

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462003

研究課題名(和文) 移植マウス乳癌細胞が放出するMicrovesiclesは癌の転移を促進する

研究課題名(英文) Mouse mammary carcinoma cell lines release microvesicles containing precursor VEGF-C

研究代表者

伊藤 裕子 (Ito, Yuko)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40148432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：高転移性マウス乳癌細胞ではVEGF-Cの発現が強く、低転移性乳癌細胞では低いことを報告した。2種類の細胞培養上清より得たmicrovesicles (MVs) にはVEGF-C前駆体が含まれていた。MVsの伝播実験において、VEGFR3 (VEGF-C受容体)を発現している内皮細胞は2種類のMVsを取り込んで管腔形成が促進、リン酸化Aktが発現亢進するなど、内皮細胞の増殖に作用することが確認された。転移性の異なる2種類の乳癌細胞が分泌するMVsに含まれるVEGF-C前駆体は内皮細胞に同じように作用した。しかし、高転移性乳癌細胞はVEGFR3を発現しており、自己の増殖に作用していた。

研究成果の概要(英文)：Using two mouse mammary carcinoma cell lines, Western blot analysis of VEGF-C demonstrated exosomal expression of premature VEGF-C (pre-VEGF-C) in both cell lines. To study target cells of that pre-VEGF-C, we used mouse endothelial cell line (UV2) which express VEGFR3. MVs in the cell lines enhanced cell proliferation and tube formation in MV-treated UV2 cells. To confirm VEGF-C/VEGFR3 interaction, Western blot and immunofluorescent analysis were performed for the MV-treated UV2 cells. After treated by MVs, UV2 strongly expressed phospho-Akt. Furthermore, neutralizing of VEGFR3 inhibited proliferation of UV2, whereas UV2 were treated by MVs. These results indicated that there was no significant difference of pre-VEGF-C between these MVs shed from low- and high-metastatic tumors, while both MVs enhanced lymphangiogenesis of endothelial cells. Highly metastatic BJMC3879 cell was suggested as another target cell of pre-VEGF-C packed in MVs, because this cell expressed VEGFR3.

研究分野：医学

キーワード：microvesicle exosome VEGF-C マウス乳癌細胞 リンパ行性転移 リンパ管新生 オートクライン

1. 研究開始当初の背景

近年、種々の細胞から microvesicles (MVs) が放出されることが知られている。MVs には受容体タンパク、タンパク分解酵素、miRNA、mRNA などが含まれ、ドナー細胞から MVs が標的細胞へ伝播され標的細胞に様々な機能変化をもたらす。われわれは乳癌細胞のリンパ行性転移について研究しており、高転移性乳癌細胞株(BJMC3879)ではリンパ管内皮細胞増殖因子(VEGF-C)の発現が強く、低転移性乳癌細胞株(BJMC338)では低いことがリンパ管の新生の差、転移性の差として出ていることを報告した。また、VEGF-C は産生後多段階のプロセッシングを受け中間型を含む多段階の型で細胞外に分泌されることが知られている。

2. 研究の目的

高転移性乳癌細胞株(BJMC3879)と低転移性乳癌細胞株(BJMC338)が分泌する MVs に含まれている VEGF-C の差異が内皮細胞に及ぼす影響および転移性の差に影響するかを検討した。

3. 研究の方法

使用した細胞はマウス乳癌細胞株として高転移性乳癌細胞株(BJMC3879)、低転移性乳癌細胞株(BJMC338)である。内皮細胞としては乳癌細胞と同系のマウスより分離確立された UV2 (VEGFR3: VEGF-C 受容体を発現している)を用いた。各々の細胞培養上清より得た MVs は透過型および走査型電子顕微鏡、ナノサイトにより形態、サイズを確認した。MVs に含まれている VEGF-C は Western blot で確認した。遠心法により採取した各々の MVs を、培養した UV2 に添加して伝播実験、tube formation assay を行った。VEGF-C/VEGFR3 系が機能するかは伝播後の Akt リン酸化で確認した。高転移性乳癌細胞株の autocrine 実験ではこの細胞が発現している VEGFR3 を中和抗体でブロックしてから高転移性乳癌細胞から採取した MVs で伝播実験を行った。

4. 研究成果

各々の細胞培養上清より得た MVs はナノサイトによる計測で BJMC3879 が平均 157nm、BJMC338 が 167nm と大差はなく、透過型および走査型電顕による観察では約 25nm ~ 50nm の exosome が大半をしめていた (Fig.1 arrowhead)。Western blot による解析で exosome に VEGF-C 前駆体が含まれていた (Fig.2 lane: Bot, arrows)。MVs の伝播実験において、VEGFR3 を発現している内皮細胞は両細胞株の MVs を取り込んで管腔形成が促進したが差は認められなかった (Fig.3)、またリン酸化 Akt が発現亢進する (Fig.4) など、VEGF-C/VEGFR3 系が機能することが確認された。すなわち、転移性の異なる 2 種類の乳癌細胞が分泌する MVs に含まれる VEGF-C 前駆体は内皮細胞に同じように作用し、両細胞の MVs で差は認められなかった。そこで、高転移性乳癌細胞ではいわば autocrine 的に自身

に作用しているのではないかと検討した。高転移性乳癌細胞は自身の MVs をよく取り込み、増殖した。結論：高転移性のマウス乳癌細胞 (BJMC3879) は VEGF-C 受容体の VEGFR3 を発現しており、自ら分泌した MVs の一部を取り込んで、自己増殖に利用していると考えられた。この autocrine 的作用が両乳癌細胞に転移性の差異をもたらしていると考えられた。

<引用文献>

Microvesicle-mediated RNA molecule delivery system using monocytes/macrophages.

Akao Y, Iio A, Itoh T, Noguchi S, Ito Y, Otsuki Y, Naoe T.

Mol Ther. 2011 Feb;19(2):395-9. doi: 10.1038/mt.2010.254.

Lymphangiogenesis and Axillary Lymph Node Metastases Correlated with VEGF-C Expression in Two Immunocompetent Mouse Mammary Carcinoma Models.

Ito Y, Shibata MA, Eid N, Morimoto J, Otsuki Y. Int J Breast Cancer. 2011;2011:867152. doi: 10.4061/2011/867152. Epub 2011 Oct 19.

Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF C

Vladimir Joukov, Tarja Sorsa, Vijay Kumar, Michael Jeltsch, Lena Claesson Welsh, Yihai Cao, Olli Saksela, Nisse Kalkkinen, Kari Alitalo

Author Affiliations
DOI 10.1093/emboj/16.13.3898 Published online 01.07.1997

The EMBO Journal (1997) 16, 3898-3911

<Figures>

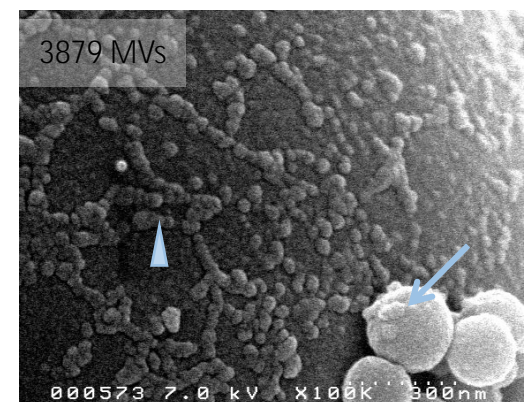
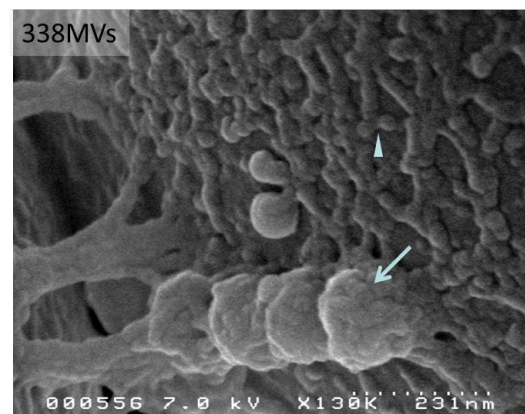


Fig.1 microvesicles の走査電顕写真

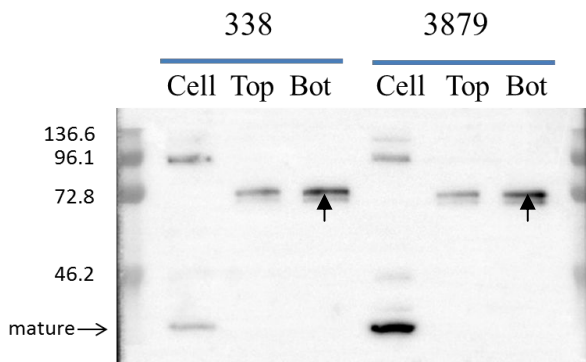


Fig.2 Western blot. 矢印が exosome の precursor VEGF-C を示す。

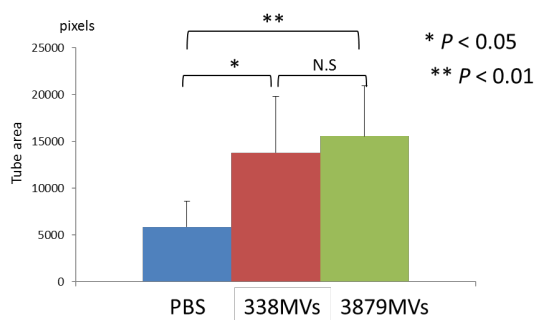


Fig.3 tube formation assay. vesicle 添加により形成された tube の面積に差異は認められない。

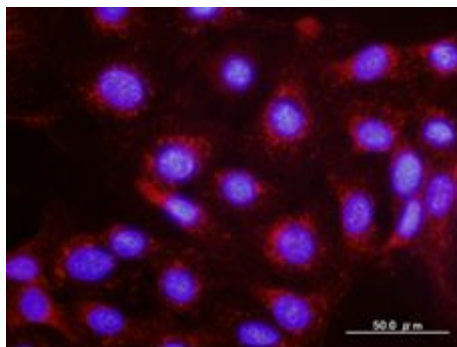


Fig.4 MVs を伝播された UV2. リン酸化 Akt が発現している。赤：リン酸化 Akt、青：核

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 10 件)

Kuranaga Y, Ito Y (13 人中 9 番目), Akao

Y (13 人中 13 番目). Anti-Oncogenic gem-Dihydroperoxides Induce Apoptosis in Cancer Cells by Trapping Reactive Oxygen Species. 査読有 Int J Mol Sci. 2016 Jan 8;17(1). pii: E71. doi: 10.3390/ijms17010071.

Shinohara H, Ito Y (11 人中 4 番目), Otsuki Y (11 人中 9 番目), Akao Y (11 人中 11 番目). Perturbation of energy metabolism by fatty-acid derivative AIC-47 and imatinib in BCR-ABL-harboring leukemic cells. 査読有 Cancer Lett. 2016 Feb 1;371(1):1-11. doi: 10.1016/j.canlet.2015.11.020.

Taniguchi K, Ito Y (15 人中 9 番目), Otsuki Y (15 人中 12 番目), Akao Y (15 人中 15 番目). PTBP1-associated microRNA-1 and -133b suppress the Warburg effect in colorectal tumors. 査読有 Oncotarget. 2016 Mar 9. doi: 10.18632/oncotarget.8005.

Shinohara H, Ito Y (11 人中 5 番目), Otsuki Y (11 人中 6 番目), Akao Y (11 人中 11 番目). Anti-cancer fatty-acid derivative induces autophagic cell death through modulation of PKM isoform expression profile mediated by bcr-abl in chronic myeloid leukemia. 査読有 Cancer Lett. 2015 Apr 28;360(1):28-38. doi: 10.1016/j.canlet.2015.01.039.

Taniguchi K, Ito Y (13 人中 2 番目), Otsuki Y (13 人中 10 番目), Akao Y (13 人中 13 番目). Organ-specific PTBP1-associated microRNAs determine expression of pyruvate kinase isoforms. 査読有 Sci Rep. 2015 Feb 27;5:8647. doi: 10.1038/srep08647.

Taniguchi K, Ito Y (11 人中 7 番目), Otsuki Y (11 人中 8 番目), Akao Y (11 人中 11 番目). MicroRNA-124 inhibits cancer cell growth through PTBP1/PKM1/PKM2 feedback cascade in colorectal cancer. 査読有 Cancer Lett. 2015 Jul 6;363(1):17-27. doi: 10.1016/j.canlet.2015.03.026.

Taniguchi K, Ito Y (12 人中 8 番目), Otsuki Y (12 人中 9 番目), Akao Y (12 人中 12 番目). 査読有 Biochim Biophys Acta. 2015 Jul 2;1852(9):1971-1980. doi: 10.1016/j.bbdis.2015.06.022.

〔学会発表〕(計 4 件)

伊藤裕子他、高転移性マウス乳癌細胞は precursor VEGF-C を autocrine する. 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016 年 3 月 28 日、郡山市、ビッグパレットふくしま

伊藤裕子他、マウス乳癌細胞は VEGF-C 前

駆体を内包した microvesicles を分泌する。第 74 回日本癌学会総会、2015 年 10 月 10 日、名古屋市、名古屋国際会議場
伊藤裕子他、マウス乳癌細胞は precursor VEGF-C を内包した exosome を放出する。
第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014 年 3 月 27 日、宇都宮市、自治医科大学キャンパス

〔その他〕

ホームページ等

大阪医科大学研究機構年報

<http://www.osaka-med.ac.jp/deps/kik/index.htm#hidden02>

大阪医科大学解剖学教室ホームページ

<http://www.osaka-med.ac.jp/deps/an1/results.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 裕子 (ITO, Yuko)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40148432

(2) 研究分担者

柴田 雅朗 (Shibata, Masa-aki)

大阪保健医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：10319543

大槻 勝紀 (OTSUKI, Yoshinori)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：50140166

(3) 連携研究者

赤尾 幸博 (AKAO, Yukihiro)

岐阜大学・連合創薬医療情報研究科・教授

研究者番号：00222505

ナビル・イード (NABIL, Eid)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：50570165