HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Tumor-Derived Microvesicles Induce Proangiogenic Phenotype in Endothelial Cells via Endocytosis [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	川本, 泰輔
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11267号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56276
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Taisuke_Kawamoto_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（歯学）　　氏名　川本泰輔

学位論文題名

Tumor-Derived Microvesicles Induce Proangiogenic Phenotype in Endothelial Cells via Endocytosis

(がん細胞由来微小胞がエンドサイトーシスを介して血管内皮細胞に血管新性能をもたらす)

腫瘍血管は正常な血管と比較して形態的・機能的に異常であることが知られている. 我々はこれまで, 腫瘍組織から単離した腫瘍血管内皮細胞（Tumor Endothelial Cells: TEC）は正常血管内皮細胞（Normal Endothelial Cells: NEC）と比較して, 運動能・血管新生能が高いなど細胞生物学的な特性に違いがあることを報告してきた (Matsuda et al., BBRC, 2010, Ohga et al., Am. J. Pathol., 2012, Yamamoto et

al., Bri. J. Cancer, 2012). 一方で, こうした特性の獲得機序に関してはほとんど分かっていない. しかしながら, がん細胞由来の growth factor や cytokine などの液性物質, は, がん間質細胞の特性に影響を及ぼすことが報告されている. 我々はこれまで, がん細胞培養上清が NEC に薬剤耐性や血管新生能を亢進させることを報告した (Akiyama et al., Am. J. Pathol., 2012). これらの知見から, がん細胞由来の液性因子が TEC の異常性獲得の機序のひとつである事が示唆されている.

がん細胞由来因子の一つとして, Tumor-derived MicroVesicles (TMV) が知られている. TMV はがん細胞が分泌する直径 50 nm - 数μm の小胞である. TMV には数 100 ～数 1,000 種類に及ぶ RNA やタンパク質が含まれており, 様々な生理活性を示すことが報告されている (Ratajczak et al., Leukemia, 2006). また, 脂質膜に内包されることで酸・高塩濃度に耐性を示し, 生体内では物質輸送を介して異種細胞間・遠隔臓器間における情報交換を担うことが示唆されている.

本研究は,「がん細胞が分泌する TMV が血管内皮に作用し, 腫瘍血管内皮様の特性を誘導する」という仮説のもと, おこなわれた.

マウス皮膚から磁気ビーズ法により分離し, 初代培養されたマウス初代培養血管内皮細胞を NEC として実験に用いた. 血管内皮細胞は初代培養後に各種血管内皮細

胞マーカー（CD31，CD105，CD144）の発現が陽性であることを，PCR 及びフローサイトメトリーにより確認した．また，ヒトメラノーマの培養上清から超遠心法(110,000 g，70 min）を用いて TMV を回収した．BCA 法でタンパク濃度を定量し，50 μg/ml で血管内皮細胞へ処理した．

腫瘍細胞の培養上清をフローサイトメトリーで観察したところ，直径 1 μm 以下の微粒子が存在することが分かった．粒子サイズの測定正には直径が既知であるマイクロビーズを用いた．超遠心法で沈降させたこれらの微粒子を走査型電子顕微鏡で観察したところ，球状の構造体であることが確認された．また，回収した微粒子には TMV マーカーとして報告されている HLA，phosphatidylserine，actin が発現することをフローサイトメトリー及びウェスタンブロッティングで確認した．

まず，膜親和性のある蛍光色素である PKH26 dye で TMV を標識し，血管内皮細胞を処理し細胞内動態の変化を検討した．共焦点顕微鏡及びフローサイトメトリーを用いた観察により，PKH26 dye 由来の蛍光がマウス NEC において観察された．NEC における蛍光輝度は時間依存的に増加したことから，TMV が時間依存的に取り込まれたと考えられる．また，取り込まれた TMV は Lysotracker で染色された部分に認められたことから，endosome に局在していることが示唆された．これらの結果から，血管内

皮細胞による TMV の取り込みは endocytosis を介している可能性が考えられた. Endocytosis は低温処理や阻害剤で阻害できることが知られている (Harashima et al., Pharmacol. Rev., 2006). 血管内皮細胞による TMV の取り込みは endocytosis に依存するかどうかを検討するため, 低温条件下の TMV の取り込み量を解析した. NEC を 37℃, 室温, 4℃のそれぞれの温度条件において 30 min 処理後, PKH 26 dye-TMV を添加して 30 min 後に NEC 中の蛍光強度をフローサイトメトリーで解析した. NEC における TMV 由来の蛍光は 37℃処理条件で最も強く, 4℃ではほとんど観察されなかった. さらに, endocytosis 阻害剤である dynasore は, 濃度依存的に TMV の取り込みを抑制した. さらに, TMV 処理 24 時間後の NEC を透過型電子顕微鏡で観察すると, endocytosis 特有である細胞膜の陥入構造が観察された. 同様の構造は TMV 未処理の NEC では見られなかった. これらの結果から, NEC における TMV の取り込みは endocytosis 依存的であることが示された.

次に, TMVの取り込みが NEC に及ぼす作用を検討した. TMV の処理前後で NEC の time-lapse 観察をおこなったところ, TMV処理で NEC の運動能が約 1. 4 倍亢進し, dynasore で endocytosis を阻害するとTMVによる運動能の亢進はキャンセルされた. このことから, TMVによる NEC の運動能亢進には endocytosis が関与する

ことが示唆された.

運動能以外の血管新生能評価法として, tube formation assay が知られている (Benton et al., Angiogenesis, 2009). Tube formation assay はコラーゲンゲル (matrigel) 上に血管内皮細胞を播種し, 血管内皮細胞が形成するネットワークの長さ・数を定量する方法である. NEC を単独で播種した群または NEC に TMV を 50 μg/ml で加えて播種した群で, ネットワークの形成度合いを比較した. TMV 処理後では NEC の形成するネットワーク長の総和が約 1.4 倍増加した. また, 運動能と同様に, TMV によるネットワーク形成は dynasore でキャンセルされた. これらの結果から, TMV が endocytosis を介して NEC の血管新生能を亢進させる可能性が示された.

血管内皮細胞の血管新生能に関与する分子の一つとして, Akt (Protein kinase B) が知られている (Walsh et al., Circ. Res., 2002, Camussi, Curr. Vascular Pharmacol., 2010). また, これまでの研究においても, TEC では Akt の活性が高いことが報告されている (Camussi et al., FASEB J., 2003). これらのことから, TMV の取り込みにより亢進する血管新生能には, Akt の活性化が関与するのではないかと考えられた. TMV 処理後の NEC における Akt の活性をウェスタンブロッティングで検討したところ, TMV 処理 10 min 後から Akt のリン酸化が亢進した. さらに, Akt の上流に存在する PI3K

(Phosphoinositide 3-kinase) 阻害剤 (LY294002) を 20 μM で処理すると, TMV 処理後の Akt リン酸化がキャンセルされた. この結果から, TMV は PI3K の活性化を介して Akt を活性化させることが示された. 続いて TMV による PI3K/Akt の活性化には, endocytosis が関与するかを検討した. dynasore 処理下の NEC においては Akt のリン酸化は亢進しなかった. 以上の結果から, TMV による PI3K/Akt 経路の活性化には, endocytosis が重要であることが示唆された.

最後に, TMV の取り込みによる PI3K/Akt 経路の活性化が, NEC の血管新生能に直接関与するか検討した. LY294002 処理下の NEC における運動能・管腔形成能を解析したところ, TMV による運動能・管腔形成能の亢進が抑制された. これらの結果から, TMV による PI3K/Akt の活性化は, NEC における運動能・管腔形成能に関与することが示唆された.

TMV を介して血管内皮細胞へ輸送される様々な分子が報告されている. PI3K/Akt 経路を活性化する分子として特に growth factor などのサイトカインが知られている. TMV 依存的に PI3K/Akt を活性化し得る分子を同定するため, サイトカインアレイを用いて TMV 中のサイトカイン含有量を解析した. しかし, TMV にはサイトカインがほとんど含まれていなかった. 一方, TMV 膜を構成するリン脂質が Akt を活性化することが

他の研究グループからの報告において示されている(Gho et al., Cancer Res., 2002). PI3K/Akt を活性化する分子については, 今後のより詳細な検討が求められる.

本研究において, endocytosis を介した TMV の取り込みが, PI3K/Akt の活性化を通して血管内皮細胞の血管新生能獲得をもたらすことが示された. これらの結果から, がん微小環境における TMV は, 腫瘍血管の特性の一因であることが示唆された. 将来的には 新たな血管新生阻害療法の開発に際し TMV の取り込み阻害がその戦略のひとつになる可能性が示された.