告されている miR-29b の作用

以上の事実から、「消化器癌腹膜播種患者の腹腔内に miR-29b を補充することにより、腹膜中皮細胞の中皮間葉転換を介して腹膜播種の成立を抑制することが可能になるのではないか」という仮説を立て、この研究を企画した。

本研究では、まず、miR-29b のヒト腹膜中皮細胞 (Human peritoneal mesothelial cells ; HPMCs) に対する作用を検討し、腹膜播種の成立過程における miR-29b の役割を解明した。次に、免疫能を有する同系マウス胃癌腹膜播種モデルを作成し、

(1)アテロコラーゲンを用いて miR-29b を腹腔内に局所投与する方法

(2) 骨髄由来間葉系幹細胞 (Bone-marrow derived mesenchymal stem cells ; BMSCs) 由来のエクソソームに封入した miR-29b を腹腔内に局所投与する方法の二つの方法を用いて腹膜播種抑制能を検討した。

2. 実験材料と方法

表1 使用した試薬・抗体

N/A: Not Applicable

商品名	clone/一般名	会社
Advanced DMEM	-	ThermoFisher Scientific
Aldhyde/Sulfate latex beads	-	Invitrogen
Anti-human/mouse β-actin	13E5	Cell Signaling Technology
Anti-human/mouse Calretiniin	EP1798	Cell Signaling Technology
Anti-human/mouse E-cadherin	EP700Y	Abcam
Anti-human/mouse E-cadherin	24E10	Cell Signaling Technology
Anti-human/mouse Fibronectin1	FBN11	Invitrogen
Anti-human/mouse Fibronectin1	F1	Abcam
Anti-human β1 integrin	P5D2	Cayman Chemical Co.
Anti-human CD9 (PE)	MZ3	Invitrogen
Anti-human/mouse CD63	NVG-2	BD Biosciences
Anti-human/mouse Vimentin	V9	Invitrogen
Anti-mouse CD31 (PE)	390	BioLegend
Anti-mouse CD34 (APC)	HM34	BioLegend
Anti-mouse/human CD44 (PE)	QA19A43	BioLegend
Anti-mouse CD73 (APC)	TY/11.8	BioLegend
Anti-mouse CD90 (PE)	53-2.1	BioLegend
Anti-rabbit IgG(H+L) AlexaFluor 488	N/A	Invitrogen
Anti-rabbit IgG(H+L) AlexaFluor 595	N/A	Invitrogen
Blocking One	-	ナカライテスク
CellTrace CFSE	-	Life technology
chemiluminescence reagent	-	ナカライテスク
DAPI	N/A	同仁堂
Dif-Quick	-	Sysmex
DMEM	-	ThermoFisher Scientific
Fc-block reagent	N/A	Miltenyi

HPR-conjugated secondary antibodies	N/A	Cytiva
human TGF-β1	N/A	R&D systems
Isoflurane	N/A	Viartis
Isotype control IgG2a (APC)	RMG1-1	BioLegend
Isotype control IgG2a (PE)	RMG1-1	BioLegend
Isotype control IgG2b (PE)	RTK2758	BioLegend
Lipofectamin RNAiMAX	-	Invitrogen
MesenCult Expansion Kit	-	Veritas
miRNeasy kit	-	Qiagen
miR Negative control	-	Invitrogen
miR-29b mimic	-	Invitrogen
mouse TGF-β1	N/A	R&D systems
MTS	-	Promega
Polybrene	-	Sigma aldrich
pLV-miRNA Expression Vector System		Biosettica
Qubit protein assay kit	-	ThermoFisher Scientific
TaqMan miRNA Reverse Transcription Kit	-	Applied BioSystems
TrypLE Express	-	ThermoFisher Scientific
Tween 20	-	Sigma aldrich
RGD peptide	-	Santa Cruz
2X QuantStudio 3D Digital PCR Master Mix	-	Applied BioSystems
20X TaqMan microRNA Assays	-	Applied BioSystems
7-AAD	-	Invitrogen

使用したオリゴヌクレオチドの配列：

miR-29b mimic 5'-UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU-3'

has-mir-29b-1

5'-CUUCAGGAA GCUGGUUUCAUAUGGUGGUUUAGAUUAAAUAG
UGAUUGUCUAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUUCUUGGGGG-3'

表 2 使用した細胞株

細胞名	癌種	会社
MKN45	ヒト胃癌細胞	理科研
NUGC-4	ヒト胃癌細胞	理科研
UE6E7T-12	ヒト骨髄由来 間葉系幹細胞	JCRB 細胞バンク
YTN16P	マウス胃癌細胞	東京大学

2-1. miR-29b の腹膜中皮細胞への作用の検討

2-1-1. 細胞の培養

ヒト胃癌細胞株の NUGC-4、MKN45 は理科研（日本）、ヒト骨髄間葉系幹細胞株である UE6E7T-12 は JCRB 細胞バンク（日本）より購入した。細胞は、Dulbecco's Modified Eagle Medium（DMEM）、10% fetal bovine serum（FBS）、ペニシリン 100U/ml、ストレプトマイシン 100mg/ml を用いて、37°C、5% CO₂、インキュベーター内で培養した。

マウス胃癌細胞株の YTN16P は、DMEM、10% FBS、L-glutamine、MITO+ serum extender（Corning, USA）、ペニシリン 100U/ml を用いて、I 型コラーゲンコーティングディッシュで 37°C、5% CO₂、インキュベーター内で培養した。

2-1-2. 腹膜中皮細胞の分離・培養法

自治医科大学の倫理委員会（承認番号臨 A21-048）によって承認され、ヘルシンキ宣言の指針に従って行った。当科で施行された肥満症に対する胃スリーブ術時に切除された胃に付着した大網組織を採取した。大網表面を Phosphate buffered saline（PBS）で洗浄し、TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific, USA) 10ml + PBS 10ml に入れ、37°Cの恒温槽で1時間振盪した。次に上清を 100 μ m メッシュで濾過し、1500rpm、5分間、4°Cで遠心して、細胞ペレットを DMEM 培地(20% FBS 含有)で懸濁し collagen I コーディング 10cm ディッシュに播種させて 5% CO₂, 37 °Cで培養した。90%コンフルエントとなった段階で継代し、実験には分離後3継代目までを使用した。

マウス腹膜中皮細胞（Mouse peritoneal mesothelial cells；MPMCs）は、C57BL/6（8週齢、メス）より大網を採取し、HPMCsと同様に TrypLE Express を用いたプロトコールで分離培養した。DMEM 培地(20% FBS 含有)で懸濁し collagen I コーディング 10cm ディッシュに播種させて 5% CO₂, 37 °Cで培養した。90%コンフルエントとなった段階で継代し、実験には分離後3継代目までを使用した。

2-1-3. 腹膜中皮細胞の中皮間葉転換の誘導

腹膜中皮細胞を DMEM 培地(20% FBS 含有)で懸濁し 6-well プレートに播種した。50-60%コンフルエントとなるように培養した後、TGF- β 1 10ng/ml（R&D

systems, USA) を添加し、37°C、48 時間培養して MMT を誘導した。各群 HPMCs への miRNA などの試薬は、MMT の誘導と同時に添加して各実験に使用した。

2-1-4. 細胞へのマイクロ RNA 導入

細胞を DMEM 培地に懸濁して 6well-プレートに播種して 37°C で培養した。翌日、抗生物質を含まない DMEM 培地に交換し、miR-29b-3p mimic (miR-29b) または negative controls miRNA (miR-NC) (終濃度 50nM) (Thermo Fisher Scientific, USA) に Lipofectamin RNAiMAX (終濃度 50nM) (Invitrogen, USA) を加えて複合体を形成させて添加し、37°C、48 時間反応させて導入した。(図 5)

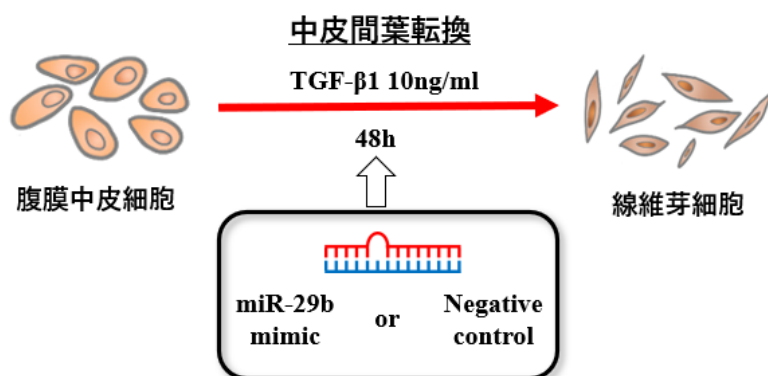


図5 腹膜中皮細胞の中皮間葉転換の誘導と miRNA の導入法

2-1-5. サンプルからの RNA 抽出とデジタル PCR 法

腹膜中皮細胞や細胞株から miRNeasy kit (Qiagen, Germany) を用いて、添付文書に則ってマイクロ RNA を含む total RNA を抽出した。cDNA は total RNA 20ng よ

り TaqMan miRNA Reverse Transcription Kit (Applied BioSystems, USA)を用いて逆転写を行い合成した。miR-29b 発現は QuantStudio 3D Digital PCR System platform を用いて比較した。cDNA 5 μ l に 2X QuantStudio 3D Digital PCR Master Mix (Applied BioSystems, USA) 7.5 μ l、20X TaqMan microRNA Assays (Applied BioSystems, USA) 0.75 μ l、nuclease-free water (Qiagen, Germany) 1.75 μ l を混合し、QuantStudio 3D Digital PCR Chip Loader を用いて QuantStudio 3D Digital PCR 20 K Chip (Applied BioSystems, USA) にローディングした。次に Chip を ProFlex PCR System (Applied BioSystems, USA) で PCR (96°C 10 分、(60°C 2 分, 98°C 30 秒) \times 39 回、60°C 2 分、10°C ∞) を行い、QuantStudio 3D Digital PCR System (Applied BioSystems, USA) で計測して、ThermoFisher connect クラウドの AnlysisSuite アプリで解析した。

2-1-6. 免疫染色とウエスタンブロット法による中皮間葉転換関連マーカーの評価

腹膜中皮細胞を 24 ウェルプレートに DMEM 培地(20% FBS 含有)で 5.0×10^5 個ずつ播種した。翌日 TGF- β 1 10ng/ml (R&D systems, USA) を添加し、同時にリポフェクション法で miRNA を導入して 37°C、48 時間培養した。免疫染色は、HPMCs を PBS で洗浄し、4%パラホルムアルデヒド (室温、10 分) で固定処理

を行った後、PBS で洗浄して 0.5% Tween-20 (Sigma aldrich, USA) (室温、20 分) で透過処理を行った。次に HPMCs を PBS で洗浄後に 3% BSA 溶液 (室温、60 分) で非特異的染色に対するブロッキングを行った。1 次抗体 (E-cadherin(1:200) (Abcam, UK)、Calretinin (1:500) (Cell Signaling Technology, USA)、Vimentin (1:1000) (Invitrogen, USA)、Fibronectin1 (FN) (1:150) (Invitrogen, USA)) は 1%BSA 溶液に希釈して、室温、60 分反応させた。次に PBS で洗浄し、二次抗体 (Anti-rabbit IgG(H+L) AlexaFluor 488、 Anti-rabbit IgG(H+L) AlexaFluor 595) (1:2000) (Invitrogen, USA) を室温、30 分反応させた後に DAPI (1:1000) (同仁堂, 日本) で核染色して蛍光顕微鏡で細胞形態と、各細胞マーカーの発現を観察した。

ウエスタンブロット法は各群の細胞から RIPA buffer (富士フイルム和光, 日本) を用いて作成したタンパク溶解液 40 μ g を PVDF 膜に転写し、Blocking One (ナカライテスク, 日本) (室温、60 分) でブロッキングし、一次抗体 (E-cadherin (1:1000, Cell Signaling Technology, USA)、Vimentin (1:500, Invitrogen, USA)、 β -actin (1:1000, Cell Signaling Technology, USA) Fibronectin1 (1:1000, Abcam, USA)) を 4°C、20 時間反応させた。次に 2 次抗体 (HPR-conjugated secondary antibodies; 1:50000, Cytiva, Japan) (室温、1 時間) で反応させ、chemiluminescence reagent (ナカライテスク, 日本) で発光させて Bio-rad Gel Doc EZ imager (Bio-rad laboratories,

USA) を用いて解析した。

2-1-7. 細胞の増殖能・遊走能に対する作用の評価

NUGC-4、MKN45 に miRNA をリポフェクション法で導入した後に回収し、96 ウェルプレートに DMEM 培地(10% FBS 含有)で 1.0×10^4 個ずつ播種して 37°C、48 時間培養した。続いて各ウェルに MTS (Promega, 日本) を加えて 37°C、3 時間培養し、マイクロプレートリーダー (Tecan spark 10M; Tecan, USA) で増殖能を測定した。腹膜中皮細胞は TGF- β 1 刺激と同時にマイクロ RNA 導入をおこなった 48 時間後に回収し、96 ウェルプレートに DMEM 培地 (20%FBS 含有) で 1.0×10^4 個ずつ播種した。37°C、24 時間培養し、MTS を添加して、37°C、3 時間培養後にマイクロプレートリーダーで測定した。

NUGC-4、MKN45 にマイクロ RNA をリポフェクション法により導入した後に回収し、24 ウェルプレート用 8 μ m pore セルカルチャーインサート (Corning, USA) 上に DMEM 培地 (0%FBS) 100 μ l に懸濁して 5.0×10^5 個ずつ播種した。プレートウェル内には DMEM 培地 (10%FBS 含有) 500 μ l を添加し、37°C、48 時間培養した。遊走細胞は、インサート膜上面は綿棒で細胞をぬぐい取り、下面を PBS で洗浄後に Dif-Quick (Sysmex, 日本) で染色し、顕微鏡下で付着した細胞数をカウントした。腹膜中皮細胞は TGF- β 1 刺激による MMT の誘導とリポフェクシ

ン法による miRNA 導入を行った後に回収し、同様の手順で 72 時間培養した後に残存する細胞数をカウントした。

2-1-8. 胃癌細胞の腹膜中皮細胞に対する接着能への作用の評価

腹膜中皮細胞は TGF- β 1 刺激と同時に Anti-human β 1 integrin 抗体 (Cayman Chemical Co, USA) 20 μ g/ml、RGD peptide (Cayman Chemical Co, USA) 40 μ M またはリポフェクション法による miRNA 導入を行った 48 時間後に回収し、96 ウェルプレートに DMEM 培地 (20%FBS 含有) で 3.0×10^4 個ずつ播種して 37 $^{\circ}$ C、72 時間程度培養して単層化させた。続いて CellTrace CFSE (5 μ g/ml) (Life technology, USA) で 37 $^{\circ}$ C、15 分染色した NUGC-4 または MKN45 1.0×10^4 個/ウェルを単層化した腹膜中皮細胞上に播種し、37 $^{\circ}$ C、15 分培養した。PBS で 3 回洗浄後に残存する癌細胞を蛍光顕微鏡で同定し、1 視野内の数をカウントした。

(図 6)

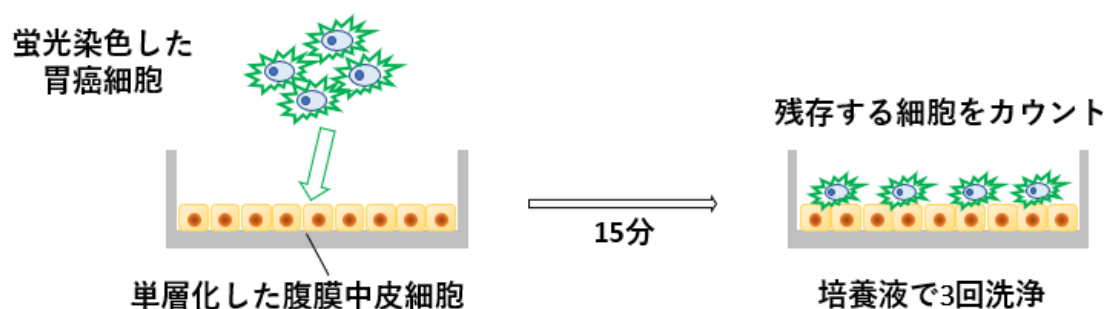


図6 腹膜中皮細胞と癌細胞の接着実験プロトコール

2-1-9. マウス胃癌腹膜播種モデルにおける miR-29b による播種抑制実験

腹膜播種モデルとして、当科にて以前に作成したマウス胃癌細胞 YTN16P を用いた。この細胞は、C57BL/6 マウス由来胃癌細胞株 YTN16 から in vivo selection を行い、腹腔内投与後 14 日目にはほぼ全例に多数の腹膜播種をきたす腹膜播種高転移株である(28) (図 7A)。この YTN16P 1.0×10^6 を HBSS 200 μ l に希釈して C57BL/6 野生型 (メス、8 週齢) (日本クレア, 日本) に腹腔内投与し、投与後の 3 日目よりアテロコラーゲン 80 μ l に混和した miR-29b mimic または miR-NC 2 μ g を 3 日毎に腹腔内に局所投与し、14 日目に安楽死させ、腸間膜と大網に形成された播種結節数を比較した。(図 7B)

本研究における全ての動物実験は自治医科大学動物実験規定 (平成 22 年規定第 51 号) に従って施行し、本実験系は自治医科大学動物実験委員会承認 (承認番号: 20043-01) の上に施行した。

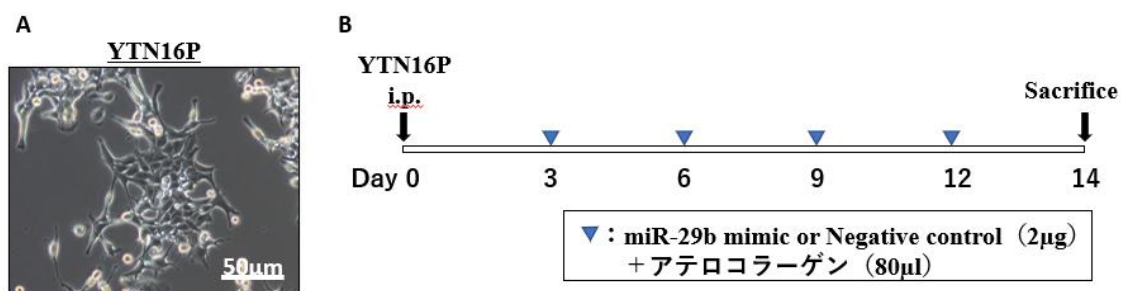


図7 マウス胃癌腹膜播種モデルの miR-29b アテロコラーゲン導入法による治療プロトコール

2-2. 骨髄間葉系幹細胞由来エクソソームを用いた miR-29b 投与法の検討

2-2-1. マウス骨髄間葉系幹細胞の分離・培養と同定

C57BL/6 マウス（6 週齢、メス）をイソフルラン（Viatris, USA）により安楽死させ、大腿骨を採取し、骨髄細胞を PBS で洗浄して抽出した。続いて 6 ウェルプレートで MesenCult Expansion Kit (Veritas, 日本)を用いて 3 継代ほど培養し、BMSCs を分離培養した。

分離培養した BMSCs を Fc block（4 °C, 10 分）で処理後、抗体（Anti-mouse CD31(APC)抗体 (BioLegend, USA)、Anti-mouse CD34(APC)抗体 (BioLegend, USA)、Anti-mouse/human CD44(PE)抗体（BioLegend, USA）、Anti-mouse CD49d(PE)抗体（BioLegend, USA）、Anti-mouse CD73(APC)抗体（BioLegend, USA）、Anti-mouse CD90(PE)抗体（BioLegend, USA））を用いて室温、1 時間で染色した。PBS で洗浄して遠心後（1500 rpm 5 分×3 回）、7-AAD による死細胞染色を行い、フローサイトメトリー（Flow cytometry ; FCM）(FACS Calibur, BD, USA) で測定し、CellQuest Pro Software（BD, USA)を用いて解析した。

2-2-2. 骨髄間葉系幹細胞からのエクソソーム抽出と同定

BMSCs を 10cm ディッシュで約 50%コンフルエントとなるように培養した。PBS で洗浄後に培地を Advanced DMEM 12ml に交換し、37°C、48 時間培養した。

そして培養上清を遠心後（1500 rpm、4°C、5分）、上清を200 μ m フィルターでろ過して超遠心（35000g、4°C、70分）を行い、エクソソームを抽出した。エクソソームのペレットはPBS 200 μ l に懸濁し、-80°Cで凍結保存した。

エクソソーム量は、Qubit protein assay kit（Thermo Fisher Scientific, USA）を用いて Qubit Fluorometer（Thermo Fisher Scientific, USA）でタンパク濃度を測定した。

エクソソームを電子顕微鏡（HT-7700、日立ハイテクノロジーズ、日本）と NanoSight LM10 (Malvern, UK)で観察した。また、エクソソームの表面マーカーをアルデヒドサルフェースラテックスビーズ（Invitrogen, USA）に吸着させてフローサイトメトリーで測定した。エクソソームをビーズに吸着させ、3%BSA 溶液でブロッキング後（60分、室温）に1次抗体（Anti-human CD9抗体（BD Bioscience, USA）、Anti-human CD69抗体（BD Bioscience, USA））に室温、1時間反応させ、二次抗体（Anti-rabbit IgG(H+L) AlexaFluor 488、Anti-rabbit IgG(H+L) AlexaFluor 595）（1:2000）（Invitrogen, USA）を室温、30分反応させてフローサイトメトリーで観察した（図8）。

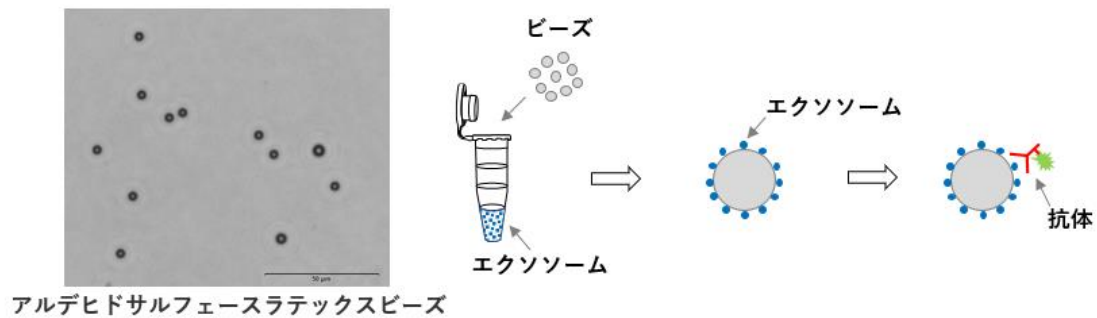


図8 エクソソームのASビーズ吸着によるFCM解析

2-2-3. 骨髄間葉系幹細胞由来エクソソームへのマイクロRNA導入とmiR-29発現の確認

pLV-miRNA Expression Vector System (Biosettica, USA) を用いて、推奨に従った方法にて miR-29b 前駆体配列を組み込んだレンチウイルスを作成した(29)。そして、ヒト骨髄間葉系幹細胞株 (UE6E7T-12)、マウス骨髄間葉系幹細胞を 6 ウェルプレートで約 50%コンフルエントとなるように培養し、抗生剤を含まない DMEM (10%FBS 含有) に培地を交換して、miR-29b 前駆体配列を組み込みレンチウイルスとポリブレン (Sigma, USA) 10ng/ml を添加し 37°C、20 時間、低酸素 (5%) で培養した。新しい DMEM (10%FBS 含有) に培地を交換し、37°C、48 時間、低酸素 (5%) で培養して導入した (図 9)。

続いて、レンチウイルスにより miR-29b を導入した BMSCs とその産生されたエクソソームより miRNeasy kit を用いて miRNA を抽出した。cDNA は miRNA

15ng より TaqMan miRNA Reverse Transcription Kit を用いて逆転写を行い合成した。miR-29b 発現は QuantStudio 3D Digital PCR System platform を用いて比較した。cDNA 5 μ l に 2X QuantStudio 3D Digital PCR Master Mix 7.5 μ l、20X TaqMan microRNA Assays 0.75 μ l、nuclease-free water 1.75 μ l を混合し、QuantStudio 3D Digital PCR Chip Loader を用いて QuantStudio 3D Digital PCR 20 K Chip にローディングした。次に Chip を ProFlex PCR System で PCR (96 $^{\circ}$ C 10 分、(60 $^{\circ}$ C 2 分、98 $^{\circ}$ C 30 秒) \times 39 回、60 $^{\circ}$ C 2 分、10 $^{\circ}$ C ∞) を行い、QuantStudio 3D Digital PCR System で計測し、ThermoFisher connect クラウドの AnlysisSuite アプリで解析した。

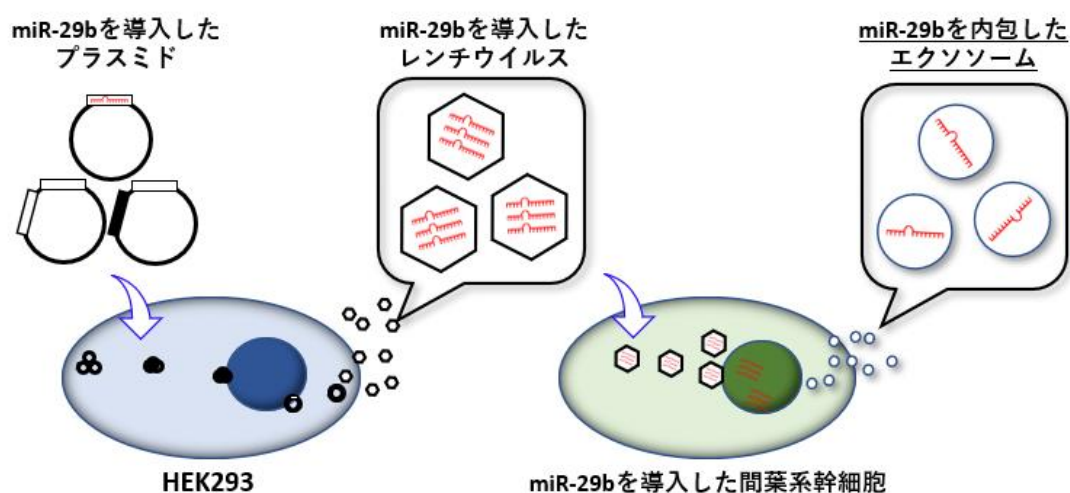


図9 レンチウイルスを用いた骨髄間葉系幹細胞への miR-29b 導入法

2-2-4. 骨髄間葉系幹細胞由来 miR-29 内包エクソソームによる腹膜中皮細胞の中皮間葉転換の抑制

各実験には HPMCs を DMEM 培地(20% FBS 含有)で 50%コンフルエントに培

養し、TGF- β 1 10ng/ml と miR-29b 内包エクソソーム 200ng を添加して 37°C、48 時間培養した後に使用した。MMT 細胞マーカーは、2-1 と同様の方法で E-cadherin、Calretinin、Vimentin、Fibronectin1 を染色し蛍光顕微鏡で観察した。

増殖能の測定は、HPMCs を DMEM 培地(20% FBS 含有)で 96 ウェルプレートに 1.0×10^4 個ずつ播種して、37°C、48 時間培養し、MTS を加えて 37°C、3 時間培養してマイクロプレートリーダーで測定した。

遊走能の測定はトランスウェルアッセイで施行した。24 ウェルプレート用 8 μ m pore インサート上に DMEM 培地 (0%FBS) 100 μ l に懸濁した HPMC_s を 5.0×10^5 個ずつ播種し、ウェル内には DMEM 培地 (10%FBS 含有) 500 μ l を添加し、37°C、48 時間培養した。次にインサート膜上面は綿棒にぬぐい取り、下面は PBS で洗浄後に Dif-Quick で染色し、顕微鏡下で細胞数をカウントした。

胃癌細胞の HPMC_s に対する接着能の測定は、単層化させた HPMC_s 上に接着した胃癌細胞をカウントして測定した。HPMC_s を DMEM 培地 (20%FBS 含有) 3.0×10^4 個/ウェルに調整し 96 ウェルプレートに播種して 37°C、72 時間培養して単層化させた。続いて CellTrace CFSE (5 μ g/ml)(Life technology, USA)で 37 °C, 15 分間染色した NUGC-4 または MKN45 1.0×10^4 個/ウェルを HPMC_s 上に播種し、37°C、15 分間培養した。PBS で 3 回洗浄後に残存する癌細胞を蛍光顕微鏡でカウントした。

2-2-5. マウス胃癌腹膜播種モデルにおける miR-29b 内包エクソソームによる播種抑制実験

C57BL/6 マウス (8 週齢、メス) に YTN16P 1.0×10^5 を HBSS 500 μ l に希釈して腹腔内投与し、同日より骨髓間葉系幹細胞由来 miR-29b 内包エクソソーム 80 μ g/ml を 3 日毎に腹腔内へ計 7 回投与した。21 日目にイソフルランで安楽死させ、腸間膜と大網の播種結節数を比較した (図 10)。

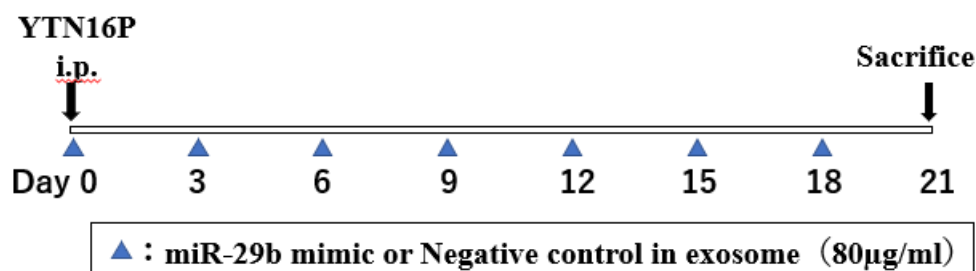


図 10 マウス胃癌腹膜播種モデルの miR-29b 内包エクソソームの治療プロト

コール

2-3. データの統計処理

データは Prism8 (Graph Pad Software, USA) を用いて解析し、値は平均値 \pm 標準偏差で表記した。統計解析は、群間の比較に one-way ANOVA 解析を行った。各検定では、 $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありと判断した。

3. 結果

3-1. miR-29b の腹膜中皮細胞への作用の検討

3-1-1. 細胞の miR-29b 発現レベル

当科で肥満症に対する胃スリーブ術を施行されたうち同意を得た症例において、切除した胃より大網を採取し、TrypLE Express で腹膜中皮細胞を分離し、DMEM (20%FBS 含有) で約 1 週間培養した。腹膜中皮細胞は丸く均一な細胞で、十分に増殖しシート状になると増殖は緩慢となり、細胞死はほぼ起こらず安定化した (図 11)。この細胞を HPMCs (human peritoneal mesothelial cell) として以下の実験に用いた。

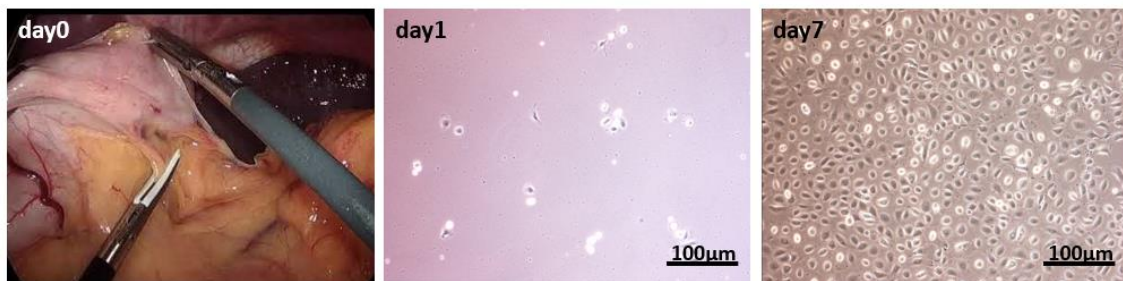


図11 HPMCs の分離・培養

day0: 肥満手術時の大網採取、day1: 少量の中皮細胞とその他の細胞、day7: シート状に増殖した中皮細胞

続いてデジタル PCR を用いて、HPMCs における miR-29b 発現レベルを測定したところ、胃癌細胞株 (NUGC-4、MKN45) や、ヒト骨髄間葉系幹細胞株

(UE6E7T-12)、末梢血単核細胞 (Peripheral blood mononuclear cells ; PBMC) よりも高値であった (図 12A)。一方で、HPMCs に TGF- β 1 10ng/ml を添加し 37°C、48 時間培養したところ、miR-29b の発現レベルは著明に減少した (図 12B)。

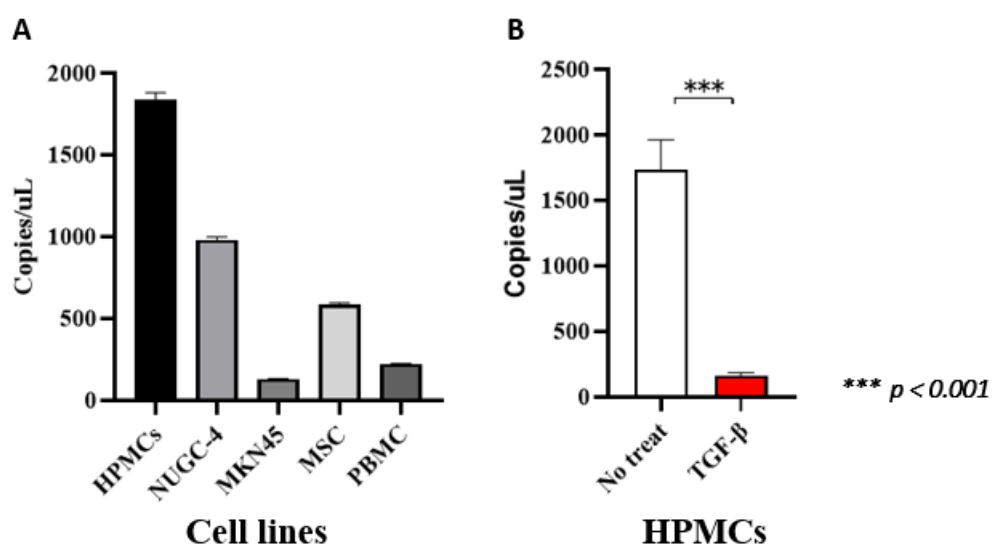


図12 各種細胞の miR-29b 発現レベル

A)HPMCs と各種細胞の比較、B)TGF- β 1 刺激による HPMCs の miR-29b 発現の変化

3-1-2. ヒト腹膜中皮細胞の miR-29b の導入効率

HPMCs に Lipofectamin RNAiMAX を用いて miR-29b (終濃度 50nM) を導入し、それぞれの実験に使用した。miRNA の導入効率は、蛍光標識された miRNA を HPMCs に導入し、フローサイトメトリーを用いて測定した。miRNA

の導入効率は、miRNA 終濃度 20nM では 97.9%、終濃度 50nM では 99.3%とほぼ全ての細胞に導入できた (図 13A)。また、HPMCs における miR-29b 発現レベルはリポフェクション法による遺伝子導入で有意に増加することを確認できた (図 13B)。

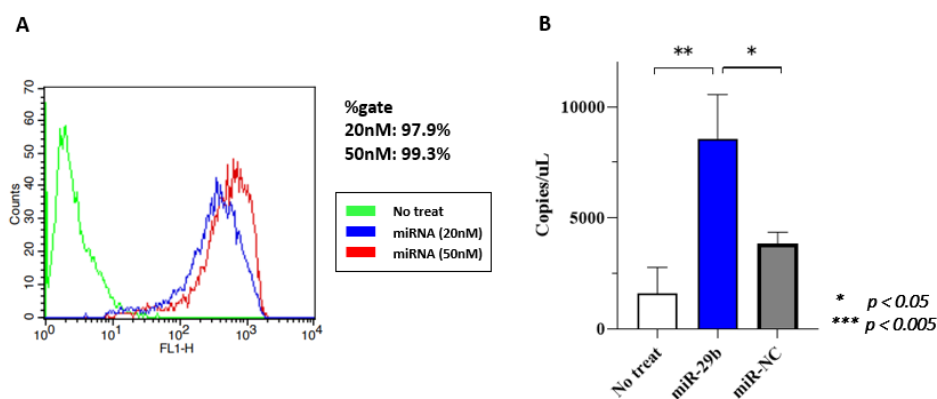


図13 HPMCs への miRNA 導入効率と miR-29b 発現レベルの変化

A.) HPMCs への蛍光標識マイクロ RNA 導入効率、 B) デジタル PCR による

HPMCs の miR-29b 発現の評価

3-1-3. ヒト腹膜中皮細胞の TGF-β1 刺激による変化と miR-29b の作用

HPMCs は TGF-β1 刺激により、細胞形態は丸型から紡錘形に変化し、免疫染色の細胞マーカーは E-cadherin、Calretinin の発現が著明に減少する一方で、Vimentin の発現が著明に亢進した。しかし、miR-29b をリポフェクション法で導入すると細胞形態や細胞マーカーの変化は打ち消されたが、この作用は miR-

NC 群では認めなかった (図 14)。また、細胞マーカーの変化はウエスタンブロット法でも確認し、同様の結果を認めた (図 15)。

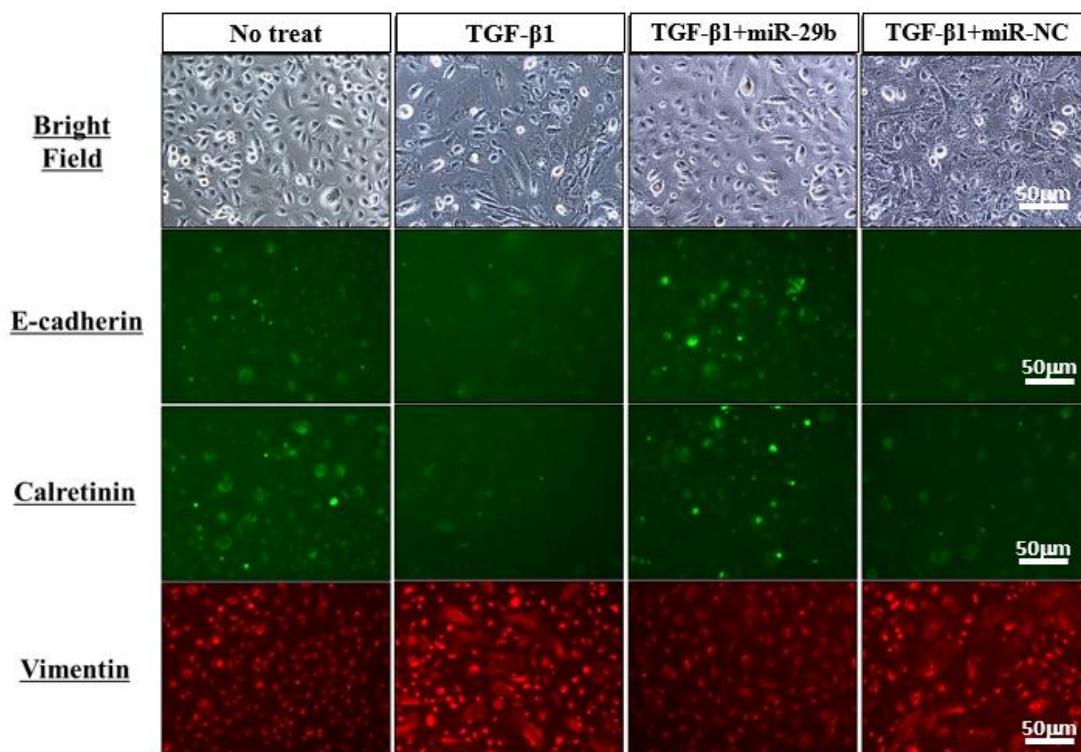


図 14 miR-29b による HPMCs の形態と細胞マーカーの変化

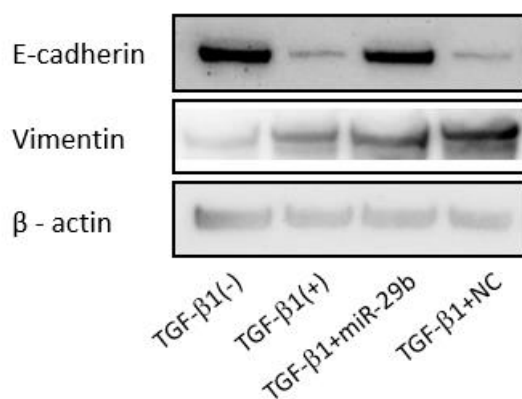


図 15 HPMCs の miR-29b による細胞マーカーの変化

3-1-4. ヒト腹膜中皮細胞の TGF- β 1 刺激による増殖能や遊走能の変化に対す

る miR-29b の抑制作用

HPMCs の増殖能は TGF- β 1 刺激による変化を認めなかったが、miR-29b を導入するとわずかではあるが有意な低下を認めた ($n=3, p>0.05$) (図 16A)。一方、非刺激群ではトランスウェルを通過して遊走する細胞をほとんど認めなかったのに対し、TGF- β 1 で刺激すると多くの細胞が遊走した (12.0 ± 7.2 vs 70.5 ± 12.2 counts/HPF, $n = 3, p < 0.001$)。しかし、miR-29b を導入すると、対照群に比べて遊走細胞は著明に減少した (3.4 ± 1.3 vs 17.9 ± 3.1 counts/HPF, $n = 3, p < 0.001$) (図 16B C)。

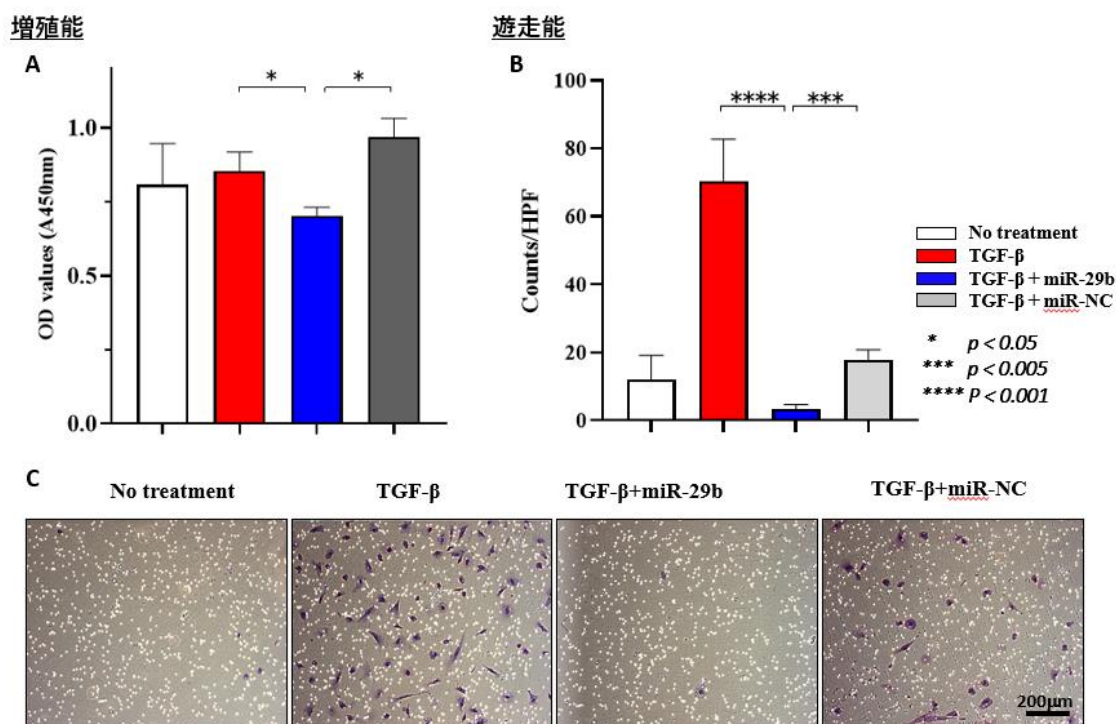


図 16 miR-29b による HPMC の増殖能と遊走能の変化

A) HPMCs の増殖能、B) HPMCs の遊走能、C) その顕微鏡観察

3-1-5. ヒト腹膜中皮細胞の TGF- β 1 刺激による胃癌細胞の接着能の変化に対する miR-29b の抑制作用

96 ウェルプレートに各種の刺激を行った HPMCs を単層化させ、その上に胃癌細胞を播種し、15 分後に培養液で洗浄して残存する細胞をカウントして接着能を測定した。胃癌細胞株 (NUGC-4、MKN45) は非刺激の HPMCs にほとんど接着しなかったのに対し、TGF- β 1 刺激後の HPMCs へは多数の細胞が接着した (NUGC-4, 6.7 ± 2.3 vs 50.7 ± 22.0 counts/HPF, $n = 5$, $p < 0.001$; MKN45; 13.7 ± 3.7 vs 147.9 ± 43.4 counts/HPF, $n = 5$, $p < 0.0001$) (図 A B)。しかし、RGD ペプチドまたは抗 β 1 integrin 抗体を添加すると、接着細胞は著明に減少した (RGD ペプチド : NUGC-4; 23.9 ± 5.9 counts/HPF, $n = 5$, $p < 0.0001$, MKN45; 6.2 ± 2.7 counts/HPF, $n = 5$, $p < 0.0001$) (β 1 integrin 抗体 : NUGC-4; 16.3 ± 6.1 counts/HPF, $n = 5$, $p < 0.0001$; MKN45; 12.3 ± 5.4 counts/HPF, $n = 5$, $p < 0.0001$) (図 17A,B)。

続いて TGF- β 1 刺激をした HPMCs に miR-29b を導入すると、miR-NC を導入した群と比較して接着細胞は著明に減少した (NUGC-4; 18.0 ± 5.2 vs 300.0 ± 119.8 counts/HPF, $n = 5$, $p < 0.001$; MKN45, 7.5 ± 2.4 vs 219.9 ± 51.7 counts/HPF, $n = 5$, $p < 0.0001$) (図 17B)。

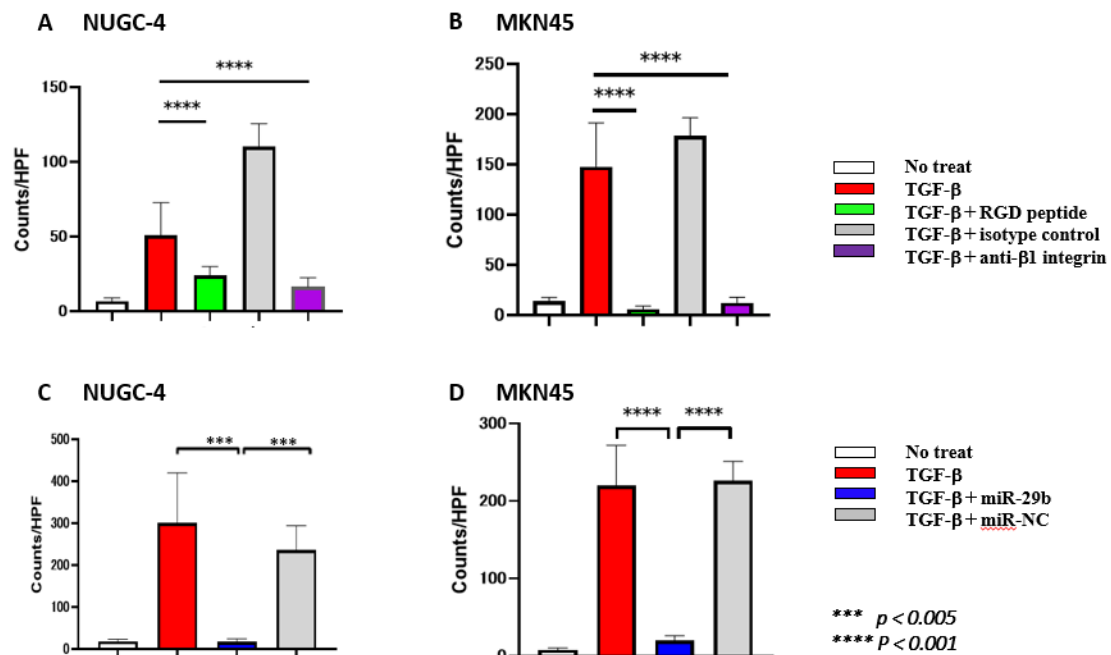


図17 HPMCs への胃癌細胞の接着能の変化

A, B) インテグリン阻害によるヒト胃癌細胞株 NUGC-4 と MKN45 の接着能の変化、C, D) miR-29b による NUGC-4 と MKN45 の接着能の変化

3-1-6. ヒト腹膜中皮細胞の TGF-β1 刺激による Fibronectin1 発現の変化に対する miR-29b の抑制作用

HPMCs の胃癌細胞に対する接着能が、RGD ペプチドと抗 β1 インテグリン抗体により抑制されることから、この接着に Fibronectin 1(FN1) が関与していることが予想された。そこで、FN1 の免疫染色を施行したところ、HPMCs はわずかに FN1 の発現を示す程度であったが、TGF-β1 刺激を行うとその発現は主に細胞間隙において著明に増強された。しかし、miR-29b を導入すると FN1 の

発現の増強は認められなくなった (図 18)。ウェスタンブロット法においても同様の結果が得られた (図 19)。

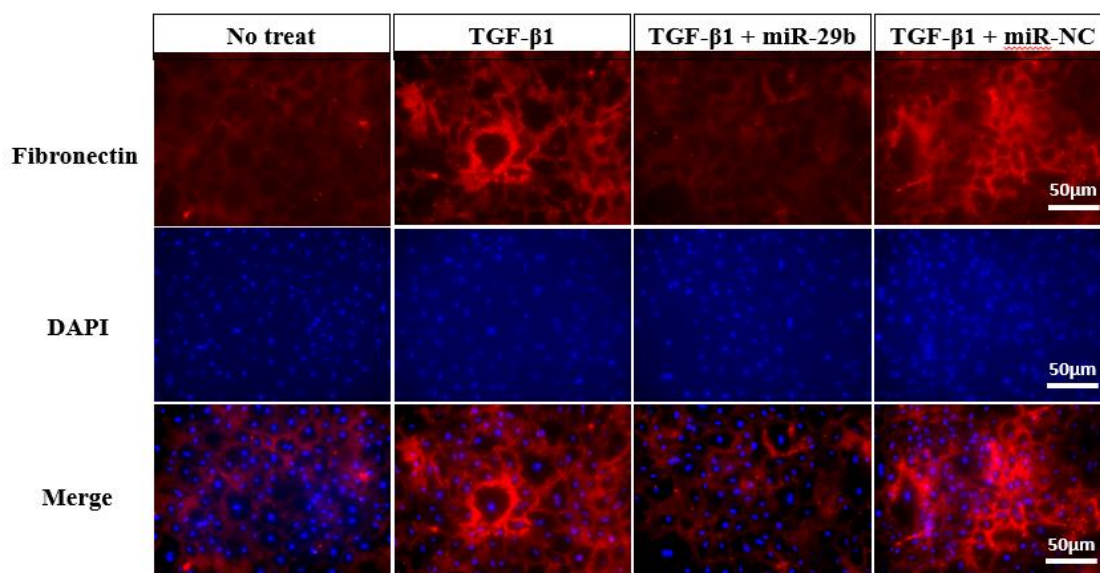


図 18 miR-29b による HPMCs の Fibronectin1 発現の変化

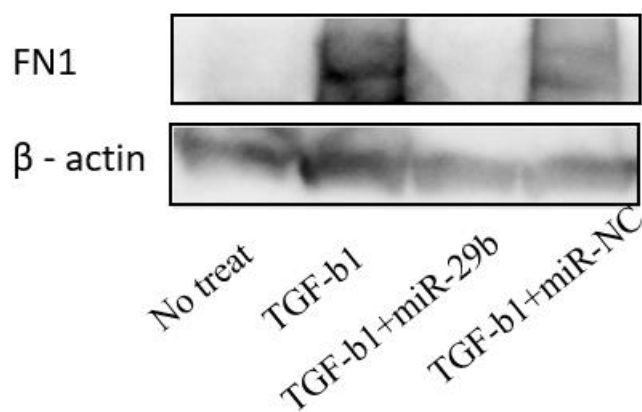


図 19 miR-29b によるヒト腹膜中皮細胞の Fibronectin1 発現の変化

3-1-7. 胃癌細胞株の増殖能や遊走能に対する miR-29b の抑制作用

ヒト胃癌細胞株（NUGC-4、MKN45）とマウス胃癌細胞株（YTN16P）の増殖能と遊走能に対する miR-29b の作用を調べた。増殖能は、NUGC-4 と MKN45 において miR-29b 群は miR-NC 群と比較して、わずかではあるが有意に低下していた（NUGC-4; $n = 3, p < 0.05$, MKN45; $n = 3, p < 0.01$ ）。しかし、YTN16P においては有意な差を認めなかった（図 A）。一方、遊走能は、いずれの細胞株においても miR-NC 群と比較して著明な低下を認めた（NUGC-4; 11.6 ± 1.7 vs 235 ± 13.8 counts/HPF, $n = 3, p < 0.0001$, MKN45; 5.0 ± 0.6 vs 52.4 ± 3.5 counts/HPF, $n = 3, p < 0.0001$, YTN16P; 32 ± 3.5 vs 136 ± 12.9 counts/HPF, $n = 3, p < 0.0001$ ）（図 B）。

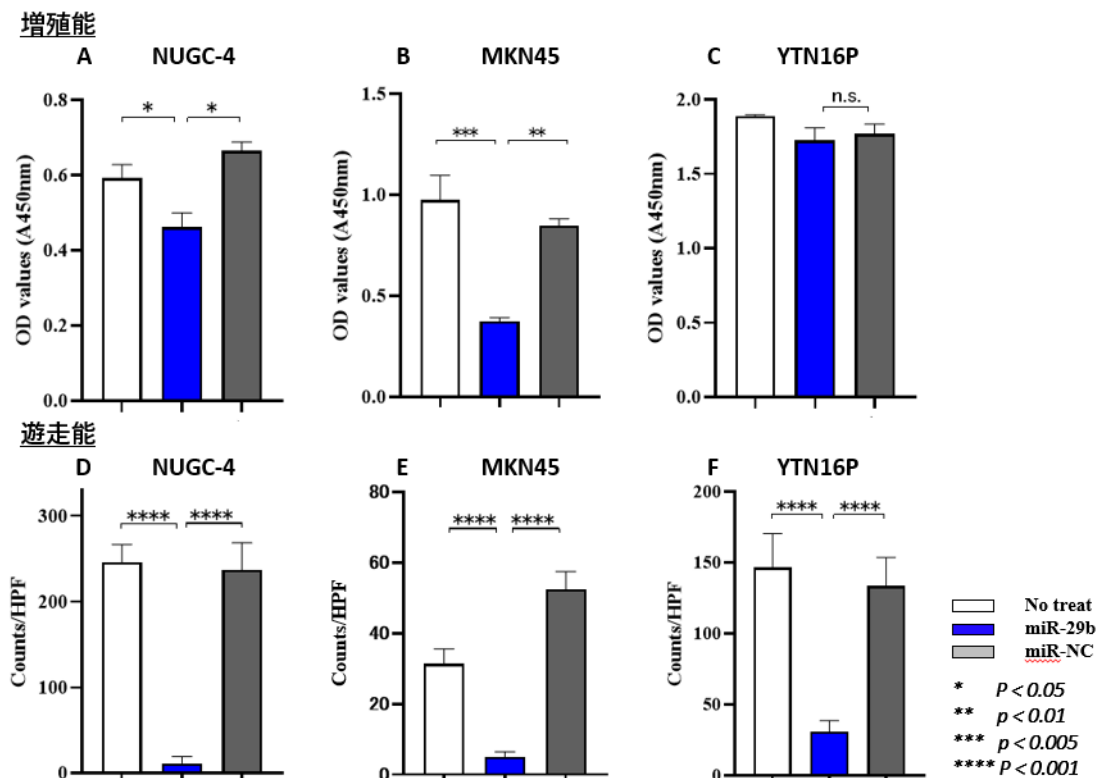


図20 胃癌細胞株の増殖能・遊走能に対する miR-29b の作用

A, B, C) ヒト胃癌細胞株 NUGC-4、KMN45、マウス胃癌細胞株 YTN16P の増殖能、D, E, F) NUGC-4、MKN45、YTN16P の遊走能

3-1-8. ヒト腹膜中皮細胞の胃癌細胞浸潤に対する miR-29b の抑制作用

PKH-26 で染色した HPMCs を I 型コラーゲンゲルでコーディングしたウェル上で培養してシート状にし、そこに GFP 標識された胃癌細胞株 NUGC-4 を播種したところ、HPMCs は NUGC-4 に先行して深部に浸潤することが観察された (図 21)。次に、HPMCs を 8.0 μ m pore インサート上で培養してシート状にし、そこに GFP 標識された胃癌細胞株 NUGC-4 を播種させてインサート膜下面へ遊走した細胞をカウントした。HPMCs は miR-29b を導入すると、miR-NC と比較して遊走した NUGC-4 は著明に減少した (58.5 ± 9.8 counts/HPF vs 100.8 ± 15.1 counts/HPF, $n=3$, $p < 0.05$) (図 22)。

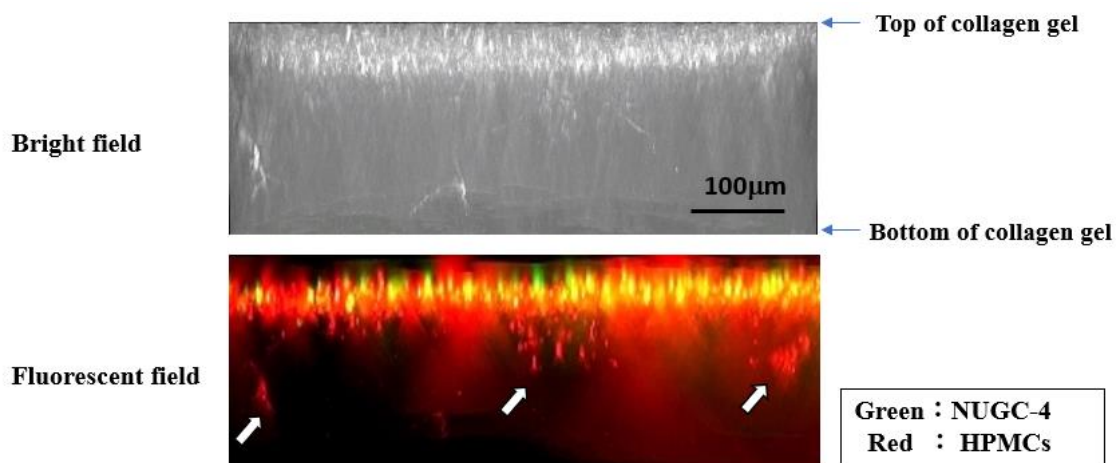


図21 ヒト腹膜中皮細胞の胃癌細胞の深部浸潤の促進作用

I型コラーゲンゲル上にHPMCs（赤：PKH-26）をシート状に培養し、NUGC-4（緑：GFP）を播種した。図はゲルの冠状断。↑はNUGC-4に先行して浸潤したHPMCsを示す。

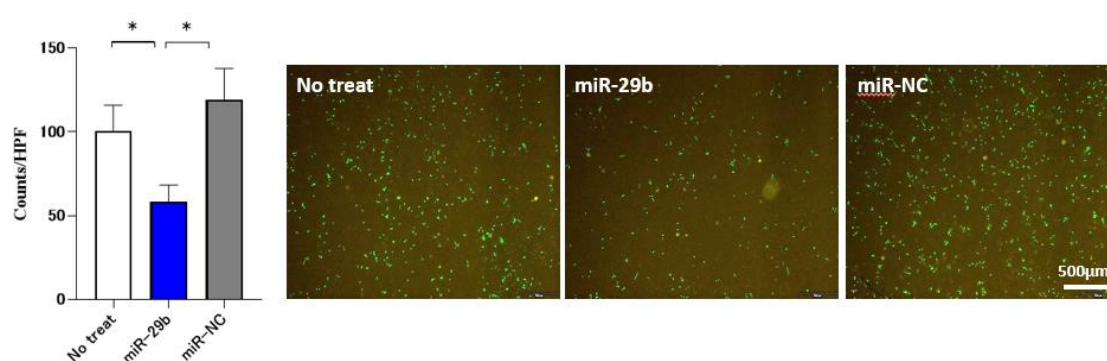


図22 胃癌細胞のHPMCsへの浸潤能に対するmiR-29bの抑制作用

3-1-9. マウス腹膜中皮細胞のTGF- β 1刺激に対するmiR-29bの抑制作用

マウス腹膜中皮細胞（mouse peritoneal mesothelial cells : MPMCs）においても、HPMCsと同様に中皮間葉転換が抑制されるのか検証した。C57BL/6 マウスより大網を採取し、ヒト同様に TripLE Express を用いて MPMCs を分離・培養して実験に使用した。MPMCs の増殖能（ $n=5, p < 0.01$ ）、遊走能（ 123.1 ± 7.2 vs 174.5 ± 26.3 counts/HPF, $n = 3, p < 0.001$ ）、マウス胃癌細胞株（YTN16P）の接着能（ 7.1 ± 2.3 vs 85.2 ± 23.7 counts/HPF, $n = 3, p < 0.001$ ）は、TGF- β 1 刺激によりいずれも有意に増加した（図23）。しかし、そこにmiR-29bを導入すると、

遊走能 (47.8 ± 6.6 vs 185.5 ± 9.0 counts/HPF, $n = 3$, $p < 0.001$) と接着能 (5.3 ± 1.4 vs 117.9 ± 16.2 counts/HPF, $n = 3$, $p < 0.001$) は miR-NC 群と比較して著明な減少を認めたが、増殖能では有意差を認めなかった (図 23)。

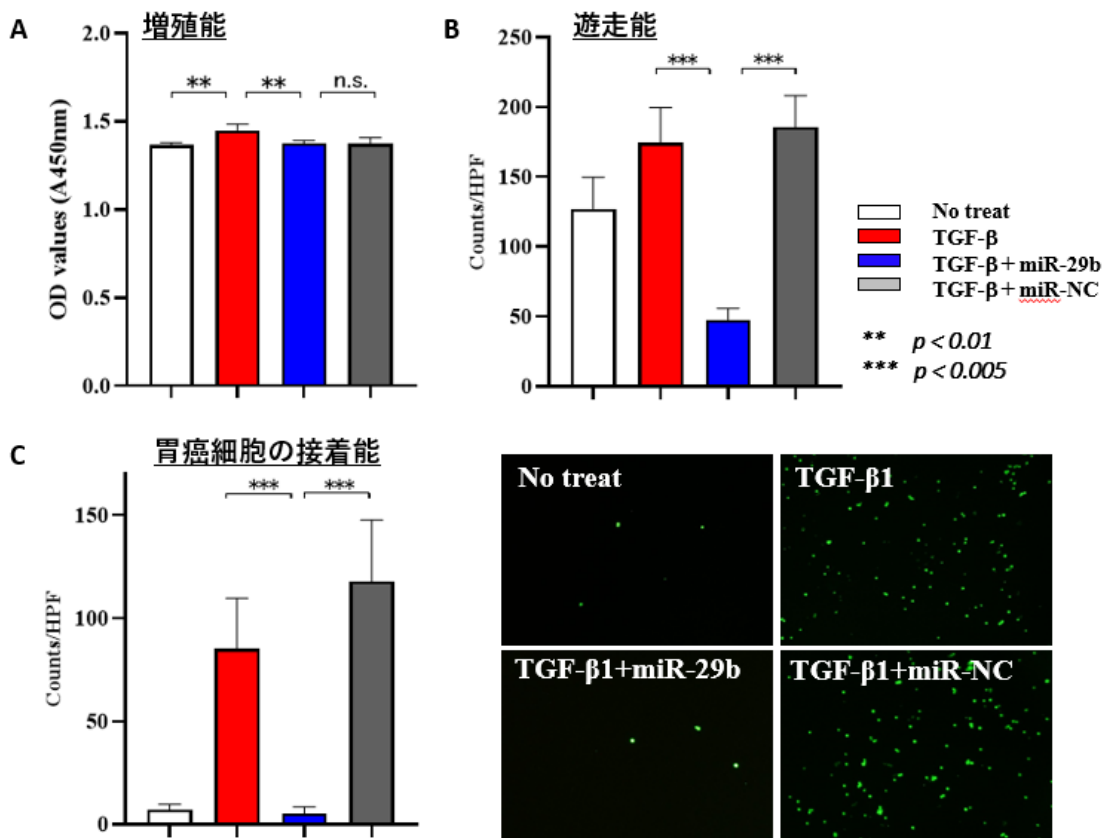


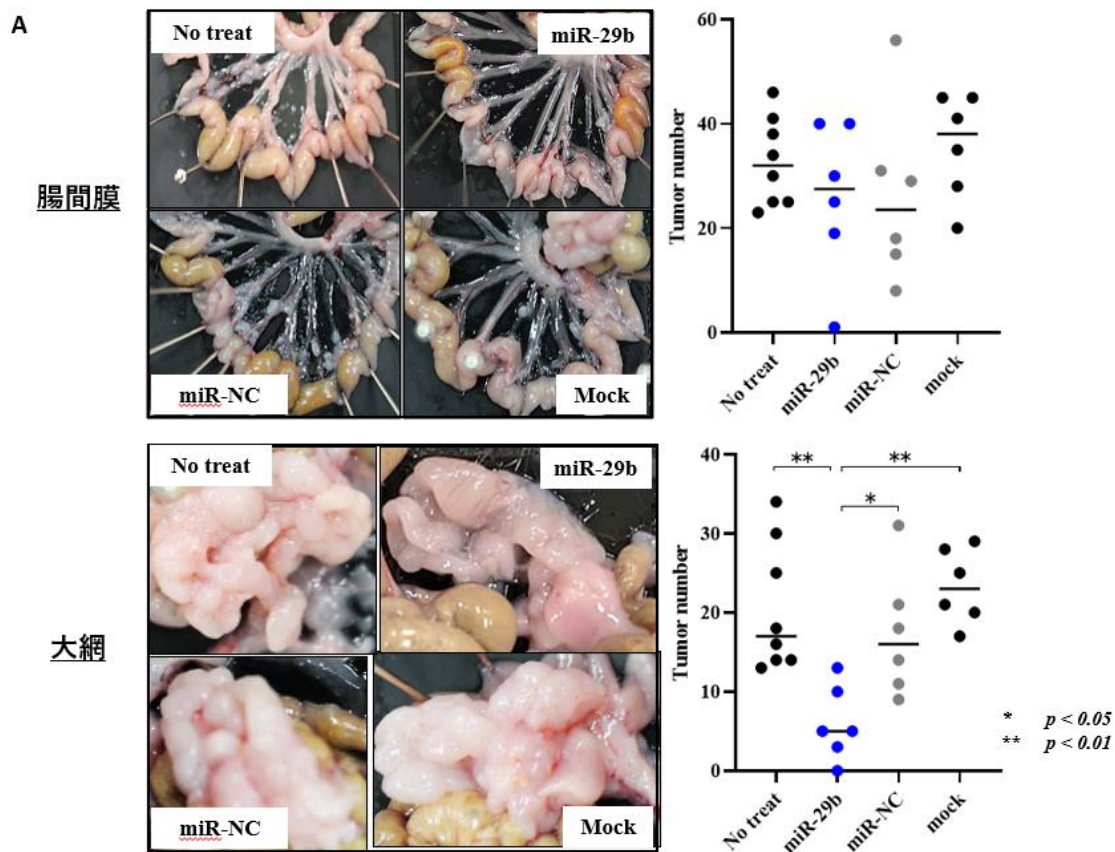
図 23 MPMCs の TGF-β1 刺激に対する miR-29b の作用

MPMCs への A) 増殖能、B) 遊走能、C) YTN16P の接着能

3-1-10. マウス胃癌腹膜播種に対するアテロコラーゲンをを用いた miR-29b 腹腔

内局所投与の抑制作用

C57BL/6 マウス (8 週齢、メス) に YTN16P を腹腔内投与し、その 3 日後よりアテロコラーゲンに混和した miR-29b mimic 2 μ g を 3 日毎に腹腔内へ計 4 回投与した。がん細胞播種後 14 日目に安楽死させ、腸間膜と大網の播種結節数を各群で比較した。腸間膜の播種結節数では各群間に有意差を認めなかったが、大網においては miR-NC 群と比較しても有意に播種結節数が抑制されていた (20.5 \pm 8.1 vs 6.0 \pm 4.7 vs 17.3 \pm 8.0 vs 23.3 \pm 4.8 counts/HPF, n = 6) (図 24)。また、大網において miR-NC 群では硬く一塊となり、多くの脂肪組織は癌細胞に置換されていたのに対し、miR-29b 群では軟らかく、多くの脂肪組織が残存していた (図 24B)。



B

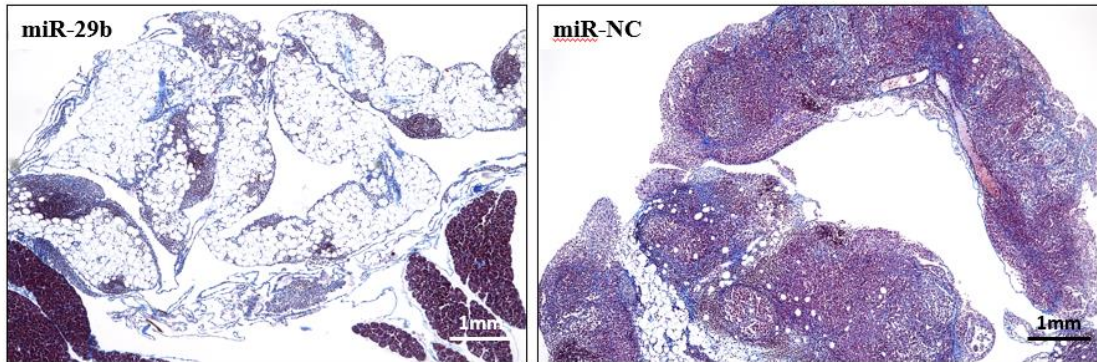


図24 マウス胃癌腹膜播種モデルにおけるアテロコラーゲンによる *miR-29b* 腹腔内補充療法の作用

A) 腸間膜と大網の播種結節数、B) 大網の顕微鏡像

3-2 骨髄間葉系幹細胞由来エクソソームを用いた *miR-29b* 投与法の検討

3-2-1. ヒト骨髄間葉系幹細胞由来エクソソームへの *miR-29b* 導入

ヒト骨髄間葉系幹細胞株 UE6E7T-12 にレンチウイルスを用いて *miR-29b* を導入し、その培養上清より超遠心法にてエクソソームを抽出した。遺伝子導入した UE6E7T-12 の細胞とエクソソームにおいて *miR-29b* 発現が著明に増加していた (図 25A)。また、UE6E7T-12 のエクソソームを PKH-26 染色し、HPMCs とヒト胃癌細胞株 NUGC-4 と MKN45 に添加して 24 時間培養した後に蛍光顕微鏡で観察した。骨髄間葉系幹細胞 (Bone-marrow derived mesenchymal stem cells ; BMSCs) 由来エクソソームは HPMC の細胞質に豊富に取り込まれる一方で、胃癌細胞株では取り込み効率が悪いことが確認された (図 25B)。

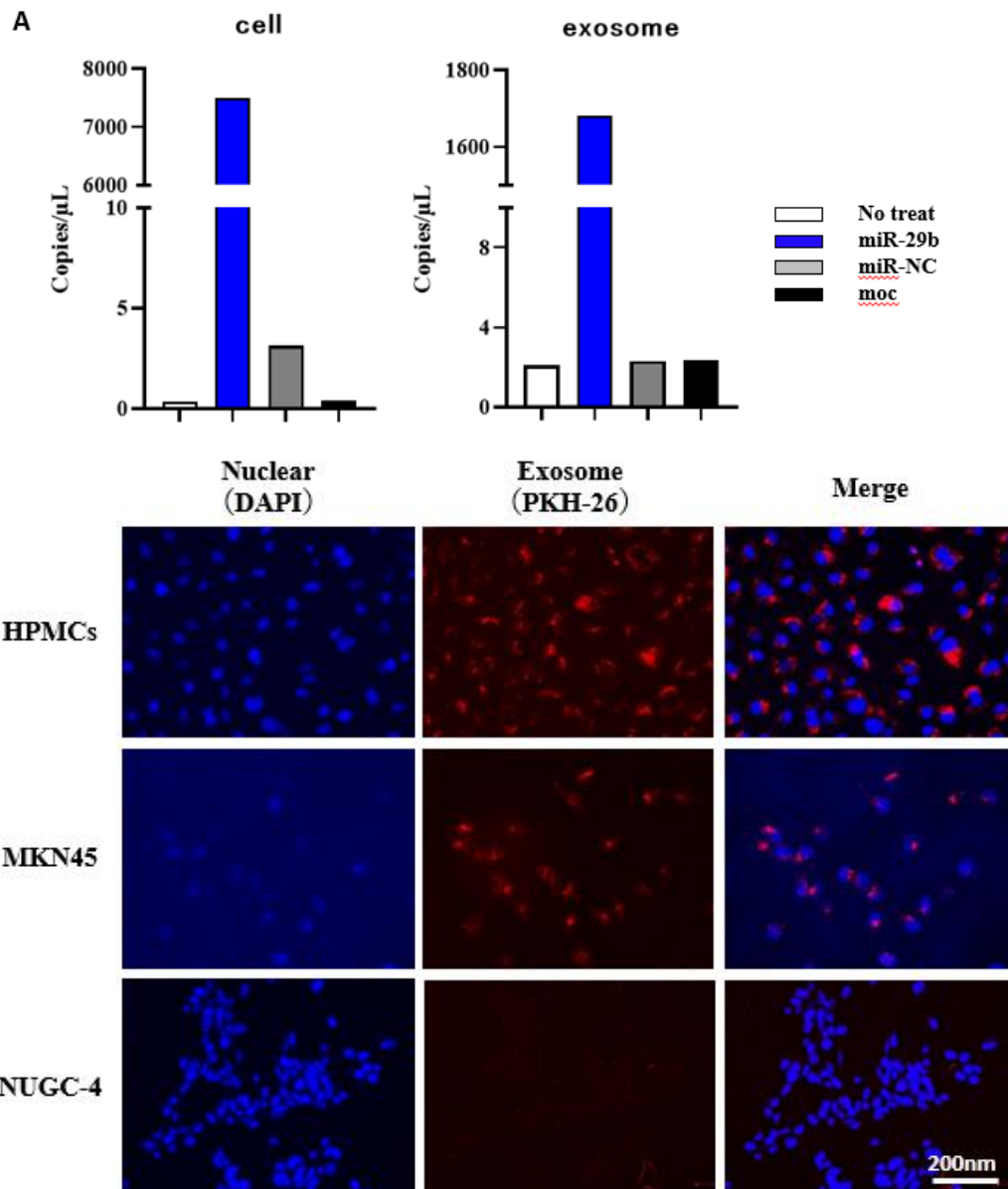
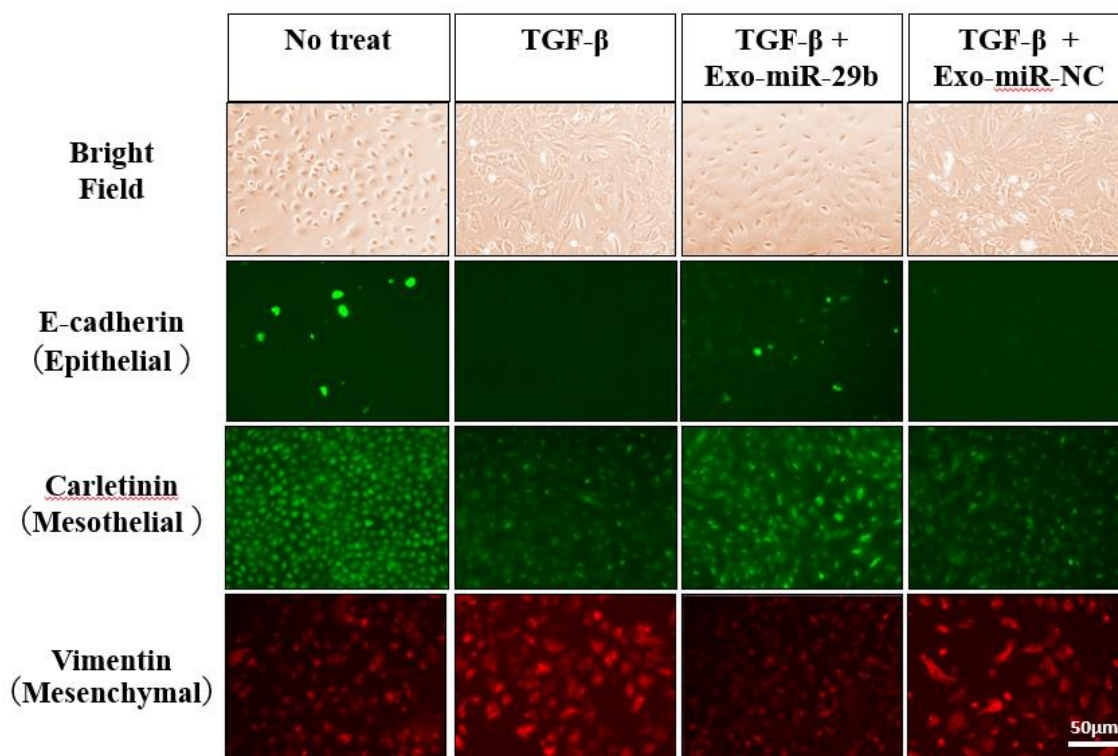


図25 BMSCs の miR-29b 発現と取り込み

A) BMSCs の細胞とエクソソームの miR-29b 発現のデジタルPCR 測定、B) 各種細胞の PKH-26 標識した BMSCs 由来エクソソームの取り込み

3-2-2. ヒト腹膜中皮細胞の TGF- β 1 刺激による形態や細胞マーカー変化や Fibronectin1 発現に対するヒト骨髄間葉系幹細胞由来エクソソーム内包 miR-29b の抑制作用

3-1-3 で示したように、HPMCs は TGF- β 1 刺激により、細胞形態は丸型から紡錘形に変化し、免疫染色の細胞マーカーは E-cadherin、Calretinin の発現が減少し、Vimentin、Fibronectin1 の発現が亢進した。しかし、ここにエクソソーム内包 miR-29b を添加すると細胞形態や細胞マーカーの変化は打ち消されたが、この作用は miR-NC 群で認めなかった (図 26AB)。



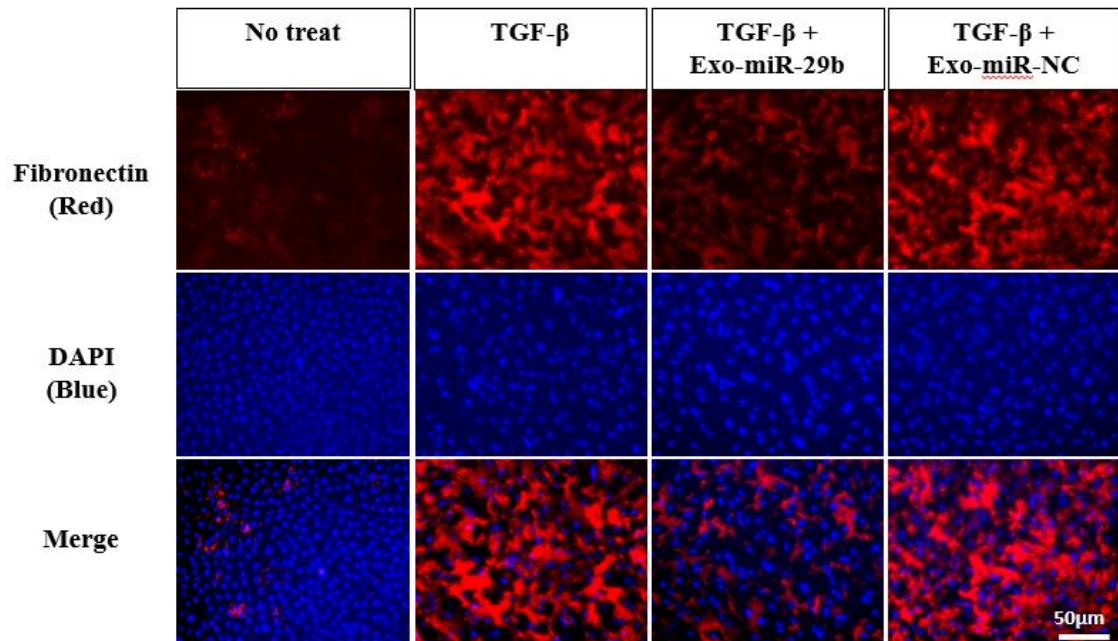


図26 HPMCs の TGF- β 1 刺激による形態と細胞マーカー変化に対するエクソソーム内包 miR-29b の抑制作用

A) HPMCs の形態と MMT 関連マーカーの変化、B) Fibronectin1 の発現

3-2-3. ヒト腹膜中皮細胞の TGF- β 1 刺激による増殖能・遊走能に対するヒト骨髄間葉系幹細胞由来エクソソーム内包 miR-29b の抑制作用

HPMCs の増殖能は TGF- β 1 刺激による変化を認めなかったが、エクソソーム内包 miR-29b を添加するとわずかではあるが有意な低下を認めた (n=6, p>0.005) (図 27A)。他方、遊走能は TGF- β 1 刺激により大きく亢進したが、エクソソーム内包 miR-29b によりほぼ打ち消された (48.3 \pm 14.5 vs 140.9 \pm 16.1 vs 36.7 \pm 5.4 vs 124.9 \pm 14.8 counts/HPF, n = 3, p < 0.005) (図 27B C)。

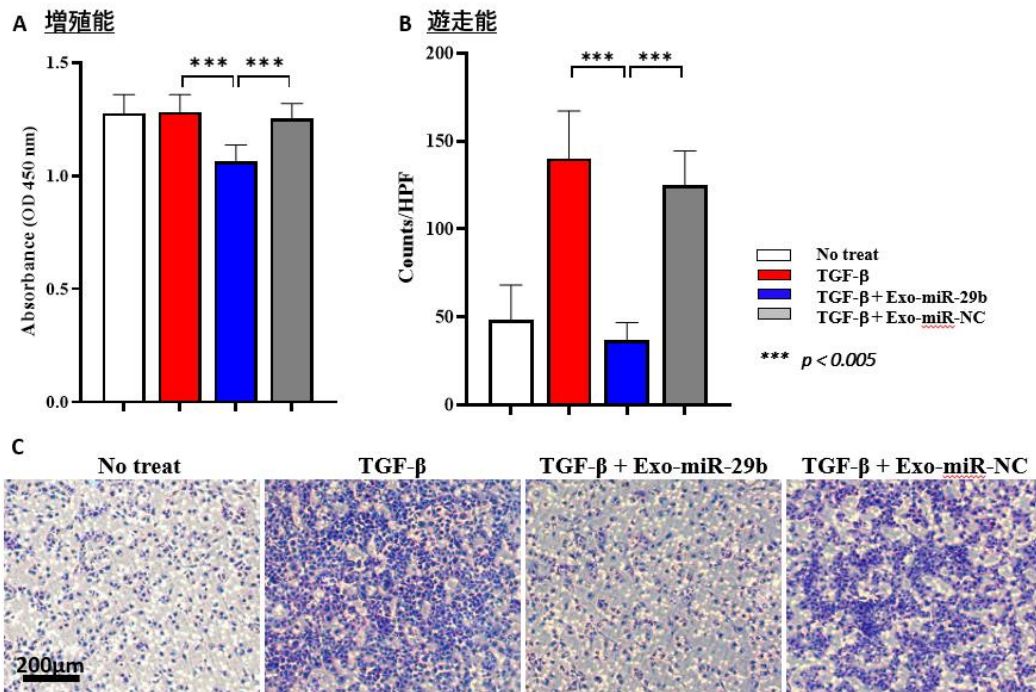


図27 HPMCsの増殖能・遊走能に対するヒトBMSCs由来エクソソーム内包miR-29bの抑制作用

A) HPMCsの増殖能、B) HPMCsの遊走能、C) その顕微鏡観察

3-2-4. ヒト腹膜中皮細胞のTGF-β1刺激による胃癌細胞との接着能に対する

ヒト骨髓間葉系幹細胞由来エクソソーム内包miR-29bによる抑制作用

HPMCsに接着する胃癌細胞株(NUGC-4、MKN45)は、TGF-β1刺激により著明に増加したが、エクソソーム内包miR-29bにより打ち消された。

(NUGC-4, 4.7 ± 1.6 vs 31.1 ± 10.8 vs 4.5 ± 1.1 vs 47.6 ± 26.5 counts/HPF, $n = 5$, $p < 0.001$; MKN45; 16.3 ± 4.2 vs 390.0 ± 30.4 vs 67.7 ± 8.9 vs 290.2 ± 45.1 counts/HPF, $n = 5$, $p < 0.0001$) (図28A B)。

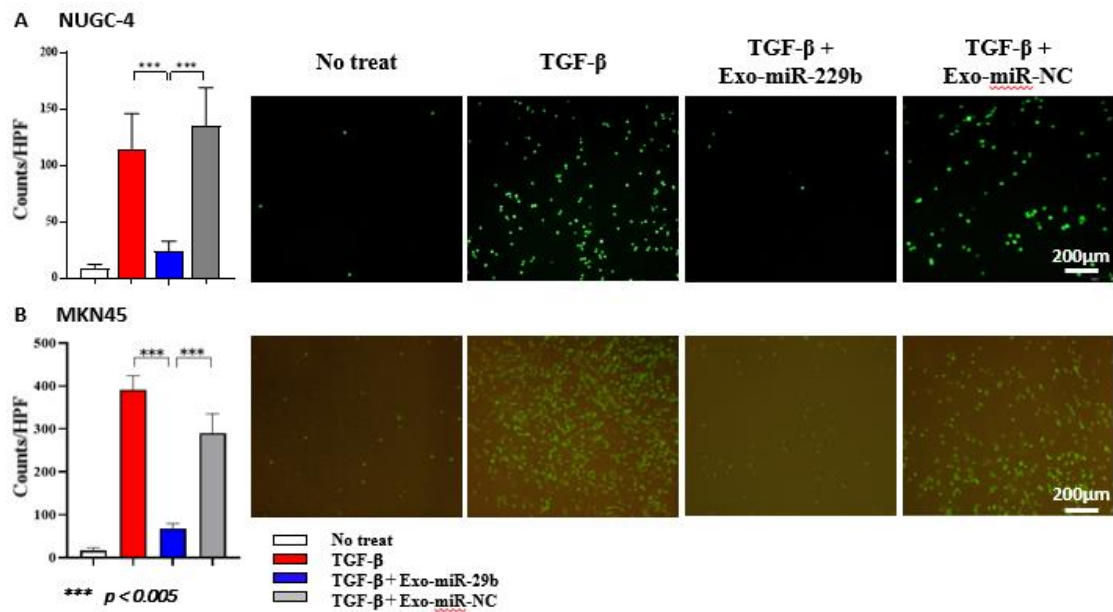


図28 HPMCs の TGF-β1 刺激による胃癌細胞株との接着能に対するヒト

BMSCs 由来エクソソーム内包 miR-29b の抑制作用

HPMCs への A) NUGC-4 との接着能、B) MKN45 との接着能

3-2-5. 胃癌細胞株の増殖能と遊走能に対するヒト骨髄間葉系幹細胞由来エクソ

ソーム内包 miR-29b の抑制作用

ヒト胃癌細胞株 (NUGC-4) とマウス胃癌細胞株 (YTN16P) の増殖能と遊走能に対するエクソソーム内包 miR-29b の作用を調べた。増殖能は、NUGC-4、YTN16P のどちらにおいてもエクソソーム内包 miR-29b 群は miR-NC 群と有意差を認めなかった (NUGC-4; n = 6, MKN45; n = 6) (図 30A)。一方で、遊走能は、どちらの胃癌細胞株においても miR-NC 群と比較して著明な低下を認めた (NUGC-4; 23.7 ± 8.9 counts/HPF vs 74.9 ± 7.6 counts/HPF, n = 5, p < 0.001,

YTN16P; 8.7 ± 1.4 counts/HPF vs 54.9 ± 1.6 counts/HPF, $n = 5$, $p < 0.001$) (図

30B)。

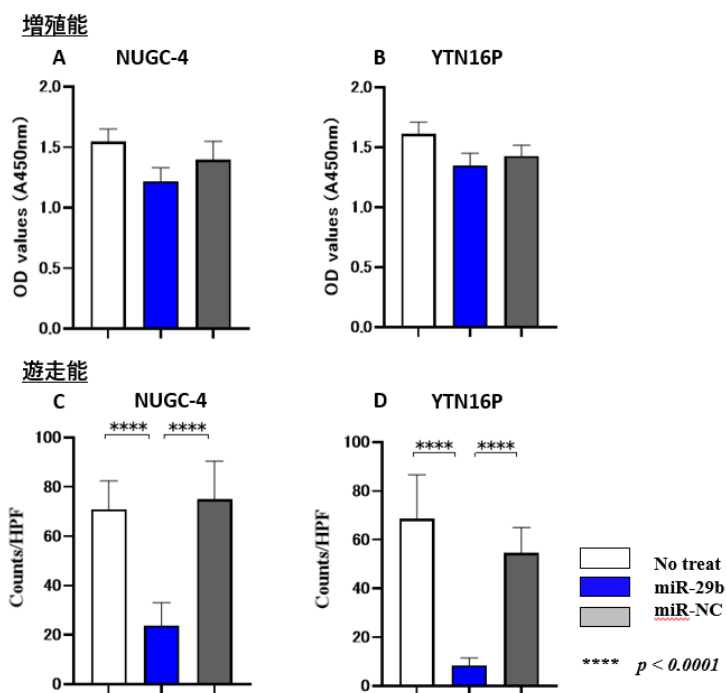


図30 胃癌細胞株の増殖能と遊走能に対するエクソソーム内包 miR-29b の抑制作用

A, B) ヒト胃癌細胞株 NUGC-4、マウス胃癌細胞株 YTN16P の増殖能、C, D)

NUGC-4、YTN16P の遊走能

3-2-6. マウス骨髄間葉系幹細胞の分離培養と同定

マウス胃癌腹膜播種モデルに miR-29b を腹腔内投与に使用するエクソソームを作成するため、マウス BMSCs の分離培養を行った。C57BL/6 マウス (6 週齢、メス) の大腿骨を採取し、MesenCult Expansion Kit (Veritas, Japan)を用いて

BMSCs を分離培養した (図 31A)。専用培地を用いて低酸素下に 3 週間培養した。細胞表面マーカーをフローサイトメトリーで測定すると、BMSCs マーカーの CD44、CD73、CD90 が多くで発現しており、陰性マーカーの CD31、CD34、CD49d の発現を認めなかった (図 31B)。以上より、マウス BMSCs と判断し、以下の実験に用いた。

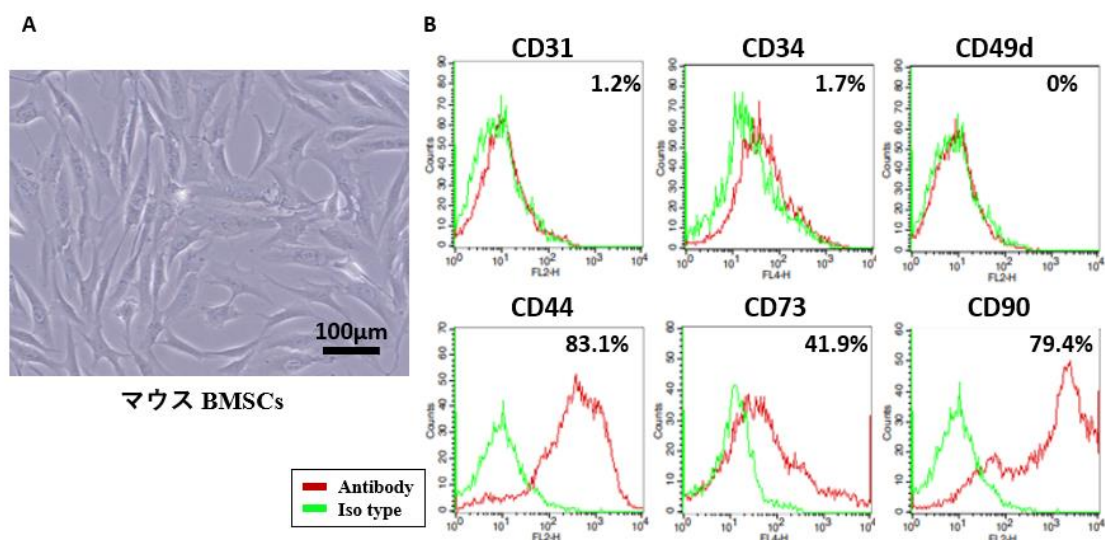


図 31 マウス BMSCs の分離培養と同定

分離培養したマウス BMSCs の A) 顕微鏡像、B) 細胞マーカー

3-2-7. マウス骨髄間葉系幹細胞由来エクソソームの抽出と同定

分離培養した BMSCs の培養上清より超遠心法でエクソソームを抽出し、電子顕微鏡で観察すると直径約 130nm の円形で均一な小胞を認め (図 32A)、ナノ粒子トラッキング解析を行うと、いずれの群のエクソソームもピークサイズ

は 130nm 程度で大きな差を認めなかった (図 32B)。回収したエクソソームをアルデヒドサルフェースラテックスビーズで吸着し、エクソソーム表面マーカーである CD9、CD63 の発現をフローサイトメトリーで測定し、陽性を確認した (図 32C)。

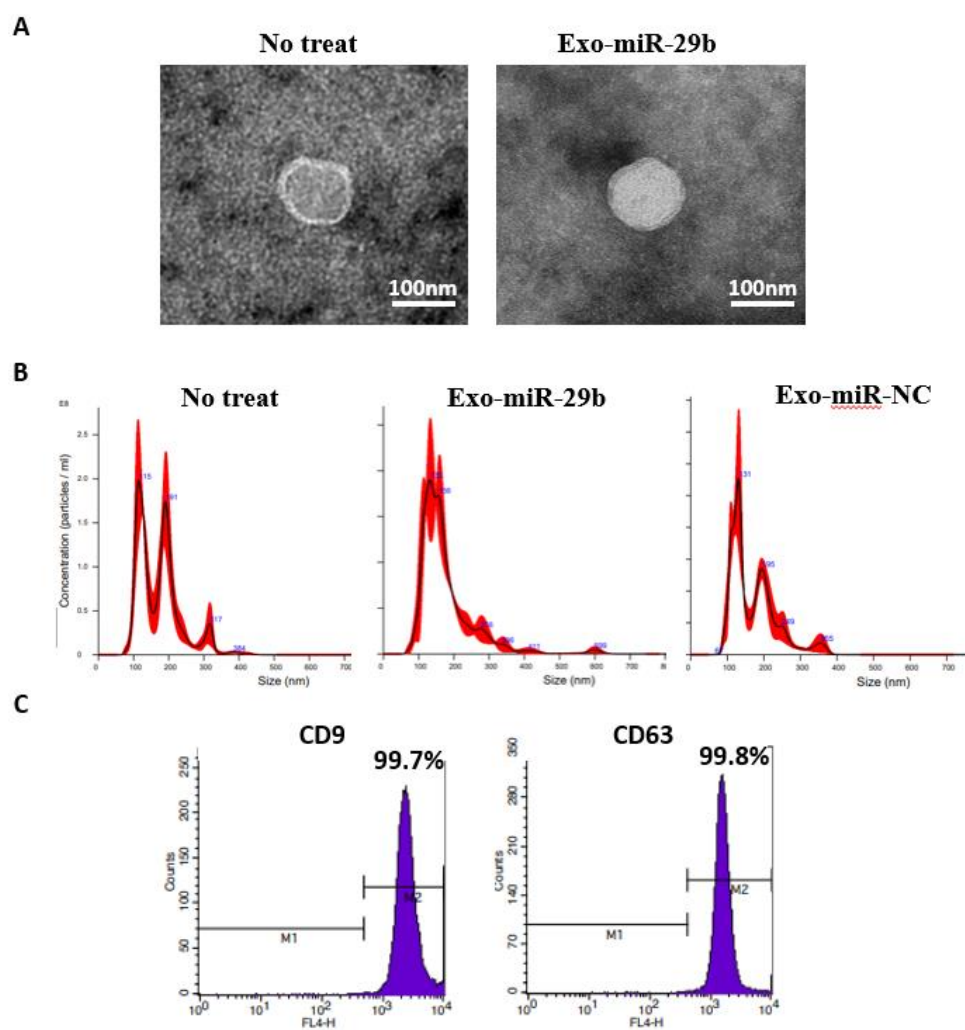


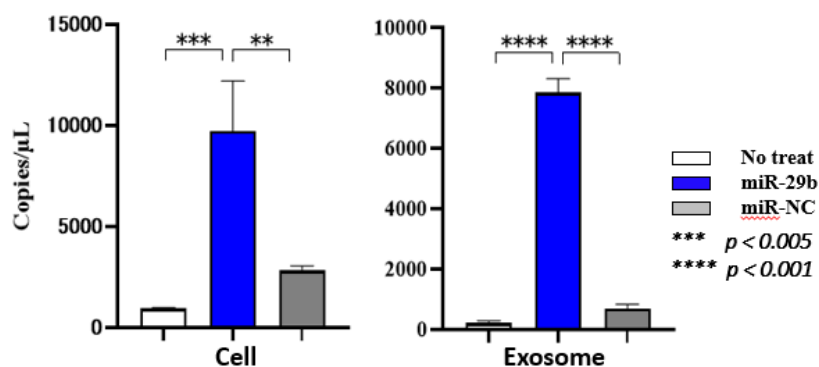
図 32 マウス BMSCs 由来エクソソームの同定

マウス BMSCs 由来エクソソームの A) 電子顕微鏡像、B) ナノ粒子トラッキング解析、C) エクソソームマーカー

3-2-8. マウス骨髄間葉系幹細胞由来エクソソームへの miR-29b 導入

ヒト BMSCs 株 UE6E7T-12 と同様にレンチウイルスを用いて、マウス BMSCs に miR-29b を遺伝子導入した。miR-29b を導入した細胞とエクソソームから RNA を抽出し、デジタル PCR を用いて miR-29b 発現を調べると、miR-29b 導入群の細胞とエクソソームで miR-29b の発現が著明に亢進していた (図 33A)。また、マウス BMSCs 由来エクソソームを PKH-26 で染色し、MPMCs とマウス胃癌細胞株 YTN16P に添加して 24 時間培養した後に蛍光顕微鏡で観察した。マウス BMSCs 由来エクソソームは MPMC の細胞質に豊富に取り込まれる一方で、胃癌細胞株では取り込み効率が悪いことが確認された (図 33B)。

A



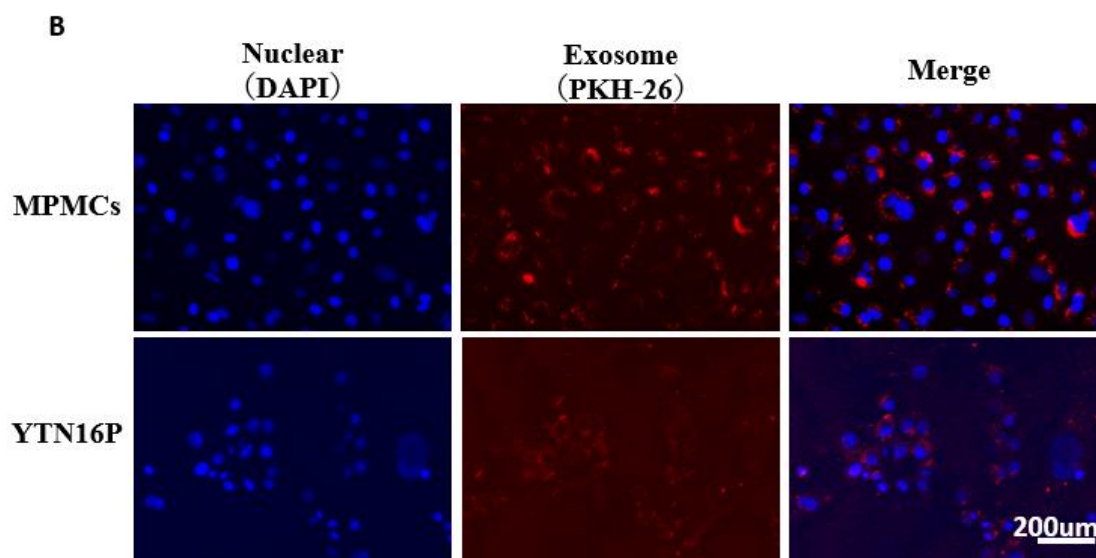


図33 マウス BMSCs 由来エクソソームへの miR-29b 導入

A) miR-29b 発現のデジタル PCR 解析、B) マウス細胞の PKH-26 標識した BMSCs 由来エクソソームの取り込み

3-2-9. マウス胃癌腹膜播種に対する骨髓間葉系幹細胞由来エクソソームを用いた miR-29b 腹腔内局所投与の抑制作用

C57BL/6 マウス (8 週齢、メス) に YTN16P (1×10^5 個) を腹腔内投与し、同日よりエクソソーム内包 miR-29b を $80 \mu\text{g/ml}$ を 3 日毎に腹腔内へ計 7 回投与して 21 日目に安楽死させ、腸間膜と大網の播種結節数を比較した。大網は、無治療群や miR-NC 群において多数の播種結節が形成され一塊となっていたのに対し、miR-29b 群では播種結節はほぼ形成されず、軟らかいままであった。また、アテロコラーゲンによる投与方法と異なり、腸間膜においても他の 2 群と比

較して著明に播種結節数を抑制した（大網； 30.3 ± 22.0 vs 5.2 ± 5.9 vs 45.5 ± 38.2 ,
 $n=6$, $p < 0.05$ counts/HPF, $n = 6$, 腸間膜； 13.0 ± 10.9 vs 2.0 ± 3.2 vs 17.0 ± 14.3
 counts/HPF, $n=6$, $p < 0.05$) (図 33)。

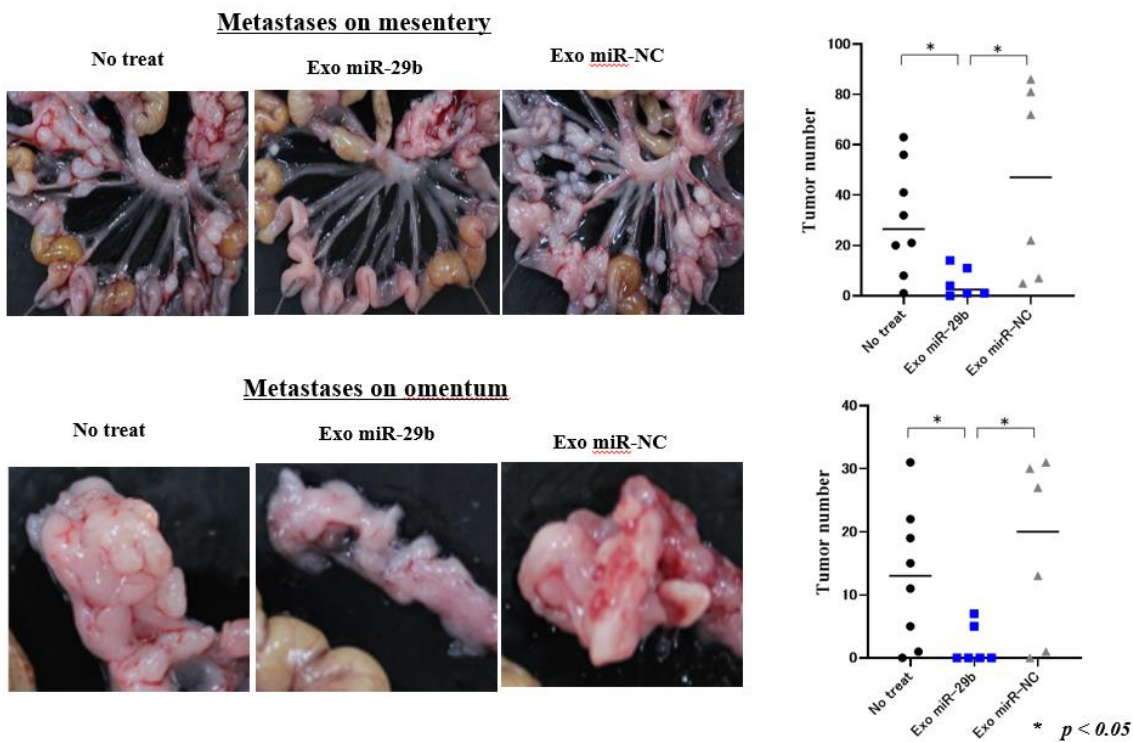


図34 マウス BMSCs 由来エクソソーム内包 miR-29b による胃癌腹膜播種の抑制

4. 考察

近年、抗がん剤治療の進歩や新たな分子標的薬などの登場により、胃癌患者の予後は改善してきている。しかし、再発形式として最も頻度の高い腹膜播種の予後は依然として悪く、新たな治療戦略の開発が望まれる。腹膜播種の成立の詳細な分子メカニズムは完全に解明されてはいないが、近年、エクソソーム中の miRNA が転移の形成に重要な役割を果たしていることが示唆されている。そこで、腹膜播種患者の腹腔内エクソソーム中で低下していた miR-29 family の中で特に顕著な差を認めた miR-29b に着目し、その中皮細胞に対する作用を明らかにするとともに、播種治療への応用の可能性を検討した。

はじめに、様々な細胞における miR-29b 発現をデジタル PCR で検討した。過去の報告によると、様々ながん細胞において miR-29b プロモーターの CpG 領域の過剰メチル化によって miR-29b 発現は低下し、腫瘍を促進するといわれている(30) (31, 32) (25)。しかし、デジタル PCR 法にて mRNA レベルを測定すると、胃癌細胞株 NUGC-4、MKN45 はヒト末梢血単核球 (PBMC)、ヒト骨髄間葉系幹細胞 (BMSCs) と同程度の miR-29b 発現能を有していた。一方、大網由来のヒト腹膜中皮細胞 (HPMCs) はより高い miR-29b 発現を示し、TGF- β 1 刺激によって miR-29b 発現が大きく低下した。この事実から、健常時の腹腔内の miR-29b の多くは HPMC に由来しており、胃癌の漿膜外浸潤に伴い腹腔内

にがん由来の TGF- β 1 の増加し HPMCs に中皮間葉転換 (MMT) を引き起こすことが、腹腔内 miR-29b 発現が低下する最大の原因であると考えられた。

次に miR-29b の HPMCs およびマウス腹膜中皮細胞 (MPMCs) に対する作用を検証した。TGF- β 1 により誘導された HPMCs の形態や E-cadherin、Calretinin、Vimentin、Fibronectin1 の発現の変化、さらには増殖能や遊走能の亢進は、miR-29b を導入することですべて一様に打ち消された。この現象は、腹膜中皮細胞から腫瘍関連線維芽細胞への転換を抑制するという過去の報告と合致し(26, 27, 33)、miR-29b は TGF- β 1 により誘導される MMT を抑制する作用を有することを明確に示している。

次に、HPMCs の胃癌細胞 NUGC-4 との接着能を検討した。NUGC-4 は非刺激の HPMCs に対しては殆んど接着しなかったが、TGF- β 1 刺激により MMT を起こすと、多数の細胞が接着した。この接着は RGD ペプチドまたは抗 β 1 インテグリン抗体の添加により強く抑制された。また、HPMCs 上の Fibronectin1 発現を免疫染色とウエスタンブロット法により検討すると、TGF- β 1 刺激により Fibronectin1 発現は顕著に増強した。しかし、miR-29b を添加すると、HPMCs における Fibronectin1 の発現が抑制され、NUGC-4 の接着も大きく減少した。これらの結果から、MMT を来した腹膜中皮細胞と胃癌細胞の接着は Fibronectin1 - β 1 インテグリン経路に依存しており、miR-29b は腹膜中皮細胞の

Fibronectin1 産生を抑制することで腹膜表面への癌細胞の着床を抑制することが示唆された。TGF- β 1 刺激による MMT がもたらす卵巣がん細胞の接着能の亢進には、Fibronectin1 - β 1 インテグリンが重要な接着経路であることが過去に報告されており(34)(35)、本研究の結果はこれと合致する。miR-29 ファミリーは、これまでに胚性線維芽細胞(36)、海綿状網状細胞(37)、肝星細胞(38)において、コラーゲン、ラミニン、フィブリリンなどの細胞外マトリックスタンパク質の合成を抑制すること、乳癌細胞において miR-29b が Hsp47 を介して Fibronectin1 産生をダウンレギュレートすることも既に示されている(39)。本研究結果も含めて、miR-29b は様々な細胞における細胞外マトリックスタンパクの産生に抑制的に作用することで腫瘍微小環境の構成に大きな影響を与えていると考えられる。

続いて、マウス同種胃癌腹膜播種モデルにおいて miR-29b 腹腔内局所投与による播種結節抑制実験を行った。マイクロ RNA は生体内では RNase の存在により不安定であるため、まず、RNase から保護し徐放材として働くアテロコラーゲンに混和して腹腔内投与することにした。しかし、大網上の播種結節数は miR-29b 群で有意に減少したものの、腸間膜では有意な抑制効果を認められなかった。この結果は、大網と腸間膜における腹膜播種の成立には異なる機序が存在することを示唆している。大網には多数の乳斑が豊富に存在する。乳斑

は、胸腔や腹腔内の漿膜面のマクロファージやリンパ球、形質細胞などが集合した2次リンパ構造体で、腹腔内では主に大網に存在し、腹腔内の恒常性を維持するため血流と腹腔内の物質交換のゲートとなるといわれている(40-42)。反面、腹腔内に播種したがん細胞は乳斑に優先的に付着することも報告されており(43, 44)、アテロコラーゲンにより徐放された miR-29b も大網に優先的に吸着され、大網に付着した YTN16P の播種を抑制したと考えられる。一方、この方法では腹腔内での miR-29b の早期分解を十分に防止できなかったため、腸間膜上の播種結節は抑制するに至らなかったのではないかと推測された。

そこで、より効率的な miRNA の局所デリバリーシステムを用いれば、臨床的に有用な播種治療になりうると考え、次にエクソソームをキャリアに用いることを検討した。エクソソームは内部に様々な核酸やタンパクを内包して生体内で多くの細胞間コミュニケーションを担い、薬剤のキャリアとして有用な可能性を持つことが報告されている(17, 45)。また、miRNA をエクソソームに内包することにより様々な標的細胞における吸収効率が良くなることも報告されている(16)。

また本研究では、キャリアとなるエクソソームを産生させる細胞には BMSCs を用いることとした。BMSCs は、多量のエクソソームを放出することが知られており(46)、自家や同種他家に対する免疫反応の制御効果を持ち BMSCs 由来エ

エクソソーム投与による副反応が出る可能性が低く(47)(48)(49)(50)、治療用のエクソソームを産生させる細胞に適していると考えられるためである。

実際に、BMSCs の培養上清から超遠心法で細胞外小胞成分を回収すると、電子顕微鏡では丸く均一な小胞であり、ナノ粒子トラッキング解析ではサイズのピークが約 130nm で、フローサイトメトリーではエクソソーム表面マーカー (CD9、CD69) の発現を認め、エクソソームであることが確認できた。デジタル PCR により遺伝子導入した BMSCs とそのエクソソームに miR-29b が豊富に内包されていることも確認できた。さらに、このエクソソーム内包 miR-29b が、miR-29b mimic のリポフェクション法と同様に MMT を抑制することが確認できた。そこで、マウス同種胃癌腹膜播種モデルにおけるエクソソーム内包 miR-29b の腹腔内局所投与による播種結節抑制実験を行ったところ、エクソソーム内包 miR-29b を腹腔内投与した群において、大網のみでなく、腸間膜においても腹膜播種結節が有意に減少した。この結果から、miR-29b 内包エクソソームの腹腔内補充療法が腹膜播種再発を抑制する有望な治療法になりうることと考えられた。

近年、エクソソームに診断や治療を目的として注目が集まっているが、細胞間で生物学的情報を伝達できる内因性のキャリアとして大きな期待が寄せられている(51, 52)(53)。過去の研究でも、乳癌において miR-142-3p を BMSCs 由来

エクソソームに内包させ投与することで腫瘍の形成を抑制することが報告されている(54)。また、エクソソームをキャリアとして用いる方法のメリットとして、エクソソーム産生細胞の遺伝子発現を調節することで、標的とする細胞の特異性や吸収効率を上昇させることが可能である(51)(52)(53)。その例として、ヒト胚性腎細胞株 HEK293 に上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor ; EGFR) に特異的に結合するペプチドを持つ血小板由来成長因子受容体を発現させることで、この HEK293 が産生するエクソソームが EGFR を持つ乳癌細胞に効率的に miRNA を送達できるようになること(55)や、ニューロン特異的ペプチドを含む修飾膜をエクソソームに持たせることでマウスの血液から脳組織に送達できたこと(56)が報告されている。したがって、本研究に用いた腹膜播種の実験系においても、腹膜中皮細胞に特異的な分子をエクソソームの表面構造に発現させることで、より選択的に取り込み効率を上昇させ、さらに播種抑制効果を高めることも可能になると考えられる。

エクソソームを用いたドラッグデリバリーシステムの開発に関する研究は未だ十分でなく、安定した製造法や品質を維持した保存法の確立も不十分である。また、エクソソームを用いたナノ医療治療薬の臨床応用例は現状ではまだ少なく、癌を対象とした臨床研究はほとんどない(57)。しかし、前述のようにエクソソームは、核酸やタンパクの安定的な送達を可能とするだけでなく、送

達中の不要な代謝や他臓器への不要な蓄積を避けることで高い臓器選択性や安全性をもたらす可能性を秘めており、胃癌腹膜播種に対する新規治療法として期待できるだけでなく、既存の治療薬と併用する事でその治療効果の向上にもつながる可能性があると考える。

5. 結語

miR-29b は胃癌細胞の遊走も抑制したが、腹膜中皮細胞の中皮間葉転換を強く抑制し、マウス同種胃癌腹膜播種モデルにおいて腹膜播種の形成を抑制した。特に、TGF- β 1 刺激を受けた腹膜中皮細胞の Fibronectin1 産生を抑制することで原発巣より播種された胃癌細胞の接着を強く抑制したことから、miR-29b は癌と宿主の両方に作用して腹膜播種の成立を防止する作用を有していると考えられた。したがって、miR-29b 腹腔内補充療法は、単独で播種再発を効果的に予防することが期待できるだけでなく、既存の抗がん剤や分子標的薬と併用することで、播種に対する高い治療効果をもたらす可能性があると考えられる。今後、miR-29b が播種抑制をもたらすより詳細なメカニズムの解明とエクソソームの表面構造の改良、さらには安定したエクソソーム大量産生システムを構築することにより、より効果的な腹膜播種治療法の開発に繋がると考えられる。miR-29b 腹腔内補充療法が胃癌腹膜播種患者の悲惨な現状を打破する光になると信じている。

6. 謝辞

本研究を進めるにあたり、御指導を頂いた自治医科大学 消化器一般移植外科 佐田尚宏教授、北山丈二教授、宮戸秀世先生、臨床腫瘍科 大澤英之先生に深く感謝致します。

そして、研究の計画・遂行にあたり様々なご助言を頂き、日々の研究生活を支えて下さった自治医科大学消化器一般移植外科学教室の皆様、臨床研究支援センターの篠原淳子さん、畠山浩美さん、贄田育子さんに心より御礼申し上げます。

7. 参考文献

1. M. L. Soucisse, W. Liauw, G. Hicks, D. L. Morris, Early postoperative intraperitoneal chemotherapy for lower gastrointestinal neoplasms with peritoneal metastasis: a systematic review and critical analysis. *Pleura Peritoneum* **4**, 20190007 (2019).
2. T. D. Yan, D. Black, R. Savady, P. H. Sugarbaker, Systematic review on the efficacy of cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy for peritoneal carcinomatosis from colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* **24**, 4011-4019 (2006).
3. J. Kitayama, Intraperitoneal chemotherapy against peritoneal carcinomatosis: current status and future perspective. *Surg Oncol* **23**, 99-106 (2014).
4. J. Kitayama *et al.*, Treatment of patients with peritoneal metastases from gastric cancer. *Ann Gastroenterol Surg* **2**, 116-123 (2018).
5. S. Fujimoto *et al.*, Improved mortality rate of gastric carcinoma patients with peritoneal carcinomatosis treated with intraperitoneal hyperthermic chemoperfusion combined with surgery. *Cancer* **79**, 884-891 (1997).
6. M. Kuramoto *et al.*, Extensive intraoperative peritoneal lavage as a standard prophylactic strategy for peritoneal recurrence in patients with gastric carcinoma. *Ann Surg* **250**, 242-246 (2009).
7. B. Y. Zhu *et al.*, Prognostic Factors and Recurrence Patterns in T4 Gastric Cancer Patients after Curative Resection. *J Cancer* **10**, 1181-1188 (2019).
8. P. Sandoval *et al.*, Carcinoma-associated fibroblasts derive from mesothelial cells via mesothelial-to-mesenchymal transition in peritoneal metastasis. *J Pathol* **231**, 517-531 (2013).
9. A. Rynne-Vidal, J. A. Jiménez-Heffernan, C. Fernández-Chacón, M. López-Cabrera, P. Sandoval, The Mesothelial Origin of Carcinoma Associated-Fibroblasts in Peritoneal Metastasis. *Cancers (Basel)* **7**, 1994-2011 (2015).
10. H. Saito *et al.*, Importance of human peritoneal mesothelial cells in the progression, fibrosis, and control of gastric cancer: inhibition of growth and fibrosis by tranilast. *Gastric Cancer* **21**, 55-67 (2018).
11. C. H. Gordillo *et al.*, Mesothelial-to-Mesenchymal Transition Contributes to the Generation of Carcinoma-Associated Fibroblasts in Locally Advanced Primary Colorectal Carcinomas. *Cancers (Basel)* **12**, (2020).
12. M. Yáñez-Mó *et al.*, Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* **348**, 403-413 (2003).
13. M. López-Cabrera, Mesenchymal Conversion of Mesothelial Cells Is a Key Event in the Pathophysiology of the Peritoneum during Peritoneal Dialysis. *Adv Med* **2014**, 473134

- (2014).
14. P. Sandoval *et al.*, Mesothelial-to-mesenchymal transition in the pathogenesis of post-surgical peritoneal adhesions. *J Pathol* **239**, 48-59 (2016).
 15. A. Hoshino *et al.*, Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **527**, 329-335 (2015).
 16. N. Kosaka, T. Ochiya, Unraveling the Mystery of Cancer by Secretory microRNA: Horizontal microRNA Transfer between Living Cells. *Front Genet* **2**, 97 (2011).
 17. G. van Niel, G. D'Angelo, G. Raposo, Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 213-228 (2018).
 18. H. Ohzawa *et al.*, Exosomal microRNA in peritoneal fluid as a biomarker of peritoneal metastases from gastric cancer. *Ann Gastroenterol Surg* **4**, 84-93 (2020).
 19. H. Ohzawa *et al.*, Reduced expression of exosomal miR-29s in peritoneal fluid is a useful predictor of peritoneal recurrence after curative resection of gastric cancer with serosal involvement. *Oncol Rep* **43**, 1081-1088 (2020).
 20. J. J. Zhao *et al.*, microRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma. *Blood* **115**, 2630-2639 (2010).
 21. L. Mazzoccoli *et al.*, MiR-29 silencing modulates the expression of target genes related to proliferation, apoptosis and methylation in Burkitt lymphoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* **144**, 483-497 (2018).
 22. Z. Yang *et al.*, MiR-29a modulates the angiogenic properties of human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **434**, 143-149 (2013).
 23. D. Harmanci, E. P. Erkan, A. Kocak, G. G. Akdogan, Role of the microRNA-29 family in fibrotic skin diseases. *Biomed Rep* **6**, 599-604 (2017).
 24. J. J. Kwon, T. D. Factor, S. Dey, J. Kota, A Systematic Review of miR-29 in Cancer. *Mol Ther Oncolytics* **12**, 173-194 (2019).
 25. M. Alizadeh *et al.*, The potential role of miR-29 in health and cancer diagnosis, prognosis, and therapy. *J Cell Physiol* **234**, 19280-19297 (2019).
 26. J. Chou *et al.*, GATA3 suppresses metastasis and modulates the tumour microenvironment by regulating microRNA-29b expression. *Nat Cell Biol* **15**, 201-213 (2013).
 27. A. Rynne-Vidal, J. A. Jimenez-Heffernan, C. Fernandez-Chacon, M. Lopez-Cabrera, P. Sandoval, The Mesothelial Origin of Carcinoma Associated-Fibroblasts in Peritoneal Metastasis. *Cancers (Basel)* **7**, 1994-2011 (2015).
 28. Y. Kumagai *et al.*, Effect of Systemic or Intraperitoneal Administration of Anti-PD-1 Antibody for Peritoneal Metastases from Gastric Cancer. *In Vivo* **36**, 1126-1135 (2022).

29. P. M. Voorhoeve *et al.*, A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell* **124**, 1169-1181 (2006).
30. Y. Li *et al.*, Epigenetic deregulation of miR-29a and miR-1256 by isoflavone contributes to the inhibition of prostate cancer cell growth and invasion. *Epigenetics* **7**, 940-949 (2012).
31. H. Cui *et al.*, Deregulation between miR-29b/c and DNMT3A is associated with epigenetic silencing of the CDH1 gene, affecting cell migration and invasion in gastric cancer. *PLoS One* **10**, e0123926 (2015).
32. H. Jiang, G. Zhang, J. H. Wu, C. P. Jiang, Diverse roles of miR-29 in cancer (review). *Oncol Rep* **31**, 1509-1516 (2014).
33. C. C. Wong *et al.*, Lysyl oxidase-like 2 is critical to tumor microenvironment and metastatic niche formation in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **60**, 1645-1658 (2014).
34. H. A. Kenny *et al.*, Mesothelial cells promote early ovarian cancer metastasis through fibronectin secretion. *J Clin Invest* **124**, 4614-4628 (2014).
35. M. Yoshihara *et al.*, Ovarian cancer-associated mesothelial cells induce acquired platinum-resistance in peritoneal metastasis via the FN1/Akt signaling pathway. *Int J Cancer* **146**, 2268-2280 (2020).
36. T. Yang *et al.*, miR-29 mediates TGF β 1-induced extracellular matrix synthesis through activation of PI3K-AKT pathway in human lung fibroblasts. *J Cell Biochem* **114**, 1336-1342 (2013).
37. C. Luna, G. Li, J. Qiu, D. L. Epstein, P. Gonzalez, Role of miR-29b on the regulation of the extracellular matrix in human trabecular meshwork cells under chronic oxidative stress. *Mol Vis* **15**, 2488-2497 (2009).
38. M. Kwiecinski *et al.*, Hepatocyte growth factor (HGF) inhibits collagen I and IV synthesis in hepatic stellate cells by miRNA-29 induction. *PLoS One* **6**, e24568 (2011).
39. J. Zhu *et al.*, Chaperone Hsp47 Drives Malignant Growth and Invasion by Modulating an ECM Gene Network. *Cancer Res* **75**, 1580-1591 (2015).
40. L. F. Krist *et al.*, Cellular composition of milky spots in the human greater omentum: an immunochemical and ultrastructural study. *Anat Rec* **241**, 163-174 (1995).
41. L. Cui *et al.*, Biodefense function of omental milky spots through cell adhesion molecules and leukocyte proliferation. *Cell Tissue Res* **310**, 321-330 (2002).
42. J. Liu, X. Geng, Y. Li, Milky spots: omental functional units and hotbeds for peritoneal cancer metastasis. *Tumour Biol* **37**, 5715-5726 (2016).
43. C. P. Carmignani, T. A. Sugarbaker, C. M. Bromley, P. H. Sugarbaker, Intraperitoneal cancer dissemination: mechanisms of the patterns of spread. *Cancer Metastasis Rev* **22**,

- 465-472 (2003).
44. A. A. Ayantunde, S. L. Parsons, Pattern and prognostic factors in patients with malignant ascites: a retrospective study. *Ann Oncol* **18**, 945-949 (2007).
 45. C. Lässer, Exosomal RNA as biomarkers and the therapeutic potential of exosome vectors. *Expert Opin Biol Ther* **12 Suppl 1**, S189-197 (2012).
 46. W. Zhu *et al.*, Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth in vivo. *Cancer Lett* **315**, 28-37 (2012).
 47. M. F. Peterson, N. Otoc, J. K. Sethi, A. Gupta, T. J. Antes, Integrated systems for exosome investigation. *Methods* **87**, 31-45 (2015).
 48. W. T. Tse, J. D. Pendleton, W. M. Beyer, M. C. Egalka, E. C. Guinan, Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* **75**, 389-397 (2003).
 49. S. Aggarwal, M. F. Pittenger, Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* **105**, 1815-1822 (2005).
 50. A. Corcione *et al.*, Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* **107**, 367-372 (2006).
 51. D. Ha, N. Yang, V. Nadithe, Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharm Sin B* **6**, 287-296 (2016).
 52. B. Li, Y. Cao, M. Sun, H. Feng, Expression, regulation, and function of exosome-derived miRNAs in cancer progression and therapy. *FASEB J* **35**, e21916 (2021).
 53. A. Rajput, A. Varshney, R. Bajaj, V. Pokharkar, Exosomes as New Generation Vehicles for Drug Delivery: Biomedical Applications and Future Perspectives. *Molecules* **27**, (2022).
 54. Z. Naseri, R. K. Oskuee, M. Forouzandeh-Moghadam, M. R. Jaafari, Delivery of LNA-antimiR-142-3p by Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomes to Breast Cancer Stem Cells Reduces Tumorigenicity. *Stem Cell Rev Rep*, (2020).
 55. S. Ohno *et al.*, Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. *Mol Ther* **21**, 185-191 (2013).
 56. L. Alvarez-Erviti *et al.*, Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol* **29**, 341-345 (2011).
 57. Z. Weng *et al.*, Therapeutic roles of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in cancer. *J Hematol Oncol* **14**, 136 (2021).