

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10135

研究課題名（和文）口腔扁平上皮癌のエクソソームを介した腫瘍進展機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of tumor progression via exosome in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

加藤 広禄 (Kato, Koroku)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：30444201

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：口腔扁平上皮癌細胞をCAFの培養上清で培養することで、CAFが口腔扁平上皮癌細胞に与える影響を検討した。その結果、口腔扁平上皮癌細胞が紡錘体様に形態変化し、口腔扁平上皮癌細胞の増殖や浸潤、遊走に影響を与えることが確認できた。口腔扁平上皮癌細胞から放出されるsmall Extracellular Vesicle(sEV) のフローサイトメトリー分析において、抗体を効果的に洗浄するためにSEC法やTIM4アフィニティー法などの高純度のsEV精製法の使用が必要であることがわかった。また、細胞性PD-L1の発現レベルとPD-L1陽性sEVの検出率の間に相関関係がないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔扁平上皮癌においても、間質にあるCAFとの相互作用が癌の進展に重要な役割を果たしていることがわかり、これまでの癌細胞を標的とした治療とは異なり、CAFからの情報伝達という新たな治療標的が見つかったことは、今後の新規口腔癌治療開発に役立つ研究である。また、口腔扁平上皮癌細胞から放出されているsEVにおいて、PD-L1が限られたsEV集団で発現していることは、PD-L1が限られたsEV生合成経路を介して生成されていることが示唆されており、フローサイトメトリーを用いた単一sEV解析は、疾患におけるsEVの機能解明のみならず、sEV関連疾患の診断にも有用であると期待される。

研究成果の概要（英文）：By culturing oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells with the CAF culture supernatant, we examined the effect of CAF on OSCC cells. As a result, it was confirmed that OSCC cells changed spindle-like morphological shapes, which affects the proliferation, invasion and migration of oral squamous cell carcinoma cells. Flow cytometric analysis of small extracellular vesicles (sEVs) released from OSCC cells requires the use of highly pure sEV purification methods such as SEC and TIM4 affinity methods to effectively wash away antibodies. It was also suggested that there was no correlation between the expression level of cellular PD-L1 and the detection rate of PD-L1-positive sEVs.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔扁平上皮癌 線維芽細胞 エクソソーム フローサイトメトリー PD-L1

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

高浸潤口腔扁平上皮癌は易転移能を有し、抗癌剤に低感受性であるため、臨床において制御困難となる症例が多く、医療が進歩した現在もお治療は困難を極める。そのため予後向上のための新しい治療に結びつく分子生物学的機序の解明は重要課題である。そこで近年、癌細胞とその周囲にある癌関連線維芽細胞 (CAF) との相互作用が、癌細胞の生存や癌の進展に深く関わっていることが明らかとなり、その細胞間コミュニケーション媒体として細胞外小胞 (EVs) が注目されている。その中でもエクソソームには情報伝達媒体が含有されており、癌細胞ならびに CAF はそれらを互いに分泌し合うことにより、癌の進展に影響を与えていると考えられている。

これまでの抗癌剤治療は癌細胞を治療ターゲットとして行われてきたが、抗癌剤の低感受性や耐性化といった癌細胞の性質変化が癌の制御を阻んできた。これはおそらく抗癌剤低感受性である癌幹細胞が関わっていることが考えられるが、癌細胞ならびに CAF 由来のエクソソームも大きく関わっていると考えられる。乳がんにおいて、癌細胞が分泌するエクソソーム内にある lncRNA-SNHG14 がトラスツズマブの治療抵抗性に関わっているとの報告があり (Dong H, et al: Int J Oncol. 53:1013-1026, 2018) また、大腸癌においては CAF が分泌したエクソソーム内の H19 が癌細胞の幹細胞性や化学療法抵抗性を制御しているとの報告している (Ren J, et al: Theranostics. 8:3932-3948, 2018.)。そのため近年、癌細胞のエクソソーム分泌を阻害することで、癌の制御を試みる研究が行われているが、未だ解明すべき点が多い。

### 2. 研究の目的

本研究では、CAF が分泌するエクソソームを含んだ Extracellular vehicles (EVs) を作用させることでの口腔扁平上皮癌 (OSCC) 細胞の形態学的変化ならびに生物学的変化を検討することを目的とした。また、フローサイトメトリーの測定条件の最適化を行い、口腔扁平上皮癌のシングルエクソソームを解析することによって、微量に存在する疾患関連分子含有エクソソームの検出を試みることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1. CAF 由来 EVs の OSCC 細胞形質転換ならびに腫瘍進展に関する検討

OSCC 由来細胞株であり、癌浸潤様式 (YK 分類) の異なる 3 種類の細胞株 (YK-4D 由来; HOC313、YK-4C 由来; OSC-19、YK-3 由来; OSC-20) ならびに当科にて樹立した CAF を使用した。各細胞株は 10% ウシ胎児血清と 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した最小必要培地 MEM® (Sigma-Aldrich) にて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。CAF 由来 EVs 含有培養上清をそれぞれの OSCC 由来細胞株に作用させて、その形態学的変化を検討した。また、CAF 由来 EVs 含有培養上清を作用させた場合に、各 OSCC 由来細胞株の増殖能や浸潤能、遊走能の変化を proliferation assay や invasion assay、migration assay を用いて検証した。

#### 2. OSCC 細胞由来の疾患関連分子を含んだシングルエクソソーム検出の検討

3 種類の OSCC 由来細胞株を、small EVs (sEVs) を除去した FBS 含有培養上清で培養し、培養上清中に放出されたエクソソームを 4 種類の方法 (超遠心分離法、密度勾配遠心分離法、SEC 法、TIM4 アフィニティー法) で回収し、その回収効率について検討した。また、3 種類の OSCC 由来細胞株と非癌細胞として 293T 細胞が放出する sEV を、TIM4 アフィニティー法にて回収し、その sEV マーカーに対する 3 つの FITC 結合抗体と PE 結合 PD-L1 抗体の混合物で染色することで、疾患関連分子の検出が可能かどうか検討した。

### 4. 研究成果

#### 1. CAF 由来 EVs の OSCC 細胞形質転換ならびに腫瘍進展に関する検討

CAF 由来 EVs 含有培養上清をそれぞれの OSCC 由来細胞株に作用させたところ、HOC313 細胞ではよりスピンドルな形態に、敷石状に増殖する OSC-19 細胞や OSC-20 細胞では、細胞集塊がばらけて、フィロポディアの形成を認め、間葉系細胞に類似した形態を示した。細胞増殖に関しては、HOC313 細胞や OSC-19 細胞において、CAF 由来 EVs 含有培養上清を 24 時間作用させると 1.2~1.5 倍の増殖活性を示した。また、浸潤能、遊走能に関しては、いずれの細胞においても CAF 由来 EVs 含有培養上清を 24 時間作用させることで活性化された。このことから、CAF から OSCC 細胞への EVs を介した情報伝達が、OSCC 細胞の生物学的悪性度に影響を与えていることが示唆された。

#### 2. OSCC 細胞由来の疾患特異的シングルエクソソーム検出の検討

sEV のフローサイトメトリー分析においては、抗体を効果的に洗浄するために、SEC 法や TIM4 アフィニティー法などの高純度の sEV 精製法の使用が必要であることがわかった。

293T 細胞では、細胞性 PD-L1 の発現および PD-L1 陽性の sEV の検出率が低く、同様の結果が OSC-20 細胞でも観察された。一方、IFN- $\gamma$  で刺激された HOC313 細胞は高レベルの細胞性 PD-L1 を発現したものの、PD-L1 陽性 sEV の割合は低かった。さらに、IFN- $\gamma$  で刺激された

OSC-19 細胞は細胞性 PD-L1 を中程度のレベルで発現したが、PD-L1 陽性 sEV の割合は IFN- $\gamma$  刺激に応じて増加した。これらの結果から、細胞性 PD-L1 の発現レベルと PD-L1 陽性 sEV の検出率の間に相関関係がないことが示唆された。さらに、PD-L1 が限られた sEV 集団で発現していることがわかり、これは PD-L1 が限られた sEV 生合成経路を介して選別されている可能性があることを示唆している。フローサイトメトリーを用いた単一 sEV 解析は、疾患における sEV の機能解明のみならず、sEV 関連疾患の診断にも有用であると期待される。

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 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kato K, Miyazawa H, Kobayashi H, Noguchi N, Lambert D, Kawashiri S.	4. 巻 26
2. 論文標題 Caveolin-1 Expression at Metastatic Lymph Nodes Predicts Unfavorable Outcome in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathol Oncol Res	6. 最初と最後の頁 2105-2113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12253-019-00791-1	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 該当する

1. 著者名 Kato A, Kato K, Miyazawa H, Kobayashi H, Noguchi N, Kawashiri S.	4. 巻 26
2. 論文標題 Focal Adhesion Kinase (FAK) Overexpression and Phosphorylation in Oral Squamous Cell Carcinoma and their Clinicopathological Significance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathol Oncol Res.	6. 最初と最後の頁 1659-1667
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12253-019-00732-y	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 -

1. 著者名 Kato K, Miyazawa H, Kawashiri S, Lambert DW.	4. 巻 26
2. 論文標題 Tumour: Fibroblast Interactions Promote Invadopodia-Mediated Migration and Invasion in Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Oncol.	6. 最初と最後の頁 5277440
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2022/5277440.	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤広祿, 宮澤広樹, 小林泰, 小林久乃, 船木勇人, 岸川祥彰, 野口夏代, 大井一浩, 川尻秀一
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌に対する術前S-1単独化学療法の有効性に関する検討
3. 学会等名 第45回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林久乃,加藤広祿,大井一浩,伊藤達郎,川尻秀一
2. 発表標題 悪性黒色腫細胞由来エクソソーム の1粒子解析マーカーの検出ならびに疾患特異的マーカーの検出
3. 学会等名 第57回日本口腔組織培養学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野口夏代, 小林泰, 宮澤真優子, 宮澤広樹, 北原寛子, 大井一浩, 加藤広祿, 中村博幸, 川尻秀一
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌における線維芽細胞増殖阻害の浸潤・転移抑制効果
3. 学会等名 第38回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮澤広樹,加藤広祿,北原寛子,野口夏代,大井一浩,川尻秀一
2. 発表標題 当科における UICC TNM 分類第 8 版改訂に基づいた舌扁平上皮癌症例の臨床的検討
3. 学会等名 第44回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮澤広樹,加藤広祿,北原寛子,野口夏代,大井一浩,川尻秀一
2. 発表標題 当科における UICC TNM 分類第 8 版改訂に基づいた舌扁平上皮癌症例の臨床的検討
3. 学会等名 第65回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岸川祥彰、加藤広禄、船木勇人、宮澤広樹、野口夏代、大井一浩、川尻秀一
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるDynamin-2発現と臨床病理学的因子との関連性についての検討
3. 学会等名 第46回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 船木勇人、加藤広禄、岸川祥彰、宮澤広樹、野口夏代、大井一浩、川尻秀一
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるprox-1発現と臨床病理学的因子との関連性についての検討
3. 学会等名 第46回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤広禄、宮澤広樹、小林泰、小林久乃、岸川祥彰、船木勇人、箱田京介、大井一浩、川尻秀一
2. 発表標題 Invadopodiaの形成とCAFの存在は口腔扁平上皮癌を進展させる
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2022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	川尻 秀一  (Kawashiri Shuichi)  (30291371)	金沢大学・医学系・教授   (13301)	

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