

表 題 消化器癌腹膜播種に対するマイクロ RNA を用いた
新規遺伝子治療法の確立

論 文 の 区 分 博士課程

著 者 名 金子 勇貴

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 地域医療学系

専攻分野 消化器疾患学

専攻科 消化器外科学

2024年1月10日申請の学位論文

目次

略語一覧	5
1. 序文	7
2. 実験材料と方法	10
2-1. アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた miR-29b 導入が腹 膜中皮細胞に与える影響の検討	
2-1-1. 細胞の培養	
2-1-2. 腹膜中皮細胞の分離・培養	
2-1-3. miR-29b 搭載 AAV ベクターの作製	
2-1-4. 腹膜中皮細胞における AAV セロタイプテスト	
2-1-5. 腹膜中皮細胞の中皮間葉転換の誘導	
2-1-6. AAV ベクターによる細胞へのマイクロ RNA 導入	
2-1-7. 細胞からの RNA 抽出とデジタル PCR 法	
2-1-8. 腹膜中皮細胞のマイクロアレイ解析	
2-1-9. 細胞免疫染色による腹膜中皮細胞の中皮間葉転換関連マーカー の評価	
2-1-10. 腹膜中皮細胞の増殖能・遊走能・接着能の評価	

2-1-11. フローサイトメトリーによる腹膜中皮細胞の免疫チェックポイント分子発現の評価

2-2. マウス腹膜播種モデルにおける miR-29b 搭載アデノ随伴ウイルスベクター (AAV-miR-29b) 腹腔内投与による播種抑制効果の検討

2-2-1. マウス生体内での腹膜および腹膜中皮細胞への遺伝子導入の確認

2-2-2. マウス腹膜播種モデル（胃癌・膵癌）における AAV-miR-29b による播種抑制実験

2-2-3. マウス胃癌腹膜播種モデルにおける AAV-miR-29b とパクリタキセルの併用腹腔内投与による播種抑制効果の検討

2-2-4. マウス腹膜組織の線維化の評価

2-2-5. マウス血液の生化学的検査

2-3. データの統計処理

3. 結果 27

3-1. アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた miR-29b 導入が腹膜中皮細胞に与える影響の検討

3-1-1. 腹膜中皮細胞における AAV セロタイプテスト

3-1-2. 腹膜中皮細胞の AAV ベクターによる遺伝子導入効率

3-1.3. マウス癌細胞株の AAV ベクターによる遺伝子導入効率

3-1.4. 腹膜中皮細胞の AAV ベクターによる miR-29b 導入

3-1.5. マウス癌細胞株の AAV ベクターによる miR-29b 導入

3-1.6. ヒト腹膜中皮細胞の TGF- β 1 刺激による形態および形質的变化
と AAV2-miR-29b の作用

3-1.7. 腹膜中皮細胞の TGF- β 1 刺激による増殖能・遊走能・接着能の
変化に対する AAV-miR-29b の抑制作用

3-1.8. マウス癌細胞株の増殖能に対する AAV-DJ-miR-29b の抑制作用

3-1.9. マウス腹膜中皮細胞に AAV-DJ-miR-29b が及ぼす遺伝子発現の
変化

**3-2. マウス腹膜播種モデルにおける miR-29b 搭載アデノ随伴ウイルス
ベクター (AAV-miR-29b) 腹腔内投与による播種抑制効果の検討**

3-2-1. AAV ベクター腹腔内投与によるマウス腹膜・腹膜中皮細胞への
遺伝子導入

3-2-2. マウス胃癌腹膜播種に対する AAV-DJ-miR-29b 腹腔内投与の抑
制作用

3-2-3. マウス胃癌腹膜播種モデルにおける AAV-DJ-miR-29b 腹腔内投
与による腹膜線維化抑制作用

3-2-4. マウス胃癌腹膜播種に対する AAV-DJ-miR-29b とパクリタキセル

ルの併用腹腔内投与による抑制効果

3-2-5. マウス膵癌腹膜播種に対する AAV-DJ-miR-29b 腹腔内投与に抑

制作用

3-2-6. AAV ベクター腹腔内投与による肝毒性評価

4. 考察	56
5. 結語	62
6. 謝辞	63
7. 参考文献	64

略語一覧

略語	名称
AAV	Adeno-associated virus
AAV-miR-29b	マイクロ RNA-29b 搭載 AAV
AAV-GFP	GFP 遺伝子搭載 AAV
AAV-NC	ネガティブコントロール AAV
ALT	Alanine transaminase
APC	Allophycocyanin
AST	Asparatate aminotransferase
BSA	Bovine serum albumin
B7-H3	B7 homolog 3; CD276
DAPI	4'6-diamidino-2-phenylindole
DEG	Differentially expressed gene
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	Fetal bovine serum
FN	Fibronectin
GFP	Green fluorescent protein
GO	Gene ontology

HEK293	ヒト胎児腎細胞 293
HPF	High power field
miRNA	マイクロ RNA
miR-29b	マイクロ RNA-29b
MFI	Mean fluorescence intensity
MMT	Mesothelial-to-mesenchymal transition
MOI	Multiplicity of infection
pAAV-CMV-miR-29b	miR-29b 前駆体配列組込 AAV プラスミド
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PMC	Peritoneal mesothelial cell
RNA	Ribonucleic acid
RPMI1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
TGF-β1	Transforming growth factor β 1
THBS-2	Thrombospondin-2
T-Bil	Total bilirubin
7-AAD	7-Amino-Actinomycin D

1. 序文

腹膜は、消化器癌や卵巣癌の主たる転移部位であり(1, 2)、腹腔内に腫瘍細胞が零れ落ち、腹膜に接着・浸潤することで腹膜播種が成立する。近年の全身化学療法の進歩や免疫チェックポイント阻害薬の登場により、切除不能・再発消化器癌患者の予後は著明に改善しているが、腹膜播種症例の予後は未だ不良である(3-5)。特に胃癌では全ステージの5年生存率が約70%であるのに対し、腹膜播種の1年生存率は約20%と極めて不良である(6)。腹膜播種に対する全身化学療法の有効性が乏しい原因に、全身循環から腹腔への治療薬の送達を妨げる「腹膜-血漿関門」の存在があり(7, 8)、これを克服するべく抗癌剤を直接腹腔内に投与する腹腔内化学療法の開発が進められてきた(9, 10)。胃癌や膵癌の腹膜播種に対する腹腔内化学療法は一定の有効性を示しているが(11-14)、依然として予後は良好といえない。したがって、腹膜播種患者の予後改善のために、播種の予防および新規治療法の開発が重要である。

腹膜は腹腔を構成する組織であり、その表面は単層の腹膜中皮細胞(peritoneal mesothelial cell; PMC)で覆われている。これらの腹膜中皮細胞はプロテオグリカンやリン脂質を産生・放出し、細菌の侵入や腫瘍細胞の接着を抑制するバリアとして重要な役割を担っている(15)。しかし腹膜播種の成立・進行の過程で中皮間葉転換(mesothelial-to-mesenchymal transition; MMT)をきた

し、この表現型の変化により遊走能が亢進し、細胞外マトリックスや線維化促進因子、血管形成増殖因子を産生することで、むしろ腫瘍細胞にとって好都合な環境を形成する(16, 17)。以上のことから、腹膜中皮細胞は、腹膜播種を制御するための重要な治療標的であると考えられる。

マイクロ RNA (miRNA) は、複数のメッセンジャーRNA の翻訳を阻害することにより遺伝子発現を制御するノンコーディング RNA の一種であり、様々な細胞機能の制御において重要な働きをもつ。当研究室では、これまでに胃癌患者の腹水に含まれる細胞外小胞中の miRNA を網羅的に解析し、腹膜播種患者の腹水中でマイクロ RNA-29 (miR-29) ファミリー、特に miR-29b が顕著に減少していることを明らかにした(18)。また併せて根治切除後の腹膜播種再発予測マーカーとなることを報告してきた(19)。miR-29b は多くの癌腫において腫瘍抑制性に働くことが報告されており(20-22)、この miR-29b を消化器癌腹膜播種患者の腹腔内へ補充することで、播種の成立を抑制することが出来るのではないかと考えた。

しかし miRNA は生体内で RNA 酵素の作用で急速に分解され、標的とする組織に送達するためには、何らかの担体を使用する必要がある(23)。当研究室ではこれまでにマウス胃癌腹膜播種モデルを用いて miRNA の送達システムの開発をすすめ、細胞外小胞に miR-29b を内包させ腹腔内へ反復投与することで

(24)、従来のアテロコラーゲン法(25)よりも、腹膜播種の形成を抑制することを見出した。しかし、反復投与するための大量の細胞外小胞を作成するためには多大な時間と資源が必要となる。そこで臨床応用へ向けて、より簡便な投与方法の開発が必要と考え、ウイルスベクターを用いた腹膜への遺伝子導入の研究を企画した。様々なウイルスベクターの中でもアデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus; AAV) ベクターは病原性がなく、免疫原性が低い、また遺伝子導入効率が良好かつ長期に発現が持続するといった特長があり、遺伝子治療の手段として最も研究が進んでいる(26-28)。本研究では、miR-29b を搭載した AAV ベクターを作製し腹腔内投与することで、腹膜および腹膜中皮細胞において miR-29b 発現を上昇させる送達システムを構築した。次に、胃癌および膵癌腹膜播種モデルマウスを作成し、miR-29b を搭載した AAV ベクターを腹腔内投与することでの腹膜播種抑制能を検討した。

2. 実験材料と方法

本研究で用いた試薬や抗体、オリゴヌクレオチド配列、また細胞株は以下の通りである。

表1 使用した試薬・抗体

N/A: Not Applicable		
商品名	clone/一般名	会社
Acetone	-	Fujifilm Wako Chemical
Anti- Calretinin antibody	EP1798	Abcam
Anti- Fibronectin antibody	F1	Abcam
APC-conjugated anti-human B7-H3 antibody	MIH35	BioLegend
APC-conjugated anti-human PD-L1 antibody	10F.9G2	BioLegend
Cremophor EL		Sigma aldrich
Dif-Quick	-	Sysmex
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594	N/A	Invitrogen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	-	Thermo Fisher Scientific
E-Cadherin (24E10) Rabbit mAb	24E10	Cell Signaling Technology
FcR blocking reagent	N/A	Miltenyi Biotec
Fetal Bovine Serum	-	Sigma aldrich
Formalin	-	Fujifilm Wako Chemical
Isoflurane	N/A	Fujifilm Wako Chemical
Isotype control IgG2a (APC)	RTK2758	BioLegend
Isotype control IgG2b (APC)	RTK4530	BioLegend
miRNeasy kit	-	Qiagen
miR-29b precursor	-	Biosettica
MTS	-	Dojindo

O.C.T. Compound	-	Fujifilm Wako Chemical
Paclitaxel	-	Fujifilm Wako Chemical
Paraformaldehyde (4%)	-	Fujifilm Wako Chemical
pAAV2 Rep/AAV-DJ Cap	-	Cell Biolabs
pAAV-CMV-MCS	-	Agilent Technologies
pAAV-hrGFP	-	Agilent Technologies
pAAV-RC	-	Agilent Technologies
pHelper	-	Agilent Technologies
Penicilin- Streptomycin	-	Life Technologies
Phosphate buffered saline (PBS)	-	ThermoFisher Scientific
ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI	N/A	ThermoFisher Scientific
QIAprep Spin Miniprep Kit	-	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	-	Qiagen
Quick Ligation Kit	-	New England BioLabs
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640	-	Thermo Fisher Scientific
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for Phagocytic Cell Labeling	-	Sigma aldrich
TaqMan miRNA Reverse Transcription Kit	-	Applied BioSystems
TGF-β1 (human, mouse)	N/A	R&D systems, USA
Triton X-100	-	Thermo Fisher Scientific
TrypLE Express	-	ThermoFisher Scientific
Vimentin Monoclonal Antibody (SP20)	SP20	Invitrogen
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

miR-29b 前駆体配列 (hsa-mir-29b-1)

**5'-CUUCAGGAA GCUGGUUUCAU AUGGUGGUUU AGAUUU AAAUAG
UGAUUGUCUAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUUCUUGGGGG-3'**

表 2 使用した細胞株

細胞名	癌種	会社・機関
MKN45	ヒト胃癌細胞	理化学研究所
NUGC-4	ヒト胃癌細胞	理化学研究所
HEK293	ヒト胎児腎細胞	Agilent Technologies
YTN16P	マウス胃癌細胞	東京大学
PAN02	マウス膀胱癌細胞	DCTD

2-1. アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた **miR-29b** 導入が腹膜中皮細胞に与える影響の検討

2-1-1. 細胞の培養

ヒト胃癌細胞株の MKN45、NUGC-4 は理化学研究所 (Tsukuba, Japan)、ヒト胎児腎細胞 293 (HEK293) は Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) より購入した。これらの細胞は、10%非働化ウシ胎子血清 (FBS; Sigma, St Louis, MO, USA)、およびペニシリン 100U/ml、ストレプトマイシン 100mg/ml (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 培地中で、

37°C、5%二酸化炭素下で、インキュベーター内にて培養した。

マウス胃癌細胞株の YTN16P は、10% FBS、ペニシリン 50U/ml、ストレプトマイシン 50mg/ml を添加した DMEM 培地を用い、I 型コラーゲンコーティングディッシュで 37°C、5%二酸化炭素下で培養した。

マウス膀胱癌細胞株の PAN02 は、Division of Cancer Treatment and Diagnosis (DCTD, NCI, Rockville, MD, USA) より購入し、10% FBS、ペニシリン 100U/ml、ストレプトマイシン 100mg/ml を添加した Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 培地中で培養した。

それぞれの細胞は 80%コンフルエントに至る前に TrypLE Express 試薬 (Thermo Fisher Scientific) を用い剥離され、3 継代以内に実験に用いた。

2-1-2. 腹膜中皮細胞の分離・培養

ヒト腹膜中皮細胞 (peritoneal mesothelial cells; PMCs) は当科で施行された高度肥満症に対するスリーブ状胃切除術時に、切除胃に付着する大網組織より分離した。大網表面をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; Thermo Fisher Scientific) で洗浄後、PBS で希釈した 50% TrypLE Express 20ml 中へ入れ、37°Cの恒温水槽で 1 時間振盪した。振盪後、大網組織を除去し、上清を 100 μ m ナイロンメッシュで濾過後、4°C、1500rpm で 5 分間遠心した。細胞ペレットを 20% FBS, およびペ

ニシリン 100U/ml、ストレプトマイシン 100mg/ml を添加した DMEM 培地で懸濁し、I 型コラーゲンコーティングディッシュ（10cm）に播種させて、37°C、5% 二酸化炭素下で培養した。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。上記実験は自治医科大学の倫理審査委員会（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。

マウス PMCs は、6 週齢、メスの C57BL/6N マウス（CLEA Japan）より大網を採取し、ヒト PMCs と同様に TrypLE Express を用いたプロトコルで分離・培養した。

2-1-3. miR-29b 搭載 AAV ベクターの作製

pAAV-CMV-MCS (Agilent Technologies) の *Bam*HI および *Xba*I サイトに上述の miR-29 前駆体配列（Biosettica, San Diego, CA, USA）を挿入し miR-29b 前駆体配列組込アデノ随伴ウイルス（AAV）プラスミド（pAAV-CMV-miR-29b）を作製した。プラスミドの作製には QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany)、Quick Ligation Kit (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA)、および QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を添付文書に則って用いた。

この pAAV-CMV-miR-29b と 2 型 AAV プラスミド（pAAV-RC; Agilent Technologies）もしくは DJ 型 AAV プラスミド（pAAV2 Rep/AAV-DJ Cap; Cell

Biolabs, San Diego, CA)、およびアデノウイルスヘルパープラスミド (pHelper; Agilent Technologies) の 3 つのプラスミドベクターを、それぞれ HEK293 細胞へリン酸カルシウム法で遺伝子導入し、72 時間後に細胞を回収、3 回の凍結・融解を繰り返し 2 種類の血清型 (2 型、DJ 型) の miR-29b 搭載 AAV ベクター (AAV2-miR-29b および AAV-DJ-miR-29b) を回収した。回収した AAV ベクター溶液に塩化セシウムを混ぜ、超遠心を行い、密度勾配法により精製した。ベクターの力価は定量的 polymerase chain reaction (PCR) 法により測定した。

緑色蛍光タンパク質 (Green fluorescent protein; GFP) 発現 AAV ベクター (AAV-CMV-hrGFP) の作製も併せて行った。既報の如く、pAAV-hrGFP (Agilent Technologies) のプロモーター領域を変容させることで、GFP 発現 AAV ベクタープラスミド (pAAV-CMV-hrGFP) を作製し、それを用いリン酸カルシウム法で同様に 11 種類の血清型 (1-10 型、DJ 型) のベクターを作製した(29)。

2-1-4. 腹膜中皮細胞における AAV セロタイプテスト

ヒトおよびマウスの腹膜中皮細胞を 24 ウェル I 型コラーゲンコーティングプレートに 1×10^4 個ずつ播種し、37°C、5%二酸化炭素下で培養した。12 時間後に、11 種類の血清型の GFP 発現 AAV ベクターを投与した。多重感染度 (MOI) は 100,000 で統一した。72 時間後に蛍光顕微鏡 (BZ-X710; Keyence, Osaka, Japan)

にて細胞上の GFP 発現を観察し、またフローサイトメトリー（FACSCalibur; Becton Dickinson, San Jose, CA, USA）で GFP 発現を評価した。フローサイトメトリー解析ソフト（CellQuest Pro Software, Becton Dickinson）を用い、GFP の平均蛍光強度（MFI）を算出し、比較検討した。

またマウス胃癌細胞 YTN16P、マウス膵癌細胞 PAN02 における AAV 遺伝子導入効率の評価も同様に行った。

2-1-5. 腹膜中皮細胞の中皮間葉転換の誘導

腹膜中皮細胞を播種し 12 時間後に、トランスフォーミング増殖因子 β 1（TGF- β 1; R&D systems, USA）を添加（終濃度：10ng/ml）、48 時間以上培養を追加し、中皮間葉転換（MMT）を誘導した。miR-29b 搭載 AAV ベクター（AAV-miR-29b）の投与は、MMT の誘導と同時に行い、各実験に使用した。

2-1-6. AAV ベクターによる細胞へのマイクロ RNA 導入

細胞を各至適培地に懸濁して 6 ウェルプレートに播種し、37°Cで培養した。約 12 時間後に、AAV-miR-29b または AAV-negative controls (NC)を投与し（MOI=100,000）、72 時間培養を追加し miRNA を導入した。

2-1-7. 細胞からの RNA 抽出とデジタル PCR 法

細胞からの miRNA の抽出は miRNeasy kit (Qiagen)を用いて、添付文書に則って行った。miRNA を含むトータル RNA 濃度の測定には微量分光光度計 (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific) を用いた。cDNA への変換は、トータル RNA 30ng より TaqMan miRNA Reverse Transcription Kit (Applied BioSystems, USA)を用いて逆転写 (16°C 30 分、42°C 30 分、85°C 5 分、4°C ∞) をすることで行った。miR-29b 発現は QuantStudio 3D Digital PCR System platform (Thermo Fisher Scientific) を用いて比較した。cDNA (2ng/μl) 0.5μl、2X QuantStudio 3D Digital PCR Master Mix 7.5μl、20X TaqMan microRNA Assays 0.75μl、nuclease-free water (Qiagen) 1.75μl 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 をサーマルサイクラー (ProFlex PCR System; Applied BioSystems) へ装填し、PCR (96°C 10 分、[60°C 2 分, 98°C 30 秒] ×39 回、60°C 2 分、10°C ∞) を行い、QuantStudio 3D Digital PCR System (Applied BioSystems, USA) で測定した。その後、Thermo Fisher Scientific 社が提供するクラウドサービスである Thermo Fisher Connect Platform の AnalysisSuite アプリで解析した。

2-1-8. 腹膜中皮細胞のマイクロアレイ解析

マウス腹膜中皮細胞を 6 ウェル I 型コラーゲンコーティングプレートに 1×10^5 個ずつ播種した。12 時間後に TGF- β 1 を添加し（終濃度：10ng/ml）、同時に AAV-DJ-miR-29b または AAV-DJ-negative controls (NC) を投与し (MOI= 100,000)、37°C で 72 時間培養した。細胞より RNA を抽出し、微量分光光度計（NanoDrop, Thermo Fisher Scientific）にて濃度、精製度を測定した。マイクロアレイ解析は Macrogen Japan 社に委託し、Clariom S Array （Thermo Fisher Scientific）にて行った。結果データを Thermo Fisher Scientific 社が提供するソフトウェアである Transcriptome Analysis Console へインポートし、解析した。

発現変動遺伝子（Differentially Expressed Genes; DEG）を用いた遺伝子オントロジー（Gene Ontology; GO）エンリッチメント解析は Gene Ontology (<http://geneontology.org>) と KEGG (<http://kegg.jp>) の 2 つのデータベースを用いた。

2-1-9. 細胞免疫染色による腹膜中皮細胞の中皮間葉転換関連マーカーの評価

ヒト腹膜中皮細胞を 24 ウェル I 型コラーゲンコーティングプレートに 1×10^4 個ずつ播種した。12 時間後に TGF- β 1 を添加し（終濃度：10ng/ml）、同時に AAV2-miR-29b または AAV2-negative controls (NC) を投与し (MOI= 100,000)、37°C で

60 時間培養した。培養上清を除去し PBS で洗浄、4%パラホルムアルデヒドで細胞を固定した（室温、15 分）。4%パラホルムアルデヒドを除去し PBS で洗浄、0.5% Triton X-100（Thermo Fisher Scientific）で透過処理を行った（室温、15 分）。再度 PBS で洗浄し、3%ウシ血清アルブミン（Bovine serum albumin; BSA）溶液で抗体の非特異結合に対するブロッキングを行い（室温、1 時間）、1 次抗体として E-cadherin（1:200; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA）、Calretinin（1:500; Abcam, Cambridge, MA, USA）、Vimentin（1:1000; Invitrogen, Santa Clara, CA, USA）、Fibronectin（FN）（1:150; Invitrogen）を 1% BSA 溶液に希釈して、室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄し、二次抗体の Anti-rabbit IgG(H+L) AlexaFluor 594(1:2000; Invitrogen)を室温で 30 分間反応させた後に DAPI(Thermo Fisher Scientific)で核染色を行い、蛍光顕微鏡（BZ-X710, Keyence）で、細胞形態と蛍光発現を観察した。

2-1-10. 腹膜中皮細胞の増殖能・遊走能・接着能の評価

ヒト腹膜中皮細胞に TGF- β 1（10ng/ml）刺激を加え、同時に AAV2-miR-29b または AAV2-negative controls (NC)を投与し（MOI= 100,000）、72 時間後に細胞を回収し、96 ウェル I 型コラーゲンコーティングプレートに 1×10^3 個ずつ播種した。72 時間後に各ウェルに MTS 溶液（Dojindo, Kumamoto, Japan）を添加し 37°C

で3時間、追加培養した。増殖能はマイクロプレートリーダー(Spectra Rainbow; Tecan, Mannedorf, Switzerland)で、吸光度を測定することで評価した。またマウス胃癌細胞 YTN16P とマウス膀胱癌細胞 PAN02 の増殖能も同様に評価した。

ヒト腹膜中皮細胞の遊走能はトランスウェルマイグレーションアッセイで評価した。ヒト腹膜中皮細胞に TGF- β 1 と AAV ベクターを作用させ、FBS フリーの DMEM 培地に懸濁し、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, NY, USA) 上に 3×10^4 個ずつ播種した。プレートウェル内には走化性因子として 20%FBS を添加した DMEM 500 μ l を入れ、37°C で 48 時間、培養した。インサート膜上面の非遊走細胞を綿棒でぬぐい、下面を PBS で洗浄後に Dif-Quick (Sysmex, Kobe, Japan) で染色し、顕微鏡下で付着した遊走細胞数をカウントした。

腹膜中皮細胞の癌細胞との接着能は以下のように評価した。まず腹膜中皮細胞を 96 ウェル I 型コラーゲンコーティングプレートに 5×10^4 個ずつ播種し、TGF- β 1 を添加(終濃度: 10ng/ml)、同時に AAV-miR-29b または AAV-negative controls (NC) を投与し (MOI= 100,000)、37°C で 72 時間程度培養、単層化させた。ヒト胃癌細胞 NUGC-4、MKN45、マウス胃癌細胞 YTN16P、マウス膀胱癌細胞 PAN02 を PKH26 (Sigma) で蛍光染色し、 5×10^4 個ずつ単層化した腹膜中皮細胞上に播種させ、37°C で 15 分間培養した。37°C に加温した DMEM 培地で 3 回ウ

エルを洗浄し、残存する癌細胞を蛍光顕微鏡で同定し、カウントした。

2-1-11. フローサイトメトリーによる腹膜中皮細胞の免疫チェックポイント分子発現の評価

ヒト腹膜中皮細胞に TGF- β 1 (10ng/ml) と AAV ベクター (MOI= 100,000) を作用させ、72 時間培養した。1 \times 10⁶ 個/100 μ l (PBS) の細胞懸濁液を準備し、5 μ l の FcR blocking reagent (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を添加し、4°C で 10 分間インキュベートすることで Fc 受容体のブロッキングを行った。その後、APC-conjugated anti-human B7-H3 抗体 (BioLegend, San Diego, CA, USA)、または APC-conjugated anti-human PD-L1 抗体 (BioLegend) を加え、4°C、30 分間インキュベートし抗体標識した。PBS で洗浄後に、7-AAD による死細胞染色を行い、フローサイトメトリー (FACSCalibur) で測定し、解析ソフト (CellQuest Pro Software) で解析した。

2-2. マウス腹膜播種モデルにおける miR-29b 搭載アデノ随伴ウイルスベクター (AAV-miR-29b) 腹腔内投与による播種抑制効果の検討

2-2-1. マウス生体内での腹膜および腹膜中皮細胞への遺伝子導入の確認

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の承認 (承

認番号：20045-01、23007-01）を得て、施行した。

8 週齢、メスの C57BL/6N マウス（CLEA Japan）を Specific pathogen-free 条件下で飼育した。AAV-DJ-GFP（ 5×10^{10} ベクターゲノム（vg））を PBS で 1ml に希釈し、腹腔内へ単回投与した。4 週間後にイソフルラン（Fujifilm Wako Chemical, Osaka, Japan）による深麻酔にて安楽死させ、壁側腹膜組織を採取した。組織片を包埋材（O.C.T. Compound; Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan）にて包埋し、ドライアイスおよびアセトン（Fujifilm Wako Chemical）を用い急速冷却し、凍結ブロックを作製、クリオスタット（Microm HM 525 Cryostat; GMI, Ramsey, MN, USA）で $10\mu\text{M}$ 厚の凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡（BZ-X710, Keyence）にて GFP 発現を観察した。

また AAV-DJ-miR-29b（ $5 \times 10^{10}\text{vg}$ ）を腹腔内へ単回投与し、2 週間後に安楽死させ、大網より腹膜中皮細胞を分離培養した。その腹膜中皮細胞より RNA を抽出し、デジタル PCR 法で miR-29b 発現を評価した。

2-2-2. マウス腹膜播種モデル（胃癌・膵癌）における AAV-miR-29b による播種抑制実験

マウス胃癌腹膜播種モデルの作成には、当科にて以前に作成したマウス胃癌細胞、腹膜播種高転移株である YTN16P を用いた(30)。この YTN16P を 1×10^5 個、

PBS 500 μ l に希釈して、8 週齢、メスの C57BL/6N マウス（CLEA Japan）に腹腔内投与することで、21 日目には腸間膜および大網に多数の播種結節が形成されるモデルを作成した。AAV ベクターは 5×10^{10} vg（PBS1ml に希釈）の単回投与とし、投与タイミングを①癌細胞と同時投与、②癌細胞投与後 3 日目投与、③癌細胞投与後 7 日目投与と変え、それぞれ癌細胞投与後 21 日目に安楽死させ、腸間膜に形成された播種結節数を比較した。生存期間の評価は YTN16P (1×10^5 個) と AAV ベクター (5×10^{10} vg) を同時に投与し、毎日、体重減少や病的な外観・行動がないか観察を行い、事前に設定した基準に沿って安楽死させ評価した。

マウス膵癌腹膜播種モデルは、マウス膵癌細胞 PAN02 を 5×10^5 個、PBS 500 μ l に希釈して 8 週齢、メスの C57BL/6N マウス（CLEA Japan）に腹腔内投与することで作成した。AAV ベクターは 5×10^{10} vg（PBS1mL に希釈）を癌細胞と同時に単回投与し、癌細胞投与後 14 日目に安楽死させ、腸間膜に形成された播種結節数を比較した。

2-2-3. マウス胃癌腹膜播種モデルにおける AAV-miR-29b とパクリタキセルの併用腹腔内投与による播種抑制効果の検討

パクリタキセル（Fujifilm Wako Chemical）はクレモフォール・エタノール溶液（Cremophor EL; Sigma, St Louis, MO, USA）（体積比 1:1）で 5mg/mL に溶解し、

さらにマウスへの投与直前に PBS 1mL に希釈し投与した。

マウス胃癌細胞 YTN16P を 3×10^5 個、PBS 500 μ l に希釈して 8 週齢、メスの C57BL/6N マウス (CLEA Japan) に腹腔内投与し、①治療介入なし群、②パクリタキセル (200 μ g) 投与群、③パクリタキセル (200 μ g) と AAV-DJ-miR-29b (5×10^{10} vg) の併用投与群、④パクリタキセル (200 μ g) と AAV-DJ-negative controls (5×10^{10} vg) の併用投与群、⑤モック群 (クレモフォール・エタノール溶液投与群) の 5 群へ分けた。癌細胞投与後 7 日目と 14 日目にパクリタキセル、もしくはクレモフォール・エタノール溶液を腹腔内投与し、AAV ベクターは癌細胞投与後 7 日目のみに単回投与した。癌細胞投与後 21 日目に安楽死させ、腸間膜上の播種結節数をカウントし群間比較した。

2-2-4. マウス腹膜組織の線維化の評価

癌細胞と AAV ベクターを同時投与したマウス腹膜播種抑制実験時に、壁側腹膜を採取し、それらをマッソン・トリクローム染色にて膠原繊維を染色することで、線維化の評価を行った。壁側腹膜組織は採取後速やかに、伸展した状態で 4%ホルマリンにて固定し、パラフィンにて包埋した。4 μ m 厚の組織切片を作成し、以下の通りマッソン・トリクローム染色を行った。まずキシレンにて脱パラフィン化を行い (7 分間 \times 4 回)、100%エタノールにて再水和後 (5 分間 \times 2 回、3 分

間×4回)、流水で10分間洗浄した。つぎに10%重クロム酸カリウムと10%トリクロム酢酸の混合液(体積比1:1)に浸け20分間反応させ、流水で5分間洗浄し、ワイトゲルトの鉄ヘマトキシレン液にて10分間反応させ、再度流水で5分間洗浄した。つづいて2.5%リントングステン酸、0.75%オレンジG液をそれぞれ1分間反応させ2相に分けて1%酢酸で洗浄。ポンソー・キシリジン・酸フクシン・アゾフロキシ混合液で30分間反応させ、2相に分けて1%酢酸で洗浄した後に、2.5%リントングステン酸を用いて10分間反応させ、2相に分けて1%酢酸で洗浄した。最後にアニリン青液を用いて5分間反応させ、2相にわけ1%酢酸で洗浄し、100%エタノール(3分間×1回、5分間×2回)とキシレン(5分間×4回)にて脱水・透徹しマリノールで封入した。

腹膜厚の評価は、400倍の顕微鏡下で観察しランダムに選択した5視野にて、その視野中の最も厚い部位の腹膜厚を画像解析ソフト(ImageJ Fiji Version 2.9.0, NIH, Bethesda, MD, USA)にて計測し、5視野の平均値を算出・比較することで行った。

2-2-5. マウス血液の生化学的検査

胃癌細胞 YTN16P と AAV ベクターを同時投与したマウス腹膜播種抑制実験時に、イソフルランによる安楽死後、速やかに下大静脈より血液を採取した。その

血液を室温、5000rpm で 10 分間遠心し、血清を分離し-20℃にて凍結保存した。

生化学的検査には FUJIDRYCHEM 3500V (Fujifilm, Tokyo, Japan) を用い、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、総ビリルビン (T-Bil) を測定した。

2-3. データの統計処理

データは Prism8 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA)を用いて解析し、値は平均値±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。生存期間はカプラン・マイヤー曲線を使用して評価し、各群間の比較はログランク検定を用いた。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. アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた miR-29b 導入が腹膜中皮細胞に与える影響の検討

3-1-1. 腹膜中皮細胞における AAV セロタイプテスト

ヒトおよびマウスの腹膜中皮細胞 (PMCs) における AAV セロタイプテストを、11 種類の血清型 (1-10 型、DJ 型) の GFP 発現 AAV ベクターを用いて行った。MOI は 100,000 とし、72 時間後に蛍光顕微鏡で細胞の GFP 発現を評価した。ヒト PMCs においては AAV2 型、AAV5 型、AAV-DJ 型のベクターを投与したウェルで (図 1)、マウス PMCs においては AAV1 型、AAV2 型、AAV4 型、AAV-DJ 型のベクターを投与したウェルで GFP 発現細胞が多く観察された (図 2)。

ヒトPMCs

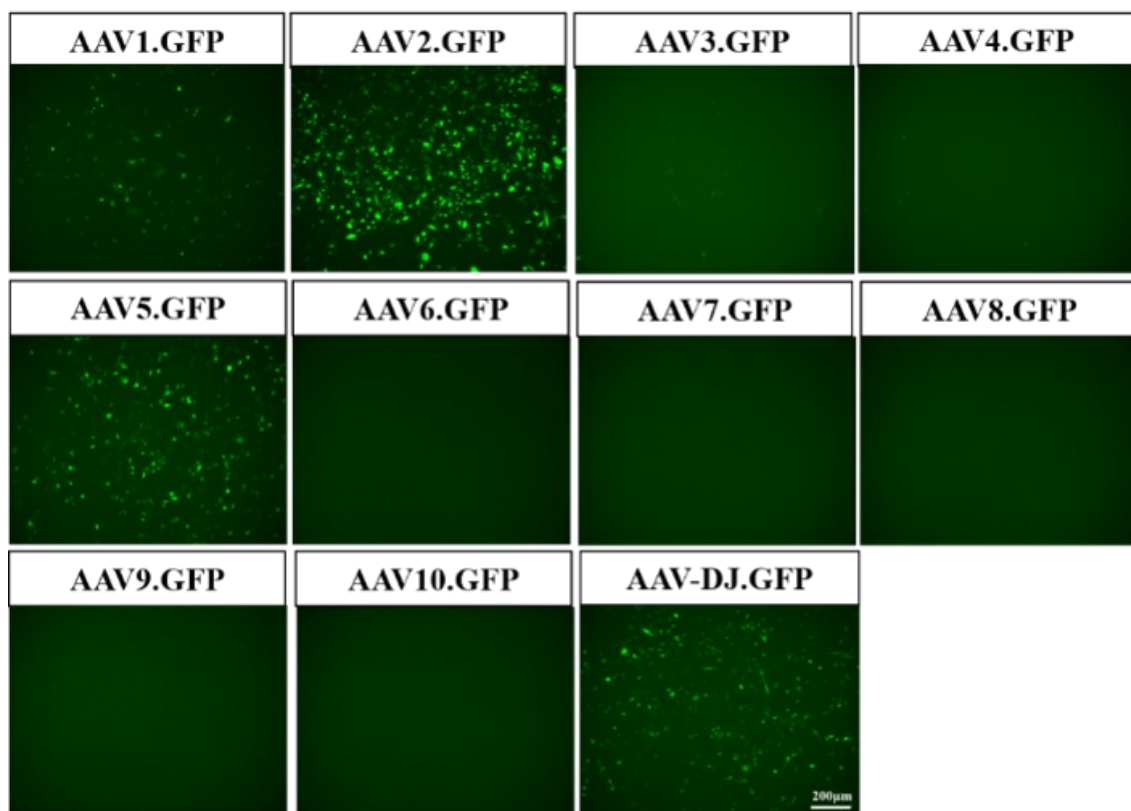


図1 ヒトPMCsの蛍光顕微鏡観察下GFP発現

マウスPMCs

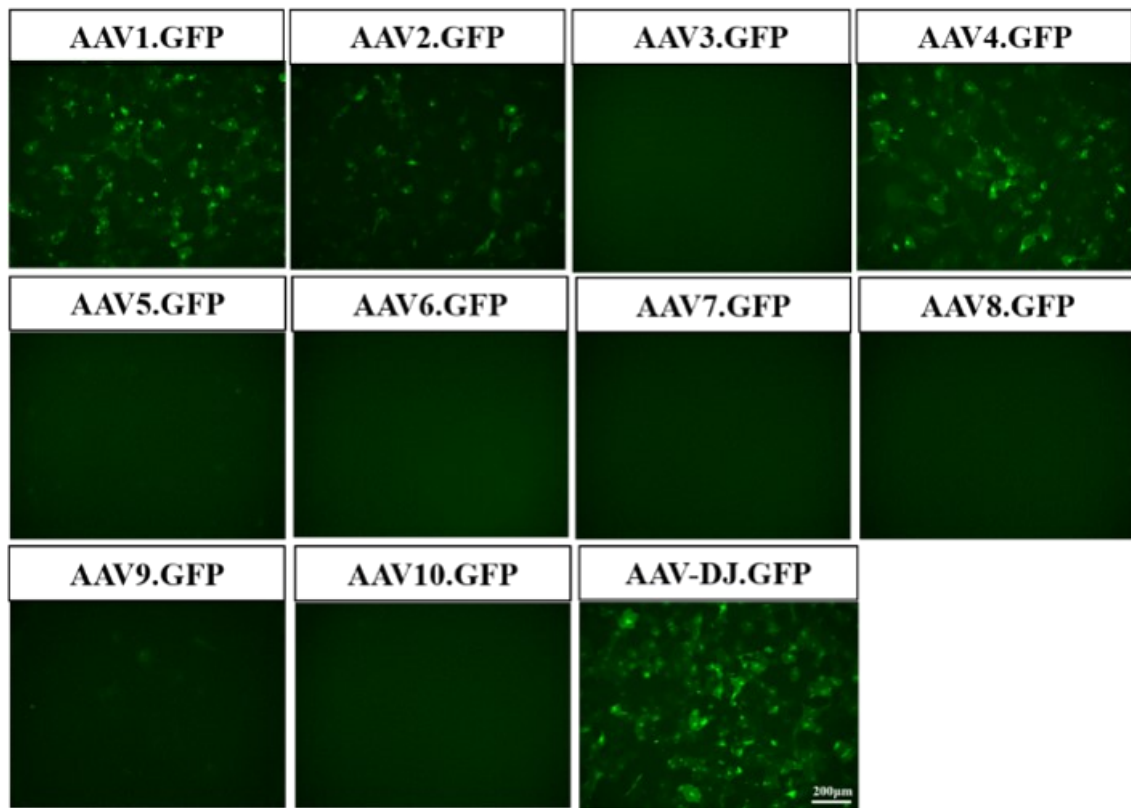


図2 マウスPMCsの蛍光顕微鏡観察下GFP発現

これらの細胞を回収し、フローサイトメトリーで GFP 発現を評価したところ、ヒト PMCs では AAV2 型を、マウス PMCs では AAV-DJ 型を作用させた群で最も高い GFP 発現を示した（図 3）。

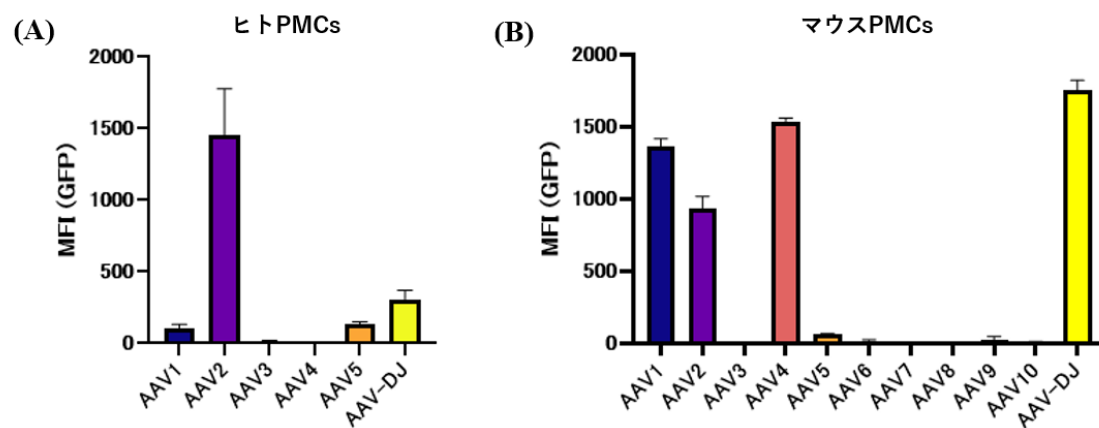


図3 PMCs のフローサイトメトリーを用いた GFP 平均蛍光強度 (MFI)

A) ヒト PMCs、B) マウス PMCs

3-1-2. 腹膜中皮細胞の AAV ベクターによる遺伝子導入効率

セロタイプテストで選出した AAV2 型、AAV-DJ 型ベクターを用い、ヒトおよびマウス PMCs への遺伝子導入効率をフローサイトメトリーで評価した。AAV ベクター非投与群をコントロールとして GFP 発現陽性細胞の割合を算出したところ、ヒト PMCs では AAV2 型ベクターを用いることで 98.7% (図 4A)、マウス PMCs では AAV-DJ 型ベクターを用いることで 98.6% (図 4B) とほぼ全ての細胞に遺伝子導入されていた。

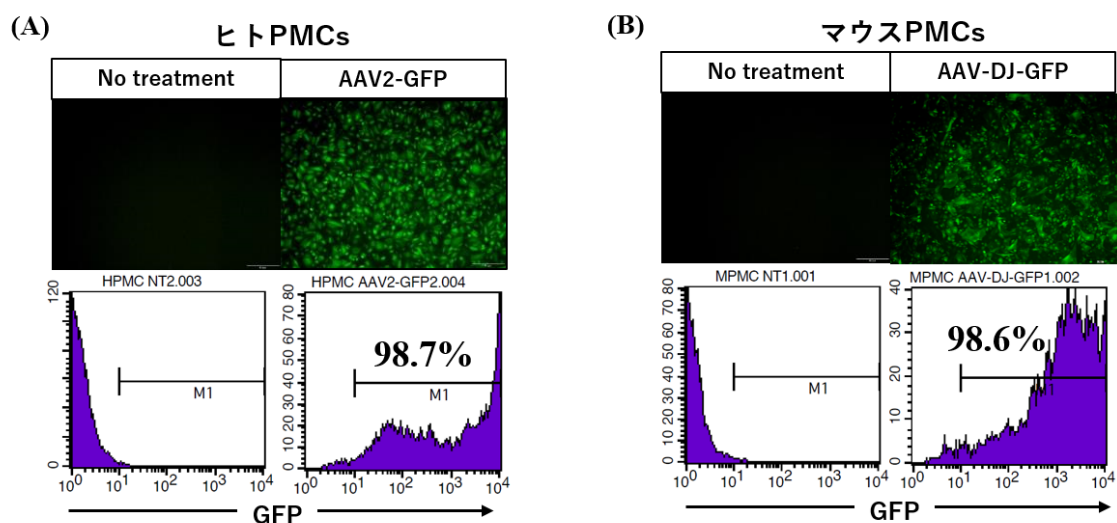


図4 PMCs への GFP 導入効率 A) ヒト PMCs、B) マウス PMCs

3-1-3. マウス癌細胞株の AAV ベクターによる遺伝子導入効率

マウス胃癌細胞 YTN16P、マウス膵癌細胞 PAN02 における AAV-DJ 型ベクターを用いた遺伝子導入効率を、腹膜中皮細胞での検討と同様に評価した。

YTN16P では 9.21% (図 5A) , PAN02 では 14.4% (図 5B) と導入効率は低かった。

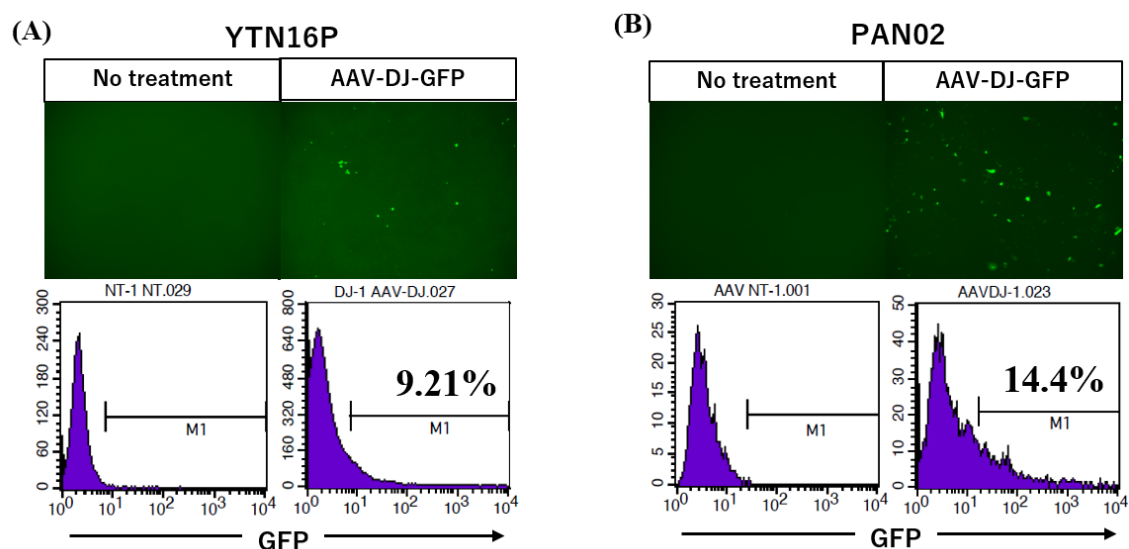


図5 マウス癌細胞株への GFP 導入効率 A) YTN16P、B) PAN02

3-1-4. 腹膜中皮細胞の AAV ベクターによる miR-29b 導入

リン酸カルシウム法で2種類の血清型（2型、DJ型）の miR-29b 搭載 AAV ベクター（AAV2-miR-29b および AAV-DJ-miR-29b）を作製した。ヒト PMCs に AAV2-miR-29b を作用させ（MOI：100,000）、72 時間後にデジタル PCR で miR-29b 発現レベルを評価したところ、有意に発現が増強した（図 6A）。また、マウス PMCs では TGF- β 1 (10ng/ml)を添加し、同時に AAV-DJ-miR-29b を作用させ 72 時間培養した。miR-29b の発現は TGF- β 1 投与により減少したが、AAV-DJ-miR-29b を併用することで著明に増加した（図 6B）。

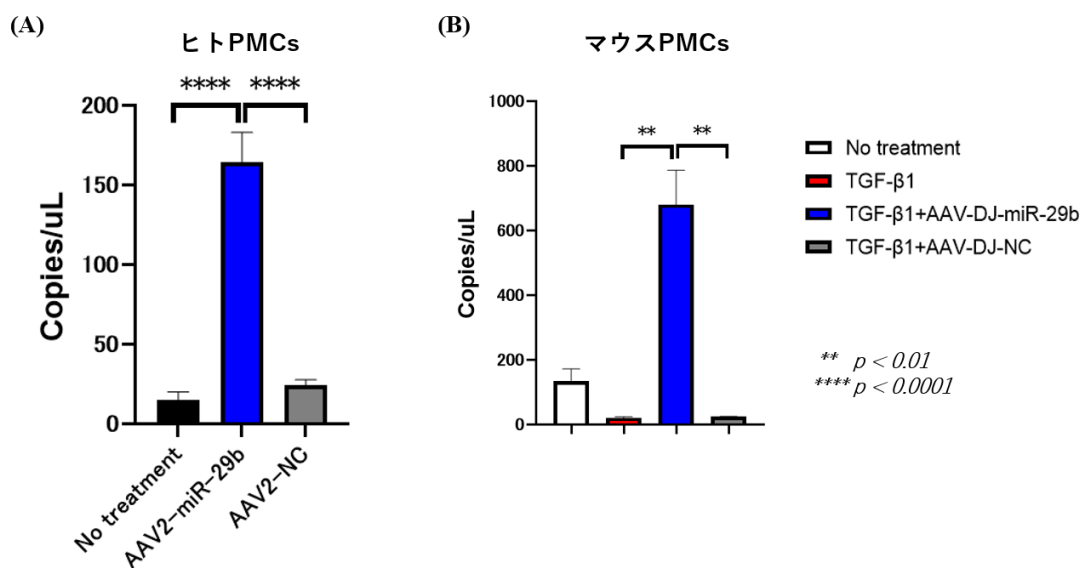


図6 PMCs における miR-29b 発現の変化 A) ヒト PMCs、B) マウス PMCs

3-1-5. マウス癌細胞株の AAV ベクターによる miR-29b 導入

マウス胃癌細胞 YTN16P、マウス膵癌細胞 PAN02 においても、AAV-DJ-miR-29b を作用させ (MOI : 100,000)、72 時間後にデジタル PCR で miR-29b 発現レベルを評価したところ、有意に増強した (図 7)。

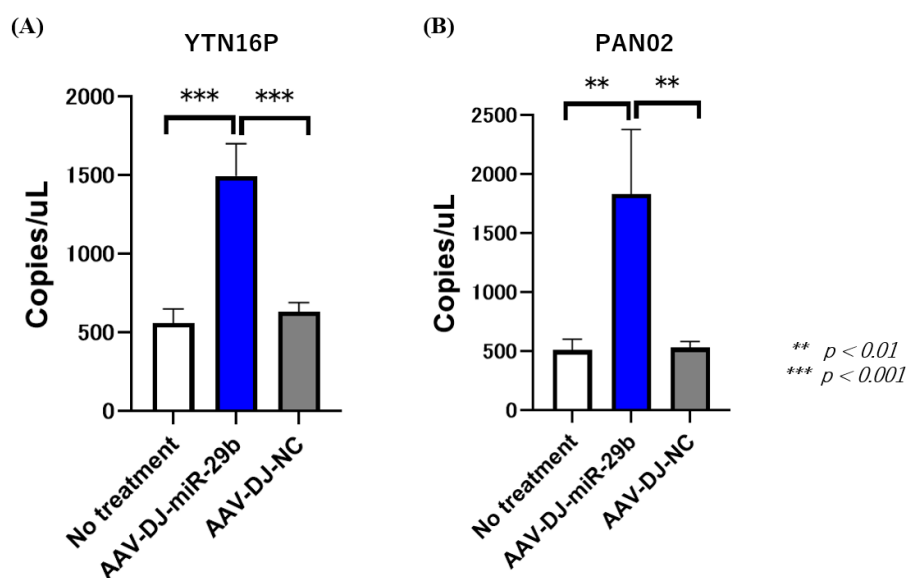


図7 マウス癌細胞における miR-29b 発現の変化 A) YTN16P、B) PAN02

3-1-6. ヒト腹膜中皮細胞の TGF- β 1 刺激による形態および形質的变化と AAV2-miR-29b の作用

既報でリポフェクション法により miR-29b をヒト PMCs へ導入することで、TGF- β 1 刺激による形態および形質的变化を打ち消すことが報告されている (25)。AAV2-miR-29b による導入でも同様な現象が起こるかを検討した。既報の如く、ヒト PMCs は TGF- β 1 (10ng/ml) を作用させることで、丸型から紡錘形への形態変化を示し、細胞免疫染色による中皮間葉転換 (MMT) 関連マーカーの評価では上皮系マーカーの E-cadherin、中皮系マーカーの Calretinin の発現が著明に減少する一方で、間葉系マーカーの Vimentin の発現が著明に亢進し、また癌細胞との接着に重要とされる Fibronectin 発現も亢進した。しかし、AAV2-miR-29b の併用により、これらの変化は打ち消された (図 8, 9)。

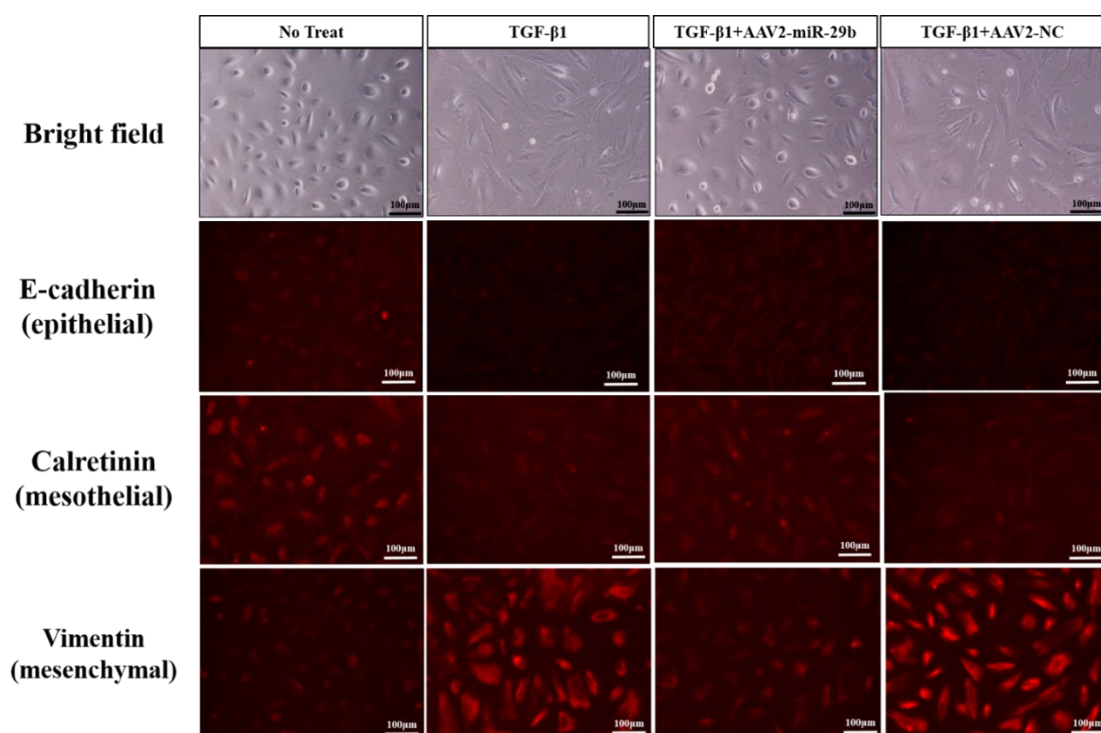


図8 AAV2-miR-29b によるヒト PMCs の中皮間葉転換 (MMT) 関連マーカーの変化

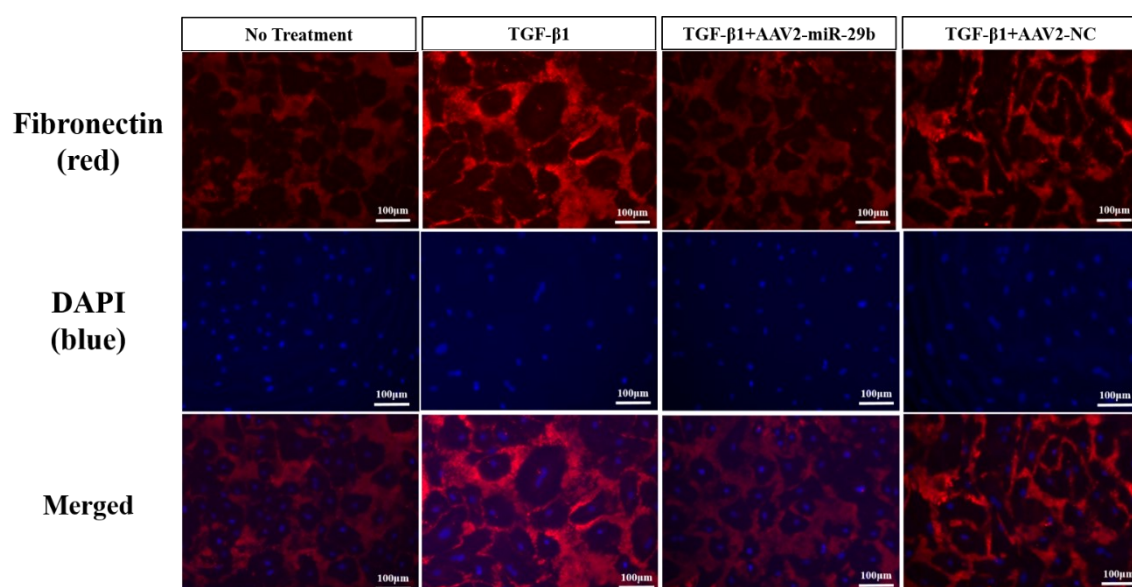


図9 AAV2-miR-29b によるヒト PMCs の Fibronectin 発現の変化

また miR-29b は免疫チェックポイント分子である B7-H3 発現を変化させるという報告があり(31)、ヒト PMCs における B7-H3、また PD-L1 に及ぼす TGF- β 1 刺激、AAV2-miR-29b による miR-29b 導入の影響を検討した。TGF- β 1 (10ng/ml) を作用させることで、B7-H3 発現は有意に増強し、PD-L1 発現は増強する傾向であった。AAV2-miR-29b を作用させることで、B7-H3 発現の増強は完全に抑制されたが、PD-L1 の発現上昇には影響を及ぼさなかった (図 10)。

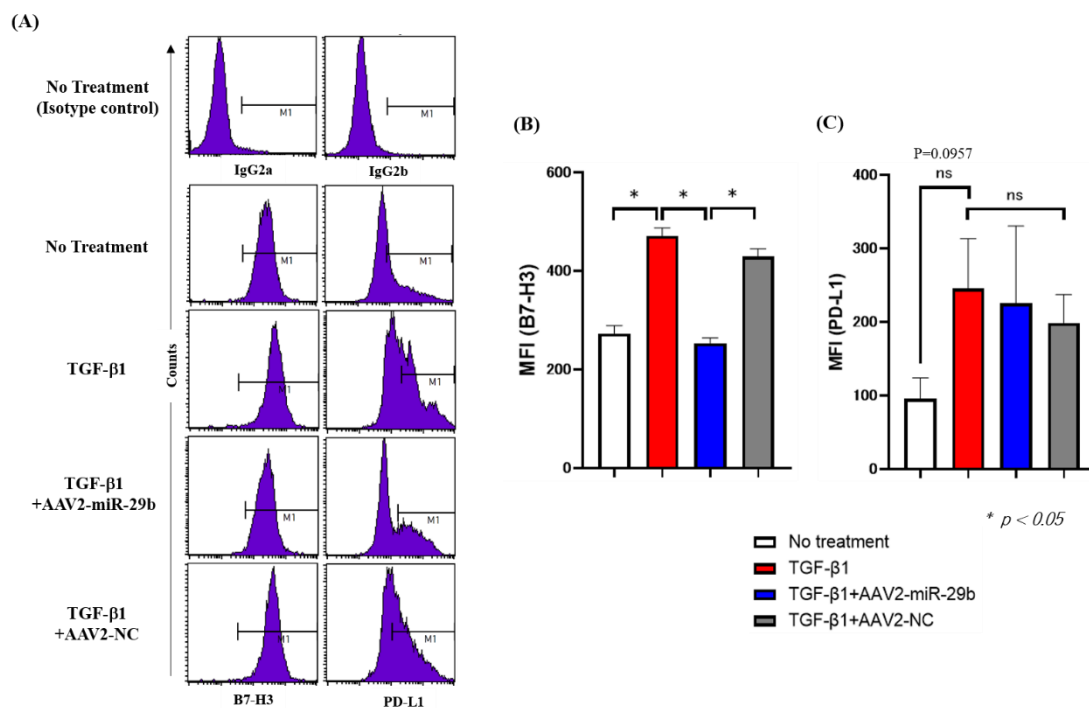


図 10 AAV2-miR-29b によるヒト PMCs の免疫チェックポイント分子発現の変化

A) B7-H3、PD-L1 発現のヒストグラム図、B) B7-H3 発現の比較、

C) PD-L1 発現の比較

3-1-7. 腹膜中皮細胞の TGF- β 1 刺激による増殖能・遊走能・接着能の変化に対

する AAV-miR-29b の抑制作用

ヒト PMCs の増殖能は TGF- β 1 刺激により増強したが ($n=8$, $P<0.001$)、AAV2-miR-29b による miR-29b の導入で有意に低下した ($n=8$, $P<0.0001$)。しかし、AAV2-NC 投与でも同様に増殖能の低下がみられ ($n=8$, $P<0.0001$)、AAV 感染による増殖能の低下を反映した結果であると考えられた (図 11A)。

一方で遊走能は TGF- β 1 刺激により顕著に増強し (3.6 ± 1.0 vs. 57.2 ± 13.8 counts/HPF, $n=3$, $P<0.001$)、AAV2-miR-29b の作用により、対照群に比較し顕著に低下した (3.1 ± 0.6 vs. 34.8 ± 7.5 counts/HPF, $n=3$, $P<0.01$) (図 11B, C)。

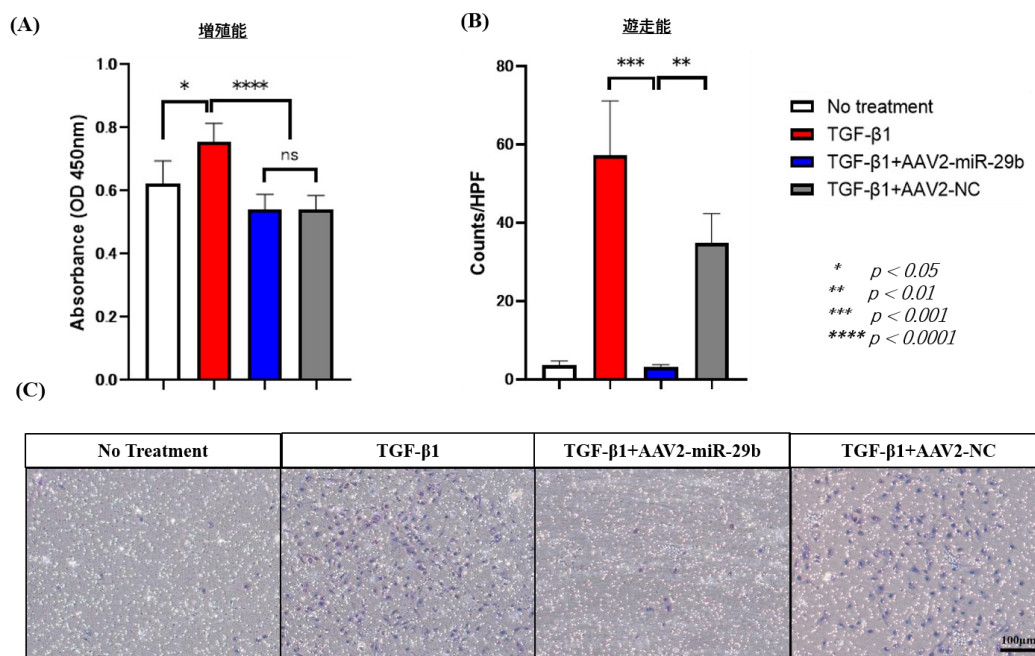


図 11 AAV2-miR-29b によるヒト PMCs の増殖能と遊走能の変化

A) 増殖能、B) 遊走能、C) 遊走能評価時の顕微鏡観察像

ヒト PMCs の接着能の評価を、ヒト胃癌細胞株 (NUGC-4、MKN45) を用い
行った。非刺激状態のヒト PMCs には胃癌細胞は接着しないが、TGF- β 1 で刺
激すると多数の癌細胞が接着した (NUGC-4: 8.5 ± 2.6 vs. 65.1 ± 15.3 counts/HPF,
 $n=7$, $P < 0.0001$, MKN45: 3.6 ± 1.5 vs. 46.6 ± 9.2 counts/HPF, $n=6$, $P < 0.0001$)。しか
し、TGF- β 1 で刺激をしたヒト PMCs に AAV2-miR-29b を前投与しておくこと
で、対照群と比較し、接着細胞は著明に減少した (NUGC-4: 8.3 ± 1.2 vs. $82.8 \pm$
 26.4 counts/HPF, $n=7$, $P < 0.0001$, MKN45: 5.8 ± 1.4 vs. 31.6 ± 4.6 counts/HPF, $n=6$, P
 < 0.0001) (図 12A, B)。同様に、マウス PMCs とマウス胃癌細胞 YTN16、マウ
ス膵癌細胞 PAN02 の接着について、それぞれ評価した。ヒト細胞での検討結果
と同様に、AAV-DJ-miR-29b をマウス PMCs に作用させておくことで、TGF- β 1
による接着能の増強を打ち消した (YTN16P: 12.0 ± 7.4 vs. 111.3 ± 34.3
counts/HPF, $n=5$, $P < 0.0001$; PAN02: 8.8 ± 2.9 vs. 225.5 ± 37.0 counts/HPF, $n=5$, $P <$
 0.0001) (図 12C, D, E)。

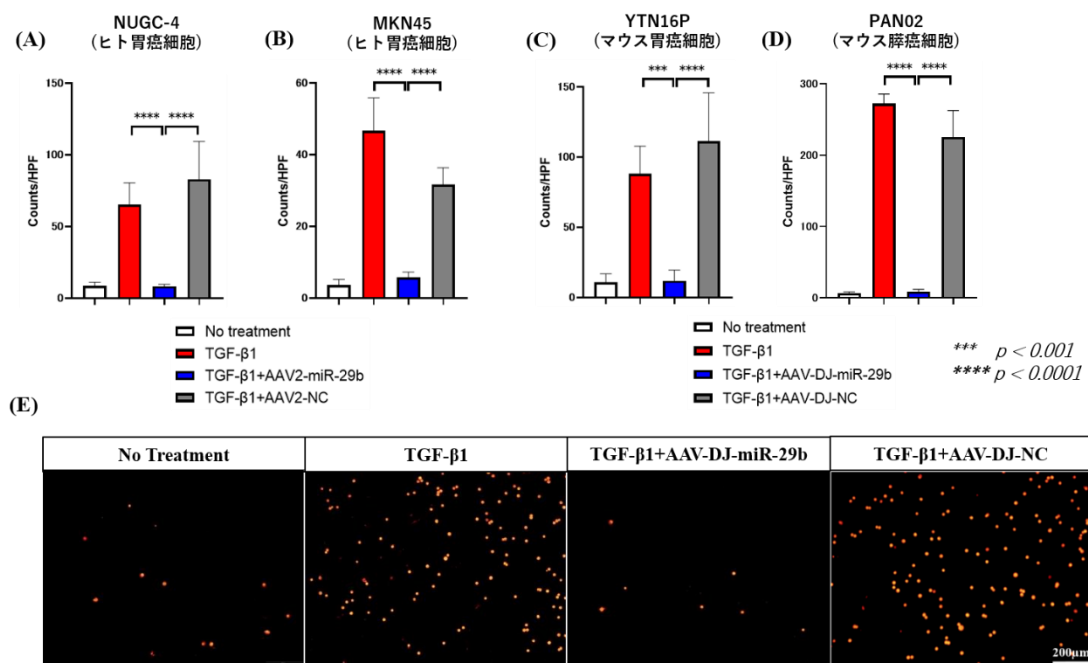


図12 PMCs の癌細胞との接着能の変化

A, B) ヒト胃癌細胞株 NUGC-4、MKN45、C) マウス胃癌細胞 YTN16P、
D) マウス膵癌細胞 PAN02、E) 接着した YTN16P の顕微鏡像

3-1-8. マウス癌細胞株の増殖能に対する AAV-DJ-miR-29b の抑制作用

マウス胃癌細胞 YTN16P、マウス膵癌細胞 PAN02 への AAV-DJ ベクターを用いた遺伝子導入効率は低い、AAV-DJ-miR-29b を作用させることで miR-29b 発現レベルは有意に発現が増強していた（結果 3-1-3, 3-1-5）。このことから、これら癌細胞の増殖能に対する AAV-DJ-miR-29b の作用を検討した。マウス胃癌細胞 YTN16P においては、AAV-DJ-miR-29b により非治療群と比較し、有意に増殖能が抑制されたが（ $n=10$, $P<0.001$ ）、対照群と比較し、その増殖能に有意な抑制は確認されなかった。しかし、マウス膵癌細胞 PAN02 においては、対照群と比較しても、有意に増殖能が抑制された（ $n=10$, $P<0.0001$ ）（図 13）。

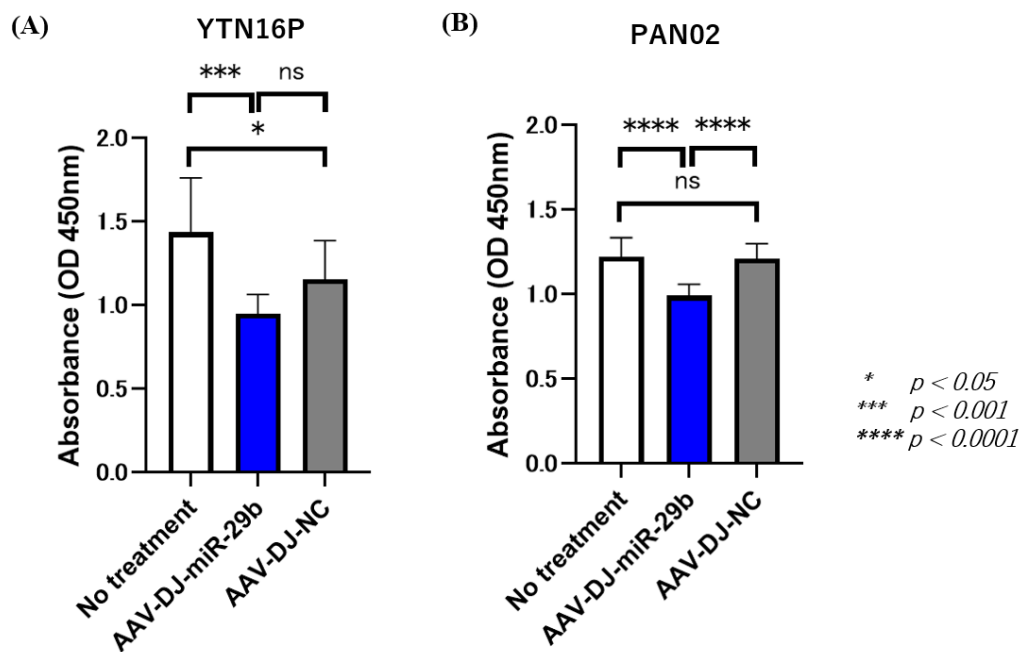


図 13 AAV-DJ-miR-29b によるマウス癌細胞株の増殖能の変化

A) マウス胃癌細胞株 YTN16P、B) マウス膵癌細胞株 PAN02

3-1-9. マウス腹膜中皮細胞に AAV-DJ-miR-29b が及ぼす遺伝子発現の変化

①ナイーブなマウス PMCs、② TGF- β 1 刺激を加えた PMCs、③ TGF- β 1 刺激に加え AAV-DJ-miR-29b を作用させた PMCs、④ TGF- β 1 刺激に加え AAV-DJ-NC を作用させた PMCs の 4 つのサンプルでマイクロアレイ解析を行い、TGF- β 1 刺激による遺伝子変化、および AAV-DJ-miR-29b の作用による遺伝子変化を検討した。まず TGF- β 1 刺激を加えた PMCs のうち、AAV-DJ-miR-29b を作用させた PMCs と対照サンプル間の比較を行い (③ vs. ④)、遺伝子発現差が 10 倍以上であった 36 個の発現変動遺伝子 (DEGs) を同定し、それら DEGs を用い階層クラスタリング解析を 4 サンプル間で行った。その結果、AAV-DJ-miR-29b の併用は、ナイーブな PMCs と同様な遺伝学的性質を与えることが示唆された (図 14A)。次に、TGF- β 1 刺激により、ナイーブ PMCs と比較して 4 倍以上の発現増強を示す 180 個の DEGs を同定し (① vs. ②)、同様に TGF- β 1 刺激を加えた PMCs のうち、AAV-DJ-miR-29b を作用させることで対照サンプルと比較し 4 倍以上の発現低下を示す 123 個の DEGs を同定した (③ vs. ④)。それらで共通する 31 個の遺伝子を、TGF- β 1 刺激により増強されるが、AAV-DJ-miR-29b の併用により発現増強が打ち消される遺伝子として同定した (図 14B)。その 31 遺伝子は Col11a1, Thbs2, Piezo2, Hbegf, Itga5, Ankrd1, Mir147, Itga2, Emp1, Rap1gap2, Itgb3, Sorcs2, F2rl2, Has2, Nuak2, Inhba, Mthfd2, Nrcam, Itga11, Ereg,

Nrp2, Slc7a11, Adamts6, Myc, Bcat1, Tmeff1, Jag1, Stk38l, Cth, Cx3cl1, Crisp1d2 であ
った。

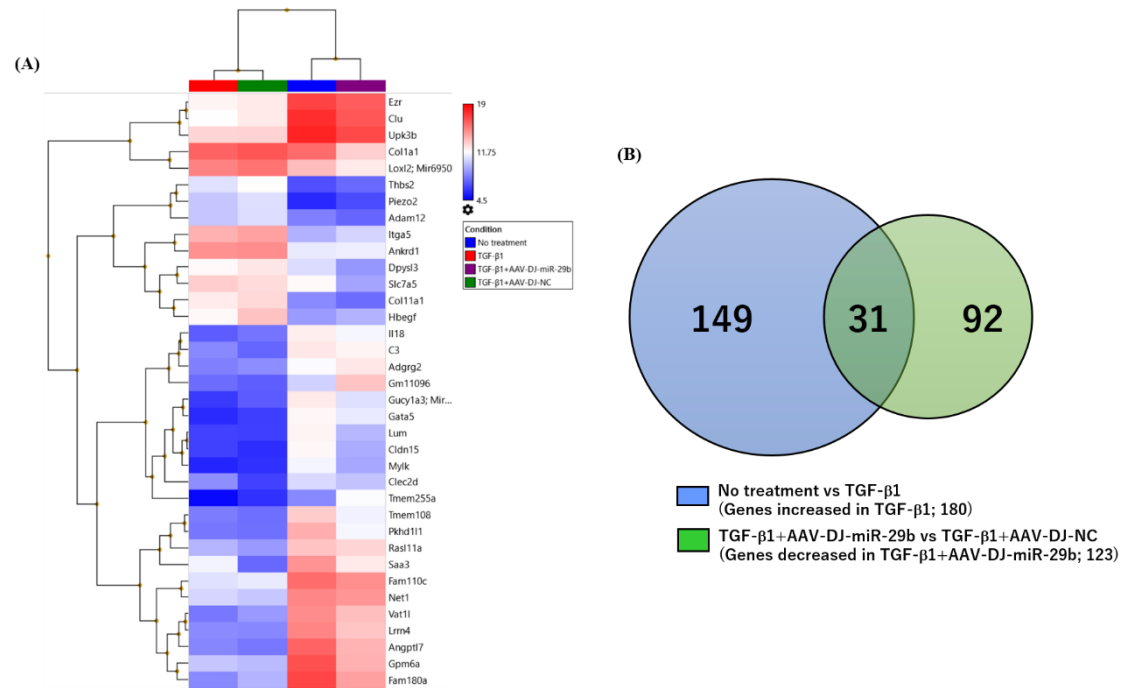


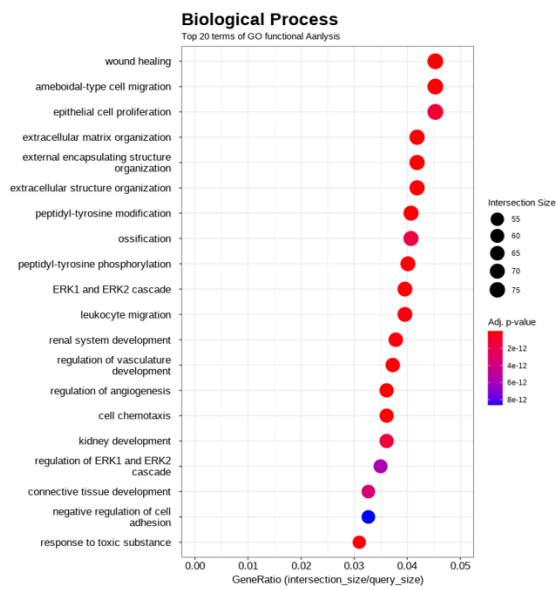
図14 AAV-DJ-miR-29b によるマウス PMCs の遺伝子発現の変化

A) 階層クラスタリング解析によるヒートマップ

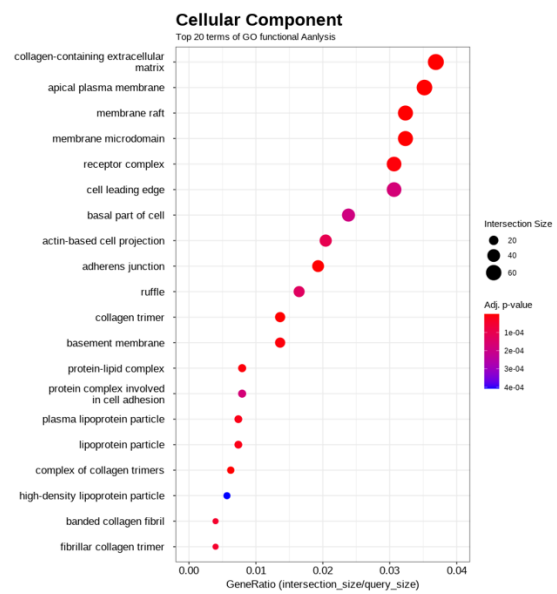
B) サンプル間の DEGs の関係を示すベン図

つづいて、TGF- β 1 刺激を加えた PMCs のうち、AAV-DJ-miR-29b を作用させた PMCs と対照サンプルで比較し、遺伝子発現差が 2 倍以上であった 1,898 個の DEGs を用い、遺伝子オントロジー (GO) エンリッチメント解析を行った。その結果、これらの DEGs は細胞外マトリックス産生、細胞の接着機能、また遊走や走化性に関連していることが示された (図 15)。

(A)



(B)



(C)

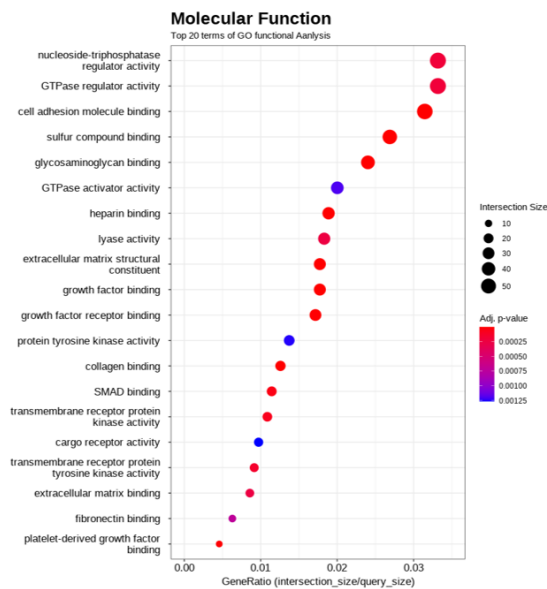


図15 AAV-DJ-miR-29b による発現変化した遺伝子の GO エンリッチメント解析

A) 生物学的プロセス、B) 細胞の構成要素、C) 分子機能

3-2. マウス腹膜播種モデルにおける miR-29b 搭載アデノ随伴ウイルスベクター

(AAV-miR-29b) 腹腔内投与による播種抑制効果の検討

3-2-1. AAV ベクター腹腔内投与によるマウス腹膜・腹膜中皮細胞への遺伝子導入

8 週齢、メスの C57BL/6N マウスに 5×10^{10} vg の AAV-DJ-GFP を PBS で 1ml に希釈し、腹腔内へ単回投与した。4 週間後に壁側腹膜を採取し、凍結切片を作成し蛍光顕微鏡にて観察すると、AAV-DJ-GFP 投与マウスの腹膜表面に一般的な GFP 発現が確認された (図 16A)。また 5×10^{10} vg の AAV-DJ-miR-29b を腹腔内投与し、2 週間後にマウス大網より PMCs を分離した。デジタル PCR 法で PMCs の miR-29b 発現レベルを評価したところ、AAV-DJ-miR-29b 投与群で対照群と比較し、著明な発現増強が確認された (図 16B)。

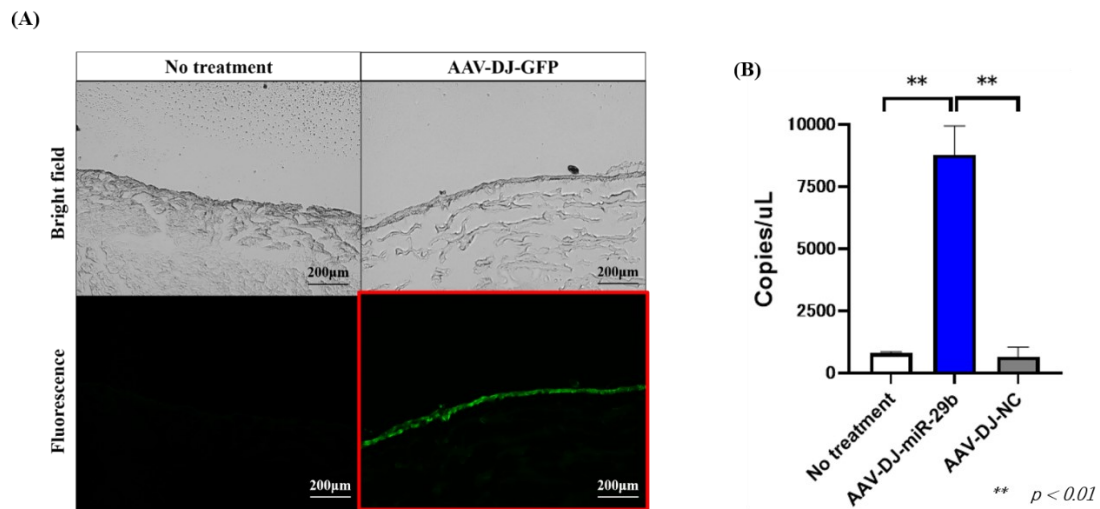


図16 AAV-DJ ベクター投与によるマウス腹膜およびPMCs への遺伝子導入

A) マウス腹膜の GFP 発現、B) マウス PMCs の miR-29b 発現

3-2-2. マウス胃癌腹膜播種に対する AAV-DJ-miR-29b 腹腔内投与の抑制作用

実験 1: 8 週齢、メスの C57BL/6N マウスにマウス胃癌細胞 YTN16P を腹腔内投与し、同時に 5×10^{10} vg の AAV-DJ-miR-29b を PBS で 1ml へ希釈し腹腔内へ単回投与した。癌細胞投与後 21 日目に安楽死させ、腸間膜の播種結節数を比較したところ、AAV-DJ-miR-29b 投与群で対照群に比較し、有意に減少していた (42.6 ± 19.9 vs. 8.0 ± 5.2 , $n=5$, $P < 0.05$) (図 17)。また生存期間も AAV-DJ-miR-29b 投与群で、有意に延長した (図 18)。

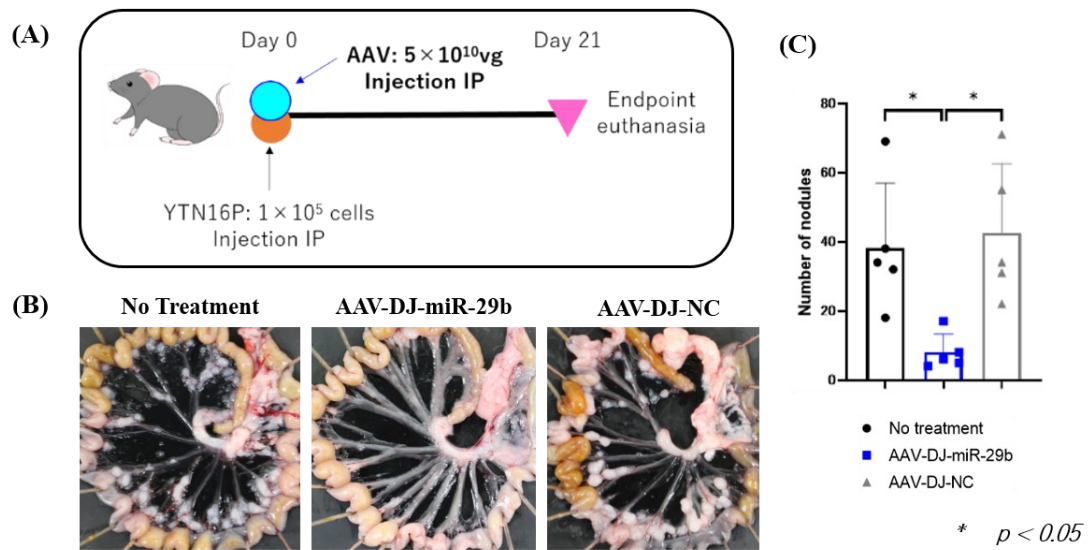


図17 マウス胃癌腹膜播種モデルでの AAV-DJ-miR-29b による抑制実験1

A)実験プロトコルのシェーマ、B)腸間膜播種結節の肉眼像

C)腸間膜播種結節数の比較

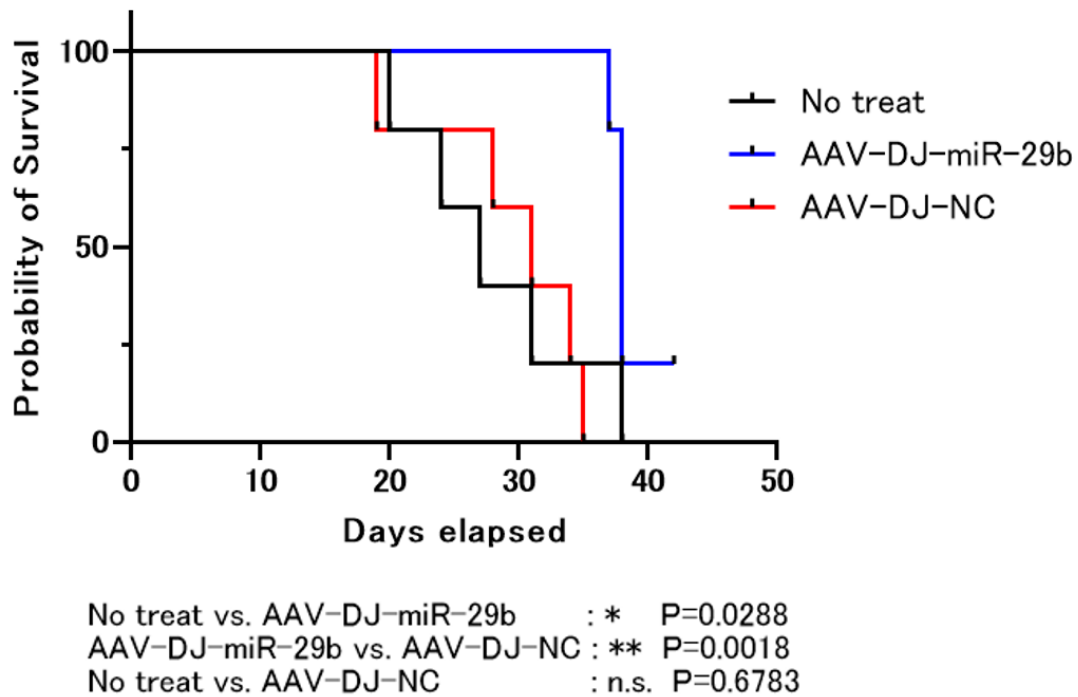


図18 マウス胃癌腹膜播種モデルでの AAV-DJ-miR-29b による生存期間の変化

実験 2：つぎに AAV-DJ-miR-29b の投与タイミングを、癌細胞投与後 3 日目とし同様の検討を行った。同時投与での結果と同様に、AAV-DJ-miR-29b 投与マウスでの腸間膜播種結節数は有意に減少していた (31.2 ± 4.9 vs. 9.8 ± 4.6 , $n=5$, $P < 0.01$) (図 19)。

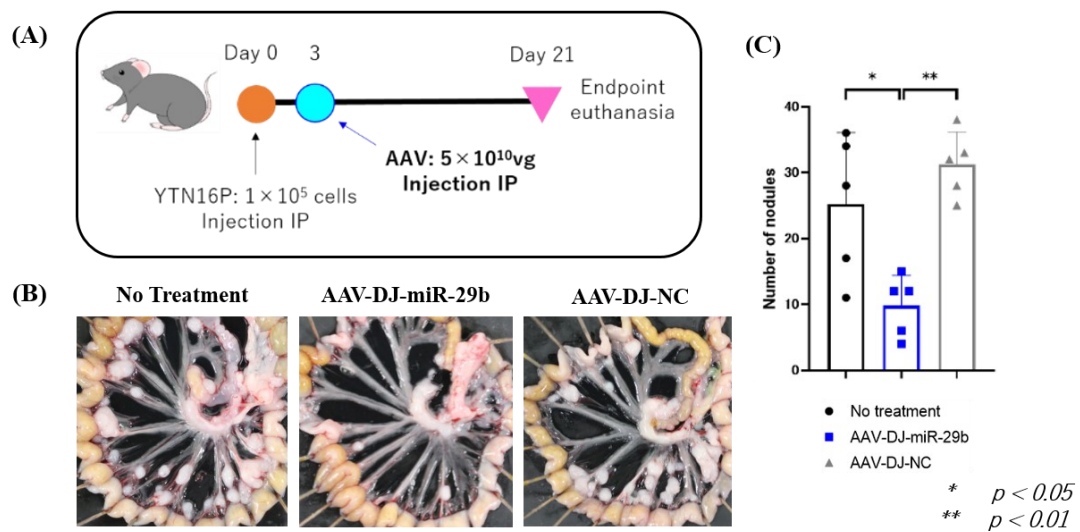


図 19 マウス胃癌腹膜播種モデルでの AAV-DJ-miR-29b による抑制実験 2

A) 実験プロトコールのシェーマ、B) 腸間膜播種結節の肉眼像

C) 腸間膜播種結節数の比較

実験3：さらに、AAV-DJ-miR-29b の投与タイミングを癌細胞投与後7日目として評価したところ、AAV-DJ-miR-29b 投与による播種抑制効果はみられなかった（図20）。

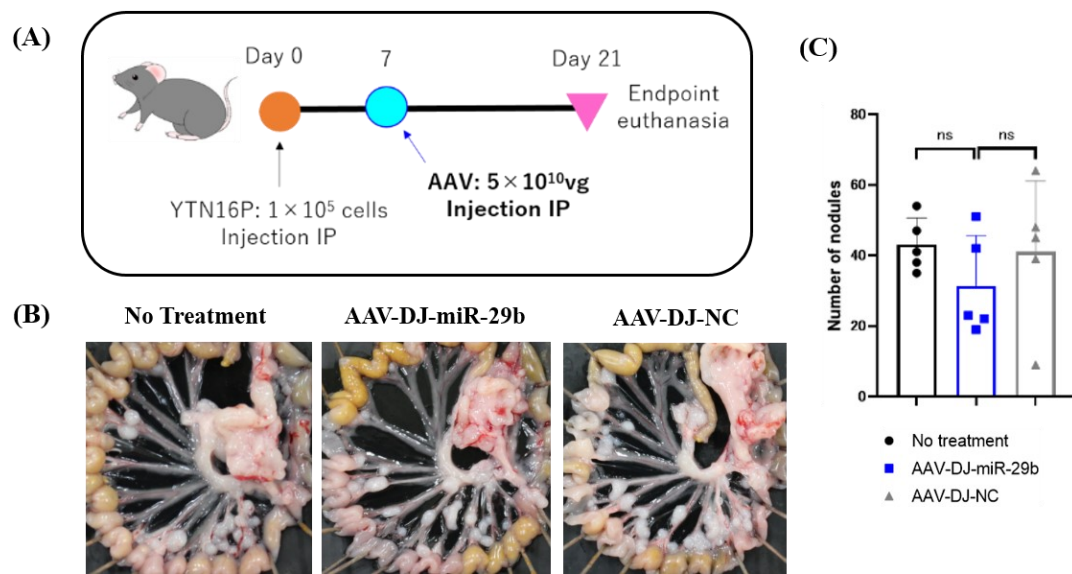


図20 マウス胃癌腹膜播種モデルでの AAV-DJ-miR-29b による抑制実験3

A)実験プロトコールのシェーマ、B)腸間膜播種結節の肉眼像

C)腸間膜播種結節数の比較

3-2-3. マウス胃癌腹膜播種モデルにおける AAV-DJ-miR-29b 腹腔内投与による腹膜線維化抑制作用

先述のマウス胃癌細胞 YTN16P と AAV ベクターを同時投与した腹膜播種抑制実験時に、それぞれのマウスから壁側腹膜を採取し、マッソン・トリクローム染色にて膠原繊維を染色することで線維化の評価を行った。対照群と比較し、AAV-DJ-miR29b 腹腔内投与群の腹膜では膠原繊維が減少しており、また腹膜厚も有意に薄くなっていた（図 21）。

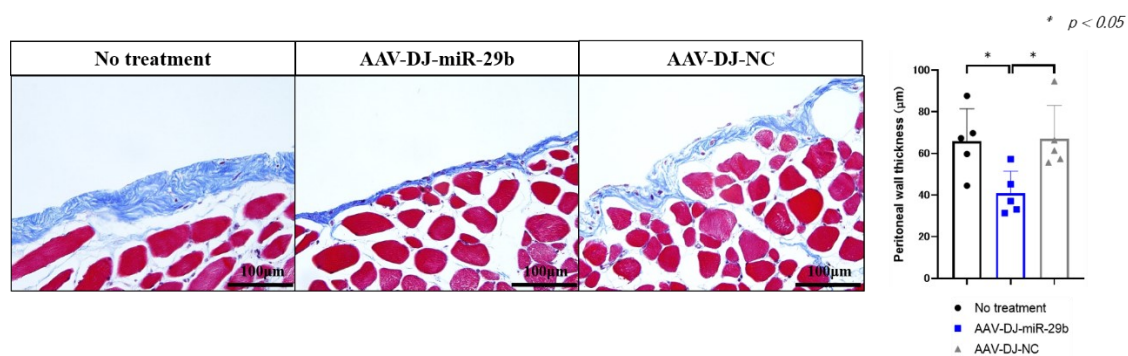


図 21 マウス胃癌腹膜播種モデルでの AAV-DJ-miR-29b による腹膜線維化の変化

3-2-4. マウス胃癌腹膜播種に対する AAV-DJ-miR-29b とパクリタキセルの併用

腹腔内投与による抑制効果

マウス胃癌腹膜播種に対して、癌細胞投与後 7 日目の AAV-DJ-miR-29b 腹腔内投与では播種が抑制されなかった。癌細胞投与後 7 日目にはすでに播種が成立しており、AAV-DJ-miR-29b 投与は一度成立した腹膜播種に対する抑制効果は乏しいと考えられた。そこで、胃癌腹膜播種の治療として臨床的に用いられているパクリタキセル腹腔内投与と併用することで、治療的效果を示すかを検討した。パクリタキセルの用量は 200 μ g として、癌細胞投与後 7 日目と 14 日目に腹腔内投与した。パクリタキセルの単独投与では、非治療群と比較し腸間膜播種結節数は減少しなかったが、AAV-DJ-miR-29b を 7 日目に腹腔内投与することで、非治療群と比較し播種結節数は減少した (35.8 ± 22.2 , n=16 vs. 14.2 ± 16.0 , n=12, $P < 0.05$) (図 22)。

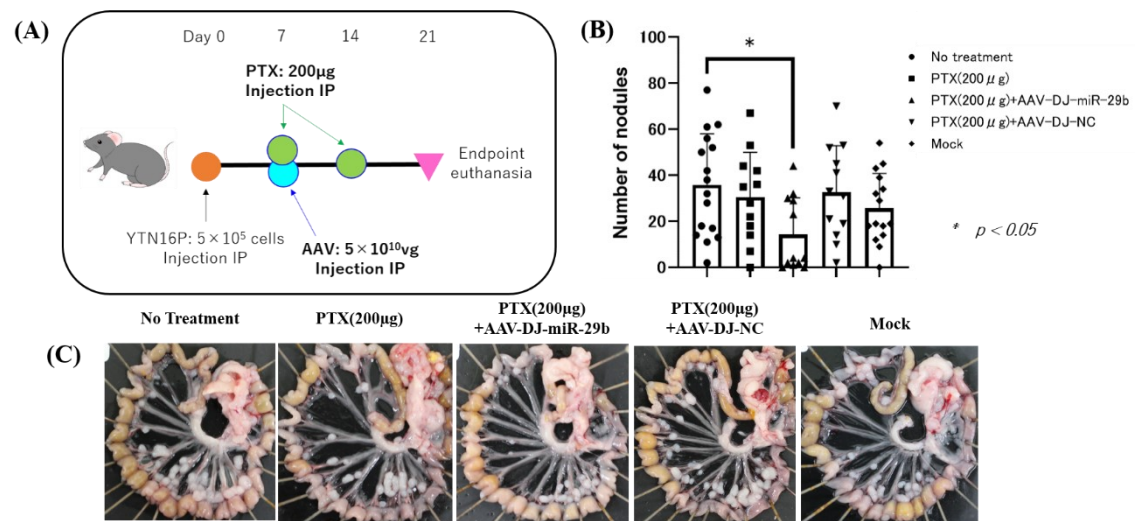


図22 マウス胃癌腹膜播種に対する AAV-DJ-miR-29b とパクリタキセルを併用した腹腔内投与による播種抑制実験

A) 実験プロトコールのシェーマ、B) 腸間膜播種結節数の比較

C) 腸間膜播種結節の肉眼像

3-2-5. マウス膵癌腹膜播種に対する AAV-DJ-miR-29b 腹腔内投与の抑制作用

メスの C57BL/6N マウスにマウス膵癌細胞 PAN02 を腹腔内投与し、同時に 5×10^{10} vg の AAV-DJ-miR-29b を PBS で 1ml に希釈し、腹腔内へ単回投与した。癌細胞投与後 14 日目に安楽死させ、腸間膜播種結節数を比較したところ、AAV-DJ-miR-29b 投与群で対照群に比較し、有意に減少していた (41.2 ± 8.7 vs. 14.4 ± 16.7 , $n=7$, $P < 0.001$) (図 23)。また壁側腹膜の線維化も AAV-DJ-miR-29b 投与マウスで顕著に抑制され、腹膜厚は有意に薄かった (図 24)。

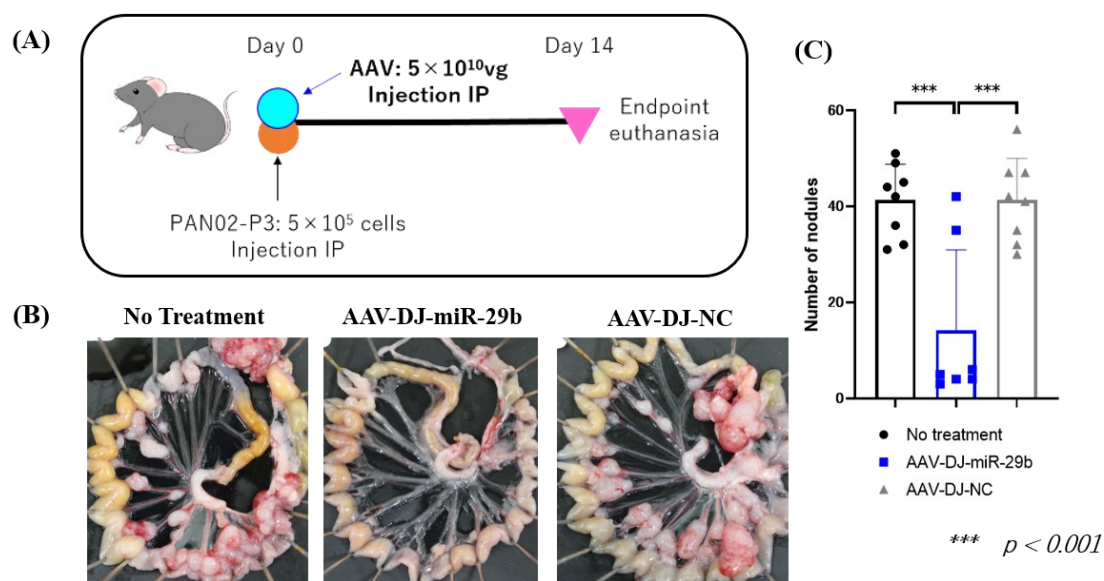


図 23 マウス膵癌腹膜播種モデルでの AAV-DJ-miR-29b による播種抑制実験

A) 実験プロトコルのシェーマ、B) 腸間膜播種結節の肉眼像

C) 腸間膜播種結節数の比較

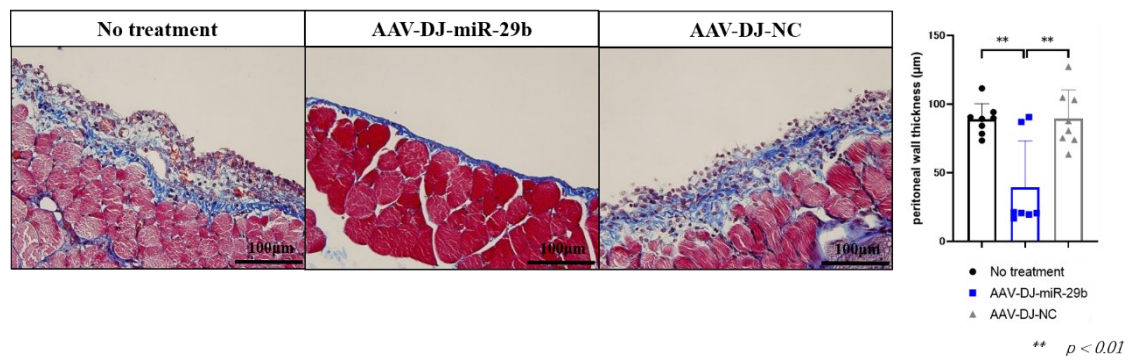


図24 マウス膀胱癌腹膜播種モデルでの AAV-DJ-miR-29b による腹膜線維化の変化

3-2-6. AAV ベクター腹腔内投与による肝毒性評価

AAV ベクター全身投与の副作用として肝毒性があり、この有無をマウス胃癌細胞 YTN16P と AAV ベクターを同時投与したマウス腹膜播種抑制実験時の血液サンプルを使用し、評価した。AAV-DJ-NC 群で肝門部播種結節により閉塞性黄疸を発症したマウスが 1 匹いた。そのマウスでは肝酵素値、総ビリルビン値が上昇したが、他の AAV ベクターを投与したマウスで肝機能異常はみられなかった (図 25)。

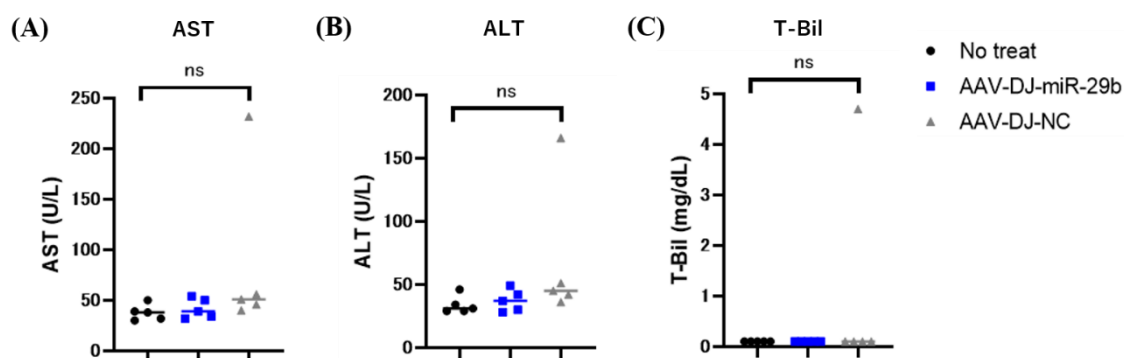


図 25 マウス血清の生化学的検査

A) アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、

B) アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、C) 総ビリルビン (T-Bil)

4. 考察

miR-29 ファミリーは様々な生物学的プロセスにおいて重要な制御機能を有することが報告されており、その発現異常は多様な疾患の病因に関連する(32, 33)。腫瘍学においては、増殖・上皮間葉転換・血管新生・線維化促進などの腫瘍を促進させる複数の因子に対し阻害効果を示し、腫瘍抑制機能をもつ miRNA として注目されている(20-22)。これらの知見と一致して、当研究室では、胃癌腹膜播種患者の腹水中では miR-29b 発現が低下しており(18, 19)、腹腔内への miR-29b の持続的な補充が腹膜播種の形成を効果的に抑制する可能性を報告してきた(24, 25)。

本研究では、臨床応用に向け AAV ベクターを用いた miR-29b のマウス腹腔内への導入につき検討した。まず標的組織の腹膜を構成する腹膜中皮細胞 (PMCs) へ遺伝子導入効率の高い AAV セロタイプを、ヒト、マウスそれぞれで検討し、miR-29b を搭載した AAV ベクター (AAV2-miR-29b および AAV-DJ-miR-29b) を作製した。これら AAV-miR-29b は TGF- β 1 刺激による PMCs の中皮間葉転換を抑制し、胃癌細胞や膵癌細胞との接着を阻害することが確認され、既報の検討結果と一致した(24, 25)。そして、単回の AAV-DJ ベクター腹腔内投与により、腹膜および PMCs への遺伝子導入が可能であることが確認され、投与後 4 週間後の腹膜で遺伝子発現が持続していることが示された。AAV-

DJ-miR-29b の単回投与は、腹腔内の miR-29b 発現を持続的に上昇させるのに十分であり、その結果、胃癌および膵癌モデル両者において腹膜の線維化および腹膜播種形成を抑制したと考えられる。また AAV ベクターの全身投与において問題となる肝毒性は認めず、一定の安全性も示された。Ogura らは、マウス新生仔への AAV ベクター腹腔内投与が、腹膜への特異的な遺伝子導入を可能にすることを報告しており(34)、また Isayeva らは、マウス卵巣癌モデルを用いて、エンドスタチンとアンジオスタチンを組み込んだ AAV ベクターを腹腔内投与することでの抗腫瘍効果を示している(35)。本研究の検討結果からも、AAV ベクターの腹腔内投与は腹膜以外の組織への作用を最小限に抑えながら、目的遺伝子を正確かつ効率的に腹膜へ送達するシステムとして有用であり、腹膜播種の治療に適した方法と考えられる。

しかし、マウス胃癌モデルを用いた腹膜播種抑制実験では、癌細胞投与と同時に、もしくは3日目に AAV-DJ-miR-29b を腹腔内投与することで腹膜播種が抑制されたが、播種がすでに成立している癌細胞投与後7日目の AAV ベクター投与では有意な播種抑制効果は示されなかった。このことから、AAV-DJ-miR-29b 投与は腹膜播種の予防効果はあるが、治療効果は十分でないことが予想された。そこで、従来のパクリタキセルを用いた腹腔内化学療法との相乗効果を検討し、低用量のパクリタキセルと AAV-DJ-miR-29b を併用投与することで、

パクリタキセル単独投与では得られない腹膜播種治療効果を示した。この結果は先行研究で得られた、腹水中細胞外小胞内の miR-21 および miR-223 に対する miR-29b の比率が高いほど、胃癌腹膜播種に対し腹腔内化学療法を受けた患者の予後が良い(36)という観察結果に一致するものであり、腹腔内化学療法に併せて AAV-miR-29b を投与することで、腹膜播種に対する治療効果を高める可能性を示している。抗癌剤の腫瘍への浸透は細胞外マトリックスの密度で規定される腫瘍内圧と関連し(37)、胃癌の腹膜播種結節は線維化が強く抗癌剤が浸透しにくいことが知られている(38)。腫瘍内の線維化にも腹膜中皮細胞が関連することが示されており(39)、AAV-DJ-miR-29b が腹膜中皮細胞を介し線維化を抑制することで、パクリタキセルの腫瘍への浸透性を高め、腹膜播種を抑制した可能性がある。また卵巣癌において miR-29b が抗アポトーシス遺伝子 Mcl-1 発現を低下させ、パクリタキセルの感受性を上げることが報告されており(40)、一部の癌細胞に miR-29b が導入されていれば、癌細胞自体の抗癌剤に対する感受性を高めることで播種抑制効果を示す機序も推察される。

また本研究では、AAV-miR-29b が PMCs の中皮間葉転換を抑制し、フィブロネクチン発現を低下させることで、腫瘍細胞との接着を阻害することを確認した。またマウス腹膜の線維化も AAV-DJ-miR-29b の腹腔内投与により顕著に抑制された。これらは既報の miR-29b の作用に一致するものである(41, 42)。し

かし、miR-29b が腹膜播種の成立を阻害する詳細な分子メカニズムは解明されていない。そこで、マウス PMCs のマイクロアレイ解析を行い、miR-29b が細胞外マトリックス産生、細胞接着および上皮間葉転換に関連する多数の遺伝子発現を調整していることを明らかにした。その中でも miR-29b を導入することで顕著に発現が低下した遺伝子としてトロンボスポンジン 2 (THBS-2)、Piezo2 があり、THBS-2 は、マトリックスメタロプロテアーゼ 13 産生を促進することで肺癌の進行促進に関与し(43)、また胃癌患者の予後不良因子として挙げられている(44)。Piezo2 は機械刺激により活性化される触覚や痛覚に関連するイオンチャネルであるが、予後不良のトリプルネガティブ乳癌細胞において上皮間葉転換を促進することが最近報告されている(45)。これらに対し miR-29b が抑制的にはたらくことで、腹膜播種の抑制に寄与している可能性がある。

また、PMCs に TGF- β 1 を作用させることで免疫チェックポイント分子の B7-H3 発現が上昇し、さらに AAV-miR-29b を併せて作用させることでその変化が打ち消されることが新たに確認された。B7-H3 は腫瘍細胞、免疫細胞、また間質細胞を含む多種の細胞において過剰発現し(46)、抗腫瘍免疫抑制作用により腫瘍促進にはたらく分子として注目され(47)、これをターゲットとした抗体薬物複合体の開発がすすめられている(48, 49)。また Calabro らは、ヒト PMCs や中皮腫細胞における B7-H3 発現について検討し、腫瘍微小環境における免疫調

節に B7-H3 が関与していることを示しており(50)、さらに Gu らは miR-29b がマクロファージの B7-H3 発現を阻害することで、Th2 細胞への分化を制御していることを報告している(31)。したがって、AAV-miR-29b は PMCs の B7-H3 発現を制御し、腹腔内の免疫抑制状態を解除することでも腹膜播種を抑制している可能性がある。

AAV ベクターを使用した遺伝子治療の開発は世界中で進められており、すでに遺伝性網膜疾患 (Luxturna) (51)、脊髄性筋萎縮症 (Zolgensma) (52)、血友病 A/B (Roctavian、Hemgenix) (53, 54) に対し治療製品として承認されている。しかし、悪性腫瘍に対する遺伝子治療の開発は、AAV の癌細胞への指向性の低さ、また分裂細胞において標的遺伝子発現の持続が困難であることから、依然として難題である。本研究では、腹膜組織、特に PMCs を標的として miR-29b を導入しているが、マウス胃癌細胞 YTN16P やマウス膵癌細胞 PAN02 においても AAV-miR-29b は増殖抑制作用を示しており、腫瘍細胞に対する直接的な作用も確認されている。しかし、PMCs と比較して癌細胞での遺伝子導入効率が著しく低いことを考慮すると、本研究で示された腹膜播種抑制効果は主に宿主側の環境変化に依存していると推測され、Paget が提唱した「seed and soil」説の「soil」である腹膜を miRNA で修飾することで、「seed」である癌細胞の発育を効果的に抑制できることを示している。近年、miRNA を生体内へ導入する上で

の AAV ベクターの利点が報告されており(55-57) 、またマウス肝癌モデルにおいて AAV を介した miRNA 導入が抗腫瘍効果をもたらした報告もある(58)。

AAV ベクターは miRNA の標的組織への安定的な導入を可能とし、標的を癌細胞だけでなく、それらが潜む腫瘍微小環境中の細胞へと拡げることで新規治療法として期待できる。腹腔内投与による AAV ベクターを介した miRNA の導入は、難治性腹膜播種治療の突破口になる可能性がある。

5. 結語

腹膜中皮細胞へ遺伝子導入効率の高い血清型を選択し、腫瘍抑制性 miRNA である miR-29b を搭載したアデノ随伴ウイルスベクター、AAV-miR-29b を作製した。AAV-miR-29b は腹膜中皮細胞の中皮間葉転換を抑制し、癌細胞との接着を強く阻害するとともに、免疫チェックポイント分子発現レベルを変化させた。また単回の AAV-DJ 型ベクターの腹腔内投与により、標的組織であるマウス腹膜への良好な遺伝子導入が可能となり、AAV-DJ-miR-29b の腹腔内投与は腹膜中皮細胞の miR-29b 発現を上昇させることで、胃癌および膵癌マウスモデルにおいて顕著な腹膜播種予防効果を示した。さらに、パクリタキセルを用いた腹腔内化学療法に AAV-DJ-miR-29b の腹腔内投与を併用することで、腹膜播種治療効果が確認された。AAV ベクターの腹腔内投与は、腹膜を標的とした遺伝子治療を実現する上で有用であり、腹膜播種をはじめ多種の腹膜疾患に応用可能であると考えられる。miRNA が難治の腹膜播種を「小よく大を制す」日は近いと信じている。

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、臨床腫瘍科 大澤英之先生、宮戸秀世先生に深く感謝致します。

また、アデノ随伴ウイルスベクターの作製を御指導頂いた自治医科大学 遺伝子治療研究部 水上浩明教授、綿野亮太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、贅田育子さんに心より御礼申し上げます。

7. 参考文献

1. N. Colombo, T. Van Gorp, G. Parma, F. Amant, G. Gatta, C. Sessa, I. Vergote, Ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **60**, 159-179 (2006).
2. P. H. Sugarbaker, Peritoneal Metastases from Gastrointestinal Cancer. *Curr Oncol Rep* **20**, 62 (2018).
3. W. J. Koemans, R. J. Lurvink, C. Grootsholten, R. H. A. Verhoeven, I. H. de Hingh, J. W. van Sandick, Synchronous peritoneal metastases of gastric cancer origin: incidence, treatment and survival of a nationwide Dutch cohort. *Gastric Cancer* **24**, 800-809 (2021).
4. R. J. Lurvink, C. Bakkers, A. Rijken, F. N. van Erning, S. W. Nienhuijs, J. W. Burger, G. J. Creemers, C. Verhoef, V. E. Lemmens, I. H. De Hingh, Increase in the incidence of synchronous and metachronous peritoneal metastases in patients with colorectal cancer: A nationwide study. *Eur J Surg Oncol* **47**, 1026-1033 (2021).
5. A. Rijken, C. Bakkers, F. N. van Erning, L. G. van der Geest, J. de Vos-Geelen, M. G. Besselink, V. E. Lemmens, I. de Hingh, Incidence, Treatment, and Survival of Synchronous Peritoneal Metastases in Pancreatic Cancer: Update of a Nationwide Cohort. *Pancreas* **50**, 827-833 (2021).
6. T. E. Nakajima, K. Yamaguchi, N. Boku, I. Hyodo, J. Mizusawa, H. Hara, T. Nishina, T. Sakamoto, K. Shitara, K. Shinozaki, H. Katayama, S. Nakamura, K. Muro, M. Terashima, Randomized phase II/III study of 5-fluorouracil/l-leucovorin versus 5-fluorouracil/l-leucovorin plus paclitaxel administered to patients with severe peritoneal metastases of gastric cancer (JCOG1108/WJOG7312G). *Gastric Cancer* **23**, 677-688 (2020).
7. P. Jacquet, P. H. Sugarbaker, Peritoneal-plasma barrier. *Cancer Treat Res* **82**, 53-63 (1996).
8. M. Steuperaert, C. Debbaut, P. Segers, W. Ceelen, Modelling drug transport during intraperitoneal chemotherapy. *Pleura Peritoneum* **2**, 73-83 (2017).
9. D. Soma, J. Kitayama, T. Konno, K. Ishihara, J. Yamada, T. Kamei, H. Ishigami, S. Kaisaki, H. Nagawa, Intraperitoneal administration of paclitaxel solubilized with poly(2-methacryloxyethyl phosphorylcholine-co n-butyl methacrylate) for peritoneal dissemination of gastric cancer. *Cancer Sci* **100**, 1979-1985 (2009).
10. T. Kamei, J. Kitayama, H. Yamaguchi, D. Soma, S. Emoto, T. Konno, K. Ishihara, H. Ishigami, S. Kaisaki, H. Nagawa, Spatial distribution of intraperitoneally administrated paclitaxel nanoparticles solubilized with poly (2-methacryloxyethyl phosphorylcholine-co n-butyl methacrylate) in peritoneal metastatic nodules. *Cancer Sci* **102**, 200-205 (2011).
11. A. A. Tentes, N. Pallas, C. Karamveri, D. Kyziridis, C. Hristakis, Cytoreduction and

- HIPEC for peritoneal carcinomatosis of pancreatic cancer. *J buon* **23**, 482-487 (2018).
12. A. Brandl, Y. Yonemura, O. Glehen, P. Sugarbaker, B. Rau, Long term survival in patients with peritoneal metastasised gastric cancer treated with cytoreductive surgery and HIPEC: A multi-institutional cohort from PSOGI. *Eur J Surg Oncol* **47**, 172-180 (2021).
 13. H. Ishigami, Y. Fujiwara, R. Fukushima, A. Nashimoto, H. Yabusaki, M. Imano, H. Imamoto, Y. Kodera, Y. Uenosono, K. Amagai, S. Kadowaki, H. Miwa, H. Yamaguchi, T. Yamaguchi, T. Miyaji, J. Kitayama, Phase III Trial Comparing Intraperitoneal and Intravenous Paclitaxel Plus S-1 Versus Cisplatin Plus S-1 in Patients With Gastric Cancer With Peritoneal Metastasis: PHOENIX-GC Trial. *J Clin Oncol* **36**, 1922-1929 (2018).
 14. S. Yamada, T. Fujii, T. Yamamoto, H. Takami, I. Yoshioka, S. Yamaki, F. Sonohara, K. Shibuya, F. Motoi, S. Hirano, Y. Murakami, H. Inoue, M. Hayashi, K. Murotani, J. Kitayama, H. Ishikawa, Y. Kodera, M. Sekimoto, S. Satoi, Phase I/II study of adding intraperitoneal paclitaxel in patients with pancreatic cancer and peritoneal metastasis. *Br J Surg* **107**, 1811-1817 (2020).
 15. S. E. Mutsaers, The mesothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 9-16 (2004).
 16. P. Sandoval, J. A. Jiménez-Heffernan, G. Guerra-Azcona, M. L. Pérez-Lozano, Á. Rynne-Vidal, P. Albar-Vizcaíno, F. Gil-Vera, P. Martín, M. J. Coronado, C. Barcena, J. Dotor, P. L. Majano, A. A. Peralta, M. López-Cabrera, Mesothelial-to-mesenchymal transition in the pathogenesis of post-surgical peritoneal adhesions. *J Pathol* **239**, 48-59 (2016).
 17. C. H. Gordillo, P. Sandoval, P. Muñoz-Hernández, L. Pascual-Antón, M. López-Cabrera, J. A. Jiménez-Heffernan, Mesothelial-to-Mesenchymal Transition Contributes to the Generation of Carcinoma-Associated Fibroblasts in Locally Advanced Primary Colorectal Carcinomas. *Cancers (Basel)* **12**, (2020).
 18. H. Ohzawa, Y. Kumagai, H. Yamaguchi, H. Miyato, Y. Sakuma, H. Horie, Y. Hosoya, A. Kawarai Lefor, N. Sata, J. Kitayama, Exosomal microRNA in peritoneal fluid as a biomarker of peritoneal metastases from gastric cancer. *Ann Gastroenterol Surg* **4**, 84-93 (2020).
 19. H. Ohzawa, A. Saito, Y. Kumagai, Y. Kimura, H. Yamaguchi, Y. Hosoya, A. K. Lefor, N. Sata, J. Kitayama, 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. B. Yan, Q. Guo, F. J. Fu, Z. Wang, Z. Yin, Y. B. Wei, J. R. Yang, The role of miR-29b in cancer: regulation, function, and signaling. *Onco Targets Ther* **8**, 539-548 (2015).
 21. J. J. Kwon, T. D. Factora, S. Dey, J. Kota, A Systematic Review of miR-29 in Cancer. *Mol Ther Oncolytics* **12**, 173-194 (2019).
 22. M. Alizadeh, A. Safarzadeh, F. Beyranvand, F. Ahmadpour, K. Hajiasgharzadeh, A.

- Baghbanzadeh, B. Baradaran, The potential role of miR-29 in health and cancer diagnosis, prognosis, and therapy. *J Cell Physiol* **234**, 19280-19297 (2019).
23. R. C. de Abreu, C. V. Ramos, C. Becher, M. Lino, C. Jesus, P. A. da Costa Martins, P. A. T. Martins, M. J. Moreno, H. Fernandes, L. Ferreira, Exogenous loading of miRNAs into small extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* **10**, e12111 (2021).
 24. Y. Kimura, H. Ohzawa, H. Miyato, Y. Kaneko, T. Kuchimaru, R. Takahashi, H. Yamaguchi, K. Kurashina, S. Saito, Y. Hosoya, A. K. Lefor, N. Sata, J. Kitayama, Intraperitoneal transfer of microRNA-29b-containing small extracellular vesicles can suppress peritoneal metastases of gastric cancer. *Cancer Sci* **114**, 2939-2950 (2023).
 25. Y. Kimura, H. Ohzawa, H. Miyato, Y. Kaneko, A. Saito, K. Takahashi, M. Tojo, H. Yamaguchi, K. Kurashina, S. Saito, Y. Hosoya, A. K. Lefor, N. Sata, J. Kitayama, MiR-29b may suppresses peritoneal metastases through inhibition of the mesothelial-mesenchymal transition (MMT) of human peritoneal mesothelial cells. *Sci Rep* **12**, 205 (2022).
 26. M. A. Kotterman, D. V. Schaffer, Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat Rev Genet* **15**, 445-451 (2014).
 27. A. Gupta, J. L. Andresen, R. S. Manan, R. Langer, Nucleic acid delivery for therapeutic applications. *Adv Drug Deliv Rev* **178**, 113834 (2021).
 28. M. F. Naso, B. Tomkowicz, W. L. Perry, 3rd, W. R. Strohl, Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* **31**, 317-334 (2017).
 29. F. Kurosaki, R. Uchibori, N. Mato, Y. Sehara, Y. Saga, M. Urabe, H. Mizukami, Y. Sugiyama, A. Kume, Optimization of adeno-associated virus vector-mediated gene transfer to the respiratory tract. *Gene Ther* **24**, 290-297 (2017).
 30. Y. Kumagai, Y. Futoh, H. Miyato, H. Ohzawa, H. Yamaguchi, S. Saito, K. Kurashina, Y. Hosoya, A. K. Lefor, N. Sata, J. Kitayama, Effect of Systemic or Intraperitoneal Administration of Anti-PD-1 Antibody for Peritoneal Metastases from Gastric Cancer. *In Vivo* **36**, 1126-1135 (2022).
 31. W. Gu, G. Li, W. Zhang, X. Zhang, Y. He, L. Huang, Y. Yan, W. Ji, C. Hao, Z. Chen, MiR-29b regulates Th2 cell differentiation in asthma by targeting inducible B7-H3 and STAT3. *Clin Transl Allergy* **12**, e12114 (2022).
 32. M. Horita, C. Farquharson, L. A. Stephen, The role of miR-29 family in disease. *J Cell Biochem* **122**, 696-715 (2021).
 33. L. T. Dalgaard, A. E. Sørensen, A. A. Hardikar, M. V. Joglekar, The microRNA-29 family: role in metabolism and metabolic disease. *Am J Physiol Cell Physiol* **323**, C367-c377 (2022).
 34. T. Ogura, H. Mizukami, J. Mimuro, S. Madoiwa, T. Okada, T. Matsushita, M. Urabe, A. Kume, H. Hamada, H. Yoshikawa, Y. Sakata, K. Ozawa, Utility of intraperitoneal

- administration as a route of AAV serotype 5 vector-mediated neonatal gene transfer. *J Gene Med* **8**, 990-997 (2006).
35. T. Isayeva, C. Ren, S. Ponnazhagan, Intraperitoneal gene therapy by rAAV provides long-term survival against epithelial ovarian cancer independently of survivin pathway. *Gene Ther* **14**, 138-146 (2007).
 36. H. Ohzawa, Y. Kimura, A. Saito, H. Yamaguchi, H. Miyato, Y. Sakuma, H. Horie, Y. Hosoya, A. K. Lefor, N. Sata, J. Kitayama, Ratios of miRNAs in Peritoneal Exosomes are Useful Biomarkers to Predict Tumor Response to Intraperitoneal Chemotherapy in Patients with Peritoneal Metastases from Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol* **27**, 5057-5064 (2020).
 37. R. Grantab, S. Sivananthan, I. F. Tannock, The penetration of anticancer drugs through tumor tissue as a function of cellular adhesion and packing density of tumor cells. *Cancer Res* **66**, 1033-1039 (2006).
 38. M. Okazaki, S. Fushida, S. Harada, T. Tsukada, J. Kinoshita, K. Oyama, T. Miyashita, I. Ninomiya, T. Ohta, Establishing a xenograft mouse model of peritoneal dissemination of gastric cancer with organ invasion and fibrosis. *BMC Cancer* **17**, 23 (2017).
 39. T. Tsukada, S. Fushida, S. Harada, Y. Yagi, J. Kinoshita, K. Oyama, H. Tajima, H. Fujita, I. Ninomiya, T. Fujimura, T. Ohta, The role of human peritoneal mesothelial cells in the fibrosis and progression of gastric cancer. *Int J Oncol* **41**, 476-482 (2012).
 40. A. Sugio, M. Iwasaki, S. Habata, T. Mariya, M. Suzuki, H. Osogami, M. Tamate, R. Tanaka, T. Saito, BAG3 upregulates Mcl-1 through downregulation of miR-29b to induce anticancer drug resistance in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **134**, 615-623 (2014).
 41. J. Zhu, G. Xiong, H. Fu, B. M. Evers, B. P. Zhou, R. Xu, Chaperone Hsp47 Drives Malignant Growth and Invasion by Modulating an ECM Gene Network. *Cancer Res* **75**, 1580-1591 (2015).
 42. T. Yang, Y. Liang, Q. Lin, J. Liu, F. Luo, X. Li, H. Zhou, S. Zhuang, H. Zhang, 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).
 43. J. F. Liu, C. W. Lee, M. H. Tsai, C. H. Tang, P. C. Chen, L. W. Lin, C. Y. Lin, C. H. Lu, Y. F. Lin, S. H. Yang, C. C. Chao, Thrombospondin 2 promotes tumor metastasis by inducing matrix metalloproteinase-13 production in lung cancer cells. *Biochem Pharmacol* **155**, 537-546 (2018).
 44. S. Zhang, H. Yang, X. Xiang, L. Liu, H. Huang, G. Tang, THBS2 is Closely Related to the Poor Prognosis and Immune Cell Infiltration of Gastric Cancer. *Front Genet* **13**, 803460 (2022).
 45. E. Katsuta, K. Takabe, M. Vujcic, P. A. Gottlieb, T. Dai, A. Mercado-Perez, A. Beyder, Q.

- Wang, M. Opyrchal, Mechano-Sensing Channel PIEZO2 Enhances Invasive Phenotype in Triple-Negative Breast Cancer. *Int J Mol Sci* **23**, (2022).
46. A. I. Chapoval, J. Ni, J. S. Lau, R. A. Wilcox, D. B. Flies, D. Liu, H. Dong, G. L. Sica, G. Zhu, K. Tamada, L. Chen, B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat Immunol* **2**, 269-274 (2001).
 47. V. Vigdorovich, U. A. Ramagopal, E. Lázár-Molnár, E. Sylvestre, J. S. Lee, K. A. Hofmeyer, X. Zang, S. G. Nathenson, S. C. Almo, Structure and T cell inhibition properties of B7 family member, B7-H3. *Structure* **21**, 707-717 (2013).
 48. U. Malapelle, P. Parente, F. Pepe, M. C. Di Micco, A. Russo, C. Clemente, P. Graziano, A. Rossi, B7-H3/CD276 Inhibitors: Is There Room for the Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer? *Int J Mol Sci* **23**, (2022).
 49. F. P. Fabrizio, L. A. Muscarella, A. Rossi, B7-H3/CD276 and small-cell lung cancer: What's new? *Transl Oncol* **39**, 101801 (2023).
 50. L. Calabrò, L. Sigalotti, E. Fonsatti, E. Bertocci, A. M. Di Giacomo, R. Danielli, O. Cutaia, F. Colizzi, A. Covre, L. Mutti, P. G. Natali, M. Maio, Expression and regulation of B7-H3 immunoregulatory receptor, in human mesothelial and mesothelioma cells: immunotherapeutic implications. *J Cell Physiol* **226**, 2595-2600 (2011).
 51. F. F. Reichel, I. Seitz, F. Wozar, S. Dimopoulos, R. Jung, M. Kempf, S. Kohl, F. C. Kortüm, S. Ott, L. Pohl, K. Stingl, K. U. Bartz-Schmidt, K. Stingl, M. D. Fischer, Development of retinal atrophy after subretinal gene therapy with voretigene neparvovec. *Br J Ophthalmol* **107**, 1331-1335 (2023).
 52. H. A. Blair, Onasemnogene Abeparvovec: A Review in Spinal Muscular Atrophy. *CNS Drugs* **36**, 995-1005 (2022).
 53. A. Philippidis, BioMarin's ROCTAVIAN Wins Food and Drug Administration Approval As First Gene Therapy for Severe Hemophilia A. *Hum Gene Ther* **34**, 665-668 (2023).
 54. T. Sekayan, D. H. Simmons, A. von Drygalski, Etranacogene dezaparvovec-drlb gene therapy for patients with hemophilia B (congenital factor IX deficiency). *Expert Opin Biol Ther*, 1-12 (2023).
 55. E. Brandon-Warner, J. H. Benbow, J. H. Swet, N. A. Feilen, C. R. Culberson, I. H. McKillop, A. S. deLemos, M. W. Russo, L. W. Schrum, Adeno-Associated Virus Serotype 2 Vector-Mediated Reintroduction of microRNA-19b Attenuates Hepatic Fibrosis. *Hum Gene Ther* **29**, 674-686 (2018).
 56. K. N. Heller, J. T. Mendell, J. R. Mendell, L. R. Rodino-Klapac, MicroRNA-29 overexpression by adeno-associated virus suppresses fibrosis and restores muscle function in combination with micro-dystrophin. *JCI Insight* **2**, (2017).

57. L. Stoica, S. H. Todeasa, G. T. Cabrera, J. S. Salameh, M. K. ElMallah, C. Mueller, R. H. Brown, Jr., M. Sena-Esteves, Adeno-associated virus-delivered artificial microRNA extends survival and delays paralysis in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Ann Neurol* **79**, 687-700 (2016).
58. J. Kota, R. R. Chivukula, K. A. O'Donnell, E. A. Wentzel, C. L. Montgomery, H. W. Hwang, T. C. Chang, P. Vivekanandan, M. Torbenson, K. R. Clark, J. R. Mendell, J. T. Mendell, Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell* **137**, 1005-1017 (2009).