

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 4 月 23 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16769

研究課題名(和文)膀胱癌の血管外脱出過程における癌由来細胞外小胞の役割解明

研究課題名(英文) Role of cancer-derived extracellular vesicles in the extravasation of bladder cancer

研究代表者

米山 美穂子 (Yoneyama, Mihoko)

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：50791696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、癌の血行性転移の鍵となる癌細胞の血管外脱出過程に焦点を絞り、癌細胞由来 extracellular vesicles (EVs) がこの過程で果たす役割を明らかにすることを目的としている。膀胱癌由来 EVs は、血管内皮細胞の透過性を亢進させ、EV 分泌抑制細胞株では、血管透過性は亢進しないことを明らかにした。さらに、EV 分泌抑制細胞株の転移能を検証すると、親株は肺への転移が認められたのに対し、tsg101 ノックダウン細胞は、肺へ転移しないことが明らかとなった。これらの結果から、膀胱癌由来 EVs は血管内皮細胞の透過性を亢進させ、膀胱癌の血管外脱出過程に寄与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌細胞由来の EVs も癌転移のための微小環境形成に関わることが報告されているが、その機能・役割には、依然、未解明な点が多い。本研究では、癌の血行性転移の鍵となる癌細胞の血管外脱出過程に焦点を絞り、癌細胞由来 EVs がこの過程で果たす役割を明らかにすることを目的としており、本研究を遂行することにより、多段階からなる血行性転移過程の全容解明に重要な貢献をすると考えられる。さらに血管透過性を亢進させる分子を同定することによって、この分子を標的とする治療法の開発につながり、社会的に大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)：To examine the role of BCa cell-derived EVs for extravasation, we performed permeability test against human lung microvascular endothelial cell (HMVEC-L) monolayer. BCa cell-derived EVs treated HMVEC-L increased cell permeability. To confirm that the BCa cell derived EVs are responsible for the upregulation of cell endothelial permeability, we established that EVs secretion-decreased YTS-1 (TSGKD cells) cells by knocking down tumor susceptibility gene 101 (TSG101), which is well known as a regulator of EVs formation. The permeability of TSGKD cell treated HMVEC-L was significantly lower than when incubated with the control cells. In addition, lung metastasis capacity by using mouse tail vein injection model demonstrate that significantly reduced lung metastasis when injected TSGKD cells compared with control cells. Taken together, these results indicate BCa cell-derived EVs may contribute disruption of endothelial cells barrier for extravasation of BCa cells.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：細胞外小胞 膀胱癌 血管外脱出

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌の転移には、癌細胞自身の浸潤能のみならず、癌の微小環境が重要であり、癌細胞と癌の微小環境による相互作用が、転移に深く関わっている。その相互作用の担い手としてサイトカインなどの液性因子や細胞間の直接作用に加えて、最近、特に注目を集めているのが、受容細胞にある特定の核酸やタンパク質を伝達する細胞外小胞 EVs である(図 1.)。その理由の一つに、数多くの癌種において EVs が、癌の微小環境を構成する様々な細胞に働きかけ、転移の促進に働く分子機構やバイオマーカーとして有用である可能性が報告されているからである

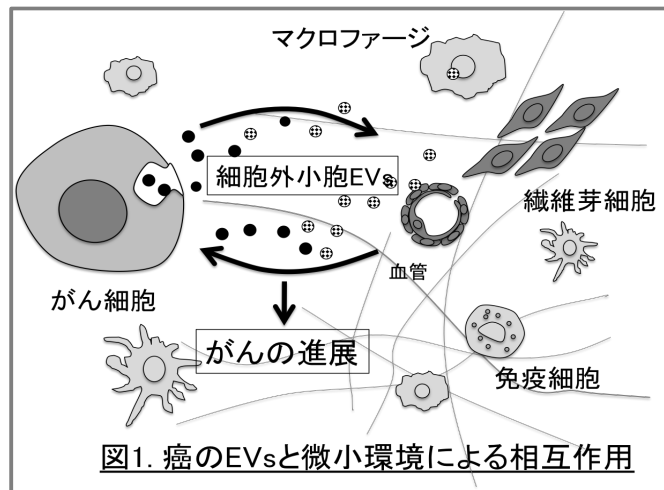


図1. 癌のEVsと微小環境による相互作用

(Hoshino A et al. Nature 527. 329-35, 2015)。申請者は自身の研究から、悪性度の高い膀胱癌細胞は、浸潤突起と呼ばれる突起状の膜構造を形成し、この浸潤突起形成が膀胱癌の浸潤転移、特に血行性転移に必須であることを明らかにした(Yoneyama MS et al. Eur J Cell Biol 93(4). 157-69, 2014(図 2.))。しかしながら、癌細胞の血管外脱出過程における癌細胞由来 EVs の役割に関しての研究はほとんどない。

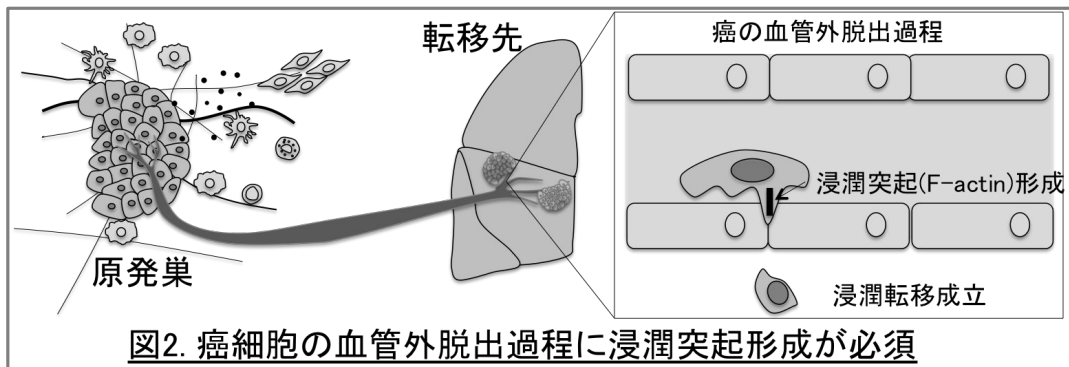


図2. 癌細胞の血管外脱出過程に浸潤突起形成が必須

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、血管外脱出過程における癌細胞由来 EVs の役割を解明することである。

Weiyang らは、悪性度の高い癌種由来 EVs が、血管内皮細胞間に隙間を形成し(=血管透過性亢進)(図 3-B.)、転移を促進させることを報告している(Weiyang Z et al. Cancer Cell 2014)。また Hoshino らは、EVs 分泌には、癌細胞の浸潤突起形成が関与し、浸潤突起形成が低下すると EVs 分泌が減少することを報告している(Hoshino D et al. Cell Reports 5. 1159-68, 2013)。

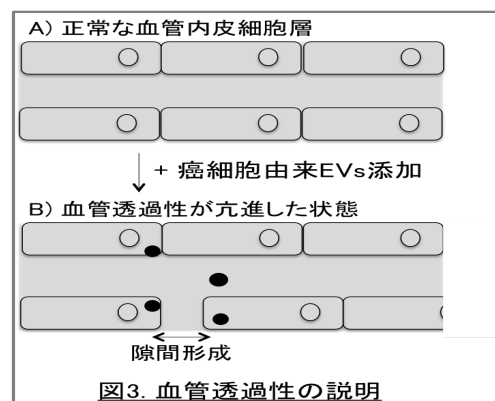


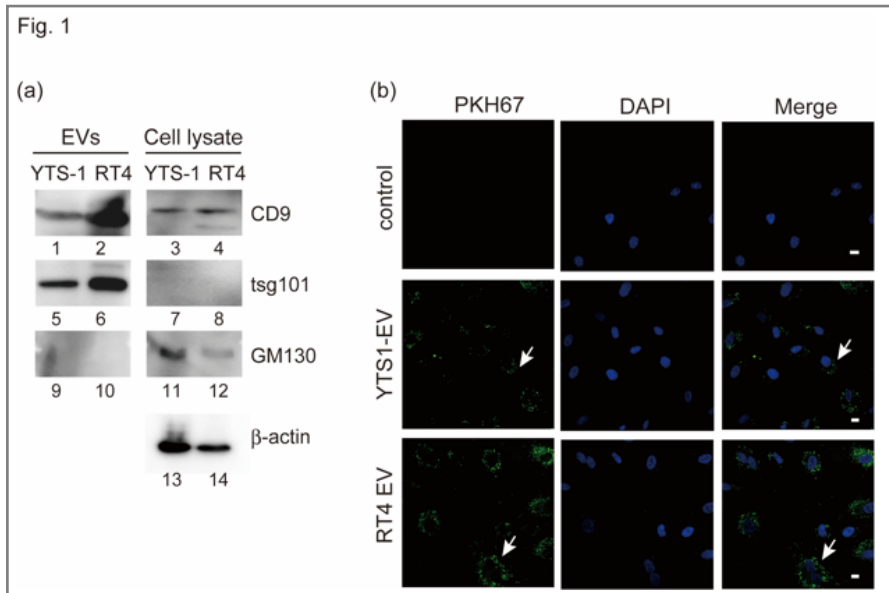
図3. 血管透過性の説明

### 3. 研究の方法

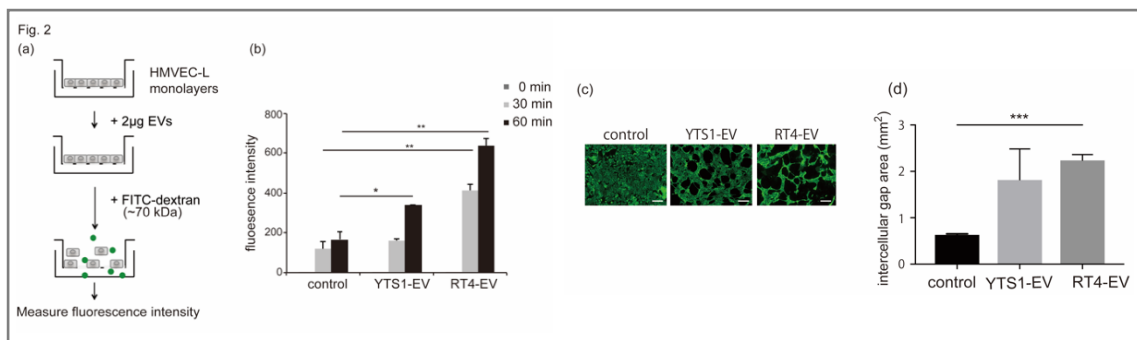
膀胱癌細胞 EVs は、超遠心法により回収した。EVs がヒト肺微小血管内皮細胞 HMVEC-L に与える影響を調べるために、膀胱癌細胞 EVs を HMVEC-L へ添加後、トレーサー拡散法による内皮細胞の血管透過性を測定した。血管透過性が膀胱癌由来 EVs に起因しているかを明確にするために、EVs 分泌抑制細胞株を作成し、血管透過性を与える影響を検証した。さらに、膀胱癌由来 EVs が癌の浸潤転移に与える影響を検証するために、EVs 分泌抑制細胞を使用し、浸潤能とマウスを用いた癌の肺転移能を評価した。最終的に、EVs 添加により変動する血管内皮細胞の mRNA マイクロアレイ解析を行った。

### 4. 研究成果

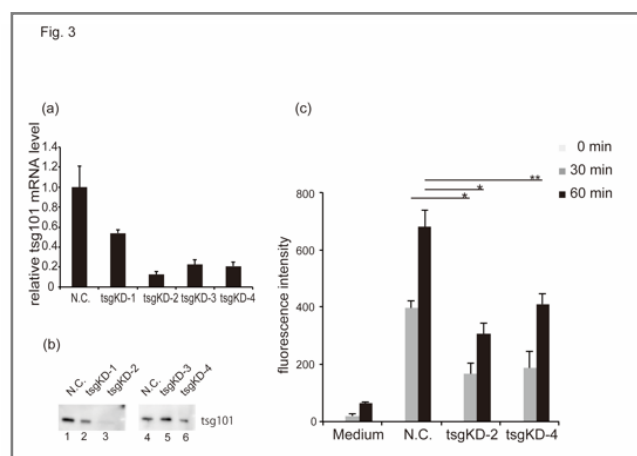
まず、膀胱癌細胞から超遠心法で得られたフラクションは EVs マーカーである CD9、tsg101 の発現が認められた。また、これらの回収した EVs は、血管内皮細胞へ添加すると、細胞内に取り込まれることがわかった (Fig. 1)。

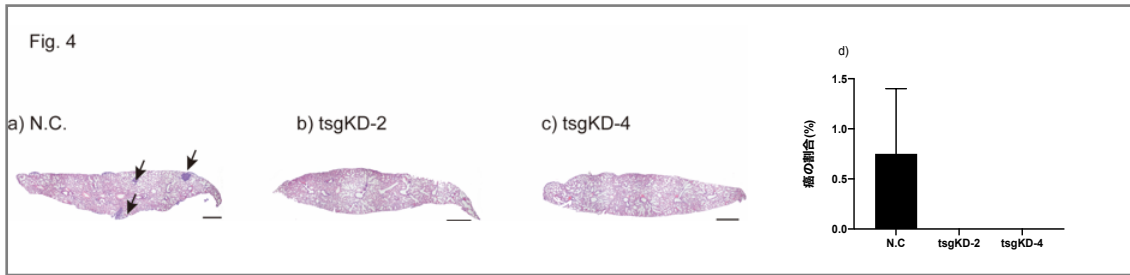


膀胱癌由来 EVs が血管内皮細胞に与える影響を検証するために、膀胱癌由来 EVs を HMVEC-L へ添加後、トレーサー拡散法による血管内皮細胞の血管透過性を検証した(Fig. 2a)。EV 添加 8 時間後に、YTS-1 および RT4 由来 EVs 共に、コントロールである PBS 添加群と比較し、有意に血管透過性を亢進させた (Fig. 2b)。また、同様に、膀胱癌由来 EVs を添加 8 時間後に、血管内皮細胞を VE-cadherin で蛍光染色し、細胞間ギャップ面積を測定したところ、YTS-1 および RT4 由来 EVs 添加で、コントロールである PBS 添加群と比較し、有意にギャップ面積が大きかった (Fig. 2c, d)。



さらに、血管透過性亢進が EVs に起因しているか否かを検証するため、YTS-1 の tsg101 タンパク質発現を、shRNA により抑制した細胞株を作成した。tsg101 発現の抑制は、mRNA とタンパク質レベルにより検証し、両者の発現が低値だったクローン 2 つ (KD2, KD4) を EV 分泌抑制細胞株として使用した (Fig. 3a,b)。これら EVs 分泌抑制細胞株を血管内皮細胞へ播種し、血管透過性に影響を与えるかどうかを検証したところ、EV 分泌抑制細胞は、コントロールと比べて、血管透過性更新が有意に減少した (Fig. 3c)。さらに、膀胱癌由来 EVs が癌の浸潤転移に与える影響を検証するために、EVs 分泌抑制細胞をマウスの尾静脈から注入し、肺への転移能を評価した。その結果、コントロールでは、肺に癌結節 (Fig. 4a 矢印) を形成したのに対し、EVs 分泌抑制細胞株では転移を認めなかった (Fig. 4b, c, d)。





最終的に、血管透過性を亢進させる血管内皮細胞の変化を捉えるために、EVs 添加により変動する血管内皮細胞の mRNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、mRNA 発現が Vinexin の発現が 2 倍以上低下していることが明らかとなった。Vinexin は、他の細胞骨格分子と結合し、細胞骨格の再構築に関与するタンパク質として知られている。EVs 添加により、血管内皮細胞内の細胞骨格の再編成が起こった結果、血管透過性が亢進した可能性が示唆された。

以上の結果から、膀胱癌由来 EVs は、血管内皮細胞の細胞骨格再編成に作用し、血管透過性を亢進させ、癌の浸潤転移に寄与していることが想定され、今後、血管透過性を亢進させる EVs 由来因子の検索を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 米山美穂子
2. 発表標題 膀胱癌細胞由来細胞外小胞は内皮細胞の血管透過性亢進に關与する
3. 学会等名 第6回日本細胞外小胞学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----