

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893124

研究課題名(和文) 口腔内エクソソームを介したタンパク分泌の扁平上皮癌増殖・浸潤における役割

研究課題名(英文) Role of exosome-mediated release of proteins on growth of oral squamous cell carcinomas.

研究代表者

沢井 奈津子 (Sawai, Natsuko)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・招聘教員

研究者番号：10403031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームは細胞から放出される分泌小胞である。我々は患者組織の口腔扁平上皮癌においてFatty acid-binding protein (FABP)4 と呼ばれるタンパク質が高発現していることを確認した。扁平上皮癌培養細胞を用いた研究から、このタンパクがエクソソームを介して分泌される可能性があることも見出した。FABP4の発現をsiRNAを用いてノックダウンすると、癌細胞の増殖が劇的に抑制された。これらの結果は扁平上皮癌細胞が異所性にFABP4の発現を増加させ増殖を促進していること、更にはエクソソームを介して放出することによりパラクライン的に細胞増殖を促進しあっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are cell-derived vesicles that are present in many biological fluids, including blood, urine, saliva, and cultured medium of cell cultures. Exosomes may affect various cell functions such as cell growth and signal transductions. We have found that fatty acid-binding protein 4 (FABP4) is ectopically expressed on tumor cells in oral squamous cell carcinoma isolated from patients. FABP4 is contained and released via exosomes. Knockdown of FABP4 by specific siRNA in cultured cell lines of squamous cell carcinoma dramatically suppressed the cell growth. Involvement of FABP4-mediated activation of mitogen-activated protein kinase pathway was observed on the growth of squamous cell carcinomas. Our observations may indicate that ectopic expression and exosome-mediated release of FABP4 are important for the growth of oral squamous cell carcinomas.

研究分野：口腔外科学

キーワード：扁平上皮癌 エクソソーム FABP4 培養細胞 浸潤 siRNA

1. 研究開始当初の背景

エクソソームは各種の細胞から放出される分泌小胞であり、タンパク質だけでなくマイクロRNAなど様々な物質が含まれていることが明らかになっている。このエクソソームは以前は単なる分泌小胞であると考えられてきたが、近年、様々な細胞間での情報の伝達に重要な役割を果たすことが指摘されている。しかしながら口腔領域、とくに正常上皮や口腔扁平上皮癌におけるエクソソームの役割についての研究は非常に少なく、不明な点が多いのが現状である。

また、口腔扁平上皮癌で異所性に高発現している分子の存在が報告されているが、それらの分子が癌細胞増殖に果たす役割と、その分子自体の細胞以外への放出との関連性についての研究もほとんどないのが現状である。

2. 研究の目的

エクソソームは細胞から分泌される小胞であり、近年、細胞間での情報の伝達に重要な役割を果たすことが指摘されている。しかしながら口腔癌領域においては、エクソソームの果たす役割についての研究は少ない。これまでに私は、口腔扁平上皮癌にある種のタンパク質が異所性に高発現していることを扁平上皮癌の摘出患者組織において確認している。更にこのタンパクがエクソソーム中に含まれており、エクソソームを介して分泌される可能性があることも見出した。本研究は、私が見出した扁平上皮癌に異所性に高発現しているタンパクがエクソソームによって分泌され、他の癌細胞に情報を伝達することにより、癌の増殖・浸潤・転移に関わっているかどうか、更にはその分子を制御することにより、扁平上皮癌の増殖や浸潤を抑制できるかどうかについて明らかにすることを目的として本研究を行った。

3. 研究の方法

1)患者から摘出された扁平上皮癌組織を用いて、私が見出している Fatty acid-binding protein (FABP)4 と呼ばれ

るタンパクの異所性高発現を、症例数を増やしてより詳細な解析、および検討を行った。すなわち、扁平上皮癌組織中での FABP4 の発現をスコア化してと癌部と非癌部で比較し、統計解析を行った。

2) 培養細胞を用いた検討では、扁平上皮癌の培養細胞における FABP の発現をウェスタンブロット法などで確認したのち、ヒト FABP4 の発現を特異的にノックダウンする siRNA を作製した。作製したいくつかの siRNA を用いて予備的検討を行うため、扁平上皮癌の培養細胞にそれぞれの siRNA を処置し、標的となる FABP のノックダウンをウェスタンブロット法により確認した。予備的検討で最も FABP4 の発現をノックアウトした配列を持つ siRNA を以下の実験に使用した。すなわち、扁平上皮癌の培養細胞に最も効果の強かった siRNA を処置し、FABP のノックダウンによる癌細胞の形態変化を顕微鏡上で確認した。さらに細胞増殖の抑制、ならびに浸潤の抑制をセルカウンターによって定量的に評価し、統計処理を行った。

3) siRNA による FABP 発現のノックダウンによる癌細胞の増殖抑制メカニズムについて検討を行った。すなわち、siRNA 処置群と非処置群での標的遺伝子の変化をマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。さらに細胞増殖関連のシグナル伝達系についても、ウェスタンブロット法による解析を行う。これらの解析により、FABP 発現抑制による癌細胞の増殖阻害メカニズムを明らかにした。

4. 研究成果

患者組織の口腔扁平上皮癌部分において FABP4 と呼ばれるタンパク質が異所性に高発現していることをスコア化により定量的に確認した。一方でこのタンパク質は正常上皮にはほとんど発現していないことも明らかになった。本来このタンパクは脂肪酸結合タンパクであり、脂肪細胞とマクロファージに特異的に発現し、炎症および細胞内脂質代謝に深く関わっている、と考えられていた。それ故に

FABP4が扁平上皮癌細胞に異所性に高発現しているのは興味深いところである。更に口腔扁平上皮癌の培養細胞を用いた研究から、このタンパクがエキソソームを介して分泌される可能性があることも見出した。この扁平上皮癌に高発現しているFABP4の役割は、これまで明らかにされていなかった。そこでこのFABP4の発現を特異的にノックダウンするsiRNAを作製し扁平上皮癌細胞に作用させたところ、FABP4の発現抑制により癌細胞の増殖が劇的に抑制された。さらにこのメカニズムにmitogen-activated protein kinase (MAP kinase) 経路が密接にかかわっていることも明らかになった。

これらの結果は、扁平上皮癌細胞が異所性にFABP4の発現を増加させることにより細胞増殖を促進させていること、またこれらのタンパク質をエキソソーム顆粒を介して放出することによりパラクライン的に相互の細胞増殖を促進しあっている可能性が示唆された。更にはFABP4の発現をsiRNAを用いて特異的にノックダウンすることにより、扁平上皮癌の細胞増殖を効果的に抑制できることも明らかにすることができた。本研究で得られた知見を応用することにより、将来的な口腔扁平上皮癌の治療につながる可能性があると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Lee D, Wada K, Taniguchi Y, Al-Shareef H, Masuda T, Usami Y, Aikawa T, Okura M, Kamisaki Y, Kogo

M.

Expression of fatty acid binding protein 4 is involved in the cell growth of oral squamous cell carcinoma.

Oncology Reports 31: 1116-1120, 2014.

[学会発表](計 2 件)

1. Doksa Lee, Koichiro Wada, Yoshitaka Taniguchi, Tomonao Aikawa, Masaya Okura, Yoshinori Kamisaki, Mikihiro Kogo.

Ectopic expression of fatty acid binding protein 4 is involved in cell growth of lingual squamous cell carcinoma.

The 21st edition of the International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery.

2013年10月21日~24日

Barcelona, Spain/

2. 李 篤史、谷口 佳孝、大倉 正也、相川 友直、古郷 幹彦

演題名 口腔扁平上皮癌における fatty acid binding protein4 (FABP4)の役割について

第58回日本口腔外科学会総会(2013年10月11-13日・福岡)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

沢井奈津子

研究者番号： 10403031

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：