

# De rol van microvesikels in kanker

## The role of microvesicles in cancer

**Auteurs** A. Kleinjan, F.F. van Doormaal en R. Nieuwland

**Trefwoorden** metastasering, microvesikels, tumorgroei

**Keywords** cancer growth, metastases, microvesicles

### Samenvatting

Het bloed van kankerpatiënten bevat van cellen afkomstige microvesikels die op verschillende manieren de tumorgroei en metastasering kunnen bevorderen. Voorbeelden hiervan zijn kankercellen die microvesikels afgeven met verhoogde concentraties cytostatica, waardoor de cellulaire overleving wordt bevorderd, of microvesikels met proteolytische enzymen waardoor de extracellulaire matrix wordt afgebroken. Microvesikels kunnen tevens onder andere het immuunsysteem moduleren, receptoren en functionele genetische informatie, zoals messenger RNA, overdragen en vaatvernieuwing bevorderen, waardoor een gunstig milieu voor kankergroei ontstaat. In dit overzichtsartikel zullen deze mechanismen worden beschreven, evenals mogelijke diagnostische, prognostische en therapeutische toepassingen.

*(Ned Tijdschr Hematol 2010;7:99-106)*

### Summary

Blood from cancer patients contains cell-derived microvesicles, which can affect tumour growth and metastasis in various ways. Examples are microvesicles from cancer cells containing increased amounts of chemotherapeutic agents, thereby contributing to cancer cell survival, or containing proteolytic enzymes that degrade the extracellular matrix. In addition, microvesicles can modulate the immune system, transport receptors to transform cells, and transport functional genetic information and pro-angiogenic factors to promote cancer growth, et cetera. This review provides an overview of these mechanisms and the potential applications of microvesicles in diagnosis, prognosis and treatment.

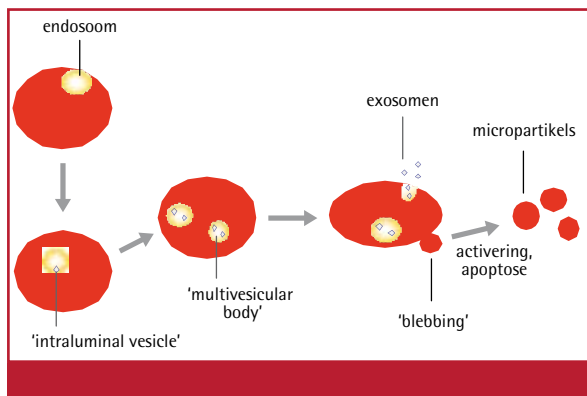
### Inleiding

Er zijn aanwijzingen dat het bloed van kankerpatiënten hogere aantallen van cellen afkomstige blaasjes (microvesikels) bevat dan het bloed van gezonde mensen. Wat zijn microvesikels? En belangrijker: betreft het hier een epifenomeen of spelen microvesikels een rol in het uitgroeien van kanker? Wat zijn de mogelijke diagnostische en therapeutische toepassingen van microvesikels?

### Microvesikels: een beschrijving

Het vermogen van cellen om microvesikels af te geven aan hun omgeving is van belang doordat het cellen in staat stelt om een homeostase te handhaven

en om informatie uit te wisselen met de omgeving, zowel lokaal als op afstand. Microvesikels kunnen receptoren, boodschappermoleculen en genetisch materiaal transporteren en overdragen op andere cellen, maar ook andere cellen activeren (zie *Figuur 1* en *2* op pagina 100 en 101). Voor zover bekend geven alle eukaryote cellen microvesikels af aan hun omgeving. De belangrijkste en bekendste soorten microvesikels zijn micropartikels en exosomen (zie *Figuur 1* op pagina 100). Micropartikels zijn microvesikels die ontstaan door het afsnoeren ('blebbing' of 'budding') van de celmembraan tijdens apoptose of activering van cellen en variëren in diameter tussen 100 nm en 1 µm. Micropartikels exposeren eiwitten en receptoren die



**Figuur 1. Ontstaanswijze van verschillende soorten microvesikels.** De route van exosoomvorming is in grijs weergegeven en verloopt via endocytose naar de vorming van intraluminale vesikels binnenin deze endosomen. Deze vesikels gaan zich organiseren als 'multivesicular bodies' en indien deze uitgescheiden worden, heten het exosomen. Micropartikels ontstaan doordat de membraan blaarvormige uitstulpingen gaat vormen ('blebbing') en micropartikels afgesnoerd worden.

van de oorspronkelijke cel afkomstig zijn, waardoor hun cellulaire herkomst kan worden vastgesteld.<sup>1</sup> Exosomen variëren in diameter tussen 30 en 100 nm. De eiwitsamenstelling van exosomen is verschillend van micropartikels, ondanks dat exosomen oorspronkelijk ook van de celmembraan afkomstig zijn. Exosomen ontstaan door een proces van internalisatie van delen van de celmembraan en uiteindelijk vorming van een 'multivesicular body' van waaruit exosomen naar de omgeving worden uitgescheiden.<sup>2</sup> De cellulaire herkomst van de microvesikels en daarmee hun inhoud en samenstelling is bepalend voor hun functie. Omdat onze huidige detectietechnieken nog onvoldoende nauwkeurig zijn om een onderscheid tussen micropartikels en exosomen te maken, en omdat in de wetenschappelijke literatuur het onderscheid niet altijd eenduidig is, wordt in dit artikel de verzamelnaam 'microvesikels' gebruikt.

### Het meten van microvesikels

Het meten van microvesikels kent een aantal beperkingen en is afhankelijk van de methode van bloedafname, het gebruikte anticoagulans, de tijd tussen bloedafname en de bereiding van het plasma, enzovoort. Het isoleren van microvesikels moet zodanig gebeuren dat de verontreiniging met cellen beperkt blijft, terwijl er tegelijkertijd zo min mogelijk microvesikels verloren gaan. Momenteel wordt flowcytometrie het meest gebruikt voor het detecteren en kwantificeren van microvesikels, vooral voor micro-

partikels. Deze methode is bewerkelijk, maar biedt de mogelijkheid om bijvoorbeeld de cellulaire herkomst van micropartikels vast te stellen. Andere gebruikte technieken zijn 'enzyme-linked immunosorbent assays' en functionele assays, zoals stollingsbepalingen. Micropartikels en exosomen kunnen ook zichtbaar worden gemaakt met elektronenmicroscopie en hun eiwitsamenstelling of de aanwezigheid van bepaalde eiwitten kan in kaart worden gebracht met 'western blotting', proteomics en immunoelectronenmicroscopie.<sup>3</sup>

### Microvesikels in kankerpatiënten: stollingsbevorderend

Initieel werden aan microvesikels alleen stollingsbevorderende en stollingsinitiërende eigenschappen toegeschreven. De negatief geladen membraanfosfolipiden vormen een oppervlak waaraan stollingsfactoren kunnen binden, waardoor het ontstaan van een fibrinestolsel wordt vergemakkelijkt. Daarnaast zijn in het bloed weefselfactor-exposerende microvesikels ('blood-borne tissue factor') aanwezig, die stollingsactief kunnen zijn. Weefselfactor is de initiator van de bloedstolling en bevindt zich vooral extravasculair.<sup>1</sup> Al in de jaren 70 van de vorige eeuw werd gezien dat het kweekmedium van kankercellen stollingsbevorderende microvesikels bevatte. Vervolgens verschenen eind jaren 90 van de vorige eeuw de eerste publicaties over de verhoogde aanwezigheid van microvesikels in het bloed van kankerpatiënten, die vooral afkomstig bleken te zijn van erythrocyten (of megakaryocyten) en slechts voor een klein deel van kankercellen.<sup>4</sup> Latere onderzoekers rapporteerden hogere aantallen microvesikels in het bloed van kankerpatiënten met een veneuze trombose in vergelijking met kankerpatiënten zonder trombose. Vooral de aanwezigheid van weefselfactor-exposerende microvesikels leek met veneuze trombose geassocieerd te zijn. Zwicker en collega's vonden dat kankerpatiënten met veneuze trombose viermaal hogere aantallen van deze microvesikels in hun bloed hadden dan kankerpatiënten zonder trombose.<sup>5</sup> Een Nederlandse onderzoeksgroep toonde zelfs achttienmaal hogere aantallen weefselfactor-exposerende microvesikels aan in oncologische patiënten met een veneuze trombose in vergelijking met kankerpatiënten zonder veneuze trombose.<sup>6</sup> Naar aanleiding van deze studies is er voldoende reden om aan te nemen dat microvesikels stollingsbevorderend zijn, en tenminste een gedeeltelijke verklaring vormen voor de verhoogde tromboseneiging bij kankerpatiënten.

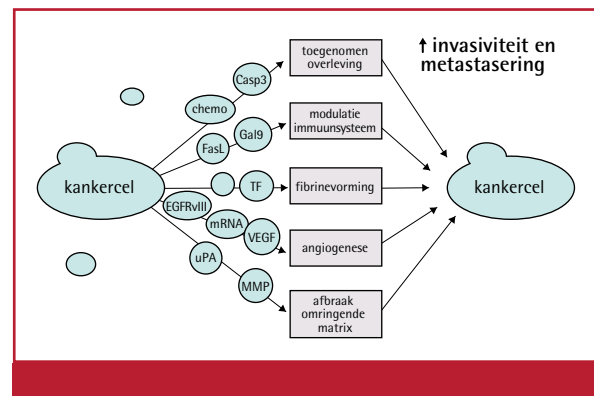
## Rol van microvesikels in kankergroei en metastasering

### Cellulaire overleving

*Ontsnappen aan geprogrammeerde celdood (apoptose)*  
Zowel exogene (extracellulaire) als endogene (intracellulaire) stress kan leiden tot geprogrammeerde celdood (apoptose) van cellen. In 1988 werd beschreven hoe endotheelcellen en erythrocyten een complementaanval (exogene stress) afweren door microvesikels af te snoeren met hierop sterk verhoogde aantallen complementcomplexen die lysis van de cel hadden kunnen veroorzaken.<sup>7</sup> Daarnaast zijn onlangs een aantal studies gepubliceerd die een verband leggen tussen het afsnoeren van microvesikels en ongevoeligheid voor cytostatica, zogenoemde 'drug resistance'. In 2 studies werden chemotherapie-gevoelige en chemotherapie-ongevoelige kankercellen geïncubeerd met cisplatinum of doxorubicine. De microvesikels van de chemotherapie-ongevoelige kankercellen bevatten bijna driemaal meer chemotherapeuticum dan de chemotherapie-gevoelige kankercellen.<sup>8,9</sup> In een aantal gevallen lijken kankercellen dus een chemotherapeuticum efficiënt te kunnen verwijderen door het afgeven van chemotherapeuticum-bevattende microvesikels aan de omgeving, waardoor de overlevingskans van de cellen toeneemt. Onlangs werd aangetoond dat microvesikels afkomstig van gezonde cellen caspase 3 bevatten. Caspase 3 is één van de belangrijkste enzymen die betrokken zijn bij apoptose. Door het ontstaan van microvesikels te remmen, steeg de intracellulaire hoeveelheid caspase 3 en gingen de cellen uiteindelijk dood. Deze experimenten tonen aan dat microvesikels kunnen fungeren als een afvalvat waardoor cellen kunnen overleven.<sup>10</sup> Concluderend vergroot het afgeven van microvesikels het vermogen van cellen om te ontsnappen aan celdood.

### Ontsnappen aan aanvallen van het immuunsysteem

Kankercellen kunnen aanvallen van het immuunsysteem afwenden door microvesikels af te geven met immuunmodulerende eigenschappen, waardoor de overleving van kankercellen toeneemt. Een bekend voorbeeld zijn microvesikels die Fas-ligand exposeren. Fas-ligand (CD95L) bindt aan de 'death receptor' Fas (CD95), waardoor apoptose van T-cellen wordt geïnduceerd en de anti-tumorrespons van het immuunsysteem wordt onderdrukt. Er is een, weliswaar zwakke, correlatie tussen de hoeveelheid Fas-ligand-exposerende microvesikels en de mate van lymfeklierinvasie en stadium van de ziekte



**Figuur 2. Overzicht van functies van microvesikels bij kanker.**

Deze figuur is een schematisch overzicht van de mogelijke mechanismen waarmee het afgeven van microvesikels door kankercellen de overleving van deze cellen kan beïnvloeden, evenals de invasiviteit en metastasering van de tumor. Het afgeven van vesicles met hierin het voor de cel schadelijke chemotherapeuticum of caspase 3 (Casp3) vergroot de overleving van de kankercellen. Microvesikels met Fas-ligand (FasL) of galectine 9 (Gal9) kunnen aanvallen van het immuunsysteem afweren. Microvesikels, weefselfactor ('tissue factor'; TF)-exposerende in het bijzonder, zijn stollingsbevorderend. Vesicles die vasculaire endotheliale groeifactor (VEGF), messenger RNA (mRNA) voor groeifactoren of groeifactorreceptoren (zoals endotheliale-groeifactorreceptor; EGFRvIII) bevatten of exposeren, kunnen deze 'informatie' overdragen op andere cellen, waardoor bijvoorbeeld angiogenese wordt bevorderd. Ten slotte kunnen microvesikels met urokinase plasminogeen activator (uPA) of matrix metalloproteases (MMP) de extracellulaire matrix afbreken die kankercellen omringt.

bij patiënten met plaveiselcelcarcinoom van de mondholte.<sup>11</sup> Hoe epstein-barr-positieve tumoren weten te ontsnappen aan de aandacht van het immuunsysteem is grotendeels onbekend, maar onlangs zijn galectine-9-bevattende microvesikels aangetroffen, afkomstig van kankercellen, die apoptose van T-cellen induceerden.<sup>12,13</sup> Tevens kunnen microvesikels van kankercellen de differentiatie van monocytten tot antigeen presenterende cellen belemmeren.<sup>14</sup>

Kankercellen kunnen ook ontsnappen aan het immuunsysteem door bepaalde oppervlaktekenmerken van normale cellen over te nemen. Een bekend voorbeeld is de aanwezigheid van het integrine (glycoproteïne) IIB-IIIa-complex ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) op kankercellen, een eiwitcomplex dat gewoonlijk op erythrocyten wordt aangetroffen. Tesselaar en collega's rapporteerden microvesikels in plasma van kankerpatiënten met co-expressie van eiwitten van zowel de tumor als van erythrocyten.<sup>6</sup> Dergelijke 'hybride'

microvesikels kunnen het gevolg zijn van het versmelten van microvesikels, afkomstig van erythrocyten, of van het versmelten van erythrocyten met kankercellen. Kankercellen exposeren dan fosfolipiden en eiwitten, zoals  $\alpha_{\text{IIB}}\beta_3$ , die oorspronkelijk afkomstig zijn van erythrocyten. Mede door deze vorming zijn de kankercellen in staat om aan de aandacht van het immuunsysteem te ontsnappen. *Figuur 3A* geeft een overzicht van de effecten van microvesikels op de overleving van kankercellen.

### *Invasieve groei en metastasering*

#### *Invasiviteit*

Een tumor wordt omgeven door een extracellulaire matrix. Afbraak van deze matrix is nodig voordat een tumor lokaal kan uitgroeien. Microvesikels van kankercellen bevatten en/of exposeren proteolytische enzymen, zoals matrixmetalloproteasen (MMP)-2 en -9 en urokinase plasminogeen activator (uPA). MMPs breken de extracellulaire matrix af, terwijl uPA de omzetting van plasminogeen in plasmine bevordert. Plasmine breekt vervolgens ook de extracellulaire matrix af en activeert inactieve MMPs. Het ascitesvocht van patiënten met ovariumkanker bevat meer microvesikels die MMPs bevatten dan ascitesvocht van patiënten met benigne ovariële tumoren. Tevens bestaat er een verband tussen de agressiviteit van de tumor en de MMP-2-activiteit van microvesikels. Latere onderzoeken bij patiënten met prostaat- of ovariumkanker bevestigden de rol van MMP-2, MMP-9 en uPA-bevattende microvesikels in het bevorderen van de invasiviteit van kankercellen.<sup>15,16</sup> Dit wordt geïllustreerd in *Figuur 3B*.

#### *Vaatnieuwvorming*

Zoals beschreven zijn microvesikels stollingsbevorderend. Het stollingssysteem op haar beurt beïnvloedt de vaatnieuwvorming op diverse manieren. Het eindproduct van de stollingscascade, het onoplosbare fibrine, vormt een stevige matrix voor vaatnieuwvorming rondom de tumor. Daarnaast hebben diverse stollings-eiwitten, zoals weefselfactor en trombine, ook directe angiogene effecten. Zo activeert trombine verschillende 'protease-activated receptors', waardoor vaatnieuwvorming wordt bevorderd (zie *Figuur 3C*).<sup>17</sup>

Microvesikels afkomstig van kankercellen kunnen zowel angiogene groeifactoren, zoals vasculaire endotheliale groeifactor, bevatten, als het mRNA dat codeert voor angiogene groeifactoren.<sup>18,19</sup> Deze microvesikels kunnen fuseren met normale cellen in hun omgeving, waardoor

bepaalde fenotypische (groeifactoren) of genotypische kenmerken (mRNA voor groeifactoren) worden overgebracht die de vaatnieuwvorming van de tumor stimuleren.<sup>19</sup> Recentelijk is beschreven dat microvesikels van glioblastoomcellen een oncogene vorm van de epidermale-groeifactor-receptor (EGFRvIII) kunnen overdragen op EGFRvIII-negatieve glioblastoomcellen. De ontvangende cellen gaan ongeremd delen omdat ze onafhankelijk worden van de aanwezigheid van endotheliale groeifactor.<sup>20</sup>

Concluderend, microvesikels bevorderen vaatnieuwvorming op verschillende manieren, waaronder het doorgeven van groeifactoren, receptoren voor groeifactoren of mRNA coderend voor groeifactoren, en indirect door het stollingssysteem te stimuleren. *Figuur 3D* is hiervan een illustratie.

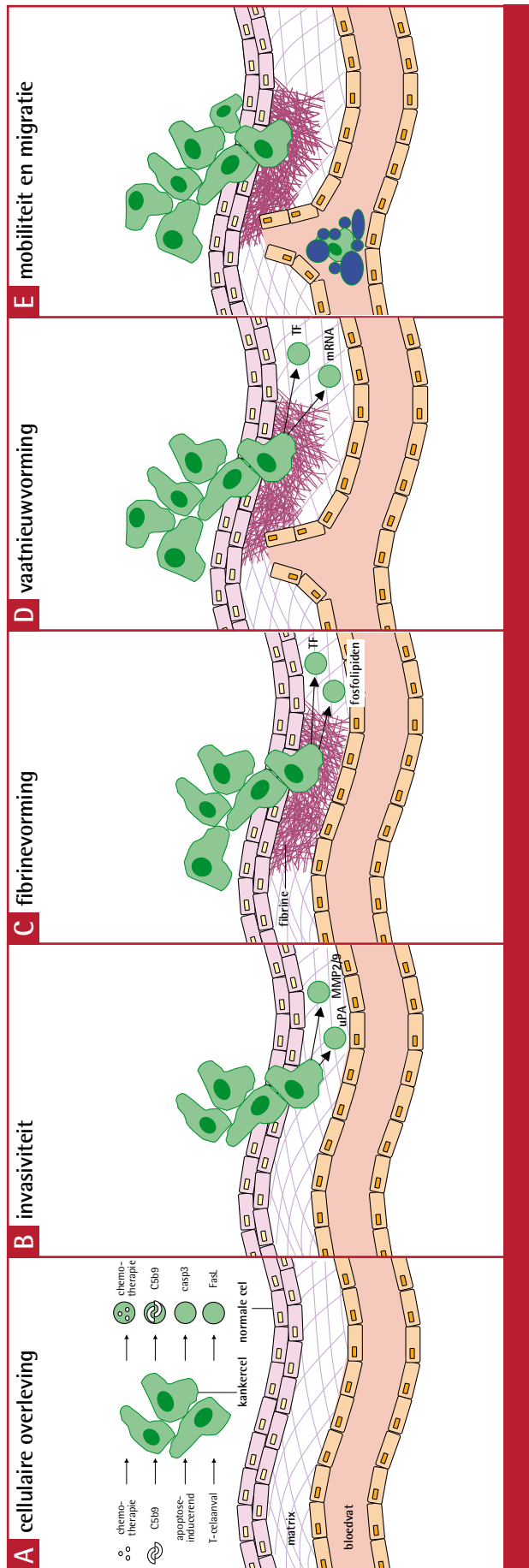
#### *Migratie*

Metastasering vereist invasieve groei en vaatnieuwvorming. Beide processen kunnen door microvesikels worden beïnvloed. Of microvesikels ook in staat zijn om de mobilisatie van kankercellen te bevorderen, is nog onbekend, op recente aanwijzingen na voor een chemotaxis-bevorderende rol bij prostaatkanker en acute myeloïde leukemie.<sup>21,22</sup> Eerder is besproken dat kankercellen kenmerken van normale cellen kunnen aannemen, waardoor metastaserende cellen minder makkelijk worden opgemerkt door het immuunsysteem. Ook vergemakkelijkt deze 'coating' het binden van kankercellen aan de vaatwand. Ten slotte kan ook de intravasculaire vorming van fibrine, welke door microvesikels wordt bevorderd, het binden van kankercellen aan de vaatwand stimuleren (zie *Figuur 3E*).<sup>17</sup>

## **Microvesikels in de klinische praktijk**

### *Behandeling*

Microvesikels (specifiek: exosomen) zijn getest in fase I klinisch onderzoek bij patiënten met gemetastaseerd melanoom, vergevorderd niet-kleincellig longcarcinoom en colorectaal carcinoom als adjuvante behandelingsmethode. Hierbij wordt gebruik gemaakt van het vermogen van microvesikels om de activiteit van het immuunsysteem te beïnvloeden. Monocyten van kankerpatiënten zijn in contact geweest met antigenen van kankercellen. Door deze monoccyten te isoleren uit het bloed van deze patiënten, deze cellen in vitro te laten differentiëren tot antigeen presenterende cellen en de microvesikels afkomstig van deze cellen te oogsten en toe te die-



**Figuur 3. Overzicht van de rol van microvesikels in de progressie van kanker.**

A. Het overleven van kankercellen kan worden vergroot door microvesikels te vormen waarin voor de cel schadelijke stoffen worden gedeponneerd. Op deze manier worden kankercellen minder gevoelig voor negatieve invloeden van binnenuit (voorbeeld: caspase 3) en buitenaf (voorbeeld: cytotostatica, het complement C5b9-complex). B. Microvesikels die proteolytische enzymen (proteasen) bevatten of exoseren, breken de extracellulaire matrix af en bevorderen hiermee de invasiviteit van kankercellen. Voorbeelden van dergelijke enzymen zijn matrixmetalloproteïnase (MMP)-2 en MMP-9, en urokinase-type plasminogeen activator (uPA). C. Microvesikels zijn stollingsbevorderend. De fosfolipiden op het oppervlak faciliteren de stolling. Bovendien exoseren sommige microvesikels de initiator van de stolling, weefselfactor ('tissue factor'; TF). Het gevormde fibrine beschermt de kanker tegen aanvallen van het immuunsysteem en vormt een matrix die de vaatnieuwvorming bevordert. D. Het afsnoeren van microvesikels met groeifactoren, messenger RNA (mRNA) coderend voor (angiogene) groeifactoren of groeifactorreceptoren draagt bij aan een vaatnieuwvorming-bevorderende omgeving. Stollingsfactoren zoals trombine en weefselfactor hebben een dubbel effect op kankergroei; enerzijds door de vorming van fibrine (zie C), anderzijds door stollingsonafhankelijke signalen die door activering van 'protease-activated'-receptoren de vaatnieuwvorming bevorderen. E. Trombocyten, en mogelijk ook hun microvesikels, vormen een schild rondom de kankercellen, waardoor de kankercellen als het ware worden vermoord en dus in feite worden beschermd tegen herkenning door het immuunsysteem. Ook deze vorming draagt bij aan de overleving van kankercellen in de bloedbaan en daarmee aan hun metastaserend vermogen. *Tevens gepubliceerd in: Van Doornaal et al., Cell-derived microvesikels and cancer. Neth J Med 2009;67(8). Met toestemming in gewijzigde vorm overgenomen.*

## Aanwijzingen voor de praktijk

1. Circulerende microvesikels kunnen bijdragen aan het maligne fenotype van de tumor.
2. Het verhoogde risico op trombose bij patiënten met kanker is geassocieerd met circulerende microvesikels.
3. Microvesikels hebben potentiële diagnostische en therapeutische toepassingen.

nen aan dezelfde kankerpatiënt, wordt een immuunreactie op gang gebracht tegen de eigen tumor. Voor zover onderzocht lijkt deze autologe anti-kankertherapie veilig en mogelijk effectief.<sup>23,24</sup>

Verder onderzoek naar het effect van deze zogenoemde 'dexasomen' op de overleving van kankerpatiënten is gaande, maar bevindt zich nog in een vroeg stadium.

In theorie vormen middelen die aangrijpen op de vorming van microvesikels en daarmee de kankergroei-bevorderende effecten van microvesikels belemmeren, nieuwe aangrijpingspunten voor (adjuvante) therapie. Chemotherapeutica gericht op 'Rho-associated coiled coil-containing protein kinases' (ROCK) interfereren deels met het mechanisme dat leidt tot het ontstaan van microvesikels.<sup>25</sup>

Een andere mogelijke toepassing komt voort uit aanwijzingen dat de inhoud van microvesikels een directe afspiegeling lijkt te zijn van de conditie van een cel. Een voorbeeld hiervan is de blootstelling van B-cellen aan hoge temperaturen ('heat shock'), waarna de hoeveelheid 'heat shock'-eiwitten toeneemt per microvesikel. Deze 'heat shock'-eiwitten vormen complexen met foutief aangemaakte of verkeerd gevouwen eiwitten, waarna ze worden afgevoerd en de cel geen schade kunnen toebrengen.<sup>26</sup> In theorie kan dus de eiwitsamenstelling van de microvesikels, afkomstig van kankercellen, de effectiviteit weerspiegelen van de anti-kankertherapie.

## Diagnostiek

### Diagnose

Het bepalen van tumorcel-afkomstige microvesikels lijkt een veelbelovend middel voor de vroege opsporing van kanker en als alternatief voor invasieve weefseldiagnostiek. Nieuw is de bepaling van microvesikels die specifiek microRNA (niet-coderend RNA) bevatten.<sup>27</sup> Microvesikels zijn

ook gebruikt als alternatief voor cellulaire plasmamembranen om merkers te vinden die verschillende typen B-cel-maligniteiten kunnen onderscheiden.<sup>28</sup>

### Prognose

Verschillende studies hebben het verband onderzocht tussen het aantal circulerende microvesikels en ziekteprogressie in kankerpatiënten. Tesselaar en collega's berekenden een aannemelijkheidsratio voor overleving van 0,42 (95%-betrouwbaarheidsinterval 0,19-0,94) voor kankerpatiënten met verhoogde aantallen microvesikels met zowel mucine als weefselfactoractiviteit op hun oppervlak ten opzichte van kankerpatiënten zonder deze specifieke microvesikels.<sup>6</sup>

Een andere onderzoeksgroep rapporteerde verhoogde aantallen microvesikels in het plasma van 109 patiënten met een maagcarcinoom ten opzichte van 29 gezonde controles. Tevens bevatte het plasma van patiënten met stadium IV-tumoren hogere aantallen van erythrocyten-afkomstige microvesikels dan de andere stadia. De sensitiviteit en specificiteit van deze microvesikels voor het voorspellen van metastasen waren respectievelijk 93% en 91%.<sup>4</sup>

Ook zouden microvesikels, en dan vooral de weefselfactor-dragende microvesikels, een inschatting kunnen geven van het trombose-risico van een individuele kankerpatiënt, waardoor het mogelijk wordt patiënten te identificeren die baat kunnen hebben bij tromboseprofylaxe.

## Conclusie

Bij kankerpatiënten zijn er duidelijke aanwijzingen dat circulerende microvesikels kunnen bijdragen aan de kwaadaardige kenmerken van de ziekte en het verhoogde risico op veneuze trombose. Of microvesikels kunnen worden gebruikt in de klinische praktijk voor diagnostiek of behandeling van kanker zal toekomstig onderzoek moeten uitwijzen.

## Referenties

1. Freyssinet JM. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost* 2003;1:1655-62.
2. Fevrier B, Raposo G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16:415-21.
3. Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, Ahn YS, Biro E, Nieuwland R, et al. Measuring circulating cell-derived microparticles. *J Thromb Haemost* 2004;2:1842-51.
4. Kim HK, Song KS, Park YS, Kang YH, Lee YJ, Lee KR, et al. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. *Eur J Cancer* 2003;39:184-91.
5. Zwicker JI, Kos CA, Johnston KA, Liebman HA, Furie BC, Furie B. Cancer-associated thrombosis: tissue factor-bearing microparticles are associated with an increased risk of venous thromboembolic events in cancer patients. XXIst congress of the international society on thrombosis and haemostasis. Supplement 2: O-M-005 ed. Geneva: *J Thromb Haemost*;2007.
6. Tesselaar ME, Romijn FP, Van der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost* 2007;5:520-7.
7. Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, Shattil SJ. Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombin activity. *J Biol Chem* 1988;18205-12.
8. Shedden K, Xie XT, Chandaroy P, Chang YT, Rosania GR. Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Res* 2003;63:4331-7.
9. Safaei R, Larson BJ, Cheng TC, Gibson MA, Otani S, Naerdemann W, et al. Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2005;4:1595-604.
10. Abid-Hussein MN, Boing AN, Sturk A, Hau CM, Nieuwland R. Inhibition of microparticle release triggers endothelial apoptosis. XXIst congress of the international society on thrombosis and haemostasis. Supplement 2: P-M-437 ed. Geneva: *J Thromb Haemost*;2007.
11. Bergmann C, Strauss L, Wieckowski E, Czystowska M, Albers A, Wang Y, et al. Tumor-derived microvesicles in sera of patients with head and neck cancer and their role in tumor progression. *Head Neck* 2009;31:371-80.
12. Keryer-Bibens C, Pioche-Durieu C, Villemant C, Souquere S, Nishi N, Hirashima M, et al. Exosomes released by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells convey the viral latent membrane protein 1 and the immunomodulatory protein galectin 9. *BMC Cancer* 2006;6:283.
13. Klibi J, Niki T, Riedel A, Pioche-Durieu C, Souquere S, Rubinstein E, et al. Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Blood* 2009;113:1957-66.
14. Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Pilla L, Sovena G, Villa A, et al. Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on T lymphocytes. *Cancer Res* 2006;66:9290-8.
15. Dolo V, D'Ascenzo S, Violini S, Pompucci L, Festuccia C, Ginestra A, et al. Matrix-degrading proteinases are shed in membrane vesicles by ovarian cancer cells in vivo and in vitro. *Clin Exp Metastasis* 1999;17:131-40.
16. Ginestra A, Miceli D, Dolo V, Romano FM, Vittorelli ML. Membrane vesicles in ovarian cancer fluids: a new potential marker. *Anticancer Res* 1999;19(4C):3439-45.
17. Buller HR, Van Doormaal FF, Van Sluis GL, Kamphuisen PW. Cancer and thrombosis: from molecular mechanisms to clinical presentations. *J Thromb Haemost* 2007;5 Suppl 1:246-54.
18. Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Weglarczyk K, Baran J, Urbanowicz B, Branski P, et al. Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55:808-18.
19. Skog J, Wurdinger T, Van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008;10:1470-6.
20. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* 2008;10:619-24.
21. Castellana D, Zobairi F, Martinez MC, Panaro MA, Mitolo V, Freyssinet JM, et al. Membrane microvesicles as actors in the establishment of a favorable prostatic tumoral niche: a role for activated fibroblasts and CX3CL1-CX3CR1 axis. *Cancer Res* 2009;69:785-93.
22. Kalinkovich A, Tavor S, Avigdor A, Kahn J, Brill A, Petit I, et al. Functional CXCR4-expressing microparticles and SDF-1 correlate with circulating acute myelogenous leukemia cells. *Cancer Res* 2006;66:11013-20.
23. Dai S, Zhou X, Wang B, Wang Q, Fu Y, Chen T, et al. Enhanced induction of dendritic cell maturation and HLA-A\*0201-restricted CEA-specific CD8(+) CTL response by exosomes derived from IL-18 gene-modified CEA-positive tumor cells. *J Mol Med* 2006;84:1067-76.
24. Lesterhuis WJ, De Vries IJ, Adema GJ, Punt CJ. Dendritic cell-based vaccines in cancer immunotherapy: an update on clinical and immunological results. *Ann Oncol* 2004;15 Suppl 4:iv145-iv51.
25. Rattan R, Giri S, Singh AK, Singh I. Rho/ROCK pathway as

