

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462597

研究課題名(和文) 上咽頭癌の前転移ニッチ構築機構解明と治療用エクソソーム開発

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism to form pre-metastatic niche in nasopharyngeal carcinoma and development of exosome for its treatment

研究代表者

脇坂 尚宏 (Naohiro, Wakisaka)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：70377414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： 上咽頭癌細胞C666.1から分泌されるエクソソームから、当初想定されたLMP1蛋白(EBV関連腫瘍蛋白)は検出されなかった。一方、EBERs、BART-miRNAsをはじめとするEBV関連RNAsは容易に検出された。

そのうち、miR-BART17-5pはエクソソームを経由しない特殊な機構で分泌されることが判明し、さらに化学療法抵抗性と深く関与することが示されたため、治療標的となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： EBV-associated oncoprotein, LMP1, was not detected in nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell line, C666.1,-derived exosomes. In contrast, EBV-associated RNAs, such as EBERs and BART-miRNAs, was easily detected in the exosomes.

One of BART-miRNAs, miR-BART17-5p, was secreted in extra-ordinarily pathway, but in exosome-independent pathway. The miRNA would be expected as novel therapeutic target of NPC.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：上咽頭癌 EBV EBERs miR-BARTs エクソソーム Argonaute 2

1. 研究開始当初の背景

申請者らは上咽頭癌の転移では、EBV 関連腫瘍蛋白 LMP1 が Key Factor となって、血管新生因子 (VEGF-A, IL-8, FGF-2) の分泌を促進し、特に、原発巣における間質の血管新生が転移を促進することを示してきた。

癌がこれから転移しようとする臓器 (転移標的臓器) では、転移に先立って血管・リンパ管新生の誘導や細胞増殖を支持する間質の形成により、癌細胞が転移しやすい微小環境 (前転移ニッチ) が構築される。

エクソソームは、細胞外へ放出される直径 30~100 nm の小胞である。エクソソームにはサイトカイン、増殖因子などの拡散物質に加えて、受容体蛋白や mRNA、microRNA などが内包されており、水平伝搬により細胞間の情報伝達を仲介する。

研究開始当初、悪性黒色腫細胞が放出するエクソソームは転移標的臓器に親和性があり、血管内皮細胞を増殖させて前転移ニッチの構築を促進すること、骨髄由来細胞 (BMDCs) が転移標的臓器に遊走し血管内皮細胞に分化して前転移ニッチを構築すること、が示された (Peinado et al. Nat Med 2012)。そこで、申請者らは上咽頭癌が放出するエクソソームも 2 種類のプロセスで前転移ニッチを構築すると考えた。プロセス [1]: エクソソームが転移標的臓器に到達して前転移ニッチを構築する。プロセス [2]: エクソソームを取り込んだ bone marrow derived cells (BMDCs) が転移標的臓器に遊走し、血管内皮細胞に分化して前転移ニッチを構築する。

近年、Drug Delivery System が注目されている。自然媒体であるエクソソームが自己免疫で排除されず末梢血中で安定な点、蛋白や RNA など多彩な物質を運搬できる点、エクソソームに siRNA、microRNA や蛋白を人為的に内包させることが出来る様になった点 (Alvarez-Erviti, et al. Nat Biotech 2011) に着目し、前転移ニッチ構築の主役である血管内皮細胞や BMDCs を標的とした全く新しい Drug Delivery System である治療用エクソソームを開発することを着想した。

2. 研究の目的

癌は転移に先だつて転移標的臓器の微小環境 (前転移ニッチ) を構築する。本研究では、申請者らが取り組んできた上咽頭癌転移機構の研究をさらに発展させ、Epstein-Barr virus (EBV) 関連腫瘍蛋白 latent membrane protein (LMP) 1 が放出を促進するエクソソームが、前転移ニッチの構築と転移を促進する機構を臨床検体の解析と蛍光技術を駆使した動物モデルで解明する。

さらに、前転移ニッチ構築の主役である骨髄由来細胞 (bone marrow derived cells, BMDCs) や血管内皮細胞に取り込まれやすく加工したエクソソームを未熟樹状細胞に強制的に産生させ、新たな Drug Delivery

System「前転移ニッチの構築を阻害して転移を予防する治療用エクソソーム」を開発するための実験的基盤を確立する。

3. 研究の方法

(1) EBV 陽性 Burkitt リンパ腫培養細胞・上咽頭癌細胞 (C666.1) 上清からエクソソームを抽出する。

(2) エクソソームに内包されている EBV 関連蛋白を定量する。

(3) エクソソームに内包されている EBV 関連 RNA を定量する。

(4) エクソソームに内包されない EBV 関連 RNA を同定し、さらにそのキャリアーを同定する。

(5) EBV 関連 RNA、特に miR-BART17-5p についてその細胞内外の発現を定量し、機能解析を行う。定量を *in vitro* に限らず、患者血清についても検討する。

(6) Cisplatin 抵抗性の上咽頭癌細胞を樹立し、miR-BART17-5p の細胞内外の発現を親細胞と比較して検討する。

4. 研究成果

(1) EBV 陽性 Burkitt リンパ腫培養細胞上清からエクソソームを抽出し、エクソソーム関連マーカーについて解析した所、CD63 が発現していることが判明した。続いて、LMP1 陽性とされる上咽頭癌細胞 C666.1 についてエクソソーム解析した所、CD63 は陽性であったが、EBV 関連蛋白 LMP1 は同定されなかった。C666.1 細胞の whole cell lysate 解析でも LMP1 発現を解析したところ、やはり LMP1 は同定できなかった。これらの結果から、エクソソーム解析実験系において、C666.1 であれば LMP1 と関係なく *in vitro* の実験系がくめることが判明した。また、C666.1 を用いてエクソソームに内包される核酸の解析は可能であると判断した。ただし、LMP1 陽性上咽頭癌細胞を用いた実験系の構築は断念した。

(2) エクソソームに含まれる EBV 関連の核酸についての定量的リアルタイム PCR 法による解析では、EBER1, 2 とともにエクソソームに内包されていることが判明した。C666.1 を用いた同様の実験でも EBERs がエクソソームに内包されていることが判明し、さらに、ヒト保存血清中のエクソソームにおける EBV 関連 RNA の解析でもやはり EBERs は同定された。以上から、上咽頭癌のエクソソームについて、蛋白の解析は困難だが、核酸の発現とその意義に関する検討は支障なく遂行が可能と考えられた。

(3) エクソソーム中における miR-BARTs の発現についても検討した。特に、miR-BART2-5p, 17-5p, 18-5p について解析した。まず抽出したエクソソームから、miR-BART2-5p と 18-5p は同定されたが、miR-BART17-5p については同定されなかった。ただし、培養液中から total RNA を抽出

して検討すると miR-BART17-5p が同定されることから、miR-BART2-5p と 18-5p は少なくともエクソソームを介して分泌されるが、miR-BART17-5p についてはエクソソームを介さずに細胞から分泌されると考えられた。(4)上咽頭癌患者血清では、EBERs は 31 症例中 1 例で検出出来たのみであった。miR-BART2-5p, 17-5p, 18-5p は治療前の多くの症例で検出されたものの、治療後に miR-BART17-5p, 18-5p が検出されるのは数例ずつであり、いずれも遺残症例や後に再発が判明した症例のみであった。また、miR-BART17-5p については腫瘍の著しい縮小にもかかわらず、治療後に発現が増加した症例も散見され、腫瘍の体積と無関係に分泌が更新したために増加したと考えられた。

(5) miR-BART17-5p はやはりエクソソームを介した分泌がされないことが確認され、さらに Argonaute 2 (AGO2) 蛋白と結合した全く別の機序で細胞外に分泌されることが判明した。

(6) Cisplatin 抵抗性細胞では、miR-BART2-5p の発現・分泌の変化はなく、miR-BART18-5p の発現量は減少することが判明した。

(7) AGO2 と結合して分泌される miR-BART17-5p は Cisplatin 抵抗性 C666.1 細胞で発現・分泌ともに著しく増加し、miR-BART17-5p が化学療法抵抗性に関与することが示唆された。

(8) miR-BART17-5p の機能解析を行う必要がある。miR-BART17-5p を標的とした治療用エクソソームの開発が、化学療法耐性細胞の根絶、さらには癌幹細胞の根絶をすることができる可能性がある。

(9) 患者血清中でも腫瘍遺残・再発症例の治療後血清中では高率に miR-BART17-5p が検出され、腫瘍マーカーとしての意義も今後、検討する必要がある。

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9件)

Hirai N, Wakisaka N, Kondo S, Aga M, Moriyama-Kita M, Ueno T, Nakanishi Y, Endo K, Sugimoto H, Murono S, Sato H, Yoshizaki T. Potential Interest in Circulating miR-BART17-5p As a Post-Treatment Biomarker for Prediction of Recurrence in Epstein-Barr Virus-Related Nasopharyngeal Carcinoma. PLoS One. 2016 Sep 29;11(9):e0163609. doi: 10.1371/journal.pone.0163609. eCollection 2016. 査読有

Wakisaka N, Hirai N, Kondo S, Aga M, Nakanishi Y, Tsuji A, Endo K, Murono S, Yoshizaki T. T-status and an oral fluoropyrimidine, S-1, adjuvant

chemotherapy are prognostic factors in reduced-RADPLAT for resectable hypopharyngeal cancer. Acta Otolaryngol. 2016 Aug;136(8):834-40. doi: 10.3109/00016489.2016.1157728. 査読有

Yoshida S, Wakisaka N, Kondo S, Moriyama-Kita M, Hirai N, Endo K, Tsuji A, Nakanishi Y, Murono S, Yoshizaki T. Expression of secreted protein acidic and rich in cysteine is an independent prognostic indicator of a poor clinical outcome in oropharyngeal carcinoma patients. Acta Otolaryngol. 2016;136(2):189-94. doi: 10.3109/00016489.2015.1103381. 査読有

再発・転移頭頸部癌症例に対するパクリタキセル週1回投与による休眠療法 個別化最大継続可能量設定を目的とした開始用量決定のための第1相試験. 脇坂 尚宏. 耳鼻咽喉科臨床 (0032-6313)109 巻 12 号 Page883-888(2016.12) DOI : 10.5631/jibirin.109.883 査読有

Laryngotracheal Flap による下咽頭癌切除後再建. 脇坂 尚宏, 室野 重之, 遠藤 一平, 近藤 悟, 中西 庸介, 吉崎 智一. 日本耳鼻咽喉科学会会報 (0030-6622)119 巻 6 号 Page880-885(2016.06) DOI : 10.3950/jibiinkoka.119.880 査読有

Wakisaka N, Hasegawa Y, Yoshimoto S, Miura K, Shiotani A, Yokoyama J, Sugawara M, Moriyama-Kita M, Endo K, Yoshizaki T. Primary Tumor-Secreted Lymphangiogenic Factors Induce Pre-Metastatic Lymphovascular Niche Formation at Sentinel Lymph Nodes in Oral Squamous Cell Carcinoma. PLoS One. 2015 Dec 2;10(12):e0144056. doi:10.1371/journal.pone.0144056. eCollection 2015. 査読有

Wakisaka N, Yoshida S, Kondo S, Kita M, Endo K, Tsuji A, Murono S, Muramatsu M, Yoshizaki T. HPV Status Determines the Efficacy of Adjuvant Chemotherapy With S-1, an Oral Fluorouracil Prodrug, in Oropharyngeal Cancer. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2015 May;124(5):400-6. doi: 10.1177/0003489414560434. 査読有

Wakisaka N, Yoshida S, Kondo S, Kita M, Sawada-Kitamura S, Endo K, Tsuji A, Nakanishi Y, Murono S, Yoshizaki T. Induction of epithelial-mesenchymal transition and loss of podoplanin expression are associated with progression of lymph node metastases in human papillomavirus-related oropharyngeal carcinoma. Histopathology. 2015 May;66(6):771-80. doi: 10.1111/his.12496. 査読有

バイオマーカーと治療方針 EBV 関連バイオマーカーによる上咽頭癌の治療効果・予後

判定. 脇坂 尚宏, 平井 信行, 近藤 悟, 吉崎 智一. 耳鼻と臨床 (0447-7227)61 巻 Suppl.1 Page S66-S71, S87-S88(2015.11) DOI: 10.11334/jibi.61.Suppl.1_S66 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

脇坂 尚宏・室野 重之・遠藤 一平・近藤 悟・中西 庸介・吉崎 智一. Laryngotracheal Flap による下咽頭癌術後再建. 第 6 8 回 日本気管食道科学会 東京 2016/11/17-18.

脇坂 尚宏・室野 重之・吉崎 智一. Laryngotracheal Flap による下咽頭癌術後再建. 第 2 9 回 日本口腔・咽頭科学会 松江 2016/9/8-9.

脇坂 尚宏・近藤 悟・喜多 万紀子・阿河 光治・中西 庸介・遠藤 一平・室野 重之・吉崎 智一. 第 4 0 回 日本頭頸部癌学会 大宮 2016/6/9-10.

脇坂 尚宏・室野 重之・遠藤 一平・近藤 悟・中西 庸介・吉崎 智一. Laryngotracheal Flap による下咽頭癌術後再建. 第 1 1 7 回 日本耳鼻咽喉科学会総会 名古屋 2016/5/18-21.

脇坂 尚宏・室野 重之・遠藤 一平・吉崎 智一. Laryngotracheal Flap で再建を行った下咽頭癌症例. 第 26 回日本頭頸部外科学会 名古屋 2016/1/28-29.

Naohiro Wakisaka, Makiko Moriyama-Kita, Satoru Kondo, Tomokazu Yoshizaki. EMT and podoplanin expression are associated with lymph node metastases in HPV-related oropharyngeal carcinoma. 第 74 回日本癌学会 名古屋 2015/10/8-10.

脇坂 尚宏, 長谷川 泰久, 吉本 世一, 三浦 弘規, 塩谷 彰浩, 横山 純吉, 菅澤 正, 喜多 万紀子, 遠藤 一平, 吉崎 智一. 口腔癌のセンチネルリンパ節におけるリンパ管新生とリンパ節転移に関する検討. 第 39 回日本頭頸部癌学会 神戸 2015/6/3-5.

脇坂 尚宏, 長谷川 泰久, 吉本 世一, 三浦 弘規, 塩谷 彰浩, 横山 純吉, 菅澤 正, 遠藤 一平, 吉崎 智一. 口腔癌のセンチネルリンパ節におけるリンパ管新生とリンパ節転移に関する検討. 第 116 回日本耳鼻咽喉科学会総会 東京 2015/5/21-23.

脇坂 尚宏, 長谷川 泰久, 吉本 世一, 三浦 弘規, 塩谷 彰浩, 横山 純吉, 菅澤 正, 遠藤 一平, 喜多 万紀子, 吉崎 智一. 口腔癌のセンチネルリンパ節におけるリンパ管新生とリンパ節転移に関する検討. 第 16 回 日本 SNNS 研究会学術集会 鹿児島 2014/9/20-21.

Naohiro Wakisaka, Shinya Yoshida, Satoru Kondo, Akira Tsuji, Kazuhira Endo, Shigeyuki Murono, Tomokazu Yoshizaki. HPV-status determines the efficacy of an oral fluoropyrimidine, S-1, in

oropharyngeal carcinoma. IFHNOS 2014 New York 2014/7/25-31.

脇坂 尚宏, 長谷川 泰久, 吉本 世一, 三浦 弘規, 塩谷 彰浩, 横山 純吉, 菅澤 正, 遠藤 一平, 喜多 万紀子, 吉崎 智一. 口腔癌のセンチネルリンパ節におけるリンパ管新生の検討. 日本がん転移学会 金沢 2014/7/10-11.

Naohiro Wakisaka, Kyoko Hirota, Satoru Kondo, Kazuhira Endo, Akira Tsuji, Shigeyuki Murono, and Tomokazu Yoshizaki. Induction of Lymphangiogenesis through Vascular Endothelial Growth Factor-C/Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 Axis and its Correlation with Lymph Node Metastasis in Nasopharyngeal Carcinoma. 2014 EBV meeting Brisbane 2014/6/15-19.

脇坂 尚宏, 長谷川 泰久, 吉本 世一, 三浦 弘規, 塩谷 彰浩, 横山 純吉, 菅澤 正, 遠藤 一平, 喜多 万紀子, 吉崎 智一. 口腔癌における VEGF-D の発現とリンパ節転移に関する検討. 日本頭頸部癌学会 東京 2014/6/11-13.

脇坂 尚宏, 杉本 寿史, 上野 貴雄, 吉崎 智一. EXIT 下に気管切開術を行った 1 例. 日耳鼻総会 福岡 2014/5/14-17.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 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 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
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
脇坂 尚宏 (WAKISAKA, Naohiro) 金沢大学・医学系・准教授
研究者番号: 70377414

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

吉崎 智一 (YOSHIZAKI, Tomokazu) 金
沢大学・医学系・教授
研究者番号：70262582

室野 重之 (MURONO, Shigeyuki) 福島
県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：20345622

近藤 悟 (KONDO, Satoru) 金沢大学・
附属病院・助教
研究者番号：70436822

遠藤 一平 (ENDO, Kazuhira) 金沢大学・
附属病院・助教
研究者番号：30547154

辻 亮 (TSUJI, Akira) 金沢大学・医学
系・協力研究員
研究者番号：70632652

(4)研究協力者

該当なし