



TITLE:

Extracellular vesicles secreted from bone metastatic renal cell carcinoma promote angiogenesis and endothelial gap formation in bone marrow in a time-dependent manner in a preclinical mouse model(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Takeda, Masashi

CITATION:

Takeda, Masashi. Extracellular vesicles secreted from bone metastatic renal cell carcinoma promote angiogenesis and endothelial gap formation in bone marrow in a time-dependent manner in a preclinical mouse model. 京都大学, 2023, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2023-07-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k24840>

RIGHT:

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏名	武田 将司
論文題目	Extracellular vesicles secreted from bone metastatic renal cell carcinoma promote angiogenesis and endothelial gap formation in bone marrow in a time-dependent manner in a preclinical mouse model （骨転移指向性腎細胞癌由来の細胞外小胞は前臨床モデルにおいて時間依存性に骨髄での血管新生、血管内皮ギャップ形成を促進する）		
（論文内容の要旨） 淡明型腎細胞癌の骨転移は予後不良、病的骨折などの骨関連事象を引き起こし、生活の質を低下させる。また、全身治療および骨を標的とした治療の効果も限定的である。骨転移成立初期に診断、介入ができれば予後改善を期待できるものの、そのためには骨転移初期の腫瘍増殖に関わる分子メカニズムの解明が重要である。近年、転移初期に癌細胞が生着、増殖するためには転移先での血管新生が重要であることが明らかにされている。本研究では、転移先で血管新生を促進する癌細胞のメッセンジャーとして細胞外小胞(EV)という細胞が分泌するナノ粒子に注目し、骨転移指向性を有する淡明型腎細胞癌が分泌するEVは骨髄での血管新生を促進するという仮説を前臨床モデルを用いて検証することを目的とした。 まず、淡明型腎細胞癌細胞株 786-O にルシフェラーゼを導入した 786-O luc をヌードマウスの脛骨へ注射し、骨転移指向性を高めた亜株 786-O BM を樹立した。次に両細胞株の細胞培養上清から EV を回収し、ヌードマウスに 2 週間にわたって静脈注射した後、0、4、8、12 週の間隔において、脛骨の骨髄血管の組織学的変化を観察した。その結果、786-O BM 由来の EV(786-O BM EV)を投与したマウスでは注射後の間隔が長いものほど拡張した血管の増殖を認め骨髄血管密度が上昇していた。さらに 8 週、12 週の間隔をおいたマウスでは 786-O luc 由来の EV(786-O luc EV)を投与したものに比べ有意に高い骨髄血管密度を認めた。以上より、 <i>in vivo</i> では 786-O BM EV は時間依存性にコントロールより有意に血管新生を促進することが示唆された。また、 <i>in vitro</i> においても、786-O BM EV は 786-O luc EV より高度な血管新生能を示した。次に骨髄血管の微細構造を電子顕微鏡で観察したところ、786-O BM EV を投与したマウスでは血管内皮により多くのギャップを認めた。骨髄での血管新生、血管内皮でのギャップ形成に関わる EV 中のタンパク質を探索するため、質量分析法で両 EV 中のタンパク質を解析した。786-O BM EV 中で有意に濃縮されている膜タンパク質に注目し、AminopeptidaseN(APN)を候補に選定した。APN ノックダウン細胞株(shANPEP)を樹立し、shANPEP 由来の EV を投与されたマウスの骨髄での血管新生、血管内皮でのギャップ形成がコントロールと比較して有意に抑制されたことから、これらの血管の変化には EV 中の APN が関与する可能性が示唆された。また、786-O BM EV、786-O luc EV のいずれかを投与し最終投与から 4 週または 12 週後のマウスに 786-O luc の左心室注射を行ったところ、12 週後でのみ 786-O BM EV を投与されたマウスで有意に骨転移の増加を認めた。また、786-O BM EV を投与されたマウスでは最終投与後の間隔を 4 週としたものに比べ 12 週としたものでより多くの骨転移を認めた。最後に骨転移性または局所進行性の淡明型腎細胞癌患者の臨床検体を培養し、培養液から回収した EV を解析した。骨転移を伴う患者組織由来の EV(BM-EV)は局所進行性患者組織由来の EV(LA-EV)と比べ、 <i>in vitro</i> で高度な血管新生能を示した。また ELISA 法で APN を定量したところ、BM-EV の方が LA-EV に比較し有意に高い APN 濃度を示した。			

本研究では、骨転移指向性淡明型腎細胞癌が分泌する細胞外小胞が前臨床モデルにおいて経時的に骨髄血管の血管新生、血管内皮ギャップ形成を促進することが示された。

（論文審査の結果の要旨）

がん細胞由来の細胞外小胞(EV)は転移巣の微小環境形成において重要な役割を担うとされているが、その詳細は未解明な部分も多い。本研究では骨転移指向性腎細胞癌が分泌する EV が骨にもたらす組織学的変化について主に血管新生に注目して前臨床モデルを用い検討した。淡明型腎細胞癌細胞株 786-O から骨転移能を高めた亜株 786-O BM を樹立した。786-O BM 由来 EV は親株と比較し、時間依存性にマウス脛骨骨髄での血管新生を促進し、血管内皮間の間隙を増加させた。また、*in vitro* で血管新生を有意に促進した。プロテオミクス解析により 786-O BM 由来 EV で高発現している膜蛋白質として抽出した Aminopeptidase N (APN)をノックダウンすると EV の血管新生促進作用が抑制された。786-O BM 由来EVの前投与により血管新生を誘導したマウスに786-Oの心臓注射を行うと骨転移の増加を認めた。以上より骨転移指向性腎癌細胞由来のEVはAPNを介して時間依存性に骨髄で血管新生を促進した。また、臨床検体において骨転移を伴う腎癌組織が分泌するEVは局所進行症例のそれと比較し、APN含有量が有意に高く、*in vitro* で血管新生促進作用を示し、EV-APNを介した機序が骨転移に関与している可能性が示唆された。

以上の研究は腎癌骨転移の機序の解明に貢献し、腎癌骨転移の新規治療法開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和05年 6月 12日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。