

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11828

研究課題名(和文) がんの悪性化とがん微小環境変化を誘導するエクソソームを標的とした治療法の開発

研究課題名(英文) Exosomes promoting malignancy and affecting tumor microenvironment, the target for anti-tumor therapy.

研究代表者

KA 井上(Inoue, Katarzyna Anna)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：90302877

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)：がん細胞由来のエクソソームは、細胞間の分子輸送を介してがん微小環境に働きかけてがんの進展に関与することから、がんの治療の標的として注目されている。エクソソームの形成や取り込みにはヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)の関与が報告されている。我々は口腔がんの悪性化に伴って起こる上皮間葉移行(EMT)におけるHSPGの機能とそのメカニズムの解明を目指した。口腔扁平上皮がん細胞は、TGF-によりEMTが誘導され、運動能が亢進された。また、エクソソームを分泌量の増加も認められた。このエクソソームには複数のHSPGが局在し、血管内皮細胞の内皮間葉移行の誘導能を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔がんはリンパ節への転移が起こりやすいため、予後不良に陥りやすい。がんの治療法としては、手術治療が中心となり、患者の生活の質(QOL: quality of life)が低下することが問題となっている。本研究の最終的な目標は、エクソソームを標的とした創薬をめざすことであり、今までになかった非侵襲的かつ効果的な治療法を確立することである。本研究の成果により、口腔がん由来のエクソソームに特異的に存在するタンパク質を同定することで、エクソソームを標的とした、未だに発見が難しい口腔がんの早期診断が可能となり、その臨床応用的な意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Cancer cell-derived exosomes, small extracellular vesicles have been reported to play an important role in cancer progression by affecting the function of cells residing in the cancer microenvironment. Exosomes, can promote tumor progression by stimulating various processes including EMT and are considered as a promising target for cancer treatment. Heparan sulfate proteoglycan (HSPG) has been reported to be involved in the formation and uptake of exosomes. We aimed to elucidate the function and mechanism of HSPG in epithelial-mesenchymal transition (EMT) of oral cancer and uptake of cancer cell-derived exosomes. Oral squamous cell carcinoma cell lines treated with TGF- underwent EMT, became more motile and secreted more exosomes than control cells. These exosomes contained multiple HSPGs and were able to induce endothelial-mesenchymal transition of vascular endothelial cells.

研究分野：生化学

キーワード：エクソソーム プロテオグリカン

1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔扁平上皮がんは、顎口腔領域に発生する悪性腫瘍である。口腔がんは、世界で6番目に多いがんであり、毎年、世界中で30万人以上が診断され、そのうちの14万人が死亡している。その治療法は近年進歩しているものの、未だにがん再発とそれに伴う転移が大きな問題となっている。上皮由来の口腔がん細胞は、がんの微小環境における様々な細胞から分泌されている分子(TGF- β 、TNF- α 、Wnt など)の作用により上皮間葉移行(EMT: epithelial-mesenchymal transition)を介して浸潤・転移能を獲得することが報告されている。しかし、口腔扁平上皮がんの転移に関わるEMTの分子メカニズムには未解明な部分が多く残されている。

(2) 近年、がん細胞が分泌するエクソソームの、EMTへの関与が注目を集めている。エクソソームは、多くの細胞から細胞外および体液に分泌され、細胞間でタンパク質、およびマイクロRNAを転送する働きを持ち、情報伝達に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。また、がんの進展の過程におけるEMT、浸潤および転移などにも重要な役割を示すことが明らかになり注目が集まっている。さらに興味深いことに、がん細胞が形成するエクソソームが、がん転移を誘導することが報告されている。このメカニズムとして、がん細胞が遠隔臓器へ転移する際のバリアとなる働きを持つ血管の細胞間結合を内皮間葉移行(EndMT)という過程を介して低下させることが提唱されている。

(3) ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)は、膜構造(マイクロドメイン)に局在し、がんの浸潤や転移などに関与することが近年明らかになった。卵巣がんのEMTにおいてはHSPGの発現変化やsheddingが観察され、また、肺がん細胞ではHSPGの発現増加が見られ、TGF- β によるがん細胞のEMT誘導や浸潤能の獲得に重要な役割を果たすことが報告されている。しかし、EMTにおけるHSPGの効果に対する詳細なメカニズムはまだ解明されていない。これら知見から、がんの進展の過程に重要な関与が示唆されているエクソソームの機能活性には、HSPGが重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、上皮扁平口腔がんの浸潤・転移においてEMTを誘導するエクソソームに着目し、エクソソームの分泌や取り込みを標的とした新規がん治療薬の開発を目指した。そのために、EMTにおけるHSPGを介したエクソソームの分泌や取り込みメカニズムを解明することを目指し、以下の3つ具体的目標を設定した。

- (1) EMTを誘導させたときの口腔扁平上皮がん細胞の変化及び評価
- (2) EMTを誘導させたときの口腔上皮扁平がん細胞由来のエクソソームのキャラクタリゼーション
- (3) EMTにおけるエクソソームとHSPGのがん微小環境構成因子に与える作用の検討

3. 研究の方法

- (1) 種々の口腔扁平上皮がん細胞(HOC313、HOC313-LM、SAS、HSC4細胞株など)を用いて、TGF- β の存在下でEMTを誘導し、EMTの誘導の際にEMTマーカーの発現変動、及びEMTの誘導における細胞運動能、細胞増殖の検討を行った。
- (2) EMTを誘導した口腔扁平上皮がん細胞からエクソソームを精製し、生化学的手法を用いて、そのエクソソームのキャラクタリゼーションを行なった。
- (3) PHK蛍光標識法を用いて、通常条件及びEMT誘導条件下で培養した口腔がん細胞由来エクソソームの膜を蛍光標識し、蛍光標識エクソソームの取り込みを蛍光点顕微鏡で観察した。
- (4) 通常状態とEMTを誘導させた状態における、悪性度の高い、もしくは低い口腔がん細胞由来のエクソソームを抽出し、がん微小環境を構成するがん細胞及び内皮細胞に対する影響を検討し、がん細胞運動能、及び内皮細胞のバリア機能に対する効果を調べた。
- (5) 生化学的手法、及び定量的RT-PCRを用いて、EMTの誘導における発現変動しているHSPGの同定を行った。加えて、CRISPR-Cas9方法を用いてHSPGの合成酵素欠損している口腔扁平上皮がん細胞を樹立した。

4. 研究成果

- (1) 種々の口腔扁平上皮がん細胞 (HOC313、HOC313-LM、SAS、HSC4 細胞株) における TGF- β の作用を検討した。TGF- β ファミリーには TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3 という3つのアイソフォームが存在する。SAS 及び HSC4 の扁平上皮がん細胞ではすべてのアイソフォームにより EMT の誘導が見られた 引用文献 1。次に、TGF- β の存在下で、口腔扁平上皮がん細胞を EMT 誘導させたところ、間葉系細胞マーカー、SM22 及び vimentin の発現増加が確認された。また、上皮系の細胞マーカーと知られている E-cadherin 及び claudin-1 の発現減少も確認された (図 1)。

また、全ての口腔扁平上皮がん細胞は、TGF- β により、がんの悪性度の指標である運動能が亢進されることを明らかとなった。TGF- β により活性化される RHO シグナルが細胞運動を制御していることが報告されているため、RHO シグナル阻害剤 (Y27632) を用いたところ、TGF- β による運動能の亢進は、RHO シグナルが重要な役割を果たしていることが明らかとなった 引用文献 2。

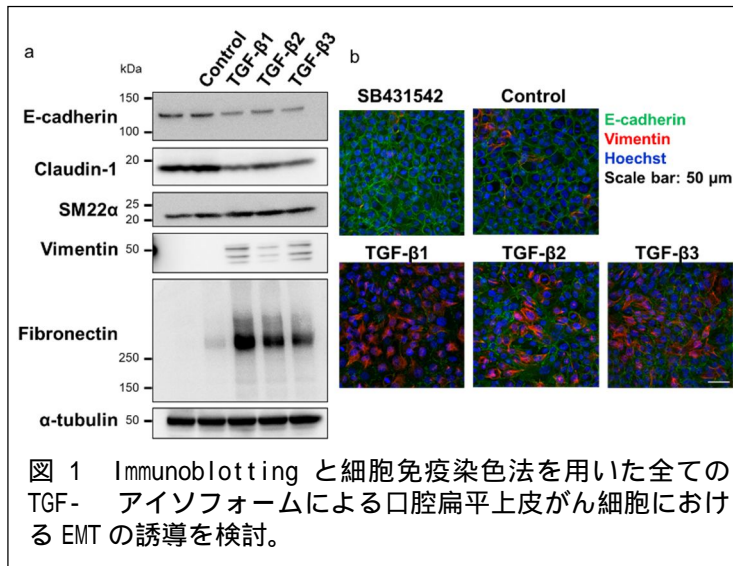


図 1 Immunoblotting と細胞免疫染色法を用いた全ての TGF- β アイソフォームによる口腔扁平上皮がん細胞における EMT の誘導を検討。

- (2) TGF- β 処理、もしくは非処理の、種々の口腔扁平上皮がん細胞からエクソソームの調整方法を確立。口腔扁平上皮がん細胞由来のエクソソームのキャラクタリゼーションを行い、エクソソームのマーカー分子として CD63、TSG101、ALIX が検出された。さらに、NanoSight 画像解析により、TGF- β で処理していない細胞と比べて、EMT を誘導させたがん細胞の方が、エクソソームの分泌量の増加が認められた。また、各細胞における HSPG の発現、及びエクソソームにおける HSPG の局在を解析することができた。ヘパラン硫酸鎖を特異的に認識する 3G10 抗体を用いたイムノプロット解析の結果から、細胞には複数の異なる分子量の HSPG が存在することが示唆された。さらに、図 2 で示されるように、EMT を誘導することで、SAS や HSC4 細胞由来のエクソソームに局在している HSPG の種類に変化が認められた (図 2)。

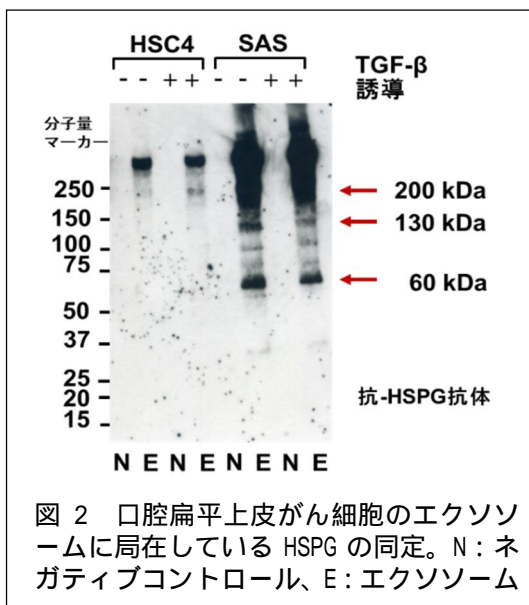


図 2 口腔扁平上皮がん細胞のエクソソームに局在している HSPG の同定。N: ネガティブコントロール、E: エクソソーム

- (3) エクソソームががん微小環境を構成する細胞 (がん細胞及び血管内皮細胞) におよぼす作用、及び微小環境構成因子の発現におよぼす作用について検討した。この結果、TGF- β を処理することで EMT を誘導させた細胞から分泌されるエクソソームを、口腔がん細胞が取り込むことで、その口腔がん細胞は EMT を誘導する可能性が示唆された。また、がん細胞を TGF- β で刺激させた時に分泌されるエクソソームが、血管内皮細胞におよぼす効果を検討した。結果、エクソソームを処理すると、血管内皮細胞は、内皮間葉移行 (EndoMT) が誘導されることが示唆された。さらに、このエクソソームを処理した血管内皮細胞はバリア機能の低下が認められた。これらエクソソームの処理によっておこる機能変化に対する HSPG の関与の解析を進めている。

引用文献

1. Takahashi K, Akatsu Y, Podyma-Inoue KA, Matsumoto T, Takahashi H, Yoshimatsu Y, Koinuma D, Shirouzu M, Miyazono K, Watabe T. Targeting all transforming growth

factor- isoforms with an Fc chimeric receptor impairs tumor growth and angiogenesis of oral squamous cell cancer. *J Biol Chem.* 295 (36): 12559-12572, 2020

2. Takahashi T#, Podyma-Inoue KA#, Takao C, Yoshimatsu Y, Muramatsu T, Inazawa J, Watabe T. Regulatory role of transforming growth factor- signals in the migration and tumor formation of HOC313-LM cells, an oral squamous cell carcinoma *J Stomatol Soc Jpn.* 85 (2): 52-61, 2018. #: equal contribution

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4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 Yoshimatsu Yasuhiro, Wakabayashi Ikumi, Kimuro Shiori, Takahashi Naoya, Takahashi Kazuki, Kobayashi Miho, Maishi Nako, Podyma Inoue Katarzyna A., Hida Kyoko, Miyazono Kohei, Watabe Tetsuro	4. 巻 111
2. 論文標題 TNF enhances TGF induced endothelial to mesenchymal transition via TGF signal augmentation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2385 ~ 2399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14455	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 Takahashi Kazuki, Akatsu Yuichi, Podyma-Inoue Katarzyna A., Matsumoto Takehisa, Takahashi Hitomi, Yoshimatsu Yasuhiro, Koinuma Daizo, Shirouzu Mikako, Miyazono Kohei, Watabe Tetsuro	4. 巻 295
2. 論文標題 Targeting all transforming growth factor- isoforms with an Fc chimeric receptor impairs tumor growth and angiogenesis of oral squamous cell cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 12559 ~ 12572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.012492	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 Sakakitani Shintaro, Podyma Inoue Katarzyna A., Takayama Rina, Takahashi Kazuki, Ishigami Yuasa Mari, Kagechika Hiroyuki, Harada Hiroyuki, Watabe Tetsuro	4. 巻 112
2. 論文標題 Activation of 2 adrenergic receptor signals suppresses mesenchymal phenotypes of oral squamous cell carcinoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 155 ~ 167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14670	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 井上 カタジナアンナ, 渡部 徹郎	4. 巻 26
2. 論文標題 【エクソソーム最前線】 血管とエクソソーム 炎症と免疫.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 炎症と免疫	6. 最初と最後の頁 280-285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kazuki Takahashi, Katarzyna A. Podyma-Inoue, Chihiro Takao, Yasuhiro Yoshimatsu Y, Tomoki Muramatsu, Johji Inazawa and Tetsuro Watabe	4. 巻 85
2. 論文標題 Regulatory role of transforming growth factor- signals in the migration and tumor formation of HOC313-LM cells, an oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal Stomatological Society, Jpn.	6. 最初と最後の頁 52-61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 若林育海, 吉松康裕, 紀室志織, 高橋直也, 高橋和樹, 伊東史子, 小林美穂, 井上カタジナアンナ, 宮園浩平, 渡部徹郎
2. 発表標題 TNF- はTGF- シグナルの増強を介してTGF- によって誘導される血管の内皮間葉移行を促進する
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Katarzyna A. Inoue, Kazuki Takahashi, Maki Saito, Atsushi Kaida, Akinari Sugauchi, Toshihiro Uchihashi, Yasuhiro Yoshimatsu, Susumu Tanaka, Masahiko Miura, Mikihiro Kogo, Tetsuro Watabe
2. 発表標題 Oral squamous carcinoma cells under TGF- -induced cell cycle arrest represent highly motile and invasive population
3. 学会等名 AACR Virtual Special Conference: Tumor Heterogeneity: From Single Cells to Clinical Impact (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuki Takahashi, Katarzyna A. Inoue, Atsushi Kaida, Akinari Sugauchi, Toshihiro Uchihashi, Yasuhiro Yoshimatsu, Susumu Tanaka, Masahiko Miura, Mikihiro Kogo, Tetsuro Watabe
2. 発表標題 TGF- -induced cell cycle arrest is associated with increased migration and metastasis of oral squamous carcinoma cells
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榑谷 振太郎、井上 カタジナ アンナ、高橋 和樹、原田 浩之、渡部 徹郎
2. 発表標題 2-アドレナリン受容体シグナルは口腔扁平癌の進行を阻害する
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Katarzyna A. Inoue, Shintaro Sakakitani, Kazuki Takahashi, Hiroyuki Harada, Tetsuro Watabe
2. 発表標題 Novel approach for treatment of oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hitomi Takahashi, Kazuki Takahashi, Yuichi Akatsu, Katarzyna A. Podyma-Inoue, Takehisa Matsumoto, Yasuhiro Yoshimatsu, Shingo Kodama, Toshihiro Uchihashi, Daizo Koinuma, Mikako Shirouzu, Kohei Miyazono and Tetsuro Watabe
2. 発表標題 Targeting all transforming growth factor- isoforms with a novel Fc chimeric receptor impairs tumor growth and angiogenesis of oral squamous cell
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（MBSJ2020）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋和樹、井上カタジナアンナ、 戒田篤志、 高橋恵生、 久保田晋平、 須河内 昭成、 内橋 峻大、 田中 晋、古郷 幹彦、 三浦雅彦、 宮園 浩平、 渡部 徹郎
2. 発表標題 口腔がんの進展におけるTGF- シグナルの役割
3. 学会等名 Research PlaNet 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋和樹、井上カタジナアンナ、戒田篤志、高橋恵生、久保田晋平、須河内昭成、内橋俊大、田中晋、古郷幹彦三、浦雅彦、宮園浩平、渡部徹郎
2. 発表標題 TGF- により細胞周期が停止した口腔扁平上皮がん細胞の運動能ならびに転移能は亢進する
3. 学会等名 第78回日本癌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Katarzyna Inoue, Rina Takayama, Kazuki Takahashi and Tetsuro Watabe
2. 発表標題 Characterization of exosomes secreted from oral squamous carcinoma cells during epithelial to mesenchymal transition
3. 学会等名 The 11th International Conference on Proteoglycans (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋 和樹, 井上 カタジナ アンナ, 吉松 康裕, 戒田 篤志, 三浦 雅彦, 渡部 徹郎
2. 発表標題 口腔扁平上皮がん細胞のTGF- による細胞周期制御と運動能亢進は関与する
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuki Takahashi, Katarzyna A. Inoue, Yasuhiro Yoshimatsu, Atsushi Kaida, Kei Takahashi, Shimpei Kubota, Akinari Sugauchi, Toshihiro Uchihashi, Susumu Tanaka, Mikihiko Kogo, Masahiko Miura, Kohei Miyazono, Tetsuro Watabe
2. 発表標題 TGF- -induced cell cycle arrest is associated with increased migration and metastasis of oral squamous carcinoma cells
3. 学会等名 AACR-JCA Joint Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	Kazuki Takahashi, Katarzyna A. Inoue, Yasuhiro Yoshimatsu, Atsushi Kaida, Kei Takahashi, Shimpei Kubota, Akinari Sugauchi, Toshihiro Uchihashi, Susumu Tanaka, Mikihiko Kogo, Masahiko Miura, Kohei Miyazono, Tetsuro Watabe
2. 発表標題	Regulatory role of transforming growth factor- signals in the migration and cell cycle of oral squamous carcinoma cells
3. 学会等名	Keystone Symposia; Cancer Metastasis: The role of metabolism, immunity and microenvironment (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Katarzyna A. Inoue, Kazuki Takahashi, Takumi Matsuda, Yasuhiro Yoshimatsu, Atsushi Kaida, Masahiko Miura and Tetsuro Watabe
2. 発表標題	Cell cycle arrest in oral squamous carcinoma cells undergoing TGF- -induced epithelial to mesenchymal transition
3. 学会等名	FASEB Conference "TGF-B Superfamily: Signaling in Development and Disease" (国際学会)
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	Tetsuro Watabe, Kazuki Takahashi, Takumi Matsuda, Yasuhiro Yoshimatsu, Atsushi Kaida, Masahiko Miura and Katarzyna A. Inoue
2. 発表標題	Relationship between cell cycle arrest and epithelial to mesenchymal transition (EMT) induced by TGF- in oral squamous carcinoma cell
3. 学会等名	ERATO/AMED-CREST/PRESTO Joint International Symposium (国際学会)
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	Katarzyna A. Inoue, Kazuki Takahashi, Takumi Matsuda, Yasuhiro Yoshimatsu, Miki Yokoyama and Tetsuro Watabe
2. 発表標題	Exosomes secreted by oral squamous carcinoma cells undergoing TGF- -induced epithelial to mesenchymal transition
3. 学会等名	ConBio2017
4. 発表年	2017年

1. 発表者名 高橋 和樹, 井上 カタジナアンナ, 吉松 康裕, 戒田 篤志, 三浦 雅彦, 渡部 徹郎
2. 発表標題 口腔がん細胞のTGF- による上皮間葉移行に伴う細胞周期制御の検討
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017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	渡部 徹郎 (Watabe Tetsuro) (00334235)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	

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
---------	---------