



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	高転移性腫瘍細胞外小胞由来 miRNAは腫瘍血管内皮における薬剤耐性を誘導する [全文の要約]
Author(s)	鳥居, ちさほ
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12165号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62220
Type	doctoral thesis
File Information	Chisaho_Torii_summary.pdf



学位論文内容の要約

学位論文題目

高転移性腫瘍細胞外小胞由来 miRNA は 腫瘍
血管内皮における薬剤耐性を誘導する

博士の専攻分野名称 博士（歯学）氏名 鳥居 ちさほ

腫瘍血管新生は腫瘍の進展や転移に重要な役割を果たしている。近年、腫瘍血管内皮細胞 (Tumor endothelial cell: TEC) は 正常血管内皮細胞 (Normal endothelial cell: NEC) とは様々な点で異なることが知られている。Hida らもこれまでに、TEC の様々な異常性を報告してきた。その中でも驚くべき事実として、がん間質に存在する TEC にさえ染色体異常が存在することを見出している。さらに最近、TEC が抗がん剤耐性を示すこと、ABC トランスポーターの一つである P-glycoprotein や Aldehyde dehydrogenase (ALDH) などの幹細胞マーカーを発現し、骨分化能やスフェア形成能などの幹細胞性の一部を有していることを報告した。また、これらの TEC の薬剤耐性はがん細胞の培養上清処理により誘導されること、さらにがんの悪性度によって TEC の性質 (薬剤耐性の有無、染色体異常や幹細胞性の程度など) が異なることを明らかにし、TEC の異常性獲得メカニズムの一部にはがん細胞由来因子が関与していることを示唆した。しかし、TEC の薬剤耐性や幹細胞性獲得の分子メカニズムについては未だ不明な点が多い。

近年、がん細胞は細胞外小胞、Extracellular vesicles (EVs) を分泌し、さらに自らの悪性化に利用していることが報告されている。EVs は Exosome や Microvesicle (MV) などの総称で、その内部にタンパク、mRNA, microRNA (miRNA) を含み、細胞間の情報伝達に関与している。血管生物学教室の Kawamoto らもこれまでに、EVs の一種である MV に着目し、腫瘍細胞由来の MV が腫瘍血管新生を促進することを見出している。しかし、腫瘍細胞由来の EVs (腫瘍由来 EVs) が血管内皮にもたらす影響については未だ不明な点が多い。

本研究では、TEC が薬剤耐性や幹細胞性を獲得するメカニズムを明らかにすることを目的とし、腫瘍由来 EVs がこれらの TEC の異常性に寄与していると仮説を立て解析を行った。

まず、NEC と比較して、TEC では ALDH 活性が高い集団が存在した。in vivo においても、マウス腫瘍内においては ALDH 陽性血管が存在した。また、ヒト腎細胞癌においても、ALDH 陽性の腫瘍血管が存在した。

ALDH と TEC のもつ薬剤耐性との関係を明らかにするため、TEC の中で ALDH 活性の高い細胞集団 (ALDH high TEC) と低い細胞集団 (ALDH low TEC) をそれぞれフローサイトメーターにより分離した。ALDH high TEC では 5-FU による死細胞の割合が少なく、5-FU に対してより耐性を示した。さらに高転移性腫瘍細胞 (A375-SM) 移植マウスにおいて 5-FU 投与を行ったところ、5-FU 投与群では、CD31 陽性血管に占める ALDH 陽性血管の割合は増加していた。このことから、in vivo においても ALDH high TEC が 5-FU に対して耐性をもつことが示唆された。

次に TEC が幹細胞マーカーALDH の発現亢進や薬剤耐性を獲得するメカニズムとして、腫瘍細胞から分泌されている因子についてより詳細に解析した。

そこで、A375-SM の培養上清 (Tumor Conditioned Medium: Tumor CM) をヒト正常血管内皮細胞 (HMVEC) に処理すると、ALDH, IL-6 およびその他の幹細胞マーカーMDR-1, CD90, ALP, Oct-4 の発現が亢進した。また、

HMVEC は Tumor CM 処理によりスフェロイドを形成した。さらに、 Tumor

CM に骨分化誘導培地を加えて HMVEC を培養すると、骨芽細胞の分化マーカーである Osteocalcin の発現が亢進し、脂肪分化誘導培地を加えて培養すると、脂肪細胞の分化マーカーである GLUT4 の発現が亢進した。さらに、HMVEC は Tumor CM 処理により 5-FU に対する耐性を獲得した。このことから、Tumor CM 中には、血管内皮に幹細胞性や薬剤耐性を獲得させる何らかの因子が含まれている可能性が示唆された。

がん細胞では ALDH の発現には STAT3 の活性化が関与するという報告がある。そこで、Tumor CM による ALDH の発現亢進に STAT3 の活性化が関与しているかどうかを Western Blot 法により解析した。Tumor CM により pSTAT3 のタンパク量が増加し、STAT3 の活性化が起こることが示された。同時に、Tumor CM による ALDH と IL-6 の発現亢進は、STAT3 リン酸化阻害剤 S3I-201 により濃度依存的にキャンセルされ、Tumor CM 処理された血管内皮細胞における ALDH や IL-6 の発現亢進には、STAT3 の活性化が関与することが示唆された。

次に ALDH や IL-6 の発現亢進を誘導する因子を特定するために、われわれは

Tumor CM 中ならびに腫瘍由来 EVs の miRNA を解析することとした。

miRNA array により正常細胞の培養上清と比較して Tumor CM 中に多く存在

し、低転移性腫瘍と比較して高転移性腫瘍由来 EVs 中に多く存在していた

miR-X に着目した。

miR-X が STAT3 の活性化、および ALDH や IL-6 の発現亢進の機序に関与す

るのかどうかを調べるために、HMVEC に miR-X を transfection し、

Western Blot 法により解析した。miR-X transfection により、pSTAT3 のタン

パク量が増加し、STAT3 が活性化されることが示された。同時に、ALDH と

IL-6 の発現が亢進していた。さらに、miR-X transfection により Akt が活性

化し、5-FU 処理後の死細胞の割合が減少し、耐性を示した。このことから、

腫瘍血管内皮の薬剤耐性獲得機序の少なくとも一部には腫瘍細胞 EVs 由来の

miR-X による STAT3 の活性化を介した IL6 の発現誘導や Akt の活性化が関与

していると示唆された。

腫瘍血管内皮における薬剤耐性の分子メカニズムとして ALDH の関与を想定した。しかし、si RNA を用いた ALDH ノックダウンによって、TEC における 5-FU への薬剤耐性はキャンセルされなかった。このことにより、ALDH は薬剤耐性に関与していないことが示唆された。そこで、薬剤耐性との関連が報告されている IL-6 に着目した。HMVEC において recombinant IL-6 (r IL-6) により Akt のリン酸化が亢進し、5-FU に対する薬剤耐性を示した。さらに、IL-6 受容体中和抗体により、rIL-6 による薬剤耐性がキャンセルされた。これらのことから、血管内皮細胞は IL-6 オートクライン機構により、5-FU に対する耐性を獲得することが示唆された。

今回、われわれは腫瘍細胞 EVs 由来 miRNA により血管内皮が薬剤耐性を獲得することを証明した。本研究により、腫瘍細胞 miR-X の標的化、また腫瘍血管内皮における IL-6 の阻害など、血管新生阻害療法の新しい戦略に応用が可能であると考えられる。