

氏 名	吉川 勇希
(ふりがな)	(よしかわ ゆうき)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第1182号
学位審査年月日	令和3年1月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Anti-cancer Effects of a Chemically Modified miR-143 on Bladder Cancer by Either Systemic or Intravesical Treatment (膀胱癌に対する、化学修飾された miR-143 の全身 投与または膀胱内投与における抗腫瘍効果)
論文審査委員	(主) 教授 朝日 通雄 教授 高井 真司 教授 樋口 和秀

学位論文内容の要旨

《背景》

膀胱癌は泌尿器悪性腫瘍の中で予後不良であり、年々増加傾向にある。膀胱癌は非筋層浸潤性膀胱癌 (NMIBC) と筋層浸潤性膀胱癌 (MIBC) の大きく 2 種類に分けられる。NMIBC は 5 年膀胱内再発率が 50-90% と非常に高く、さらにそのうちの 20% は再発時に MIBC へと進行する。MIBC の標準治療は手術療法であるが、5 年生存率は 60% と決して高くない。転移性膀胱癌の標準治療は白金製剤中心の化学療法を行うが薬剤耐性獲得や再発などの問題が多く、新規治療が必要な泌尿器悪性腫瘍である。

我々は癌特異的エネルギー代謝経路 Warburg 効果が microRNA により制御されている

事実を明らかにした。microRNA-143 (miR-143) は癌遺伝子である *RAS* を標的とする事が判明している。miR-143 を化学修飾した核酸医薬を導入する事で癌増殖抑制を示すという仮説を元の実験を施行した。

《目 的》

核酸医薬の抗腫瘍効果に着目し、miR-143 が膀胱癌の新規治療となる可能性を証明する。

《方 法》

1. 臨床症例から採取した正常膀胱組織および膀胱癌組織を 20 症例、40 検体とヒト正常尿路上皮細胞 (HUC) およびヒト膀胱癌細胞株 (253J-BV) を用いて miR-143 の発現量を RT-PCR 法で、蛋白発現量をウェスタンブロット法で確認した。
2. フルオロウラシルやメトキシ基の化学修飾を施し、化学的に安定させ RNA 分解酵素に耐性を獲得した miR-143 (miR-143 #1 / #12) を作成し実験に使用した。
3. miR-143 #1 / #12 を導入し、細胞増殖能、*RAS* 経路に関連する蛋白質 (*SOS1*、*PI3K/Akt* 経路、*Raf/MAPK/Erk* 経路) の発現量を確認した。miR-143 の拮抗薬を導入し miR-143 の効果を検討した。
4. 4 週齢のヌードマウス (BALB / cSLC nu / nu) の背部に 253J-BV を皮下移植し、対照群と治療群 4 群に対して薬剤を血管内投与し、治療効果を比較検討した。ドラッグデリバリーシステム (DDS) として Lipofectamine と重合ポリマーである uPIC を使用した。
5. 4 週齢のヌードマウス (BALB / cSLC nu / nu) の膀胱内に 253J-BV を粘膜下移植し、4 週間後に腫瘍が生着しているのを確認した後、対照群と治療群に対して薬剤を膀胱内投与し、治療効果・生存期間を比較検討した。治療群は miR-143 #12 と DDS として uPIC を使用した。

《結 果》

1. 膀胱癌組織は正常膀胱組織と比較して miR-143 の発現の低下を認めた。また、253J-BV

は HUC と比較して miR-143 の発現の低下を認めた。

2. miR-143 投与群では 253J-BV の細胞増殖が抑制され、特に miR-143 #12 投与群において高い腫瘍増殖抑制効果を認めた。
3. *RAS* を含む、*PI3K/Akt* 経路、*Raf/MAPK/Erk* 経路に関連する蛋白質の発現の有意な低下を認めた。miR-143 #1 / #12 投与群では *RAS* のリン酸化を制御している *SOS1* の発現を抑制し、*RAS* 遺伝子と *SOS1* を介した *RAS* の活性化を抑制する事が示唆された。拮抗薬実験において、miR-143 の拮抗薬投与群では非使用群と比較して対照群と同等に細胞増殖能、蛋白質の発現の回復を認めた。
4. 対照群と比較して治療群 (4 群) では腫瘍増殖抑制を確認した。特に抗腫瘍効果が高かったのは miR-143 #12 (DDS として uPIC を使用) であり、腫瘍内の miR-143 濃度が高値である事を示した。
5. 治療群で腫瘍増大の抑制が認められた。また、治療群では生存率の有意な延長を認めた。治療における他臓器への有害事象は認められなかった。

《考 察》

本研究では、253J-BV における全身または膀胱内投与による実験結果から膀胱癌細胞増殖に対する miR-143 #12 の強力な抗癌活性を示した。また、miR-143 は、*RAS* 経路の上流に位置し、*RAS* のリン酸化を制御する *SOS1* を抑制する事で *RAS* 発現ネットワークを抑制する事を報告した。

253J-BV では、発癌性に関係する *H-RAS* と *K-RAS* はどちらも過剰発現している。miR-143 は *K-RAS* を直接抑制し、また、*RAS* 発現ネットワークの正の回路を破綻させた。

EGFR や *FGFR* などの *RTK* 変異は、下流で *RAS* の過剰発現を誘発すると推測される。化学修飾を施した miR-143 は *Akt* と *Erk* も抑制し、成長と生存に関連する転写因子を不活性化させ、*RAS* 経路を含む *RAS* 発現ネットワークを抑制し、アポトーシスと共に細胞増殖を阻害する可能性がある。

同所移植膀胱癌モデルに対する膀胱内注入による miR-143 の効果に焦点を当て、結果、

有意な効果が得られた。以前、我々は膀胱内注入による miR-145 の有効性を報告した。本研究では、miR-143 を新規 DDS である uPIC に搭載して膀胱内に注入する事で膀胱癌に対して強力な抗腫瘍活性を示した。腫瘍および血液サンプル中の miR-143 発現量、および腫瘍サンプルのウェスタンブロット法によって推定された抗腫瘍活性の観点から腫瘍抑制効果は明らかである。興味深い事に、我々の結果は、miR-143 の発現レベルは脳でも高度である事を示唆した。従って、miR-143 / uPIC は、移植腫瘍の毛細血管に取り込まれた後、血液脳関門を通過する能力を獲得する可能性がある。miR-143 の ADMET（吸収、分布、代謝、排泄、および毒性）を認定するには、さらなる検証が必要と考えられる。

《結 論》

化学修飾を施した miR-143 は、*SOS1/RAS*、*Raf/MAPK/Erk*、および *PI3K/Akt* 経路を含む *RAS* ネットワークを全体的に抑制する事が明らかになった。*In vivo* で認めた全身投与および膀胱内投与の治療効果を確認した事で、化学修飾を施した miR-143 を使用する核酸医薬は *RAS* 発現型の膀胱癌を治療するための新しい戦略となる可能性がある。

(様式 甲 6)

論文審査結果の要旨

本研究では新規の化学修飾を施した miR-143 (miR143 #12) を開発し、それを用いて膀胱癌 (BC) の病因に対する miR-143 の寄与を調べた。

申請者は臨床検体とヒト膀胱癌細胞株を使用して miR-143 の発現を確認した。臨床検体における正常膀胱組織と膀胱癌組織を比較し、癌組織において miR-143 が著明に低下している事を確認した。また、細胞株の実験においてヒト正常膀胱細胞とヒト膀胱癌細胞株を比較し、膀胱癌細胞株において miR-143 が著明に低下している事を確認した。また、膀胱癌細胞株に miR-143 を導入し、細胞増殖を抑制する事を確認した。miR-143 は既存のものと化学修飾を施した数種類を使用し、比較検討を行った。化学修飾を施した miR-143 の方が既存のものよりも治療効果が高いという事実を明らかにした。

miR-143 は *RAS* 遺伝子を制御する *SOS1* 遺伝子、また *PI3K/Akt* 経路、*Raf/MAPK/Erk* 経路を抑制する事で膀胱癌に対する増殖抑制効果を発揮するという事実を証明した。

In vitro のみならず、*In vivo* においても異所移植膀胱癌モデルと同所移植膀胱癌モデルの 2 種類の実験系において、化学修飾を施した miR-143 の高い抗腫瘍効果を示した。

これらの事実は miR-143 を使用した核酸医薬は *RAS* 発現型の膀胱癌を治療するための新しい戦略となる可能性があり、重要な知見と考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Molecular Therapy: Methods & Clinical Development

13:290-302, 2019 Jun

doi: 10.1016/j.omtm.2019.02.005. eCollection 2019 Jun 14