

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年7月4日(04.07.2024)



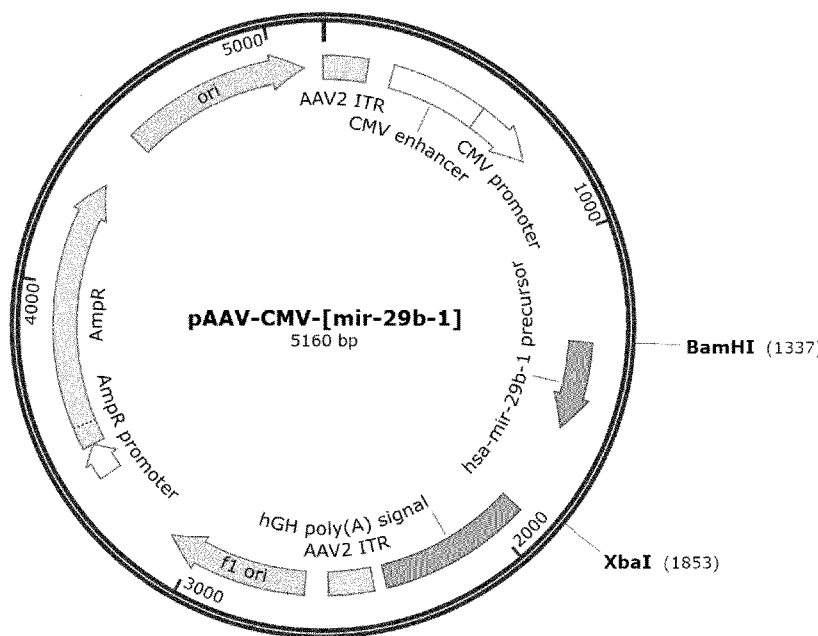
(10) 国際公開番号

WO 2024/142962 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 35/76 (2015.01) A61P 35/04 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) C12N 15/864 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2023/044802
- (22) 国際出願日: 2023年12月14日(14.12.2023)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2022-211068 2022年12月28日(28.12.2022) JP
- (71) 出願人: 学校法人自治医科大学 (JICHI MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1020093 東京都千代田区平河町二丁目6番3号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 大澤 英之 (OZAWA, Hideyuki); 〒3290498 栃木県下野市薬師寺3311-1 学校法人自治医科大学内 Tochigi (JP).
北山 丈二 (KITAYAMA, Joji); 〒3290498 栃木県下野市薬師寺3311-1 学校法人自治医科大学内 Tochigi (JP).
- (74) 代理人: 堀 城之, 外 (HORI, Shiroyuki et al.); 〒1050002 東京都港区愛宕1-6-7 愛宕山弁護士ビル8階806号 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY,

(54) Title: PERITONEAL SEEDING INHIBITOR, METHOD FOR INHIBITING PERIOTNEAL SEEDING, METHOD FOR PREVENTING PERITONEAL SEEDING, AND METHOD FOR TREATING PERITONEAL SEEDING

(54) 発明の名称: 腹膜播種抑制剤、腹膜播種抑制方法、腹膜播種予防方法、及び腹膜播種治療方法



(57) Abstract: Provided is a peritoneal seeding inhibitor that efficiently inhibits peritoneal seeding. The peritoneal seeding inhibitor comprises an adeno-associated virus vector loaded with miR-29b. The serotype of this adeno-associated virus vector includes at least one type selected from AAV1, AAV2, AAV4, and AAV-DJ. More specifically, the serotype of the adeno-associated virus vector is AAV1, AAV2, AAV5, or AAV-DJ in humans (*Homo sapiens*), and is AAV1, AAV2, AAV5, AAV9, or AAV-DJ in mice (*Mus musculus*). Through this peritoneal seeding inhibitor, miR-29b is expressed in cells constituting the peritoneal cavity, and peritoneal seeding is treated or prevented.



WO 2024/142962 A1

MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
 - 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))
-

(57) 要約：腹膜播種を効率よく抑制する腹膜播種抑制剤を提供する。腹膜播種抑制剤は、m i R-29 b 搭載のアデノ随伴ウイルスベクターを含む。このアデノ随伴ウイルスベクターの血清型は、AAV 1、AAV 2、AAV 4、及びAAV-D J からなる群の一種を含む。より具体的にいうと、アデノ随伴ウイルスベクターの血清型は、ヒト (H o m o s a p i e n s) では、AAV 1、AAV 2、AAV 5、又はAAV-D J であり、マウス (M u s m u s c u l u s) では、AAV 1、AAV 2、AAV 5、AAV 9、又はAAV-D J である。この腹膜播種抑制剤により、腹腔内を構成する細胞にm i R-29 b を発現させ、腹膜播種を治療又は予防する。

明 細 書

発明の名称：

腹膜播種抑制剤、腹膜播種抑制方法、腹膜播種予防方法、及び腹膜播種治療方法

技術分野

[0001] 本発明は、特に腹膜播種抑制剤、腹膜播種抑制方法、腹膜播種予防方法、及び腹膜播種治療方法に関する。

背景技術

[0002] 腹膜播種 (Peritoneal dissemination) は、胃癌、膵癌、大腸癌、子宮癌、卵巣癌等の腹腔内に発生する癌 (悪性腫瘍) において、頻度の高い転移、再発形式である。腹膜播種は、腹腔内に小さな結節を無数に作り、腹水の貯留や消化管閉塞をきたし、予後不良となり得る深刻な病態である。しかしながら、従来、腹膜播種において有効な治療法はなく、腹膜播種を標的とした特別な治療方法は存在していなかった。また、肉眼的に根治手術が施行できても、手術後数ヶ月後に、腹膜播種が出現するケースも多くみられていた。このため、腹膜播種を伴う癌では、抗癌剤や分子標的薬の経静脈投与による全身への化学療法が標準治療として行われていた。しかしながら、これらの薬剤は、血中から腹腔内への移行が少なく、十分な治療効果が得られないことが多かった。このため、より効果的な治療法が求められていた。

[0003] ここで、特許文献1を参照すると、従来、癌の治療に有効な弱毒化単純ヘルペスウイルス及びこれを含有する癌治療用組成物であり、外来性の自殺遺伝子が組み込まれている弱毒化単純ヘルペスウイルスが記載されている。

このウイルスは、腹膜播種を伴う癌そのものを攻撃するもので、腹膜播種自体を防ぐことはできなかった。

[0004] このように、従来、腹膜播種を確実に制御する方法が存在しなかったため、腹膜播種再発を効率よく予防する方法を確立することが、消化器等の腹膜

播種を生じる癌患者の予後を改善する上で最も重要な課題と考えられていた。

[0005] ここで、非特許文献1を参照すると、胃癌の腹膜播種症例の腹腔内で低下しているマイクロRNAであるmiR-29bの働きを検討したことが記載されている。

非特許文献1によれば、miR-29bのRNAそのものである「miR-29bミミック」が、ヒト腹膜中皮細胞 (Human peritoneal mesothelial cell、HPMC) にリポフェクションによってトランスフェクトされ、影響が*in vitro*で評価された。トランスフォーミング増殖因子 β (Transforming Growth Factor- β 、以下「TGF- β 」という。) で刺激したヒト腹膜中皮細胞 (Human peritoneal mesothelial cell、HPMC) に対してmiR-29bを作用させると、増殖が抑制され、遊走能及び腹膜中皮細胞に対する癌細胞の接着能が著明に低下した。これにより、miR-29bは、TGF- β で誘導される中皮間葉転換 (Mesothelial-mesenchymal transition、以下「MMT」) を抑制した。これにより、腹膜播種を抑えることができるかと期待された。そこで、miR-29bミミックをアテロコラーゲンと複合体を形成させてマウス腹膜播種モデルに投与したところ、大網上の腹膜播種を抑制したものの、腸間膜上の腹膜播種は抑制できなかった。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開2002-218975号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Kimura Y, Ohzawa H, Miyato H他、
「MiR-29b may suppresses peritoneal metastases through inhibition of the mesothelial-mesenchymal transi

tion (MMT) of human peritoneal mesothelial cells」、Scientific Reports、2022年、12(1):205

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] しかしながら、非特許文献1の技術（以下、「従来技術」という。）では、miR-29bを用いて、実際に、生体内で、治療剤として用いられる程度に十分な腹膜播種の抑制を行うことができなかった。

よって、miR-29bを効率よく腹膜中皮細胞に導入し、腹膜播種を抑制する腹膜播種抑制剤が求められていた。

[0009] 本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、上述の問題を解消することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明の腹膜播種抑制剤は、miR-29b搭載のアデノ随伴ウイルスベクターを含むことを特徴とする。

本発明の腹膜播種抑制方法は、miR-29b搭載のアデノ随伴ウイルスベクターにより、腹腔内を構成する細胞にmiR-29bを発現させることを特徴とする。

本発明の腹膜播種予防方法は、miR-29b搭載のアデノ随伴ウイルスベクターにより、腹腔内を構成する細胞にmiR-29bを発現させることを特徴とする。

本発明の腹膜播種治療方法は、ヒト以外の動物の腹膜播種治療方法であって、miR-29b搭載のアデノ随伴ウイルスベクターにより、腹腔内を構成する細胞にmiR-29bを発現させることを特徴とする。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、miR-29b搭載のアデノ随伴ウイルスベクターを含むことで、従来より効果的に、miR-29bを腹膜中皮細胞等に効率よく

導入し、腹膜播種を抑制する腹膜播種抑制剤を提供することができる。

図面の簡単な説明

- [0012] [図1A]本発明の実施例1に係るベクターの構造を示す概念図である。
- [図1B]本発明の実施例1に係るベクターの構造を示す概念図である。
- [図2]本発明の実施例1に係る培養されたヒト腹膜中皮細胞を示す写真である。
- [図3A]本発明の実施例1に係るヒト腹膜中皮細胞に対する血清型選択実験の結果を示す概念図である。
- [図3B]本発明の実施例1に係るヒト腹膜中皮細胞に対する血清型選択実験の結果を示す写真である。
- [図3C]本発明の実施例1に係るヒト腹膜中皮細胞に対する血清型選択実験の結果を示すグラフである。
- [図4A]本発明の実施例1に係るマウス腹膜中皮細胞に対する血清型選択実験の結果を示す概念図である。
- [図4B]本発明の実施例1に係るマウス腹膜中皮細胞に対する血清型選択実験の結果を示す写真である。
- [図4C]本発明の実施例1に係るマウス腹膜中皮細胞に対する血清型選択実験の結果を示すグラフである。
- [図5]本発明の実施例1に係る腹膜中皮細胞のTGF- β による中皮間葉転換の抑制実験の結果を示す写真である。
- [図6A]本発明の実施例1に係るマウス腹膜へのAAV導入実験の結果の概念図である。
- [図6B]本発明の実施例1に係るマウス腹膜へのAAV導入実験の結果の写真である。
- [図6C]本発明の実施例1に係るマウス腹膜へのAAV導入実験の結果のグラフである。
- [図7]本発明の実施例1に係る腹膜播種抑制実験（癌細胞播種後3日目で投与）の概念図である。

[図8A]本発明の実施例1に係る腹膜播種抑制実験（癌細胞播種後3日目で投与）の結果を示す写真である。

[図8B]本発明の実施例1に係る腹膜播種抑制実験（癌細胞播種後3日目で投与）の結果を示すグラフである。

[図9]本発明の実施例1に係る腹膜播種抑制実験（癌細胞播種と同時に投与）の概念図である。

[図10A]本発明の実施例1に係る腹膜播種抑制実験（癌細胞播種と同時に投与）の結果の結果を示す写真である。

[図10B]本発明の実施例1に係る腹膜播種抑制実験（癌細胞播種と同時に投与）の結果の結果を示すグラフである。

[図11A]本発明の実施例1に係るAAV-DJ-miR-29bによるマウス腹膜の変化を示す写真である。

[図11B]本発明の実施例1に係るAAV-DJ-miR-29bによるマウス腹膜の変化を示すグラフである。

[図12A]本発明の実施例2に係る膵癌に対する腹膜播種抑制実験の概念図である。

[図12B]本発明の実施例2に係る膵癌に対する腹膜播種抑制実験の結果を示す写真である。

[図12C]本発明の実施例2に係る膵癌に対する腹膜播種抑制実験の結果を示すグラフである。

[図12D]本発明の実施例2に係る膵癌に対する腹膜播種抑制実験のマウス腹膜の変化を示す写真である。

[図12E]本発明の実施例2に係る膵癌に対する腹膜播種抑制実験のマウス腹膜の変化を示すグラフである。

[図13A]本発明の実施例2に係る抗癌剤との併用による腹膜播種抑制実験の概念図である。

[図13B]本発明の実施例2に係る抗癌剤との併用による腹膜播種抑制実験の結果を示す写真である。

[図13C]本発明の実施例2に係る抗癌剤との併用による腹膜播種抑制実験の結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0013] <実施の形態>

癌、特に胃癌の転移形式には、血行性、リンパ行性、播種性がある。胃の内腔の粘膜面から発生した胃癌は、深部に浸潤して漿膜側（＝外側）に露出すると腹腔内に癌細胞が散布され腹膜上に腹膜播種を形成すると言われている。

腹膜播種は、癌性腹水や腸閉塞を発症しやすい病態であるため、十分な治療効果が得られないことがあり、臨床上的大きな問題点であった。また、進行癌では根治手術後に術後補助的な化学療法が行われるが、腹膜播種再発を来すこともあった。しかしながら、腹膜播種再発の高危険群において腹膜播種を予防するための治療が存在しないことも問題点であった。

[0014] これに対して、本発明者らは、腹膜播種のある胃癌患者の腹水と、腹膜播種のない早期胃癌の患者の腹腔内洗浄液内のエクソソームmiRNAを網羅的に解析し、腹膜播種のある胃癌患者では、miR-29が有意に低下していることを発見した。

本発明者らは、深達度が漿膜に達する（T4）胃癌の患者で、腹膜播種のある症例ではmiR-29bの発現が有意に低下することを見いだした。そして、miR-29bは、癌抑制的に働く「Tumor-suppressor miRNA」であることを確認した。このため、本発明者らは、miR-29bを腹腔内で様々な細胞に対して作用させることが、腹膜播種の新たな治療となるのではないかと着想し、鋭意実験を進めた。

[0015] そして、本発明者らは、様々な細胞についてmiR-29bの発現をデジタルPCR法で調べたところ、ヒト腹膜中皮細胞（HPMC）で発現が高いことがわかった。HPMCをTGF- β で処理するとmiR-29b発現が低下することから、腹腔内でのmiR-29b低下は腹膜中皮細胞での発現低下によるものではないかと考えられた。

[0016] そこで、本発明者らは、腹腔内にmiR-29bを補充するという治療戦略を着想した。この上で、miR-29bでの実験を進めていくにあたり、腹膜中皮が間葉系の形質へと転換し癌の進展に促進的に働く中皮間葉転換（MMT）に着目して作用機序を調べた。発現が低下しているmiR-29bは、腹膜の表面にある腹膜中皮細胞で発現が高く、癌細胞による刺激で発現が低下した。また癌細胞や免疫細胞での発現は低かった。

[0017] このため、非特許文献1に記載したように、TGF- β で刺激した腹膜中皮に対して、RNAそのものであるmiR-29bミミックをリポフェクションして、miR-29bを増強させた。すると、HPMCの増殖が抑制され、遊走能及び腹膜中皮細胞に対する癌細胞の接着能が著明に低下した。さらに、miR-29bはTGF- β で誘導される中皮間葉転換（MMT）を抑制していた。

[0018] このため、本発明者らは、更なる実験を進め、同種腫瘍移植モデルを用いたmiR-29bの局所投与実験としてmiR-29bをアテロコラーゲンと混合し、3日おきにマウスの腹腔内に注射して大網上及び腸間膜上の腹膜播種結節数をカウントし評価した。ここで、マウスの腹膜播種の実験は、腸間膜上の腹膜播種結節数で評価されることが多いものの、この実験においては、腸間膜上の腹膜播種結節数は変化がなかった。一方で、マウスの大網上の腹膜播種結節数は、有意に低下していた。

しかしながら、残念なことに、miR-29bミミックでは、中皮間葉転換（MMT）の効果を持続させ、腹膜播種の治療剤として用いることができる程度の効果が得られなかった。

[0019] このことから、本発明者らは、miR-29bを効率良く腹腔内に送達することが必用であると考え、更なる実験を進めた。このなかで、腹腔内を構成する腹膜中皮細胞にアデノ随伴ウイルスベクターを用いてmiR-29bを送達させることを着想した。

そして、本発明者らは、miR-29b搭載のアデノ随伴ウイルスベクターを実際に作製して、鋭意実験を繰り返した。具体的には、腹腔表面を覆う

腹膜中皮細胞に対して指向性を持つアデノ随伴ウイルスの血清型を選択し、腹膜播種患者の腹腔内で発現が低下しているmiR-29bの前駆体配列を挿入し、後述する実施例1、2に記載したような、miR-29b搭載のアデノ随伴ウイルスベクター「AAV-miR-29b」を作製した。このAAV-miR-29bを、マウス胃癌細胞株YTN16Pを用いたマウス腹膜播種モデルの腹腔内に投与した。すると、対照群と比べて腸間膜上の腹膜播種結節が有意に減少し、腹膜播種の進展抑制効果が見られた。また、癌細胞株とAAV-miR-29bの同時投与においても、腹膜播種結節数は有意に少なくなり、予防的効果もあった。

[0020] 結果として、実際に腹膜播種の成立及び進展を抑制し、腹膜播種を抑制することができることを明らかとし、遂に本発明を完成させるに至った。

従来、癌に対する遺伝子治療の殆どは癌細胞を標的として開発されてきたが、本発明は、宿主の腹腔環境におけるmiR-29bの量的変化を修正し、腹膜播種を制御することができる。すなわち、宿主側の腹腔内を構成する細胞に、アデノ随伴ウイルスベクターを用いてmiR-29bを発現させることで、腹膜播種の治療及び予防を行うことができる。これにより、本発明により、難治性の病態である癌腹膜播種を標的とした有用な治療剤、治療方法を提供することができる。

以下、より具体的に本発明の実施の形態について説明する。

[0021] 〔腹膜播種抑制剤〕

具体的には、本実施形態に係る腹膜播種抑制剤は、miR-29b搭載のアデノ随伴ウイルスベクターを含むことを特徴とする。

[0022] ここで、マイクロRNA (microRNA、以下「miRNA」、「miR」ともいう。) は、ゲノム上にコードされた、機能性のncRNA (non-coding RNA、ノンコーディングRNA、非コードRNA) の一種であり、多段階的な生成過程を経て、20~25塩基 (nt) 長程度の一本鎖RNA分子となるものである。マイクロRNAは、真核生物において遺伝子の転写後の発現調節等に関与している。

本実施形態においては、このマイクロRNAとして、癌抑制的に働き、腹膜播種患者の腹腔内で発現が低下しているmiR-29bの前駆体配列をベクターに導入する。本実施形態において用いられるヒト及びマウスで共通のmiR-29b（マイクロRNAに転写された状態）の配列の一例を、配列表の配列番号1に示す。

[0023] しかしながら、本実施形態に係るmiR-29bは、必ずしも配列番号1に示したようなmiR-29bのDNAによる前駆体配列でなくてもよく、ゲノム上のmiRNA遺伝子と同様の配列、pre-miRNA、mature（成熟）-miRNAに準じた配列等であってもよく、その他の細胞内の処理により活性化されてmiR-29bが最終的に合成されるような配列等であってもよい。

さらに、miR-29bを修飾したり、中皮間葉転換（MMT）の抑制効果を高めたりして修正された配列であってもよい。さらに、このmiR-29bの配列は、ヒトやマウス以外の動物種の配列、動物種に合わせて修正された配列等であってもよく、AAVに搭載されるコピー数やエンハンサー配列等も任意であってもよい。加えて、本実施形態に係るmiR-29bは、配列上に、他の遺伝子、例えば、他の癌抑制型miRNA（Tumor Suppressor miRNA）を含んでいてもよい。このような癌抑制効果のある他のmiRNAは、例えば、miR-34等であってもよい。

[0024] 一方、アデノ随伴ウイルス（Adeno-associated virus、以下「AAV」ともいう。）は、ヒトや霊長目の動物に感染するパルボウイルス科ディペンドウイルス属で、ヘルパーウイルスに依存する、エンベロープを持たない小型（20nm程度）のウイルスである。

本実施形態においては、このAAVにmiR-29bを搭載させる。AAVは、毒性が低く、免疫原性が低く、期間発現を持続させることが可能であるという特徴をもつ。さらに、AAVは、実際に、いくつか臨床応用されている手法であり安全性が高いため、実際に臨床応用する上でmiR-29bを搭載しても安全性を高められる。なお、本実施形態においては、上述した

ように、miR-29b搭載のAAVを、「AAV-miR-29b」ともいう。

[0025] ここで、上述の非特許文献1のmiR-29bミミックのアテロコラーゲンと複合体を形成させた投与に比べて、本実施形態に係るAAV-miR-29bを利用した送達法を用いる腹膜播種抑制剤は、後述する実施例1、2に示すように、マウス腹膜播種モデルを用いた*in vivo*実験においても腹膜播種抑制効果が当業者に予測できない程度に極めて高く、従来技術に対して顕著な効果を示す。

[0026] また、本実施形態に係る腹膜播種抑制剤において、AAVの血清型は、AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV9、及びAAV-DJからなる群の一種を含むことを特徴とする。

特に、本実施形態に係るAAVの血清型として、ヒト (*Homo sapiens*) では、後述する実施例1、2で腹腔表面を覆う腹膜中皮細胞に対して指向性を持つアデノ随伴ウイルスの血清型を選択した結果を示すように、特にAAV2が好適である。すなわち、AAV2が、最も腹膜中皮細胞に対して最も指向性が高い。加えて、特に、AAV2は、当業者において、癌細胞自体に対する障害性も見いだされている。このため相乗的な効果が期待でき、このAAV2型のベクターを用いることが特に好適である。

一方、マウス (*Mus musculus*) では、AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV9、又はAAV-DJが好適である。このうち、特に、マウスでは、AAV-DJが好適である。

以下、AAV-miR-29bのうち、各血清型のAAVに搭載されたものを区別して示す場合、AAV2-miR-29b、AAV-DJ-miR-29b等として記載する。

[0027] より詳細について具体的に説明すると、本実施形態に係る腹膜播種抑制剤は、腹腔内を構成する細胞にmiR-29bを発現させ、腹膜播種を治療又は予防することを特徴とする。すなわち、AAVを用いてmiR-29bを、腹腔内を構成する細胞に送達させて発現させることにより、腹膜播種の成

立及び進展を抑制又は予防することが可能である。

[0028] 本実施形態に係る腹膜播種抑制剤が対象とする腹腔内を構成する細胞は、例えば、腹腔、胸腔、心嚢等の体腔表面を覆う膜様組織を構成する各種細胞であってもよい。このうち、本実施形態においては、特に、腹腔内を構成する細胞として、腹膜の中皮 (mesothelium) を構成する腹膜中皮細胞を主な対象細胞として説明するものの、それ以外の細胞であってもよい。すなわち、本実施形態に係る腹腔内を構成する細胞は、他のmiR-29bが減少すると繊維化され、癌細胞が転移されやすくなるような膜様組織を構成する各種細胞であってもよい（以下、これらの細胞を「腹膜中皮細胞等」という。）。

[0029] さらに、本実施形態に係る腹膜播種抑制剤においては、腹腔内を構成する細胞の中皮間葉転換 (MMT) を抑制し、腹膜の線維化を抑制することを特徴とする。すなわち、本実施形態の腹膜播種抑制剤は、癌細胞の刺激や炎症物質等により、腹膜中皮細胞等に中皮間葉転換 (MMT) が生じるのを抑制する。これによって、腹膜中皮細胞等の遊走能を有意に抑制し、腹膜全体の腹膜の線維化を抑制する。

このため、本実施形態に係る腹膜播種抑制剤により、腹膜中皮細胞等に対する癌細胞の接着能を低下させ、腹膜播種を治療又は予防することができる。

[0030] また、本発明の実施の形態に係る腹膜播種抑制剤が対象とする癌は、胃癌、膵癌、大腸癌、子宮癌、卵巣癌等の腹腔に発生する癌を含む。

なお、本発明の実施の形態に係る腹膜播種抑制剤は、他の腹膜播種を生じる可能性がある癌に適用することも可能である。たとえば、本実施形態の治療剤は、頭頸部癌、食道癌、肝臓癌、胆嚢癌、肺癌、腎癌、精巣癌、乳癌、前立腺癌、膀胱癌、皮膚癌、甲状腺癌、悪性リンパ腫、他の肉腫等の各種癌による腹膜播種に適用することも可能である。すなわち、本実施形態に係る腹膜播種抑制剤により、これらの腹膜播種の浸潤や転移による腹膜播種の発生を抑制することも可能である。

[0031] この治療又は予防のため、本実施形態に係る腹膜播種抑制剤は、腫瘍に対する手術と同時又は後に投与されることが好適である。

本実施形態に係る腹膜播種抑制剤は、後述する実施例1で示すように、癌細胞播種後3日目に投与しても、癌細胞播種と同時に投与しても、腹膜播種結節数を抑制することができる。加えて、後述する実施例2で示すように、既に腹膜播種が発生している状態でも、腹腔内に抗癌剤と同時投与することで、腹膜播種結節数を抑制することができる。

[0032] このため、腹膜播種形成のごく早期での予防として、「手術時に腹膜播種がみられなかったものの通常の検査で検出困難なくらいごく少数の癌細胞が残存している状態」、例えば、T4胃癌でCYO（腹腔内洗浄細胞診陰性）のような状態において投与可能である。すなわち、このような状態で、本実施形態に係る腹膜播種抑制剤を投与することで、腹膜播種の成立及び進展を抑制することが期待できる。

または、手術時に本実施形態に係る腹膜播種抑制剤を投与することも可能である。すなわち、本発明者らが調べたところ、T4胃癌患者でmiR-29bが低い患者には腹膜播種を来すことが多いため、本実施形態に係る腹膜播種抑制剤を手術の際に投与ことによって術後の腹膜播種の発生、再発を予防可能となる。

[0033] この際、本実施形態に係る腹膜播種抑制剤は、上述の手術時又は後に、腹腔内に直接投与されてもよい。

このように構成することで、後述する実施例1、2で示すように、本実施形態の腹膜播種抑制剤を中皮間葉転換による腹膜播種の成立及び進展を抑制又は予防に資することができる。すなわち、実施例1、2で、AAVを腹腔内注射したように、本実施形態の腹膜播種抑制剤を腹腔内に、注射や点滴や手術時のスプレー等の当業者に一般的な手段を用いて、直接、投与することが可能である。

[0034] このように、本実施形態に係る腹膜播種抑制剤は、腹膜播種の治療剤（治療用組成物）又は予防剤（予防用組成物）のような医薬として用いることが

可能である。すなわち、本実施形態に係る腹膜播種抑制剤は、腹膜播種の抑制、及び手術可能な癌の腹膜播種による再発を予防する薬剤として使用可能である。

実際に、後述する実施例1、2で示すように、miR-29bを用いることで、中皮間葉転換を阻害して、腹膜播種の成立及び進展を抑えることが可能となっている。これにより、miR-29bを腹膜播種の治療剤として使用できる。

[0035] 加えて、上述したように、本実施形態においては、miR-29b搭載のAAVにより、腹腔内を構成する細胞にmiR-29bを発現させることで、腹膜播種抑制方法及び腹膜播種予防方法として用いることが可能である。

このように構成し、本実施形態の腹膜播種抑制剤を治療剤として用い、又は、治療方法として用いることにより、中皮間葉転換による腹膜播種の成立及び進展を抑制又は予防し、予後不良な腹膜播種の増生も抑制することが可能となる。つまり、本実施形態の治療剤は、腹膜の線維化の防止により、腹腔内に発生する癌転移による腹膜播種の治療手段として提供することができる。

[0036] また、本実施形態に係る腹膜播種抑制剤は、標準的な臨床用の癌治療方法に係る薬剤と組み合わせることも可能である。

すなわち、本実施形態に係る腹膜播種抑制剤は、抗癌剤と併用されてもよい。

具体的には、当業者が行う化学療法用の抗癌剤等と併用することが可能である。すなわち、本実施形態に係る腹膜播種抑制剤を腹膜播種の治療として使用されている抗癌剤と併用することで、抗癌剤単独による治療よりも腹膜播種の成立及び進展を抑制又は予防することが可能となる。

[0037] なお、本実施形態に係る腹膜播種抑制剤は、miR-29bそのものに加え、miR-29の合成促進剤や分解阻害剤等を含んでいてもよい。すなわち、本実施形態に係る腹膜播種抑制剤は、腹腔内に発生する癌を含む腹膜播種の治療標的をmiR-29bの生合成系とし、miR-29bの合成を促

進する物質である合成促進剤、miR-29bの分解を阻害する物質である分解阻害剤等を含む。

[0038] 具体的には、このmiR-29bの合成促進剤や分解阻害剤は、miR-29bの遺伝子発現調節剤であってもよい。具体的には、遺伝子発現調節剤として、miR-29bの合成、分解に関する経路に対する遺伝子調整剤を各種用いることが可能である。

この遺伝子調整剤は、例えば、miR-29bの遺伝子からの生合成系の経路において転写や修飾の調整を行うDNAやRNA等の核酸（ヌクレオチド）、各酵素等のタンパク質（以下、「標的タンパク質」という。）に対する、抗体を含むペプチド、PNA、ゲノム編集に係る核酸やタンパク質等であってもよい。

このうち、核酸は、アンチセンスDNA若しくはRNA、siRNA、shRNA、リボザイム等であってもよい。

また、本実施形態の遺伝子発現調節剤は、標的タンパク質のアミノ酸配列、及びmRNA配列、ゲノムDNA配列等から同定して、当業者に容易な手法で製造することが可能である。

[0039] このように、miR-29bの合成促進剤や分解阻害剤等を含む、miR-29bの合成や分解に関する生合成経路に対する各種組成物も、腹膜播種の治療剤として提供できる。すなわち、これらを腹膜播種の成立及び進展を抑制する腹膜播種抑制剤として提供することが可能となる。

また、この他にも、本実施形態の腹膜播種抑制剤として、miR-29bによる遺伝子発現調整と同様のパスウェイをターゲットとする合成促進剤や分解阻害剤を用いることも可能である。

[0040] また、本実施形態の腹膜播種抑制剤は、中皮間葉転換（MMT）に関連する酵素を標的とした低分子化合物、抗体医薬、核酸、PNA等の各種医療用組成物を用いることが可能である。これらとして、例えば、低分子化合物等を合成して腹膜播種抑制剤として併用してもよい。

また、本実施形態の腹膜播種抑制剤は、癌のアポトーシスを促進したり、

癌の免疫系を惹起したり、ゲノム編集等の遺伝子改変に関連する手法を実現する医療用組成物等も加えられていてもよい。

[0041] また、本発明の実施の形態に係る腹膜播種抑制剤が低分子化合物である場合、各種の塩として提供されてもよい。これらの塩は、低分子化合物と、医薬品の製造に使用可能である酸又は塩基とを反応させることにより製造してもよい。

[0042] なお、本実施形態に係る腹膜播種抑制剤として、手術不能の腹膜播種、すなわち高度進行例に対しては、miR-29bによる腹膜中皮の強化だけでは進展を抑えづらい可能性もあるため、アンチmiRNAやmiRNAインヒビターを発現するAAVベクターを同時に投与してもよい。

[0043] また、本実施形態に係る腹膜播種抑制剤として、腹腔内を構成する細胞に中皮間葉転換を抑止させるような他の調節剤等を加えて用いることも可能である。

また、本実施形態の治療剤は、各種の腫瘍接着防止剤、腫瘍血管新生阻害剤等を併用し、癌細胞の接着や腹膜播種の内部への血管新生を抑えることで、効果を高めてもよい。

[0044] さらに、AAV以外の医療用の各種ベクターをAAVに加えて用いることも可能である。このウイルスベクターとしては、例えば、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター等を使用可能である。このうち、AAVよりも長いDNAを保持可能なベクターを用いることで、腹膜播種の元の種類の癌等の治療対象の腫瘍に特異的なゲノム編集等を実現することも可能となる。

[0045] また、本発明の実施の形態に係る腹膜播種抑制剤は、プロドラッグも含まれる。ここで、プロドラッグは、投与後、生理条件下で、特定のpH条件や酵素の作用等で分解され変換される誘導体を意味する。また、プロドラッグは、患者に投与された際には不活性であってもよいものの、生体内では活性のある治療剤に変換される。

[0046] また、本発明の実施の形態に係る腹膜播種抑制剤は、任意の製剤上許容し

うる担体として、例えば生理食塩水、アテロコラーゲン、その他のコラーゲン等を含んでもよい。さらに、担体として、ブドウ糖、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、エタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤等と共に投与することができる。

[0047] また、本発明の実施の形態に係る腹膜播種抑制剤は、製剤上許容しうる担体を調製するために、適切な薬学的に許容可能なキャリアを含んでもよい。このキャリアとしては、シリコン、コラーゲン、ゼラチン等の生体親和性材料を含んでもよい。

さらには、例えば、希釈剤、香料、防腐剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、結合剤、乳化剤、可塑剤等の製剤用添加物を含有させてもよい。また、本実施形態の治療剤は、適切な賦形剤等を含んでもよい。

また、本発明の実施の形態に係る腹膜播種抑制剤は、投与に適した投与形態においては、当該分野で周知の製剤上許容しうる担体を用いて処方され得る。

[0048] [腹膜播種治療方法]

また、本発明の実施の形態に係る治療方法は、腹膜播種の治療方法であって、上述の腹膜播種抑制剤を投与することを特徴とする。

具体的には、本実施形態に係る腹膜播種治療方法は、動物の腹膜播種治療方法であって、miR-29b搭載のアデノ随伴ウイルスベクターにより、腹腔内を構成する細胞にmiR-29bを発現させることを特徴とする。すなわち、腹膜内を構成する細胞でmiR-29bを発現し、腹膜播種を生じうる動物に対して、腹膜播種の治療方法に用いることが可能である。

また、本発明の実施の形態の治療剤は、生物体、生物体の体内の一部について、治療用の対象とすることができる。この生物体は特に限定されるものではないが、例えば、ヒト、家畜動物種、野生動物等の動物を含む。

[0049] この際、本発明の実施の形態に係る治療剤の治療対象としては、主にヒト及び、ヒト以外の各種脊椎動物に用いることができる。

このヒト以外の動物は、特に限定されるものではなく、真獣下綱（Eutheria）の有胎盤哺乳類を包括する各種哺乳類を含む。具体的には、例えば、マウス、ラット、フェレット、ハムスター、モルモット、又はウサギ等のげっ歯類、イヌ、ネコ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、又は非ヒューマンのトランスジェニック霊長類等であってもよい。すなわち、本発明の実施の形態に係る腹膜播種治療剤は、ヒトの治療の他に、各種動物の腹膜播種の抑制又は予防のための方法にも用いることができる。

なお、ヒトの治療が産業上利用可能な（特許要件となり得る）国においては、この本発明の実施の形態に係る治療方法は、ヒトについても適用範囲となってもよい。

[0050] 本発明の実施の形態に係る医薬組成物の投与経路は、特に限定されないが、非経口的又は経口的に投与することが可能である。

非経口投与としては、例えば、上述の担体とともに腹腔内への注射、手術時の腹膜への散布等による投与に加え、静脈内、動脈内、皮下、真皮内、筋肉内への投与が挙げられる。

[0051] また、本発明の実施の形態に係る治療剤を上述の治療に用いるために、投与間隔及び投与量は、腫瘍の状況、さらに対象の状態等の種々の条件に応じて適宜選択及び変更することが可能である。

ここで、治療する場合には、腫瘍の増生を遅くする投与用量を用いることができる。また、その他の治療剤と組み合わせて用いる場合、吐き気や重篤な副作用を抑えることで、効果的に使用可能である。

[0052] 本発明の実施の形態に係る治療剤は、腹膜播種を生じ得る癌患者に対しての投与量、及び投与回数を、投与の目的により、更に患者の年齢及び体重、症状及び疾患の重篤度等の種々の条件に応じて適宜選択及び変更することが可能である。

この投与回数及び期間は、状態をモニターし、その状態により再度あるいは繰り返し投与を行う。

[0053] 本発明の実施の形態に係る治療剤は、抗癌剤と併用されることを特徴とす

る。すなわち、本発明の実施の形態に係る治療剤は、従来の化学療法剤や抗癌剤等の他の治療用組成物等と併用することも可能である。この抗癌剤は、例えば、後述する実施例2で示す、パクリタキセルのような、腹膜播種の治療に当業者が用いるようなものを含んでいてもよく、それ以外の種類のものを用いてもよく、複数の治療用組成物の組み合わせ（カクテル）を用いてもよい。これにより、腹膜播種の治療及び予防効果が期待できる。また、既に治療が始まっている状態でも、本実施形態に係る治療剤を用いることが可能である。

また、放射線治療、粒子線治療、手術等の他の癌の治療剤や治療方式と併用することも可能である。これにより、予後の悪い腹膜播種への有効な治療法となり得る。

[0054] 本実施形態の治療剤に加えて、苦痛を緩和したりQOLを向上させたりするような治療用組成物を加えて治療してもよい。また、他の組成物と同時に本発明の組成物を投与してもよく、また間隔を空けて投与してもよいが、その投与順序は特に問わない。

また、本発明の実施の形態において、疾患が改善または軽減される期間は特に限定されないが、一時的な改善または軽減であってもよいし、一定期間の改善または軽減であってもよい。

[0055] [発明の効果]

従来の腹膜播種の治療は化学療法しかなく、腹膜播種を標的とした効果的な治療薬、治療方法は開発されていなかった。

これに対して、本実施形態に係る腹膜播種抑制剤により、後述する実施例1で示すように、マウス胃癌細胞株YTN16Pを用いたマウス腹膜播種モデルの腹腔内にAAV-miR-29bを投与したところ、対照群と比べて腸間膜上の腹膜播種結節が有意に減少し、腹膜播種の進展抑制効果が見られた。また、後述する実施例2で示すように、悪性度が高い膵癌のような他の癌においても、対照群と比べて腸間膜上の腹膜播種結節が有意に減少し、腹膜播種の進展抑制効果が見られた。すなわち、胃癌と同様かそれ以上に腹膜

播種の予後が悪い膵癌においても、腹膜播種の進展を抑制することができる。

まとめると、本実施形態に係る腹膜播種抑制剤により、癌細胞ではなく、腹膜中皮細胞に作用して腫瘍形成を効率よく抑制することができる。

[0056] また、癌細胞株とAAV-miR-29bの同時投与においても腹膜播種結節数は有意に少なく、予防的効果もあると考えられた。この結果から、壁深達度が高度（T4）の患者で洗浄細胞診が陰性（CYO）であるT4CYO胃癌の手術時終了時にAAV-miR29bを腹腔内に単回投与することで将来の腹膜播種再発を予防できる可能性がある。すなわち、難治性の病態である腹膜播種の予防を目指した治療を行うことが可能となる。

[0057] 具体的に、治療効果や予防効果としては、腹膜播種となった癌の転移巣が腹膜を覆うように又は結節のように増殖し、消化管やその他の臓器や組織を閉塞させるのを抑えることができる。さらに、悪液質を改善し、更に、新たな腹膜播種が生じるのを防ぐことが期待できる。そして、各転移巣を化学療法、抗癌剤、又は手術により消去、除去、又は切除されることで、癌そのものが緩解することも期待できる。実際に、後述する実施例2で示すように、化学療法（抗癌剤）と併用することで、より腹膜播種の進展を抑制することが可能である。

[0058] [他の実施の形態]

なお、本発明の他の実施の形態に係るウイルスベクターとしては、本発明の他の実施の形態に係る腹膜播種抑制方法として、採取された腹腔内液中のmiR-29bの発現量を測定し、予後を予測することを特徴としてもよい。

このように構成し、手術や検査時に採取された腹膜の細胞サンプル中のmiR-29bの発現量を測定することにより、腹膜播種の起こりやすさ（予後の予測）及び及び治療効果の判定を行うことが可能となる。すなわち、腹膜でのmiR-29b等の測定を、予後及び治療効果の予測マーカーとして使用することが可能となる。

[0059] 具体的には、癌の手術時に取得した腹膜の細胞中のmiR-29b等の発現量をRT-PCR法、デジタルPCR法、ノーザンブロット等の各種手法で測定することで、腹膜播種の起こりやすさを判定し、予後の良否を同定することができる。これにより、miR-29b等の発現量の測定により、腫瘍の腹膜播種による転移のし易さ予後を予測し、治療法を選択可能な診断方法を提供することができる。この発現量は、絶対的な発現量でもよいし、相対的な発現量でもよく、特定の発現量幅の「レベル」を基にした濃度であってもよい。

このように構成し、予後予測方法を組み合わせて、腹膜播種の起こりやすさを調べた上で、有効に治療することが可能となる。また薬剤投与後、腹膜でのmiR-29b等の発現量を目安として治療効果の判定が可能である。

[0060] なお、本実施形態において、「一種以上」とは、各構成のうち一つ又は複数の組み合わせのいずれかであることを示す。すなわち、いずれか一つを用いてもよいし、これらのうち二つ～全てについての任意の組み合わせを含んでもよい。

実施例 1

[0061] 次に図面に基づき本発明を実施例によりさらに説明するが、以下の具体例は本発明を限定するものではない。

[0062] [実験方法]

(プラスミドDNAの構築)

pAAV-CMV-MCS (タカラバイオ株式会社製) を制限酵素BamHIとXbaIで切断し、miR-29bを発現するpLV-[hsa-mir-29b-1] (BioSettia社製) からBamHIとXbaIで切断して得られたmiR-29bの前駆体配列 (以下、「mir-29b-1配列」という。これを配列番号1に示す。) を含む配列を導入することでpAAV-CMV-[mir-29b-1] を作製した。

図1AにpAAV2-CMV-MCS、図1Bに作製したpAAV-CMV-[mir-29b-1] のベクターの構造を示す。

[0063] (AAVベクターの回収)

HEK293 (Human Embryonic Kidney cells 293) 細胞を培養し、pAAV-CMV-[mir-29b-1] と、AAV1~10血清型及びAAV-DJ血清型をコードするAAVプラスミド、ヘルパープラスミド(タカラバイオ株式会社製)をリン酸カルシウム法でトランスフェクションした。72時間後にHEK293細胞を剥がして回収し、細胞を破壊してAAVベクターを遊離させ、エンドヌクレアーゼ処理を行った。遠心処理を行って上清を回収した。

回収したAAVベクター溶液に塩化セシウムを混合し密度勾配超遠心法を行いAAVベクターが含まれる分画を回収した。ベクター用の緩衝液で透析を行った後、PCR定量を行い、サンプル中のベクター濃度を確定させた。

[0064] (腹膜中皮細胞の分離)

ヒトの腹膜中皮細胞は、自治医科大学倫理審査委員会の承認を受け、患者本人に説明し同意を取得した上で分離培養を行った。非癌手術(肥満症手術)患者の手術時に2~4cm³の大網組織を取得し、直ちにリン酸緩衝化生理食塩水(Phosphate Buffered Saline、PBS)で半分の濃度としたTrypLE Express(Thermo Fisher Scientific社製)に浸し、37℃で2時間培養した。上清を100μmのナイロンメッシュフィルターで濾過し、1500rpm、4℃で5分間、遠心処理した。回収した細胞は20%FBS(Fetal Bovine Serum、Sigma社製)と100U/mlペニシリン、100mg/mlのストレプトマイシンを含むDMEM培地(コスモ・バイオ株式会社製)に再懸濁し、37℃、5%CO₂のインキュベーター内で培養した。

図2に、培養されたヒト腹膜中皮細胞の様子を示す。

[0065] マウスについては、C57BL/6Nマウス(株式会社クレア・ジャパン製)を犠牲死後に大網を回収し、ヒトと同様の手法で腹膜中皮細胞を分離培養した。

[0066] [結果]

(腹膜中皮細胞及び胃癌細胞株に対する血清型の選択実験)

まず、ヒト又はマウスの腹膜中皮細胞に対して、GFPを発現するコントロールベクターを感染させて、AAV血清型による腹膜中皮細胞への指向性を調べた。

このため、AAV1~10血清型及びAAV-DJ血清型のAAVに、リポーターとしてGFP遺伝子を組み込んだコントロールAAVベクターを用意した。これらを、以下、それぞれAAV1~10、AAV-DJベクターという。

24ウェルプレートに、ヒト及びマウスの腹膜中皮細胞、マウス胃癌細胞株YTN16P(東京大学のS. Nomura博士により提供された)を 1×10^4 個ずつ播種した。一晚培養し、翌日にそれぞれのAAVベクターを1ウェルあたり 1×10^5 vg(ベクターゲノム)ずつ添加して、ヒト腹膜中皮細胞では3日後、マウス腹膜中皮細胞では7日後に蛍光顕微鏡で観察し、フローサイトメトリーでGFP発現細胞割合を測定した。

[0067] 図3A~図3Cに、このヒトの腹膜中皮細胞に対して、GFPを発現するコントロールベクターを感染させた血清型選択実験の結果を示す。図3Aは、この実験の概念図である。図3Bは、各ベクターのGFP発現を示す写真である。図3Cは、フローサイトメトリーでのGFP発現の中央値(Median Fluorescence Intensity、MFI)を示すグラフである。

結果として、AAV2ベクターが最も指向性が高いことが分かった。すなわち、ヒトでは2血清型が最も導入効率が高かった。この他にも、ヒトでは、AAV1、AAV5、又はAAV-DJも指向性があり、使用可能であった。

[0068] 図4A~図4Cに、マウス腹膜中皮細胞に対して、同様に血清型選択実験を行った結果を示す。

それぞれ、図4Aは実験の概念図、図4Bは各ベクターのGFP発現の写

真、図4CはGFP発現のMFIのグラフである。

結果として、マウスでは、AAV-DJベクターが、最も腹膜中皮に指向性が高かった。すなわち、マウスではDJ血清型が最も導入効率が高かった。この他にも、マウスでは、AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、又はAAV9も指向性があり、使用可能であった。

[0069] なお、本発明者らは、マウス胃癌細胞株YTN16Pに対しても同様の実験を行い、どの血清型においてもGFP発現が弱かったことを確認している。すなわち、マウス胃癌細胞株において、AAVは、血清型に関わらず、導入されにくいと考えられる。

[0070] (腹膜中皮細胞のTGF- β による中皮間葉転換の抑制実験)

次に、トランスフォーミング増殖因子(Transfoming Growth Factor- β 、TGF- β)で腹膜中皮細胞が中皮間葉に形質転換されるのを、AAV2-miR-29bが抑制するかどうかを確かめた。

[0071] この実験では、24ウェルプレートに、ヒト腹膜中皮細胞を 1×10^4 個ずつ播種し、TGF- β (株式会社プロテインテック・ジャパン製)を10ng/mlの濃度で加えた。翌日にAAV2-miR-29bベクターを1ウェルあたり 1×10^5 vg(ベクターゲノム)ずつ添加して、3日後に蛍光免疫染色を行って上皮系及び間葉系細胞マーカーの発現を蛍光顕微鏡で観察した。

[0072] 図5に、この結果を示す。「No Treat」は何も加えないコントロール、「TGF- β 」はTGF- β のみを加えたコントロール、「TGF- β 1+AAV2-miR-29b」は本実施例のAAV2-miR-29bベクターを加えたもの、「TGF- β 1+AAV2-NC」は、pAAV2-ネガティブコントロールベクターの結果をそれぞれ示す。pAAV2-ネガティブコントロールベクターは、miR-29bの前駆体配列が入っていないプラスミドDNAベクターから作製されたAAVベクターである。いずれの列も、「Bright Field」は、顕微鏡の写真、「E-cad

herin]、「Calretinin」、「Vimentin」、「Fibronectin」、「DAPI」は、上皮系及び間葉系細胞マーカーを、それぞれ示す。Fibronectinについては、非特許文献1で、miR-29bによる癌細胞接着低下機序の一つとして、Fibronectinとインテグリンを介した機構があることが示されており、確認のために加えた。

[0073] 結果として、TGF- β で間葉系マーカーのVimentin発現が亢進するのを、miR-29bが抑制していることが分かった。すなわち、腹膜中皮細胞にTGF- β を加えても、AAV2-miR-29bベクターにより、中皮間葉転換するのを抑制することができた。

[0074] (マウス腹膜へのAAV導入実験)

ここで、上述のようにヒト腹膜中皮細胞を用いた*in vitro*の実験で中皮間葉転換するのを抑制する結果が得られたので、マウスを用いた*in vivo*実験を行うことにした。

まず、マウスにおいて最も導入効率が高かったAAV-DJ-miR-29bベクターを導入して、実際に腹膜でmiR-29bを発現することを確認した。

[0075] この実験では、8週齢のC57BL/6Nマウスの腹腔内に 5×10^{10} vgのAAV-DJ-miR-29bと、及びコントロールベクターのAAV-DJ-GFPを注射して28日目に犠牲死させた。AAV-DJ-GFPを投与した群では腹膜中皮細胞のGFP発現を蛍光顕微鏡で観察した。また、AAV-DJ-miR-29bを投与した群では腹膜中皮細胞へのmiR-29b発現を、マウスの大網（腹膜中皮細胞の培養元）から取得した細胞について、非特許文献1と同様のデジタルPCR法（Thermo Fisher Scientific社製キット）で調べた。

[0076] 図6Aは、この実験の概念図を示す。

図6Bは、AAV-DJ-GFPの腹膜上でのGFP発現量を示す。28日後においても、非投与群（No treat）はGFP発現がなく、腹膜

上にコントロールベクターを投与した群（AAV-DJ-GFP群）ではGFP発現がみられる。すなわち、DJ血清型のAAVは、確かにマウスの腹膜に導入されることが分かった。

図6Cは、腹膜から取得したマウス腹膜中皮細胞（Mouse Peritoneal Mesothelial Cells、MPMC）のmiR-29b発現量（コピー数/μL）を示す。無投与のコントロール群（No treat）と、AAV-DJベクターのみ投与したネガティブコントロール群（AAV-DJ-NC）とに比べて、AAV-DJ-miR-29bを投与した群（AAV-DJ-miR-29b）では、1-way ANOVAで検定したところ、 $p < 0.01$ で有意にmiR-29bの発現が高くなっていた。

[0077]（AAV-DJ-miR-29bによる腹膜播種抑制実験）

次に、実際にin vivoでAAV-DJ-miR-29bが腹膜播種を抑制するかどうかを3日目投与と同時投与とで投与時期を変えて調べた。

図7により、まず、この腹膜播種抑制実験（癌細胞播種後3日目で投与）の概要について説明する。ここでは、腹膜播種形成のごく早期での予防をイメージし、癌細胞を腹腔内投与して3日後にAAV-DJ-miR-29bを、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）にて希釈し、腹腔内注射して、大網上と腸間膜上の腹膜播種結節数をカウントし、評価した。具体的には、8週齢のC57BL/6Nマウスの腹腔内に 1×10^5 個のマウス胃癌細胞株YTN16P2を投与した。その3日後に、 5×10^5 vgのAAV-DJ-miR-29b及びAAV-DJ-GFPを腹腔内注射し、3週間後に犠牲死させた。これらについて、（1）AAVベクター無投与のコントロール群（No treat）、（2）AAV-DJ-miR-29bを投与した群（AAV-DJ-miR-29b）、（3）AAV-DJベクターのみ投与したネガティブコントロール群（AAV-DJ-NC）について、それぞれ $n = 5$ で、腸間膜と大網上の腹膜播種結節数を測定した。

[0078] 図8Aは、腹膜播種抑制実験（癌細胞播種後3日目で投与）の各群の腸間

膜の写真を示す。

図8Bは、各群の結節数の比較であり、AAV-DJ-miR-29bを投与した群で、腸間膜上の腹膜播種結節数が有意 ($p < 0.05$) に少なかった。

すなわち、マウス腹膜播種モデルの腹腔内にAAV-miR-29bを投与したところ、対照群と比べて腸間膜上の腹膜播種結節が有意に減少し、腹膜播種の進展抑制効果が見られた。

[0079] 図9により、腹膜播種抑制実験（癌細胞播種と同時に投与）の概要について説明する。ここでは、手術時の予防投与をイメージし、癌細胞を腹腔内投与と同時にAAV-DJ-miR-29bを投与して、腹膜播種結節数をカウントし、評価した。具体的には、上述の図8の実験例と同様に、8週齢のC57BL/6Nマウスの腹腔内に 1×10^5 個のマウス胃癌細胞株YTN16P2を投与した。同時に 5×10^5 vgのAAV-DJ-miR-29b及びAAV-DJ-GFPを腹腔内注射し、3週間後に犠牲死させて腸間膜と大網上の腹膜播種結節数を測定した。

[0080] 図10Aは、腹膜播種抑制実験（癌細胞播種と同時に投与）の各群の腸間膜の写真を示す。

図10Bは、各群の結節数の比較であり、AAV-DJ-miR-29bを投与した群で、腸間膜上の腹膜播種結節数が有意 ($p < 0.05$) に少なかった。

すなわち、癌細胞株とAAV-miR-29bの同時投与においても腹膜播種結節数は有意に少なく、予防的効果もあると考えられた。

[0081] (AAV-DJ-miR-29bによるマウス腹膜の変化)

次に、AAV-DJ-miR-29bによるマウス腹膜の繊維化の抑制効果を確認した。

具体的には、上述の腹膜播種抑制実験時に採取したマウス腹膜組織の凍結切片を蛍光顕微鏡で観察した。また、組織切片におけるコラーゲン結合組織繊維を検出するマッソントリクローム染色を、Trichrome Sta

in Kit (ScyTek Laboratories社製)で行い、腹膜の厚みを測定した。

[0082] 図11Aは、この実験のマウス腹膜に起こる変化を示す写真である。

図11Bは、各群で腹膜の厚みを比較した結果であり、AAV-DJ-miR-29bを投与した群では、腹膜の肥厚が見られなかった。すなわち、AAV-miR-29bを投与した群では、腹膜の線維化が有意 ($p < 0.05$) に抑制されていた。

実施例 2

[0083] (膵癌に対する効果)

上述の実施例1では、マウス胃癌腹膜種モデルに対する効果を示したので、異なる癌腫でも効果を確認した。

本実施例では、マウス膵癌細胞PANO2を用いた膵癌腹膜播種モデルを用いて、膵癌についての腹膜播種抑制の効果について確認した。

[0084] 図12Aに、この実験の概念図を示す。

この実験では、C57BL/6Nマウスの腹腔内にマウス膵癌細胞PANO2を 5×10^5 個投与し、同時にAAV-DJ-miR-29bを 5×10^{10} vg (vector genome) 投与した。

14日後に犠牲死させて、腸間膜上の腹膜播種結節数をカウントすることで腹膜播種の形成状況を評価した。実験に用いた膵癌細胞株と胃癌細胞株で腹膜播種の形成状況が異なるので、膵癌モデルでは14日後の評価とした。

壁側腹膜は4%ホルマリンで固定後にパラフィン包埋し、4 μ m厚に薄切したスライドでマッソントリクローム染色を行い腹壁の厚さを測定した。

[0085] 図12Bは、膵癌へ各群の腸間膜の写真を示す。「No treatment」は、癌細胞のみ投与した群を示す。AAVは投与していない群を示す。「AAV-DJ-NC」はAAV-DJベクターのみ投与したネガティブコントロール群を示す。「AAV-DJ-miR-29b」が本実施例のAAV-DJ-miR-29bを投与した投与群を示す。

図12Cは、膵癌細胞とAAV-miR-29bを同時に投与し、14日

目に腹膜播種の形成状況を評価した際の、腸間膜播種結節数の測定した結果を示す。

AAV-miR29b投与群では、腸間膜上での腹膜播種数は、有意に抑制されていた。図中の「***」は、 $p < 0.01$ であることを示す。

[0086] 図12Dは、実施例1の胃癌モデルと同様に、腹膜の変化を腹膜組織の凍結切片を蛍光顕微鏡で観察した写真である。

図12Eは、マッソントリクローム染色により、腹膜の厚みを測定し、各群で腹膜の厚みを比較した結果である。腹膜の線維化に伴う壁肥厚を見たところ、AAV-miR-29b投与群では腹膜厚が有意に減少していた。図中の「**」は、 $p < 0.05$ であることを示す。

[0087] このように、本実施例に係るAAV-miR-29bは、組織への浸透性が特に高く腹膜播種を生成しやすい膵癌においても、術後の腹膜播種再発の予防効果が得られると考えられる。このため、AAV-miR-29bは、他の腹膜播種を生じる癌種においても、同様の効果が期待できる。

[0088] (抗癌剤との併用による治療効果)

上述のように、胃癌と膵癌モデルで腹膜播種の予防効果を示したので、診断時に既に腹膜播種が存在する状態である腹膜播種の進行期での治療効果を確認した。

具体的には、限定された施設で臨床試験として実施されている腹腔内化学療法と、本実施例のAAV-miR29bとを併用して効果を調べた。より具体的には、胃癌及び膵癌の腹膜播種に対する腹腔内化学療法で用いる抗癌剤であるパクリタキセルと組み合わせて投与した。

[0089] 図13Aに、この実験の概念図を示す。

この実験では、C57BL/6Nマウスの腹腔内にマウス胃癌細胞YTN16Pを 5×10^5 個投与した。そして、7日目に、 5×10^{10} vgのAAV-DJ-miR-29bを投与し、同時に $200 \mu\text{g}$ のパクリタキセル（富士フイルム和光純薬（株）製、カタログ番号167-28166）を、通常の投与量で投与した（1回目）。14日目に、 $200 \mu\text{g}$ のパクリタキセルを

投与した（2回目）。そして、21日後に犠牲死させて、腸間膜上の腹膜播種結節数をカウントすることで腹膜播種の形成状況を評価した。すなわち、AAV-miR-29bは1回のみ投与し、パクリタキセルは複数回投与している。

[0090] 図13Bは、各群の腸間膜の写真を示す。「No treatment」は癌細胞のみ投与し、AAVは投与していないものを示す。「AAV-DJ-NC」はAAV-DJベクターのみ投与したネガティブコントロールを示す。「AAV-DJ-miR-29b」が本実施例のAAV-DJ-miR-29bを投与したものを示す。「Mock」は、パクリタキセルの溶媒を投与したものを示す。それぞれ、パクリタキセル「PTX (200 μg)」を投与したものと組み合わせを各群として示した。

図13Cは、21日後に腸間膜播種結節数を測定した結果を示す。

AAV-miR-29bを投与した群では、有意に腹膜播種結節が有意に少ないという結果が得られた。図中の「*」は、 $p < 0.05$ であることを示す。

[0091] このような結果から、本実施例に係るAAV-miR-29bは、腹膜播種の予防だけでなく、既に形成された腹膜播種への治療においても、抗癌剤と併用しても、腹膜播種の成立及び進展を抑制又は予防する効果が期待できる。

[0092] なお、上記実施の形態の構成及び動作は例であって、本発明の趣旨を逸脱しない範囲で適宜変更して実行することができることは言うまでもない。

産業上の利用可能性

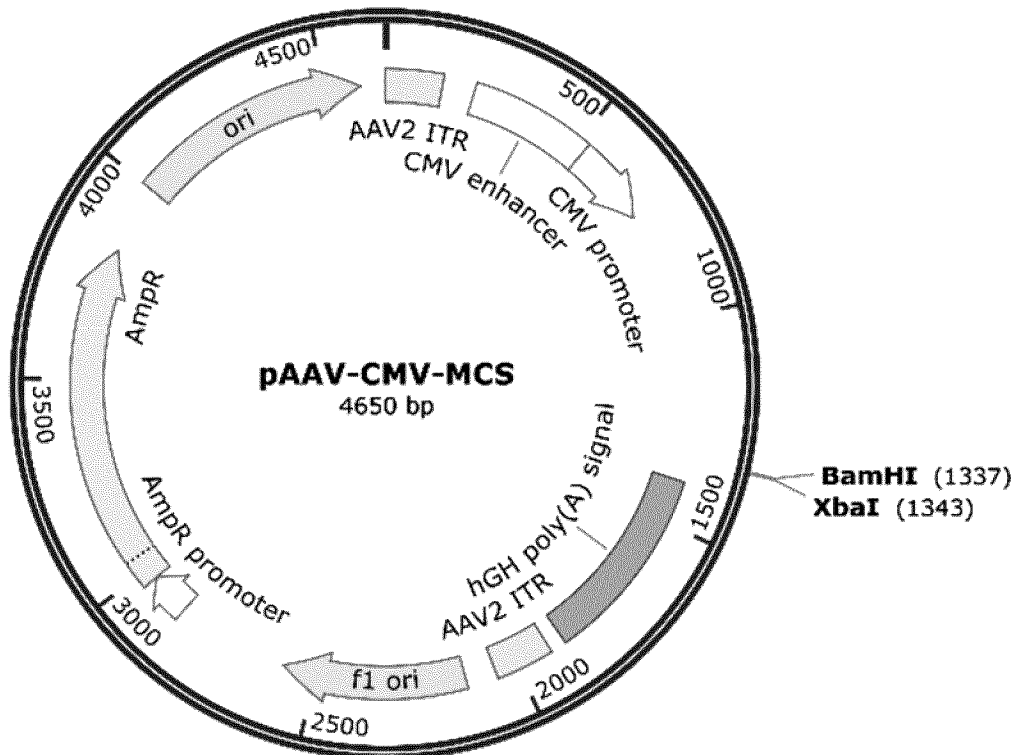
[0093] 本発明の治療剤は、予後不良の腹膜播種患者に対して単回投与で完治が望める腹膜播種抑制又は予防薬、治療剤としての腹膜播種抑制剤を提供することができ、産業上利用することができる。

請求の範囲

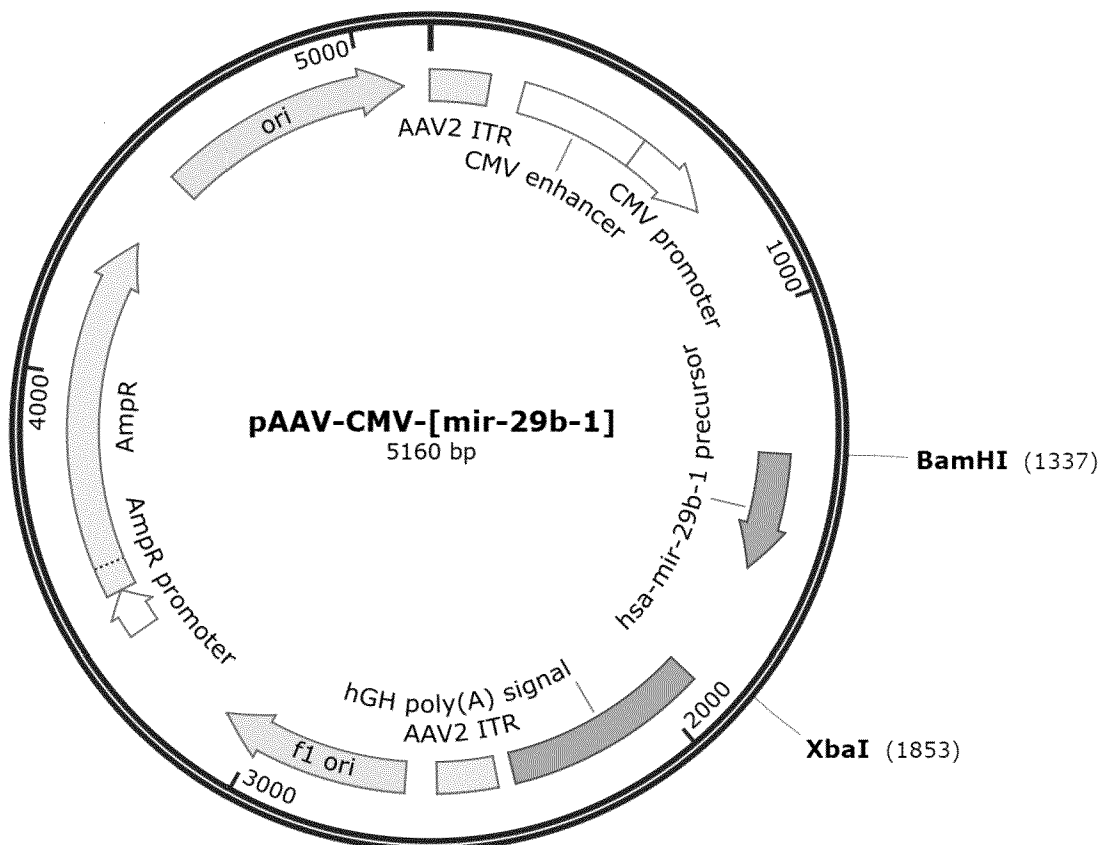
- [請求項1] m i R - 2 9 b 搭載のアデノ随伴ウイルスベクターを含む
 ことを特徴とする腹膜播種抑制剤。
- [請求項2] 前記アデノ随伴ウイルスベクターの血清型は、AAV 1、AAV 2
 、AAV 4、AAV 5、AAV 9、及びAAV-DJからなる群の一
 種を含む
 ことを特徴とする請求項1に記載の腹膜播種抑制剤。
- [請求項3] 前記アデノ随伴ウイルスベクターの血清型は、
 ヒト (Homo sapiens) では、AAV 1、AAV 2、A
 AV 5、又はAAV-DJであり、
 マウス (Mus musculus) では、AAV 1、AAV 2、
 AAV 4、AAV 5、AAV 9、又はAAV-DJである
 ことを特徴とする請求項2に記載の腹膜播種抑制剤。
- [請求項4] 腹腔内を構成する細胞にm i R - 2 9 b を発現させ、腹膜播種を治
 療又は予防する
 ことを特徴とする請求項1に記載の腹膜播種抑制剤。
- [請求項5] 前記アデノ随伴ウイルスベクターは、
 腹膜中皮細胞の中皮間葉転換を抑制し、腹膜の線維化を抑制する
 ことを特徴とする請求項1に記載の腹膜播種抑制剤。
- [請求項6] 前記アデノ随伴ウイルスベクターは、
 腫瘍に対する手術と同時又は後に投与される
 ことを特徴とする請求項1に記載の腹膜播種抑制剤。
- [請求項7] 前記アデノ随伴ウイルスベクターは、
 腹腔内に直接投与される
 ことを特徴とする請求項1に記載の腹膜播種抑制剤。
- [請求項8] 前記アデノ随伴ウイルスベクターは、
 抗癌剤と併用される
 ことを特徴とする請求項1に記載の腹膜播種抑制剤。

- [請求項9] m i R - 2 9 b 搭載のアデノ随伴ウイルスベクターにより、
腹腔内を構成する細胞に m i R - 2 9 b を発現させる
ことを特徴とする腹膜播種抑制方法。
- [請求項10] m i R - 2 9 b 搭載のアデノ随伴ウイルスベクターにより、
腹腔内を構成する細胞に m i R - 2 9 b を発現させる
ことを特徴とする腹膜播種予防方法。
- [請求項11] 抗癌剤と併用する
ことを特徴とする請求項 1 0 に記載の腹膜播種予防方法。
- [請求項12] ヒト以外の動物の腹膜播種治療方法であって、
m i R - 2 9 b 搭載のアデノ随伴ウイルスベクターにより、
腹腔内を構成する細胞に m i R - 2 9 b を発現させる
ことを特徴とする腹膜播種治療方法。

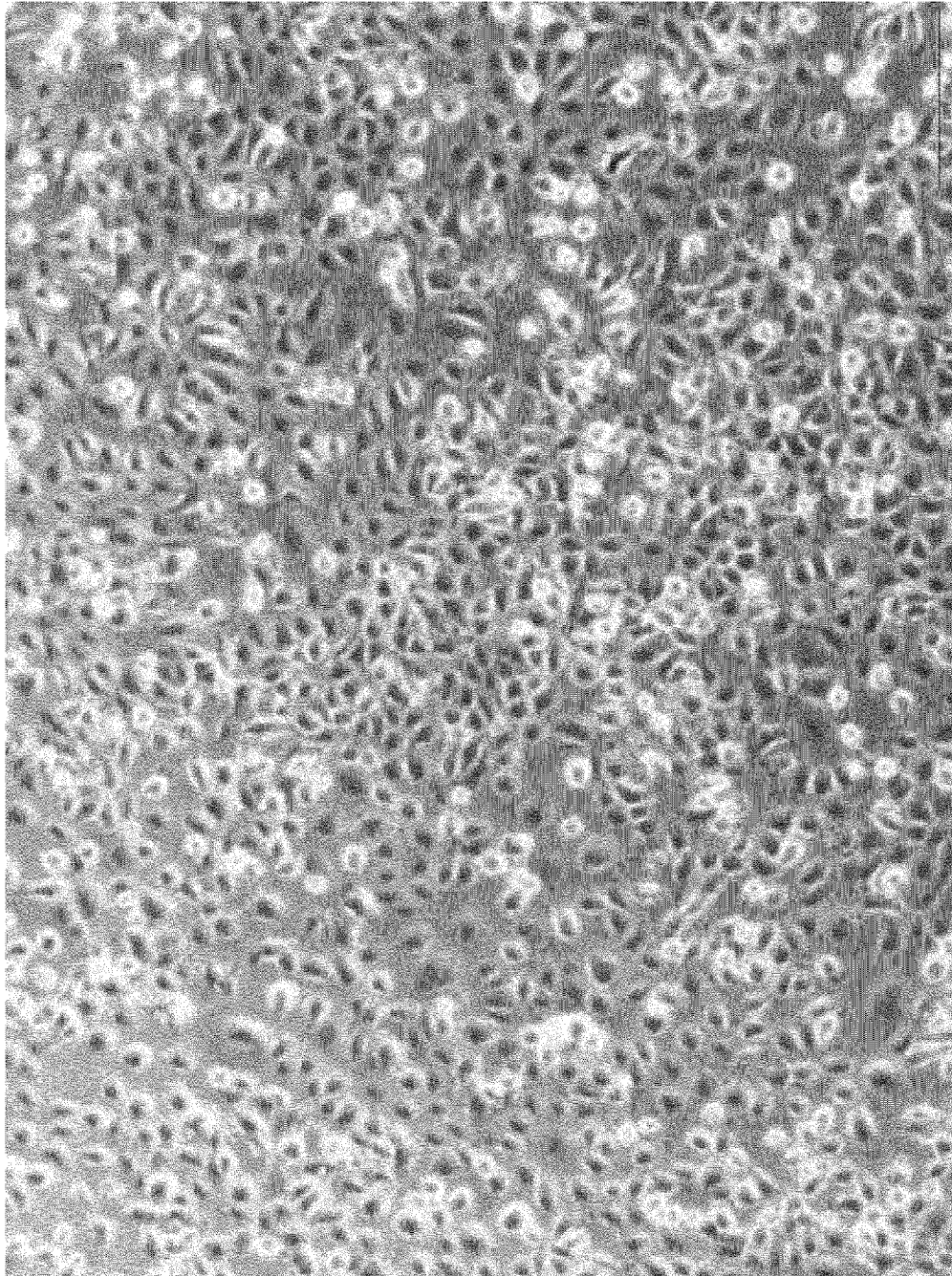
[1A]



[1B]

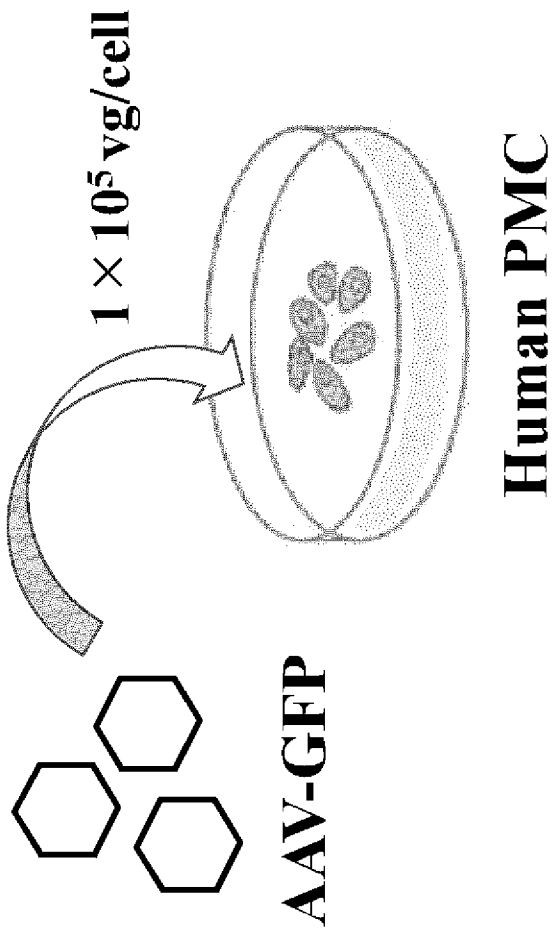


[図2]

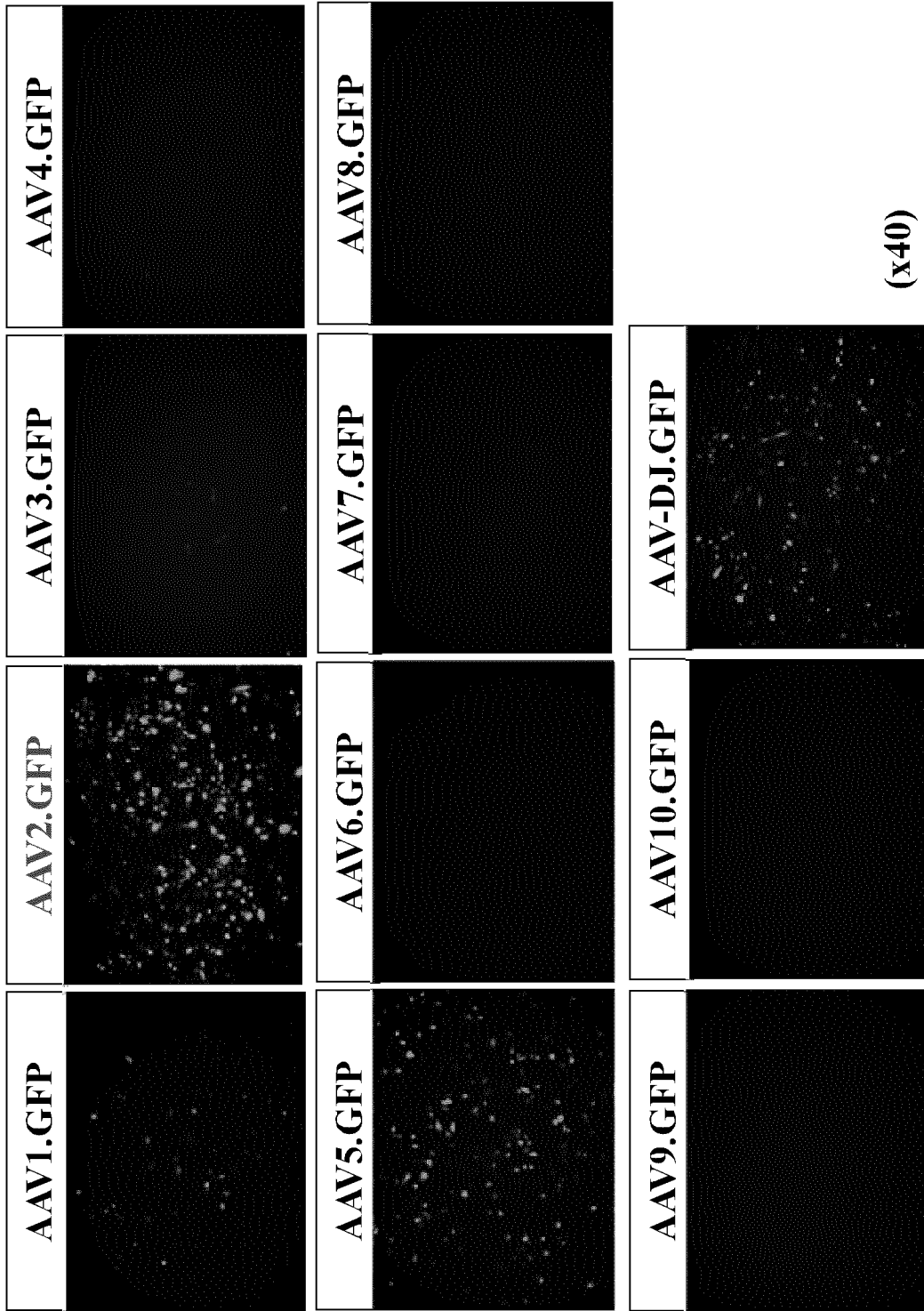


培養されたヒト腹膜中皮細胞

[3A]

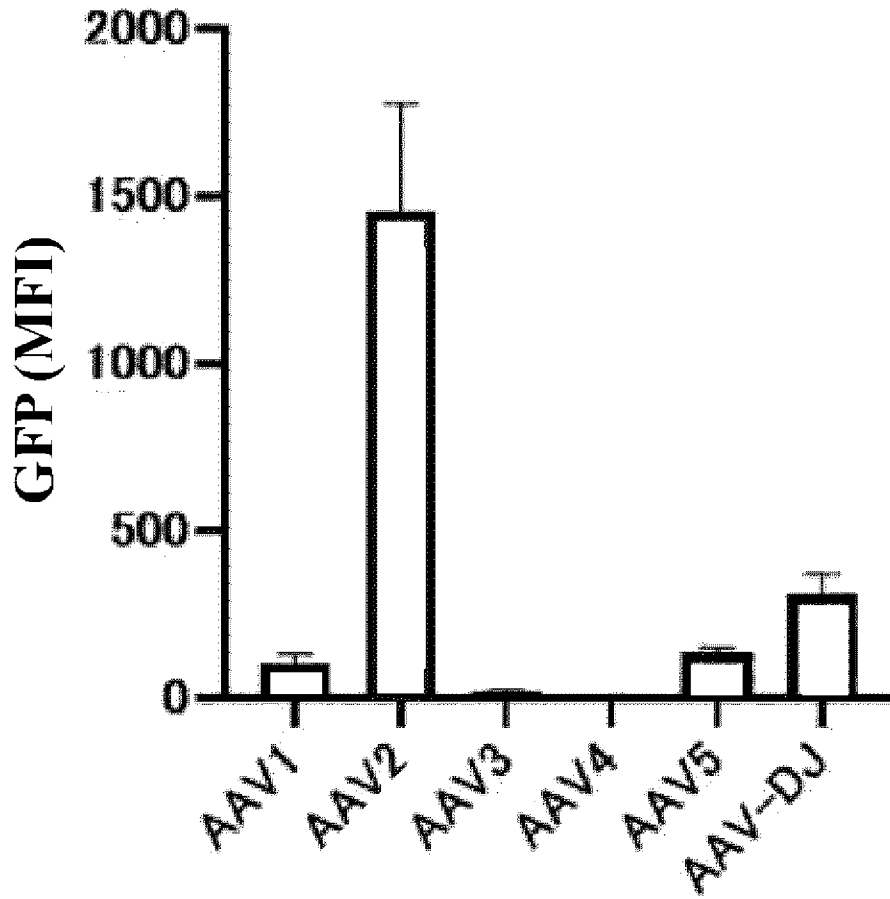


[3B]

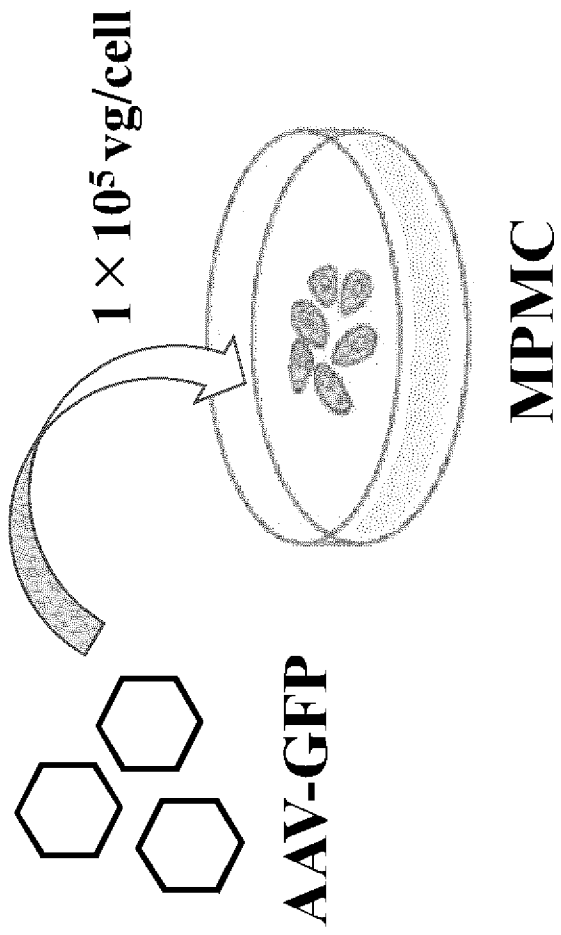
Fluorescence microscopy

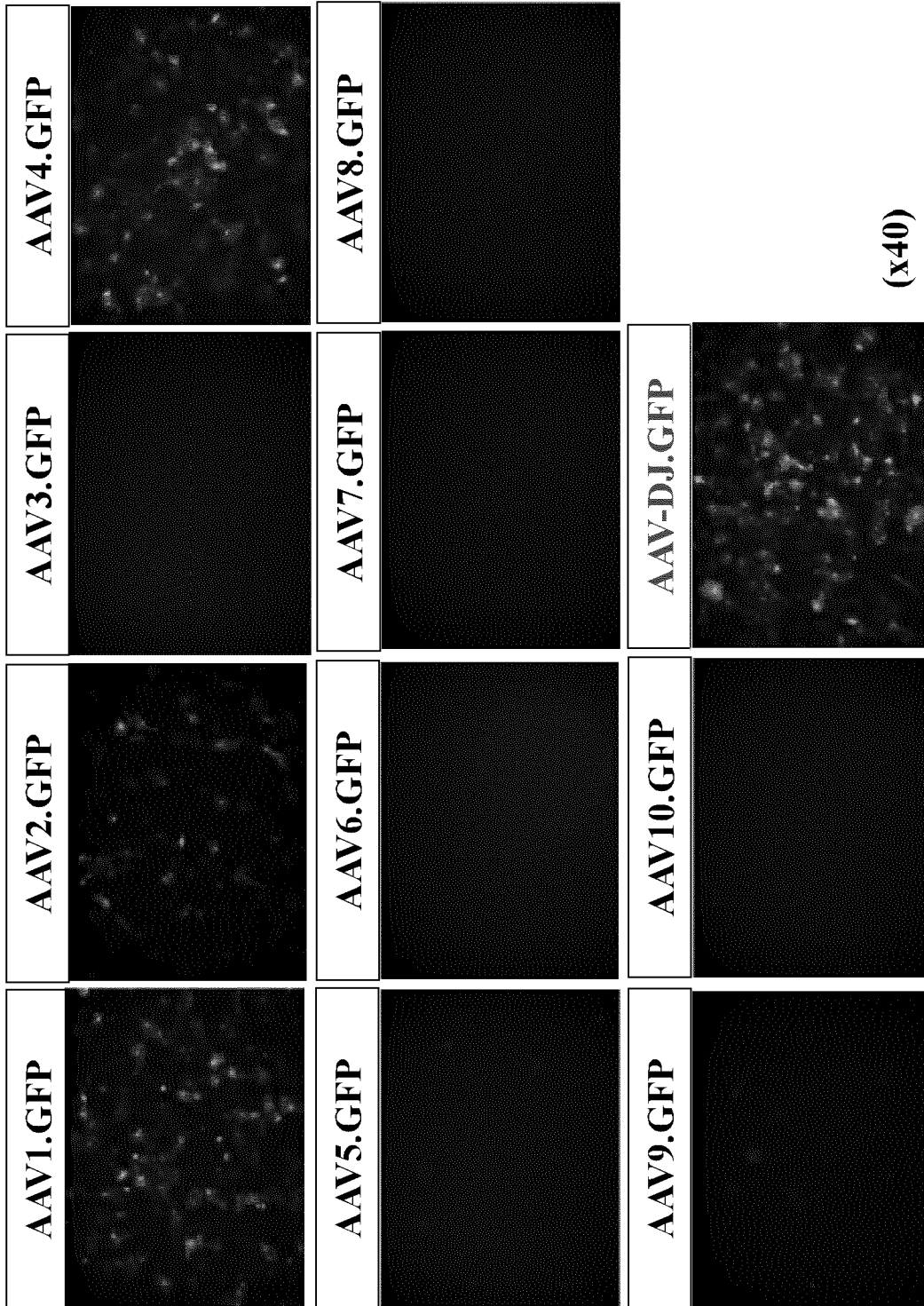
[図3C]

Flowcytometry



[図4A]



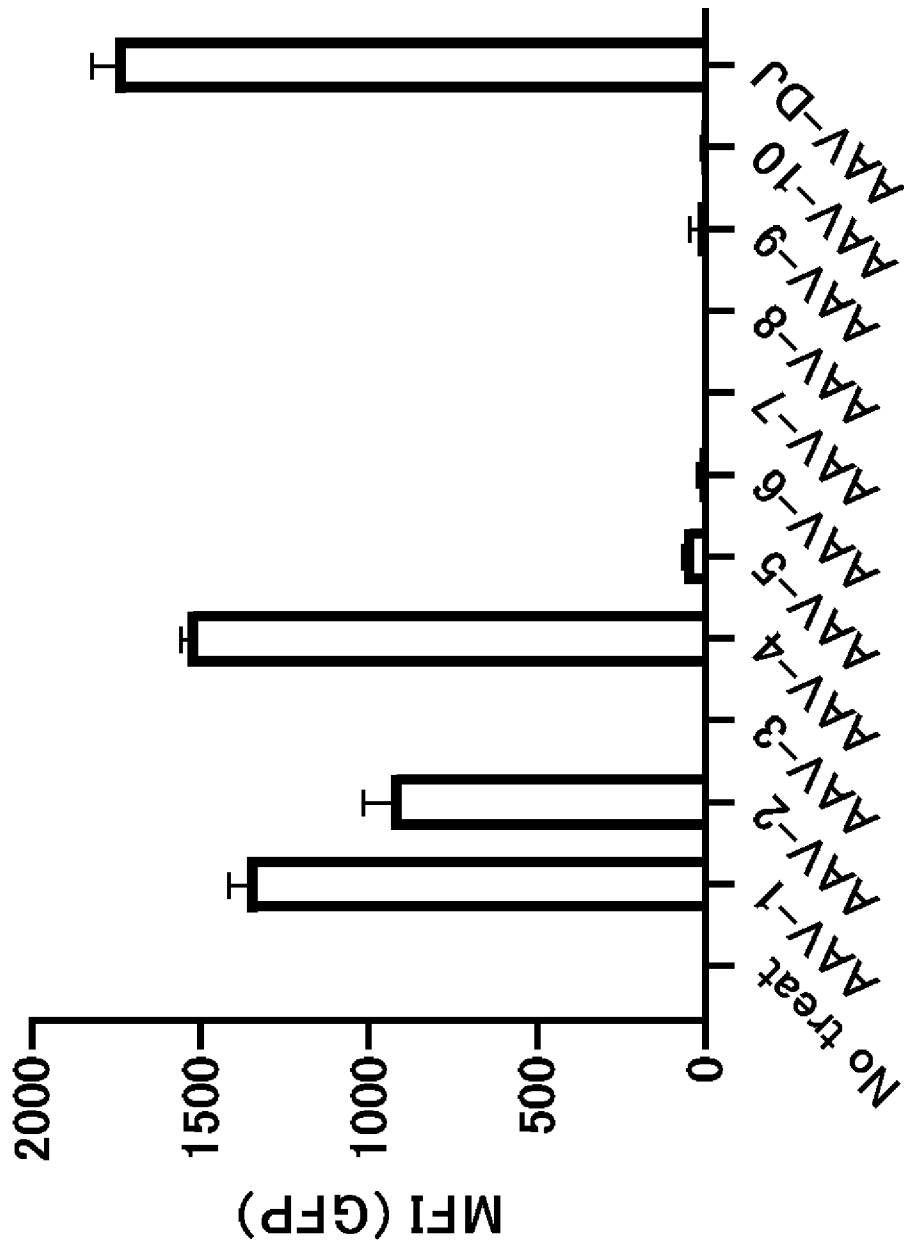
[4B]Fluorescence microscopy

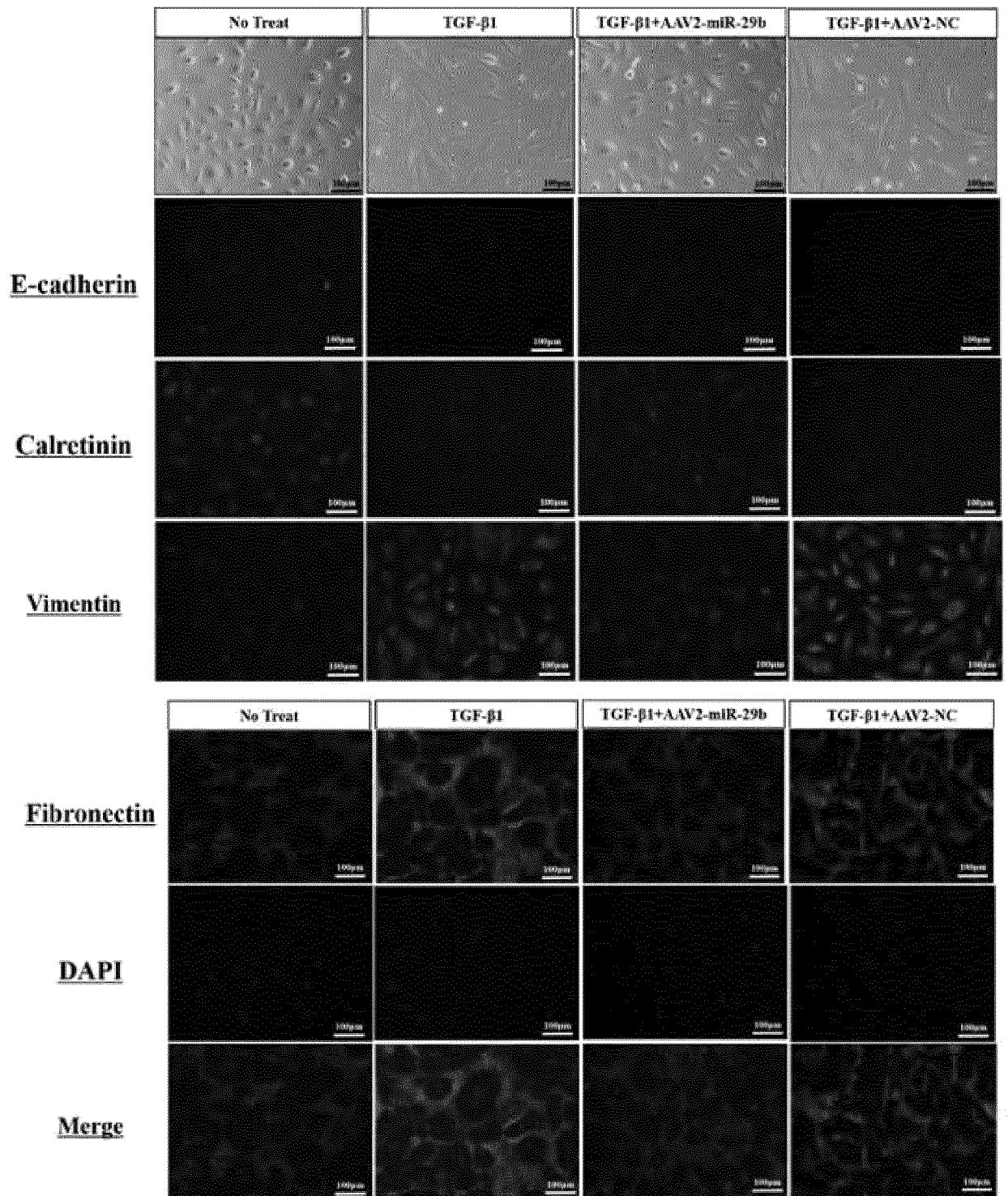
(x40)

[圖4C]

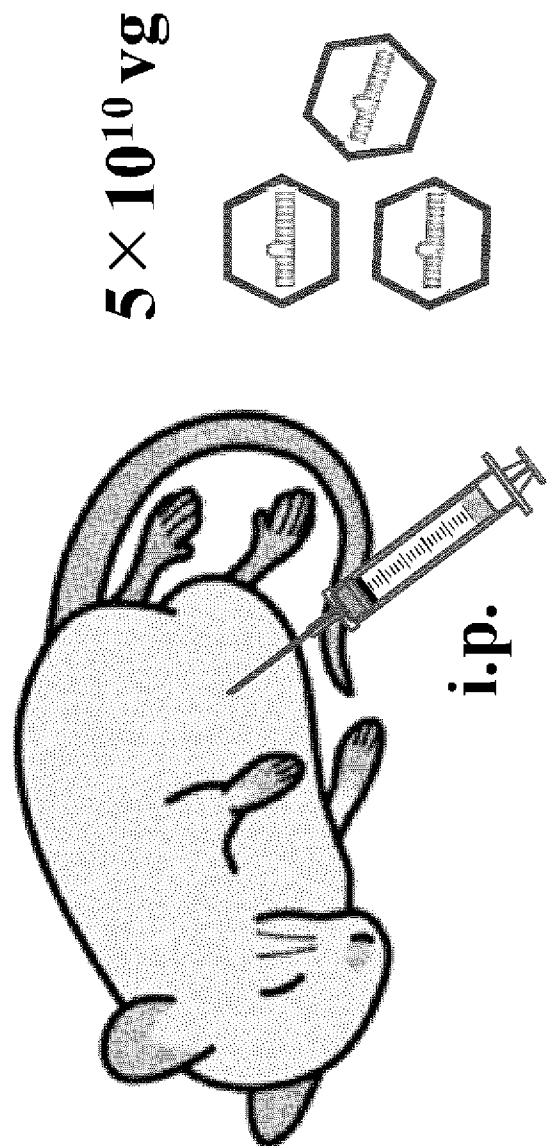
Flowcytometry

Murine PMC



[5]($\times 200$)

[図6A]



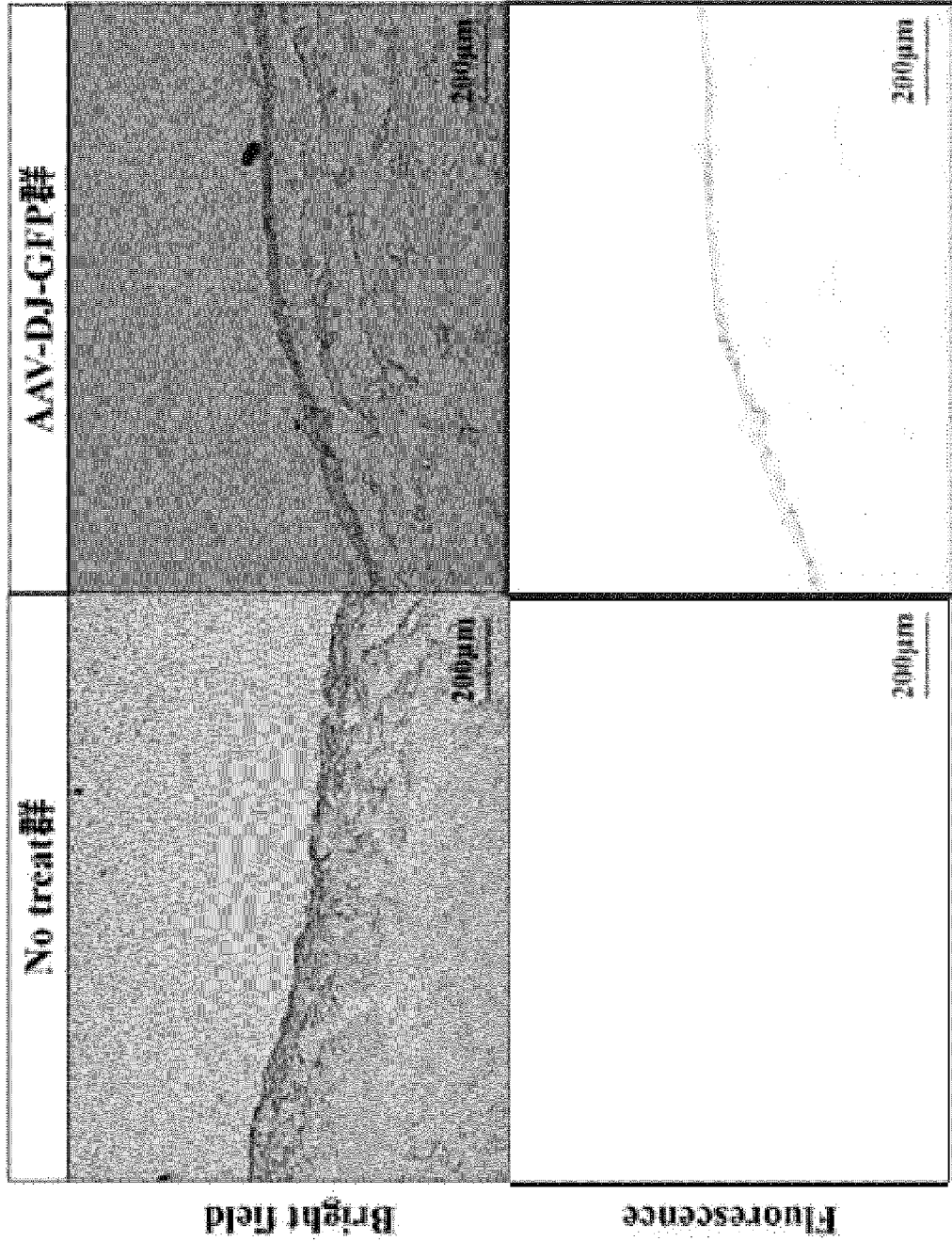
AAV-DJ-GFP

AAV-DJ-miR-29b

[図6B]

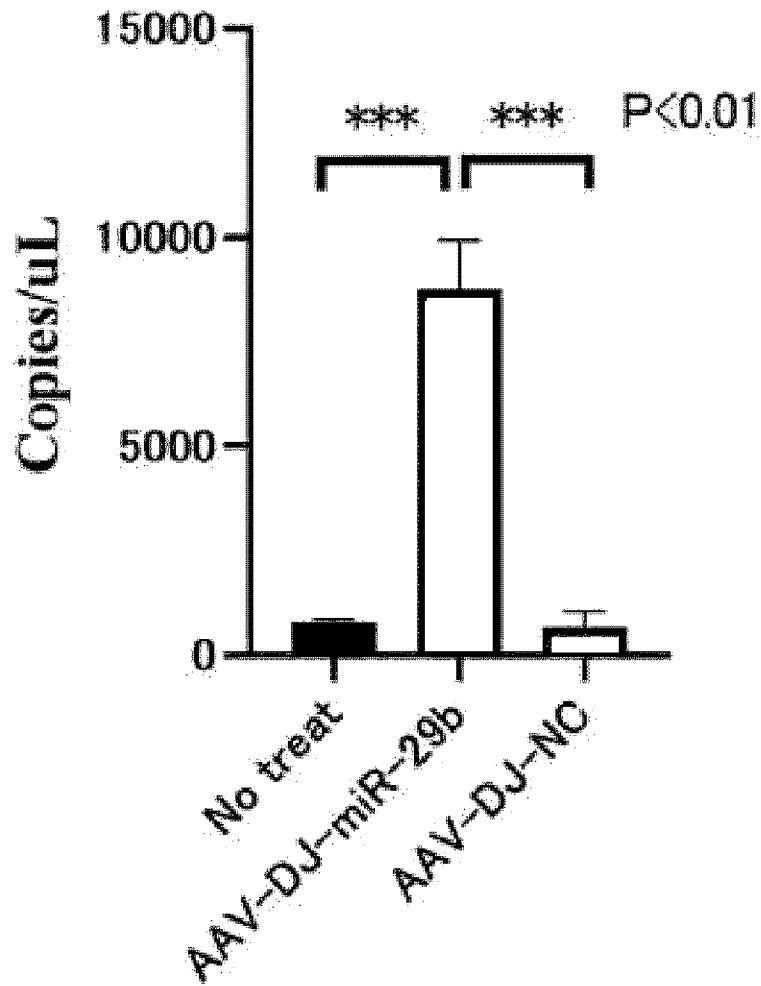
GFP expression of parietal peritoneum

(x100)

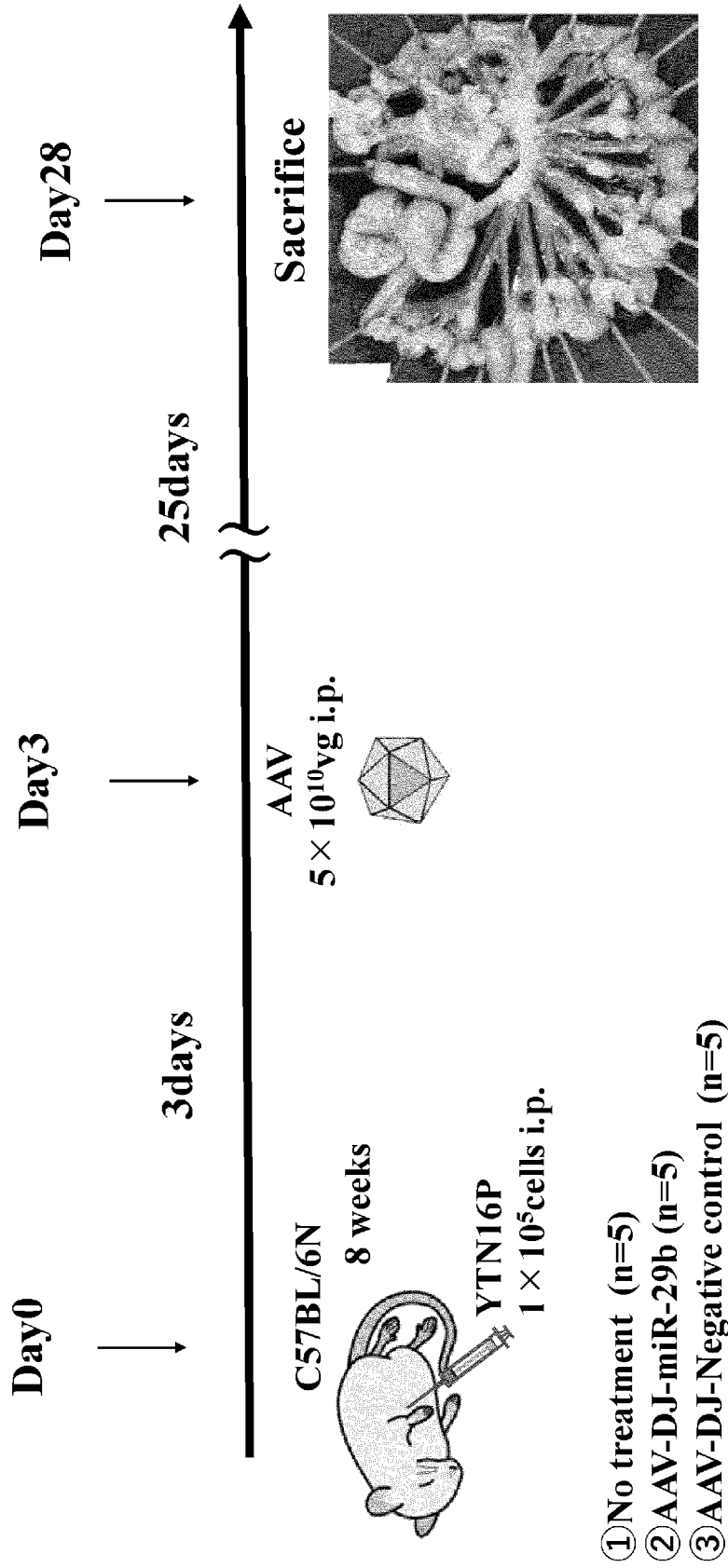


[図6C]

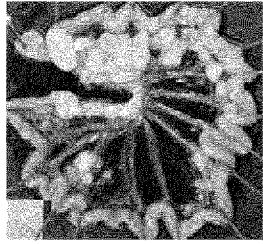
miR-29b expression of MPMCs isolated from omentum



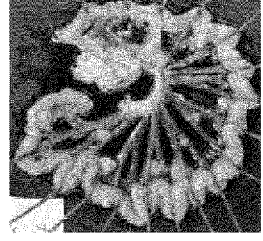
[7]



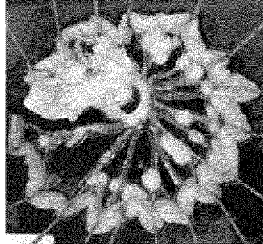
[図8A]



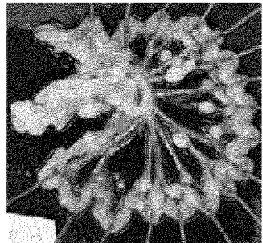
34



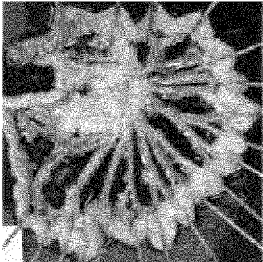
17



36

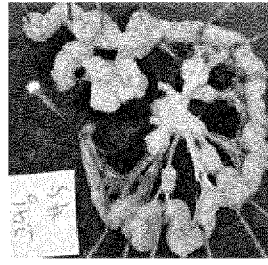


28

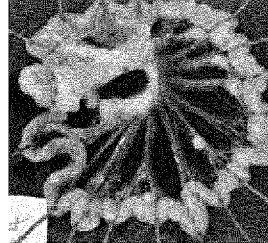


11

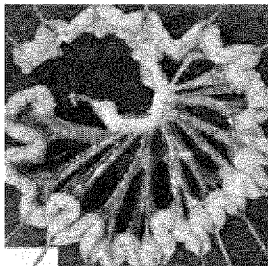
No treat群



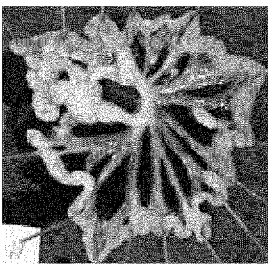
15



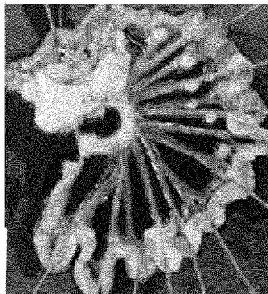
12



4

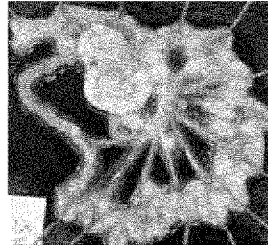


6



12

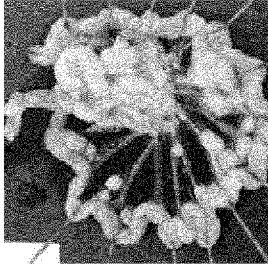
AAV-DJ-miR-29b群



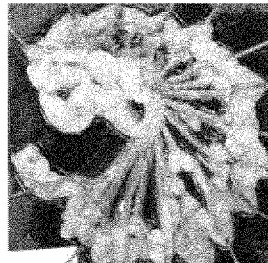
25



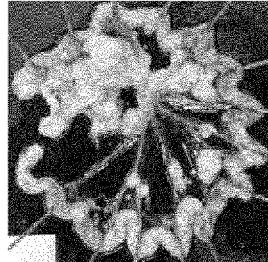
33



28



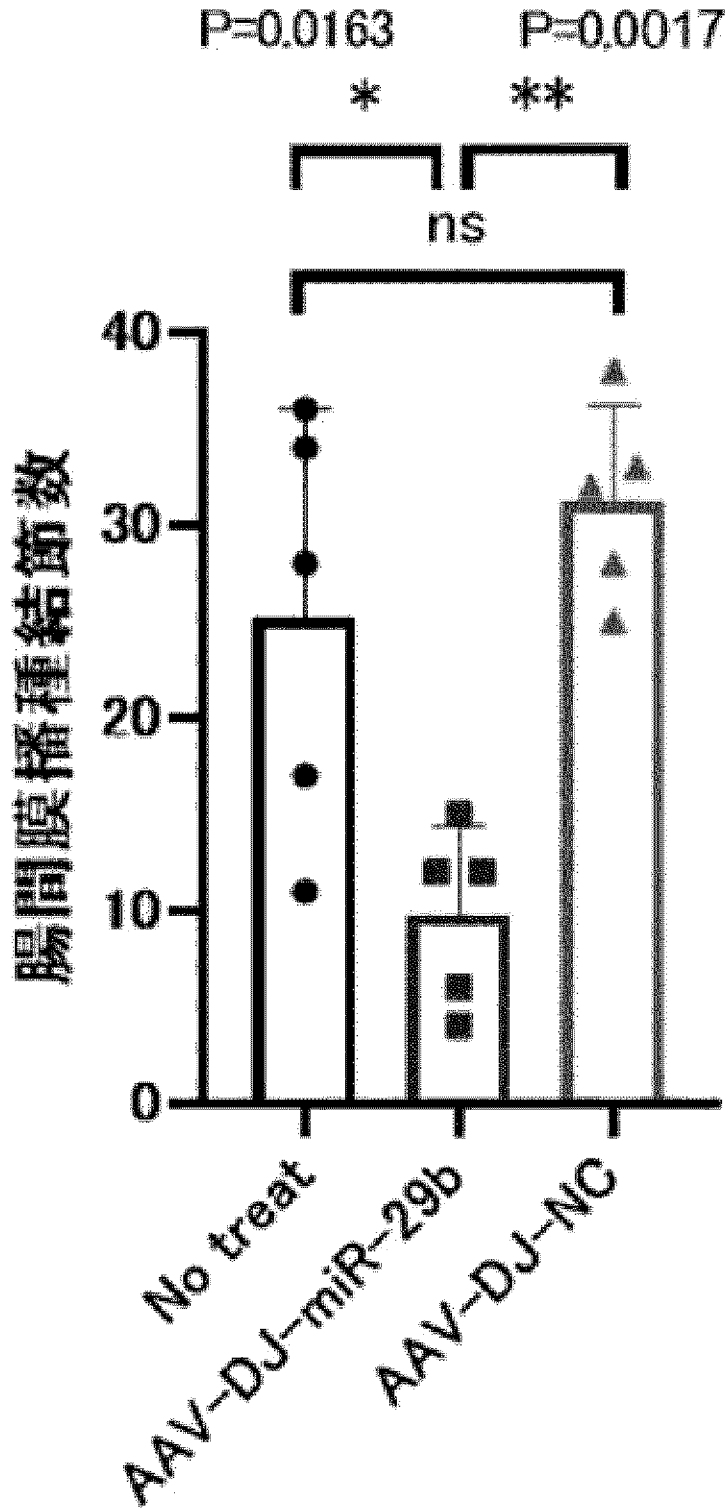
38



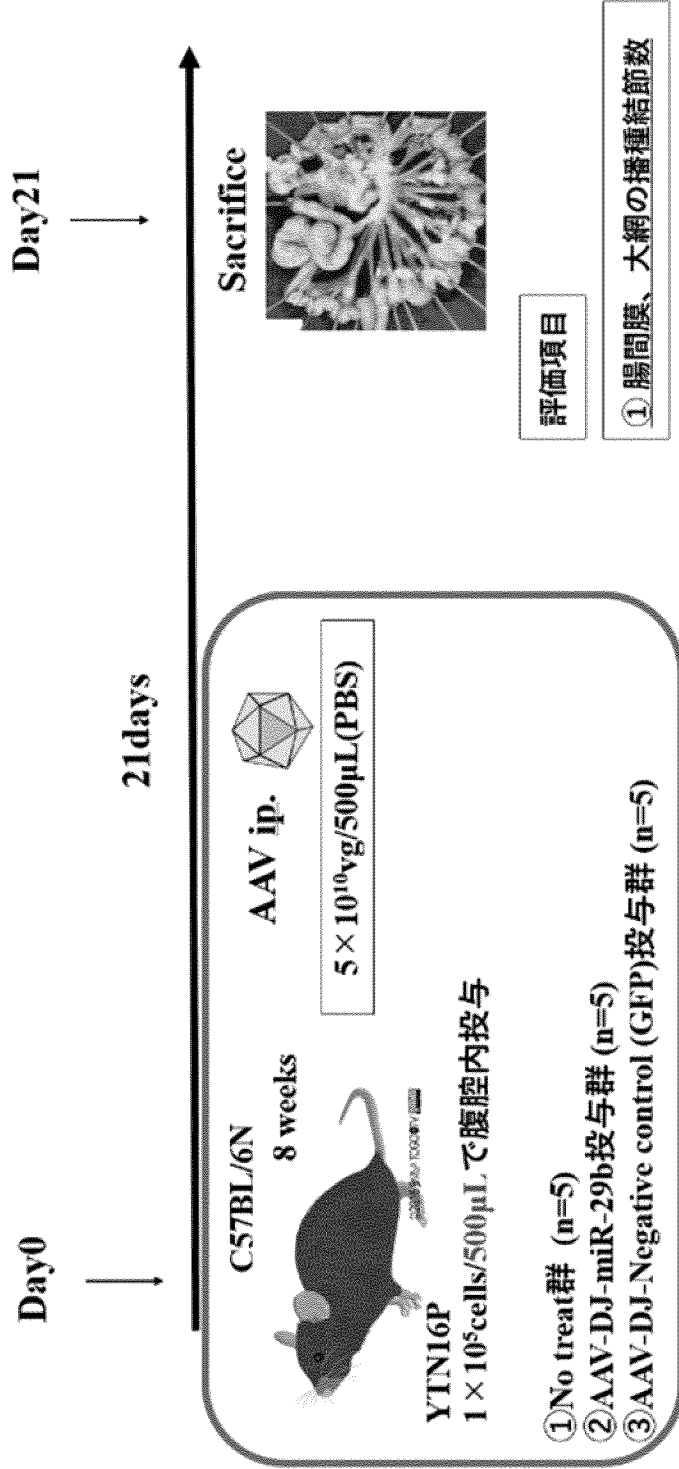
32

AAV-DJ-NC群

[図8B]

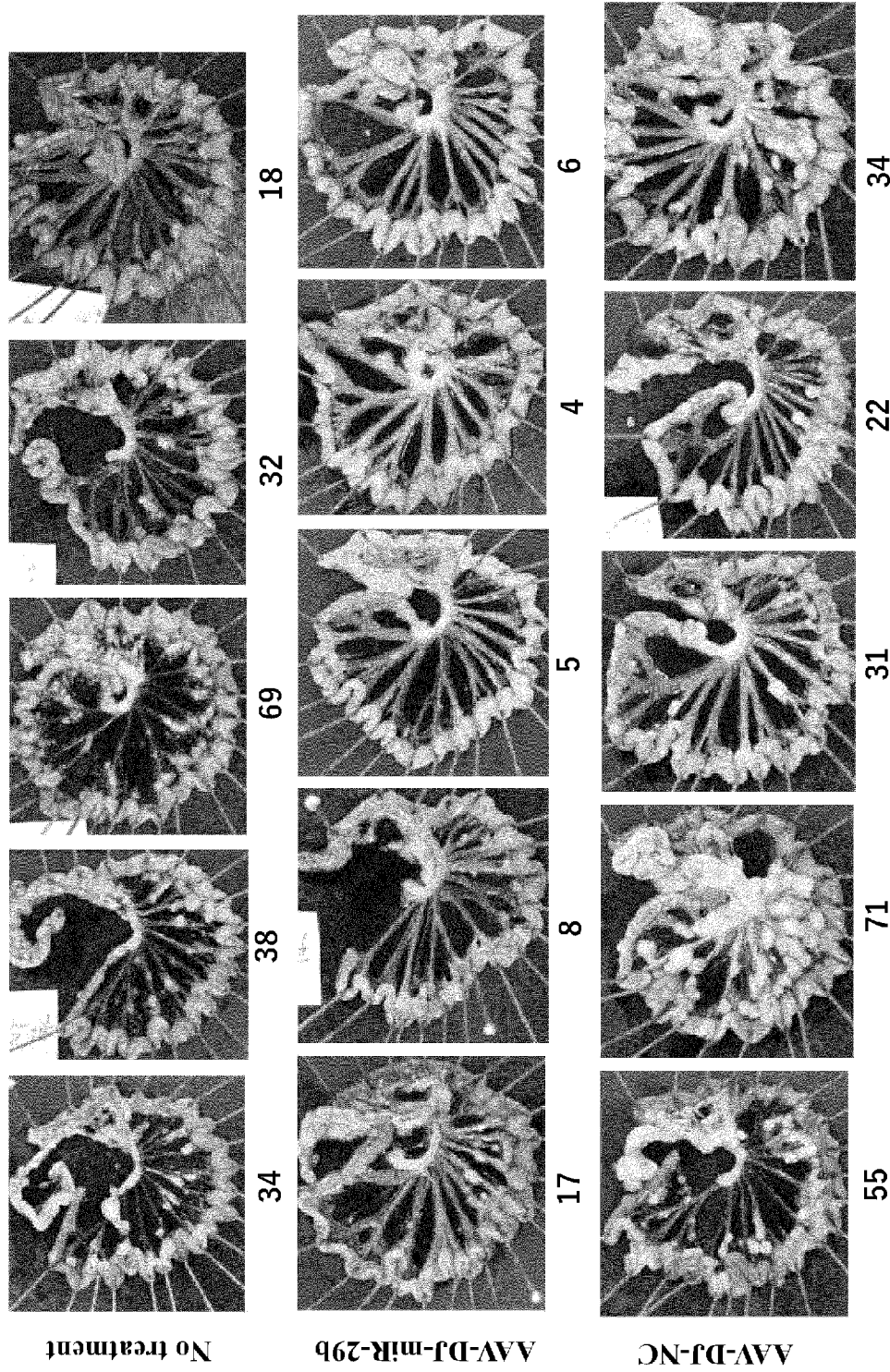


[図9]



腹膜播種抑制実験の概略（癌細胞播種と同時に投与：手術時の予防投与をイメージ）

[図10A]

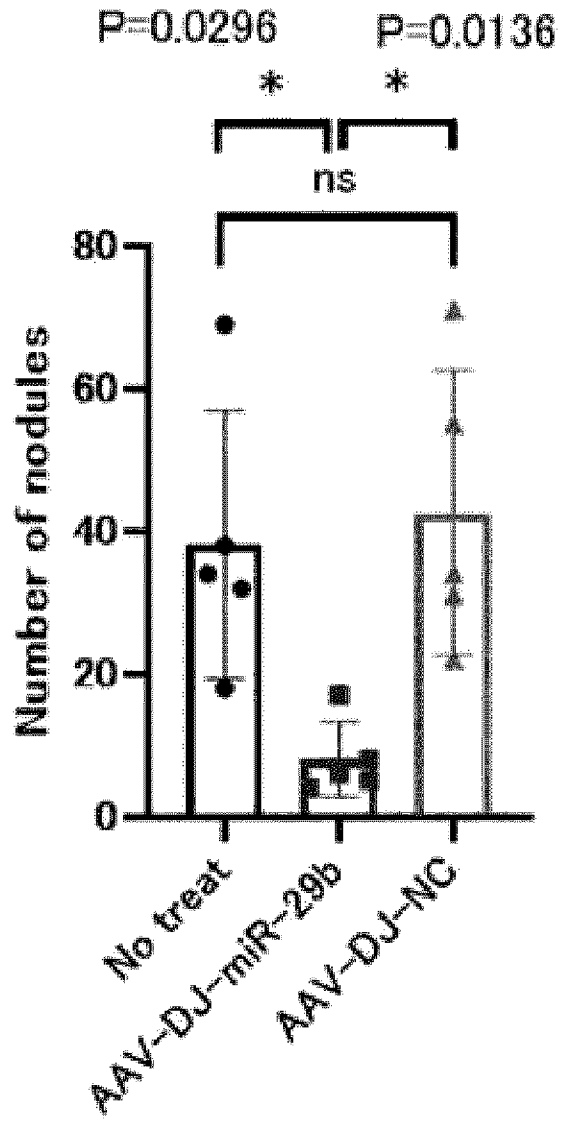


No treatment


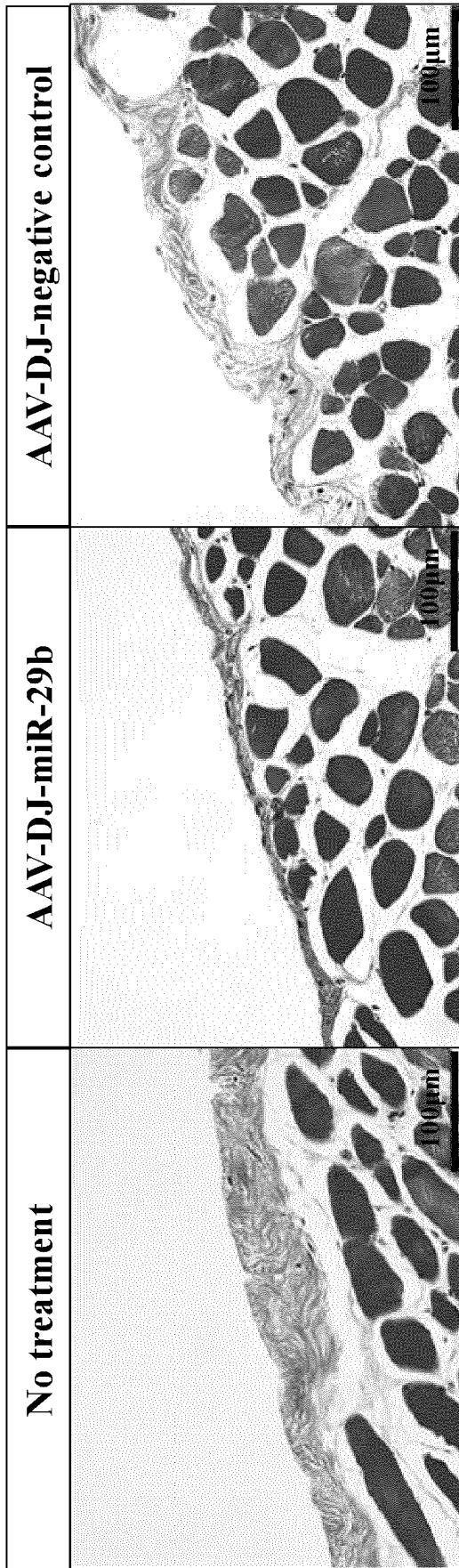
AAV-DJ-miR-29b

AAV-DJ-NC

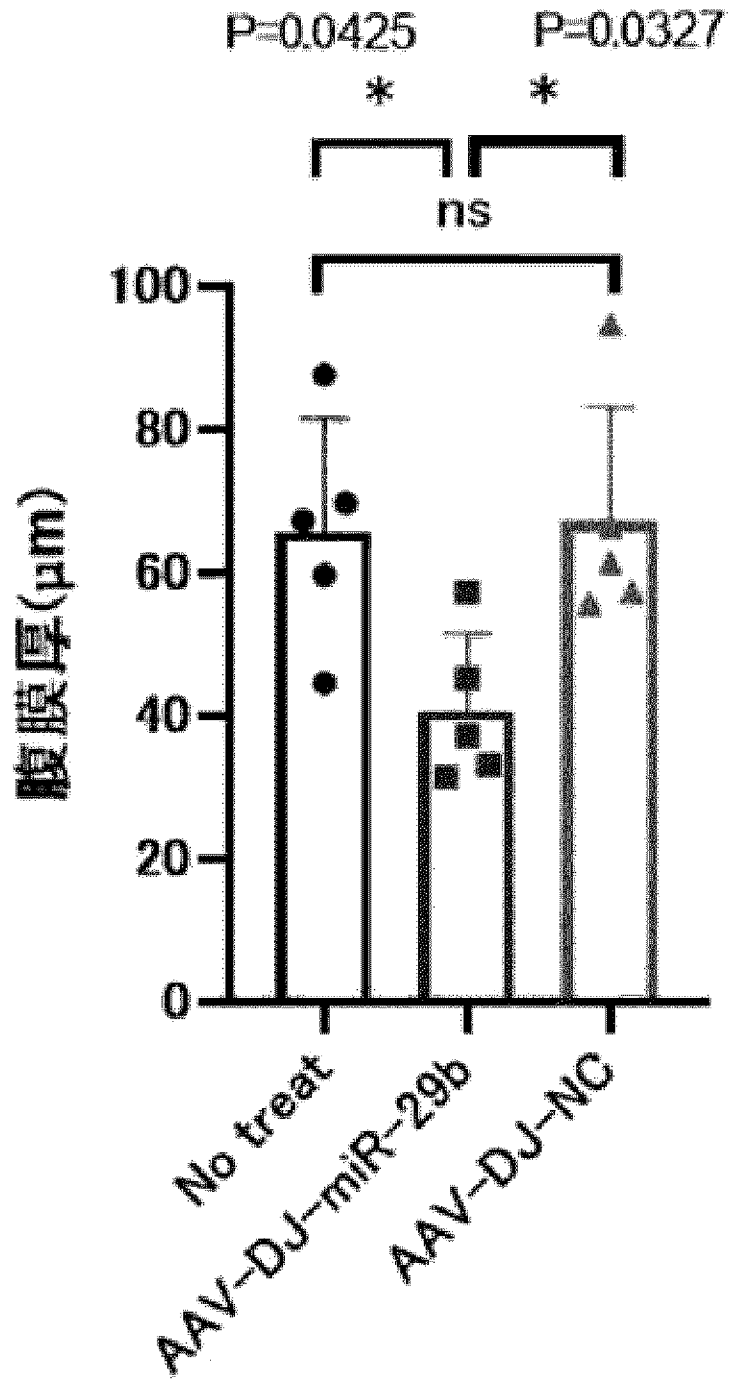
[図10B]



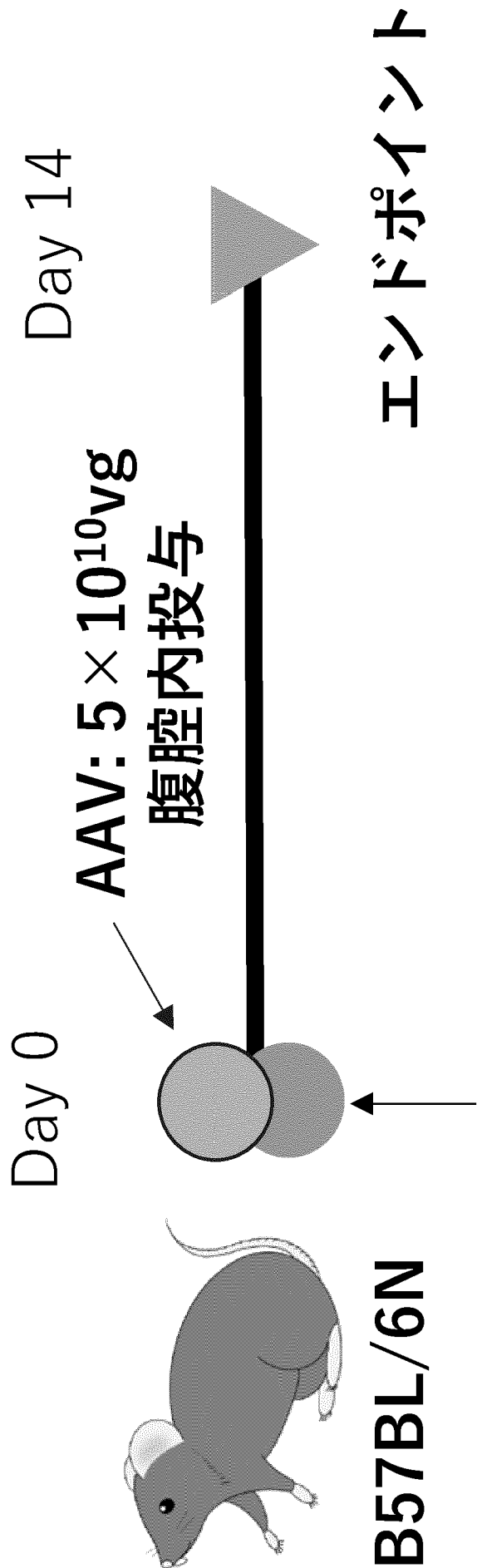
(1-way ANOVA で検定)


[11A]**Masson's Trichrome staining of parietal peritoneum****(x400)**

[図11B]

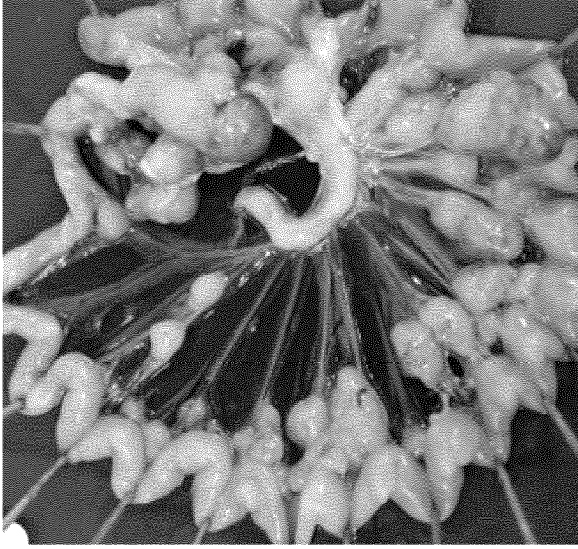


[図12A]

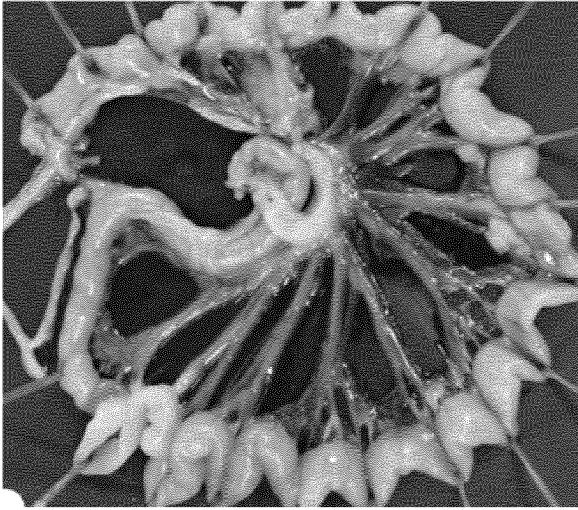


[12B]

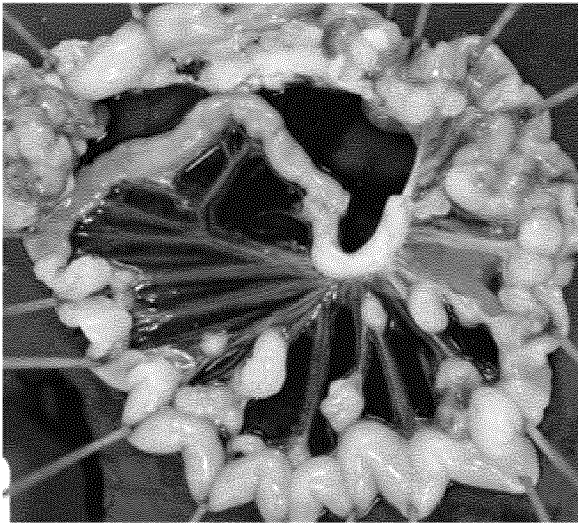
AAV-DJ-NC



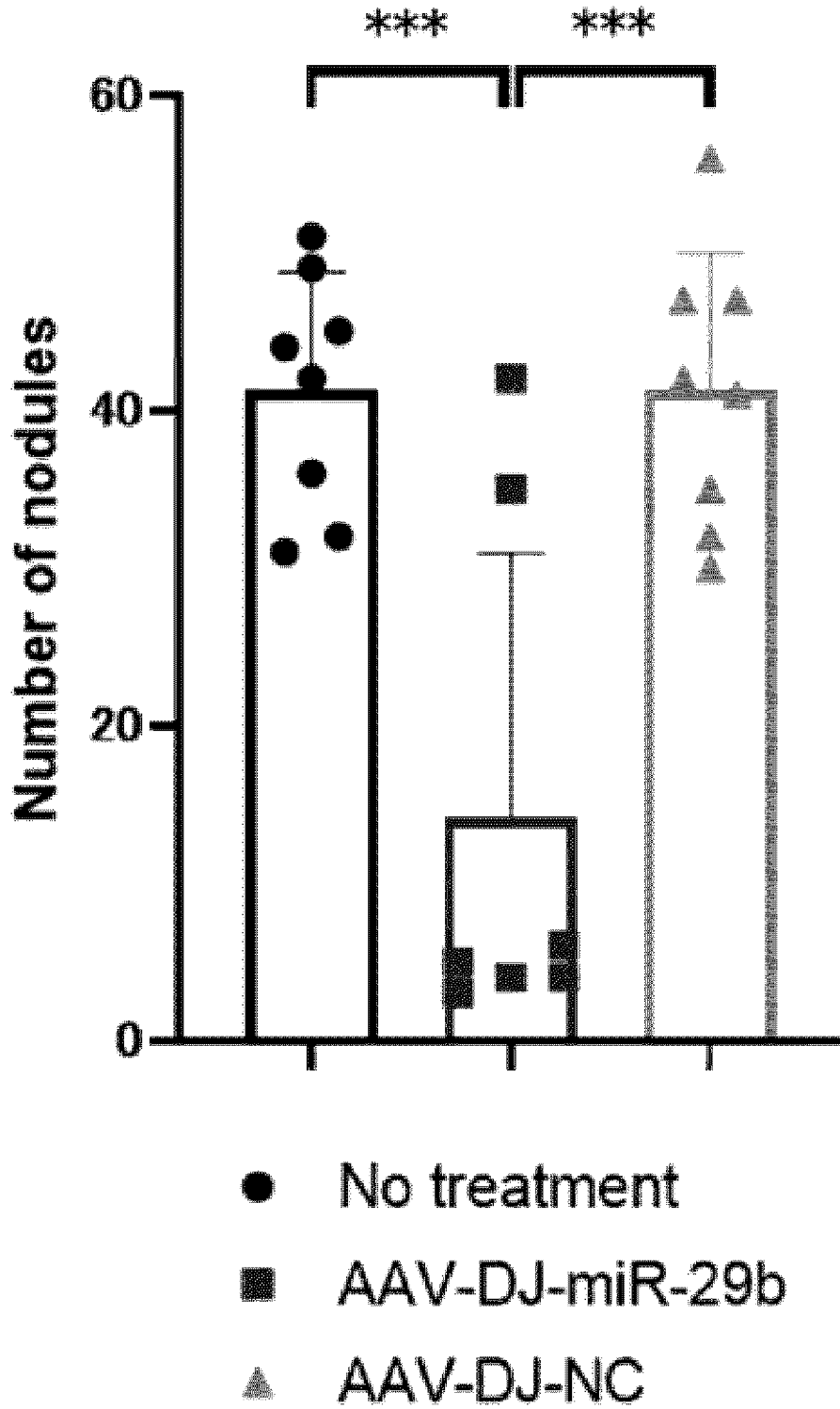
AAV-DJ-miR-29b




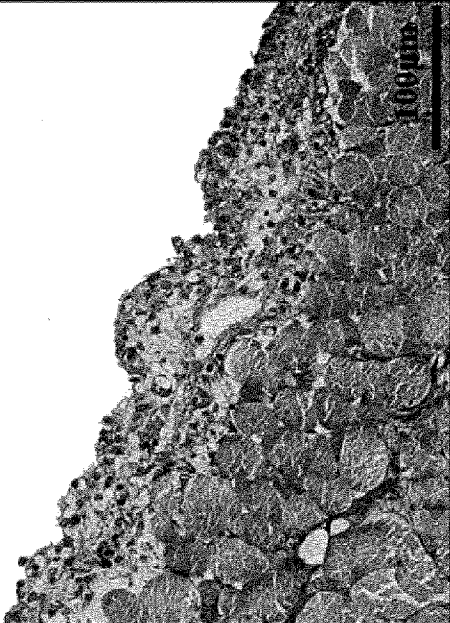


No Treatment



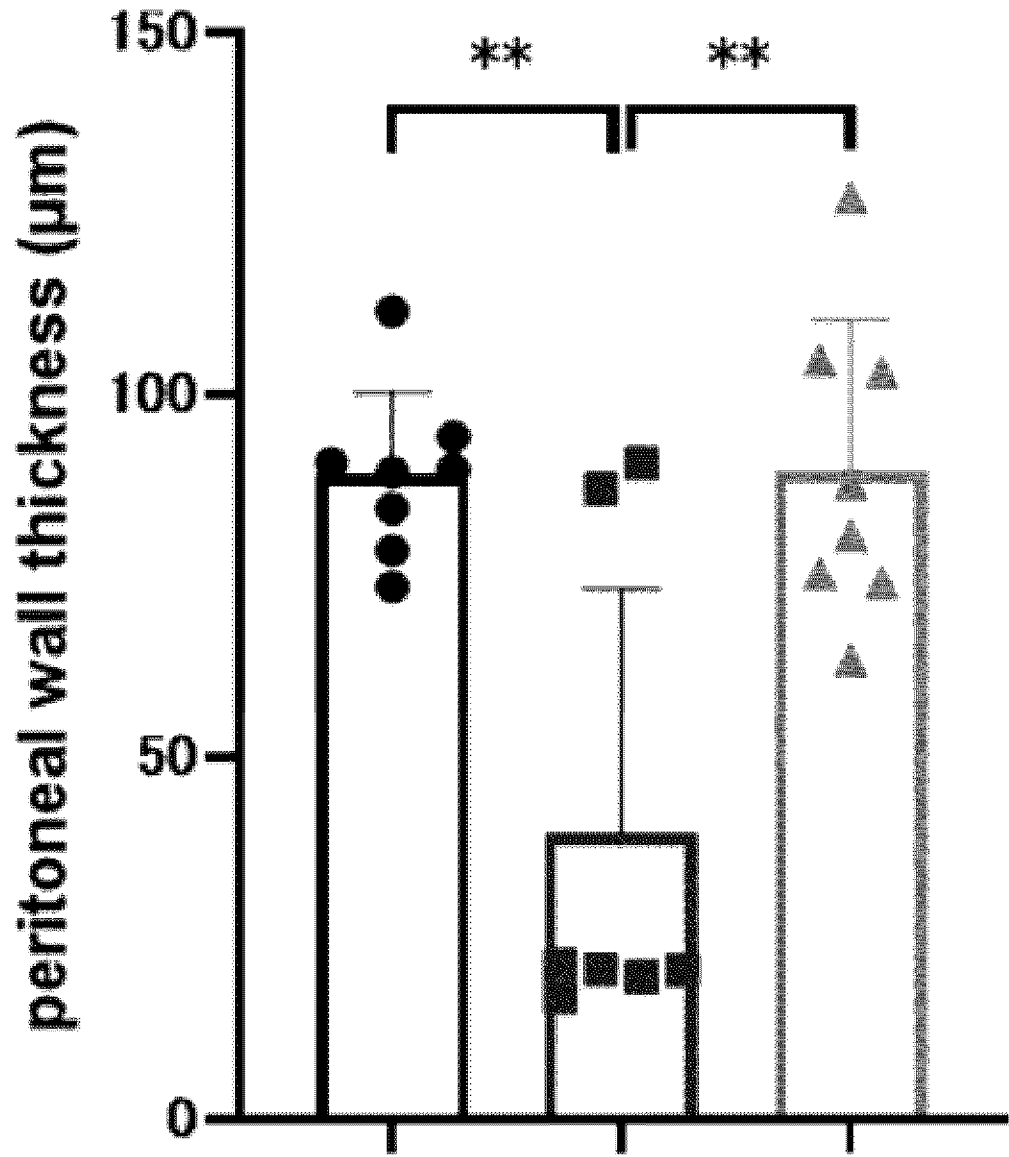
[図12C]



[12D]

No treatment	AAV-DJ-miR-29b	AAV-DJ-NC
		

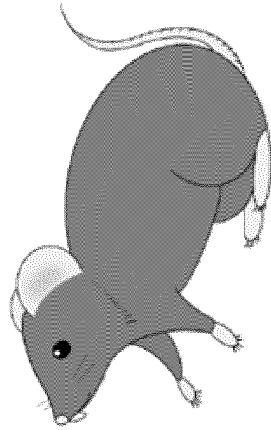
[図12E]



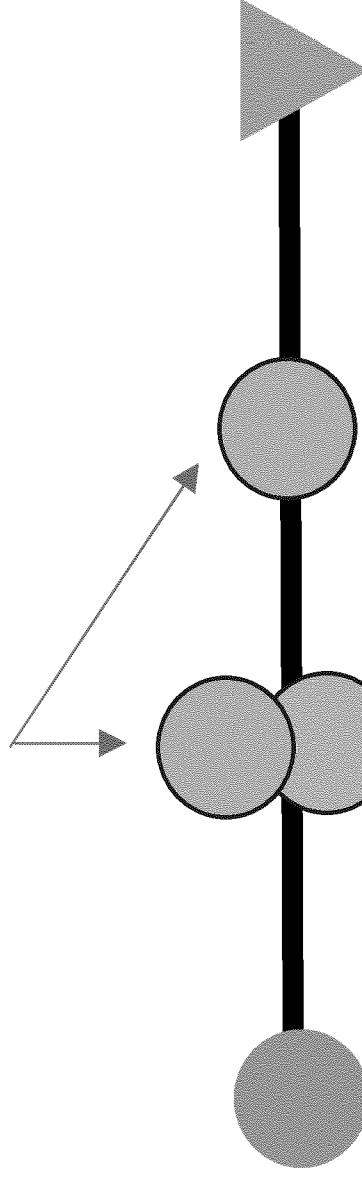
[図13A]

Day 0 7 14 21

パクリタキセル (200 μ g)
腹腔内投与




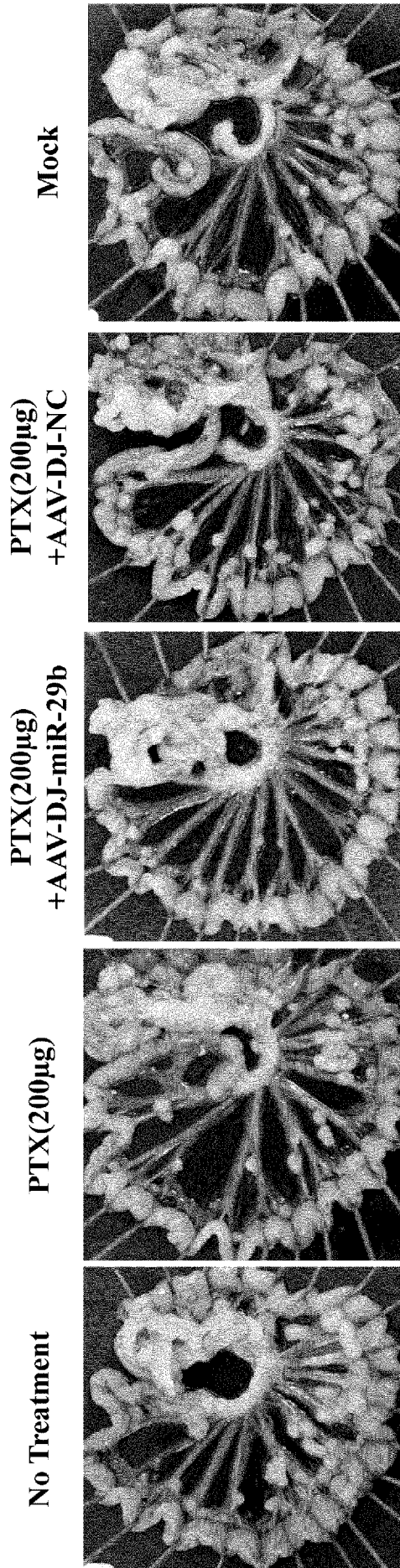
B57BL/6N



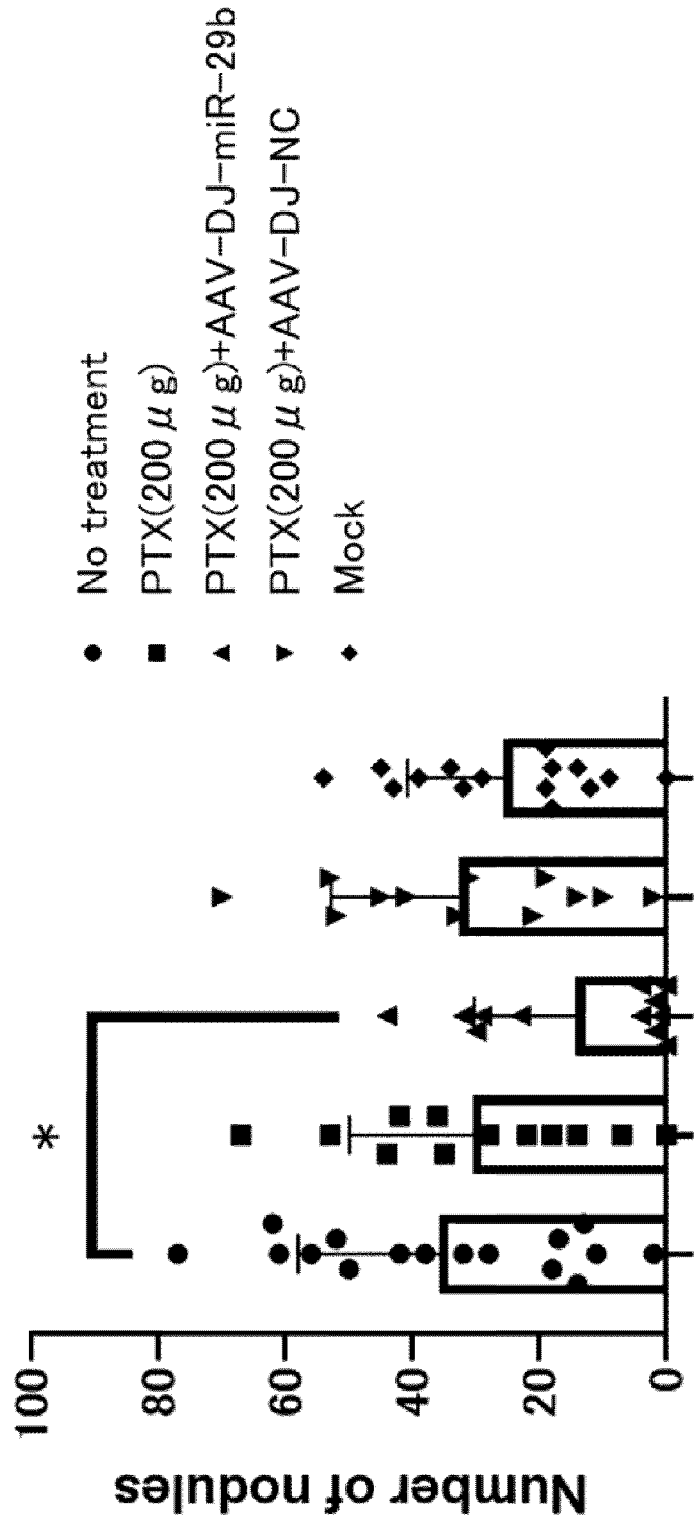
エンドポイント

マウス胃癌細胞 YTN16P:
5 \times 10⁵ cells 腹腔内投与

AAV: 5 \times 10¹⁰vg
腹腔内投与

[13B]

[Figure 13C]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/044802

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p>A61K 35/76(2015.01)i; A61K 31/7105(2006.01)i; A61K 45/00(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 35/04(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C12N 15/864(2006.01)n FI: A61K35/76 ZNA; A61K31/7105; A61K45/00; A61K48/00; A61P35/04; A61P43/00 121; C12N15/864 100Z</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K35/76; A61K31/7105; A61K45/00; A61K48/00; A61P35/04; A61P43/00; C12N15/864		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KIMURA, Yuki et al. MiR-29b may suppresses peritoneal metastases through inhibition of the mesothelial-mesenchymal transition (MMT) of human peritoneal mesothelial cells. Scientific Reports. 07 January 2022, 12:205, <DOI: 10.1038/s41598-021-04065-2> abstract, pp. 2-3, fig. 7, p. 7	1-12
Y	JP 2013-216627 A (KYUSHU UNIV, THE UNIVERSITY OF TOKYO) 24 October 2013 (2013-10-24) examples 7-8, paragraph [0043]	1-12
Y	CHAUDHARY, Kunal et al. Nanotechnology and adeno-associated virus-based decorin gene therapy ameliorates peritoneal fibrosis. Am J Physiol Renal Physiol. 2014, vol. 307, pp. F777-F782, <DOI: 10.1152/ajprenal.00653.2013> p. F777, right column, 2nd paragraph, p. F779, right column, 2nd paragraph, fig. 6	1-12
Y	SUGANO, Hanako et al. Fetal Gene Therapy for Lethal Murine Hypophosphatasia. Molecular Therapy. 2011, vol. 19, Suppl. SUPPL. 1, p. S174, Abstract Number: 451 abstract	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“D” document cited by the applicant in the international application</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 31 January 2024		Date of mailing of the international search report 20 February 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/044802

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2009-46450 A (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 05 March 2009 (2009-03-05) paragraphs [0040]-[0041]	8, 11
A	JP 2019-512489 A (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, MIRECULE, INC) 16 May 2019 (2019-05-16) claims, paragraphs [0005]-[0006], [0110], example 12, tables 1-2	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/044802

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/044802

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2013-216627 A	24 October 2013	(Family: none)	
JP 2009-46450 A	05 March 2009	(Family: none)	
JP 2019-512489 A	16 May 2019	US 2019/0284554 A1 claims, paragraphs [0004]- [0005], [0116], example 12, table 1 WO 2017/156015 A2 EP 3426781 A2 CN 109312341 A	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K 35/76(2015.01)i; A61K 31/7105(2006.01)i; A61K 45/00(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 35/04(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C12N 15/864(2006.01)n FI: A61K35/76 ZNA; A61K31/7105; A61K45/00; A61K48/00; A61P35/04; A61P43/00 121; C12N15/864 100Z</p>														
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K35/76; A61K31/7105; A61K45/00; A61K48/00; A61P35/04; A61P43/00; C12N15/864</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2024年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2024年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2024年</td> </tr> </table> <p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); PubMed</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2024年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2024年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2024年				
日本国実用新案公報	1922 - 1996年													
日本国公開実用新案公報	1971 - 2024年													
日本国実用新案登録公報	1996 - 2024年													
日本国登録実用新案公報	1994 - 2024年													
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>KIMURA, Yuki et al., MiR-29b may suppresses peritoneal metastases through inhibition of the mesothelial-mesenchymal transition (MMT) of human peritoneal mesothelial cells, Scientific Reports, 2022.01.07, 12:205, <DOI: 10.1038/s41598-021-04065-2> Abstract, 第2 - 3頁、図7, 第7頁</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2013-216627 A (国立大学法人九州大学、国立大学法人 東京大学) 24.10.2013 (2013 - 10 - 24) 実施例7 - 8, 段落0043</td> <td>1-12</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CHAUDHARY, Kunal et al., Nanotechnology and adeno-associated virus-based decorin gene therapy ameliorates peritoneal fibrosis, Am J Physiol Renal Physiol, 2014, Volume 307, Pages F777-F782, <DOI: 10.1152/ajprenal.00653.2013> F777頁右欄第2段落, F779頁右欄第2段落, Fig. 6</td> <td>1-12</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	Y	KIMURA, Yuki et al., MiR-29b may suppresses peritoneal metastases through inhibition of the mesothelial-mesenchymal transition (MMT) of human peritoneal mesothelial cells, Scientific Reports, 2022.01.07, 12:205, <DOI: 10.1038/s41598-021-04065-2> Abstract, 第2 - 3頁、図7, 第7頁	1-12	Y	JP 2013-216627 A (国立大学法人九州大学、国立大学法人 東京大学) 24.10.2013 (2013 - 10 - 24) 実施例7 - 8, 段落0043	1-12	Y	CHAUDHARY, Kunal et al., Nanotechnology and adeno-associated virus-based decorin gene therapy ameliorates peritoneal fibrosis, Am J Physiol Renal Physiol, 2014, Volume 307, Pages F777-F782, <DOI: 10.1152/ajprenal.00653.2013> F777頁右欄第2段落, F779頁右欄第2段落, Fig. 6	1-12
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号												
Y	KIMURA, Yuki et al., MiR-29b may suppresses peritoneal metastases through inhibition of the mesothelial-mesenchymal transition (MMT) of human peritoneal mesothelial cells, Scientific Reports, 2022.01.07, 12:205, <DOI: 10.1038/s41598-021-04065-2> Abstract, 第2 - 3頁、図7, 第7頁	1-12												
Y	JP 2013-216627 A (国立大学法人九州大学、国立大学法人 東京大学) 24.10.2013 (2013 - 10 - 24) 実施例7 - 8, 段落0043	1-12												
Y	CHAUDHARY, Kunal et al., Nanotechnology and adeno-associated virus-based decorin gene therapy ameliorates peritoneal fibrosis, Am J Physiol Renal Physiol, 2014, Volume 307, Pages F777-F782, <DOI: 10.1152/ajprenal.00653.2013> F777頁右欄第2段落, F779頁右欄第2段落, Fig. 6	1-12												
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>														
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献</p> <p>“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“&” 同一パテントファミリー文献</p>														
<p>国際調査を完了した日</p> <p>31.01.2024</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>20.02.2024</p>													
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>堂畑 厚志 4U 7880</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3439</p>													

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	SUGANO, Hanako et al., Fetal Gene Therapy for Lethal Murine Hypophosphatasia, Molecular Therapy, 2011, Vol. 19, Supp. SUPPL. 1, p. S174, Abstract Number: 451 A b s t r a c t	1-12
Y	JP 2009-46450 A (国立大学法人 東京大学) 05.03.2009 (2009 - 03 - 05) 段落0040-0041	8, 11
A	JP 2019-512489 A (ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリカ, アズ リプレゼンテッド バイ ザ セクレタリー, デパートメント オブ ヘルス アンド ヒューマン サービスズ, ミリキユール, インコーポレイテッド) 16.05.2019 (2019 - 05 - 16) 特許請求の範囲、段落0005-0006、段落0110、実施例12、表1-2、	1-12

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
 - a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 - b. 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a）
 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

2. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。

3. 補足意見：

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2023/044802

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2013-216627 A	24.10.2013	(ファミリーなし)	
JP 2009-46450 A	05.03.2009	(ファミリーなし)	
JP 2019-512489 A	16.05.2019	US 2019/0284554 A1 Claims, [0004]-[0005], [0116], Example 12, Table 1 WO 2017/156015 A2 EP 3426781 A2 CN 109312341 A	