

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861389

研究課題名(和文) リジルオキシダーゼ様酵素2の阻害による頭頸部扁平上皮がんリンパ節転移抑制の検討

研究課題名(英文) Contribution of LOXL2 in lymph node metastasis of head and neck squamous cell carcinoma

研究代表者

上田 哲平(Kaminota, Teppei)

愛媛大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30611941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：LOXL2ノックダウンSASL1m細胞を樹立し、高転移性口腔扁平上皮がんリンパ節転移系モデルを用いて転移率の測定を行った。LOXL2ノックダウンSASL1m細胞ではコントロールと比べて有意にリンパ節転移が抑制されていた。

LOXL2が転移に促進的に寄与している可能性が示唆されるため、頭頸部扁平上皮癌症例の臨床検体の収集と解析を開始した。頭頸部扁平上皮癌症例の血液中よりエクソソームを精製し、LOXL2の存在を免疫ブロット法により確認した。まだ症例数は少ないが、健常者と比較して頭頸部扁平上皮癌症例では血液中にLOXL2がより多く存在している傾向が確認できた。

研究成果の概要(英文)：To determine the participation of LOXL2 in lymph node metastasis, stable LOXL2 knockdown cells (LOXL2 KD) were established by using lentiviral vector system. LOXL2 KD cells exhibited significantly low metastatic ability the control cells in the mouse lymph node metastasis model, suggesting that LOXL2 can participate in lymph node metastasis of SCCs.

Exosomes was purified from the blood of the head and neck squamous cell cancer cases. The presence of LOXL2 was confirmed by immunoblotting analyses. LOXL2 expression was high in cancer cases

研究分野：医歯薬学

キーワード：頭頸部扁平上皮癌 転移 LOXL2 エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

がんの脅威はその転移によるところが大きい。これに対し、細胞増殖の制御を宿命として背負うわれわれのような多細胞生物体は、組織構築の破綻を防ぎ、がんの進行に対して制限をかける多くの機構を持ってその組織構築を維持している。そのためがん細胞といえど転移を成功させることは容易ではなく、実際に転移先臓器においてマクロ転移巣の形成に至るものは、潜在的に転移能をもつ腫瘍細胞のうちわずか 0.02% にとどまるとの算出もなされている (Weinberg, et.al., Cell, 147, 275-292, 2011)。こうした中で転移に成功するがん細胞は、いわば「巧みに」、転移に先立って転移標的となる組織を転移に好適に誘導・改変し、防御系細胞からの排除を逃れると考えられる事例が示されてきている。申請者らはこれまでに、高転移性ヒト口腔扁平上皮がん細胞 SASL1m を用いたリンパ節転移モデルを構築し、腫瘍原発巣から遠隔の転移標的リンパ節に対する働きかけについて検討してきた。その結果、腫瘍細胞が転移に先立って標的臓器の組織構築を転移に好適なものに改変する液性因子を分泌することを突き止め、パスイエイ解析と組み合わせたアレイ解析から、候補物質としてリジロキシダーゼ様酵素 2 (LOXL2)、TGF β 1 から四つの因子を見出し報告した (Oral Oncology, 48, 663-758, 2012)。今般さらに、この LOXL2 が蛋白質としても確かに転移性扁平上皮がん細胞から特異的に分泌されていること、さらにそれがエクソソーム画分に存在することを新たに見出した。

エクソソームは種々の細胞が放出するウイルス様の小胞で、その内部に種々の蛋白質や、miRNA などの機能性 RNA 分子が梱包されており、標的細胞・臓器に到達してさまざまな生理的・病理的機能を果たすことが近年急速に明らかになってきている。がん転移との関連としてみると、乳がん細胞から放出されるエクソソームが小胞輸送制御因子の一つである Rab27A の制御下にあつて転移に寄与することや、(Cancer Res., 72, 4920-4930, 2012) し、メラノーマの転移に先立ってメラノーマから放出されたエクソソームが骨髄細胞を教育し、転移環境を形成するのに寄与するというセンセーショナルな報告も先ごろなされ (Nat. Med., 18, 883-891, 2012)、がん転移におけるエクソソームへの注目度は急激に高まっている。しかしながらこれらの研究における重大な懸案事項は、そのエクソソームの中の一体何が目的の機能に対して責任ある因子なのか、である。たとえばがん抑制遺伝子のひとつである PTEN がエクソソームを介して他細胞にも

たらされ、その細胞内で機能しうるといった in vitro の興味深い解析例などもある (Putz, et.al., Sci. Signal. 5 (243) ra70) が、その生理的意義までが解明されてはいない。これに対してわれわれの得ている結果は、転移という現象の物質的背景を追求した結果、エクソソームおよびその内容物に行き着いたという点で、極めてストレートフォワードな状況にある。本研究においては、i) 実際にこの LOXL2 が転移を引き起こすことに寄与しているか、ii) それはヒトの症例においても有意と言えるか、を検討する。

2. 研究の目的

頭頸部扁平上皮がん研究においては、その浸潤・転移形質獲得の機序に関する報告自体がまだまだほとんどなく、その分子機構の解明がそもそも学術的に意義深いのみならず、言うまでもなく臨床的にも非常に重要である。

本研究においては解析の遅れているリンパ節転移について、転移に先立って標的組織の構築改変に寄与することをこれまでに見出しているリジロキシダーゼ様酵素 2 (LOXL2) に注目し、その阻害による口腔扁平上皮がんのリンパ節転移抑制を試みる。

3. 研究の方法

(1) SASL1m 細胞のリンパ節転移における LOXL2 の寄与の証明

LOXL2 ノックダウン SASL1m 細胞を樹立して上記モデル系にかけ、転移率を測定する。親株細胞、および標的遺伝子を持たない配列の shRNA を発現する細胞においても同様に転移率を測定し、比較対象とする。

において準備するモデル動物の血清よりエクソソーム画分を調製し、イムノプロットングにより LOXL2 レベルを比較・測定する。エクソソーム画分の調製は Invitrogen 社の生成試薬を用い、蛋白質量、CD8, 63, 81 および α -アクチンを内性対照に比較の基準とする。

LOXL2 がいかにして転移に寄与しているかを解析するため、当研究グループの先行研究で SASL1m 細胞において同じく発現亢進を確認している TGF β 等の他の液性因子との関係性についての検討を行う。

免疫抑制剤の一つである D-penicillamine に LOXL2 抑制効果がある

ことが示されている (Cancer Res. 71, 1561-1572, 2011.)。150 mg / kg にてマウスにおける使用例があるので、これに準じた種々の濃度で親株 SASL1m 移植系において、その転移抑制効果を転移率の比較により検討する。

2. ヒト血漿検体における LOXL2 量と、腫瘍ステージ・予後の相関の検討

愛媛大学耳鼻咽喉科を受診している扁平上皮がん患者および健常者について、ヒト検体の収集とエクソソーム画分の調製を開始し、エクソソーム蛋白質あたりの LOXL2 量をイムノプロット法により逐次測定する。

得られるデータに関して、i) 健常者、ii) ステージごとの分類による腫瘍患者における血漿エクソソーム中の LOXL2 レベルを比較する。さらに、iii) 腫瘍患者内では、転移の有無、治療歴 (外科治療、化学療法、放射線療法等) による分類との相関についても検討する。

検体採取後の予後について、追跡調査を行って LOXL2 レベルと予後の相関について検討する。可能であれば、同一個体の治療・病期進行過程における経時的な LOXL2 レベルの変化についても検討することで、LOXL2 レベルと病期進行・転移の相関について詳細な解析を行う。

以上の解析より、ヒト血漿中エクソソームの LOXL2 レベルが転移の予測や予後の診断において有用と言えるか否か考察する。診断薬としての可能性について、がん転移診断薬の製造を目指している企業がすでに一社興味を示しており、有望な結果が得られれば、開発協力の可能性について模索する。

同様、LOXL2 阻害薬の治療薬としての可能性についても考察する。D-penicillamine はすでにヒトに使える化合物だが、特異性において劣る。本剤をリード化合物とした創薬展開の可能性について、企業との協力関係を模索する。

4. 研究成果

LOXL2 ノックダウン SASL1m細胞を樹立し、高転移性口腔扁平上皮がん リンパ節転移系モデルを用いて転移率の測定を行った。陰性対照として、標的遺伝子を持たない配列の shRNA を発現するレンチウイルスベクターを導入したものを作成した。LOXL2 ノックダウン SASL1m細胞ではコントロールと比べて有

意にリンパ節転移が抑制されていた。

そこで LOXL2 がいかんにして転移に寄与しているかを解析するため、当研究グループの先行研究で SASL1m細胞において同じく発現亢進を確認している TGF についての検討を行った。LOXL2 ノックダウン SASL1m細胞の培養上清中ではコントロールと比較して遷延型の TGF は同程度だが、活性型の TGF 量が増加していることが確認された。このことから LOXL2 は細胞外基質に TGF を沈着させることで TGF の活性化を通じて、転移機構の動員に寄与している可能性が示唆された。

以上より LOXL2 が転移に促進的に寄与している可能性が示唆されるため、当院倫理委員会の承認を受けて頭頸部扁平上皮癌症例の臨床検体の収集と解析を開始した。頭頸部扁平上皮癌症例の血液中よりエクソソームを精製し、LOXL2 の存在を免疫プロット法により確認した。まだ症例数は少ないが、健常者と比較して頭頸部扁平上皮癌症例では血液中に LOXL2 がより多く存在している傾向が確認できた。

頭頸部扁平上皮癌においてはその浸潤・転移形質獲得の機序に関する報告がいまだ少なく、その分子機構の解明が効果的な治療のため急務となっている。リンパ節転移における LOXL2 の寄与に関する報告は他に存在しておらず、LOXL2 が新規転移抑制治療の標的となる可能性があると考えている。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

上田哲平他、頭頸部扁平上皮癌における NHE1 の浸潤への寄与に関する検討、第 4 回アジア頭頸部癌学会、2015 年 6 月 4 日、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

上田哲平他、口腔扁平上皮癌における NHE1 の発現と浸潤・転移に関する検討、第 38 回日本頭頸部癌学会、2014 年 6 月 12 日、東京ファッションタウンビル (東京都有明)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

上田 哲平 (Kaminota, Teppei)
愛媛大学・医学部附属病院・医員
研究者番号 : 30611941