

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	腫瘍制御科学領域婦人科腫瘍学教育研究分野 氏名 海老名 杏奈
(論文題目) <b>Carbonyl reductase 1-overexpressing exosomes inhibit proliferation of ovarian cancer cells</b> (カルボニル還元酵素 1 過剰発現エクソソームは卵巣癌細胞の増殖を抑制する)	
<b>【緒言】</b> Carbonyl reductase 1 (CBR1) は、NADPH 依存性のカルボニル還元酵素の一つである。我々は、CBR1 が高発現している卵巣癌細胞から腫瘍が十分に増殖せず、逆に卵巣癌細胞内の CBR1 の発現を低下させると腫瘍の発生が促進され、他の臓器への転移の頻度が増加することを報告してきた。本研究では、ドラッグデリバリーシステム (DDS) としてエクソソームに着目した。CBR1 を過剰発現するエクソソームを作製し、エクソソームを用いて卵巣癌細胞内に CBR1 DNA を送達するための最適な条件を決定すること、エクソソームで運ばれた CBR1 の発現程度による細胞増殖の違いを調べることを目的とした。	
<b>【方法】</b> 本研究には、線維芽細胞株である不死化ヒト子宮内膜間質細胞 (THESCs) を使用した。 <ol style="list-style-type: none"> <li>1) リポフェクション法で THESCs に CBR1 DNA を導入した。GFP タグ付きの DNA を用いて、DNA の導入状況を蛍光顕微鏡で確認した。Lipofectamin/DNA 比を Lipofectamin12~36<math>\mu</math>l、DNA12~48<math>\mu</math>g に設定し効率的な条件の検討を行った。さらにウエスタンブロット法で CBR1 DNA を導入した細胞での CBR1 の発現レベルを Lipofectamin/DNA 比と導入からの経過時間で比較した。</li> <li>2) CBR1 DNA をトランスフェクションした細胞の培養上清から exoEasy Maxi Kit を用いてエクソソームを精製した。精製したエクソソームはウエスタンブロット法でエクソソームの膜タンパクである CD63 の発現程度を確認した。CBR1 DNA 導入細胞、CBR1 si RNA 導入細胞、遺伝子導入を行わなかった細胞 (コントロール) の上清から精製したエクソソームの CBR1 の発現の差を確認した。</li> <li>3) 卵巣癌細胞株 TOV-21G(ヒト卵巣明細胞癌から樹立)、SK-OV-3(ヒト卵巣漿液性癌から樹立)に CBR1 DNA 導入細胞、CBR1 si RNA 導入細胞、コントロール細胞から精製したエクソソームを添加し、細胞増殖を比較した。</li> </ol>	
<b>【結果】</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) CBR1 DNA 導入から 48 時間後まで CBR1 DNA の取り込みが増加し、種々の Lipofectamin/DNA 比の中で Lipofectamin24<math>\mu</math>l/DNA 36<math>\mu</math>g で最も良好だった。ウエスタンブロット法により、CBR1 DNA を導入した細胞でコントロール細胞よりも CBR1 の発現が増強している事を確認した。</li> <li>2) CBR1 DNA 導入細胞、CBR1 si RNA 導入細胞、コントロール細胞からの培養上清精製検体で CD63 の発現を認めたため、エクソソームが精製されたことを確認できた。さらに、CBR1 DNA 導入細胞から精製したエクソソームで、他の 2 種類と比較して、CBR1 の発現が増強していることを確認した。</li> <li>3) CBR1 DNA 導入細胞から精製したエクソソームを添加した卵巣癌細胞株の増殖は、CBR1 発現を減少させたエクソソームを添加した細胞の増殖に比べて有意に抑制された。</li> </ol>	
<b>【考察】</b>	

CBR1 が卵巣癌の増殖、転移に関与することは、当教室の先行研究で示されている。DNA の導入は、トランスフェクション試薬の使用、エレクトロポレーション法、ウイルスベクターの細胞内への導入などの方法があるが、これらの技術は臨床での使用は困難である。我々は DDS として CBR1 DNA-デンドリマー複合体を卵巣癌の腹膜播種マウスに腹腔内に投与することで、生存期間が有意に長くなることを示したもののデンドリマーの人体への投与の安全性は未知である。

本研究は新たな DDS として生体内から精製可能なエクソソームに着目した。最近の研究でエクソソームは mRNA と microRNA (miRNA) の両方を含んでいることがわかっている。また、別の細胞に移行して新しい環境で機能することができ、分泌細胞の状態によってエクソソームの機能が変化することが示されている。エクソソームは循環中で安定であり、免疫拒絶反応を起こさないことから、DDS として治療への応用が期待されている。ナノテクノロジーの進歩により、化学療法薬、低分子、miRNA、siRNA などの治療薬をエクソソームにカプセル化することが可能となった。卵巣癌では、脂肪間葉系幹細胞由来のエクソソームが、細胞周期を阻害し、ミトコンドリアを介したアポトーシスシグナルを活性化することで、A2780 ヒト卵巣癌細胞の細胞増殖を抑制しており、この抑制経路におけるエクソソームの miRNA の重要性が示唆されている。今回の研究では、エクソソームが CBR1 DNA を卵巣癌細胞内に運ぶ可能性が示され、エクソソームと CBR1 DNA を組み合わせた遺伝子治療が癌性腹膜炎を伴う進行卵巣癌に対して臨床的に応用される可能性が示唆された。

#### 【結論】

今回の in vitro 実験では、CBR1 を過剰発現させたエクソソームを作成し、その投与により卵巣癌細胞の増殖を抑制することに成功した。この結果は、エクソソームが遺伝子導入の有用なツールであることを示唆しており、CBR1 DNA とエクソソームを組み合わせた遺伝子治療が進行・再発卵巣癌の治療戦略として有望であることを示唆している。