

口腔扁平上皮癌における細胞外小胞体を介した放射線耐性制御機構の解明 —放射線耐性がん克服を目指して—



吉田 遼司
Yoshida Ryoji



山名 啓介
Yamana Keisuke



中山 秀樹
Nakayama Hideki

1 はじめに

口腔扁平上皮癌（Oral squamous cell carcinoma: OSCC）は口腔に発生する悪性腫瘍の90%を占める悪性腫瘍である。多くが舌に発生するが、口底、歯肉等にも発生し、進行すると嚥下、咀嚼、構音等の口腔機能に深刻な機能低下をきたし、死に至る疾患である（図1A）¹⁾。OSCCの治療において放射線治

療は手術に次いで根治性の高い治療法である。しかしながら、放射線治療に抵抗性を示し再発・増悪する症例が存在することが問題となっており、治療成績の改善を阻んでいる（図1B）。このような現象はOSCC細胞の放射線耐性に起因していると考えられている。この放射線耐性獲得メカニズムは多岐にわたり、現在も様々な視点から研究が進んでいる²⁾。

近年、様々な疾患において細胞外小胞（Extracellular

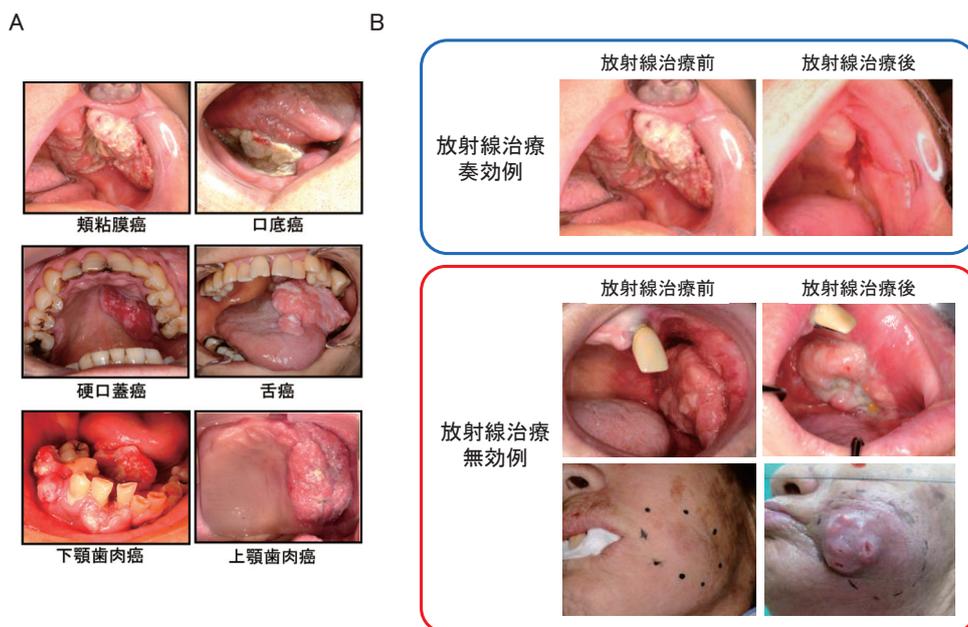


図1 口腔扁平上皮癌細胞の概要

A：典型的な進行口腔扁平上皮癌患者の口腔内写真，B：放射線治療に対する治療効果の違い。上段のように放射線治療に良好な反応を示す症例がある一方で、放射線治療に抵抗性を示し、むしろ増殖するような症例も存在する

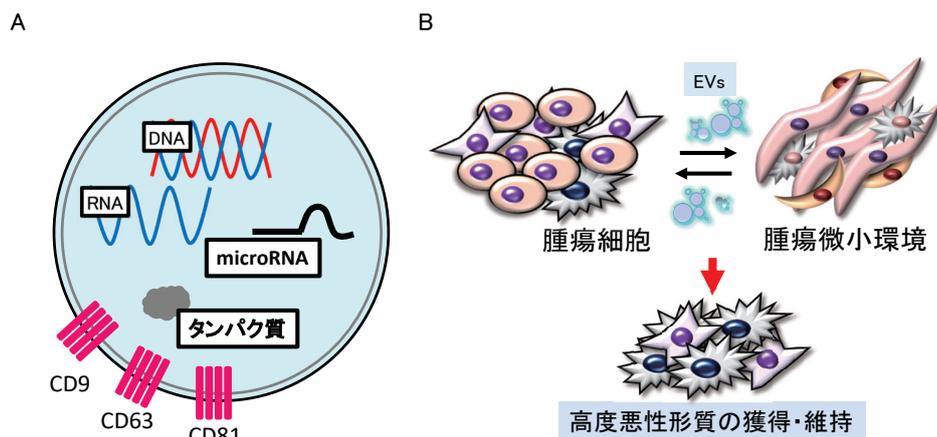


図2 口腔扁平上皮癌細胞から抽出したEVsと放射線抵抗性への影響

A: EVsの構造イメージ。EVsは表面マーカーとしてCD9, CD81, CD63を発現し、様々な分子を内包している
 B: EVsによる高悪性腫瘍の形成のイメージ。腫瘍細胞や腫瘍微小環境を構築する様々な間質細胞からEVsが放出される。放出されたEVsに内包された分子を起点として高度悪性形質が獲得・維持されると考えられている

Vesicles: EVs) が病態形成に関わることが報告されている, EVsは細胞から分泌される100 nm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(図2A)³⁾。分泌されたEVsは内包するタンパク質やマイクロRNA(miRNA)等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EVs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2B), 新たな治療標的や診断ツールとして注目を集めている⁴⁾。他の悪性腫瘍では, EVsが悪性腫瘍の治療抵抗性獲得に関わることが報告されているが⁵⁾, OSCCの放射線耐性とEVsとの関わりについてはほとんど研究されていない。

今回, 筆者らの研究グループは, 世界で初めて放射線耐性OSCC細胞から分泌されたEVsの単離に成功し, それを放射線感受性OSCC細胞に作用させた。その結果, 放射線耐性細胞が, EVsの中に含まれるmiRNAの受け渡しを介してアポトーシス制御を行い, 放射線感受性細胞に放射線耐性を獲得させることを明らかにした⁶⁾。本稿では, 筆者らの研究成果の概要を提示すると共に, EVsを標的とした新規診断・治療法の展望について述べる。

2 放射線耐性口腔がん細胞からのEVs抽出と品質評価

本研究では, 最初に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に従い⁷⁾, OSCC細胞株であるSAS及びSASから樹立した放射線耐性細胞株であるSAS-Rから放出されたEVsの構造と特性を検証した。なお, SAS-Rは日常臨床と同様に2 Gy/日の照射を30日以上(合計60 Gy以上照射)継続した後に樹立された臨床的放射線耐性株(Clinically relevant radioresistant cell line; CRR)であり, 放射線耐性研究における有用な研究リソースである⁸⁾。EVs研究において, ISEVの規定に従ってEVsを評価することは研究の質を担保するために必要不可欠である。また, EVsによって起こる細胞の形質変化がEVsそのものの形状や含有タンパク量に左右されていないことを担保するためにも必要である。まず, 回収した両EVsを透過型電子顕微鏡で形態を観察したところ, 両EVs共直径100 nm程度の円形構造を示した(図3A)。また, EVsであることを証明するための分子マーカーであるCD9, CD81, ALIXの発現が確認され, 陰性マーカーであるcalnexinは確認されなかった(図3B)。EVsの粒度分布をナノ粒子トラッキング解析法にて分析したところ, SAS EVsとSAS-R EVsの粒子数や形状に有意差は無かった(図3C)。以上から, SAS及びSAS-Rから放出されるEVsの構造, 分子マーカー, 粒子数等に大きな差は無いことが明らかとなった。

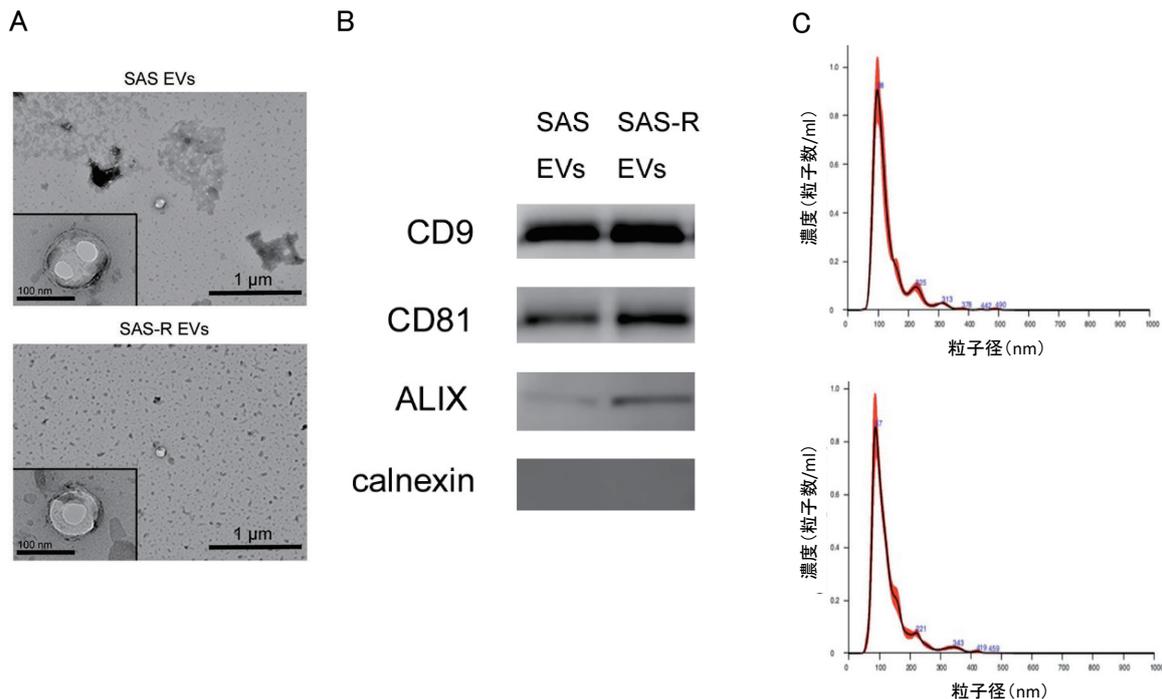


図3 口腔扁平上皮癌細胞から抽出したEVsと放射線抵抗性への影響（文献6）より引用改変

A：放射線感受性細胞（上段）と放射線耐性細胞（下段）から抽出したEVsの電子顕微鏡像。左下の四角内は拡大像，B：ウェスタンブロット法による抽出したEVsの分子マーカーの発現検討。EVs陽性マーカー（CD9, CD81, ALIX）と陰性マーカー（calnexin）によって確認。SAS-EVs：SAS由来EVs, SAS-R EVs：SAS-R由来EVs, C：ナノ粒子トラッキング解析法によるEVsの粒度分布分析。SAS EVs（上段）とSAS-R EVs（下段）

3 放射線耐性 OSCC 細胞由来 EVs が放射線感受性に与える影響

SAS-R 細胞由来のEVsがSAS細胞放射線耐性にどのような影響を与えるかを検討した。各細胞から抽出したEVsを蛍光標識色素であるPKH26で染色してSAS細胞に作用させ、蛍光顕微鏡で観察し、EVsが細胞内に取り込まれていることを確認した。また、その取込み量はSAS EVs, SAS-R EVsほぼ同等であった（図4A）。次に、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、有意に放射線感受性が低下していた（図4B）。この結果は、生体内を模した共培養系を用いた実験でも再現可能であった（図4C）。以上の結果から、SAS-Rは、EVsの授受を介して周囲の放射線感受性OSCC細胞に放射線抵抗性を賦与することが示唆された。

4 口腔がんの放射線耐性に関わるEVs由来miRNAの特定

EVsによる腫瘍細胞の悪性形質の変化には、内包されるmiRNAが関わっていることが報告されている⁹⁾。そこで、OSCC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miRNAマイクロアレイの比較解析を行った。対象は熊本大学病院歯科口腔外科にて化学放射線療法後に外科的切除術を受けた進行OSCC患者のうち¹⁰⁾、術後の病理組織検査で『病理組織学的に完全奏効』と判定された3例と『病理組織学的に無効』と判定された4例とした。各症例の保存血清からmiRNAを含むTotal RNAを抽出し、miRNAマイクロアレイ解析に供した。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。放射線耐性に関わるmiRNAを更に絞り込むために、SAS EVsとSAS-R EVsとの間でもmiRNAマイクロアレイの比較解析を行った。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

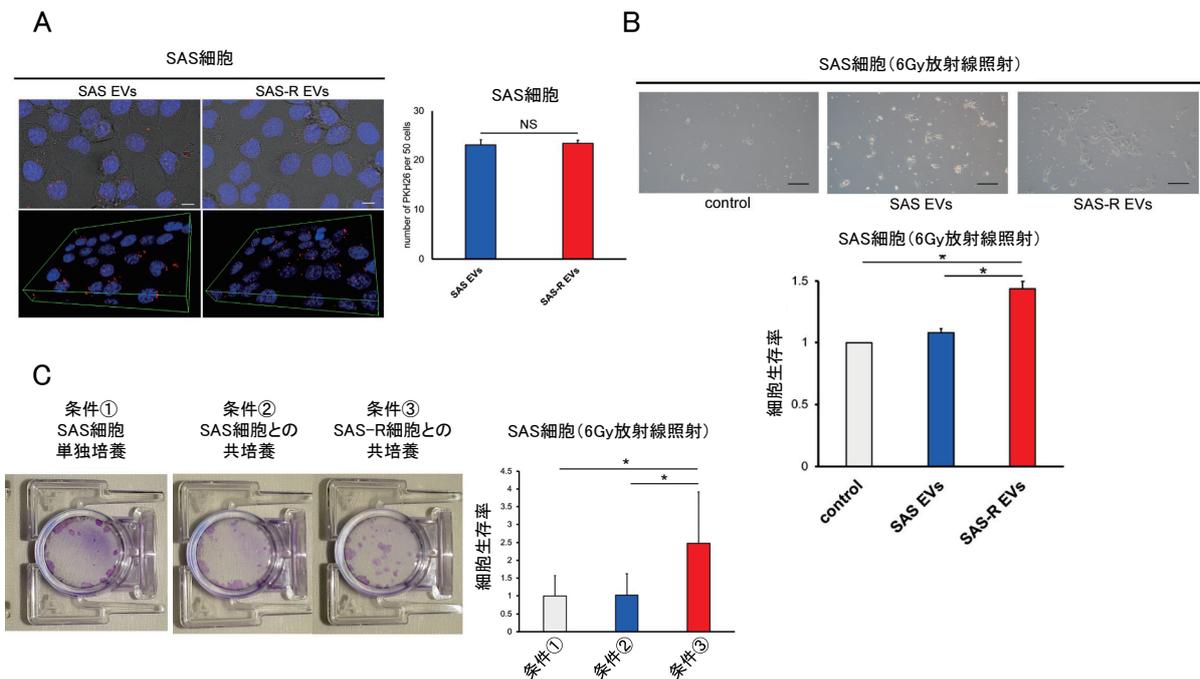


図4 口腔がん細胞から抽出したEVsと放射線抵抗性への影響 (文献6) より引用改変)

A: (左) 放射線感受性細胞に取り込まれたEVsの蛍光顕微鏡画像。SAS細胞(青色)の中に、取り込まれたSAS EVs及びSAS-R EVs(赤色)が取り込まれている。(右) 各細胞由来EVsの細胞内への取込み量のグラフ。NS, 有意差無し, B: (左) SAS EVs及びSAS-R EVsを添加して放射線照射(6 Gy)処理を行った際のSAS細胞の顕微鏡画像(control: 未処理, SAS EVs: SAS由来EVs処理, SAS-R EVs: SAS-R由来EVs処理)。(右) 各処理におけるSAS細胞の細胞生存率のグラフ, C: 共培養システムを用いてSAS細胞をSAS細胞又はSAS-R細胞と共培養し、放射線照射(6 Gy)処理を行った際のコロニー形成アッセイの結果(左)と各処理におけるSAS細胞の細胞生存率のグラフ(右)

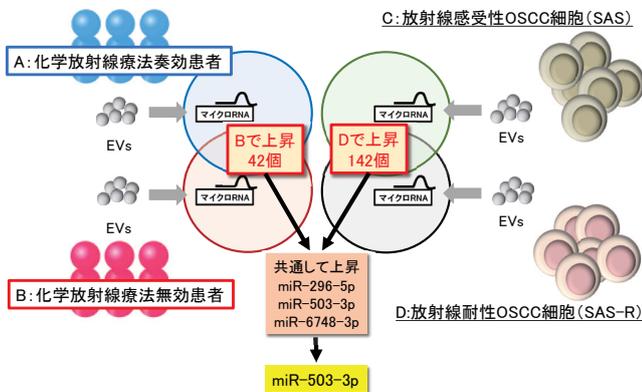


図5 放射線抵抗性に関わるmiRNA探索の概略図

化学放射線療法奏効患者と化学放射線療法無効患者から抽出したEVsに含まれるmiRNAの発現量を比較し、無効患者で上昇していたmiRNAを42個ピックアップした。放射線感受性細胞と放射線耐性細胞から抽出したEVsに含まれるmiRNAの発現量を比較し、142個のmiRNAをピックアップした。双方で発現が上昇していたmiRNA3つを用いて予備実験を行い、最終的にmiR-503-3pを放射線耐性に関わるmiRNAとして同定した

プルとSAS-R EVsの結果を比較検討し、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)。ピックアップしたmiRNAのSAS細胞及びSAS-R細胞

内における発現とSAS細胞に遺伝子導入した際の放射線感受性の変化を検証し(データ未掲載)、放射線抵抗性に関わるmiRNAとして、最終的にmiR-503-3pに着目した(図5)。

5 EVsによるmiR-503-3p/BAK経路を介した放射線耐性制御機構

miR-503-3pの標的遺伝子を、生体情報アルゴリズム(TargetScanHuman, miRDB)を用いて探索した。その結果、ミトコンドリア/アポトーシス経路に関与する遺伝子であるBAKを候補遺伝子として見出した。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、標的遺伝子であることが証明された。また、miR-503-3p導入後及びSAS-R EVs投与後、いずれの条件下でもOSCC細胞において、BAKの発現低下(図6A)とそれに続くアポトーシス細胞数の減少(図6B)、及びアポトーシス関連分子(Cytchrome C, Apaf1, Caspase 9, Cleaved caspase 3)の発現低下が認められた(図6C)。また、この結果は複数のOSCC

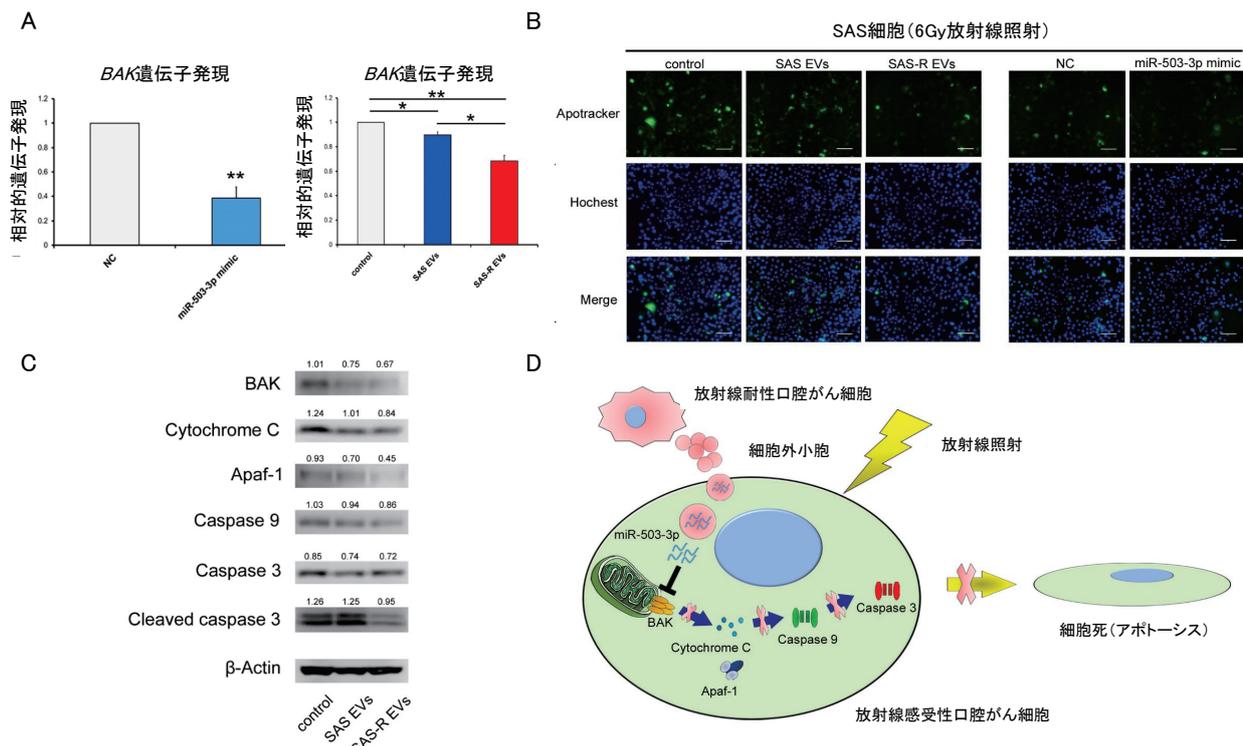


図6 EVsによる放射線耐性制御のメカニズム (文献6) より引用改変)

A: SAS細胞にmiR-503-3pを遺伝子導入、又はSAS EVs, SAS-R EVsを作用させた際のBAK遺伝子の発現変化
 B: SAS細胞にmiR-503-3pを遺伝子導入、又はSAS EVs, SAS-R EVsを作用させた際のアポトーシス細胞数の変化。Apotracker (アポトーシス細胞, 緑), Hoechst (核染色, 青), Merge (合成画像)
 C: SAS細胞にSAS EVs, SAS-R EVsを作用させ、放射線照射 (6 Gy) 処理を行った際のアポトーシス関連分子の発現変化
 D: 放射線耐性口腔がん細胞から分泌されたEVsは放射線感受性細胞に取り込まれ、miR-503-3pを放出する。放出されたmiR-503-3pがアポトーシス促進タンパク質であるBAKを抑制し、アポトーシスを回避し、放射線耐性を獲得する

細胞株において同様に観察された (データ未掲載)。以上より、SAS-R EVsはmiR-503-3pを介してBAK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可能性が示唆された (図6D)。

6 血中miR-503-3pに着目した口腔がん患者の放射線感受性・予後予測

これまでの *in vitro* における研究成果により、miR-503-3pがOSCCの放射線抵抗性に深く関わっていることが明らかとなった。そこで、実際のOSCC患者においても同様の機構が存在する可能性があるか、臨床検体を用いて検討した。熊本大学病院歯科口腔外科で治療を行った進行OSCC患者のうち、術前化学放射線療法を施行したOSCC患者55例の血清サンプルからEVsを抽出し、miR-503-3pの発現を定量した。miR-503-3p発現量を基に患者をmiR-503-3p高発現グループ又は低発現グループ

の2群に分け、臨床病理学的データとの相関を検討した。その結果、miR-503-3p高発現グループでは、術前化学放射線療法の病理学的治療効果が有意に不良であった (図7A)。また、全生存期間において血中miR-503-3p高発現患者では低発現患者と比較して有意に予後不良であることが明らかとなった (図7B)。この結果は、実際のヒト腫瘍においても *in vitro* で見出されたような放射線耐性機構が存在する可能性を示唆していると考えられた。また、血液サンプルにおけるmiR-503-3p発現量が放射線治療を受けるOSCC患者における治療効果予測因子、あるいは予後予測因子となり得ることが示された。近年、複数の悪性腫瘍においてmiRNAによるLiquid biopsyの有用性が報告されているが^{11,12)}、OSCCにおいても同様に、血中miRNAを標的としたバイオマーカー探索が有用である可能性が示唆された。

A

表. 口腔扁平上皮癌患者の血中miR-503-3p発現量と化学放射線療法に対する病理学的治療効果の関係

	合計	miR-503-3p 発現量		p-value
		高発現 n (%)	低発現 n (%)	
病理学的治療効果				
無効	12	8(66.7)	4(33.3)	0.030*
部分奏功	13	6(46.1)	7(53.9)	
完全奏効	30	14(46.7)	16(53.3)	

B

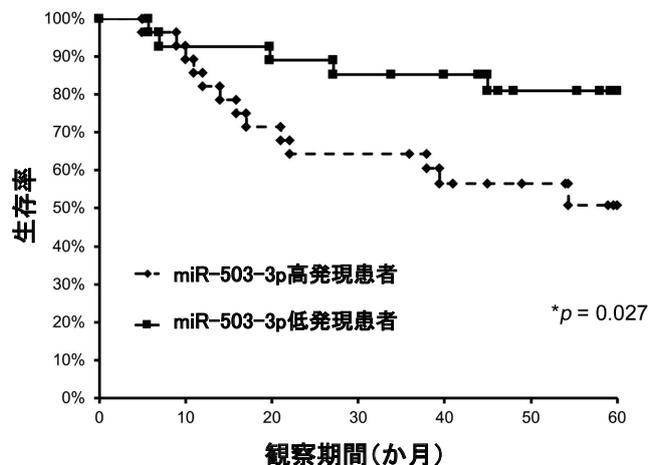


図7 血中 miR-503-3p の発現量と化学放射線治療の治療効果、患者予後との関係 (文献6) より引用改変)

A: 口腔扁平上皮癌患者の血中 miR-503-3p の発現量と放射線治療効果との関係。血中 miR-503-3p の発現量が高い患者では化学放射線療法の病理学的治療効果が乏しい症例の割合が有意に高くなる (赤), B: 口腔扁平上皮癌患者の血中 miR-503-3p の発現量と予後の関係。血中 miR-503-3p の発現量が高い患者では5年生存率が有意に低くなる (破線)

7 今後の展望

本研究において、筆者らは OSCC における EVs を介した新たな放射線耐性メカニズムを明らかにした。また、血中 miRNA のバイオマーカーとしての有用性を示した。一方で、放射線性細胞死には様々なパターンがあり、今回明らかとなったメカニズムはその一端に過ぎないと考えられる。現在、筆者らはアポトーシス以外の放射線性細胞死にも着目して EVs による放射線耐性制御機構の解明を進めている。今後更に研究が発展することで、EVs を標的とした放射線耐性 OSCC への革新的な診断法・治療法の開発につなげていきたい。

本研究は、日本学術振興会「科学研究費助成事業 基盤研究(C)18K09771」等の支援を受けて実施した。

参考文献

1) 日本口腔腫瘍学会「口腔がん診療ガイドライン」改定委員会, 日本口腔外科学会口腔癌診療ガイドライン策定小委員会編, 口腔癌診療ガイドライン

2019年版, 第3版
 2) Yamamoto, VN., et al., *Oral Oncology*, **63**, 44-51 (2016)
 3) Raposo, G., Stoorvogel, W., *Journal of Cell Biology*, **200** (4), 373-383 (2013)
 4) Tominaga, N., et al., *Nature Communications*, **6**, 6716 (2015)
 5) Kulkarni, B., et al., *Drug Discovery Today*, **24**(10), 2058-2067 (2019)
 6) Yamana, K., et al., *Journal of Extracellular Vesicles*, **10**, e12169 (2021)
 7) They, C., et al., *Journal of Extracellular Vesicles*, **7**, 1535750 (2018)
 8) Kuwahara, Y., et al., *Journal of Radiation Research*, **51** (3), 297-302 (2010)
 9) Kosaka, N., et al., *Frontiers in Genetics*, **4**:173 (2013)
 10) Nomura, T., et al., *International Journal of Radiation and Oncology in Biology and Physics*; **76**(5), 1347-1352 (2010)
 11) Joyce, D. P., et al., *International Journal of Cancer*, **139** (7), 1443-1448 (2016)
 12) Pfeffer, S. R., et al., *Journal of Clinical Medicine*, **4**(12), 2012-2027 (2015)

(熊本大学大学院 生命科学部 総合医薬科学部門 感覚・運動医学分野 歯科口腔外科学講座)