

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10288

研究課題名(和文) 口腔癌分泌エクソソームを用いた分子標的抗癌剤感受性試験の開発

研究課題名(英文) Development of Molecularly-Targeted Anticancer Drug Susceptibility Tests Using Oral Cancer Secretory Exosomes

研究代表者

村上 純 (Murakami, Jun)

岡山大学・歯学部・博士研究員

研究者番号：40362983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：セツキシマブは、細胞外小胞のEGFRと結合することで、細胞外小胞を標的とすることが示唆された。口腔癌細胞が放出したEGFR高発現細胞外小胞にセツキシマブを作用させると、マクロファージおよび正常上皮細胞による取り込みが低下した。このことから、セツキシマブは、癌周辺組織への細胞外小胞の取り込みを阻害する事で、抗腫瘍効果を示す可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果から、口腔癌細胞が分泌する細胞外小胞を介したセツキシマブ耐性機序の一部が明らかとなった。この成果により、新たな薬剤耐性機構に則した治療の開発や、化学療法患者の血中のエクソソーム中の薬剤の分量を定量することで、患者の新たな薬剤感受性試験を開発することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：Oral cancer cells increased the release of extracellular vesicles upon EGF stimulation, and these extracellular vesicles expressed high levels of EGFR. This suggests the involvement of extracellular vesicles in the metabolism of cetuximab, an anti-EGFR antibody drug. When oral cancer cells were treated with cetuximab, cetuximab was detected in the cell and extracellular vesicle fractions.

This suggests that cetuximab targets extracellular vesicles by binding to EGFR in these vesicles. When cetuximab was applied to EGFR-highly expressing extracellular vesicles released by oral cancer cells, uptake by macrophages and normal epithelial cells was reduced. This suggests that cetuximab may exert its antitumor effect by inhibiting the uptake of extracellular vesicles into the tissues surrounding the cancer.

研究分野：歯科放射線

キーワード：口腔扁平上皮癌 エクソソーム

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

セツキシマブ（商品名：アービタックス）は、抗上皮成長因子受容体（EGFR）標的抗癌剤である。日本では、2012年に頭頸部扁平上皮癌に対して承認され、セツキシマブはEGFRに結合し、受容体機能を阻害して抗癌作用を示す。

ディラードらによると、大腸癌において、EGFR伝達経路を担うKRAS遺伝子変異によりセツキシマブ抵抗性が生じる事が明らかになってきた。マルコらによると、エクソソームを介する新たな抗癌剤の耐性機構が明らかになっている。そこで我々も、口腔癌細胞が示すセツキシマブ耐性に、エクソソームが関与するのではないかとという着想に至った。

エクソソームとは、正常細胞および癌細胞が放出する小胞のことで、様々な細胞に伝達される。癌細胞が放出するエクソソームには、正常細胞を癌化する分子が含まれている。エクソソームは癌細胞から放出され、正常細胞内に取り込まれ、内包する分子を伝達してがん化を促進させる。近年、癌細胞が放出するエクソソームに含まれる分子が注目されている。

2. 研究の目的

ギータンジャリーらによると、EGFRを高発現している前立腺癌細胞は、細胞外小胞を介してEGFRを放出することを報告している。このことから、口腔癌細胞においても細胞外小胞を介して、EGFRを放出するのではないかと考えた。

3. 研究の方法

【対象】

HSC-3 ヒト口腔扁平上皮癌細胞株

【解析機器】

Exoscreen Enspire Alpha LISA system
(PerkinElmer, USA)

蛍光顕微鏡：BZ-X700 fluorescence microscope (Keyence, Osaka, Japan)

【材料】

試薬

recombinant human EGF (carrier free) (585506, BioLegend, San Diego, CA)
Cetuximab (Erbix® Injection, MerckSerono, Tokyo, Japan)

- ・エクソソームおよび全細胞タンパク質の抽出

Ultra-15 Centrifugal Filter Devices for MW. 100,000 (Amicon)
Total Exosome Isolation (ThermoFisher Scientific)

- ・タンパク質濃度の測定（microBCA法）

Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo SCIENTIFIC)
Western blotting

- ・抗体

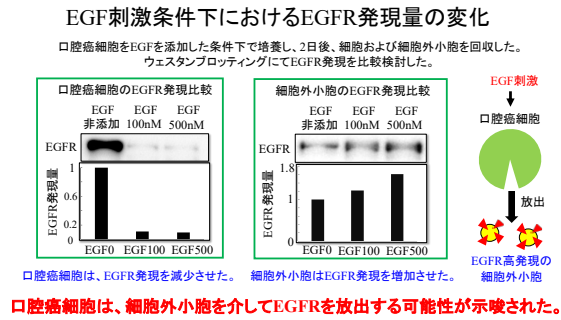
mouse anti-CD9 (1:1,000, MBL, #D252-3)、rabbit anti-EGFR (1:1000, abcam, #E114)
HRP-conjugated goat anti-human IgG (H+L chain) (1:5,000, MBL, #206)

- ・蛍光標識したエクソソームによる解析

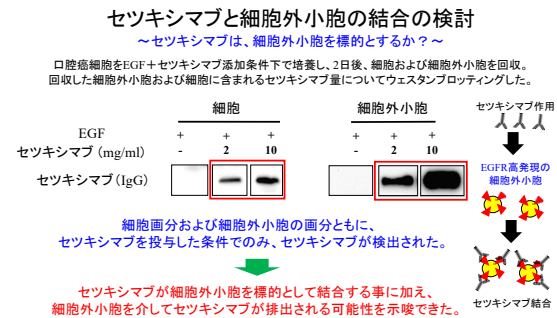
BODIPY TR Ceramide (ThermoFisher Scientific)にてエクソソームのタンパク質カーゴを蛍光標識染色し、Exosome Spin Columns (MW 3000)で精製した。蛍光顕微鏡下で観察、画像解析した。

4. 研究成果

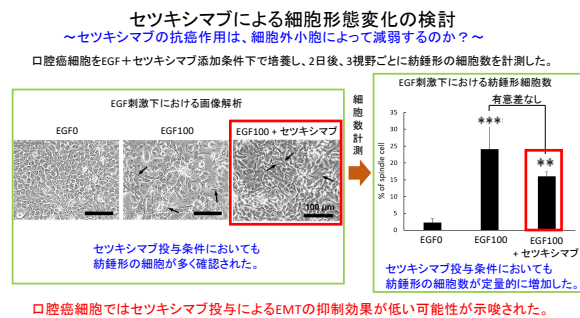
口腔癌細胞を用いて、EGF 刺激条件下における EGFR 発現量の変化を検討した。口腔癌細胞を EGF 刺激条件下で培養 2 日後に、細胞および細胞外小胞を回収し、ウェスタンブロッティングにて EGFR 発現を比較検討した。EGF 刺激により細胞内の EGFR 量が減少し、細胞小胞内の EGFR 量は、EGF 刺激によって増加した。よって、EGF 刺激を受けた口腔癌細胞は、細胞外小胞を介して EGFR を放出する可能性が示唆された。



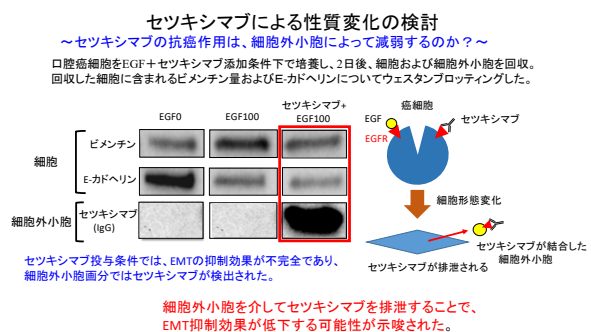
次に、セツキシマブと細胞外小胞の結合の検討を行った。口腔癌細胞を EGF とセツキシマブ添加条件下で培養 2 日後、その細胞および細胞外小胞に含まれるセツキシマブ量を比較検討した。その結果、細胞画分および細胞外小胞画分ともに、セツキシマブを投与した条件でのみ、セツキシマブが検出された。よって、セツキシマブが細胞外小胞を標的として結合することに加え、細胞外小胞を介してセツキシマブが排出される可能性を示唆された。



さらに、セツキシマブによる細胞形態変化を検討した。口腔癌細胞を EGF とセツキシマブ添加条件下で培養 2 日後、蛍光顕微鏡にて 3 視野ごとに紡錘形の細胞数を計測した。EGF およびセツキシマブ添加条件の両方において紡錘形の細胞が多く確認された。また、EGF およびセツキシマブ添加条件に両方においても定量的に紡錘形の細胞の割合が増加していた。このことから、口腔癌細胞ではセツキシマブ投与による EMT の抑制効果が低い可能性が示唆された。



また、セツキシマブによる性質変化の検討を行った。口腔癌細胞を EGF とセツキシマブ添加条件下で培養 2 日後、回収した細胞に含まれるビメンチンおよび E-カドヘリン量について検討した。EGF 添加条件ではビメンチン発現の増加と E-カドヘリン発現の減少が確認できた。セツキシマブ添加条件では、E-カドヘリン発現が減少したままであり、EMT 抑制効果が不完全だった。また、細胞外小胞画分ではセツキシマブが検出された。このことから、細胞外小胞を介してセツキシマブを排泄することで、EMT 抑制効果が低下する可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takabatake Kiyofumi, Shimo Tsuyoshi, Murakami Jun, Anqi Chang, Kawai Hotaka, Yoshida Saori, Wathone Oo May, Haruka Omori, Sukegawa Shintaro, Tsujigiwa Hidetsugu, Nakano Keisuke, Nagatsuka Hitoshi	4. 巻 20
2. 論文標題 The Role of Sonic Hedgehog Signaling in the Tumor Microenvironment of Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5779 ~ 5779
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20225779	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takeshita Yohei, Okada Shunsuke, Hisatomi Miki, Matsuzaki Hidenobu, Kawai Hotaka, Noda Yohei, Murakami Jun, Fujita Mariko, Nagatsuka Hitoshi, Yanagi Yoshinobu, Asami Junichi	4. 巻 35
2. 論文標題 Oropharyngeal adenoid cystic carcinoma invading the mandibular bone through the mandibular foramen	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oral Radiology	6. 最初と最後の頁 335 ~ 340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11282-018-0359-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長塚 仁 (Nagatsuka Hitoshi) (70237535)	岡山大学・学術研究院医歯薬学域・教授 (15301)	
研究分担者	河合 穂高 (Kawai Hotaka) (10803687)	岡山大学・学術研究院医歯薬学域・助教 (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	高畠 清文 (Takabatake Kiyofumi) (70736537)	岡山大学・学術研究院医歯薬学域・助教 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関