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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（歯学）　氏名　川本泰輔

審査担当者	主査	教授	進藤　正信
	副査	教授	鄭　漢忠
	副査	特任准教授	樋田　京子

学位論文題名

Tumor-Derived Micro vesicles 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)

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。

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。申請者らはこれまで、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。さらに、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も報告しており、これらの知見からがん細胞由来の液性因子が TEC の異常性獲得機序のひとつである事が示唆されている。がん細胞液性由来因子の一つである Tumor-derived Micro Vesicles (TMV)はがん細胞が分泌する直径 50nm-数μm の小胞で、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。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」という仮説のもとに行われた。

実験にはマウス皮膚由来初代培養血管内皮細胞（NEC）を実験に用いた。ヒトメラノーマ細胞培養上清から超遠心法（110、000g、70min）を用いて TMV を回収し BCA 法でタンパク濃度を定量し、50 μg/ml で血管内皮細胞（NEC）を処理した。

まず、蛍光色素 PKH26 dye で標識した TMV で NEC 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、TMV がマウス NEC に取り込まれることが確認された。取り込まれた TMV は endosome に局在したことから、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 阻害法の一つである低温処理や endocytosis 阻害剤である dynasore は、TMV の取り込みを抑制した。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 観察および管腔形成能について検索したところ、TMV は NEC の運動能・管腔形成能を亢進させることが分かった。また、dynasore は TMV による運動能・管腔形成能を抑制したことから、これらの生理活性には TMV の取り込みが重要であることが示唆された。

血管内皮細胞の運動能・管腔形成能を亢進したことから細胞内シグナル伝達経路について検索を行った。TMV 処理した NEC では PI3K/Akt経路が活性化し、これらの応答は dynasore で阻害されたことから、NEC における PI3K/Aktは TMV の取り込み依存的に活性化することが示唆された。

最後に、TMV による運動能・管腔形成能の亢進に PI3K/Akt の活性化が関与するかを検討した。TMV による NEC の運動能・管腔形成能亢進は PI3K/Akt 経路阻害剤である LY294002 で抑制され、TMV の取り込みによる NEC の運動能・管腔形成能の亢進は PI3K/Akt 経路依存的であることが示唆された。

学位申請者による論文の概要説明後、各審査員より、本研究の背景、方法、結果、考察および関連の研究等について質問がなされた。

主な質問内容は、

1. TMV の含有物と粒子径等の物性における相関
2. TMV はどのような方法で定量的に計測するのか
3. 血管内皮細胞の運動速度はどのような方法で算出するのか
4. In vivo における腫瘍径と腫瘍血管（内皮細胞）に対する TMV の取り込み量は相関するか
5. 腫瘍血管内皮細胞はどのような部位から分離した細胞か
6. TMV の直径によって血管内皮細胞に対する取り込み機構に違いはあるか
7. 正常細胞が分泌する TMV にはどのような生理的意義があるか
8. 取り込まれた TMV は p-body などの細胞内小器官へ輸送される可能性はあるか
9. 抗炎症剤の使用はがん治療及び TMV の作用において効果が期待されるか
10. TMV を血中から除去する治療を想定した場合に有効であり得る治療開始のタイミ

ングは？
などであり、いずれの質問に対しても申請者から明確かつ的確な回答が得られ、さらに今後の研究についても発展的な将来展望が示された。

本論文は、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に関与することを明らかにし、がん微小環境における TMV が腫瘍血管の特性の一因であることを示唆すること、また将来的には新たな血管新生阻害療法の開発に際し TMV の取り込み阻害はその戦略のひとつになる可能性を示した点において、今後の腫瘍医学の発展に大きく貢献するものと評価された。さらに学位申請者は、本研究を中心とした専門分野はもとより、関連分野についても十分な学識を有していることを審査員一同が認め、学位申請者は博士(歯学)の学位授与に値するものと認められた。