

氏名	小野 喜章		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第5929号		
学位授与の日付	平成31年3月25日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	HSP-enriched properties of extracellular vesicles involve survival of metastatic oral cancer cells (細胞外小胞の HSP に富む特性は、転移性口腔癌細胞の生存を担う)		
論文審査委員	久保田 聡 教授	長塚 仁 教授	飯田 征二 教授

学位論文内容の要旨

論文内容の要旨（2000字程度）

【緒言】

口腔扁平上皮癌（OSCC）は頭頸部癌（HNC）の30%を占める癌腫で、早期癌であれば高い生存率が示されているが、進行癌における生存率は大きく低下する。頸部リンパ節や肺など遠隔臓器への転移は予後不良の重大な原因であるが、有用な予後予測および診断バイオマーカーはまだ発見されておらず、高精度かつ再現性の高いバイオマーカーの開発が期待されている。

癌の進行は、癌細胞からその周囲の微小環境に放出される細胞外小胞（EV）と関連していることが報告されている。特に EV の一種であるエクソソームは、脂質二重膜に囲まれ、タンパク質、核酸、脂質などの様々な内在分子を含むことが知られており、腫瘍微小環境において、エクソソームを介したドナー細胞からレシピエント細胞への機能の受け渡しが、癌進行における細胞間コミュニケーションの重要な一端を担っていることが示されている。

そこで、リンパ節転移能の異なる2種類のOSCC細胞株培養上清より単離したエクソソーム含有EV画分を解析し、その差異による腫瘍進展への関与を検討した。

【研究目的】

OSCCの転移メカニズムにOSCCが分泌するEVが重要な役割をもっているとの仮説を立て、OSCCの腫瘍進展および転移に関与する因子を探索するために、転移能の異なるOSCC細胞株から単離したEVを解析した。

【研究方法】

ヒトOSCC細胞株HSC-3と、その高転移性亜株HSC-3-M3から単離したEVを形態的・機能的に比較解析した。

(1) EV画分の精製

当研究室で以前より実施していたポリマー沈殿法に加え、一般的なEV画分精製プロトコルとして用いられている超遠心分離法も実施し、両プロトコルについて比較検討した。

(2) 各 EV 画分の形態学的比較解析

精製した EV 画分中に含まれる粒子のサイズを測定するために、動的光散乱法を用いた粒子径分布測定を行った。また、実際に小胞の視覚的な形態確認をするため、透過型電子顕微鏡 (TEM) 撮影を行い、画像解析ソフトを用いて比較解析を行った。

(3) EV マーカータンパク質に対する抗体を用いた定量比較解析

既知のエクソソーム膜タンパク質として知られる CD9 および EpCAM の抗体を用い、ウェスタンブロット (WB) 法およびエクソソーム定量に ELISA 機能を応用した ExoScreen 定量法を用いて、各 EV 画分中に含まれるエクソソームの定量比較解析を行った。その他、既知の EV タンパク質について、WB 法により相対定量解析を行った。

(4) 質量分析法を用いた各 EV 画分の網羅的プロテオーム解析

各 EV 中に含まれるタンパク質の違いについて調べるために、質量分析法を用いた網羅的定量解析を行った。

(5) 転移性 OSCC 細胞に影響を与える分子の解析

プロテオーム解析により見つかった転移性 EV マーカーとなりうる分子について、mRNA を標的とした siRNA を HSC-3-M3 細胞に導入することで、細胞に対する影響を検討した。

【結果】

(1) ポリマー沈殿法と超遠心分離法による EV 画分の精製

EV 画分精製過程において、ポリマー沈殿法と超遠心分離法を比較したところ、EV はポリマー沈殿法の方が効率良く回収できた。このため以下の研究については、ポリマー沈殿法により精製した EV 画分を用いることとした。

(2) 高転移性 OSCC 細胞はより大きな EV を分泌する

TEM 撮影および粒子径分布測定の両解析において、50-200 nm 範囲内の粒子サイズの EV を精製できていることが確認された。また、HSC-3 細胞に比べて、HSC-3-M3 細胞の方が、より大きな EV を分泌した。

(3) 高転移性 OSCC 細胞はより多くの EV を分泌する

既知のエクソソーム膜タンパク質 CD9 および EpCAM はいずれも HSC-3-M3 細胞が分泌する EV において高く検出された。その他の EV タンパク質についても、WB 法の結果、HSC-3-M3 細胞が分泌する EV においてより高く検出された。

これらのことから、高転移性 OSCC 細胞はより多くのエクソソームを含む EV を分泌する可能性が示唆された。

(4) 高転移性 OSCC 細胞由来 EV にはより多くの分子シャペロンタンパク質が含まれる

HSC-3 細胞と HSC-3-M3 細胞より精製した EV 画分を、質量分析法を用いて網羅的プロテオーム解析した結果、計 192 のタンパク質種が両癌細胞株に共通して同定された。これらのタンパク質種を生物学的機能別に分類したところ、HSC-3-M3 細胞は分子シャペロン種に富む EV を分泌していた。特に、分子シャペロン種の中でも、HSP90 α / β は、ともに WB 法の結果とも一致した。また、公的データベースに登録されている HNC 499 症例の解析においても、HSP90 遺伝子の高発現症例で予後不良の傾向が示され、今回の我々の研究結果を支持するものであった。

(5) HSP90 α と HSP90 β の二重 RNAi は、転移性 OSCC 細胞の生存を低下させる

転移性 OSCC の HSP90 α / β それぞれの単独遺伝子をターゲットとした RNAi に比べて、HSP90 α / β の 2 遺伝子およびコシャペロン CDC37 を加えた 3 遺伝子といった多重 RNAi により顕著な細胞数の減少を引き起こした。

【考察】

HSP90 は主要な細胞内分子シャペロンの 1 つであり、様々な癌種において高発現し、腫瘍増殖および転移を促進することが報告されていることから、HSP90 阻害剤は癌治療の分野で大きな注目を集めていた。しかしながら、細胞内安定性や正常細胞への機能障害などから予想され得る甚大な副作用が避けることのできない課題となり、HSP90 を標的とする抗体医薬の開発は非常に困難とされてきた。

我々は、今回の研究結果より、OSCC が分泌する EV 内 HSP90 発現レベルの上昇が OSCC の転移/悪性度を反映しており、潜在的な予後バイオマーカーとなり得るのではないかと考えている。OSCC における EV 内 HSP90 の役割を明らかにし、バイオマーカーおよび治療標的としての有用性を今後追究することが必要である。

【結論】

転移性口腔癌細胞は、HSP90 α および HSP90 β を含む分子シャペロンに富む細胞外小胞を分泌する。HSP90 は、潜在的に癌転移性表現型の EV バイオマーカーならびに OSCC を含む HNC における予後バイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

【論文要旨】

癌細胞はしばしば、腫瘍の進行に関与する熱ショックタンパク質 (HSP) を含む細胞外小胞 (EV) を分泌する。口腔扁平上皮癌 (OSCC) では、頸部リンパ節や肺など遠隔臓器への転移は予後不良の重大な原因であるが、有用な予後予測および診断バイオマーカーはまだ発見されておらず、高精度かつ再現性の高いバイオマーカーの開発が期待されている。そこで、本研究では、リンパ節転移能の異なる2種類のOSCC細胞株から単離したEVを解析し、OSCCの腫瘍進展および転移に関与する因子を探索することとした。その結果、単離したEV画分タンパク質を用いたプロテオーム解析により、高転移性OSCC細胞においてHSP90を多く含むEVを分泌していることを見出した。また、HSP90 α およびHSP90 β mRNAを標的としたsiRNAによる二重RNA干渉は、転移性OSCC細胞の生存率を有意に低下させたが、各HSP90に対する単一のRNA干渉は無効であった。さらに、これらのHSP90ファミリーメンバーの発現上昇は、OSCCを含む頭頸部癌 (HNC) 症例の生存率の低下や悪性度と相関することがわかった。したがって、分泌小胞中のHSP90レベルの予後バイオマーカーとしての有用性、およびHSP90が転移性OSCCにおける治療標的となりうることが示唆された。

本研究は、高浸潤・転移癌細胞株より分泌されるEVには、浸潤転移能などの悪性形質の獲得に関与するタンパク質、脂質、mRNAやマイクロRNA(miRNA)を含む非コードRNA(ncRNA)等が存在するとの仮説に基づくものである。その結果、リンパ節高転移OSCC細胞株から放出される浸潤転移関連性タンパク質として熱ショックタンパク質であるHSP90を見出した。これら研究は独創的であり、その成果は新規性が高い。申請者は筆頭著者として、本研究内容を4年の博士課程在学中に英文原著論文としてまとめ上げ、国際専門誌 *Journal of Cellular Biochemistry* に掲載を果たした。そればかりではなく、同内容の研究発表をもって3度の学会賞受賞の栄誉にも浴している。これらの実績は本論文が、世界レベルのがん分子生物学研究の進歩に十分に貢献するものであることを如実に示している。

よって、審査委員会は本論文に博士(歯学)の学位論文としての価値を認める。