

令和元年6月3日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11688

研究課題名(和文) エクソソーム取り込みを標的とする口腔癌治療薬の探索

研究課題名(英文) Investigation of anticancer agents targeting exosomal uptake in OSCC

研究代表者

仙頭 慎哉 (Sento, Shinya)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教

研究者番号：30635264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞が分泌するエクソソームは癌細胞自身に取り込まれ、エクソソーム内包物質を介して下流のシグナルを活性化し、癌の発育・進展を促進することが知られている。しかしながら、エクソソームの細胞内への取り込み機構は未だ十分に解明されていない。本研究では、口腔扁平上皮癌(OSCC)細胞において、EGFにより誘導されるアクチン依存性マクロピノサイトーシスがOSCC細胞内へのエクソソームの取り込みを促進するとともに、EGFR標的薬(エルロチニブ、セツキシマブ)がこの作用を阻害することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セツキシマブはEGFRのリガンド結合部位にEGFと競合的に結合し、EGFRのシグナル伝達阻害を介して、癌細胞の増殖、遊走、生存、浸潤などの細胞機能を阻害することから、大腸癌、頭頸部癌に臨床応用されている。本研究では、セツキシマブの抗腫瘍効果の新たな作用機序として、癌細胞分泌エクソソームの癌細胞内への取り込み阻害作用を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are secreted from various cell types into their surrounding extracellular space, that transfer various components to recipient cells and affect their function and activity. Numerous studies have highlighted the crucial role that tumor cell-derived exosomes play in tumor growth and progression. However, the precise mechanisms remain unknown. In the present study, we demonstrated that oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells express abundantly the epidermal growth factor receptor (EGFR) and its phosphorylated form. The treatment of OSCC cells with recombinant EGF induced active macropinocytosis and significantly promoted the cellular uptake of OSCC cell-derived exosomes into OSCC cells themselves. Conversely, the uptake of exosomes by OSCC cells was abrogated in the presence of EGFR inhibitors, including erlotinib and cetuximab.

研究分野：外科系歯学

キーワード：口腔扁平上皮癌 エクソソーム EGFR マクロピノサイトーシス

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

1. 研究開始当初の背景

エクソソームは細胞から分泌される径 30~100 nm の脂質二重膜で囲まれた膜小胞で、内部には miRNA、mRNA 等の核酸や種々の蛋白質等が含まれ、表面には CD9 や CD63 といった膜貫通型蛋白質など様々な分子が発現されている。エクソソームは、Fusion、Receptor-mediated uptake、Internalization といった機序によりレシピエント細胞に取り込まれ、細胞機能に影響を及ぼすことが明らかとなっているが、腫瘍の発育・進展においても腫瘍細胞の増殖・遊走・浸潤能の亢進や腫瘍細胞の免疫系からのエスケープなどにおいて重要な役割を有していることが知られてきている¹⁾。これまで我々は、株化口腔扁平上皮癌 (OSC) 細胞もエクソソームを分泌しており、分泌されたエクソソームは OSC 細胞自身に取り込まれ、Akt、ERK および JNK シグナルの活性化を介して OSC 細胞の増殖・遊走・浸潤を促進し、*in vivo* において濃度依存的に腫瘍の発育を促進することを報告するとともに、エクソソームの OSC 細胞への取り込みには、細胞表面に発現するヘパラン硫酸プロテオグリカンが関与しており、それに親和性を持つヘパリン処理は、エクソソームの OSC 細胞への取り込みとそれに続くエクソソームによる腫瘍促進効果を抑制し、ヘパリンによるエクソソームの取り込み障害が抗腫瘍効果をもたらすことを明らかにした^{2,3)}。しかしながら、エクソソームの細胞への取り込み機構は未だ十分に解明されていない。

2. 研究の目的

今回我々は、エクソソームの取り込みを標的とする新規の口腔癌治療薬を探索するため、OSC 細胞のエクソソームの取り込み機構として新たにアクチン依存性マクロピノサイトーシスに着目した。マクロピノサイトーシスは、癌細胞が細胞外から栄養素を取り込むための機構で、EGFR の活性化や K-Ras 変異体の発現により誘導され、アクチン骨格の再構成により特殊な膜構造を形成し多量の細胞外物質を取り込む機構である⁴⁾。このことは、OSC 細胞に高発現する EGFR の活性化がマクロピノサイトーシスを誘導し、エクソソームの取り込みを促進している可能性を示唆している。本研究では既に臨床応用されている抗ヒト EGFR モノクローナル抗体であるセツキシマブおよび EGFR チロシンキナーゼ阻害薬であるエルロチニブの 2 種類の EGFR 阻害剤を用い、OSC 細胞においてこれらの阻害剤がマクロピノサイトーシスを介する細胞内へのエクソソームの取り込みとそれに続くエクソソームによる腫瘍促進効果を抑制するかどうかを検討することにした。

3. 研究の方法

当教室で樹立した口腔扁平上皮癌細胞株：OSC 細胞 (OSC-4) を 48 時間培養し、上清中の細胞片を遠心により除去した後、エクソソームの抽出キットである Total exosome isolation kit を用いてエクソソームを分離した。エクソソームの細胞内への取り込みは、マクロピノサイトーシス阻害剤の EIPA および 2 種類の EGFR 阻害剤存在、非存在下に OSC-4 細胞の培養液に蛍光色素で標識したエクソソームを加え、共焦点顕微鏡およびフローサイトメトリーを用いて評価した。さらに、エクソソームの取り込み障害が OSC-4 細胞の増殖・遊走・浸潤能に及ぼす影響をそれぞれ、WST-1 assay、wound healing assay、invasion assay を用いて検討した。

4. 研究成果

PKH 26 で標識したエクソソームは、24 時間処理後 OSC-4 細胞内へと取り込まれており、その局在はマクロピノサイトーシスのマーカーである FITC 標識デキストランと共局在していた。一方、マクロピノサイトーシス阻害剤である EIPA で処理すると、OSC-4 細胞内への取り込みは、エクソソーム、デキストラン共に抑制された。また、エルロチニブおよびセツキシマブも

EIPA と同様に、エクソソーム、デキストランの OSC-4 細胞内への取り込みを抑制した。さらに、フローサイトメトリーにてエクソソーム取り込みの経時的変化について検討したところ、EGF 処理により OSC-4 細胞内へのエクソソームおよびデキストランの取り込みは経時的に促進されることが確認された。一方、EIPA、EGFR 阻害剤は処理後 6 時間から取り込みを抑制し、24 時間でより顕著に抑制した。OSC-4 由来エクソソームによる腫瘍促進効果については、エクソソームは濃度依存的に OSC-4 細胞の増殖・遊走・浸潤を促進したが、EIPA および EGFR 阻害剤はエクソソーム非存在下においても OSC-4 細胞の増殖・遊走・浸潤を抑制し、エクソソーム処理により誘導される各促進作用も抑制した。さらに、シグナル経路への影響について検討したところ、エクソソーム処理により誘導される ERK および Akt のリン酸化は、EGFR 阻害剤処理により抑制された。

以上の結果から、OSC 細胞は EGF 誘導性マクロピノサイトーシスを介してエクソソームを取り込むが、EGFR 標的薬はこの作用を阻害することが明らかとなった。このようにエクソソームの取り込みを阻害することが癌の発育・進展を阻止し、新規口腔癌治療に繋がる可能性が示唆された。

<参考文献>

- 1, Kosaka N, Yoshioka Y, Tominaga N, Hagiwara K, Katsuda T, Ochiya T. Dark side of the exosome: the role of the exosome in cancer metastasis and targeting the exosome as a strategy for cancer therapy. *Future Oncol.* 2014;10(4): 671-681.
- 2, Christianson HC, Svensson KJ, van Kuppevelt TH, Li JP, Belting M. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(43): 17380-17385.
- 3, Sento S, Sasabe E, Yamamoto T. Application of a Persistent Heparin Treatment Inhibits the Malignant Potential of Oral Squamous Carcinoma Cells Induced by Tumor Cell-Derived Exosomes. *PLoS One.* 2016;11(2):e0148454.
- 4, Nakase I, Kobayashi NB, Takatani-Nakase T, Yoshida T. Active macropinocytosis induction by stimulation of epidermal growth factor receptor and oncogenic Ras expression potentiates cellular uptake efficacy of exosomes. *Sci Rep.* 2015;3;5:10300.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Sasabe E, Liu Hm Tomomura A, Tomita R, Sento S, Yamamoto T. EGFR blockage inhibits uptake of tumor cell-derived exosomes through micropinocytosis in oral squamous cell carcinoma」14th Biennial Congress of the European Association of Oral Medicine (2018/9/27-29 Gothenburg)
2. Sento S, Sasabe E, Tomita R, Kitamura N, Yamamoto T. Exosomes as targeting therapy in oral squamous cell carcinoma」96th General Session & Exhibition of the IADR IADR Pan European Regional Congress (July 25-28, 2018 ExCeL London Convention Center London, England)
3. Tetsuya Yamamoto. The inhibition of the Malignant Potential by Targeting Tumor Cell-Derived Exosomes in Oral Squamous Cell Carcinomas. The 30th Taiwanese Congress on Oral & Maxillofacial Surgery (March 10, 2018, Kaohsiung, the Republic of China).
4. 仙頭慎哉・笹部衣里・北村直也・山本哲也 エクソソーム取り込みを標的とする口腔癌治療薬の探索 第 54 回日本口腔組織培養学会学術大会 (2017/11/4 岩手医科大学附属病院 循環器

医療センター)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm_dntst/index.htm

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：笹部 衣里

ローマ字氏名：SASABE, Eri

所属研究機関名：高知大学

部局名：教育研究部医療学系臨床医学部門

職名：講師

研究者番号(8桁): 40363288

研究分担者氏名：山本 哲也

ローマ字氏名：YAMAMOTO, Tetsuya

所属研究機関名：高知大学

部局名：教育研究部医療学系臨床医学部門

職名：教授

研究者番号(8桁): 00200824

研究分担者氏名：北村 直也

ローマ字氏名：KITAMURA, Naoya

所属研究機関名：高知大学

部局名：教育研究部医療学系臨床医学部門

職名：講師

研究者番号(8桁): 70351921

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。