

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07704

研究課題名(和文)新規核酸医薬を用いた実用的腹膜播種予防法の開発

研究課題名(英文) Novel method to prevent peritoneal recurrence using nuclear medicine

研究代表者

大澤 英之 (Ohzawa, Hideyuki)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60458271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌や膵癌において頻度の高い転移・再発形式で最大の予後規定因子である腹膜播種に対して、腹腔内のマイクロRNAの量的変化を是正することで腹膜播種再発を予防するという新たな腹膜播種治療を開発することを目指した。腹膜播種患者の腹腔内液中エクソソームにおいて発現が低下しているmiR-29bは、腹膜中皮細胞の中皮間葉転換を抑制し、マウス腹膜播種モデルにおいて腹膜播種の形成を抑制することが明らかになった。また、間葉系幹細胞にmiR-29bを発現させ、そこから分泌されるmiR-29b内包エクソソームを腹腔内に投与したところ、さらに良好な腹膜播種の抑制効果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでほとんど解析されていない腹腔内液を対象とした研究の成果をもとにして、予後不良の腹膜播種に対する新たな治療法を開発することを目指した研究である。本研究を発展させることで、難治性の病態である腹膜播種をより早い段階で予防するという臨床的有用性の高い新規治療の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：Peritoneal dissemination of advanced gastrointestinal cancer is one of the most important clinical issues. This study aimed at developing novel treatment which prevent peritoneal recurrence by correcting quantitative changes in microRNA in the peritoneal cavity. miR-29b, which expression is downregulated in exosomes derived from the peritoneal fluid of patients with peritoneal metastasis, suppressed the mesothelial-mesenchymal transition of peritoneal mesothelial cells and suppresses the formation of peritoneal metasis in a mouse model. In addition, intraperitoneal administration of miR-29b-encapsulating exosomes resulted in an even better suppressive effect on peritoneal dissemination.

研究分野：がん薬物療法

キーワード：腹膜播種 マイクロRNA 核酸医薬

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腹膜播種は胃癌や膵癌において頻度の高い転移・再発形式で、最大の予後規定因子である。近年の薬物療法の進歩によって、根治切除不能・再発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予後改善はみられていない。また、胃癌、膵癌では肉眼的根治手術を施行できても、術後に腹膜播種再発をきたす症例を数多く経験する。腹膜播種を確実に制御する方法が見出させていない今、この播種再発を効率的に予防する方法論を確立することが患者の予後向上を考える上で最も重要な事項であると考えられる。

エクソソームは細胞が放出する 30~150 nm の細胞外小胞で、様々な生理活性を有するたんぱく質や DNA やマイクロ RNA (miRNA) などの核酸成分を含有し、細胞間コミュニケーションに重要な役割を果たしている。近年の研究で、癌患者の血中エクソソームはがん特異的な機能分子を多量に含有しており、標的臓器の微小環境を癌細胞の生育に適したものに交換することによって、遠隔転移の成立を促進している事実が報告されてきている。腹膜播種においても、腹膜表面に露出した癌細胞が腹腔というフリースペースに多量のエクソソームを放出し、腹腔内微小環境を修飾することが播種性転移の成立に重要な役割を果たしていることが類推される。しかし、サンプル採取の困難さのため、腹腔内液中のエクソソームの組成や機能に関する情報は少ない。本研究では、腹腔内液中のエクソソームに含まれる miRNA が腹腔内の遊離がん細胞や微小環境に対する作用を明らかにして、その量的変化を是正することによって腹膜播種再発を予防するという新たな腹膜播種治療を確立することを目指す。

2. 研究の目的

これまでの研究で、胃癌腹膜播種患者の腹腔内エクソソームの網羅的解析を行い、腹膜播種症例で著明に変化する 7 個の miRNA を見出した。また、根治切除が施行された胃癌患者において手術時の腹腔洗浄液中の miR-29 family が低下している症例が、有意に播種再発をきたしやすいことを見出した(Ohzawa H et al, Ann.Gastroenterol.Surg, 2019)。

本研究では、これらの miRNA を治療に応用することを考え、miR-29b の mimic miRNA を、癌細胞や腹膜中皮細胞、免疫細胞、線維芽細胞など腹腔内を構成する細胞群に導入することで細胞機能の変化を評価し、miR-29b の播種抑制効果のメカニズムを明らかにするとともに、マウス腹膜播種モデルの miR-29b を腹腔内に投与し、腹膜播種の予防効果を明らかにすることを第一の目的とした。

一方、miRNA は生体内での安定性に欠けるため、腹腔内への投与方法が問題になると考えられたことから、エクソソームを用いたデリバリーシステムの開発に取り組むこととした。エクソソームを利用することで、従来の核酸導入試薬を使用しないで、細胞に miRNA を導入することが出来る。免疫原性の少ない間葉系幹細胞に miR-29b を発現させ、そこから分泌されるエクソソームを実験に用いることにした。エクソソーム自体を miRNA のキャリアとして応用するという方法論を検証することも目的とした。

3. 研究の方法

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腹膜中皮細胞を分離・培養した。腹膜中皮細胞に対して TGF- β 1 を添加し、37 $^{\circ}$ C、48 時間培養して中皮間葉転換を誘導した。TGF- β 1 と同時に miR-29b mimic を添加して、細胞機能実験を行い、腹膜中皮細胞に対する miR-29b の作用を評価した。C57BL/6 マウスに腹膜播種を起こす胃癌細胞株 YTN16P を用いたマウス腹膜播種モデルに対して、アテロコラーゲンに混和した miR-29b mimic と陰性対照 miRNA を 3 日毎に腹腔内に投与して腸間膜と大網に形成された播種結節数を比較した。C57BL/6 マウスから大腿骨を採取し、骨髄から間葉系幹細胞 (MSC) を分離培養した。miR-29b 発現レンチウイルスベクターを用いて miR-29b を導入し、培養上清から miR-29b 発現エクソソームを回収し実験に用いた。腹膜中皮細胞に対する作用を miR-29b mimic を用いた実験と同様の手法で評価し、マウス腹膜播種モデルの腹腔内への投与実験も同様に行った。

4. 研究成果

デジタル PCR 法でヒト腹膜中皮細胞における 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、末梢血単核細胞よりも高値であったが、TGF- β 1 10ng/ml を添加し 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 1)。ヒト腹膜中皮細胞の増殖能は 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に低下した。遊走能は、TGF- β 1 で刺激したものに比べて、miR-29b を導入したもので著明に減少した (図 2)。ヒト腹膜中皮細胞は TGF- β 1 刺激により中皮間葉転換を来すが、miR-29b をリポフェクション法で導入すると中皮間葉転換を抑制した (図 3)。

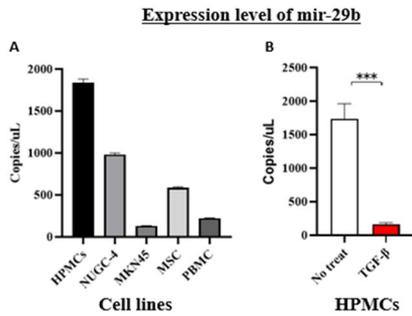


図1 細胞における miR-29b 発現レベル

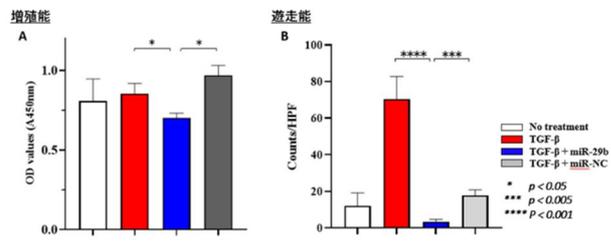


図2 腹膜中皮細胞への miR-29b 導入による変化

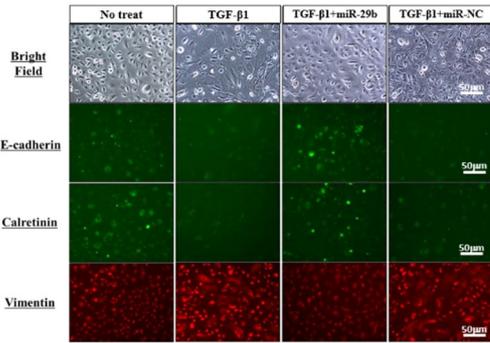
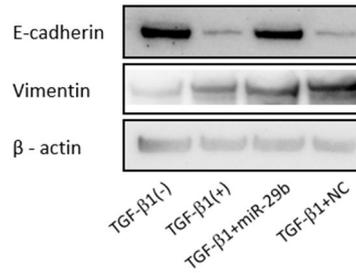


図3 miR-29b による中皮間葉転換の抑制



マウス胃癌細胞株 YTN16P を C57BL/6 マウスの腹腔内に投与した3日後からアテロコラーゲンに混和した miR-29b mimic 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、大網においては陰性対照群と比較して播種結節数を有意に抑制していた。

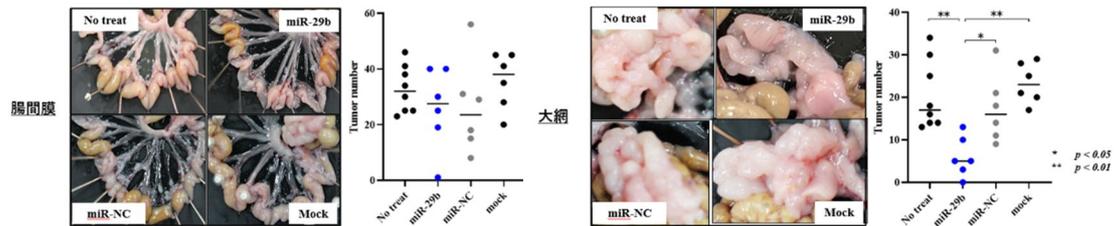


図4 マウス腹膜播種モデルに対する miR-29b の投与

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、マウス骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) の分離培養を行った。C57BL/6 マウスの大腿骨から MSC を分離培養し、細胞表面マーカーを確認すると、間葉系幹細胞マーカーの CD44、CD73、CD90 が発現し、陰性マーカーの CD31、CD34、CD49d の発現を認めなかった。この MSC に対して miR-29b 発現レンチウイルスベクターを用いて、miR-29b 前駆体を遺伝子導入した。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 の発現が著明に増強していた。

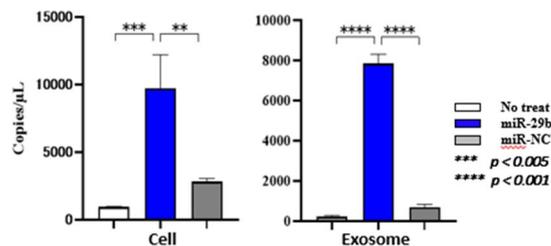


図5 マウス骨髄由来間葉系幹細胞に対する miR-29b 導入

マウス胃癌細胞株 YTN16P を C57BL/6 マウスの腹腔内に投与した3日後からアテロコラーゲンに混和した miR-29b mimic を3日毎に腹腔内へ計4回投与した。がん細胞播種後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。大網は無治療群や陰性対照群では多数の播種結

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ていなかった。また、アテロコラーゲンによる投与方法と異なり、大網だけでなく腸間膜においても、他の2群と比較して著明に播種結節数を抑制した(図6)。

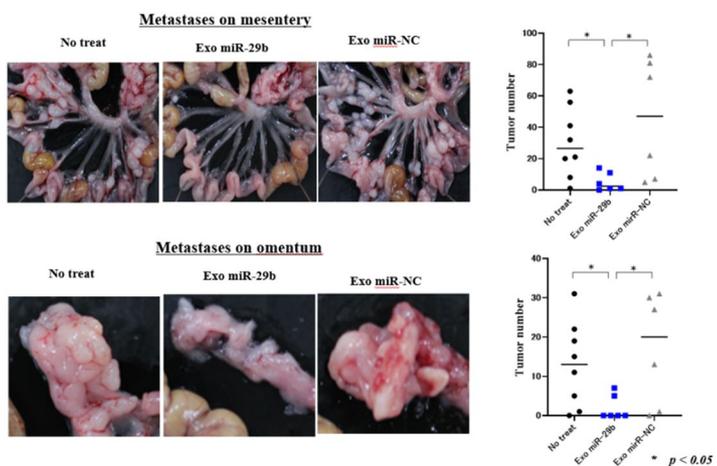


図6 マウス腹膜播種モデルに対する miR-29b 内包エクソソームの投与

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kimura Yuki, Ohzawa Hideyuki, Miyato Hideyo, Kaneko Yuki, Saito Akira, Takahashi Kazuya, Tojo Mineyuki, Yamaguchi Hironori, Kurashina Kentaro, Saito Shin, Hosoya Yoshinori, Lefor Alan Kawarai, Sata Naohiro, Kitayama Joji	4. 巻 12
2. 論文標題 MiR-29b may suppresses peritoneal metastases through inhibition of the mesothelial?mesenchymal transition (MMT) of human peritoneal mesothelial cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-04065-2	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 H. Ohzawa, Y. Kimura, A. Saito, H. Yamaguchi, H. Miyato, Y. Sakuma, H. Horie, Y. Hosoya, A. K. Lefor, N. Sata, J. Kitayama.	4. 巻 27(13)
2. 論文標題 Ratios of miRNAs in Peritoneal Exosomes are Useful Biomarkers to Predict Tumor Response to Intraperitoneal Chemotherapy in Patients with Peritoneal Metastases from Gastric Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol	6. 最初と最後の頁 5057-5064
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-020-09007-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 H. Ohzawa, Y. Kumagai, H. Yamaguchi, H. Miyato, Y. Sakuma, H. Horie, Y. Hosoya, A. Kawarai Lefor, N. Sata, J. Kitayama.	4. 巻 4(1)
2. 論文標題 Exosomal microRNA in peritoneal fluid as a biomarker of peritoneal metastases from gastric cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Gastroenterol Surg	6. 最初と最後の頁 84-93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ags3.12296	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 H. Ohzawa, A. Saito, Y. Kumagai, Y. Kimura, H. Yamaguchi, Y. Hosoya, A. K. Lefor, N. Sata, J. Kitayama.	4. 巻 43(4)
2. 論文標題 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	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncol Rep	6. 最初と最後の頁 1081-1088
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2020.7505	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 S. Saito, H. Yamaguchi, H. Ohzawa, H. Miyato, R. Kanamaru, K. Kurashina, Y. Hosoya, A. K. Lefor, N. Sata, J. Kitayama.	4. 巻 -
2. 論文標題 Intraperitoneal Administration of Paclitaxel Combined with S-1 Plus Oxaliplatin as Induction Therapy for Patients with Advanced Gastric Cancer with Peritoneal Metastases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-020-09388-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kimura Yuki, Ohzawa Hideyuki, Miyato Hideyo, Kaneko Yuki, Kuchimaru Takahiro, Takahashi Rei, Yamaguchi Hironori, Kurashina Kentaro, Saito Shin, Hosoya Yoshinori, Lefor Alan Kawarai, Sata Naohiro, Kitayama Joji	4. 巻 -
2. 論文標題 Intraperitoneal transfer of microRNA 29b containing small extracellular vesicles can suppress peritoneal metastases of gastric cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15793	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 大澤 英之, 金子勇貴, 木村 有希, 齋藤 晶, 山口 博紀, 細谷 好則, 佐田 尚宏, 北山 丈二
2. 発表標題 腹腔内液中エクソソームマイクロRNAを用いた胃癌腹膜播種症例のリキッドバイオプシー
3. 学会等名 第5回Liquid Biopsy研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大澤 英之, 金子 勇貴, 木村 有希, 齋藤 晶, 山口 博紀, 細谷 好則, 佐田 尚宏, 北山 丈二
2. 発表標題 スキルス胃癌腹膜播種治療における腹腔内エクソソーム中マイクロRNAの応用
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村 有希, 大澤 英之, 山口 博紀, 佐久間 康成, 川平 洋, 堀江 久永, 細谷 好則, 味村 俊樹, 北山 丈二, 佐田 尚宏
2. 発表標題 miR-29bは腹膜中皮細胞の中皮間葉転換(MMT)を阻害し腹膜播種の成立を抑制する
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村 有希, 大澤 英之, 金子 勇貴, 風當 ゆりえ, 田村 昂平, 高橋 和也, 齋藤 晶, 東條 峰之, 宮戸 秀世, 佐田 尚宏, 北山 丈二
2. 発表標題 miR-29b may suppress peritoneal metastasis via the effects on peritoneal mesothelial cells.
3. 学会等名 第32回日本消化器癌発生学会総会/第10回国際消化器癌発生会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村 有希, 大澤 英之, 金子 勇希, 風當 ゆりえ, 田村 昂平, 高橋 和也, 齋藤 晶, 東條 峰之, 熊谷 祐子, 宮戸 秀世, 佐田 尚宏, 北山 丈二
2. 発表標題 間葉系幹細胞由来エクソソーム内包miR-29bはヒト由来腹膜中皮細胞の中皮間葉転換を抑制する
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hideyuki Ohzawa, Yuki Kimura, Akira Saito, Hironori Yamaguchi, Yoshinori Hosoya, Naohiro Sata, Joji Kitayama
2. 発表標題 Exosomal miR-29 in peritoneal uid predicted peritoneal recurrence in resected T4 gastric cancer
3. 学会等名 第92回日本胃癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大澤 英之, 金子 勇貴, 木村 有希, 齋藤 晶, 山口 博紀, 細谷 好則, 佐田 尚宏, 北山 丈二
2. 発表標題 腹腔内液中エクソソームマイクロRNAを用いた胃癌腹膜播種症例のリキッドバイオプシー
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大澤 英之, 木村 有希, 齋藤 晶, 山口 博紀, 佐久間 康成, 堀江 久永, 細谷 好則, 佐田 尚宏, 北山 丈二
2. 発表標題 腹腔内液中エクソソームを用いた腹膜播種関連バイオマーカーの探索
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大澤 英之, 木村 有希, 齋藤 晶, 山口 博紀, 佐久間 康成, 堀江 久永, 細谷 好則, 佐田 尚宏, 北山 丈二
2. 発表標題 腹腔内液中エクソソームマイクロRNAを用いた胃癌腹膜播種のバイオマーカー研究
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大澤 英之, 木村 有希, 齋藤 晶, 山口 博紀, 細谷 好則, 佐田 尚宏, 北山 丈二
2. 発表標題 腹腔内液中エクソソームを用いた胃癌腹膜播種症例のリキッドバイオプシー
3. 学会等名 第4回Liquid Biopsy研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大澤 英之, 木村 有希, 齋藤 晶, 山口 博紀, 細谷 好則, 佐田 尚宏, 北山 丈二
2. 発表標題 Exosomal microRNA profiles in peritoneal fluids as a biomarker for peritoneal metastasis of gastric cancer.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村 有希, 大澤 英之, 金子 勇貴, 風當 ゆりえ, 田村 昂平, 高橋 和也, 齋藤 晶, 東條 峰之, 熊谷 祐子, 佐田 尚宏, 北山 丈二
2. 発表標題 miR-29bはヒト由来腹膜中皮細胞の中皮間葉転換を抑制する MiR-29b may suppress peritoneal metastasis via the effects on peritoneal mesothelial cells.
3. 学会等名 第31回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村 有希, 大澤 英之, 齋藤 晶, 高橋 和也, 東條 峰之, 熊谷 祐子, 佐田 尚宏, 北山 丈二
2. 発表標題 Exosomal miR-29b derived from mesenchymal stem cell may suppress peritoneal metastasis via peritoneal mesothelial cells.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤 心, 山口 博紀, 倉科 憲太郎, 春田 英律, 川平 洋, 佐久間 康成, 堀江 久永, 細谷 好則, 佐田 尚宏, 北山 丈二
2. 発表標題 IP-PTX+SOX療法に奏功を認めた腹膜播種陽性胃癌症例に対するconversion surgeryの適応と成績
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shin Saito, Hironori Yamaguchi, Hideyo Miyato, Shiro Matsumoto, Rihito Kanamaru1, Hidenori Haruta, Kentaro Kurashina, Yoshinori Hosoya, Lefor Alan, Naohiro Sata, Joji Kitayama
2. 発表標題 Intraperitoneal paclitaxel treatment combined with SOX for gastric cancer with peritoneal metastasis
3. 学会等名 第92回日本胃癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北山 丈二, 山口 博紀, 大澤 英之, 宮戸 秀世, 木村 有希, 高橋 和也, 金子 勇貴, 風當 ゆりえ, 斎藤 心, 細谷 好則, 佐田 尚宏.
2. 発表標題 胃癌腹膜播種に対する腹腔内局所治療の展望
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuki Kimura, Hideyuki Ohzawa, Yuki Kaneko, Kohei Tamura, Yurie Futoh, Kazuya Takahashi, Akira Saito, Mineyuki Tojo, Hideyo Miyato, Joji Kitayama.
2. 発表標題 Exosomal miR-29b derived from mesenchymal stem cell (MSC) may suppress peritoneal metastasis via the effects on peritoneal mesothelial cells
3. 学会等名 AACR ANNUAL MEETING 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	北山 丈二 (Kitayama Joji) (20251308)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐田 尚宏 (Sata Naohiro) (20261977)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	
研究分担者	鯉沼 広治 (Koinuma Koji) (20382905)	自治医科大学・医学部・准教授 (32202)	
研究分担者	宮戸 秀世 (Miyato Hideyo) (90813163)	自治医科大学・医学部・講師 (32202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関