



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
Author(s)	森本, 真弘
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13495号
Issue Date	2019-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13495
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90937
Type	doctoral thesis
File Information	Masahiro_Morimoto.pdf



博士論文

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

平成31年3月申請

北海道大学
大学院歯学研究科口腔医学専攻

森本真弘

抄録

腫瘍血管は遠隔転移が生じる際に重要な経路となる。腫瘍細胞は、自らに都合の良い環境を作るために、細胞外小胞 (Extracellular vesicles ; EVs) を分泌する。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。

高転移性腫瘍の EVs をマウスに注射すると、腫瘍細胞の肺への接着と転移が増加することがわかった。逆に、高転移性腫瘍細胞の miR-1246 をノックダウンしてマウスに皮下移植すると、肺転移が減少した。そこでわれわれは、転移に関与する腫瘍細胞の血管内皮への接着と、血管内皮のバリア機構に着目した。血管内皮に高転移性腫瘍 EVs 処理または miR-1246 導入を行うと、IL-6-STAT3 経路を介して血管内皮細胞膜上の接着分子 ICAM-1 の発現が亢進し、血管内皮に接着する腫瘍細胞が増加した。また、miR-1246 導入によって血管内皮間接着分子 VE-Cadherin の発現が低下し、血管内皮モノレイヤーの透過性が亢進した。標的遺伝子予測データベースおよび 3' UTR assay により、VE-Cadherin は miR-1246 の標的遺伝子であることがわかった。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ることにより、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って転移を促進することが示唆された。

キーワード：腫瘍血管内皮細胞，細胞外小胞，転移，miRNA

緒言

腫瘍の増大には血管からの栄養と酸素の供給が必要であるため、血管新生が不可欠である¹⁾。また、転移はがんによる死亡原因の9割を占めるが、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^{2,3)}。腫瘍血管は周皮細胞の被覆の少なさや透過性亢進など、形態学的にも機能的にも正常血管とは異なることが知られている⁴⁾。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、染色体異常^{5,6)}や薬剤耐性⁷⁾など様々な異常性をもつことを報告してきた。また、Xiongらは、肝細胞癌由来のTECがNECと比較して血管新生能および薬剤抵抗性が高いことを報告している⁸⁾。しかし、どのようにしてTECが異常性を獲得するか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、抗がん剤耐性を示すこと、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ことを見出した^{7,9)}。また、悪性度の異なるがんにおいて、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とを報告した¹⁰⁾。このようにTECの多様性は、腫瘍微小環境因子がTECの異常性獲得に関与して

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¹¹⁾。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¹²⁾。われわれは過去に、腫瘍細胞由来の EVs が血管内皮に取り込まれ、Akt 活性化を介して血管新生能を亢進することを報告した¹³⁾。

miRNA は 20 塩基程度の non coding RNA で、標的 mRNA に結合して不安定化させるとともに、翻訳を阻害することでタンパク産生を抑制する¹⁴⁾。また、miRNA は EVs によって細胞間を移動し情報伝達物質として機能することも知られている。例えば、腫瘍細胞由来 EVs 中の miR-210 が血管内皮細胞に運ばれ血管新生を誘導すること¹⁵⁾や、EVs 中の miR-105 が血管内皮間の接着分子である ZO-1 を阻害し、腫瘍細胞の転移を促進すること¹⁶⁾が報告されている。しかし、EVs 中の miRNA が血管内皮の形質に与える影響についての報告は未だ少ない。われわれは、TEC の異常性獲得に関与する腫瘍微小環境因子として、腫瘍細胞が分泌する EVs 中の miRNA に着目した。そして、低転移性腫瘍由来 EVs と比較して高転移性腫瘍由来 EVs に多く含まれる miRNA として miR-1246 を同定し

た (Torii, 投稿中) .

転移の過程では, 腫瘍細胞は原発巣から遊走・浸潤して血管内皮細胞に接着した後, 内皮間を遊走して血管内に侵入する. その後, 血流によって体内を循環して遠隔臓器の血管内皮に接着し, 血管外遊走を経て転移巣を形成する¹⁷⁾.

本研究では, 転移の過程において重要な血管内皮-腫瘍細胞間接着および血管内皮のバリア機構に着目し, 高転移性腫瘍由来 EVs 中の miR-1246 が血管内皮の形質を変化させ, 転移を促進する可能性およびそのメカニズムの解明を目的とした.

材料と方法

細胞と培養条件

ヒト皮膚微小血管内皮細胞 (Human dermis microvascular endothelial cell: HMVEC) およびヒト皮膚臍帯静脈血管内皮細胞 (Human umbilical vein endothelial cell: HUVEC) を Lonza (Tokyo, Japan) から購入し, *hTERT* を導入して不死化した (iHMVEC, iHUVEC) (Maishi N, 投稿中) . iHMVEC, iHUVEC はそれぞれ血管内皮専用培地 (Endothelial cell Growth Medium : EGM-2 MV, EGM-2, Lonza) で培養した. 低転移性メラノーマ細胞株 A375 は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) から得た. A375SM は, A375 から in vivo selection

によって樹立された高転移性メラノーマ細胞株で, Dr. Isaiah J Fidler (MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA) から供与された. A375 と A375SM は 10%牛胎仔血清 (FBS; Gibco, Grand Island, NY, USA) を含む最小必須培地 (minimal essential medium: MEM; Gibco) で培養した. 全ての細胞は 37°C, 5%CO₂-95%気相下において培養した.

RT-PCR と Real-time PCR

mRNA発現解析では, それぞれの細胞からReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Promega, Madison, WI, USA) を用いてtotal RNAを抽出した. 1 µgのRNAから ReverTra Ace, RT Buffer (ToYoBo, Osaka, Japan) , Oligo dT primer, Random primer, dNTP mixture (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて逆転写反応を行い, cDNAを合成した. Real-time PCRは, KAPA SYBER FAST qPCR Kit (Kapa Biosystems, KK4602, Woburn, MA, USA) を用いて, イニシャルインキュベーション (95°C 5分) , 熱変性 (95°C 1秒) , アニーリング・伸長反応 (60°C 5秒) を40サイクル行い, CFX Manager (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) で増幅産物を定量した. 内部標準には *GAPDH*を用い, $\Delta\Delta$ Ct法をもとに相対比を算出した. 以下に使用したプライマーの配列を示す.

human *GAPDH*: forward, 5'-ACAGTCAGCCGCATCTTCTT-3', reverse,

5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'

human *VE-Cadherin*: forward, 5'- AAGTACAGCATCTTGCGGGGCGAC-3', reverse,

5'-TTGATGATGCCCTCGTTGTGGGCG-3'

human *ICAM-1*: forward, 5'-GGCAAGAACCTTACCCTACGCTGCC-3', reverse,

5'-GTTTCAGTGCGGCACGAGAAATTGGC-3'

human *Claudin-5*: forward, 5'-AAGATTGAGAGCTGCCAGAGGC-3', reverse,

5'-TACCCTCTTTGAAGGTTTCGGGG-3'

human *ZO-1*: forward, 5'-GGGGAGGGTGAAGTGAAGA-3', reverse,

5'-AGGCATTTCTGCTGGTTAGTATG-3'

human *IL-6*: forward, 5'-TACCCCCAGGAGAAGATTCC-3', reverse,

5'-TTTTCTGCCAGTGCCTCTTT-3'

miRNA発現解析では、それぞれの細胞からRNeasy Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) を用いてtotal RNAを抽出した。TaqMan miRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて逆転写反応を行い、cDNAを合成した。Real-time PCRは、TaqMan Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems) を用いて、イニシャルインキュベーション (95°C 10分) , 熱変性 (95°C 10秒) , アニーリング・伸長反応 (60°C 1分) を40サイクル行い、CFX Manager (Bio-Rad) で増幅産物を定量した。内部標準には*RNU6B*を用い、外

部標準にはcel-miR-39を使用した。各プライマーは、TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems) を用い、 $\Delta\Delta$ Ct法をもとに相対比を算出した。

レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入

各レンチウイルスベクターは、パッケージングプラスミド (pCAG-HIVgp) , VSV-G-REV プラスミド (pCMV-VSV-G-RSV-REV) を用いて HEK293T (ヒト胎児腎細胞) に FuGENE HD Transfection Reagent (Promega) で遺伝子導入した。レンチウイルスを用いた遺伝子導入は H. Miyoshi の方法¹⁸⁾ に準拠した。Anti-miR-1246 A375SM, Control-miR A375SM 細胞株樹立のために、それぞれ miRZip-1246 Anti-miR-1246 microRNA construct , Scramble Hairpin Control Anti-MicroRNA Construct (System Biosciences, California, USA) を使用した。tdTomato-luc2 A375 細胞株の樹立には、ptdTomato-C1 vector (Clontech, Clontech, Palo Alto, CA, USA) , pGL4.50 [luc2/CMV/Hygro] vector (Promega) を pCSII-CMV-MCS の EcoRI-NotI 部位に挿入し、pCSII-CMV-tdTomato-luc2 を作成して使用した。

マウス実験

6週齢の雌ヌードマウス (BALB/c AJcl-nu/nu) は日本クレア株式会社から購入

し, specific pathogen-free (SPF) の環境で飼育した。全行程は, 北海道大学動物実験指針を遵守して行われた。

EVs 注射による転移実験においては, ヌードマウスに $3\ \mu\text{g}$ の A375SM 由来 EVs を 1 週間に 2 回 (計 5 回) 静脈内注射した後, 2.0×10^5 cells の tdTomato-luc2 A375 を静脈内注射した。コントロールとしては PBS を用いた。24 時間後に VivoGlo Luciferin, In Vivo Grade (Promega) を腹腔内投与後, IVIS Spectrum (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA) を用いて腫瘍細胞のシグナルを検出し, 肺への接着を解析した。注射から 40 日後, 同様に腫瘍細胞のシグナルを検出し, 肺転移を解析した。

腫瘍細胞の皮下移植実験においては, 1.0×10^6 cells の Anti-miR-1246 A375SM, Control-miR A375SM を HBSS に懸濁し, ヌードマウスの皮下に移植した。28 日後, 肺を摘出し, IVIS Spectrum を用いて肺に存在する腫瘍細胞の GFP シグナルを評価した。

EVs の単離

EVs を除去した FBS を 10% 含有する MEM で, A375, A375SM を 48 時間培養した (1×10^6 cells) 。前処理として培養上清を $2000 \times g$, 4°C , 10 分間遠心分離し, その上清を $0.2\ \mu\text{m}$ filter unit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) で濾過

した。EVs の単離には、前処理済みの上清を $175,000 \times g$, 4°C , 84 分間超遠心分離した。超遠心分離には、Optima XPN-80, SW32Ti (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) を使用した。沈殿物を PBS で洗浄し、再度同条件で超遠心分離して、PBS に懸濁して EVs 溶液とした。以降、通法に従い¹⁹⁾、タンパク質量により実験条件間の EVs の量をあわせた。タンパク質濃度の測定には、Micro BCA protein assay kit (Thermo Scientific) を使用し、血管内皮細胞への EVs 処理には、 1.0×10^5 cells あたり 3ug の EVs を使用した。

EVs の観察およびサイズ測定

透過型電子顕微鏡を用いた EVs の観察方法は、Yamashita らの方法²⁰⁾を参考にした。EVs 溶液に等量の 4%パラホルムアルデヒド (PFA)を加えた。30 分後、グリッド (応研商事, Tokyo, Japan) に載せ、20 分間吸着させた。1%グルタルアルデヒドで 2 分間固定し、滅菌水で 8 回洗浄した。1%酢酸ウラン染色を 10 分間行い、走査型電子顕微鏡 JEM-1400 (日本電子, Tokyo, Japan) で観察した。EVs の大きさは、Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Southborough, UK) を用いて測定した。

miRNA mimic transfection

iHMVEC を 6 well plate に 1×10^5 cells / well で播種した。24 時間後に Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて miRIDIAN microRNA Human hsa-miR-1246-Mimic (CN-001040, Dharmacon, GE Dharmacon, Lafayette, CO, USA) , miRIDIAN microRNA Mimic Negative Control (CN-001000-01-05, Dharmacon) を終濃度 25nM で transfection した。6 時間後に培地を EGM-2MV (Lonza) に交換し、以降の解析に用いた。

免疫細胞染色

miR-1246 mimic, miRNA mimic negative control (Dharmacon) を transfection した iHMVEC を 4%PFA で 10 分間固定した。PBS で 3 回洗浄後、5%ヤギ血清含有 PBS で 1 時間ブロッキングし、1 次抗体として 1:400 に希釈したマウス抗 VE-Cadherin 抗体 (BD Pharmingen, 555661, San Diego, CA, USA) を 4°C で 16 時間処理した。PBS で洗浄後、2 次抗体として 1:400 に希釈した Alexa Fluor 594 -抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen, 11032) を室温で 2 時間処理した。PBS で洗浄後、DAPI (同仁化学, Tokyo, Japan) で核染色を行い、Perma Fluor (Thermo Scientific) で封入した。観察には、Fluoview FV10i 共焦点顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いた。細胞あたりの VE-Cadherin 染色面積は、染色画像 5 視野をランダムに選択し、Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて算出した。

細胞による EVs の取り込み

カバーガラスを入れた 12 well plate に iHMVEC を 4×10^5 cells / well で播種し、5%血清含有 EBM2 (Lonza) で 24 時間培養した。PKH26 red fluorescent labeling kit (Sigma-Aldrich, MO, USA) で EVs を標識し、余剰分を除去するために 100K Amicon Ultra-0.5 mL centrifugal filter (Millipore, Bedford, MA, USA) を用いて洗浄した。iHMVEC に EVs を加え ($3 \mu\text{g} / 1.0 \times 10^5$ cells) , 24 時間後に 4%PFA で固定した。PBS で 3 回洗浄し、DAPI で核染色後、Perma Fluor (Thermo Scientific) で封入した。観察には、Fluoview FV10i 共焦点顕微鏡 (Olympus) を用いた。

Adhesion assay

iHMVEC に miR-1246 mimic, miRNA mimic negative control の transfection または EVs 処理してから 48 時間後に assay を行った。 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ の Fibronectin (Corning) でコーティングした 35mm dish に iHMVEC を播種して monolayer を形成させ、その上に tdTomato-luc2 A375 を播種し、3 時間経過後に 3 回 PBS で洗浄し、接着していない腫瘍細胞を除去した。4%PFA で 10 分間固定後、3 回 PBS で洗浄し、Fluoview FV10i 共焦点顕微鏡で血管内皮ものレイヤーに接着している腫瘍細胞を観察した。tdTomato-luc2 A375 の細胞数を 5 視野計測して比較した。

Permeability assay

Pore size 0.4 μ m Transwell (Corning, NY, USA) のメンブレン上に 5.0×10^4 cells の iHUEVC を播種し, 24 時間後に EVs 処理を行った. EVs 処理から 48 時間後, FITC-dextran (Average MW ~70,000; Sigma-Aldrich) を加え, 30 分間室温でインキュベートした. 漏れ出た FITC-dextran を含む下層の培地 100 μ l を 96 well plate に加え, Varioskan Flash (Thermo Scientific) で蛍光強度を測定し下層に漏れ出した FITC-dextran 量を測定した.

Western Blot 解析

細胞は RIPA バッファー [50 mM Tris-HCl (pH = 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, and 1 mM Na_3VO_4] で溶解して回収した. タンパクを 10%ポリアミドゲルにて電気泳動した後, 電気泳動ゲルから polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (Millipore) に転写した. メンブレンを 60 分 5%スキムミルク / TBST でブロッキングした. 1次抗体は 1:250 に希釈した抗 CD63 抗体 (Biolegend, 353013, San Diego, CA, USA) , 1:500 に希釈した抗 CD9 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, sc-59140, CA, USA) , 1:1000 に希釈した抗 STAT3 抗体 (Cell Signaling Technology, 12640S, Beverly, MA, USA) , 抗

pSTAT3 抗体 (Cell Signaling Technology, 9145S) , 抗 VE-Cadherin 抗体 (Abcam, ab33168, Cambridge, UK), 1:2000 に希釈した抗 ICAM-1 抗体 (Abcam, ab53013), 1:5000 に希釈した抗 β -actin 抗体 (Cell Signaling Technology, 4970) を 4°C, 16 時間処理した. 2 次抗体として 1:5000 に希釈した抗ラビット HRP 標識抗体 (Cell Signaling Technology, 7074) または抗マウス HRP 標識抗体 (Cell Signaling Technology, 7076) を室温, 60 分間処理した. シグナル検出は ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を用いて, LAS-4000 mini image analyzer (FUJIFILM, Tokyo, Japan) により検出した.

3' UTR assay

HEK293T に miR-1246 mimic, miRNA mimic negative control を transfection した. 24 時間後, 3'UTR clone of CDH5 for miRNA target validation (Origene, Rockville, MD, USA) を FuGENE HD Transfection Reagent (Promega) を用いて transfection した. 24 時間後に Dual-Luciferase Reporter assay system (Promega) を用いて発光させ, GloMax-Multi plus (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を比較した.

統計学的検定

統計学的検定には, 二群間比較の場合は Student's t-test や Mann-Whitney U test

を用い、三群間の場合は Tukey-Kramer 法を用いた。いずれも $p < 0.05$ をもって統計学的に有意差があるものとした。

結果

miR-1246 は高転移性腫瘍が分泌した EVs を介して血管内皮に取り込まれる

われわれは、高転移性腫瘍由来 EVs 中の miR-1246 が血管内皮に取り込まれ、内皮の形質を変化させることで、転移を促進するのではないかと考えた。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 を単離した。透過型電子顕微鏡での観察および動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering, DLS) による測定を行ったところ、A375 と A375SM 由来 EVs はともに直径約 150nm にピークがあり、EVs として報告されている大きさ²¹⁾と同様であることがわかった (Fig. 1A, B)。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 (Fig. 1C)。EVs 中の miR-1246 レベルを比較したところ、A375SM 由来 EVs は A375 由来 EVs と比べて miR-1246 レベルが 1.5 倍高いことが確認された (Fig. 1D)。血管内皮による EVs の取り込みを調べるために、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。処理から 24 時間後、PKH26 のシ

グナルが iHMVEC 内で観察され、血管内皮による EVs 取り込みが示唆された (Fig.1E) . さらに, A375SM 由来 EVs で処理された iHMVEC の miR-1246 レベルは, コントロールの 2.5 倍高く, A375 由来 EVs で処理された iHMVEC と比較しても有意に高いことがわかった (Fig. 1F) . 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.

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

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 in vivo イメージングシステムにより解析した (Fig. 2A) . 腫瘍細胞を注射してから 24 時間後, EVs 群の肺ではコントロール群と比較して有意に強い腫瘍細胞由来のルシフェラーゼシグナルが認められた (Fig. 2B, C) . さらに, 腫瘍細胞を注射してから 40 日後でも同様の結果が認められ, 腫瘍転移巣の形成が示唆された (Fig. 2D, E) . したがって, これらの結果から, 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唆された.

腫瘍細胞の miR-1246 ノックダウンは肺転移を抑制する

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 (Anti-miR-1246 A375SM) とコントロール (Control-miR A375SM) を樹立した。Anti-miR-1246 A375SM と Control-miR A375SM において、それぞれの細胞および EVs 中の miR-1246 レベルを比較したところ、Anti-miR-1246 A375SM は Control-miR A375SM における miR-1246 発現レベルの 50%以下に抑制されていることが確認された (Fig. 3A) . これらの腫瘍細胞をマウスに皮下移植し、28 日後に腫瘍と肺を摘出して以下の解析を行った (Fig. 3B) . 摘出時に採取したマウスの血清から EVs を単離し、miR-1246 レベルを比較したところ、Control-miR A375SM 移植マウスの血清由来 EVs に比べ、Anti-miR-1246 A375SM 移植マウスの血清由来 EVs の miR-1246 レベルが有意に低かった (Fig. 3C) . 腫瘍の増大に関しては二群間で有意な差は認められなかった (Fig. 3D) . しかし、摘出した肺における腫瘍細胞由来の GFP シグナルを評価したところ、Control-miR A375SM 移植マウスと比較して Anti-miR-1246 A375SM 移植マウスの肺でシグナルが弱く、腫瘍細胞の miR-1246 ノックダウンによって肺転移が抑制されたことがわかった (Fig. 3E, F) . 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。

miR-1246 は、IL-6-STAT3 経路の活性化を介して血管内皮の ICAM-1 の発現を亢進させる

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る²²⁾。ICAM-1 は、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²³⁾。iHMVEC に A375SM 由来 EVs 処理すると *IL-6* の mRNA 発現が 1.7 倍に増加し (Fig. 4A) , miR-1246 を transfection すると *IL-6* の mRNA 発現は 4.5 倍に増加した (Fig. 4B) 。一方、Anti-miR-1246 A375SM 由来 EVs 処理した iHMVEC は、Control-miR A375SM 由来 EVs 処理した iHMVEC と比較して *IL-6* の mRNA 発現が 0.7 倍であり、*IL-6* 発現亢進を誘導しなかった (Fig. 4C) 。また、iHMVEC に A375SM 由来 EVs 処理または miR-1246 を transfection すると、STAT3 の活性化が認められた (Fig. 4D, E) 。さらに、iHMVEC に A375SM 由来 EVs 処理すると *ICAM-1* の mRNA 発現量が 2.0 倍に増加し、miR-1246 の transfection によって *ICAM-1* の mRNA 発現は 2.2 倍に増加した (Fig. 4 F, G) 。一方、Anti-miR-1246 A375SM 由来 EVs 処理した iHMVEC は、Control-miR A375SM 由来 EVs 処理した iHMVEC と比較して *ICAM-1* の mRNA 発現が 0.7 倍であり、*ICAM-1* 発現亢進を誘導しなかった (Fig. 4H) 。Recombinant IL-6 処理は iHMVEC の *ICAM-1* 発現を 1.6 倍に増加させ (Fig.

4I), A375SM 由来 EVs により 1.2 倍に増加した *ICAM-1* の発現は, STAT3 リン酸化阻害剤 S3I-201 によりキャンセルされた (Fig. 4J) . 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* 発現亢進を誘導することが示唆された.

miR-1246 は, 腫瘍細胞の血管内皮への接着を促進する

miR-1246 が血管内皮の *ICAM-1* 発現亢進を誘導することから, 腫瘍細胞の血管内皮への接着が促進されるのではないかと考え, adhesion assay を行った. コントロールは一視野あたりの内皮に接着した腫瘍細胞数の平均が 44 であったのに対し, A375SM 由来 EVs 処理された内皮に接着した腫瘍細胞数の平均は 102 と有意に増加した (Fig. 5A) . また, miRNA mimic negative control を transfection した内皮に接着した腫瘍細胞数の平均が 41 であったのに対して, miR-1246 mimic を transfection された内皮に接着した腫瘍細胞数の平均は 73 であり, 血管内皮への miR-1246 の導入によって腫瘍細胞の接着が促進された (Fig. 5B) . 一方, Control-miR A375SM 由来 EVs 処理した内皮に接着した腫瘍細胞数の平均が 39 であるのに対し, Anti-miR-1246 A375SM 由来 EVs 処理した内皮に接着した腫瘍細胞数の平均は 24 であり, EVs の miR-1246 レベルを抑制することで, 腫瘍細胞の接着が減少した (Fig. 5C) . これらの結果から, 高転移性腫瘍由来 EVs

中の miR-1246 は、腫瘍細胞の血管内皮への接着を促進することが示された。

miR-1246 は、VE-Cadherin 発現を抑制し、血管内皮間のバリア機構を破壊する

次に、われわれは miR-1246 による転移促進機構として、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²⁴⁾。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²⁵⁾。これらの分子からなる血管内皮間のバリア機構が破壊されることで、転移が促進する。miR-1246 を iHMVEC に transfection し、これらの接着分子の発現量を調べたところ、VE-Cadherin の mRNA 発現のみ control と比べ 42%と有意な発現低下を示した (Fig.6A) 。さらに、miRNA 標的遺伝子予測データベース TargetScan を用いたところ、miR-1246 は VE-Cadherin の 3'UTR に結合する可能性があることがわかった (Fig. 6B) 。そこで、VE-Cadherin が miR-1246 の標的遺伝子であるかどうかを調べるため、VE-Cadherin の 3'UTR 配列とルシフェラーゼ遺伝子が挿入された vector を用いて 3'UTR assay を行った。miR-1246 を過剰発現させることで、ルシフェラーゼ活性が 70%に減少したことから、VE-Cadherin が miR-1246 の標的遺伝子であることが示された (Fig. 6C) 。また、iHMVEC に miR-1246 を

transfection すると, VE-Cadherin のタンパク質発現低下が認められた (Fig. 6D) .
次に, 免疫細胞染色によって iHMVEC の VE-Cadherin (赤) を染色し, 一細胞あたりの VE-Cadherin シグナル面積を比較した. その結果, miR-1246 を transfection した iHMVEC の VE-Cadherin シグナル面積は control の 46%と減少した (Fig. 6E) . 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 (Fig. 6F). 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 が増加して蛍光強度が 1.7 倍となり, 血管内皮モノレイヤーの透過性亢進が示された (Fig. 6G) . 一方, Control-miR A375SM 由来 EVs 処理した内皮は蛍光強度が 1.3 倍に増加したのに対し, Anti-miR-1246 A375SM 由来 EVs 処理した内皮は蛍光強度を増加させなかった (Fig. 6H) .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.

考察

本研究により, 腫瘍細胞が分泌する EVs 中の miR-1246 が血管内皮に取り込まれ, 血管内皮の形質を変化させることで転移が促進されることが見出された. そのメカニズムとして, 以下の 2 つが示唆された (Fig. 7).

1) 高転移性腫瘍由来 EVs 中の miR-1246 は、血管内皮細胞に取り込まれ、IL-6-STAT3 経路を介して ICAM-1 発現を誘導する。その結果、腫瘍細胞の血管内皮への接着が促進される。

2) miR-1246 は、血管内皮細胞間接着分子である VE-Cadherin を標的として発現を抑制する。その結果、血管内皮によるバリア機構が破壊され、腫瘍細胞の内皮間遊走が促進される。

腫瘍の転移は複雑な過程を経て成立する。腫瘍細胞はまず原発巣で増殖し、遊走・浸潤して血管内皮細胞に接着する。そして、血管内皮間を遊走して血管内に侵入し、血流に乗って全身を循環する。その後、遠隔臓器の血管内皮に接着し、再び血管内皮間遊走を経て組織内に到達し、転移巣を形成する¹⁷⁾。このように、血管内皮細胞は腫瘍細胞の転移において非常に重要な経路となっている。

近年、細胞間情報伝達的手段として Extracellular vesicles (EVs) が注目されている。EVs は、exosome や microvesicle などの細胞外小胞の総称であり、内部にタンパク質、mRNA、miRNA を含んでいる¹¹⁾。腫瘍細胞は、自身が分泌した EVs をオートクラインで利用して、腫瘍細胞自身の遊走能・浸潤能を上げることが知られている²⁶⁾。さらに、腫瘍細胞は EVs を分泌することで、腫瘍微小環境に存在する血管内皮細胞や線維芽細胞、免疫細胞などの間質細胞にはたらきかけ、

自らの進展・増殖に都合の良い環境をつくることが報告されている。われわれは過去に、腫瘍細胞由来 EVs が血管内皮に取り込まれ、Akt の活性化を介して血管新生能を亢進させることを見出した¹³⁾。また、高転移性腫瘍 EVs 中の miR-1246 によって血管内皮が IL-6 分泌を亢進させ、STAT3 および Akt の活性化を介して薬剤耐性を獲得するメカニズムを明らかにした (Torii C, 投稿中)。本研究では、その高転移性腫瘍 EVs 中に多く含まれる miR-1246 による転移促進メカニズムを解明した。腫瘍の転移に関わる EVs 中の miRNA についての報告として、Zhou らは転移性乳がん細胞由来 EVs 中の miR-105 が血管内皮細胞間の tight junction を構成する ZO-1 の発現を抑制し、内皮間バリアを破壊することで転移が促進されることを報告した¹⁶⁾。Tominaga らは、高転移性の乳がん細胞が分泌する EVs 中の miR-181c が、血管内皮の PDPK1 を抑制し、細胞骨格であるアクチンの重合を阻害することで血液脳関門を破壊して乳癌の脳転移が促進されることを明らかにした¹⁹⁾。しかしながら、腫瘍細胞由来 EVs が血管内皮にもたらす影響とそのメカニズムについてはまだ不明な点が多い。

本研究における *in vivo* 実験の結果では、①高転移性腫瘍由来 EVs が腫瘍細胞の肺への接着および肺転移を促進した。②腫瘍細胞の miR-1246 をノックダウンすると、腫瘍の増殖には変化がなかったものの、血中 EV-miR-1246 レベルが減少し、転移が抑制された。これらの結果から、miR-1246 は腫瘍の増殖促進を介

さず転移を促進する可能性が示唆された。そこでわれわれは、転移での重要な経路である血管に着目し、miR-1246による血管内皮の形質変化に着目した。特に、miR-1246が腫瘍細胞と血管内皮の接着に及ぼす影響と血管内皮によるバリア機構に及ぼす影響という2つのメカニズムについて解析を行った。

原発巣での血管内侵入および遠隔臓器での血管外遊走の前段階で、腫瘍細胞は血管内皮細胞に接着する。その際、ICAM-1, VCAM-1, E-selectinが接着分子としてはたらく²⁷⁾。いずれの分子も、主に白血球が組織浸潤する際、血管壁への接着に関与する分子である。E-selectinは、白血球の内皮細胞壁でのローリングに関与し、ICAM-1とVCAM-1はそれに続く強固な接着に関与しているが、癌細胞の血管内皮への接着も同様にこれらの分子を利用していると考えられている^{28,29)}。ICAM-1は、白血球、血管内皮細胞、線維芽細胞、胸腺上皮細胞などの細胞膜に発現している。癌細胞が発現する $\beta 2$ インテグリンと血管内皮が発現するICAM-1が結合することが示されている²²⁾。VCAM-1は、サイトカイン刺激を受けた血管内皮に発現し、癌細胞が発現する $\alpha 4 \beta 1$ インテグリンと結合する²⁷⁾。E-selectinは血管内皮細胞に発現し、癌細胞表面の糖鎖リガンド (sialyl Lewis X など) と結合する³⁰⁾。これまでに、血管内皮のICAM-1, VCAM-1の発現亢進を介して腫瘍細胞の接着が促進されることが報告されている^{31,32)}。Nojiriらは、心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) が血管内皮のE-selectin発現を抑制する

ことで、腫瘍細胞の内皮への接着が減少し、肺転移が抑制されることを見出している³³⁾。本研究では、その中でも代表的な接着分子である ICAM-1 に着目した。ICAM-1 は IL-6-STAT3 経路によって発現誘導されることが知られている²³⁾ ため、本研究ではこの経路を中心に解析を行った。本研究で明らかにした腫瘍由来 EVs による腫瘍細胞の血管内皮への接着亢進という転移促進メカニズムは、これまでに報告されていない。

転移の過程において、腫瘍細胞が血管内または血管外に侵入する際、血管内皮間を遊走する。内皮細胞間接着は、adherence junction と tight junction によって形成される²⁴⁾。Adherence junction を構成する VE-Cadherin は、血管内皮に特異的に発現するカルシウム依存性の膜貫通型タンパクである。VE-Cadherin は細胞内に β -catenin および p120-catenin 結合ドメインをもち、細胞外に存在する 5 つの cadherin ドメインによって隣接した血管内皮同士が接着し、血管透過性を制御している³⁴⁾。炎症刺激により産生される様々なサイトカインや、血管新生因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) は、VE-Cadherin による血管内皮細胞間接着を減弱させ、血管透過性を亢進する³⁵⁾。最近、血管新生阻害剤により VEGF を抑制することで腫瘍血管の透過性を抑制し、正常化したのちに薬剤送達が改善されることが報告されている³⁶⁾。Tight junction は主に claudin-5 と zonula occludens-1 (ZO-1) から構成される。Claudin-5 は膜貫通型タンパクであ

り、ZO-1によって裏打ちされている²⁴⁾。これらによる tight junction も adherence junction とともに血管内皮のバリアを形成し、血管透過性を制御している。本研究では、これらの接着分子の中で血管内皮細胞への miR-1246 導入により、唯一発現低下が認められた VE-Cadherin に着目した。

転移についての miR-1246 の報告として、Zhang らは、非小細胞肺癌における miR-1246 が腫瘍形成および悪性化に関与し、腫瘍細胞の miR-1246 を抑制することで転移が減少することを報告している³⁷⁾。EVs 中の miR-1246 による血管内皮への影響として、Yamada らは、miR-1246 を含む大腸がん細胞由来 EVs が血管内皮に取り込まれ、Smad 1/5/8 シグナルを介して血管新生能を亢進することを報告している³⁸⁾。また、大腸癌、乳癌、膵癌患者は健常者と比較して血中 EVs の miR-1246 レベルが高く、バイオマーカーになりうることが報告されている³⁹⁻⁴¹⁾。しかし、miR-1246 の血管内皮細胞の形質変化に関する機能は全く報告されていない。さらに、これまで腫瘍細胞と血管内皮の接着促進と血管内皮によるバリア機構の破壊という2つの転移過程に及ぼす miRNA は報告されておらず、今回の結果が初めての報告となる。

しかしながら、本研究では、EVs が転移先の肺血管内皮に取り込まれているかを解明するには至っていない。腫瘍由来 EVs には転移先臓器指向性があるという報告⁴²⁾があるが、本実験で用いた腫瘍細胞が肺転移性であることは広く知

られており，EVs が肺の血管内皮に取り込まれている可能性は高い．EVs の *in vivo* における検出はその微小な粒子径ゆえ平易ではないが，今後ラベルする蛍光色素の明るさの向上，検出するイメージング機器の向上などにより可能になると思われる．EVs は多数のタンパク，mRNA，miRNA を含んでおり，本研究での血管内皮の形質変化の原因は miR-1246 以外の分子の関与も否定できない．しかし，Anti-miR1246 を導入した腫瘍細胞を用いた実験結果から，少なくとも miR-1246 は血管内皮細胞の *in vivo* 転移抑制メカニズムの1つであることは示唆された．本研究は，腫瘍細胞由来 EVs による血管内皮細胞への影響を解析した．しかし，腫瘍微小環境における腫瘍細胞そのものに対して，あるいは免疫細胞や線維芽細胞など他の間質細胞に与える影響についても未知であり，今後さらなる研究で明らかにしたい．

今回の研究により，腫瘍細胞由来 EVs を治療標的とすることで，転移を予防できる可能性が考えられる．また，腫瘍細胞における miR-1246 の標的化，腫瘍血管内皮における IL-6-STAT3 経路の阻害でも転移予防の可能性が示唆された．さらに，メラノーマ患者や口腔癌患者血中 EVs の miR-1246 レベルが高い (data not shown) ことから，がんの早期診断のためのバイオマーカーになりうると予想される．

結論

高転移性腫瘍 EVs 中の miR-1246 は血管内皮細胞における IL-6 - STAT3 経路を介して ICAM-1 の発現を亢進することで、腫瘍細胞と血管内皮の接着を促進する。さらに、miR-1246 は VE-Cadherin を標的として発現を抑制し、血管内皮のバリア機構を破壊することで、腫瘍細胞の内皮間遊走を促進する。高転移性腫瘍由来 EVs は、この 2 つのメカニズムを介して転移を促進する可能性が考えられた。

参考文献

- 1) Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nat Med 1:27-31,1995.
- 2) Folkman J: Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. Semin Oncol 29:15-8,2002.
- 3) Reymond N, d'Agua BB, Ridley AJ: Crossing the endothelial barrier during metastasis. Nat Rev Cancer 13:858-70,2013.
- 4) McDonald DM, Baluk P: Significance of blood vessel leakiness in cancer. Cancer Res 62:5381-5,2002.
- 5) Hida K, Hida Y, Amin DN, Flint AF, Panigrahy D, Morton CC, Klagsbrun

M: Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities.

Cancer Res 64:8249-55,2004.

6) Akino T, Hida K, Hida Y, Tsuchiya K, Freedman D, Muraki C, Ohga N,

Matsuda K, Akiyama K, Harabayashi T, Shinohara N, Nonomura K,

Klagsbrun M, Shindoh M: Cytogenetic abnormalities of tumor-associated endothelial cells in human malignant tumors. Am J Pathol

175:2657-67,2009.

7) Akiyama K, Ohga N, Hida Y, Kawamoto T, Sadamoto Y, Ishikawa S,

Maishi N, Akino T, Kondoh M, Matsuda A, Inoue N, Shindoh M, Hida K:

Tumor endothelial cells acquire drug resistance by MDR1 up-regulation via VEGF signaling in tumor microenvironment. Am J Pathol

180:1283-93,2012.

8) Xiong YQ, Sun HC, Zhang W, Zhu XD, Zhuang PY, Zhang JB, Wang L,

Wu WZ, Qin LX, Tang ZY: Human hepatocellular carcinoma

tumor-derived endothelial cells manifest increased angiogenesis capability

and drug resistance compared with normal endothelial cells. Clin Cancer

Res 15:4838-46,2009.

9) Akiyama K, Maishi N, Ohga N, Hida Y, Ohba Y, Alam MT, Kawamoto T,

- Ohmura H, Yamada K, Torii C, Shindoh M, Hida K: Inhibition of multidrug transporter in tumor endothelial cells enhances antiangiogenic effects of low-dose metronomic paclitaxel. *Am J Pathol* 185:572-80,2015.
- 10) Ohga N, Ishikawa S, Maishi N, Akiyama K, Hida Y, Kawamoto T, Sadamoto Y, Osawa T, Yamamoto K, Kondoh M, Ohmura H, Shinohara N, Nonomura K, Shindoh M, Hida K: Heterogeneity of tumor endothelial cells: comparison between tumor endothelial cells isolated from high- and low-metastatic tumors. *Am J Pathol* 180:1294-307,2012.
- 11) Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO: Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9:654-9,2007.
- 12) Bobrie A, Krumeich S, Reyat F, Recchi C, Moita LF, Seabra MC, Ostrowski M, Thery C: Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression. *Cancer Res* 72:4920-30,2012.
- 13) Kawamoto T, Ohga N, Akiyama K, Hirata N, Kitahara S, Maishi N, Osawa T, Yamamoto K, Kondoh M, Shindoh M, Hida Y, Hida K: Tumor-derived microvesicles induce proangiogenic phenotype in

- endothelial cells via endocytosis. PLoS One 7:e34045,2012.
- 14) Bartel DP: MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell 136:215-33,2009.
- 15) Kosaka N, Iguchi H, Hagiwara K, Yoshioka Y, Takeshita F, Ochiya T: Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. J Biol Chem 288:10849-59,2013.
- 16) Zhou W, Fong MY, Min Y, Somlo G, Liu L, Palomares MR, Yu Y, Chow A, O'Connor ST, Chin AR, Yen Y, Wang Y, Marcusson EG, Chu P, Wu J, Wu X, Li AX, Li Z, Gao H, Ren X, Boldin MP, Lin PC, Wang SE: Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. Cancer cell 25:501-15,2014.
- 17) Saxena M, Christofori G: Rebuilding cancer metastasis in the mouse. Mol Oncol 7:283-96,2013.
- 18) Miyoshi H: Gene delivery to hematopoietic stem cells using lentiviral vectors. Methods Mol Biol 246:429-38,2004.
- 19) Tominaga N, Kosaka N, Ono M, Katsuda T, Yoshioka Y, Tamura K, Lotvall J, Nakagama H, Ochiya T: Brain metastatic cancer cells release

- microRNA-181c-containing extracellular vesicles capable of destructing blood-brain barrier. *Nat Commun* 6:6716,2015.
- 20) Yamashita T, Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y: Effect of exosome isolation methods on physicochemical properties of exosomes and clearance of exosomes from the blood circulation. *Eur J Pharm Biopharm* 98:1-8,2016.
- 21) S ELA, Mager I, Breakefield XO, Wood MJ: Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 12:347-57,2013.
- 22) Roland CL, Harken AH, Sarr MG, Barnett CC, Jr.: ICAM-1 expression determines malignant potential of cancer. *Surgery* 141:705-7,2007.
- 23) Chen JS, Chen YH, Huang PH, Tsai HY, Chen YL, Lin SJ, Chen JW: Ginkgo biloba extract reduces high-glucose-induced endothelial adhesion by inhibiting the redox-dependent interleukin-6 pathways. *Cardiovasc Diabetol* 11:49,2012.
- 24) Dejana E: Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:261-70,2004.
- 25) Bazzoni G, Dejana E: Endothelial cell-to-cell junctions: molecular

- organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* 84:869-901,2004.
- 26) Qu JL, Qu XJ, Zhao MF, Teng YE, Zhang Y, Hou KZ, Jiang YH, Yang XH, Liu YP: Gastric cancer exosomes promote tumour cell proliferation through PI3K/Akt and MAPK/ERK activation. *Dig Liver Dis* 41:875-80,2009.
- 27) Strell C, Entschladen F: Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells. *Cell Commun Signal* 6:10,2008.
- 28) Giavazzi R, Foppolo M, Dossi R, Remuzzi A: Rolling and adhesion of human tumor cells on vascular endothelium under physiological flow conditions. *J Clin Invest* 92:3038-44,1993.
- 29) Orr FW, Wang HH, Lafrenie RM, Scherbarth S, Nance DM: Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis. *J Pathol* 190:310-29,2000.
- 30) Barthel SR, Gavino JD, Descheny L, Dimitroff CJ: Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer. *Expert Opin Ther Targets* 11:1473-91,2007.
- 31) Tamaki M, Aoyagi M, Morita I, Hirakawa K, Murota S: Cell adhesion

- molecules acting between C6 glioma and endothelial cells. *J Neurooncol* 24:181-8,1995.
- 32) Vidal-Vanaclocha F, Fantuzzi G, Mendoza L, Fuentes AM, Anasagasti MJ, Martin J, Carrascal T, Walsh P, Reznikov LL, Kim SH, Novick D, Rubinstein M, Dinarello CA: IL-18 regulates IL-1beta-dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:734-9,2000.
- 33) Nojiri T, Hosoda H, Tokudome T, Miura K, Ishikane S, Otani K, Kishimoto I, Shintani Y, Inoue M, Kimura T, Sawabata N, Minami M, Nakagiri T, Funaki S, Takeuchi Y, Maeda H, Kidoya H, Kiyonari H, Shioi G, Arai Y, Hasegawa T, Takakura N, Hori M, Ohno Y, Miyazato M, Mochizuki N, Okumura M, Kangawa K: Atrial natriuretic peptide prevents cancer metastasis through vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:4086-91,2015.
- 34) Giannotta M, Trani M, Dejana E: VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Dev Cell* 26:441-54,2013.
- 35) Gavard J: Breaking the VE-cadherin bonds. *FEBS letters* 583:1-6,2009.

- 36) Zhang L, Takara K, Yamakawa D, Kidoya H, Takakura N: Apelin as a marker for monitoring the tumor vessel normalization window during antiangiogenic therapy. *Cancer Sci* 107:36-44,2016.
- 37) Zhang WC, Chin TM, Yang H, Nga ME, Lunny DP, Lim EK, Sun LL, Pang YH, Leow YN, Malusay SR, Lim PX, Lee JZ, Tan BJ, Shyh-Chang N, Lim EH, Lim WT, Tan DS, Tan EH, Tai BC, Soo RA, Tam WL, Lim B: Tumour-initiating cell-specific miR-1246 and miR-1290 expression converge to promote non-small cell lung cancer progression. *Nat Commun* 7:11702,2016.
- 38) Yamada N, Tsujimura N, Kumazaki M, Shinohara H, Taniguchi K, Nakagawa Y, Naoe T, Akao Y: Colorectal cancer cell-derived microvesicles containing microRNA-1246 promote angiogenesis by activating Smad 1/5/8 signaling elicited by PML down-regulation in endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1839:1256-72,2014.
- 39) Lai X, Friedman A: Exosomal microRNA concentrations in colorectal cancer: A mathematical model. *J Theor Biol* 415:70-83,2017.
- 40) Hannafon BN, Trigos YD, Calloway CL, Zhao YD, Lum DH, Welm AL, Zhao ZJ, Blick KE, Dooley WC, Ding WQ: Plasma exosome microRNAs

are indicative of breast cancer. *Breast Cancer Res* 18:90,2016.

- 41) Madhavan B, Yue S, Galli U, Rana S, Gross W, Muller M, Giese NA, Kalthoff H, Becker T, Buchler MW, Zoller M: Combined evaluation of a panel of protein and miRNA serum-exosome biomarkers for pancreatic cancer diagnosis increases sensitivity and specificity. *Int J Cancer* 136:2616-27,2015.
- 42) Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, Molina H, Kohsaka S, Di Giannatale A, Ceder S, Singh S, Williams C, Soplop N, Uryu K, Pharmed L, King T, Bojmar L, Davies AE, Ararso Y, Zhang T, Zhang H, Hernandez J, Weiss JM, Dumont-Cole VD, Kramer K, Wexler LH, Narendran A, Schwartz GK, Healey JH, Sandstrom P, Labori KJ, Kure EH, Grandgenett PM, Hollingsworth MA, de Sousa M, Kaur S, Jain M, Mallya K, Batra SK, Jarnagin WR, Brady MS, Fodstad O, Muller V, Pantel K, Minn AJ, Bissell MJ, Garcia BA, Kang Y, Rajasekhar VK, Ghajar CM, Matei I, Peinado H, Bromberg J, Lyden D: Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527:329-35,2015.

謝辞

稿を終えるにあたり，本研究に多大なるご援助，ご協力を頂きました本学遺伝子病制御研究所フロンティア研究ユニット血管生物学研究室，本学大学院歯学研究院口腔病態学分野血管生物分子病理学教室の樋田京子教授をはじめ教室員の皆様，本学大学院医学研究科循環器・呼吸器外科学分野の樋田泰浩准教授，A375SM 細胞を供与してくださった M.D. Anderson Cancer Center の Prof. Isaiah J. Fidler に厚く御礼を申し上げますとともに，ご理解ご協力を賜りました本学大学院歯学研究院口腔病態学分野口腔診断内科学教室の北川善政教授をはじめ教室員の皆様に心より感謝致します。

図とその説明

Fig. 1 高転移性腫瘍由来 EVs を介した miR-1246 の輸送

(A) 透過型電子顕微鏡による A375 由来 EVs, A375SM 由来 EVs の観察像. スケールバー: 100nm. (B) 動的光散乱法による A375 由来 EVs と A375SM 由来 EVs の粒子径分布. (C) A375 由来 EVs と A375SM 由来 EVs における CD63, CD9 の Western Blot 解析. (D) Real-time PCR 法による A375 由来 EVs と A375SM 由来 EVs 中の miR-1246 レベル解析. エラーバーは標準偏差を表す. Student's t-test, n=3. (*P<0.01) (E) PKH26 で標識した A375 由来 EVs, A375SM 由来 EVs を 24 時間処理した iHMVEC の観察像. スケールバー: 10 μ m (F) Real-time PCR 法による A375 由来 EVs, A375SM 由来 EVs 処理を 12 時間行った iHMVEC における miR-1246 レベル解析. エラーバーは標準偏差を表す. Student's t-test, n=3. (*P<0.01)

(Fig. 1 に挿入)

Fig. 2 高転移性腫瘍由来 EVs による肺転移促進

(A) 実験概要を示す. 5 回の A375SM 由来 EVs 注射後に腫瘍細胞を注射し, 24 時間後, 40 日後に in vivo イメージングシステムによって腫瘍細胞のシグナルを解析した. (B, C) 腫瘍細胞注射から 24 時間後における, コントロール群と

A375SM 由来 EVs 注射群での腫瘍細胞の発光シグナル(左図). 発光の強さ (Total flux) を定量解析 (右図). Mann-Whitney U test. (**P<0.05) (D, E) 腫瘍細胞注射から 40 日後における, コントロール群と A375SM 由来 EVs 注射群での腫瘍細胞の発光シグナル (左図). 発光の強さ (Total flux) の定量解析 (右図). Mann-Whitney U test. (**P<0.05)

(Fig. 2 に挿入)

Fig. 3 miR-1246 ノックダウンによる肺転移の抑制

(A) Real-time PCR 法による Control-miR A375SM と Anti-miR-1246 A375SM の細胞および EVs 中の miR-1246 レベル解析. エラーバーは標準偏差を表す. Student's t-test, n=3. (*P<0.01) (B) Control-miR A375SM, Anti-miR-1246 A375SM の皮下移植から 28 日後のマウス (C) Real-time PCR 法による Control-miR A375SM と Anti-miR-1246 A375SM 腫瘍マウスから得た血清 EVs 中の miR-1246 レベル解析. エラーバーは標準偏差を表す. Mann-Whitney U test. (**P<0.05) (D) Control-miR A375SM と Anti-miR-1246 A375SM の皮下移植腫瘍増殖. 腫瘍体積は (長径×短径²) / 2 で算出した. N.S.: Not Significant. (E, F) Control-miR A375SM と Anti-miR-1246 A375SM 移植から 28 日後に摘出した肺におけるそれぞれの腫瘍細胞の蛍光シグナル (左図). 蛍光の強さ (Total flux) を定量解析 (右図). Mann-

Whitney U test. (**P<0.05)

(Fig. 3 に挿入)

Fig. 4 miR-1246 は、IL-6-STAT3 経路の活性化を介して血管内皮の ICAM-1 の発現を亢進させる

(A) Real-time PCR 法による A375SM 由来 EVs で 12 時間処理された iHMVEC の *IL-6* mRNA 発現解析. エラーバーは標準偏差を表す. Student's t-test, n=3.

(*P<0.01) (B) Real-time PCR 法による miRNA mimic negative control, miR-1246 mimic を transfection した iHMVEC の *IL-6* mRNA 発現解析. エラーバーは標準偏差を表す. Student's t-test, n=3. (*P<0.01) (C) Real-time PCR 法による Control-miR

A375S 由来 EVs, Anti-miR-1246 A375SM 由来 EVs で 12 時間処理された iHMVEC の *IL-6* mRNA 発現解析. エラーバーは標準偏差を表す. Student's t-test, n=3.

(*P<0.01) (D) A375SM 由来 EVs で 48 時間処理した iHMVEC における pSTAT3,

STAT3 および β -actin の Western Blot 解析. (E) microRNA mimic negative control,

miR-1246 mimic を transfection した iHMVEC における pSTAT3, STAT3 および β

-actin の Western Blot 解析. (F) Real-time PCR 法による A375SM 由来 EVs で 12

時間処理した iHMVEC の *ICAM-1* mRNA 発現解析. エラーバーは標準偏差を表

す. Student's t-test, n=3. (*P<0.01) (G) Real-time PCR 法による miRNA mimic

negative control, miR-1246 mimic を transfection した iHMVEC の *ICAM-1* mRNA 発現解析. エラーバーは標準偏差を表す. Student's t-test, n=3. (*P<0.01) (H) Real-time PCR 法による Control-miR A375SM 由来 EVs, Anti-miR-1246 A375SM 由来 EVs で 12 時間処理した iHMVEC の *ICAM-1* mRNA 発現解析. エラーバーは標準偏差を表す. Student's t-test, n=3. (*P<0.01) (I) Real-time PCR 法による 10ng/mL の recombinant IL-6 (rIL-6) を 24 時間処理した iHMVEC の *ICAM-1* mRNA 発現解析. エラーバーは標準偏差を表す. Student's t-test, n=3. (*P<0.01) (J) Real-time PCR 法による A375SM 由来 EVs で 12 時間処理した iHMVEC の *ICAM-1* mRNA 発現解析. S3I-201 (10 μ M): STAT3 リン酸化阻害剤. エラーバーは標準偏差を表す. Tukey-Kramer 法, n=3. (*P<0.01)

(Fig. 4 に挿入)

Fig. 5 miR-1246 は、腫瘍細胞の血管内皮への接着を促進する。

(A) A375SM 由来 EVs 処理した iHMVEC に接着した tdTomato-luc2 A375 の数を比較した. エラーバーは標準偏差を表す. Student's t-test, n=3. (*P<0.01) スケールバー: 100 μ m (B) miRNA mimic negative control, miR-1246 mimic を transfection した iHMVEC に接着した tdTomato-luc2 A375 の数を比較. エラーバーは標準偏差を表す. Student's t-test, n=3. (*P<0.01) スケールバー: 100 μ m (C) Control-miR

A375SM 由来 EVs Anti-miR-1246 A375SM 由来 EVs 処理した iHMVEC に接着した tdTomato-luc2 A375 の数を比較. エラーバーは標準偏差を表す. Student's t-test, n=3. (*P<0.01) スケールバー : 100 μ m

(Fig. 5 に挿入)

Fig. 6 miR-1246 は, VE-Cadherin 発現を抑制し, 血管内皮間のバリア機構を破壊する

(A) Real-time PCR 法による miRNA mimic negative control, miR-1246 mimic を transfection した iHMVEC の *VE-Cadherin*, *Claudin-5*, *ZO-1* mRNA 発現解析. エラーバーは標準偏差を表す. Student's t-test, n=3. (*P<0.01) N.S.: Not Significant.

(B) *VE-Cadherin* の 3' UTR と has-miR-1246 の結合位置予測 (TargetScan, <http://www.targetscan.org>) . (C) miRNA mimic negative control, miR-1246 mimic

を transfection した HEK293T の相対的ルシフェラーゼ活性. エラーバーは標準偏差を表す. Student's t-test, n=3. (*P<0.01) (D) miRNA mimic negative control,

miR-1246 mimic を transfection した iHMVEC の *VE-Cadherin*, β -actin の Western Blot 解析. (E) miRNA mimic negative control, miR-1246 mimic を transfection し

た iHMVEC における *VE-Cadherin* (赤) の免疫細胞染色. 一細胞あたりの *VE-Cadherin* シグナル面積は Image J を用いて *VE-Cadherin* 陽性面積 / 細胞数で

算出した。エラーバーは標準偏差を表す。Student's t-test, n=3. (*P<0.01) スケールバー: 10 μ m (F) Permeability assay の実験概要. monolayer を形成した iHUVCE に A375SM 由来 EVs を加え, 48 時間培養後に FITC-dextran の漏出を蛍光強度の測定によって評価した。 (G) Permeability assay により, A375SM 由来 EVs 処理による血管内皮モノレイヤー透過性の解析。エラーバーは標準偏差を表す。 Student's t-test, n=3. (*P<0.01) (H) Permeability assay により, Control-miR A375S 由来 EVs, Anti-miR-1246 A375SM 由来 EVs 処理による血管内皮モノレイヤー透過性の解析。エラーバーは標準偏差を表す。 Tukey-Kramer 法, n=3. (*P<0.01)

(Fig. 6 に挿入)

Fig. 7 高転移性腫瘍 EVs の miR-1246 は, 腫瘍細胞の接着促進と内皮のバリア破壊によって転移を促進する。

本研究によって得られた知見のまとめ. 高転移性腫瘍 EVs 中の miR-1246 は血管内皮細胞における IL-6 - STAT3 経路を介して ICAM-1 の発現を亢進することで, 腫瘍細胞と血管内皮の接着を促進する。さらに, miR-1246 は VE-Cadherin を標的として発現を抑制し, 血管内皮のバリア機能を抑制することで, 腫瘍細胞の内皮間遊走を促進する。高転移性腫瘍由来 EVs 中の miR-1246 は, この 2 つのメカニズムを介して転移を促進する可能性が示唆された。

(Fig. 7 に挿入)

**Promotion of metastasis via alteration of vascular endothelium
by metastatic tumor extracellular vesicle miRNA**

Masahiro Morimoto

Abstract

Tumor blood vessels are an important pathway for tumor metastasis. Tumor cells secrete extracellular vesicles (EVs) to create a suitable environment for themselves. We have identified miR-1246 that is more abundant miRNA in high metastatic tumor EVs compared with in low metastatic tumor EVs. In this study, we aimed to elucidate the role of EV-miR-1246 in tumor metastasis, especially focusing on tumor blood vessels.

Intravenous administration of high metastatic tumor EVs into mice increased the adhesion of tumor cells to the lung and lung metastasis. Conversely, miR-1246 knockdown in high metastatic tumor cells decreased lung metastasis in tumor xenograft model. Therefore, we focused on the adhesion of tumor cells to endothelial cells and the endothelial cell barrier, which are involved in metastasis steps. EV treatment or miR-1246 transfection upregulated the expression of the adhesion molecule ICAM-1 on endothelial cell membrane via IL-6-STAT3 pathway, and increased the number of adherent tumor cells to endothelial cells. In addition, the expression of endothelial

adhesion molecule VE-Cadherin was decreased by miR-1246 transfection, and the permeability of endothelial monolayer was enhanced. The target gene prediction database and 3' UTR assay showed that VE-Cadherin was the target gene of miR-1246. Collectively, these results suggest that miR-1246 in high metastatic tumor EVs is taken up by endothelial cells and promotes lung metastasis by alteration of endothelial cell phenotypes.

Key words: Tumor endothelial cell, extracellular vesicle, metastasis, miRNA

Fig. 1

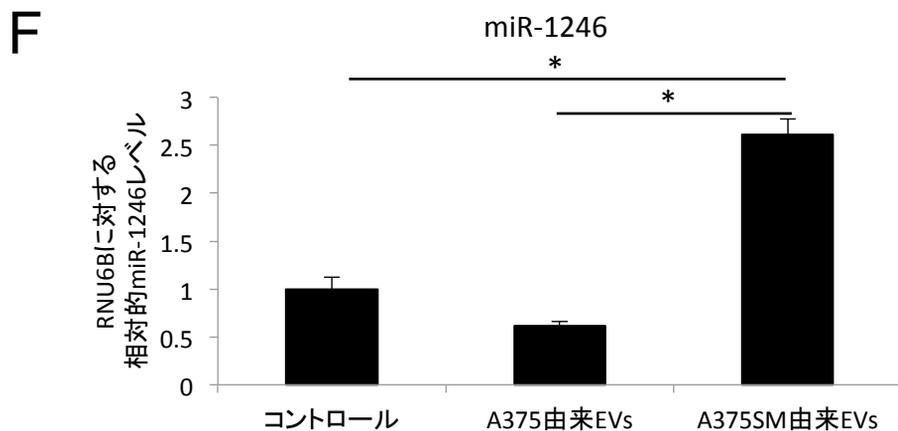
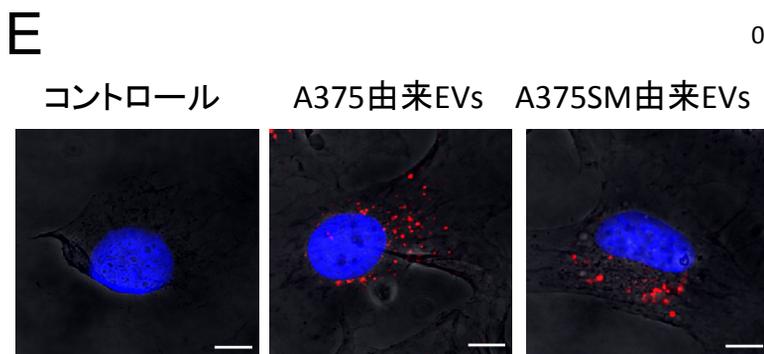
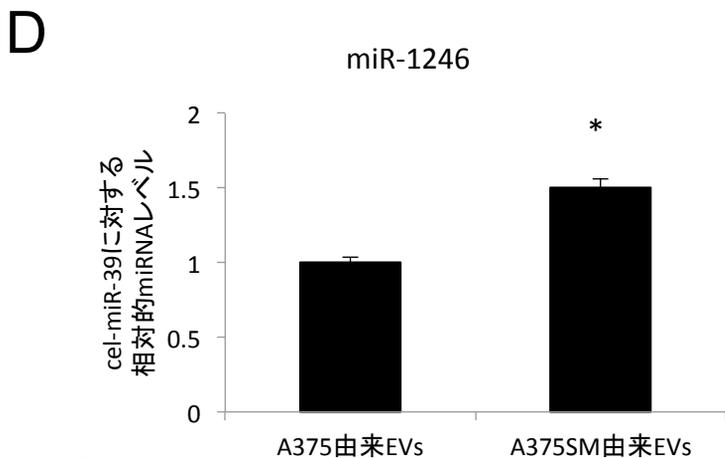
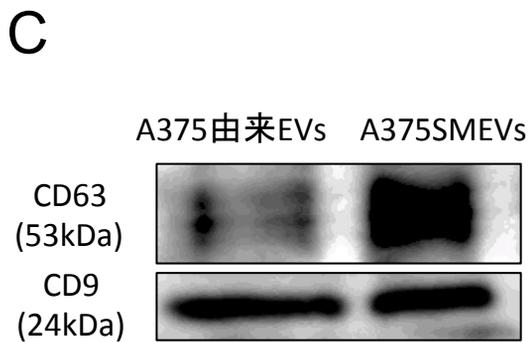
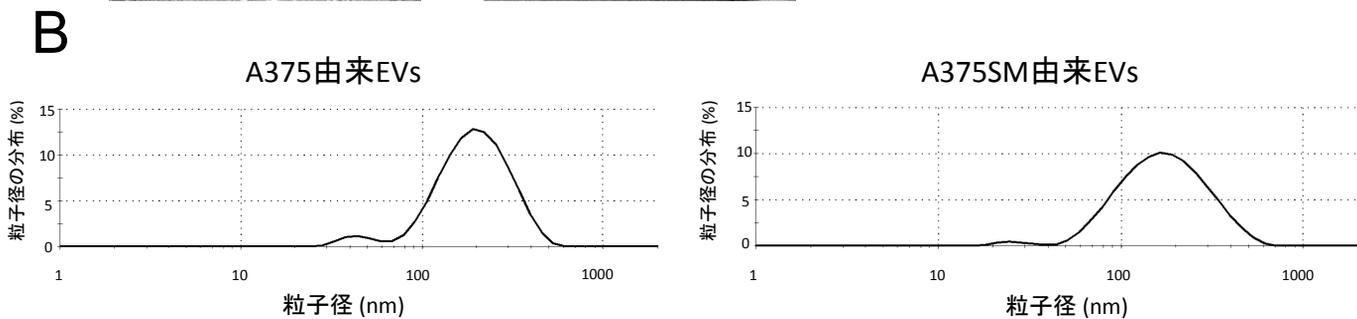
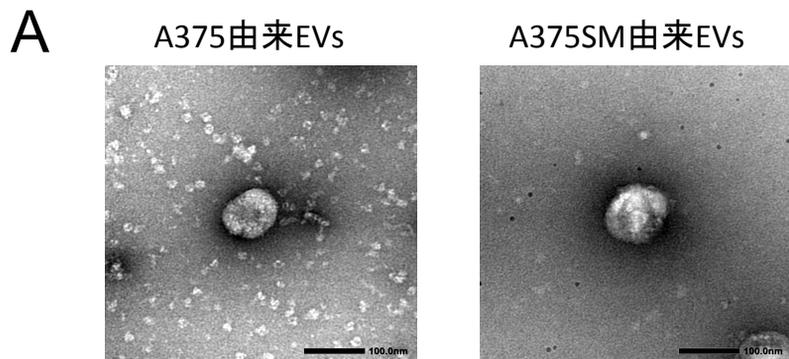


Fig. 2

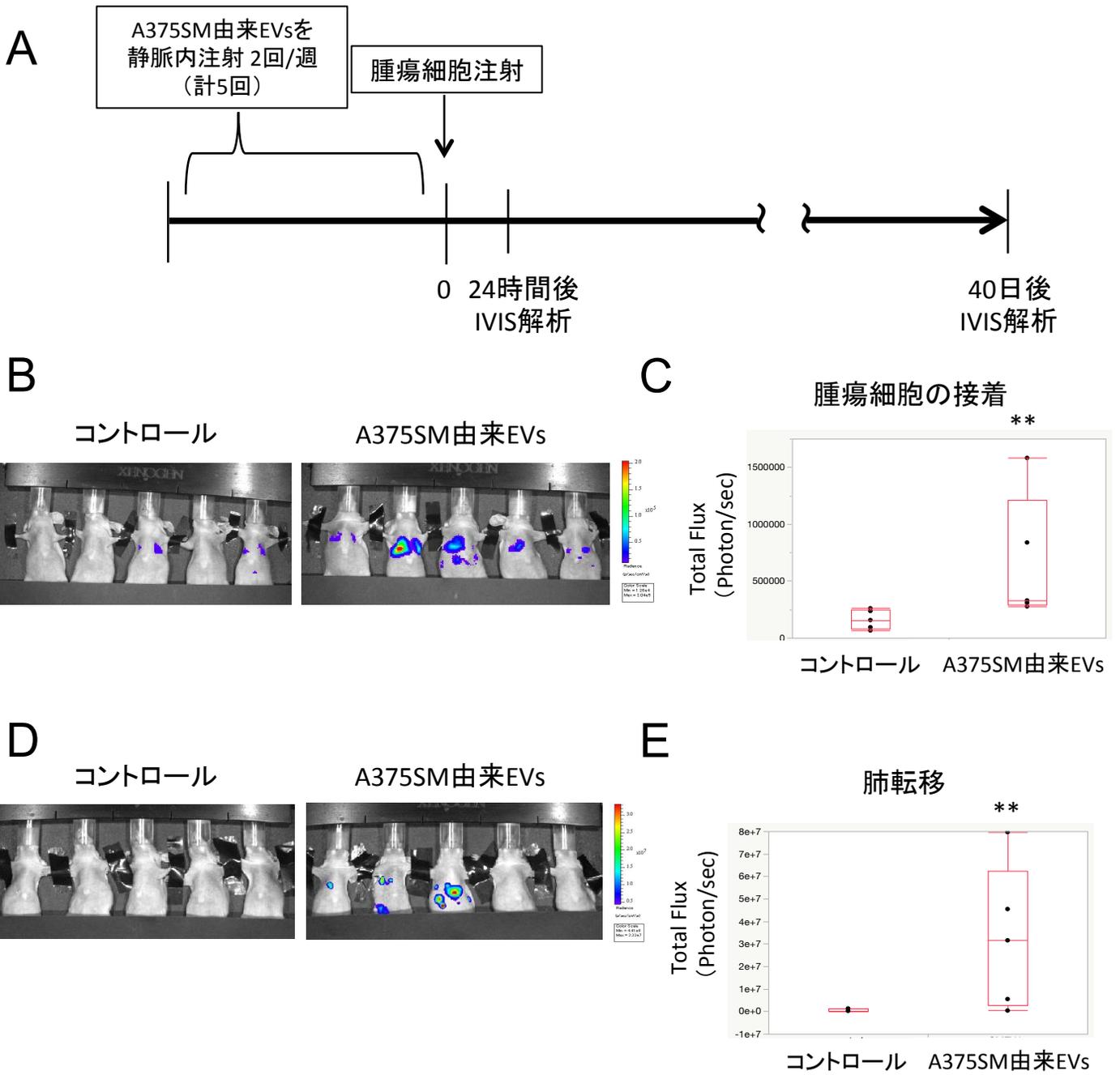
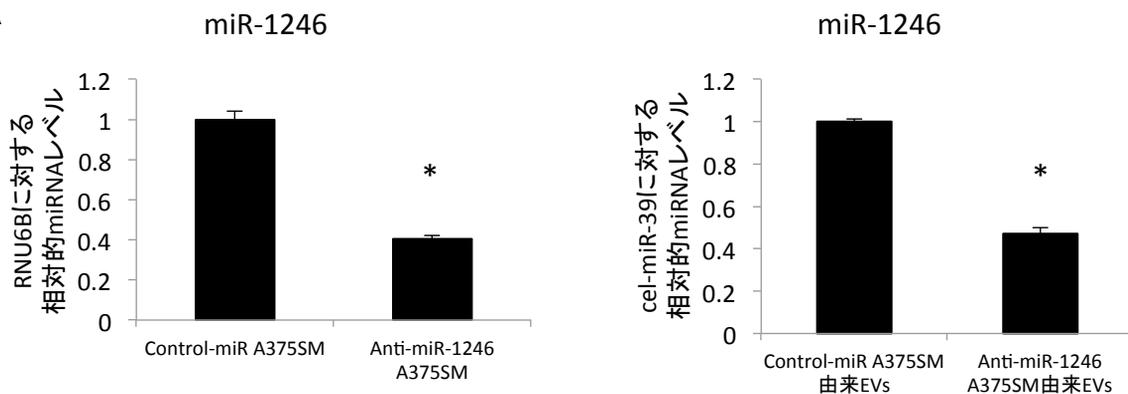
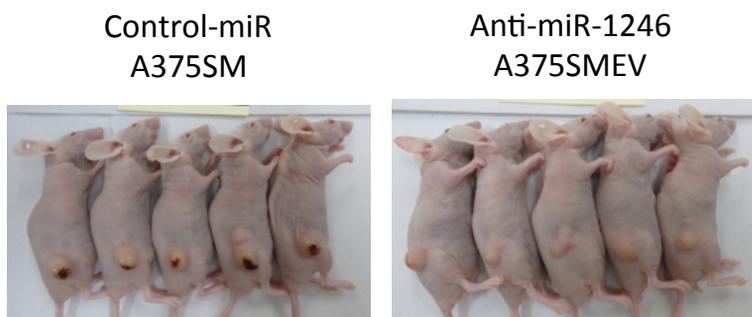


Fig. 3

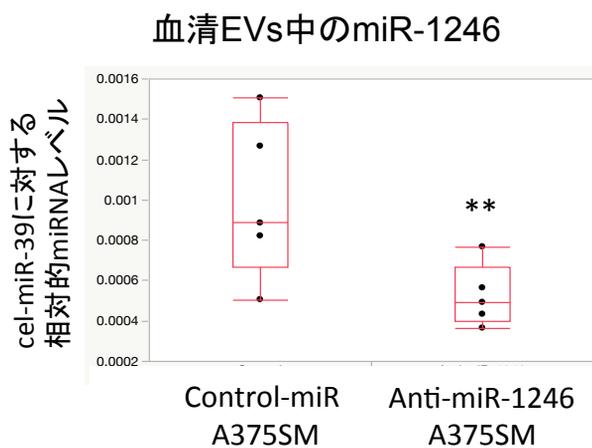
A



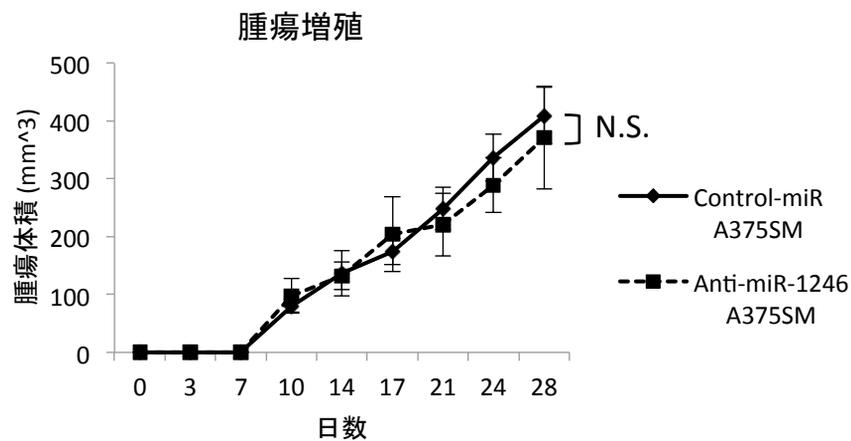
B



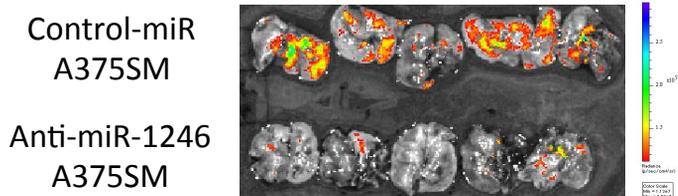
C



D



E



F

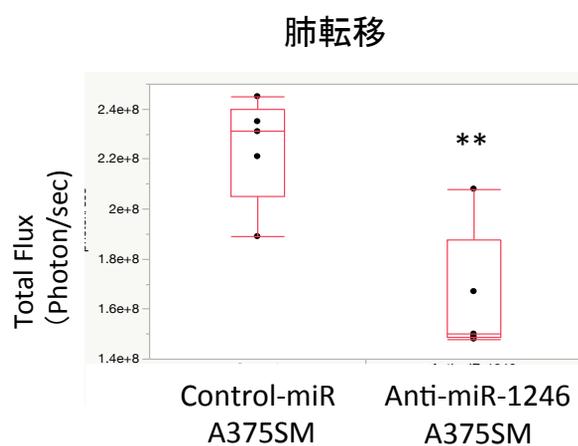


Fig. 4

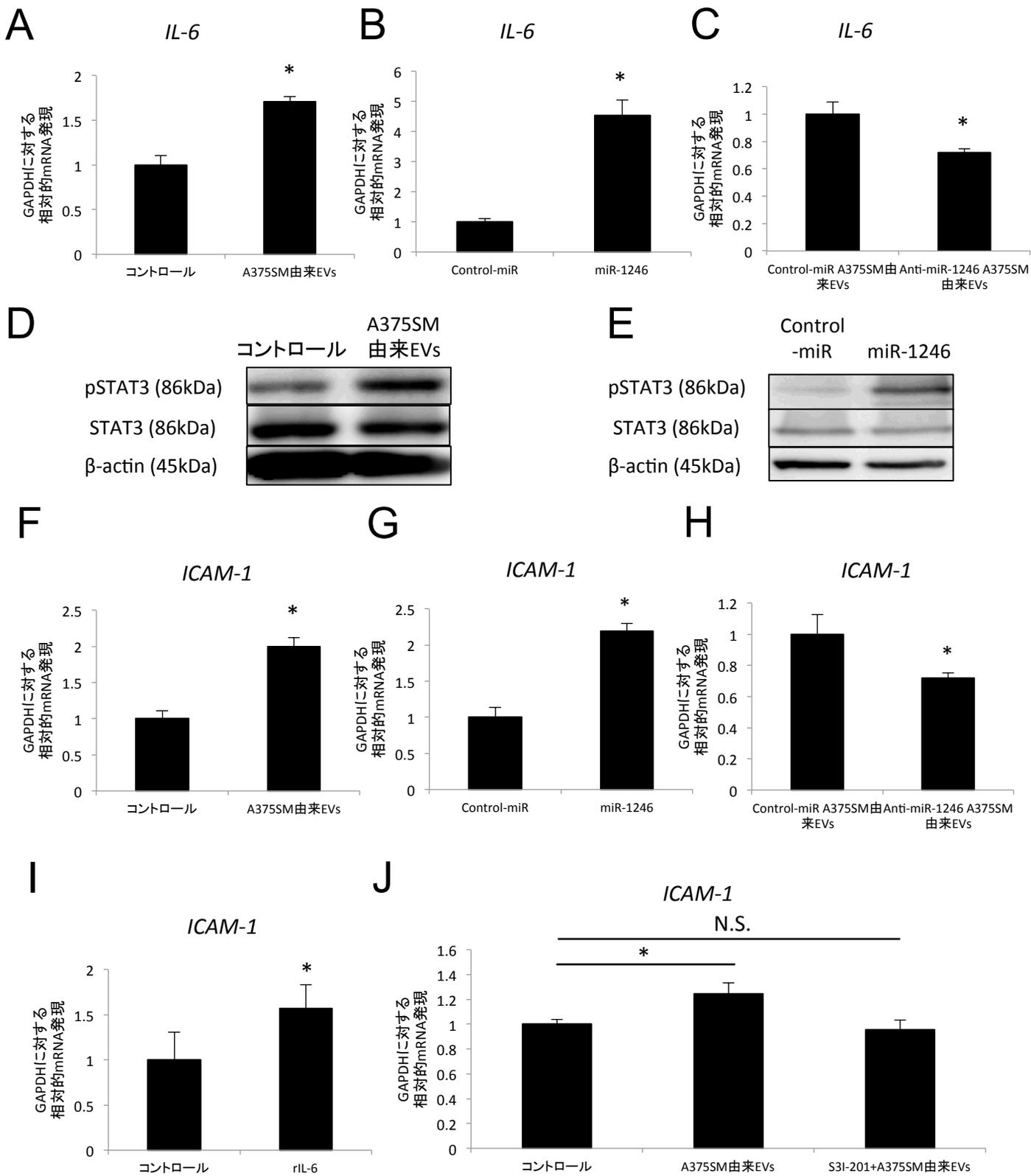
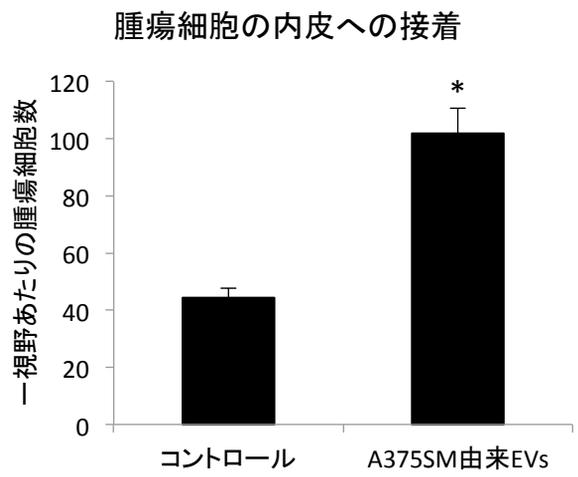
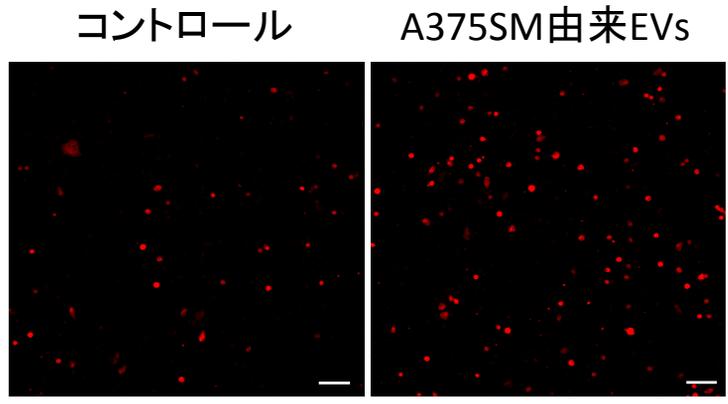
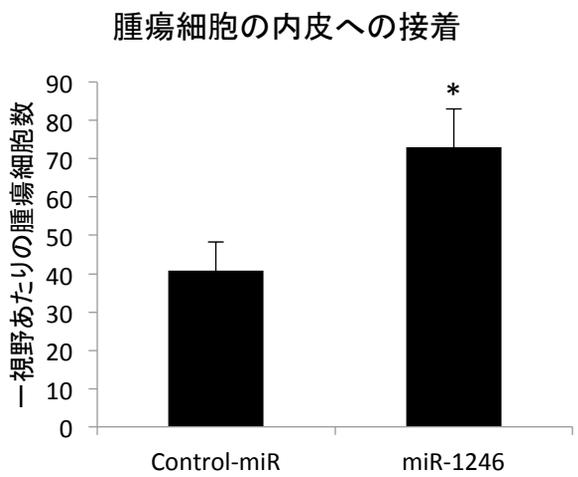
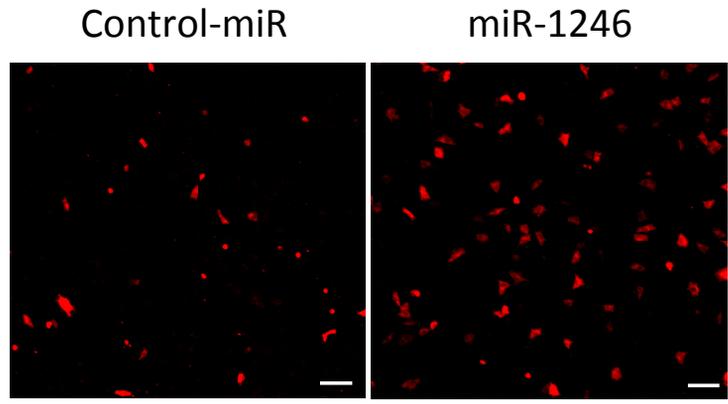


Fig. 5

A



B



C

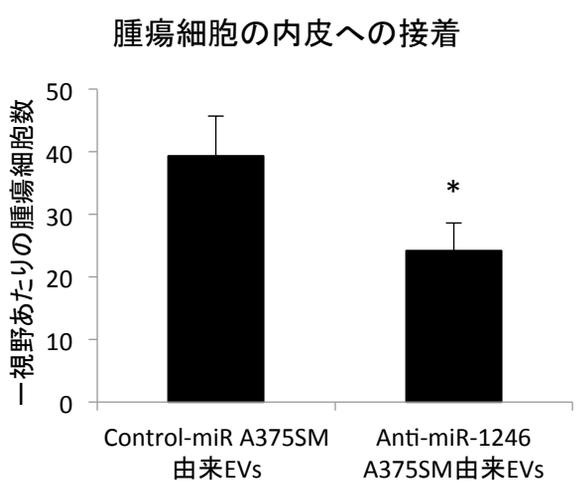
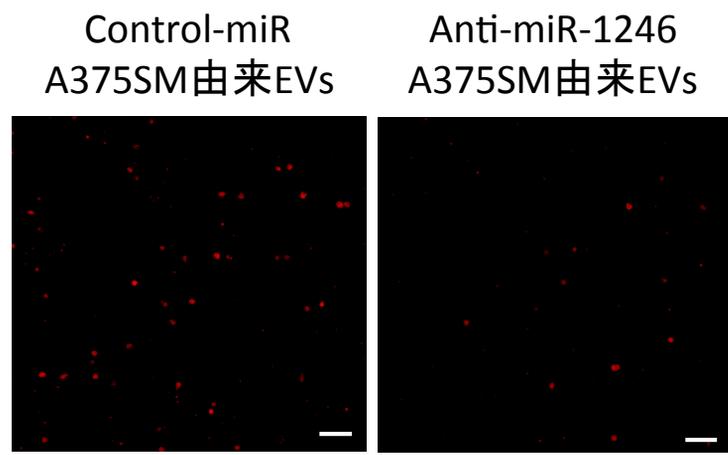
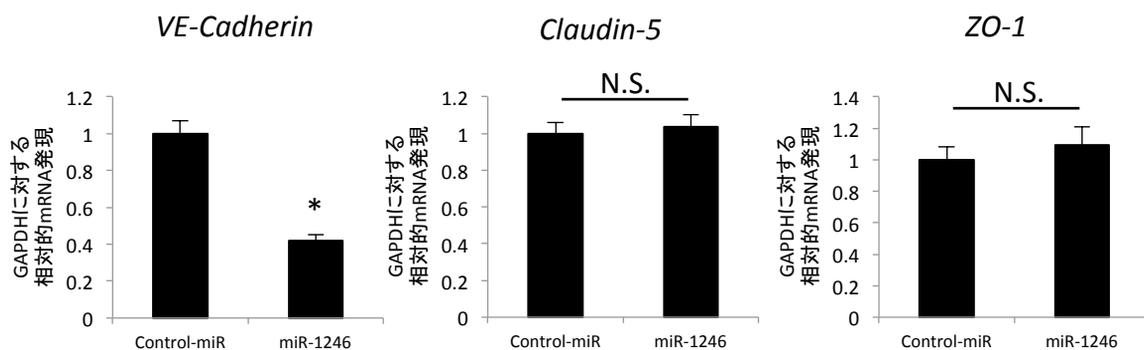
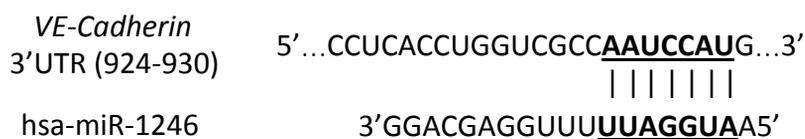


Fig. 6

A

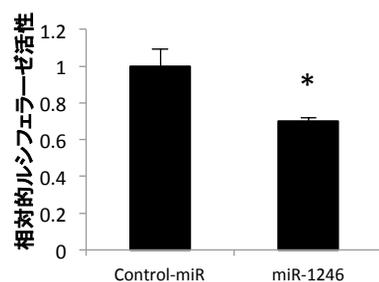


B

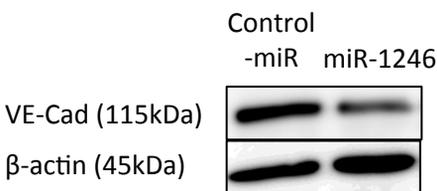


C

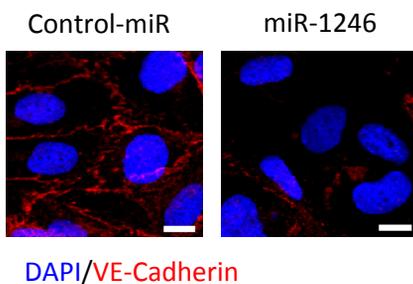
3' UTR assay



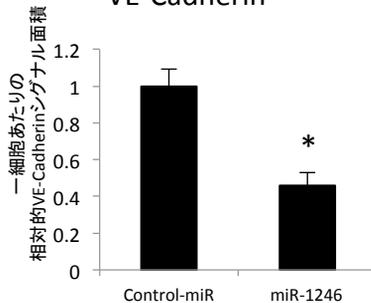
D



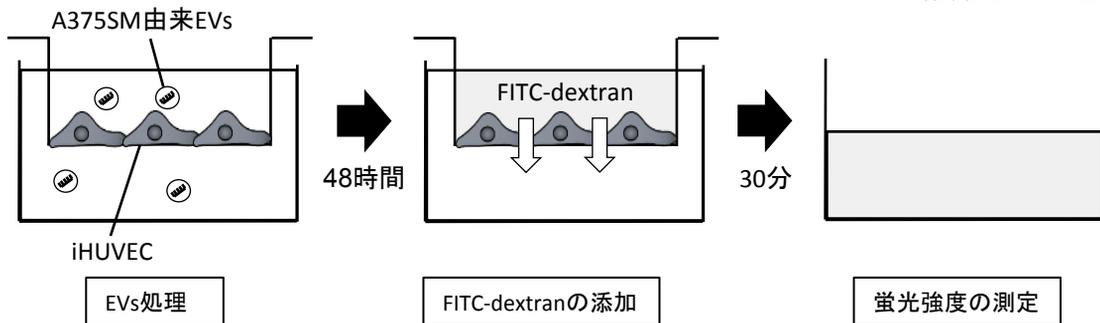
E



VE-Cadherin

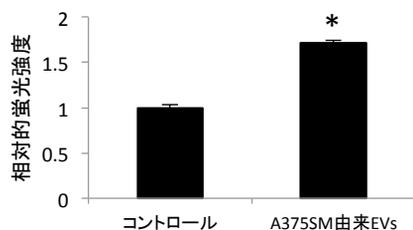


F



G

血管内皮モノレイヤー透過性



H

血管内皮モノレイヤー透過性
N.S.

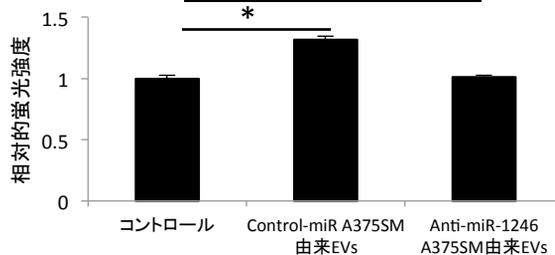


Fig. 7

