

Title	Cancer Cells Cause Vascular Endothelial Cell (vEC) Retraction via 12(S)HETE Secretion : The Possible Role of Cancer Cell Derived Microparticle
Author(s)	打出, 啓二
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/48895">https://hdl.handle.net/11094/48895</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	うち で けい し 打 出 啓 二
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 5 9 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年 9 月 26 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Cancer Cells Cause Vascular Endothelial Cell (vEC) Retraction via 12(S)HETE Secretion; The Possible Role of Cancer Cell Derived Microparticle (癌細胞による 12 (S) HETE 分泌を介した、血管内皮細胞の開裂:癌細胞由来マイクロパーティクルの関与)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 門 田 守 人  (副査) 教 授 野 口 眞 三 郎 教 授 青 笹 克 之

## 論 文 内 容 の 要 旨

### [ 目 的 ]

癌転移の1つのステップとして、癌細胞による血管内皮細胞の開裂がある。この現象は、血管内皮細胞に癌細胞が接着する物理刺激、及び、癌細胞が分泌する開裂惹起物質によることが知られているが、詳細は不明である。今回、癌細胞由来の開裂惹起物質について検討した。

### [ 方 法 ]

#### 1) 癌細胞培養上清の調製

ヒト乳癌細胞株 (MCF-7) を 10%牛胎児血清 (以下 FBS) 添加 DMEM/F12 培養液を用いて 37°C で 3-4 日間培養した。培養液を交換後、さらに 48 時間培養し、遠沈した上清をフィルター (0.45  $\mu$ m) で濾過し、蛋白濃度が 1 mg/ml になるようにリン酸緩衝化生理食塩水 (PH 7.4) で調整し、これを癌細胞培養上清 (以下 CM) とした。

#### 2) 血管内皮細胞開裂活性の測定

2 層式トランスウェル (Costar3413) の上槽下面に Matrigel を滴下し、牛肺動脈血管内皮細胞 (Calf pulmonary arterial endothelial cells) を、10%FBS 添加 D-MEN 培養液で 37°C 3 日間培養した。上槽に FITC-Dx (最終濃度 1 mg/ml) 添加 CM (250  $\mu$ l) を入れ、24 時間後に、下槽から標本を採取し、蛍光光度 (励起波長 490 nm、蛍光波長 550 nm) を測定した。開裂活性は、未処理 CM の開裂活性を 100%として表した。

#### 3) 開裂惹起物質の生化学的検討

CM を、熱処理 (95°C 5 分間)、トリプシン (0.1%) 処理、Brigh and Dyer 法による脂質抽出などを行い、開裂活性を検討した。さらに、CM から Brigh and Dyer 法にて抽出した脂質を TLC plate (LK6DF) を用いて分離し、各分画の開裂活性を測定した。また、開裂因子が脂質である可能性が考えられたので、acetyl salicylic acid (以下 ASA: cyclooxygenase inhibitor) と、nordihydroguaiaretic acid (以下 NDGA: lipoxygenase inhibitor) を添加して 48 時間培養を行い、開裂活性を測定した。さらに、標準 12(S)HETE とその光学異性体の 12(R)HETE (いずれも最終濃度 0.3  $\mu$ M) について、開裂活性を検討した。

#### 4) 血管内皮細胞における開裂惹起因子の局在

CM を超遠心 (105,000 g、150 分間) し、沈渣 (マイクロパーティクル分画) を調製した。次に FITC でラベルした 12(S)HETE 抗体と反応 (4 °C、30 分間) させ、FACSscan を用いて 12(S)HETE の局在を解析した。

### [ 結 果 ]

#### 1) 血管内皮細胞開裂活性の測定

CM (蛋白濃度 0.2 mg/ml) の開裂活性を、経時的に検討したところ、24 時間まで濃度及び時間依存的に増加した。

#### 2) 開裂惹起物質の生化学的検討

トリプシン (0.1%) 処理により、CM の開裂活性は、トリプシン処理前の CM と比較し  $36 \pm 6\%$  ( $n=3$ ) 低下した。95°C 5 分間の加熱処理により、CM の開裂活性はほぼ消失した。また、脂質抽出により、CM の開裂活性は、脂質抽出前の CM と比較し  $46 \pm 11\%$  ( $n=3$ ) 低下した。さらに、培養時に ASA 及び NDGA を添加した CM を用いて、開裂活性を測定した結果、ASA 添加 CM は、ASA を添加しない CM と同等の活性を認めたのに対し、NDGA 添加 CM の活性は、NDGA を添加しない CM と比較して、 $46 \pm 4\%$  ( $n=3$ ) 消失した。CM から脂質を抽出し、TLC にて分画すると、Rf 値 0.73 の 12-HETE に相当する分画を含む 3 つのバンドが出現し、12-HETE に相当する分画の開裂活性は  $66 \pm 6\%$  ( $n=3$ ) であった。また、標準 12(S)HETE は開裂活性を認めたが、12(R)HETE は開裂活性がほとんど認められなかった。

#### 3) 血管内皮細胞における開裂惹起因子の局在

CM の超遠心処理 (105000 g、150 分間) を行い、上澄と沈渣 (マイクロパーティクル分画) に分けて開裂活性を調べると、ほとんどの活性はマイクロパーティクル分画に認められた。FITC ラベル 12(S)HETE 抗体を用いた FACSscan では、マイクロパーティクル表面に 12(S)HETE が局在していた。

### [ 総 括 ]

癌細胞由来の血管内皮細胞開裂因子には、蛋白と脂質の双方が存在する。脂質については 12(S)-HETE の可能性が高く、マイクロパーティクルの表面に局在していることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

癌転移の 1 つのステップとして、癌細胞による血管内皮細胞の開裂現象がある。本研究ではこの現象に関与する、癌細胞由来の血管内皮細胞開裂惹起物質、特に脂質の惹起物質について、その局在を含めて検討した。ヒト乳癌細胞株 (MCF-7) を培養し、癌細胞培養上清 (以下、培養上清) を作製し、2 層式トランスウェルを用いて、牛肺動脈血管内皮細胞の開裂活性の測定を行った。まず、生化学的検討を行った結果、開裂惹起物質は、熱耐性ではなく、蛋白及び、脂肪成分も含まれることが示唆された。次に、リポキシゲナーゼ系の阻害剤としてノルジヒドログアヤレティック酸 (NDGA) を、シクロオキシゲナーゼ系の阻害剤としてアセチルサリチル酸 (ASA) を、培養上清を作製する段階で添加し、開裂活性に対する影響を検討した。ASA 添加培養上清は、未添加の培養上清と活性はほぼ同じで、ASA による阻害効果を認めなかったが、NDGA 添加培養上清では、約 50% の阻害が認められ、開裂活性はリポキシゲナーゼ系代謝物にあると考えた。培養上清から抽出した脂質を TLC plate を用いて分離すると、Rf 値 0.73 の 12-HETE に相当する分画を含む 3 つのバンドが出現し、12-HETE に相当する分画には、約 70% の開裂活性が認められた。また、標準 12(S)HETE は開裂活性を認めたが、その光学異性体である 12(R)HETE には開裂活性がほとんど認められなかった。さらに、培養上清の超遠心処理 (105000 g、150 分間) を行い、上澄と沈渣 (マイクロパーティクル分画) に分けて開裂活性を調べると、ほとんどの活性はマイクロパーティクル分画に認められた。FITC ラベル 12(S)HETE 抗体を用いた FACSscan では、マイクロパーティクル表面に 12(S)HETE が局在していた。

本研究により、癌細胞由来の血管内皮細胞開裂因子には、蛋白と脂質の双方が存在し、脂質については 12(S)-HETE の可能性が高く、マイクロパーティクルの表面に局在していることが示唆されており、本研究は学位の授与に値すると思われる。