

氏名	木村有希
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第 678 号
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 23 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	MicroRNA 医薬を用いた新規消化器癌腹膜播種治療法の確立
論文審査委員	(委員長) 教授 力山敏樹 (委員) 准教授 嵯峨泰 准教授 仲矢丈雄

論文内容の要旨

1 研究目的

腹膜播種は消化器癌で最も重要な予後規定因子である。播種を形成する分子機序はまだ十分に解明されていないが、腹膜中皮細胞（PMCs）は腹膜転移に際して中皮間葉転換（MMT）をきたし、播種の成立・進行に重要な役割を果たすといわれている。一方、がん患者のエクソソームはがん特異的な機能分子を有し、標的臓器の微小環境を癌細胞の生育に適すように変換し、遠隔臓器への血行性転移を促進することが解っている。過去の研究で、腹膜播種を有す胃癌患者の腹腔内液中のエクソソームに含まれる miRNA を網羅的に解析し、播種患者では miR-29b が有意に低下していること、根治切除時の腹腔内洗浄液で miR-29b 低下は腹膜播種再発率が高いことが判明した。そこで、本研究では miR-29b の PMCs に対する作用を *in vitro* の実験で検討すると共に、マウス同種腹膜播種モデルを用いて miR-29b を腹腔内に補充し胃癌の腹膜播種に対する抑制効果を検討した。特に、miRNA は生体内で分解されやすく miRNA 単独では細胞内に取り込まれにくいことから、その投与方法については工夫が必要になる。そこで、腹膜播種に対する miRNA 補充療法の最適化や効率化に注目して検討した。

2 研究方法

miR-29b の胃癌細胞や PMCs の増殖能、遊走能や接着能に対する作用を *in vitro* で検討した。PMCs を TGF- β 1 で刺激して MMT を誘導し、cytokeratin、Vimentin、calretinin 及び fibronectin1 の発現を免疫染色法で検討し、miR29b の作用を検討した。C57BL/6 マウスに YTN16P を腹腔内注入する胃癌腹膜播種モデルを用いて、miR-29b を、(1) miR-29b をアテロコラーゲンと混合し複合体を形成させて分解を防ぎ安定的な作用を発揮させる方法 (2) miR-29b を骨髄間葉系幹細胞（BMSCs）由来エクソソームに封入して投与方法、以上二つの方法で腹腔内投与し、腸間膜・大網上の播種巣の数と重さを測定し、腹膜播種抑制効果を検討した。後者では、レンチウイルスを用いた遺伝子導入により、安定的に miR-29b 内包エクソソームを放出する細胞株を作成し、その上清から超遠心分離法にて抽出したエクソソームを用いた。

3 研究成果

1. 各種細胞の miR-29b 発現

miR-29b 発現を PCR で比較すると、ヒト腹膜中皮細胞 (HPMCs) は NUGC、MKN45 や末梢血単核細胞より高値であったが、TGF- β 1 で MMT を起こすと著明に低下した。

2. miR-29b のヒト胃癌細胞株に対する作用

NUGC、MKN45 にリポフェクション法で miR-29b 導入すると、10%FCS に対する遊走能は miR-NC 群と比べ著明に低下した (NUGC-4 11.6 ± 1.7 vs 235 ± 13.8 、MKN45 5.0 ± 0.6 vs 52.4 ± 3.5 counts/HPF, $n = 3$, $p < 0.0001$)。

3. miR-29b の TGF- β 1 誘導 MMT に対する作用

HPMCs は TGF- β (10ng/ml) の添加により MMT を起こし、細胞形態は紡錘形に変化し、E-cadherin・Calretinin 発現低下や Vimentin、Fibronectin1 発現上昇し、遊走能が著明に亢進したが、miR-29b はこれらの変化をほぼ完全に打ち消した。また、胃癌細胞 (NUGC、MKN45) の HPMC への接着能が著増したが (NUGC-4 6.7 ± 2.3 vs 50.7 ± 22.0 、MKN45 13.7 ± 3.7 vs 147.9 ± 43.4 counts/HPF, $n = 5$, $p < 0.0001$)、miR-29b 導入で miR-NC と比較して強く抑制された (NUGC-4 18.0 ± 5.2 vs 300.0 ± 119.8 、MKN45 7.5 ± 2.4 vs 219.9 ± 51.7 counts/HPF, $n = 5$, $p < 0.0001$)。 β 1 インテグリン抗体、RGD ペプチドを用いた抑制実験の結果より、この接着能の変化は HPMC 上の Fibronectin1 の発現低下によるものと考えられた。

4. miR-29b 腹腔内投与のマウス胃癌腹膜播種に対する治療効果

マウス胃癌細胞株 YTN16P を用いた腹膜播種モデルにおいて、アテロコラーゲン法で miR-29b を腹腔内投与すると、腸間膜での播種形成を抑制しなかったが、大網上の播種結節数は有意に減少した (20.5 ± 8.1 vs 6.0 ± 4.7 vs 17.3 ± 8.0 vs 23.3 ± 4.8 counts/HPF, $n = 6$)。

5. miR-29b 内包エクソソームの TGF- β 1 誘導 MMT に対する作用

BMSCs に miR-29b 前駆体配列組み込みレンチウイルスを感染させ、産生するエクソソームを超遠心法で回収し、miR-29b 発現をデジタル PCR で測定すると、対照群と比べ著明に増加していた。この miR-29b 内包エクソソーム添加により、TGF- β 1 刺激により増加した HPMC の遊走能は著明に減少し (36.7 ± 5.4 vs 124.9 ± 14.8 counts/HPF, $n = 3$, $p < 0.005$)、胃癌細胞の HPMC への接着能も同様に著明に減少した (NUGC-4 4.5 ± 1.1 vs 47.6 ± 26.5 counts/HPF、MKN45 67.7 ± 8.9 vs 290.2 ± 45.1 counts/HPF, $n = 5$, $p < 0.0001$)。また、miR-29b 内包エクソソームは、MMT による細胞形態や中皮間葉転換マーカー変化を強く抑制した。

6. miR-29b 内包エクソソーム腹腔内投与の腹膜播種に対する治療効果

上記の胃癌腹膜播種モデルにて、miR-29b 内包エクソソームを腹腔内投与すると、大網、腸間膜どちらの播種結節数も有意に減少した (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, $n = 6$, $p < 0.05$)。

4 考察

胃癌腹膜播種症例の腹腔内液中エクソソームにおいて低下している miR-29b は胃癌細胞の遊走能だけでなく、HPMC の TGF- β 1 誘導 MMT に伴う諸現象を強く抑制した。特に Fibronectin1 産生と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に抑制的な作用を発揮すると考えられた。マウス胃癌腹膜播種モデルに miR-29b をアテロコラーゲン法で腹腔内投与すると大網に局限した抑制作用を認めるのみであったが、BMSCs 由

来エクソソームに内包した形で投与すると、腸間膜においても有意に播種結節数を抑制した。この結果から、miR-29b をエクソソームに内包することにより生体内で分解されやすい miRNA をより効率的に標的である中皮細胞へ輸送できると考えられた。以上より、エクソソームを担体とする投与法は miRNA 製剤の有用な薬物輸送法であり、miR-29b 内包エクソソームの腹腔内局所投与は腹膜播種の新規治療法となりうることが示唆された。

5 結論

胃癌腹膜播種患者の腹腔内液中エクソソームで低下している miR-29b を適切な方法で腹腔内補充することは腹膜播種の抑制に繋がることが判明した。今後、miR-29b 補充療法は胃癌術後の播種再発に対する有用な治療法として臨床応用できると考える。

論文審査の結果の要旨

研究目的は明確であり、miR29b をアテロコラーゲン法や BMSC 由来エクソソーム封入などの手法で腹腔内投与し、腹膜播種抑制を検討する手法は独創的と考えられる。

miR29b の、ヒト胃癌細胞株に対する増殖能・抑制能の低下、ヒト腹膜中皮細胞の MMT に対する抑制効果、マウス胃癌播種モデルでの抑制効果など、十分な研究結果であると考えられた。

胃癌腹膜播種患者への miR-29b 腹腔内補充療法など、今後の臨床応用への発展が期待される研究と思われる。

また、学位論文自体も、読みやすく理解しやすい体裁で、非常に良く纏まっていた。十分学位に値する論文である。

最終試験の結果の要旨

発表内容は、上記論文の評価通り十分な研究結果であり、よく纏まって理解しやすい内容であった。十分学位に値する試験結果であった。