

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09771

研究課題名(和文) 高悪性口腔癌が分泌するエクソソームによる腫瘍微小環境制御機構の解明と治療応用

研究課題名(英文) Elucidation and therapeutic application of tumor microenvironmental control mechanism by exosomes secreted by high-grade oral cancer

研究代表者

吉田 遼司 (Yoshida, Ryoji)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授

研究者番号：10632458

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)：高悪性口腔がん、特に口腔扁平上皮癌(OSCC)細胞の放射線耐性に着目して研究を行った。OSCC細胞株であるSASから樹立された放射線抵抗性OSCC細胞株(SAS-R)が分泌するエクソソームは、内包するmiR-503-3pによるBAK制御とアポトーシス抑制を介して、SASやHSC2の放射線感受性を低下させることが明らかとなった。また、患者血清を用いた解析の結果、血中miR-503-3pの発現は化学放射線療法の病理学的治療効果ならびに患者予後と相関することが明らかとなった、本研究から、エクソソームを介した放射線耐性獲得メカニズムの一端が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線抵抗性は口腔がんの治療上、問題となるがん細胞の特性の一つである。本研究では放射線耐性口腔がん細胞がどのように周囲細胞に放射線抵抗性を与えるかを実験的に解析した。本研究から、放射線耐性口腔がん細胞はエクソソーム内に含まれるマイクロRNA(miR-503-3p)を介して放射線によって惹起される細胞死を抑制していることが解明された。また、血中miR-503-3pが放射線治療効果や口腔がんの予後と相関していることが明らかとなった。本研究成果は、新たな口腔がんの放射線耐性獲得機構の存在を示唆するものであり、将来の新規診断・治療法につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The present study focused on radiation resistance of high-grade oral cancer, especially oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells. The exosomes secreted by the radiation-resistant OSCC cell line (SAS-R) established from the OSCC cell line SAS confer radioresistant phenotype on SAS and HSC2 through BAK regulation by the contained miR-503-3p and apoptosis suppression. In addition, as a result of analysis using patient's serum, it was clarified that the expression of miR-503-3p in blood correlates with the pathological response to chemoradiotherapy and the patient prognosis. The mechanism of radiation resistance acquisition was clarified

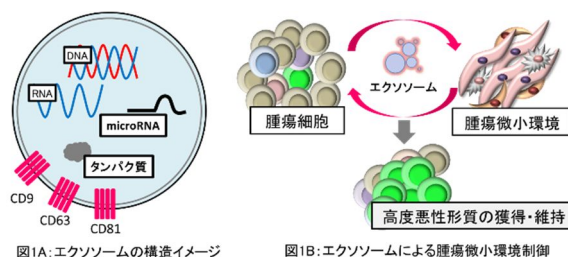
研究分野：口腔がん

キーワード：口腔扁平上皮癌 エクソソーム 治療抵抗性 放射線耐性 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

OSCC は口腔癌の 80%以上を占める悪性腫瘍である。近年、OSCC の診断・治療法の選択肢は広がっているが、その 5 年生存率に大きな改善はみられない (Siegel et al. *CA Cancer J Clin* 2012, Gupta et al. *Int J Cancer* 2009)。その原因として、**高浸潤・転移能や治療抵抗性をもつ高悪性腫瘍細胞が存在**していることが挙げられる (Hanahan & Weinberg. *Cell* 2011)。近年、そのような腫瘍細胞の一部は“**癌幹細胞**”と位置付けられ、OSCC でもその存在が示唆されている (Naik et al. *Oral Oncol* 2016)。一方、**癌幹細胞の悪性形質獲得・維持には腫瘍細胞自身の形質変化だけでなく、腫瘍細胞を取り巻く腫瘍微小環境が重要である**ことが見出され、**腫瘍微小環境の理解が難治性癌克服に不可欠である**ことが明らかとなってきた (Brock et al. *Nat Rev Cancer* 2015)。これらの知見から、**高度悪性形質を有する OSCC の成立・維持に関わる腫瘍微小環境調節の分子メカニズムの解明は OSCC の予後改善に重要であると考えられる。**

近年、がん研究において**エクソソーム**が注目を集めている。エクソソームは細胞から分泌される 100nm 前後の細胞外分泌顆粒であり、核酸やタンパク質を内包している (Valadi et al. *Nat Cell Biol* 2007) (図 1A)。分泌されたエクソソームは内包するタンパク質や miRNA などの核酸を介して標的細胞の形質に大きな影響を与えるが、悪性腫瘍においても**腫瘍細胞から分泌されるエクソソームが腫瘍細胞同士あるいは間質細胞とのクロストークに重要な役割を果たしており** (図 1B) 新たな治療標的や診断ツールとして注目を集めている (Al-Nedawi et al. *Nat Cell Biol* 2008, Tominaga et al. *Nat Commun* 2015)。



しかし、OSCC において**高悪性形質を有する腫瘍細胞におけるエクソソームの発現プロファイル、腫瘍間質細胞に与える影響、OSCC 癌幹細胞の形成・維持に果たす役割について、未だその詳細は不明である。**

2. 研究の目的

上述のような学術的背景と問いを出発点として、本研究では、**OSCC の病態解明および OSCC 癌幹細胞を標的とした新たな診断・治療法の開発を目的として、OSCC の悪性形質獲得におけるエクソソームを中心とした新たな分子ネットワークの解明を行うこととした。**現在、このような観点から癌幹細胞に代表される高悪性 OSCC の病態解明を目指した研究はほとんどない。**研究成果は、既存治療では限界を迎えつつある口腔がん治療に大きなパラダイムシフトをもたらし得ると考えられる。**更に、OSCC の病態解明に寄与するだけでなく、**他癌腫における高悪性腫瘍細胞の制御機構解明にも新たな知見をもたらし、その治療法開発に大きく貢献する**と考えられる。

3. 研究の方法

(1) 放射線耐性 OSCC 由来エクソソームからのエクソソーム抽出と特性評価

エクソソーム研究において、抽出されたエクソソームの特性評価はその後の実験の信頼性の根幹に関わる重要なステップである。そこで本研究では、放射線耐性 OSCC 細胞株：SAS-R および親株である SAS から、エクソソームを抽出しその特性評価を行った。

(2) 放射線耐性 OSCC 由来エクソソームが放射線感受性 OSCC に与える影響の検討

放射線耐性 OSCC から抽出したエクソソームが放射線感受性 OSCC の放射線感受性に与える影響を、*in vitro* において各種アッセイを行って検討した。

(3) 放射線耐性 OSCC 由来エクソソームに特徴的な遺伝子発現プロファイルの解明

前述のように、高悪性腫瘍細胞由来のエクソソームが特徴的タンパク質、miRNA を内包していることが既に報告されている。そこで本研究では、

我々が樹立した放射線耐性 OSCC 細胞株のエクソソームが内包する miRNA の発現プロファイルを網羅的に解析した。

化学放射線療法への治療反応性が違う OSCC 患者から得た血清を用いて血中 miRNA のプロファイルと比較し、と統合することで放射線抵抗性に関わる miRNA を絞り込んだ。

(4) 高悪性 OSCC 由来エクソソームによる放射線耐性獲得メカニズムの解明

エクソソームが隣在腫瘍細胞や間質細胞を標的とし、様々な細胞内シグナルを制御することが報告されている。一方、その結果獲得される形質は細胞のタイプや状況によって大きく異なり、その形質が高悪性 OSCC の病態にどの程度関与しているかは不明である。本研究では、エクソソームによる悪性形質獲得の分子ネットワークについて *in vitro* にて明らかにした。

(5) 放射線耐性獲得に関わる miRNA の臨床的意義についての検討

上記 1-3 にて放射線抵抗性との関連が明らかとなった miRNA (miR-503-3p) の臨床病理学的意義について、進行 OSCC 患者の血清を用いて検討を行った。

4. 研究成果

(1) SAS EVs および SAS-R EVs の特性評価

2018年に国際細胞外小胞学会 (ISEV) によって提案された、細胞外小胞研究の Minimal Information に従って、SAS および SAS-R 細胞から放出された EVs の構造と特性を検証した回収時の細胞数は、SAS 細胞が約 6.7×10^6 、SAS-R 細胞が約 6.1×10^6 であった。回収した両 EVs からエクソソームマーカー (CD9, CD81, ALIX) の発現を確認し、陰性マーカーである calnexin は確認されなかった (図 1A)。また、透過型電子顕微鏡で形態を観察したところ、両 EVs とも円形の構造を示した。大きさは、SAS EVs が 150nm 前後、SAS-R EVs が 120nm 前後であり、SAS EVs の方がややサイズが大きい結果となった (図 1B)。BCA Protein assay で測定した両 EVs のタンパク濃度は、SAS EVs は $56.8 \mu\text{g/ml}$ ($42.1 \sim 79.0 \mu\text{g/ml}$)、SAS-R EVs は $57.1 \mu\text{g/ml}$ ($39.1 \sim 78.4 \mu\text{g/ml}$) であった (図 1C)。さらにナノ粒子追跡分析の結果、SAS EVs は平均直径 $131.9 \pm 1.4 \text{ nm}$ 、 $5.62 \times 10^9 \pm 5.05 \times 10^8 \text{ particle/ml}$ で、SAS-R EVs は平均直径 $128.7 \pm 2.8 \text{ nm}$ 、 $5.43 \times 10^9 \pm 4.05 \times 10^8 \text{ particle/ml}$ であった (図 1D)。以上より、SAS 細胞と SAS-R 細胞からはエクソソームが放出されていることが明らかとなった。また、両細胞から放出されるエクソソームの質量、粒子数、構造に有意な差は認めない結果となった。

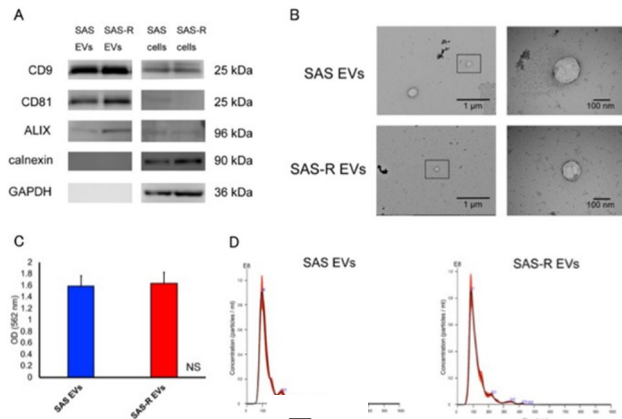


図 1

(2) OSCC 細胞の放射線感受性に EVs が与える影響

EVs が細胞内に取り込まれていることを確認するため、EVs を蛍光標識色素である pkh26 で染色した。蛍光顕微鏡で観察し、両 EVs が SAS 細胞内に取り込まれていることを確認した (図 2A)。

SAS 細胞に取り込まれる SAS EVs および SAS-R EVs の量に、有意な差は認めなかった (図 2B)。

EVs が OSCC 細胞の増殖に影響するかどうか検証するため、SAS 細胞に EVs を投与し細胞増殖を評価した。投与量を変更しても細胞増殖に有意差は認めず、両 EVs とも細胞増殖には影響を与えない結果となった (図 2C)。

方、HDS assay を用いて EVs 投与後の放射線感受性を評価したところ、SAS-R EVs 投与後の SAS 細胞は、未処理の SAS 細胞や SAS EVs 投与後の SAS 細胞と比較して、有意に放射線抵抗性が上昇した (図 2D)。また、放射線照射後の SAS 細胞を接続式細胞共培養容器 (NICO-1) を用いて、SAS 細胞と SAS-R 細胞とそれぞれ共培養したところ、SAS-R 細胞と共培養した SAS 細胞はより多くのコロニーを形成した (図 2E)。共培養中に EVs が中央のフィルターを通過しもう一方の培養器に移動していることを確認するため、Exosome Cyto-tracer を EVs に導入した。蛍光顕微鏡でそれぞれの EVs が中央のフィルターを通過しもう一方の培養器の SAS 細胞に取り込まれていることを確認した (図 2F)。

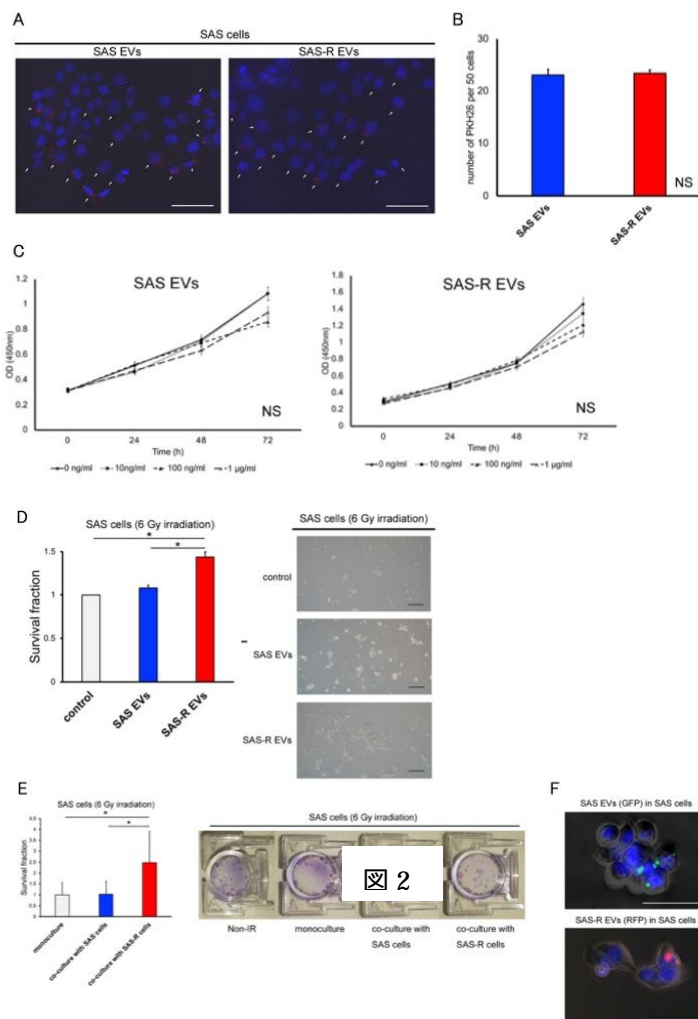


図 2

以上の結果、SAS-R 細胞から放出される EVs は、周囲の細胞に放射線抵抗性を賦与することが

示された。

(3) 口腔癌の放射線抵抗性に関わる miRNA の探索

口腔癌の放射線耐性に関与する miRNA の同定のため、患者血清サンプルのマイクロアレイ解析を行った。解析の結果、治療奏功群と比較して治療不応群に有意に発現上昇を認めた miRNA は 42 個であった。同様の解析を、SAS EVs および SAS-R EVs 間でも行った。SAS EVs と比較して SAS-R EVs で発現上昇を認めた miRNA は 142 個であった。治療不応群の血清サンプルと SAS-R EVs の結果を比較検証したところ、両者で共通して発現上昇を認めた miRNA を 3 つピックアップした (miR-296-5p, miR-503-3p, miR-6748-3p) (図 3A)。3 つの miRNA の発現比を表 8 に示す。ピックアップした miRNA の SAS 細胞および SAS-R 細胞内における発現を検証したところ、miR-503-3p および miR-6748-3p は SAS-R 細胞での発現上昇を認めた。一方、miR-296-5p は SAS 細胞内での発現が上昇していた。同様の検証を EVs でも行ったところ、3 つの miRNA は SAS EVs よりも SAS-R EVs での発現が多い結果となった (図 3B)。ピックアップした miRNA を SAS 細胞に導入し、放射線感受性を検証した。miR-503-3p を導入した SAS 細胞は、Negative control や他の miRNA を導入した SAS 細胞よりも、有意に放射線抵抗性が上昇していた (図 3C)。

以上の結果より、口腔癌の放射線抵抗性に関わる miRNA として、miR-503-3p に着目した。

miRNA	ratio	
	serum	cell-EVs
	CCRT non responder vs CCRT responder	SAS-R EVs vs SAS EVs
hsa-miR-296-5p	1.52	1.1
hsa-miR-503-3p	1.43	25.55
hsa-miR-6748-3p	1.24	2.69

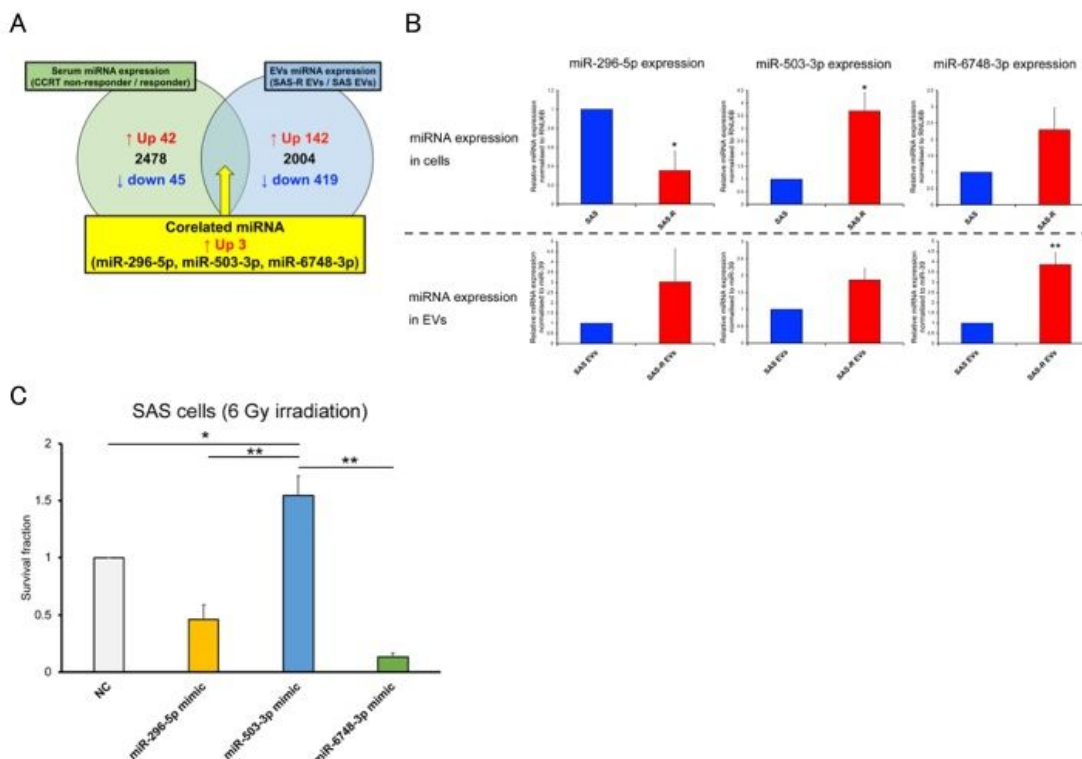


図 3

(4) SAS-R EVs および miR-503-3p がア

ポトーシス関連遺伝子に与える影響

miR-503-3p の標的遺伝子の探索のため、生体情報アルゴリズム (TargetScanHuman、miRDB) を用いてミトコンドリアアポトーシス経路に關与する遺伝子を検索し、候補遺伝子として BAK を発見した。Luciferase assay の結果、miR-503-3p は、BAK-3'UTR レポーター遺伝子の相対的な luciferase 活性を低下させた (図 4A)。

OSCC 細胞における放射線照射後の BAK の影響を検証したところ、放射線照射後の SAS 細胞は BAK の発現が増加していた (図 4B)。一方で、miR-503-3p 導入後および SAS-R EV 投与後 SAS 細胞は、放射線照射後に BAK 発現が減少していた。さらに、cytochrome C の放出が減少し、Apaf-1、caspase 9、caspase 3、および cleaved caspase3 の下流発現が減少した (図 4C、D)。

以上の結果より、SAS-R EVs および miR-503-3p は放射線照射後の BAK の発現を抑制することで、アポトーシス経路を阻害していることが明らかとなった。

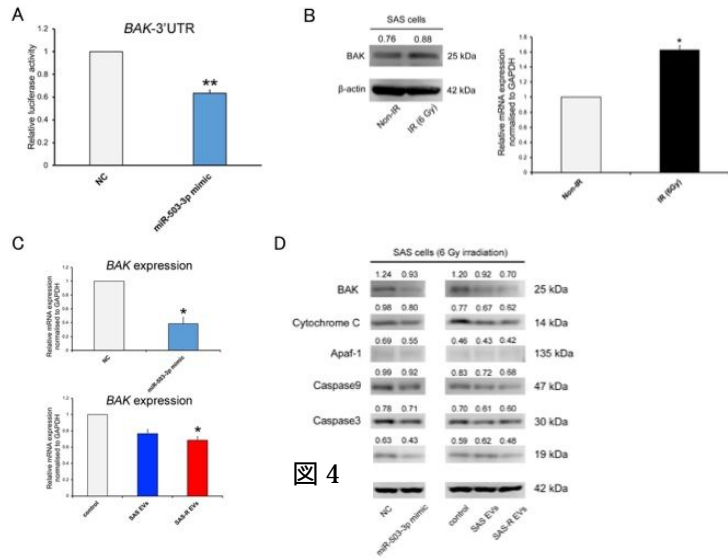


図 4

(5) 血中 EVs における miR-503-3p 発現の臨床的意義の検討

術前化学放射線療法を施行された OSCC 患者 55 例の血清サンプルから EVs を抽出し、miR-503-3p の発現を評価した。miR-503-3p の発現値の中央値で、miR-503-3p High 群と miR-503-3p Low 群とに 2 分した。結果として、miR-503-3p High 群は、術前化学放射線療法の治療効果不良症例 ($P = 0.003$) で、有意差を持って多い結果となった。年齢、性別、原発腫瘍部位、T ステージなどの他の項目では miR-503-3p の発現に統計学的有意差は認めなかった。

一方、Circulating miR-503-3p 発現と生存期間との間の関連を検討するため、術前化学放射線療法を施行された OSCC 患者 55 例の 5 年 OS と 5 年 DFS の Kaplan-Meier 生存曲線を log-rank 検定にて解析した。単変量解析と同様に患者群を 2 群に分け検討した。miR-503-3p High 群では miR-503-3p Low 群と比較して OS、DFS 共に予後が悪化しており、両群間に有意差を認めた ($P = 0.027$, $P = 0.026$ 図 5)。

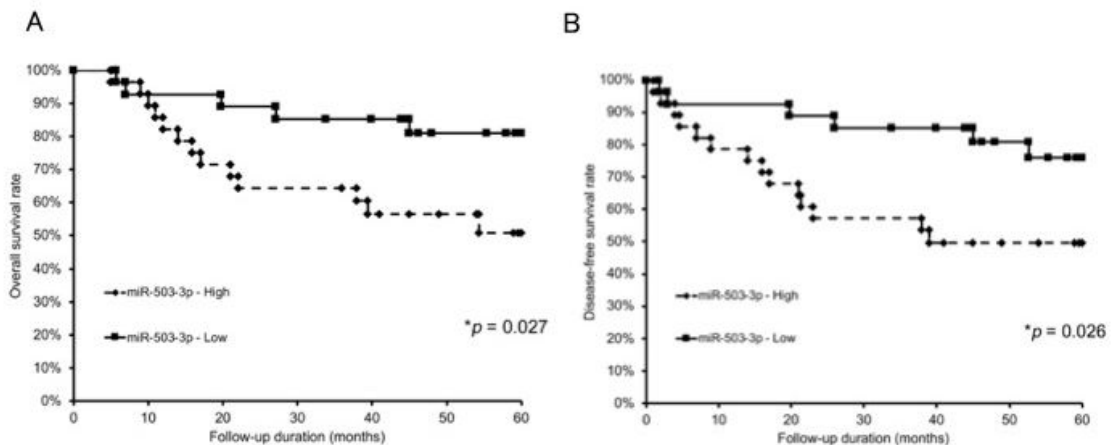


図 5

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 1件）

1. 著者名 Nakashima H, Yoshida R, Hirose A, Kawahara K, Sakata J, Arita H, Yamamoto T, Toya R, Murakami R, Hiraki A, Shinohara M, Ito T, Kuwahara Y, Nakayama H	4. 巻 41
2. 論文標題 Circulating miRNA-1290 as a potential biomarker for response to chemoradiotherapy and prognosis of patients with advanced oral squamous cell carcinoma: A single-center retrospective study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tumor Biology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1010428319826853.	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山名啓介、吉田遼司、中嶋光、有田英生、松岡祐一郎、郷原俊輔、川口翔、永尾優果平、中山秀樹
2. 発表標題 24. 口腔扁平上皮癌の放射線抵抗性におけるエクソソームを介した細胞間相互作用についての検討
3. 学会等名 第43回 日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keisuke Yamana, Ryoji Yoshida, Hikaru Nakashima, Yuichiro Matsuoka, Hidetaka Arita, Junki Sakata, Sho Kawaguchi, Shunsuke Gohara, Yuka Nagao, Kenta Kawahara, Akiyuki Hirose, Hideki Nakayama
2. 発表標題 Exosomes from radioresistant cells enhances radioresistance phenotype in oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keisuke Yamana, Ryoji Yoshida, Hikaru Nakashima, Yuichiro Matsuoka, Hidetaka Arita, Junki Sakata, Hideki Nakayama
2. 発表標題 Elucidation of radioresistance in oral squamous cell carcinoma via radioresistant cell-derived exosomes
3. 学会等名 第64回 公益社団法人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 中嶋光、吉田遼司、廣末晃之、松岡祐一郎、川原健太、有田英生、坂田純基、川口翔、郷原俊輔、山名啓介、中山秀樹
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるがん微小環境と放射線耐性に関する検討
3. 学会等名 第42回 日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田遼司、川原健太、中嶋光、坂田純基、有田英生、永田将士、田中拓也、廣末晃之、福間大喜、尾木秀直、平木昭光、篠原正徳、中山秀樹
2. 発表標題 口腔がんにおけるmicroRNAを介した悪性形質制御
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

〔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
---------	---------