

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04406

研究課題名(和文) 新規診断・治療法の開発に向けた口腔扁平上皮癌細胞由来エクソソームの解析

研究課題名(英文) Analysis of oral squamous cell carcinoma cell-derived exosomes for the development of new diagnostic and therapeutic methods

研究代表者

山本 哲也 (Yamamoto, Tetsuya)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号：00200824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームはエンドソームから形成される膜小胞であるが、内包物質が細胞により異なることから、近年、癌のバイオマーカーリソースとして注目されている。そこで、本研究では当科で樹立した株化口腔扁平上皮癌(OSC)細胞分泌エクソソームよりRNAを抽出し、正常口腔粘膜上皮細胞をコントロールとしてmiRNAアレイ解析を行い、OSC細胞分泌エクソソームに特異的に発現低下を示すがん抑制性miRNAの一つであるmiR-X1を同定するとともに、口腔扁平上皮癌症例の血清ならびに血清エクソソームにおいてmiR-X1の発現は健常人と比較して有意に低下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

口腔扁平上皮癌の発症、さらに予後を左右する重要な因子である再発・転移は比較的進行してからでない診断が困難であり、従来の診断法より非侵襲的で、高精度の診断法の確立が待たれている。本研究では、口腔癌細胞分泌エクソソームにおけるmiRNAの発現解析を行い、口腔扁平上皮癌細胞分泌エクソソームにおいて発現低下を示すがん抑制性miRNAの一つであるmiR-X1を同定した。miR-X1は口腔癌患者の血清ならびに血清中エクソソームにおいて、健常人の発現レベルより低値を示したことから、将来的には、口腔扁平上皮癌の診断が可能となるバイオマーカーとしての有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are membrane vesicles formed from endosomes and their components are dependent on cell types. Therefore, exosomes are being used as diagnostic and prognostic biomarkers for various cancers. In this study, we extracted RNA from oral squamous cell carcinoma cell (OSCC)-derived exosomes and performed miRNA array analysis compared with normal oral mucosal epithelial cells. We identified miR-X1, which is one of tumor suppression miRNAs. The expression of miR-X1 was significantly reduced in sera and exosomes in the peripheral blood of patients with oral squamous cell carcinoma.

研究分野：外科系歯学

キーワード：エクソソーム 口腔扁平上皮癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エクソソームはエンドソームから形成される直径30から100nmのリン脂質二重膜で覆われた膜小胞で、癌細胞、間質細胞、免疫担当細胞などの多様な細胞から細胞外に分泌され、血清、母乳、尿等に存在が認められている。エクソソームの膜にはテトラスパニンや接着分子、MHCクラス抗原などが発現されているとともに、エクソソームの内部には蛋白質や脂質、mRNA、miRNAなどの核酸といった様々な物質が内包されている。近年、分泌されたエクソソームは分泌細胞自身や周囲の他の細胞内に取り込まれ、内包物質を介して取り込んだ細胞の様々な機能に影響を及ぼすことが明らかにされ、エクソソームが細胞間情報伝達物質として機能していると考えられるようになってきた¹⁾。癌においては、癌細胞分泌エクソソームが癌細胞自身に取り込まれ、癌の発育・進展をオートクラインないしパラクライン的に促進することや、腫瘍間質細胞に取り込まれ、エクソソーム内包物質を介して、転移、血管新生、免疫修飾、抗癌剤耐性などに影響することが明らかとなってきている²⁾。

一方、エクソソームの内包物質は分泌する細胞、組織、疾患により異なることから、近年、エクソソームはバイオマーカーのリソースとして注目されており、癌においてはエクソソーム内包物質のうち特にmiRNAの発現を解析することで、腫瘍の有無や起源、病態を推測し、診断へ応用しようとする研究が活発になされている³⁾。また、最近、膵臓がん患者の血清中に存在するエクソソーム膜に発現されるヘパラン硫酸プロテオグリカンの一つであるGlypican-1の発現の有無をフローサイトメトリーにて解析することにより、膵臓癌を早期検出できる可能性があることが報告された⁴⁾。これらのことは、口腔扁平上皮癌(OSC)細胞由来エクソソームに特異的に発現される分子を同定し解析することが新たな口腔癌の診断ツールとなりうる可能性を示唆している。しかしながら、その分子は未だ明らかにされておらず、また、癌細胞分泌エクソソームに内包される特異分子の発現調節機構や、さらには、その分子が腫瘍悪性化・進展にどのように影響するのかが不明である。

2. 研究の目的

本研究ではOSC細胞由来エクソソームに特異的に発現する分子を同定する。その後、口腔癌患者の血清と血清中エクソソームにおける同定分子の発現解析を行い、癌の診断・病態・治療感受性・予後予測マーカーとしての有用性を検討する。それとともに、OSC細胞由来エクソソームにおける同定分子の発現調節機構や腫瘍悪性化・進展への影響を検討し、その分子の発現抑制や下流のシグナル伝達阻害が抗腫瘍効果をもたらすかを検討する。

3. 研究の方法

当科で樹立したOSC細胞の培養上清より回収したエクソソームからRNAを抽出し、正常口腔粘膜上皮細胞をコントロールとしてmiRNAアレイ解析を行い、いずれの株化細胞においてもコントロールに比べ10倍以上の発現増強を示す、あるいは0.1倍以下の発現低下を示すmiRNAを同定する。その後、口腔癌患者およびコントロール群の血清および血清中エクソソームからRNAを抽出し、同定した口腔扁平上皮癌で発現異常を示すmiRNAの発現レベルを定量し、口腔癌症例とコントロール群間の発現レベルの比較検討を行う。それとともに、口腔癌症例においては臨床病理学的因子、治療感受性、リンパ節転移、予後との関連を検討する。同定分子の発現調節機構については、OSC細胞株を低酸素ストレス(1%O₂濃度下での培養)に曝露させた後、OSC細胞の培養上清よりエクソソームを回収し、同定分子の発現変化を検討する。そして、同

定分子発現ベクターをOSC細胞に導入して強発現させる系、miRNA Mimic、miRNA阻害剤を導入する系を用いてOSC細胞分泌エクソソームを回収し、エクソソームのOSC細胞の増殖、遊走、浸潤能、治療感受性に対する影響を検討する。

4. 研究成果

いずれのOSC細胞由来エクソソームにおいても、ヒト口腔粘膜上皮細胞由来エクソソームに比べ10倍以上の発現増強を示すmiRNA、ならびに0.1倍以下の発現低下を示すmiRNAが幾つか同定された。その中で最も発現が低下していたがん抑制性miRNAの一つであるmiR-X1の発現について口腔癌のパラフィン包埋組織より癌組織と隣接した正常組織をそれぞれ採取し比較検討を行った。その結果、16例中14例の口腔癌症例において癌組織での発現低下が認められた。さらに、健常人22例と口腔扁平上皮癌18例の血清ならびに血清中エクソソームよりRNAを抽出しmiR-X1の発現解析を行った。その結果、口腔扁平上皮癌症例の血清ならびに血清エクソソームにおけるmiR-X1の発現は健常人のものと比較して有意に低下していた。しかしながら、口腔扁平上皮癌症例におけるmiR-X1の発現と臨床病理学的因子、治療感受性、リンパ節転移、予後との間に明らかな関連は認められなかった。

次に、口腔扁平上皮癌細胞由来エクソソームにおけるmiR-X1の発現抑制機構について検討するため、1%の低酸素環境下に口腔扁平上皮癌細胞株のOSC-4を培養した。その結果、低酸素処理により、細胞レベル、細胞由来エクソソームのいずれにおいてもmiR-X1の発現は経時的に低下した。さらに、miR-X1の発現は株化口腔扁平上皮癌細胞のみならず、舌癌組織においても低酸素領域が想定される腫瘍中心部においてその発現が低下していた。続いて、口腔扁平上皮癌細胞の悪性形質獲得におけるmiR-X1の作用について検討した。OSC-4細胞にmiR-X1を強発現させると細胞増殖が抑制され、その際、G0/G1期の細胞比率が増加するとともに、S期ならびにG2/M期の細胞比率が減少し、G0/G1アレストが生じた。さらに、がん細胞の浸潤能におけるmiR-X1の関与についてInvasion assayにて検討したところ、miR-X1の導入により浸潤能は有意に抑制され、逆に、miR-X1をノックダウンすると浸潤能は有意に増強した。加えて、遊走能への影響についてWound healing assayにて検討したところ、浸潤能と同様の効果が認められた。エクソソームの作用については、miR-X1強発現OSC-4由来エクソソームは、OSC細胞の増殖能、浸潤能、遊走能を抑制し、miR-X1ノックダウンOSC-4由来エクソソームは逆に、OSC細胞の増殖能、浸潤能、遊走能を促進した。

以上のことより、血清および血清中エクソソームにおけるmiR-X1の発現レベルは、口腔扁平上皮癌を診断できるバイオマーカーとなる可能性が示唆された。さらに、口腔扁平上皮癌細胞におけるmiR-X1の発現は低酸素環境下で低下し、miR-X1低発現エクソソームを介して口腔扁平上皮癌細胞の悪性化が促進されている可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles
Marina Colombo, Graca Raposo, Clotilde Théry, C. Annu Rev Cell Dev Biol. 2014;30:255-89. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.

- 2) Exosomes in cancer: small vesicular transporters for cancer progression and metastasis, biomarkers in cancer therapeutics Atefe Abak, Alireza Abhari, Sevda Rahimzadeh PeerJ. 2018; 6: e4763. Published online 2018 May 29. doi: 10.7717/peerj.4763
- 3) Exosomal miRNAs as cancer biomarkers and therapeutic targets Arron Thind, Clive Wilson J Extracell Vesicles. 2016; 5: 10.3402/jev.v5.31292. Published online 2016 Jul 19. doi: 10.3402/jev.v5.31292
- 4) Glypican1 identifies cancer exosomes and facilitates early detection of cancer Sonia A. Melo, Linda B. Luecke, Christoph Kahlert, Raghu Kalluri Nature. 2015; Jul 9; 523(7559): 177–182. Published online 2015 Jun 24. doi: 10.1038/nature14581

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sasabe E, Tomomura A, Tomita R, Sento S, Kitamura N, Yamamoto T.	4. 巻 12(11)
2. 論文標題 Ephrin-B2 reverse signaling regulates progression and lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0188965.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0188965.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sento S, Kitamura N, Yamamoto T, Nakashiro K, Hamakawa H, Ibaragi S, Sasaki A, Takamaru N, Miyamoto Y, Kodani I, Ryoke K, Mishima K, Ueyama Y	4. 巻 37(12)
2. 論文標題 Palonosetron Prevents Highly Emetogenic Chemotherapy-induced Nausea and Vomiting in Oral Cancer Patients.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 6977-6981
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.12165	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sasabe E, Tomomura A, Kitamura N, Yamamoto T.	4. 巻 62
2. 論文標題 Metal nanoparticles-induced activation of NLRP3 inflammasome in human oral keratinocytes is a possible mechanism of oral lichenoid lesions.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxicol In Vitro.	6. 最初と最後の頁 104663
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tiv.2019.104663.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 0件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 富田理生、笹部衣里、山本哲也
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌細胞の抗癌剤感受性に対するマクロファージ由来エクソソームの影響
3. 学会等名 第71回NPO法人日本口腔科学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 笹部衣里、仙頭慎哉、北村直也、山本哲也
2. 発表標題 口腔粘膜上皮由来細胞およびマクロファージのインフラマソームに及ぼす金属ナノ粒子の影響
3. 学会等名 第71回NPO法人日本口腔科学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 仙頭慎哉、吉澤泰昌、北村直也、山本哲也
2. 発表標題 原発性下顎骨内扁平上皮癌の4例
3. 学会等名 第71回NPO法人日本口腔科学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 仙頭慎哉、中谷貴恵、大野清二、北村直也、山本哲也
2. 発表標題 舌尖に発生した明細胞癌NOSの1例
3. 学会等名 第46回（公社）日本口腔外科学会中国四国支部学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 仙頭慎哉・笹部衣里・北村直也・山本哲也
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第54回日本口腔組織培養学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中谷貴恵、富田理生、仙頭慎哉、笹部衣里、山本哲也
2. 発表標題 上顎骨に発生した間葉系軟骨肉腫の1例
3. 学会等名 第65回 日本口腔科学会中国・四国地方部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 富田理生・北村直也・大野清二・山本哲也
2. 発表標題 後発外側舌リンパ節転移を来した舌扁平上皮癌の2例
3. 学会等名 第36回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北村直也
2. 発表標題 自然消退したHIV関連形質芽細胞リンパ腫の1例
3. 学会等名 第36回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tetsuya Yamamoto
2. 発表標題 The inhibition of the Malignant Potential by Targeting Tumor Cell-Derived Exosomes in Oral Squamous Cell Carcinomas
3. 学会等名 The 30th Taiwanese Congress on Oral & Maxillofacial Surgery (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kie Nakatani, Shinya Sento, Riki Tomita, Eri Sasabe, Tetsuya Yamamoto
2. 発表標題 A case of mesenchymal chondrosarcoma in the maxilla
3. 学会等名 The 59th Congress of Korean Association of Oral & Maxillofacial Surgeons (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笹部衣里・仙頭慎哉・北村直也・山本哲也
2. 発表標題 口腔粘膜上皮細胞のインフラマソームに及ぼす金属ナノ粒子の影響
3. 学会等名 第72回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sento S, Sasabe E, Tomita R, Kitamura N, Yamamoto T
2. 発表標題 Exosomes as targeting therapy in oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 96th General Session & Exhibition of the IADR IADR Pan European Regional Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笹部衣里・北村直也・山本哲也
2. 発表標題 金属ナノ粒子はオートファジーを介するインフラマソーム活性化により炎症を惹起する
3. 学会等名 第28回日本口腔内科学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sasabe E, Liu Hm Tomomura A, Tomita R, Sento S, Yamamoto T
2. 発表標題 EGFR blockage inhibits uptake of tumor cell-derived exosomes through micropinocytosis in oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 14th Biennial Congress of the European Association of Oral Medicine (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 仙頭慎哉、中谷貴恵、富田理生、青嶋美紀、吉澤泰昌、北村直也、山本哲也
2. 発表標題 口腔癌手術におけるTracheostomy scoring systemの有用性の検討
3. 学会等名 第63回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 富田理生、笹部衣里、山本哲也
2. 発表標題 マクロファージ由来エクソソームは口腔扁平上皮癌細胞の抗癌剤感受性を減弱する
3. 学会等名 第55回日本口腔組織培養学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 富田理生、笹部衣里、山本哲也
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌細胞の悪性度に及ぼすマクロファージ由来エクソソームの影響
3. 学会等名 第17回中国四国口腔癌研究会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北村直也、大野清二、吉澤泰昌、山本哲也
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌cN0症例に関する臨床的検討
3. 学会等名 第37回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹部衣里、仙頭慎哉、山本哲也
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌の抗癌剤耐性獲得における細胞老化関連分泌現象の関わり
3. 学会等名 第73回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sasabe E, Sento S, Tomita R, Yamamoto T
2. 発表標題 Senescence-associated Secretory Phenotype is involved in Cisplatin-resistant of Ora Cancer
3. 学会等名 97th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹部衣里、仙頭慎哉、北村直也、山本哲也
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌の抗癌剤耐性獲得における細胞老化関連分泌現象の関わり
3. 学会等名 第56回日本口腔組織培養学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宇高 恵子 (Udaka Keiko) (40263066)	高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・教授 (16401)	
研究分担者	笹部 衣里 (Sasabe Eri) (40363288)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・講師 (16401)	
研究分担者	仙頭 慎哉 (Sento Shinya) (30635264)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教 (16401)	
研究分担者	北村 直也 (Kitamura Naoya) (70351921)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・講師 (16401)	