

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09379

研究課題名(和文) 頭頸部扁平上皮がんのリンパ節転移に対する集学的抗転移治療の開発

研究課題名(英文) Development of a multidisciplinary anti-metastasis treatment against lymph node metastasis of head and neck squamous cell carcinomas

研究代表者

矢野 元 (Yano, Hajime)

愛媛大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00284414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：多因子・多次元の複雑系であるがん転移において、複数の標的分子を設定することで「効率的ながん転移抑制」が可能であることを、検証・実証することを本研究では目指してきた。標的因子の一つである LOXL2 が腫瘍細胞由来のエクソソーム様画分に局在し、そのことが頭頸部がん患者血清においても観察されることを報告したが、この傾向は特に比較的初期がんにおいて強く、LOXL2 の転移初期への関与を示唆した。さらにもう一因子の NHE1 と併せて発現抑制した腫瘍細胞では、非がん組織への生着が減弱していることが観察され、LOXL2 単独の発現抑制時よりもさらに抗 - 転移的状态となっている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血清エクソソーム様画分に注目することで、リンパ節転移がないか少ない比較的初期の頭頸部がん患者において LOXL2 含量が亢進していることが示された。動物実験においては LOXL2 がリンパ節転移に寄与することはすでに確認されていたので、それを肯定的に支持する患者血清データが得られたことの臨床的意義は大きい。一方 NHE1 / LOXL2 両ノックダウン細胞のマウス舌移植における生着性の低下はこれまで各因子の単独ノックダウンにおいては観察されておらず、目指していた相加的な抗-転移性のみならず、さらに強い相乗的抗-転移性が生じている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Cancer metastases are multi-factorial as well as multi-dimensional events. This study was aimed at proving multidisciplinary treatment against factors responsible for metastases is effective on "anti-metastasis" therapy. We have reported that one of the target molecules of the multidisciplinary treatment, LOXL2 localizes to exosomal fraction derived from the Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) both in cultured cells as well as serum from patients. Amounts of LOXL2 were higher in relatively early phase of the HNSCC patients suggesting the participation of LOXL2 on the early phase of metastasis. The HNSCC cell with double knockdown of LOXL2 together with another target protein NHE1 exhibited decreased primary engraftment to non-tumor tissues, makes the HNSCC cell, possibly, much less metastatic than each single knockdown.

研究分野：がん転移

キーワード：頭頸部扁平上皮がん リンパ節転移 リジルオキシダーゼ ナトリウムイオン / プロトン交換輸送体 1 細胞外小胞 エクソソーム 患者血清エクソソーム

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

がんの脅威の本態の一つは転移である。頭頸部がんの 90% 以上を占める扁平上皮がんにおいては、肺や肝臓への遠隔転移においてリンパ節転移を**伴わないことが稀**である、という腺がんとは際立って異なった特徴がある。このことは遠隔転移が発生するうえで、リンパ節転移に何らかの意義があることを強く示唆している。臨床的にもリンパ節転移の有無は予後を大きく左右するため、この転移を抑制することが、ひいては疾患全体の予後の改善に資する可能性があるが、現在に至るまで有効な抗 - 転移治療というものは存在しない。一方、腫瘍の殺傷を目指した抗がん剤や分子標的薬を用いた治療では、プラチナ製剤と抗体製剤など、その作用機序の異なる二剤を併用する「集学的治療」が繁用されており、奏功することも観察される。抗 - 転移治療の実現に向けて、こうした集学的治療をデザインするためには、同時に対象とできる複数の治療標的が必要である。われわれは独自に開発・樹立した**定量的マウス舌がんリンパ節転移モデル系**を用いて、これまでにこうした治療標的候補分子をいくつか見出してきた。このうち、リジルオキシダーゼ様因子 2 (LOXL2) は転移標的の細胞外基質微小環境を改変して前転移期ニッチを形成する潜在的能力をもつ。またナトリウムイオン / プロトン交換輸送体 1 (NHE1) はヒトの舌がん組織において発現亢進が観察されるほか、そのノックダウン細胞のリンパ節転移性が確かに減弱しているなど、がん転移との深い関連が示唆されていた。こうしたことを踏まえ、本研究では LOXL2、NHE1 の二因子を標的とすることで有効な「集学的抗 - 転移治療」が構築できる可能性について、追求を行った。

## 2. 研究の目的

本研究で注目する二因子ががん転移に寄与するという知見、およびそれに類似するものは、他グループからも断片的に示唆されている。特に LOXL2 については、同じ酵素活性を持つファミリー因子であるリジルオキシダーゼ (LOX) が、乳がんの肺転移における前転移期ニッチ形成に中心的な役割を果たすという先駆的な発見がすでになされていた。また NHE1 についても細胞極性のメンテナンス、ひいては運動性の制御において重要な役割を果たすということも示唆されていた。本研究では、こうした先行する知見がわれわれの独自系においてどのように位置づけられるのか、これらの因子のがん転移における意義にあらたな視点から臨むことはできるか、という追及を行い、のちこれらを集学的に標的とすることで抗 - 転移治療に相加的な効果をもたらすことができるか否か、を査定することを目指してきた。

こうした中われわれは、LOXL2 について、細胞外小胞の一つである**エクソソーム様小胞の画分に局在する**ことを明らかにした。この知見を得て報告しているのはオランダの Verhaar のグループとわれわれのみであり、高い独自性ととも、近年その研究が飛躍的な展開を見せている細胞外小胞の、がん転移領域における生物学的重要性をいち早く指摘・実証するものとしても重要である。また NHE1 については、従来注目されてきた単一細胞の運動性における意義を超えた、**細胞集団の運動性における意義**を独自に見出し指摘してきた。上皮がん、特に扁平上皮がん細胞においては、上皮 - 間充織形質転換 (Epithelial - Mesenchymal Transition: EMT) を介する単一細胞化を要せず、上皮組織構築の一部である細胞集団としての運動が、がん浸潤・転移において意義深いことが指摘されてきている。われわれは NHE1 が細胞集団の運動性、特にその極性を規定する因子として重要であることを見出しており、この知見も従来の理解に新しい次元を付け加える発見として重要である。本研究では、このように作用機序の異なる二つのがん転移関連因子を集学的に標的とすることの妥当性の査定を通じて、効果的抗 - 転移治療への道筋を拓くことを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) LOXL2 タンパク質の細胞下画分局在の検討

細胞培養上清を濃縮し、イムノブロット法にての検出を試みたほか、同培養上清よりエクソソーム様画分を調製して、イムノブロットに供した。エクソソーム様画分の調製は、ポリマー沈殿法、超遠心法、免疫沈降法の各種を試みた。またエクソソーム画分としての査定は、メイワフォーシス株式会社様における「qNano ナノ粒子マルチアナライザー」のデモンストレーションとしての協力を得ての、粒径測定をもって行った。さらに LOXL2 の

イムノブロットによる検出とともに、そのリジロキシダーゼ活性を AAT Bioquest 社製 Amplitude™ リシンオキシダーゼ活性アッセイ (蛍光) を用いて確認した。またコペンハーゲン大学 Janine Erler 博士より、LOXL2 shRNA 発現レトロウイルスベクターの供与を受け、SASL1m 細胞における恒常的 LOXL2 ノックダウン垂株を作成した。

## (2) LOXL2 の転移との関連性の検討 (定量的マウス舌がんリンパ節転移モデル)

(1) において作成した SASL1m 恒常的 LOXL2 ノックダウン (KD) 細胞を定量的マウスリンパ節転移モデル系における転移性の測定に供し、LOXL2 の転移性との相関を査定した。

## (3) ヒト舌がん組織における LOXL2 発現亢進の確認と形態学的検討

愛媛大学医学部附属病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科ご受診の、舌がん患者さんの切除組織を供与いただき、抗 LOXL2 抗体を用いた免疫組織化学によってヒト舌がん組織における LOXL2 の発現と、その形態学的検討を行った。

## (4) ヒト頭頸部がん患者血清エクソソーム様画分における LOXL2 局在

健常者として愛媛大学医学部附属病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科のドクター三名と、同科ご受診の舌がん患者さん三名の血清を供与いただき、超遠心法によってエクソソーム様画分を調製した。総血清画分、および上清画分との比較において、イムノブロット法にて単位タンパク質量当たりの LOXL2 タンパク質の含量を測定することで、局在を査定した。

## (5) 36 症例のヒト頭頸部がん患者血清における LOXL2 含量の測定 (ELISA 法)

さらに同科ご受診の舌がん患者さん血清を集め、最終的には研究期間内に 36 症例の血清、および 7 例の健常者血清を得た。これらについて ELISA 法 (Cloud-Clone Corp. 社製キット) にて血清 1 ml あたりの LOXL2 重量を測定した。LOXL2 含量と、ステージ分類、および TNM 分類の間に相関が観察されるか否か、統計学的に検定を行った。

## (6) SCC 抗原など他の指標との比較

血液サンプルは SCC 抗原測定にも供し、データを採集した。また喫煙など患者の生活習慣との関連についても検討した。

## (7) SASL1m における NHE1 局在と細胞集団としての pH 分布の検討

既報である、NHE1 が細胞集団の運動性の制御的因子である、ということが、どのようなメカニズムに依っているのか、運動中の細胞集団における NHE1 の局在と細胞集団内における pH の分布の関連を検討した。抗 NHE1 抗体を用いた蛍光免疫細胞化学により運動中の細胞集団における NHE1 の細胞内分布を検討した。細胞内 pH (pHi) の測定には pH 指示色素 pHrodo を用い、Molecular Device 社製 MetaMorph イメージングソフトウェアにて pHrodo をロードした細胞の蛍光写真データを解析した。

上記の検討に加え、以下の探索的検討を行った。

## (8) LOXL2, NHE1 ダブルノックダウン細胞の樹立とそれらによる定量的マウスリンパ節転移モデル系における転移性および生着性の検討

## 4. 研究成果

### (1) LOXL2 タンパク質の細胞下画分局在の検討

LOXL2 mRNA 発現の亢進を観察していた高転移性ヒト舌がん細胞 SASL1m, およびその親株である SAS 細胞の培養上清よりイムノブロット法により LOXL2 タンパク質の検出・確認を試みた。しかしながら上清そのもの、および濃縮画分から有意な LOXL2 タンパク質の検出・確認はなされず (データ非表示)、mRNA 発現とタンパク質への翻訳が相関していない可能性が示唆された。しかしながら、エクソソーム様画分を調製しイムノブロット解析に供したところ、分子量約 92 kDa のシグナルを検出した (図 1)。その含量は SAS と SASL1m の転移性の相違に相関し、SASL1m において高かった。図 1 には、SASL1m 恒常的 LOXL2 ノックダウン (KD) 株 (SASL1m LOXL2 KD) も同時に示しており、ノックダウンによるタンパク質量の減少が確認される。調製したエクソソーム様画分のエクソソームとしての妥当性を、粒径を測定することで査定したところ、ほぼ 100 nm 前後と、エクソソームにお

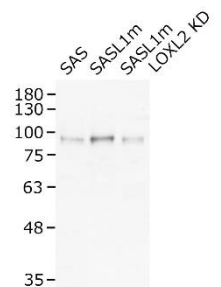


図 1 エクソソーム画分における LOXL2

いてよく観察される粒径の粒子が調製されていることが確認された (図 2)。また得られた LOXL2 シグナルが確かにリジロキシダーゼ活性を呈するか否か測定したところ、LOXL2 シグナル量に相関した活性の多寡が、上清画分からエクソソーム様画分へ 100 倍近く濃縮とともに観察された (図 3)。注意すべきことに、測定時の溶液環境は界面活性剤等非存在下であり、エクソソーム画分を溶解させておらず、したがって検出された活性は、エクソソーム様粒子内に梱包されているのではなく、外側に局在すると考えられる。

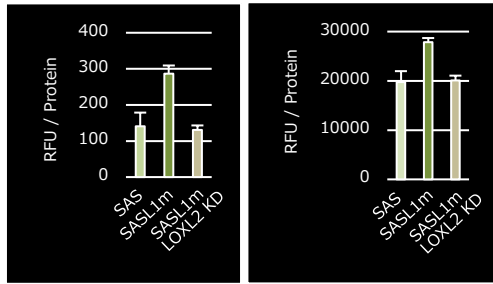


図 3 リジロキシダーゼ活性の測定  
左: 培養上清中の活性、右: エクソソーム様画分中の活性

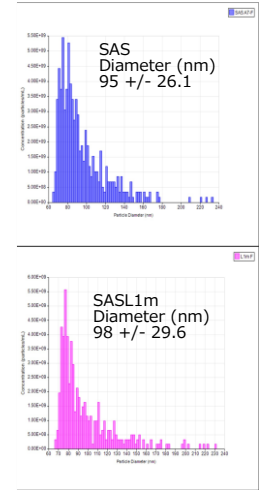


図 2 エクソソーム様画分中の粒子の粒径の測定  
qNano による粒径測定。  
横軸は粒径、縦軸が出現頻度

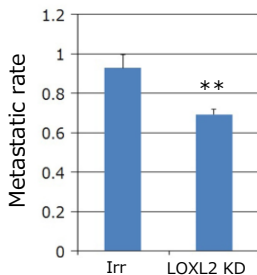


図 4 定量的マウス舌がんリンパ節転移モデルにおける LOXL2 KD の効果の検討 \*: P<0.05

(2) LOXL2 の転移との関連性の検討 (定量的マウス舌がんリンパ節転移モデル)

(1) でしめした恒常的 LOXL2 ノックダウン SAS1m 細胞の転移性を、定量的マウス舌がんリンパ節転移モデルにおいて査定した。転移性の表記は、原発巣と転移巣の組織量、およびサンプル中の宿主であるマウス遺伝子量と移植された細胞由来のヒト遺伝子量の比を取ることで補正して提示している。図 4 に示す通り、LOXL2 ノックダウンにより約 20% の転移性の減弱が観察された。なお恒常的 LOXL2 ノックダウン SAS1m 細胞の培養下における増殖性は親株と同等であることから、LOXL2 発現抑制の効果は、増殖性を介さない転移機構のいずれかの部分、に及んでいることが示唆される (データ非表示)。

(3) ヒト舌がん組織における LOXL2 発現亢進の確認と形態学的検討

これらの結果を踏まえ、実際のヒト頭頸部扁平上皮がんにおける LOXL2 の意義を検討した。ヒト舌がん組織の LOXL2 免疫組織化学解析より、腫瘍細胞における LOXL2 の陽性反応を観察した (図 5)。この反応は原発巣付近とみられる舌表層部よりも、舌内部に深く浸潤した構造において強陽性であり、腫瘍組織内においてもより悪性の、いざ転移に臨んでいると思しき細胞・組織においてより機能している可能性が示唆される (図 5、矢印)。また染色像の形態を仔細に検討すると顆粒様の構造が認められ、このことも LOXL2 がエクソソーム画分に局在することを支持する。

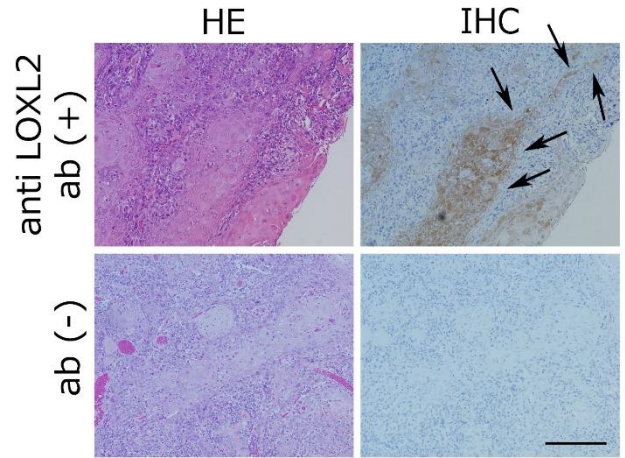


図 5 ヒト舌がん組織における LOXL2 分布  
HE: ヘマトキシリンエオジン染色、IHC: 免疫組織化学染色  
矢印: 舌内部への浸潤部分、Scale Bar: 200 μm

(4) ヒト頭頸部がん患者血清エクソソーム様画分における LOXL2 局在

さらにヒト頭頸部扁平上皮がんにおける LOXL2 の意義を追求した。LOXL2 が可溶性であってもエクソソーム局在性であっても、血清中に放出されている可能性は高いため、患者血清 (3 名分)、およびそれ由来のエクソソーム様画分における LOXL2 含量を健康者 3 名分と比較した (図 6)。血清画分から約 50 kDa の LOXL2 シグナルが確認されたとともに、そのエクソソーム様画分への局在・強い濃縮が観察され、またその含量は患者において亢進していた (図 6)。

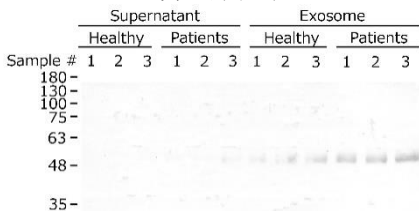


図 6 ヒト血清エクソソーム様画分中の LOXL2

(5) 36 症例のヒト頭頸部がん患者血清における LOXL2 含量の測定 (ELISA 法)

(4) において予備的に検討した傾向が一般化できることなのか否か査定するため。さらに合計 36 人分の頭頸部がん患者血清を採集、血清 LOXL2 含量を測定し、病期との対応を検討した。血清中 LOXL2 含量の平均値は健康者群で  $0.17 \pm 0.24$  ng/ml、患者群で  $1.62 \pm 1.74$  ng/ml と、患者群で 9 倍を超える高値を示した (図 7A)。興味深いことに、病期との対応を見ると、ステージ分類 (図 7C)、TNM 分類 (図 7D) いずれにおいても末期群にお

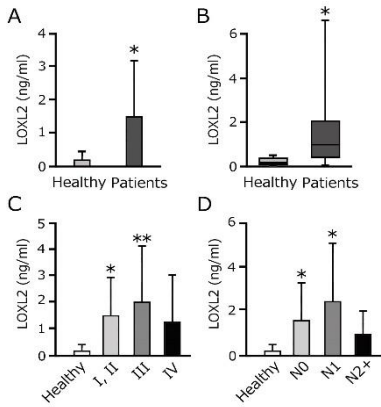


図7 頭頸部扁平上皮がん患者血清中の LOXL2 含量の比較  
A: 平均値, B: 分布, C: ステージ分類, D: TNM 分類, \*: P<0.05

いては健常群との有意な差が観察されず、比較的初期がんの群において有意な高値が観察された。このことは LOXL2 が「これから転移する」という段階において機能し、転移が完成されたのちは重要でない可能性を示しており、前転移期ニッチ形成に寄与する、というわれわれの作業仮説と合致する。

#### (6) SCC 抗原など他の指標との比較

扁平上皮がんマーカーとしては、すでに SCC 抗原が臨床的に利用され、血液中 1.5 ng/ml を以ってカットオフ値とされている。このマーカーとの上記の 36 例中 21 例において SCC 抗原が測定されており、その平均値は  $1.65 \pm 1.74$  ng/ml とカットオフ値を凌駕していた。またステージ III ( $1.29 \pm 1.16$ )、T1 ( $1.50 \pm 0.9$ )、T3+ ( $2.00 \pm 2.71$ )、N0 ( $2.02 \pm 2.51$ )、そして N2+ ( $1.53 \pm 1.29$ ) の各群においてカットオフ値を凌駕していた。

#### (7) SASL1m における NHE1 局在と細胞集団としての pH 分布の検討

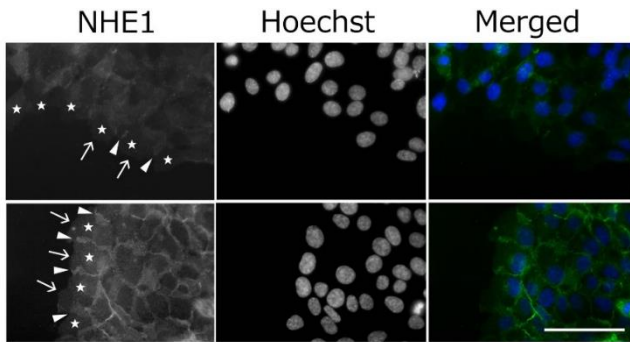


図8 SAS および SASL1m における NHE1 局在  
\*: LC, 矢頭: 細胞 - 細胞間における NHE1 局在, 矢印: 細胞 - 細胞間接着の存在しない辺縁端においては NHE1 局在がほとんど観察されない。Scale Bar: 100  $\mu$ m, NHE1: 抗 NHE1 抗体免疫染色, Hoechst: Hoechst33344 による核染色, Merged: 重ね合わせ画像。

細胞集団の辺縁を形成する細胞は Leading/Leader cell (LC)、内部に分布する細胞は Following/Follower cell (FC) と呼ばれ、細胞集団内における意義が異なると目されている。SAS、SASL1m いずれにおいても LC における細胞内 pH (pHi) が低く、さらには NHE1 含量の高い SASL1m では LC、FC いずれの pHi も SAS より高く、SASL1m において H<sup>+</sup> 排出能力が充進していることが示唆された (図 9)。NHE1 ノックダウン SASL1m においては、LC-FC 間の pHi の差異が消失しており、LC における相対的な pHi の低さに NHE1 が寄与していることが示された (図 8)。NHE1 ノックダウン SASL1m は細胞集団としての運動方向の維持能力が破綻しており (2017 年、既報)、このことと LC における相対的な pHi の低さが相関する可能性が高く、LC-FC 間に pHi の差異が存在することが、細胞集団としての運動方向制御において重要であることが示唆された。

#### (8) LOXL2, NHE1 ダブルノックダウン細胞の樹立とそれらによる定量的マウスリンパ節転移モデル系における転移性および生着性の検討

本研究は LOXL2 と NHE1 を集学的抗 - 転移治療の標的とすることの妥当性を査定することを目的の一つとしている。上記の通りの個々の因子の治療標的としての妥当性を踏まえて、両因子を同時に抑制することの優位性の検討を、期間後期に開始した。両因子を同時に恒常的にノックダウンした SASL1m 細胞の樹立に成功し、定量的マウスリンパ節転移モデル系にかけた。これまでのところ、従前にみられなかった原発巣形成の不全を観察している (データ採取中)。このことはダブルノックダウン細胞の組織生着性の低さを示していると考えられ、ひいてはそのような細胞では転移性も従前になく減弱している可能性がある。現在継続してその精査を行っており、早期の論文報告を目指している。

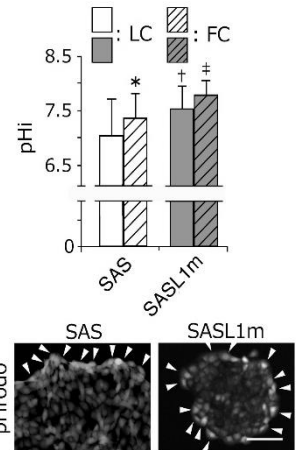


図9 SAS, SASL1m 細胞集団における pH 分布  
上段: LC, FC における pHi, 下段: 代表的な pHrodo による pHi 指示像, Scale Bar: 100  $\mu$ m

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sanada T, Islam A, Kaminota T, Kirino Y, Tanimoto R, Yoshimitsu H, Yano H, Mizuno Y, Okada M, Mitani S, Ugumori T, Tanaka J, Hato N.	4. 巻 Jan 20
2. 論文標題 Elevated Exosomal Lysyl Oxidase Like 2 Is a Potential Biomarker for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Laryngoscope	6. 最初と最後の頁 1 - 8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/lary.28142	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yano H, Islam A, Kaminota T, Tanimoto R, Hato N and Tanaka J
2. 発表標題 Roles of lysyl oxidase like 2 (LOXL2) in exosomal fraction on lymph node metastasis of head and neck squamous cell carcinoma
3. 学会等名 Annual meeting of INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXTRACELLULAR VESICLES（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野 元、谷本 玲奈、吉光 華、真田 朋昌、上田 哲平、羽藤 直人、田中 潤也
2. 発表標題 頭頸部扁平上皮がんのリンパ節転移における LOXL2 のエクソソーム画分への局在の意義
3. 学会等名 第71回日本生理学会中四国地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yano H, Islam A, Tanimoto R, Kaminota T, Hato N and Tanaka J.
2. 発表標題 Roles of LOXL2 in exosomal fraction on lymph node metastasis of head and neck squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会（誌上開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢野 元、谷本 玲奈、真田 朋昌、上田 哲平、羽藤 直人、田中 潤也
2. 発表標題 頭頸部扁平上皮がんのリンパ節転移における LOXL2 のエクソソームへの局在の意義
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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