

氏 名	かね こ ゆう き 金 子 勇 貴
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 699 号
学位授与年月日	令和 6 年 3 月 18 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	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 審 査 委 員	(委員長) 教授 藤原 寛行 (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

胃癌腹膜播種患者の腹水中ではマイクロ RNA-29b (miR-29b) が減少しており、また根治切除後の播種再発予測マーカーとなることを当研究室では報告してきた。また miR-29b が腹膜中皮細胞 (PMC; peritoneal mesothelial cell) の中皮間葉転換 (MMT; mesothelial-to-mesenchymal transition) を抑制し、細胞外小胞に内包させた miR-29b をマウス腹腔内へ反復投与することで胃癌腹膜播種を抑制することを明らかにした。しかし多量の細胞外小胞を作成・保存するシステムは確立されておらず、臨床応用へ向けて、より簡便な投与法の開発が必要であった。そこでアデノ随伴ウイルス (AAV; adeno-associated virus) を用い腹腔内へ miR-29b を導入し、その腹膜播種抑制効果につき検討した。

2 研究方法

(1) miR-29b 搭載 AAV ベクター (AAV-miR-29b) の作製

ヒトおよびマウス PMCs の AAV セロタイプテスト (1-10 型、DJ 型) を行い、遺伝子導入効率の高い血清型を選出した。miR-29b 前駆体配列を組み込んだ AAV プラスミドを作製し、リン酸カルシウム法で AAV-miR-29b を作製した。PMCs に AAV-miR-29b を作用させ miR-29b 発現レベルをデジタル PCR 法で評価した。

(2) PMCs の MMT 抑制実験

PMCs に TGF- β 1 (10ng/ml) 刺激を加えることで MMT を誘導した。MMT による表現型や増殖能・遊走能・癌細胞との接着能の変化、その変化に対する AAV-miR-29b の抑制効果を細胞免疫染色、フローサイトメトリー、また各種アッセイで評価した。

(3) マウス PMCs のマイクロアレイ解析

① naïve PMCs、また② TGF- β 1、③ TGF- β 1+AAV-miR-29b、④ TGF- β 1+AAV-negative controls、各々で作用させたマウス PMCs から RNA 抽出を行い、Clariom S Array を用いマイクロアレイ解析を行った。発現変動遺伝子 (DEG; differentially expressed gene) を同定し、遺伝子オントロジー (GO; gene ontology) 解析を行った。

(4) マウス腹膜・PMCs への遺伝子導入 (in vivo 実験)

C57BL/6N マウスに AAV-DJ-GFP を 5×10^{10} ベクターゲノム (vg) 腹腔内へ単回投与、4 週間後に腹膜組織の凍結切片を作成し、GFP 発現を蛍光顕微鏡で確認した。また AAV-DJ-miR-29b を腹腔内投与し、2 週間後のマウス PMCs を分離培養、それらの miR-29b 発現をデジタル PCR 法で評価した。

(5) AAV-DJ-miR-29b のマウス腹膜播種抑制効果の検討

マウス胃癌細胞 YTN16P を 1×10^5 個、腹腔内投与することで胃癌腹膜播種モデルを作成した。AAV-DJ-miR-29b を 5×10^{10} vg、腹腔内へ単回投与し、癌細胞投与後 21 日目の腸間膜播種結節数を比較した。また壁側腹膜を採取し、マッソン・トリクローム染色で線維化を評価した。同様にマウス膵癌細胞 PAN02 を 5×10^5 個、腹腔内投与することで膵癌腹膜播種モデルを作成し、同様に播種抑制効果を検討した。

(6) 腹腔内化学療法と AAV-DJ-miR-29b 併用投与による腹膜播種治療効果の検討

マウス胃癌腹膜播種モデルにおいて、癌細胞投与後 7、14 日目にパクリタキセル (PTX) を $200 \mu\text{g}$ 投与し、21 日目の腸間膜播種数をカウントした。AAV-DJ-miR-29b は 7 日目に単回投与し、併用による治療効果につき検討した。

3 研究成果

- (1) ヒト、マウス PMCs に遺伝子導入効率の高い血清型として、それぞれ 2 型、DJ 型を選出し、AAV2-miR-29b, AAV-DJ-miR-29b の 2 種類の AAV ベクターを作製した。PMCs に作用させることで miR-29b 発現が顕著に上昇した。
- (2) ヒト PMCs に TGF- β 1 を作用させることで、E-cadherin、Calretinin 発現が低下し、Vimentin、Fibronectin、また免疫チェックポイント分子である B7-H3 の発現が上昇した。併せて遊走能の増強、また癌細胞との接着能の増強が確認された。AAV-miR-29b の添加は、これらの変化を打ち消した。
- (3) マウス PMCs に AAV-DJ-miR-29b を作用させることで、対照群と比較し 10 倍以上発現差のあった DEGs は 36 個であった。それらで階層クラスタリングを 4 サンプル間で行ったところ、AAV-DJ-miR-29b を併用することで、naïve な PMCs と同様な遺伝学的性質を与えることが示された。また発現差が 2 倍以上であった 1,898 個の DEGs を用い GO 解析を行い、これらの DEGs は細胞外マトリックス産生、細胞接着機能、また細胞の遊走・走化性に関連していることが示された。
- (4) AAV-DJ-GFP を 5×10^{10} vg 腹腔内投与し、4 週間後の腹膜で GFP 発現が確認された。また AAV-DJ-miR-29b を腹腔内投与し、2 週間後の PMCs でも miR-29b の顕著な発現上昇が確認された。
- (5) マウス胃癌腹膜播種モデルにおいて AAV-DJ-miR-29b を癌細胞投与と同時に、もしくは 3 日後に単回投与することで、対照群と比較し腸間膜播種結節数が減少し、腹膜の線維化も抑制された。しかし、7 日目の AAV ベクター投与では播種抑制効果は認めなかった。
マウス膵癌腹膜播種モデルにおいても AAV-DJ-miR-29b の投与により播種が抑制された。
- (6) PTX 単独投与では腸間膜播種結節数は対照群と比較し減少しなかったが、AAV-DJ-miR-29b を併用することで、播種結節数は減少した。

4 考察

PMC に遺伝子導入効率の高い血清型を用い、miR-29b を搭載した AAV ベクターを作製した。この AAV-miR-29b は PMCs の MMT を抑制し、既報の検討結果と一致した。また単回の AAV-DJ-miR-29b 腹腔内投与は、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において腹膜播種形成、腹膜の線維化を抑制したと考えられる。しかし、癌細胞投与後 7 日目の AAV ベクター投与は播種抑制効果を示さず、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推測された。そこで、従来の PTX を用いた腹腔内化学療法との相乗効果を検討した。AAV-DJ-miR-29b を併用投与することで、PTX 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の、腹水中の 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という観察結果に一致し、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。

本研究では、マウス PMCs を用いてマイクロアレイ解析を行い、miR-29b が細胞接着や上皮間葉転換に関連する遺伝子発現を調整していることが示された。しかし、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おらず、今後の検討課題である。

5 結論

AAV-DJ-miR-29b の腹腔内投与は、miR-29b の腹膜・PMCs への導入を可能とし、消化器癌腹膜播種を良好に抑制した。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ると考えられた。

論文審査の結果の要旨

消化器癌の進展形式の一つである腹膜播種に関して、これを治療ターゲットとして予後改善を図る目的をもった研究。腫瘍抑制性に働く miR-29b が腹膜播種患者の腹水中で明らかに低下していることに着目し、この補充を行うことを検討した。補充法として細胞外小胞やアテロコラーゲン法などが検討されたが、実際の臨床に応用するには量的・資源的にも非現実的であることから、新規の送達システムとしてアデノ随伴ウイルスベクター（AAV ベクター）が選択された。

播種の形成される腹膜中皮細胞に対して、遺伝子導入効率の高い血清型は、ヒト腹膜中皮細胞は AAV2 型、マウス腹膜中皮細胞は AAV-DJ であることを示し、これらを用いて miR-29b が搭載された AAV-miR-29b が作製された。これを用いた基礎実験において、AAV-miR-29b は腹膜中皮細胞の中皮間葉転換（MMT）を抑制し、癌細胞との接着を阻害すること、B7-H3 の発現も増強させることなどを明らかにした。また *in vivo* 実験においては、単回の AAV-DJ-miR-29b の腹腔内投与により、腹膜中皮細胞の miR-29b 発現を上昇させること、胃癌や膵癌マウスモデルにおいては、播種形成前の AAV-DJ-miR-29b 投与で、顕著な腹膜播種予防効果があることを示した。播種形成後であってもパクリタキセルとの併用であれば、非治療群と比して播種結節数の減少効果が認められ、治療効果も確認された。

AAV ベクターを用いたこと、また導入対象を腫瘍ではなく腹膜にしたことなどにより、miR-

29b の効果を証明する実験系の確立がなされ、また将来の実臨床に応用できる可能性を示すことが出来ている。MMT 抑制など、miR-29b の補充による効果を証明し、またこれら *in vitro* の結果と矛盾しない現象を *in vivo* でも示した。研究に至る背景、実験方法、結果、解釈ともに十分に検討されたものであり、論旨の進め方も的確であった。本論文が学位論文に相当するものであると判断し、審査員全員一致で合格とした。

最終試験の結果の要旨

申請者により、学位論文研究の背景、目的、実験方法、結果、解釈等が発表された。スライドは見やすく、理解しやすいプレゼンテーションであった。審査委員から実験系に関する質問があったが、いずれも的確に回答し、研究の周辺領域も含めて十分な知識があることが確認された。また研究結果の解釈や今後の展開に関する質問に対しても、現状で確認出来ていることと、まだ推測の段階であることをしっかり分けて回答出来ており、科学的思考能力も十分に備わっていると判断された。修正箇所に関しては審査終了後、すみやかに修正版が提出された。医学博士に求められる能力を十分に有していると判断され、審査員全員一致で合格とした。