

令和元年6月18日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11234

研究課題名(和文) 頭頸部扁平上皮がんリンパ節転移におけるLOXL2の効果

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

研究代表者

鵜久森 徹 (Ugumori, Tohru)

愛媛大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80512128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は頭頸部扁平上皮がんのリンパ節転移誘導因子として見いだされたLOXL2が、ヒト血清中のエクソソームにタンパク質として内包されることを確認し、健常ボランティアに比べ、頭頸部扁平上皮がん患者において有意に高含量である傾向を確認した。また、頭頸部扁平上皮がん患者の臨床像と血清LOXL2含量との相関について、LOXL2値は比較的早期から上昇を認め、リンパ節転移が成立した進行期には低下する傾向を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血清LOXL2含量が健常ボランティアに比べ、頭頸部扁平上皮がん患者において有意に高値である傾向は、血清LOXL2の頭頸部扁平上皮がん検出のバイオマーカーとしての可能性を示唆するものと考えられる。頭頸部扁平上皮がん患者の臨床像と血清LOXL2含量における上記相関傾向は、前転移期ニッチェ形成に關与する因子としてのLOXL2の役割に矛盾しないものであり、血清LOXL2の転移危険性診断指標としての可能性が示唆されるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We confirmed that LOXL2, which might induce a lymph node metastasis for head and neck squamous cell carcinoma, was included as a protein in exosomes in human serum. Serum LOXL2 levels tended to be significantly higher in head and neck squamous cell carcinoma patients than in healthy volunteers. Regarding the correlation between the clinical stage of head and neck squamous cell carcinoma patients and the serum LOXL2 content, the LOXL2 value was found to rise relatively early, and it was confirmed that it tended to decrease in the advanced stage of lymph node metastasis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：頭頸部扁平上皮がん リンパ節転移 LOXL2 転移誘導因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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。これに対して我々のような多細胞生物は、組織構築の破綻を防ぎ、がんの進行に対して制限をかけうる多くの機構をもっている。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いたるものは、潜在的に転移能を持つ細胞のうちわずか0.02%にとどまるとの試算もなされている (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、転移に先立ち転移標的となる組織を転移に適した状態に誘導・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。申請者らの研究グループはこれまでに、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、パスウェ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ルオキシダーゼ様酵素2 (LOXL2)、TGF β ら四つの因子を見出し報告した (Oral Oncology, 48, 663-758, 2012)。さらにこのLOXL2が蛋白質としても転移性扁平上皮がん細胞から特異的に分泌していることと、それがエクソソーム分画に存在することを見出した。

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・臓器に到達して様々な生理的・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の制御下にあって転移に寄与することや (Cancer Res., 72, 4920-4930, 2012)、melanomaの転移に先立ってmelanoma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のセンセーショナルな報告もなされ (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速に高まっている。

2. 研究の目的

頭頸部がんの予後はリンパ節転移に負うところが大きい。申請者らは、がん細胞が転移に先立って標的となる組織を転移に適した状態に誘導する分泌性因子のリジルオキシダーゼ様酵素2 (LOXL2) に注目し、LOXL2が転移リスクに関与すると考えられるデータを得ている。本研究においてはその阻害による頭頸部扁平上皮がんのリンパ節転移抑制を試み、また臨床検体からLOXL2の予後因子としての有用性を検討する。

3. 研究の方法

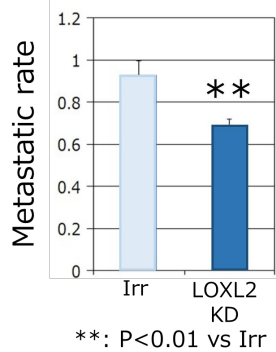
まず LOXL2 阻害による転移能への影響を LOXL2 ノックダウン SASL1m 細胞を転移モデルに供することで検討する。恒常的ノックダウンが必要だが、共同研究関係にある Janine Erler 博士より shRNA 発現ベクターを供与され、すでに細胞を樹立済みである。この細胞が低転移性を示した場合、親株細胞のエクソソーム分画を投与することで転移能が回復するか、などの検討を行う。LOXL2 の機能阻害には、特異的ではないものの阻害効果を有する免疫抑制剤である D-oenicillamine が有効である。

また腫瘍細胞が放出するエクソソームは血中に入ることが想定されるためヒト症例におい

て血液中のエクソソーム量、およびエクソソーム分画中の LOXL2 を定量し、その転移・予後との相関について統計的な検討を行い治療標的としての価値を査定する。

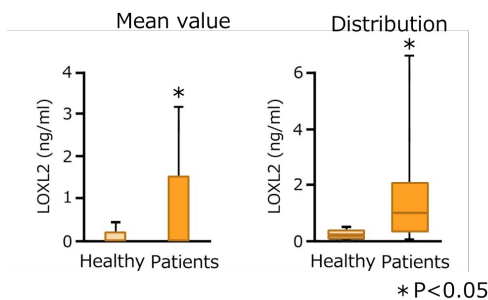
4. 研究成果

LOXL2 ノックダウン SASL1m細胞を上記リンパ節転移モデル系にかけ、転移率を測定したところ、比較対象とした親株細胞、および標的遺伝子を持たない配列の shRNA を発現する細胞に比べ、有意に転移率の低下を認めた。このことから LOXL2 がリンパ節転移に関与しており、その阻害はリンパ節転移抑制に働く可能性が示唆された。



申請者らは、頭頸部扁平上皮がんのリンパ節転移に貢献しうる分泌性因子として見いだされた LOXL2 が、ヒト血清中のエクソソームにタンパク質として内包されることを確認し、健常ボランティアに比べ、頭頸部扁平上皮がん症例において血清 LOXL2 含量が有意に高値である傾向を確認した。これは LOXL2 の頭頸部扁平上皮がん検出のバイオマーカーとしての可能性を示唆するものとする。

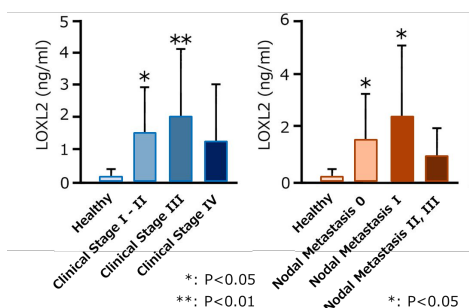
【血清Exosome画分中のLOXL2値】



また、頭頸部扁平上皮がん症例の臨床像と血清 LOXL2 含量との相関についての検討において、比較的早期から LOXL2 値は上昇を認め、リンパ節転移が成立した進行期には LOXL2 値は低下する傾向を確認した。これは前転移期ニッチェ形成に関与する因子として見出した

LOXL2 の役割に矛盾しないものであり、転移危険性診断指標としての可能性が示唆された。

【LOXL2値と臨床像】



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Tomoyoshi Sanada, Afsana Islam, Teppei Kaminota, Yui Kirino, Reina Tanimoto, Hana Yoshimitsu, Hajime Yano, Yosuke Mizuno, Masahiro Okada, Souhei Mitani, Tohru Ugumori, Junya Tanaka, Naohito Hato
Elevated exosomal lysyl oxidase like 2 is a potential biomarker for head and neck squamous cell carcinoma. Laryngoscope 誌 (査読有)

〔学会発表〕(計 6 件)

真田朋昌、三谷壮平、上田哲平、鶴久森徹、羽藤直人。

頭頸部扁平上皮がん細胞由来エクソソーム画分に含有される LOXL2 の転移危険性診断指標および抗転移治療標的としての可能性 第 120 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 2019 年

Hajime Yano, Reina Tanimoto, Tomoyoshi Sanada, Teppei Kaminota, Naohito Hato, Junya Tanaka.

Roles of lysyl oxidase like 2 (LOXL2) in exosomal fraction on lymph node metastasis of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)
International Society of Extracellular Vesicles (ISEV) 2019 2019 年

矢野 元、谷本 玲奈、真田 朋昌、上田 哲平、羽藤 直人、田中 潤也。

頭頸部扁平上皮がんのリンパ節転移における LOXL2 のエクソソームへの局在の意義 第 41 回日本分子生物学会大会 2018 年

Yano H, Kaminota T, Hato N, Tanaka J.

Possible participation of the intra-cell collective pH distribution in the maintenance of direction of the metastatic tumor cell collective migration . 第 95 回日本生理学会大会シンポジウム 2018 年

谷本玲奈、吉光華、真田朋昌、上田哲平、矢野元、鶴久森徹、羽藤直人、田中潤也。
転移性頭頸部扁平上皮がんのリンパ節転移に先立ち発現亢進し、エクソソーム画分に含有される分泌性因子の同定 第 9 回日本 RNAi 研究会・第 4 回日本細胞外小胞学会合同年会 2017 年

真田朋昌、吉光華、谷本玲奈、上田哲平、矢野元、鶴久森徹、田中潤也、羽藤直人。
頭頸部扁平上皮がんリンパ節転移に際して発現亢進する分泌性因子の診断標的としての可能性 第 9 回日本 RNAi 研究会・第 4 回日本細胞外小胞学会合同年会 2017 年

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：矢野 元

ローマ字氏名：(Yano.Hajime)

所属研究機関名：愛媛大学医学系研究科

部局名：分子・機能分子細胞生理学

職名：准教授

研究者番号(8桁)：00284414

(2)研究分担者

研究分担者氏名：岡田 昌浩

ローマ字氏名：(Okada.Masahiro)

所属研究機関名：愛媛大学医学部附属病院

部局名：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

職名：講師

研究者番号：20512130

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。