

Title	Exosomal miR-155 Derived from Hepatocellular Carcinoma Cells Under Hypoxia Promotes Angiogenesis in Endothelial Cells
Author(s)	松浦, 雄祐
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72528
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 松浦 雄祐	
論文審査担当者	(職) 氏 名
	主 査 大阪大学教授 土岐 裕一
	副 査 大阪大学教授 竹原 敏一
	副 査 大阪大学教授 富山 憲幸
論文審査の結果の要旨	
<p>肝細胞癌(HCC)において低酸素は悪性度を増強する主要な因子である。近年、腫瘍微小環境における細胞間の情報伝達物質としてエクソソーム(Ex)が注目されている。本研究では低酸素下HCC細胞由来Exの機能と標的分子について検証した。</p> <p>ヒト肝癌細胞株を通常酸素・低酸素下で培養後にExを抽出し、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)に添加した。MTT法による通常酸素下Ex添加(Nx群)・低酸素下Ex添加(Hx群)の増殖能に有意差を認めなかった。Tube formation assayでは、Hx群で血管新生が促進された。定量的PCR法によるEx内miRNAの発現変化では、低酸素下でmiR-155の発現が上昇していた。また、HCC40例の血清中Ex内miR-155の発現によりHigh群/Low群の2群に分類すると、High群の予後は不良であった。</p> <p>以上より、低酸素下HCC由来Exは内包するmiR-155を介して血管新生と転移・再発に関与することが示唆され、本論文は博士(医学)の学位授与に値する。</p>	

論文内容の要旨
Synopsis of Thesis

氏名 Name	松浦 雄祐
論文題名 Title	Exosomal miR-155 Derived from Hepatocellular Carcinoma Cells Under Hypoxia Promotes Angiogenesis in Endothelial Cells (低酸素下肝癌細胞由来エクソソームに内包されるmiR-155は内皮細胞の血管新生を促進させる)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>肝細胞癌(HCC)は血流が豊富な多血性腫瘍であり、その増殖・進展に血管新生が深く関与している。一方、低酸素は腫瘍微小環境における重要な要素の一つであり、血管新生・浸潤・転移を促進させる因子として知られている。また近年、細胞が分泌するエンドソーム由来の小顆粒であるエクソソームが、腫瘍微小環境における細胞間情報伝達物質として機能することが明らかになってきている。本研究では、低酸素環境下において肝癌細胞が分泌するエクソソームの腫瘍細胞および血管内皮細胞への影響を検証し、血管新生に関与する作用機序を解明することを目的とした。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>本研究では、ヒト肝癌細胞株PLC/PRF/5, HuH7を通常酸素下(20%O₂)および低酸素下(1%O₂)で培養し、その培養上清からExoQuick-TC[®]を用いてエクソソームを抽出して、それぞれの実験に使用した。</p> <p>まず、低酸素下における肝癌細胞からのエクソソーム分泌能について検討したところ、低酸素下では細胞増殖能は低下したが、一細胞当たりのエクソソーム分泌量は増加した。次に抽出したエクソソームを肝癌細胞株とヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)に添加して、増殖能の変化をMTT法により検討した。エクソソーム無添加群(対照群)と比較して、エクソソーム添加により増殖能は抑制されたが、通常酸素下エクソソーム添加群(Nx群)と低酸素下エクソソーム添加群(Hx群)の2群間では、いずれの細胞株でも増殖能に有意な差は認めなかった。エクソソームによる血管新生能を評価するために、抽出したエクソソームをHUVECsに添加してTube formation assayを行い、1視野あたりの分枝細胞数を算出すると、対照群(PLC/PRF/5由来:62.0±10.1/view-fields, HuH7由来:75.0±1.7/view-fields)と比較し、Nx群(PLC/PRF/5由来:51.3±10.0/view-fields, HuH7由来:65.6±9.8/view-fields)では有意差を認めなかったが、Hx群(PLC/PRF/5由来:81.3±7.5/view-fields, HuH7由来:96.3±5.7/view-fields)では有意に脈管形成能が促進された($p < 0.05$)。</p> <p>次に血管新生促進に関与する分子を同定するために、細胞内およびエクソソーム内の血管新生に関与する種々のマイクロRNA(miR)(miR-21, miR-26a, miR-122, miR-146a, miR-155, miR-182)の発現量を定量的PCR法により検討した。低酸素下では、通常酸素下と比較して肝癌細胞自体のmiR-155の発現量は、PLC/PRF/5:3.1倍, HuH7:3.5倍に上昇しており、エクソソーム内miR-155も同様にPLC/PRF/5:3.3倍, HuH7:1.7倍に上昇していた。エクソソーム内のmiR-155を介した血管新生能を評価するために、anti-miR-155を用いてmiR-155をknockdownした肝癌細胞から低酸素下のエクソソームを抽出して、HUVECsに添加すると、低酸素下肝癌細胞由来エクソソームによる脈管形成能の促進作用が阻害された。</p> <p>最後に、miR-155の臨床的意義を検証するために、肝切除術を施行したHCC40例における血清中miR-155発現と切除標本における血管新生因子の発現及び予後と比較検討した。血清中エクソソーム内miR-155の発現量により、中央値でHigh群20例, Low群20例の2群に分類すると、1年・3年無再発生存率はHigh群65.0%・37.9%, Low群80.0%・75.0%とHigh群で有意に不良であった($p = 0.04$)。組織標本が得られた30例でVEGF, HIF-1αの発現を免疫組織染色法で比較すると、High群のVEGF・HIF-1αの陽性率はそれぞれ60%(9/15例)・80%(12/15例)であり、Low群の20%(3/15例)・40%(6/15例)よりも有意に高率であった($p = 0.03$)。CD34の免疫組織染色により微小血管密度(MVD)を測定すると、Low群(79.4±55.2/view-fields)と比較してHigh群(117.4±54.0/view-fields)で有意に高かった($p = 0.03$)。これらより、臨床検体でもmiR-155高発現群では血管新生因子の発現が亢進しており、血管新生が促進されていることが示された。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>低酸素下において肝癌細胞が分泌するエクソソームは、内包するmiR-155を介して血管新生を促進することで、転移・再発に関与している可能性が示唆された。</p>	