

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24072

研究課題名(和文) 口腔癌エクソソームの網羅的解析による新規体液診断・治療体系の確立

研究課題名(英文) Establishment of new diagnostic method and system of therapeutics by comprehensive analysis of oral cancer exosomes.

研究代表者

小野 喜章 (ONO, KISHO)

岡山大学・岡山大学病院 口腔外科・医員

研究者番号：30845384

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、転移性の異なる口腔扁平上皮癌(OSCC)細胞から単離したエクソソームの網羅的発現解析を行うことで、腫瘍促進因子を探索し、臨床的に有効なバイオマーカーの同定を試みた。同定したエクソソームマーカー分子の生物学的機能を評価し、OSCC進展における分子機構の一端の解明を目指した。その結果、転移性エクソソームには分子シャペロン種の一つであるHSP90が多く含まれていた。また、エクソソーム内HSP90欠失により、OSCC上皮間葉転換レベルが抑制された。エクソソーム内HSP90レベルの上昇は、OSCC進行における予後予測バイオマーカーおよび治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

OSCCの治療方針としては外科切除が優先されるが、特に進行症例においては術後の様々な口腔機能障害や審美障害などの疾患特有の問題が生じる。この問題解決の糸口として、早期発見や悪性度判定を容易かつ迅速に行うことができる検査システムが求められている。またOSCC研究では、癌進展における悪性形質獲得の分子機構は未だ十分には解明されていない。今回の研究ではそのメカニズムの一端を明らかにするだけでなく、癌診断のための画期的なバイオマーカー開発においても重要な意味を有し、OSCCの早期発見・治療法開発に寄与することが予想される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to identify tumor-promoting factors and clinically effective biomarkers by comprehensively analyzing the expression of exosomal markers isolated from oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells with different metastases. We aimed to evaluate the biological functions of the identified exosomal molecules and elucidate a part of the molecular mechanism in the progress of OSCC. As a result, the metastatic exosome contained a large amount of HSP90, which is a kind of molecular chaperone. Intraexosome HSP90 deletion also suppressed OSCC epithelial-mesenchymal transition levels. Elevated levels of HSP90 in exosomes have been suggested to be prognostic biomarkers and therapeutic targets in OSCC progression.

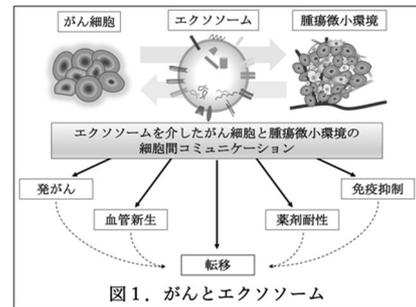
研究分野：口腔腫瘍学

キーワード：エクソソーム 細胞外小胞 バイオマーカー 口腔扁平上皮癌 分子シャペロン HSP90

## 1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌 (OSCC) は早期発見であれば5年生存率が90%と良好であるのに対し、進行症例では50%以下となる。また、医療機関を受診したときには全体の60%を進行症例が占め、その発見の遅れにも問題がある。しかしOSCCにおいて、臨床的に早期診断や悪性度判定による個別化医療のためのエビデンスが実証された分子診断バイオマーカーはいまだ確立されていない。これらの解決にはOSCC早期発見のために癌スクリーニングを容易に行えるシステムの開発が急務である。

エクソソームは生体の体液中を循環している細胞外分泌小胞の一種で、細胞間の情報伝達を担うことで疾患の成立から悪性化に重要な機能を果たしている (図1)。新世代の体液診断マーカーの新たなリソースとして、その実現に向けた大きな可能性に着目されている。



## 2. 研究の目的

本研究は、OSCCが分泌するエクソソームがその腫瘍進展・転移に関わっていると仮定した上で、有用な新規バイオマーカー及び治療標的を同定することを目的としている。OSCCの治療方針としては外科切除が優先されるが、特に進行症例においては術後の様々な口腔機能障害や審美障害などの疾患特有の問題が生じる。一方で、再発がんや切除不能な進行がんでは放射線療法や化学療法に対し抵抗性をもつことが問題となっている。これらの問題点を解決する糸口を見つけるべく、簡便かつ低侵襲的に採取できる体液中のエクソソームを用いた新たな視点からのがん診断・治療方法の開発を目的とする。

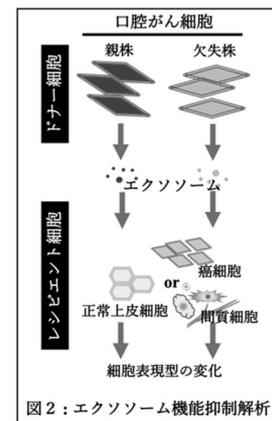
## 3. 研究の方法

### (1) エクソソームタンパク質の網羅的発現解析

転移性の異なるOSCC細胞からエクソソームを精製する。エクソソームの確認には動的光散乱法や電子顕微鏡での粒子の形態学的解析、およびエクソソーム表面抗原を標的としたタンパク質検出法を用いる。各細胞から抽出したエクソソームについて質量分析法を用いたプロテオーム解析を行い、OSCCに特異的なエクソソームタンパク質の同定を試みる。

### (2) エクソソームタンパク質の生物学的機能評価

同定したエクソソームタンパク質のOSCC進展における生物学的機能を明らかにするため、培養細胞や実験動物を用いて、細胞およびエクソソーム内の目的タンパク質喪失がもたらす影響について検討する。具体的には、同定したタンパク質をコードする伝令RNA (mRNA) を標的とした低分子干渉RNA (siRNA) をOSCC細胞もしくはエクソソームへ導入することで、細胞やエクソソームに起こる機能的変化を検討する (図2)。



### (3) OSCC患者臨床検体におけるタンパク質発現解析

同定したエクソソームタンパク質のバイオマーカーとしての有用性を示すため、OSCC患者の腫瘍組織検体を用いた免疫組織化学染色を行い、目的タンパク質の検出程度の違いにバイオマーカーとしての臨床意義を見出せるか検討する。

## 4. 研究成果

申請者らは、転移性の異なるOSCC細胞の培養上清から単離したエクソソームの網羅的プロテオーム解析により、転移性エクソソームには分子シャペロン種が多く含まれていた。その内、エクソソーム内HSP90が腫瘍進展・転移因子および有用なバイオマーカーとなる可能性について報告した (Ono K, *J Cell Biochem*, 2018)。HSP90は主要な細胞内分子シャペロンの1つであり、様々な癌種において高発現し、腫瘍増殖および転移を促進することが報告されていることから、HSP90阻害剤は癌治療の分野で大きな注目を集めていた。しかし、細胞内安定性や正常細胞への機能障害などから予想され得る甚大な副作用が避けることのできない課題となり、HSP90を標的とする抗体医薬の開発は非常に困難とされてきた。細胞内HSP90の機能については以前より多くの研究がなされてきたが、分泌型として細胞外に放出されたHSP90の機能については不明な点が多い。これらの問題点を踏まえて、エクソソーム内HSP90およびその関連分子に着目し、その機能を解明するとともに、エクソソーム内HSP90がOSCC進展に関わるか否かを明らかとし、新規のOSCC転移マーカーの同定を目指した。

### (1) 機能抑制エクソソームの精製

独自に設計した siRNA プールと最適化した導入効率を組み合わせたノックダウン実験系を用いた。高転移性 OSCC 細胞株への HSP90 $\alpha$ 、HSP90 $\beta$ 、CDC37 をトリプルターゲットとした RNAi 法を応用し、エクソソーム内の HSP90 を欠失させた (図 3)。

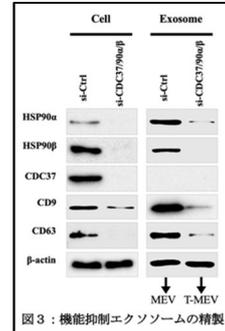


図 3：機能抑制エクソソームの精製

### (2) 機能抑制解析

親株と HSP90 欠失株から精製したそれぞれのエクソソーム (以下 MEV, T-MEV) を各種細胞に作用させてエクソソーム機能を比較解析し、OSCC 進展におけるエクソソーム内 HSP90 の役割を検討した (図 2)。

#### 癌細胞へのエクソソーム機能の検討

OSCC 細胞株 HSC-3 に対して、MEV および T-MEV を取り込ませ、癌細胞の運動能、遊走-浸潤能に与える影響を検討したところ、MEV を添加した群においては有意にその機能を上昇させるのに対して、T-MEV を添加した群ではその効果が抑制された (図 4)。

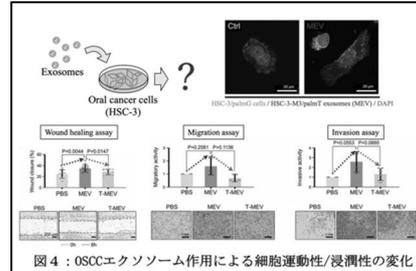


図 4：OSCCエクソソーム作用による細胞運動性/浸潤性の変化

#### 口腔粘膜上皮細胞へのエクソソーム機能の検討

ヒト正常口腔粘膜上皮細胞 RT7 に対して、MEV および T-MEV を取り込ませ、細胞形態および上皮間葉転換 (EMT) に関わる分子発現の変化を検討した。RT7 は敷石様の規則的な形態を示すが、MEV 添加群では、突起が伸びた紡錘形の細胞形態変化を示した。対照的に、T-MEV 添加群では、細胞の形態学的変化が抑制された。ウエスタンブロット法により EMT 関連分子を相対定量比較した結果、MEV 添加群での EMT 促進、T-MEV 添加群での EMT 抑制傾向を示した (図 5)。

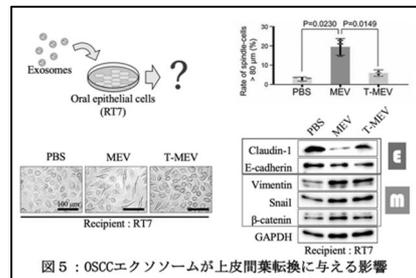


図 5：OSCCエクソソームが上皮間葉転換に与える影響

#### 癌スフェロイドへのエクソソーム機能の検討

近年 *in vivo* の生理学的環境により近く、従来よりも優れたモデルとして 3 次元培養により作製された細胞凝集塊であるスフェロイドが注目されている。3 次元培養で作製された細胞塊は、単層培養と比較して実際の腫瘍塊の発育と類似した性質をもつことが知られており、癌治療抵抗性や造腫瘍性などの特性を反映している。そこで、各エクソソームを取り込ませた口腔癌のスフェロイドに起こる機能変化を評価した。その結果、MEV 添加群ではスフェロイドの形成が促進されるのに対し、T-MEV 添加群では抑制された。スフェロイドの大きさや数の定量、ウエスタンブロット法を用いた細胞接着マーカーの相対定量比較でも同様の傾向を示した。

#### マクロファージへのエクソソーム機能の検討

ヒト急性単球性白血病由来の細胞株 THP-1 は PMA による刺激により、浮遊性の単球細胞から付着性のマクロファージへと分化する。この初期のマクロファージを M0 型と定義する。マクロファージは本来侵入した病原微生物や異常細胞を貪食する作用に働くが、腫瘍微小環境に存在するマクロファージはその性質が逆転し、抗腫瘍免疫応答の抑制、癌細胞の増殖・生存の促進、血管新生因子の産生等を介して癌増生を促進している。前者を M1 型、後者を M2 型と定義し、サイトカイン等の刺激によりその極性化に違いがでることがわかっている。M0 マクロファージに対して、MEV および T-MEV を取り込ませたところ、MEV 添加群では M2 型マクロファージで特異的に発現するマンノース受容体 CD206 の発現が増強するのに対し、T-MEV 添加群では抑制された。

### (3) 臨床検体解析

OSCC の腫瘍組織検体を用いて、HSP90 $\alpha$  / HSP90 $\beta$  についてそれぞれ免疫組織染色を行ったところ、進行した OSCC における腫瘍細胞において HSP90 $\alpha$  はその発現が上昇するのに対し、HSP90 $\beta$  の発現が低下する傾向にあった (図 6)。しかし、実際には HSP90 $\alpha$  は腫瘍細胞での発現は下がるものの、腫瘍組織周囲の間質組織においてその発現が上昇する傾向にあった (図 6)。また、腫瘍周囲におけるマクロファージにおいて発現が増えていることが示唆された。

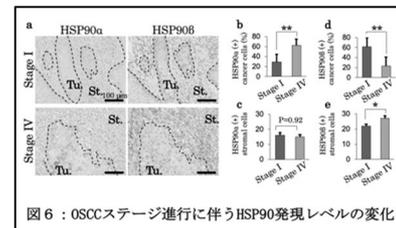


図 6：OSCCステージ進行に伴うHSP90発現レベルの変化

以上より、高転移性の OSCC 細胞は HSP90 リッチなエクソソームを分泌することで、癌細胞自身の運動性や浸潤性を亢進し、また EMT を介した正常細胞の発癌機構やマクロファージの悪性

転換に寄与することが示唆された。その結果、腫瘍増強に働くと考えられた。さらに、癌細胞中の分子シャペロン種のノックダウンにより、エクソソーム内の HSP90 を欠失し、癌エクソソームの働きが抑制されることで、抗腫瘍効果を示すことが示唆された。また、HSP90 は OSCC のステージ進行と相関して、その発現レベルや局在性が変化することが示唆された。エクソソーム内 HSP90 レベルの上昇は、OSCC 進行における予後予測バイオマーカーおよび治療標的となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ono Kisho, Sogawa Chiharu, Kawai Hotaka, Tran Manh Tien, Taha Eman A., Lu Yanyin, Oo May Wathone, Okusha Yuka, Okamura Hirohiko, Ibaragi Soichiro, Takigawa Masaharu, Kozaki Ken Ichi, Nagatsuka Hitoshi, Sasaki Akira, Okamoto Kuniaki, Calderwood Stuart K., Eguchi Takanori	4. 巻 9
2. 論文標題 Triple knockdown of CDC37, HSP90 alpha and HSP90 beta diminishes extracellular vesicles driven malignancy events and macrophage M2 polarization in oral cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Extracellular Vesicles	6. 最初と最後の頁 1769373 ~ 1769373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/20013078.2020.1769373	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 該当する

1. 著者名 Eguchi Takanori, Taha Eman Ahmed, Calderwood Stuart K., Ono Kisho	4. 巻 9
2. 論文標題 A Novel Model of Cancer Drug Resistance: Oncosomal Release of Cytotoxic and Antibody-Based Drugs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 47 ~ 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biology9030047	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 江口傑徳, 小野喜章, 河合穂高, チャン・チエン・マン, 十川千春, 奥舎有加, 岡元邦彰
2. 発表標題 口腔癌エクソソームによる腫瘍悪性化及びマクロファージM2分極における分子シャペロントリオの重要性
3. 学会等名 第6回日本細胞外小胞学会JSEV
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野喜章, 江口傑徳, 中野敬介, 河合穂高, 佐々木朗
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌診断・治療における分子シャペロンHSP90含有エクソソームの可能性
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江口傑徳, 小野喜章, 河合穂高, チャン・チエン・マン, 十川千春, 奥舎有加, 岡元邦彰
2. 発表標題 分子シャペロントリオによるエクソソーム制御, 腫瘍悪性化およびマクロファージ分極について
3. 学会等名 第14回 臨床ストレス応答学会
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
研究協力者	佐々木 朗  (SASAKI Akira)		
研究協力者	岡元 邦彰  (OKAMOTO Kuniaki)		
研究協力者	十川 千春  (SOGAWA Chiharu)		
研究協力者	江口 傑徳  (EGUCHI Takanori)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------