HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	転移性腫瘍細胞外小胞miRNAによる血管内皮の形質変化とがん転移促進メカニズムの解明［全文の要約］
Author(s)	森本, 真弘
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13495号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74162
Type	doctoral thesis
File Information	Masahiro_Morimoto_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要約

学位論文題目

転移性腫瘍細胞外小胞 miRNA による血管内皮の形質変化とがん転移促進メカニズムの解明

博士の専攻分野名称　　博士（歯学）　　氏名　森本　真弘

腫瘍血管は腫瘍細胞が遠隔転移をする際の経路となっており，重要な役割を担っている．われわれはこれまでに，腫瘍血管の内側を構成する腫瘍血管内皮細胞 (Tumor Endothelial Cell, TEC) が正常血管内皮細胞 (Normal Endothelial Cell, NEC) と比べて，様々な異常性をもつことを報告してきた．しかし， TEC が異常性を獲得するメカニズムについては未だ不明な点が多い．これまでわれわれは， TEC の異常性における腫瘍微小環境因子の関与についていくつかの知見を見出してきた．例えば，TEC は薬剤排出ポンプである ABC トランスポーターの一つ，P-glycoprotein (p-gp) の発現が高く，抗がん剤耐性を示し，その薬剤耐性は腫瘍細胞が分泌する VEGF によって誘導される．また，悪性度の異なるがんにおいては，増殖能や遊走能，薬剤耐性や幹細胞性など TEC の様々な性質が異なる．これらの結果は TEC の異常性獲得には，腫瘍微小環境因子が関与していることを示唆している．

近年，腫瘍微小環境において，腫瘍細胞が分泌する細胞外小胞 (Extracellular vesicles ; EVs) が注目されている．EVs は，様々な細胞から分泌される脂質二重膜で覆われた小胞であり，タンパク質，mRNA，miRNA を含む．EVs は細胞間情報伝達の役割を果たしており，腫瘍細胞が分泌する EVs が腫瘍の増大や転移に影響を及ぼすことが報告されている．われわれはこれまでに，低転移性腫瘍 EVs と比較して高転移性腫瘍 EVs に多く含まれる miRNA として miR-1246 を同定している．本研究では，EVs 中の miR-1246 が腫瘍の転移に果たす役割について，特に腫瘍血管に焦点をあててそのメカニズムを明らかにすることを目的とした．

はじめに，低転移性腫瘍細胞 (A375) および高転移性腫瘍細胞 (A375SM) の培養上清から EVs を単離して，透過型電子顕微鏡での観察および動的光散乱法により測定を行った．その結果，A375 と A375SM 由来 EVs はともに EVs として報告されている大きさと同様であることがわかった．また，これらの EVs には EV マーカーである CD9, CD63 タンパクが認められた．腫瘍由来 EVs を赤色蛍光色素 PKH26 で標識して不死化

したヒト血管内皮細胞 (iHMVEC) に処理したところ，血管内皮による EVs の取り込みが観察された. さらに, A375SM 由来 EVs は A375 由来 EVs よりも血管内皮の miR-1246 レベルを亢進させた．これらの結果から，miR-1246 は高転移性腫瘍由来 EVs を介して血管内皮に輸送されることが示された.

in vivo において高転移性腫瘍由来 EVs の転移への関与を調べるため，マウスに A375SM 由来 EVs を注射した後に腫瘍細胞を静脈内注射し，腫瘍細胞の肺への接着および肺転移を解析した．その結果，高転移性腫瘍由来 EVs は腫瘍細胞の肺への接着および肺転移を促進することが示された.

in vivo における miR-1246 の転移への関与を調べるために，われわれはレンチウイルスベクターを用いて miR-1246 をノックダウンした腫瘍細胞を樹立し，この腫瘍細胞をマウスに皮下移植した．miR-1246 ノックダウン腫瘍群とコントロール腫瘍群の間で腫瘍増殖には有意な差は認められなかった．しかし，肺を摘出して腫瘍細胞由来の GFP シグナルを評価したところ，miR-1246 ノックダウン腫瘍群では肺転移が抑制されていた．これらの結果から，miR-1246 は腫瘍の増大には直接関与しないが，転移を促進させていることが示唆された.

われわれは，miR-1246 による転移促進機構として，血管内皮と腫瘍細胞間の接着に着目した. 血管内皮細胞に発現する ICAM-1 は，血管内皮と腫瘍細胞の接着のための重要な分子であり，IL-6-STAT3 経路の活性化を介して発現が誘導されることが報告されている. iHMVEC に A375SM 由来 EVs 処理または miR-1246 を導入すると, IL-6 の mRNA 発現亢進，STAT3 の活性化，そして ICAM-1 の発現誘導が認められた．さらに，Recombinant IL-6 処理により iHMVEC の ICAM-1 発現が亢進し，STAT3 リン酸化阻害剤により A375SM 由来 EVs による ICAM-1 発現誘導がキャンセルされた．さらに，iHMVEC に A375SM 由来 EVs 処理または miR-1246 を導入すると，腫瘍細胞の接着が促進された．これらの結果から，高転移性腫瘍由来 EVs 中の miR-1246 が，IL-6-STAT3

経路の活性化を介して血管内皮の ICAM-1 発現亢進を誘導し, 腫瘍細胞の血管内皮への接着を促進することが示唆された.

もう一つの転移促進機構として，われわれは血管内皮細胞間接着に着目した．内皮細胞間接着は，adherence junction と tight junction によって形成される．Adherens junction を構成する接着分子は VE-Cadherin であり，tight junction は主に claudin-5 と zonula occludens-1 (ZO-1) から構成される． iHMVEC に miR-1246 を導入したところ，これらの接着分子のうち VE-Cadherin のみ発現が低下したため，VE-Cadherin に着目した．miRNA 標的遺伝子予測データベースおよび 3'UTR assay により，VE-Cadherin が miR-1246 の標的遺伝子であることが示された ．次に，高転移性腫瘍由来 EVs による血管内皮の透過性変化を評価するために，Permeability assay を行った．血管内皮に A375SM 由来 EVs 処理を行うと，血管内皮の下層に漏れ出る dextran が増加し，血管内皮モノレイヤーの透過性亢進が示された．これらの結果から，高転移性腫瘍 EVs 中の miR-1246 が VE-Cadherin 発現低下を介して血管内皮のバリア機構を破壊することによって血管透過性を亢進し，転移を促進する可能性が示唆された.

以上の結果から，高転移性腫瘍 EVs 中の miR-1246 は血管内皮に取り込まれ，内皮への腫瘍細胞の接着促進および血管内皮のバリア機構の破壊により転移を促進することが示唆された．本研究により，腫瘍細胞由来 EVs や miR-1246 の標的化が新たな転移抑制戦略につながる可能性が考えられる.