

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23880

研究課題名(和文) CD63をターゲットとした食道扁平上皮癌に対する新規治療法の探索

研究課題名(英文) Development of new treatments for esophageal squamous cell carcinoma targeting CD63

研究代表者

松本 泰典 (Matsumoto, Yasunori)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80738831

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)：食道扁平上皮癌におけるCD63蛋白および細胞外小胞エクソソームの解析を行なった。CD63蛋白の癌組織における発現と臨床病理学的因子との解析を行なったが、生存や再発に関して明らかな関連を認めなかった。また、癌細胞におけるCD63とエクソソーム放出能との間にも明らかな相関を認めなかった。食道扁平上皮癌細胞が高濃度のエクソソーム存在下でどのような変化をもたらすかについて検討したところ、細胞の増殖は抑えられる一方で細胞の遊走は上昇する結果であり、癌の進展に影響を与えるものと考えられた。この結果は論文報告として発表した。(Matsumoto et al. Cancer Sci. 2020)

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソソームは癌細胞を含めた各種細胞から放出され、癌の進展に関与するとされる。今回の検討で、食道扁平上皮癌の細胞株が自身から放出されるエクソソームを高濃度に添加された際に、増殖の抑制と遊走の上昇という表現系と遺伝子発現変化を起こすことを解明した。また蛍光イメージングを用いることによりエクソソームが癌細胞に取り込まれることも示した。このことは、癌進展のメカニズム解明の一助となるとともに、エクソソームの阻害や治療薬の担体としての利用を含めた新規治療の開発の可能性を示唆し、難治性のがんである食道扁平上皮癌の克服に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed CD63 protein and extracellular vesicle exosomes in esophageal squamous cell carcinoma. The expression of CD63 protein in esophageal cancer tissues were analyzed with clinicopathological factors, but no clear association was clarified with survival or recurrence. In addition, no clear correlation was found between CD63 and exosome-releasing ability in cancer cells. Examination of how esophageal squamous cell carcinoma cells undergo in the presence of high concentrations of exosomes results in suppressed cell proliferation while increased cell migration, affecting cancer progression. This result was published as a treatise report. (Matsumoto et al. Cancer Sci. 2020)

研究分野：消化器外科学

キーワード：CD63 エクソソーム 食道扁平上皮癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食道扁平上皮癌は予後不良な癌腫の1つである。早期からリンパ節転移や周囲臓器浸潤をきたすこと、有効な化学療法が少なく標準治療として行われうる分子標的薬が存在しないこと、などがその要因とされ、浸潤転移の制御や分子標的薬等新規薬剤の開発が課題である。

近年、癌の進展にエクソソームが関与することが諸家により報告されており、当研究室においても食道扁平上皮癌におけるエクソソーム中 microRNA の、バイオマーカーとしての有用性に関する報告(Takeshita et al. British Journal of Cancer, 108(3):644-52, 2013)や、食道扁平上皮癌における血漿中エクソソーム定量の予後因子としての有用性(Matsumoto et al. Oncol Rep. 36(5):2535-2543, 2016)の報告を行っている。テトラスパニン CD63 は膜4回貫通型のタンパク質であり、エクソソームの特異的マーカーとして有名であるが、“エクソソームマーカー”の役割として注目されることがほとんどであり、CD63 そのものの機能解析や臨床病理学的検討の報告は少数に限られる。癌における CD63 の機能解析としては、EMT に関し転移前段階を示唆するという報告(Seubert B et al. Int J cancer 15;136(10):2304-15, 2015)、膀胱癌や白血病では TIMP- と結合し癌進展に関与するという報告 (Grünwald B et al. Gastroenterology. 151(5):1011-1024, 2016, Forte D et al. Oncotarget. 10;8(2):2261-2274, 2017)が散見されるが、食道扁平上皮癌に関する解析はほとんどなされていない。

2. 研究の目的

上記の背景より、CD63 が癌進展に影響を与えるという仮説を立て、食道扁平上皮癌における治療ターゲットとなる可能性を模索する着想を得た。本研究は、“食道扁平上皮癌における CD63 の発現解析”、“CD63 とエクソソーム放出能との関連”、“癌細胞由来エクソソームによる癌細胞自体の変化に関する解析”から食道扁平上皮癌に対する新規診断治療の知見を得ることを目的に設定した。

3. 研究の方法

(1)食道扁平上皮癌切除標本における CD63 発現の解析

当院における食道扁平上皮癌切除標本を用い、免疫組織染色による CD63 発現評価と、病期や予後、化学療法感受性や抵抗性など臨床病理学的な特性につき評価を行う。

(2)食道扁平上皮癌細胞株における CD63 発現・機能解析

CD63 の食道扁平上皮癌細胞株における発現の検討、および CD63 高発現株である TE2, TE15 をターゲットとした siRNA による CD63 の knock down を行う。マイクロアレイおよび GSEA 解析により CD63 knock down による遺伝子発現変化を解析する。

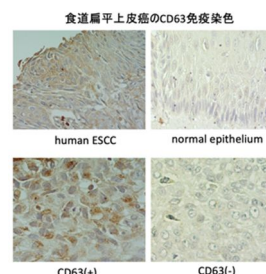
(3)癌由来エクソソーム添加による食道扁平上皮癌細胞株の変化の解析

食道扁平上皮癌細胞株の培養上清から超遠心法を用いて抽出したエクソソームを 10 µg/mL の濃度で添加した際における表現系の変化を proliferation assay, wound healing assay を用いて行う。また細胞周期の評価を FUCCI(Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) 発現食道扁平上皮癌細胞株(TE2-FUCCI)の蛍光イメージングにより行う。遺伝子発現の変化として mRNA microarray および GSEA(gene set enrichment analysis)を用いた解析を行う。

4. 研究成果

(1)予備実験として、食道扁平上皮癌術前未治療症例(n=86)の CD63 免疫染色で、CD63 高発現群において予後不良であるという結果を得た。また、in vitro の検討から CD63 の Knock down で HER2 を含めた ERBB 経路が低下する結果を得たため、validation および CD63 と HER2 の関連評価のため新規に 2005-2013 年における食道癌切除標本(n=132)を用いて免疫染色及び臨床病理学的因子との統合解析を行なった。

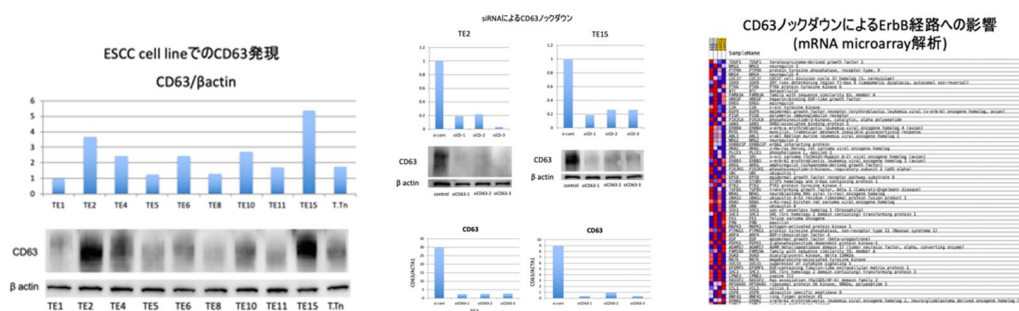
CD63 の発現に関しては、壁進達度(P=0.77)、リンパ節転移の有無(P=0.47)、分化度(P=0.62)との相関は認められず、今回の検討では OS(P=0.48, Log-rank test)、DSS(P=0.98, Log-rank test)とも有意差を認めなかった。また、CD63 と HER2 の免疫染色態度に関しても相関を認めなかった(P=0.53)。



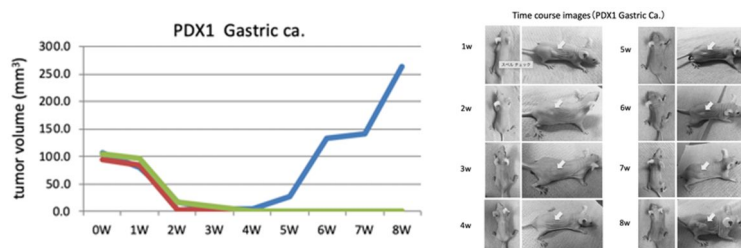
本検討においては腫瘍細胞自体の染色態度を検討したが、今後腫瘍間質の染色態度と臨床病 理的因子との解析もすすめていく予定である。

(2)CD63 の食道扁平上皮癌細胞株における発現検討のため、食道扁平上皮癌細胞株 10 種のウエスタンプロットを行い、TE2,TE15 を CD63 高発現株として同定した。

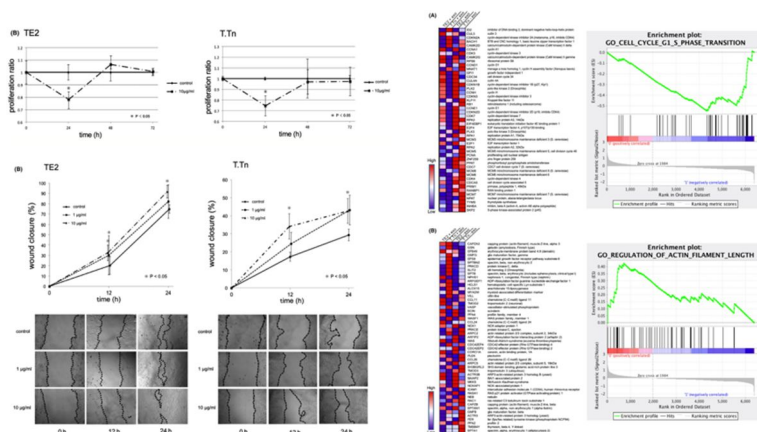
siRNA を用いて CD63 の knockdown を行い、蛋白・mRNA の低下を確認した。Knockdown により起こる遺伝子発現変化を mRNA microarray および GSEA 解析で評価し、ERBB 経路の低下という結果を得た。この結果を元に前述の切除標本における HER2 との関連の評価、および後述の HER2 陽性上部消化管癌に対する患者組織由来マウスモデル(Patient derived xenograft;PDX)を行なった。



HER2 陽性上部消化管癌に対する PDX 作成を行なった。HER2 陽性腫瘍に関しては 3 症例の生着を得て、1 例に関しては継代および凍結融解が可能であることを確認し、HER2 阻害薬を含めた治療介入により HER2 に起こる変化につき解析を開始した。



(3)食道扁平上皮癌由来エクソソームの高濃度存在下で起こる癌細胞の変化については、癌細胞の増殖能低下、遊走能上昇、細胞周期の抑制という表現系および遺伝子 発現変化をきたすことを確認し、この成果はオープンアクセスによる論文発表(Cancer Science 2020 Dec;111(12):4348-4358.)となった。



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 Matsumoto Yasunori, Kano Masayuki, Murakami Kentaro, Toyozumi Takeshi, Suito Hiroshi, Takahashi Masahiko, Sekino Nobufumi, Shiraishi Tadashi, Kamata Toshiki, Ryuzaki Takahiro, Hirasawa Soichiro, Kinoshita Kazuya, Matsubara Hisahiro	4. 巻 111
2. 論文標題 Tumor derived exosomes influence the cell cycle and cell migration of human esophageal cancer cell lines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4348 ~ 4358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14660	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松本 泰典, 加野 将之, 坂田 治人, 村上 健太郎, 遠藤 悟史, 豊住 武司, 岡田 晃一郎, 横山 将也, 白石 匡, 鎌田 敏希, 龍崎 貴寛, 平澤 壮一郎, 木下 和也, 松原 久裕
2. 発表標題 癌由来エクソソームとCD63をターゲットとした食道扁平上皮癌新規治療法の探求
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木下 和也, 松本 泰典, 加野 将之, 村上 健太郎, 坂田 治人, 遠藤 悟史, 豊住 武司, 横山 将也, 岡田 晃一郎, 白石 匡, 鎌田 敏希, 龍崎 貴寛, 平澤 壮一郎, 松原 久裕
2. 発表標題 in vitroでの胃癌細胞由来エクソソームが癌細胞に及ぼす影響について
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木下 和也(千葉大学 先端応用外科学), 松本 泰典, 加野 将之, 村上 健太郎, 坂田 治人, 遠藤 悟史, 豊住 武司, 岡田 晃一郎, 鎌田 敏希, 龍崎 貴寛, 平澤 壮一郎, 佐々木 拓馬, 松原 久裕
2. 発表標題 胃癌腹膜播種とエクソソームの関係性について
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 Yasunori Matsumoto, Masayuki Kano, Kentaro Murakami, Satoshi Endo, Takeshi Toyozumi, Tadashi Shiraishi, Toshiki Kamata, Takahiro Ryuzaki, Kazuya Kinoshita, Soichiro Hirasawa, Hisahiro Matsubara.
2. 発表標題 Clinical significance of tetraspanin CD63 in human ESCC
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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