

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659623

研究課題名(和文)腫瘍血管の分泌するエクソソームによる肺転移促進機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of enhanced lung metastasis due to exosome from tumor endothelial cells

研究代表者

樋田 泰浩 (Yasuhiro, Hida)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：30399919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍の中の血管細胞(腫瘍血管内皮細胞, TEC)が分泌するマイクロRNA(miRNA)が腫瘍の遠隔転移を促進するという仮説の元に研究を行った。実験動物に移植してもほとんど転移しない悪性黒色腫の細胞株A375と同株から樹立された良く転移するA375SM("super metastatic")を用いた。それらの細胞株を移植したマウスに出来た腫瘍からそれぞれTECを分離してmiRNAを抽出し、miRNAマイクロアレイで発現量の比較を行った。見出したA375SMのTECに特異的に多いmiRNAを皮膚から分離された正常血管内皮細胞に導入すると、A375SMのTECと同様の性質を持つようになった。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that tumor-associated endothelial cells (TEC) facilitate tumor metastasis. We established TEC from xenograft tumor of the low metastatic malignant melanoma cell, A375 and from that of high metastatic counterpart, A375SM("super metastatic"). Comparison of those 2 TEC revealed specific up regulation of some microRNA in A375SM TEC. Transfection of the microRNA change the phenotype of normal endothelial cells from normal skin to that of A375SM TEC.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：血管内皮細胞 転移 悪性腫瘍 マイクロRNA

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子変異の蓄積した腫瘍細胞に対して血管内皮細胞などの間質細胞は正常であると信じられてきたが、申請者らは世界に先駆けて腫瘍血管内皮細胞(TEC, tumor endothelial cell)を分離・培養して、染色体異常や(2004 Cancer Res, 2008 Am J Pathol), 正常血管内皮細胞(NEC, normal EC)とは明らかに異なる性質を呈することを明らかにした(2005 Cancer Res, 2008 Cancer Science, 2010 BBRC).

腫瘍微小環境で異常性を獲得した TEC が肺転移を促進しているのではないかと考え、転移実験を行った。高転移性腫瘍(A375 "Super Metastatic")由来腫瘍血管内皮細胞(HM-TEC, high metastatic-TEC)と共移植すると本来転移しない低悪性度の腫瘍細胞 A375 が肺転移を来した。低転移性腫瘍由来 LM-TEC(low metastatic-TEC)や NEC との共移植では肺転移は起こらなかった。血中の CTC(circulating tumor cell)も HM-TEC と共移植すると多数認められ、腫瘍細胞が血管内に潜り込むようになった("intravasation")ことが明らかになった。

熱処理した HM-TEC 由来の培養上清でも A375 細胞の性質が変わることから、タンパク質以外の物質の関与が強く疑われた。上清を超速心して得られた CD63 陽性の細胞外小胞エクソソームの投与で A375 の遊走能が亢進することから、エクソソームによって安定に細胞間を伝搬されるマイクロ RNA(miRNA)が転移能の獲得に重要であると考えられた。

## 2. 研究の目的

腫瘍血管内皮細胞由来のエクソソームから miRNA を分離し、マイクロアレイで TEC に特異的に高発現する miRNA を同定する。

## 3. 研究の方法

(1) HM-TEC と LM-TEC の分離培養。

ヌードマウスの皮下にヒト悪性黒色腫瘍細胞株 A375SM と A375 をそれぞれ異種移植し、1cm 以上になった腫瘍をコラーゲン処理して単細胞化し、抗 CD31 抗体と磁気ビーズを使用して CD31 陽性細胞を分離した。混入する可能性のあるヒト腫瘍細胞を取り除く目的でヒト細胞に特異的に毒性を示す、ジフテリア毒素を培養に添加する。培養してパッセージ後に BS1-B4-lectin を用いて 2 度目の isolation を行い、純粋な TEC を得る。また、ヒト腎癌組織と隣接正常腎組織から TEC と NEC を分離培養する。

(2) TEC の培養上清のエクソソームを生成し、抽出したマイクロ RNA(miRNA)のマイクロアレイを実施する。

分離培養した TEC がこれまでに報告された TEC の発現を持つことを RT-PCR, FACS, ウェスタンブロットティングなどで確認した後に miRNA を抽出し、マイクロアレイを実施する。マイクロアレイから見出した候補の miRNA の特異的発現を PCR で確認する。

(3) 同定された miRNA を正常血管内皮細胞に導入し、TEC の表現型を持つようになるか検討する。

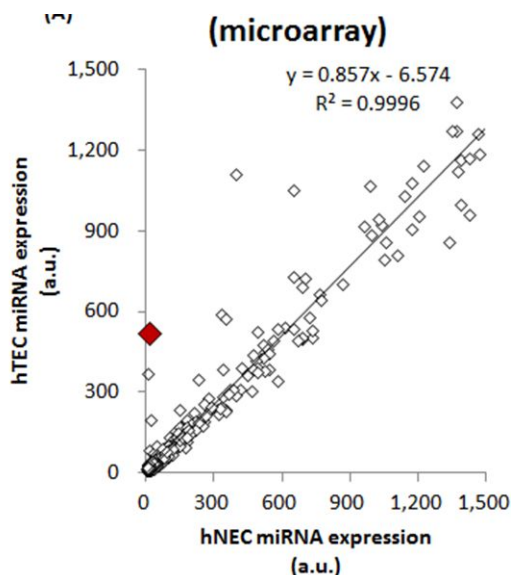
MTS アッセイ、遊走試験などを行う。

## 4. 研究成果

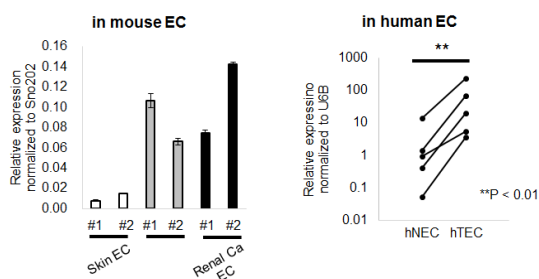
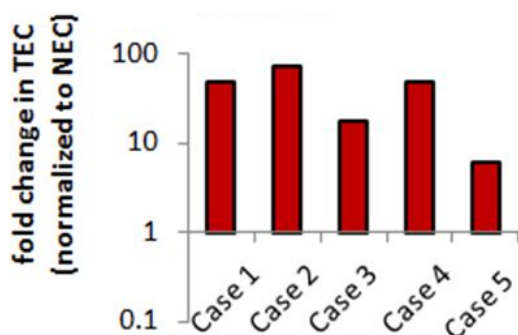
(1) ヌードマウスの皮下にヒト悪性黒色腫瘍細胞株 A375SM と A375 をそれぞれ異種移植した腫瘍から 99% 以上純粋な TEC を分離培養することができた(FACS 解析)。RT-PCR で CD31, VEGFR2 などの血管内皮細胞マーカーの発現、

TYEM1, 8, Biglycan, Lysyl oxidase, F-prostaglandin receptor, など TEC マーカーの発現が確認された。ヒト TEC でも同様の発現形式が確認された。

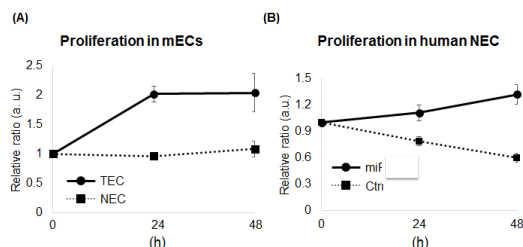
(2) 分離培養した TEC から miRNA を抽出し、マイクロアレイを行った。miRNA-X (論文投稿準備中のため X の番号は未公開) が TEC に特異的に高発現することが明らかになった。



この特異的発現は RT-PCR で再現性が確認された。



(3) 同定された miRNA を正常血管内皮細胞に導入したところ、増殖能が亢進し、TEC 様の性質を獲得した。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

- Hida K., Ohga N., Akiyama K., Maishi N., Hida Y.: Heterogeneity of tumor endothelial cells, *Cancer Sci*, 104(11), 1391-1395, 2013, DOI 10.1111 査読有

[学会発表](計 1 件)

- 川本泰輔, 秋山廣輔, 大賀則孝, 間石奈湖, 進藤正信, 樋田泰浩, 小坂展慶, 落谷孝広, 樋田京子: microvesicles を介して腫瘍細胞由来の miRNA が血管内皮細胞へ輸送される, 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013.10.4, パシフィコ横浜(横浜市)

[その他]

ホームページ等

北海道大学血管生物学教室

<http://www.den.hokudai.ac.jp/vascular-biology/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋田 泰浩 (HIDA YASUHIRO)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号：30399919

(2)研究分担者

加賀 基知三 (KAGA KICHIZOU)

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号：80224335

松居 喜郎 (MATSUI YOSHIROU)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：90219379

加藤 達哉 (KATOH TATSUYA)

北海道大学・北海道大学病院・特任助教

研究者番号：20624232

樋田 京子 (HIDA KYOKO)

北海道大学・大学院歯学研究科・特任准教

授

研究者番号：40399952

(3)連携研究者

なし