

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11722

研究課題名(和文) エクソソームを指標とする体液診断型口腔癌予後予測法の開発

研究課題名(英文) Development of prognosis method for oral cancer prognosis with body fluid diagnosis using exosome as an index

研究代表者

村上 純 (Murakami, Jun)

岡山大学・歯学部・博士研究員

研究者番号：40362983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：セツキシマブ(商品名：アービタックス)は、抗上皮成長因子受容体(EGFR)標的抗癌剤です。日本では、2012年に頭頸部扁平上皮癌に対して承認された。セツキシマブはEGFRに結合し、受容体機能を阻害して抗癌作用を示す。細胞外小胞を介する新たな抗癌剤の耐性機構が明らかになってきた。そこで我々も、口腔癌細胞が示すセツキシマブ耐性に、細胞外小胞が関与するのではないかとこの着想に至り、腔癌細胞が分泌する細胞外小胞を介したセツキシマブ耐性機序を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌細胞は、EGF刺激によりエクソソームの放出量が増加し、放出されたエクソソームはEGFRを高発現していた。ギータンジャーらは、EGFRを高発現している前立腺癌細胞は、エクソソームを介してEGFRを放出することを報告している。このことから、抗EGFR抗体薬であるセツキシマブ代謝へのエクソソームの関与が示唆された。これらの結果から、口腔癌細胞はエクソソームを介して、EGFRを細胞外へ放出し、薬剤耐性に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cetuximab (brand name: Erbitux) is an anti-epithelial growth factor receptor (EGFR) targeted anti-cancer drug. In Japan, it was approved for squamous cell carcinoma of the head and neck in 2012. Cetuximab binds to EGFR, inhibits receptor function, and exhibits an anticancer effect. The mechanism of resistance of new anticancer drugs via extracellular vesicles has been clarified. Therefore, we also reached the idea that extracellular vesicles might be involved in the resistance to cetuximab exhibited by oral cancer cells, and examined the mechanism of resistance to cetuximab mediated by extracellular vesicles secreted by cavity cancer cells.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔扁平上皮癌 セツキシマブ エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

セツキシマブ（商品名：アービタックス）は、抗上皮成長因子受容体（EGFR）標的抗癌剤である。日本では、2012年に頭頸部扁平上皮癌に対して承認され、セツキシマブはEGFRに結合し、受容体機能を阻害して抗癌作用を示す。

ディラードらによると、大腸癌において、EGFR伝達経路を担うKRAS遺伝子変異によりセツキシマブ抵抗性が生じる事が明らかになってきた。マルコらによると、エクソソームを介する新たな抗癌剤の耐性機構が明らかになっている。そこで我々も、口腔癌細胞が示すセツキシマブ耐性に、エクソソームが関与するのではないかという着想に至った。

エクソソームとは、正常細胞および癌細胞が放出する小胞のことで、様々な細胞に伝達される。癌細胞が放出するエクソソームには、正常細胞を癌化する分子が含まれている。エクソソームは癌細胞から放出され、正常細胞内に取り込まれ、内包する分子を伝達してがん化を促進させる。近年、癌細胞が放出するエクソソームに含まれる分子が注目されている。

2. 研究の目的

以上のことから、本研究の目的は、口腔癌細胞が分泌するエクソソームを介したセツキシマブ耐性機序を検討し、薬剤耐性による予後への影響を明らかとすることである。

3. 研究の方法

【対象】

HSC-3 ヒト口腔扁平上皮癌細胞株

【解析機器】

Exoscreen Enspire Alpha LISA system
(PerkinElmer, USA)

電子顕微鏡：H-7650 transmission
electronmicroscope (Hitachi, Tokyo, Japan)

粒子径解析：ELS-8000 (Otsuka Electronics, Hirakata, Japan)

蛍光顕微鏡：BZ-X700 fluorescence microscope (Keyence, Osaka, Japan)

【材料】

試薬

recombinant human EGF (carrier free) (585506, BioLegend, San Diego, CA)

Cetuximab (Erbix® Injection, MerckSerono, Tokyo, Japan)

・エクソソームおよび全細胞タンパク質の抽出

Ultra-15 Centrifugal Filter Devices for MW. 100,000 (Amicon)

Total Exosome Isolation (ThermoFisher Scientific)

・タンパク質濃度の測定 (microBCA法)

Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo SCIENTIFIC)

Western blotting

・抗体

mouse anti-CD9 (1:1,000, MBL, #D252-3)、rabbit anti-EGFR (1:1000, abcam, #E114)

HRP-conjugated goat anti-human IgG (H+L chain) (1:5,000, MBL, #206)

・蛍光標識したエクソソームによる解析

BODIPY TR Ceramide (ThermoFisher Scientific)にてエクソソームのタンパク質カーゴを蛍光標識染色し、Exosome Spin Columns (MW 3000)で精製した。蛍光顕微鏡下で観察、画像解析した。

4. 研究成果

【口腔癌細胞が放出するエクソソーム回収と同定】

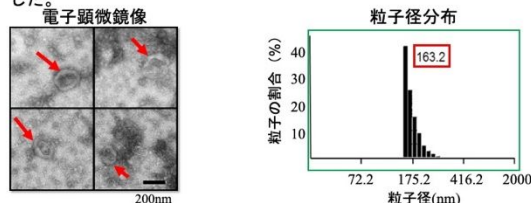
口腔癌細胞を、無血清下で培養し、2日後、エクソソームを回収した。

電子顕微鏡像では、回収したサンプルには、赤矢印に示すような二重膜に囲まれた粒子が存在していた。

粒子径分布のグラフでは、横軸に粒子のサイズ、縦軸に分布割合を表示している。回収したサンプルの40パーセントが粒子径 163.2nm を示した。これらは、二重膜に囲まれた粒子径 50 ~ 200nm というエクソソームの定義と一致しており、エクソソームと同定した。

口腔癌細胞が放出する細胞外小胞の回収と同定

口腔癌細胞HSC-3を無血清下で培養し、2日後、細胞外小胞を回収した。

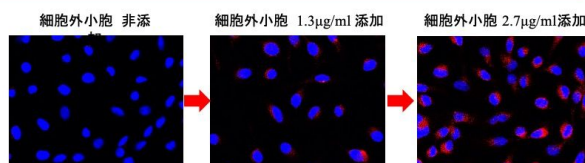


二重膜に囲まれた粒子が存在していた。40%が粒子径163.2nmの範囲に存在していた。
細胞外小胞の定義(二重膜に囲まれた粒子径約50~200nmの粒子)と一致した。

【口腔癌細胞によるエクソソーム取り込みの確認】

回収したエクソソームを蛍光標識して、口腔癌細胞HSC3 に添加し、癌細胞内への取り込まれるかを蛍光顕微鏡にて観察した。口腔癌細胞にエクソソーム量を変えて添加し、細胞内取り込みを比較した。エクソソームの添加量を多くすると、エクソソーム陽性を示す口腔癌細胞が増加する結果となった。以上より、回収したエクソソームが口腔癌細胞に濃度依存的に取り込まれ、エクソソームとしての機能を有する事が確認できた。

口腔癌細胞による細胞外小胞の取り込みの確認



回収した細胞外小胞は口腔癌細胞に濃度依存的に取り込まれ、細胞外小胞としての機能を有することを確認した。

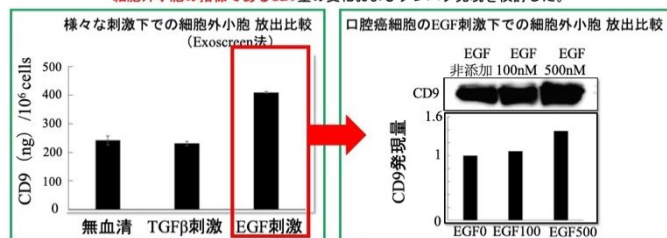
【様々な刺激条件下での胞外小胞放出量の変化】

口腔癌細胞を様々な刺激条件下で培養し、2日後、エクソソームを回収し、エクソソームの指標である CD9 量の変化およびタンパク発現を比較した。

エクソスクリーン法による様々な刺激下でのエクソソーム放出量の比較のグラフを示す。無血清と比較して、TGF 刺激ではエクソソーム量は増加しないが、EGF 刺激ではエクソソーム放出量が増加した。

様々な刺激条件下における細胞外小胞放出量の変化

口腔癌細胞を様々な刺激条件下で培養し、2日後、細胞外小胞を回収し、細胞外小胞の指標であるCD9量の変化およびタンパク発現を検討した。



口腔癌細胞は、EGF刺激により細胞外小胞の放出量を増加させた。

抗EGFR抗体薬であるセツキシマブ代謝への細胞外小胞の関与が予想された。

また、様々な濃度の EGF で刺激した場合でのエクソソーム放出量を CD9 ウェスタンブロッティングで検討すると、EGF 濃度が高いほどエクソソーム放出が増加した。以上より、口腔癌細胞は、EGF 刺激によりエクソソームの放出量を増加させることを明らかになった。これらは、口腔癌における、抗 EGFR 抗体薬であるセツキシマブ代謝において、エクソソームが関与する可能性が示唆された。

考察・まとめ

口腔癌細胞は、EGF 刺激によりエクソソームの放出量が増加し、放出されたエクソソームは EGFR を高発現していた。ギータンジャリーらは、EGFR を高発現している前立腺癌細胞は、エクソソームを介して EGFR を放出することを報告している。このことから、抗 EGFR 抗体薬であるセツキシマブ代謝へのエクソソームの関与が示唆された。

これらの結果から、口腔癌細胞はエクソソームを介して、EGFR を細胞外へ放出し、薬剤耐性に関与している可能性が示唆された。

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 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fujiwara Toshifumi, Eguchi Takanori, Sogawa Chiharu, Ono Kisho, Murakami Jun, Ibaragi Soichiro, Asaumi Jun-ichi, Okamoto Kuniaki, Calderwood Stuart K., Kozaki Ken-ichi	4. 巻 503
2. 論文標題 Anti-EGFR antibody cetuximab is secreted by oral squamous cell carcinoma and alters EGF-driven mesenchymal transition	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1267 ~ 1272
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.07.035	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, Sogawa Chiharu, Okusha Yuka, Uchibe Kenta, Iinuma Ryosuke, Ono Kisho, Nakano Keisuke, Murakami Jun, et al	4. 巻 13
2. 論文標題 Organoids with cancer stem cell-like properties secrete exosomes and HSP90 in a 3D nanoenvironment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0191109 ~ 0191109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0191109	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 Fujiwara Toshifumi, Eguchi Takanori, Sogawa Chiharu, Ono Kisho, Murakami Jun, Ibaragi Soichiro, Asaumi Jun-ichi, Calderwood Stuart K., Okamoto Kuniaki, Kozaki Ken-ichi	4. 巻 86
2. 論文標題 Carcinogenic epithelial-mesenchymal transition initiated by oral cancer exosomes is inhibited by anti-EGFR antibody cetuximab	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oral Oncology	6. 最初と最後の頁 251 ~ 257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.oraloncology.2018.09.030	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 藤原 敏史、村上 純
2. 発表標題 EGFR標的抗体薬セツキシマブによる口腔癌由来のEGFR陽性 エクソソームの制御
3. 学会等名 第72回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 難波友里、江口傑徳、村上純、十川千春、浅海淳一、小崎健一
2. 発表標題 転移性癌細胞クローンの薬剤耐性
3. 学会等名 第71回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤原敏史、十川千春、小野喜章、村上純、浅海淳一、小崎健一、江口傑徳
2. 発表標題 腫瘍微小環境シグナルによる上皮間葉転換およびエクソソーム変化についての解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2016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	岡田 俊輔 (Okada Shunsuke) (00759681)	岡山大学・大学病院・助教 (15301)	
研究分担者	竹中 文章 (Takenaka Fumiaki) (10642522)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	
研究分担者	江口 傑徳 (Eguchi Takanori) (20457229)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	