

血清を用いた頭頸部扁平上皮がん転移の危険性診断系の構築と その治療標的としての可能性の検討

愛媛大学大学院 医学系研究科 分子細胞生理学
准教授 矢野 元

(共同研究者)

愛媛大学大学院 医学系研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科	助教 真田 朋昌
愛媛大学大学院 医学系研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科	医員 上田 哲平
愛媛大学大学院 医学系研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科	准教授 鵜久森 徹
愛媛大学大学院 医学系研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科	教授 羽藤 直人

はじめに

頭頸部がんの発症頻度は、肺がんや大腸がんのような高頻度で発症するがんに比すると低い。しかしながら、頭頸部には呼吸・発声・咀嚼・嚥下など、生存にとって基本的な生理機能が集中しているため、この部位に発症するがん—頭頸部がん—は生活の質を著しく低下させてしまう点で、その治療成績の向上が渴望されている。このうち扁平上皮がんが90%以上にも及ぶ頭頸部がんの大半を占めている。

上記の理由による原発巣発症部位の重要性もさることながら、生命予後に重篤な影響を与えるものはやはり転移である。興味深いことにこの扁平上皮がんは転移において腺がんなどとは異なる特徴を示す。それは非常に高い頻度で見られる、“遠隔転移に先立つリンパ節転移”である。言い換えればリンパ節転移なくして遠隔転移する扁平上皮がんは稀有であり、一旦リンパ節に転移することが肺などの遠隔臓器に転移するうえで重要な意義を持つことが推測できる、リンパ節転移の有無が生命予後の良し悪しに対する重要な“分水嶺”ともなっている。このため、いち早い発見とともに、リンパ節転移を阻止する、あるいは不幸にしてリンパ節転移が起こってしまってもそこに腫瘍細胞を留めおく、といったいわば「抗転移治療」というものが長年渴望されているが果たされていない。がん転移という現象がそもそも極めて多次元的な現象であることからその全容がいまだ解明されておらず、このことが大きな障壁となっていることに加え、とくにリンパ節転移のメカニズム解明は遠隔転移に比して後れを取っている。その理由の一つはリンパ節の機能に対する理解である。すなわち、原発巣から流入域リンパ節に対しては、解剖学上「直結」といった状態が形成されるし、リンパ節の役割がリンパ液の濾過や通過物を見張ることである以上、腫瘍細胞が移動してくることは必然であり、そこに特殊な分子機構は必要ないのではないかという理解が支配的であったことである。臨床家の先生方に実際にお話を伺うと、扁平上皮がんのリンパ節転移は、ことさらに「転

移」という言葉を使うほどのものではなく、「病域の拡大」といったとらえ方が実感として近い、というご意見であった。

われわれはいわばこれに「異を唱える」かのごとき結果を得てきた⁽¹⁾。すなわち、標的リンパ節において、腫瘍細胞の実際の到着に先立ち、組織構築改変や遺伝子発現変化が起こって転移を受け入れるための過程が動いている、という観察である。こうしたことは「前転移期ニッチェの形成」として乳がんの肺などへの遠隔転移において発見・呈示されてきた概念であり、これがリンパ節転移において当てはまることであるか否かが、そもそも確定的ではなかった。われわれの成果は、腫瘍細胞が原発巣において分泌性の因子を放出し、リンパ流に乗せて標的リンパ節における前転移期の反応を遠隔に惹起していることを強く示唆するもので、さらにその候補因子群までを同定していた。本助成の対象となった因子Aがまさにその因子の一つであり、本助成の開始時点では、遺伝子発現としての因子Aの同定に加え、実際の蛋白質としての検出に成功したところであった。その臨床検体における検出と、病期との関連を検討することで、転移の危険性を判定するための指標、バイオマーカーとすることの可否を査定すること、すなわち「転移リスクあるいは転移の存在と血清中の因子A含量が正に相関する」という仮説の検証が本課題のテーマである。国立研究開発法人 科学技術振興機構 研究開発戦略センター (JST CRDS) 本年度発行の「研究開発の俯瞰報告書」にも強く指摘がある通り、各種バイオマーカーの開発、時にliquid biopsy開発の競争は国際的に熾烈を極め、国家的要請としても焦眉の急を告げている。本課題はまさにこの点にfocusしたもので、今後に向けて重要なデータが得られたことを報告したい。

なお、この成果により因子Aの知財としての管理の必要性が生じているので、報告書として大変失礼ながら物質名を伏せることを、平にご容赦願いたい。

結 果

1. 培養上清からの因子Aの検出 - exosome 画分に存在することの発見

助成開始時点では、既報⁽¹⁾において、頭頸部扁平上皮がんのリンパ節転移に先だって発現が亢進する遺伝子として見出していた因子Aの、蛋白質としての検出が可能となったところであった。このことをことさらに述べ立てるのは、細胞破碎液中や、細胞培養上清中、免疫細胞染色において、因子A蛋白質の検出が困難であったためである。

前述の論文においてわれわれは、高転移性のSASL1m細胞、および非転移性のACC2細胞を比較・検討しており、SASL1m細胞における因子A遺伝子発現亢進を見出していた。実際にSASL1m細胞において因子A蛋白質が分泌されているか否かを、培養上清中からイムノブロッティングによって検出しようとした。しかしながら上記のようにそれはかなわず、濃縮も有効でなかった。

因子Aが分泌性の因子であることから、exosomeに内包される可能性にある時点で思い至

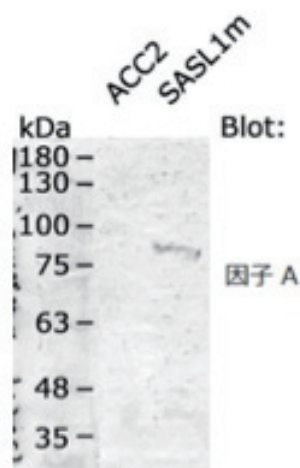


Figure 1 Exosome 画分における因子 A の検出
高転移性頭頸部扁平上皮がん細胞 SASL1m
exosome 画分において因子 A を検出し、
非転移性の ACC2 においては検出されなかった

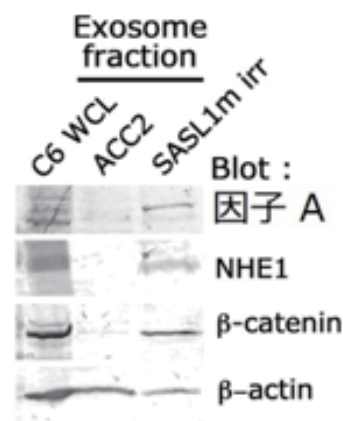


Figure 2 SASL1m 細胞
exosome 画分中蛋白質の例
比較としてラットグリオーマ
C6 の総細胞抽出画分を表示
因子 A シグナルの特異性が
保証されないことがわかる

り、培養上清より exosome 画分を調製して検討したところ、特定の検出に成功した (Figure 1)。興味深いことに、たしかに非転移性細胞である ACC2 の exosome 画分からは検出されず、転移性との相関が示唆された。この exosome 画分をさらに検討すると、ナトリウムイオン/プロトン交換輸送体 1 (NHE1) や、 β カテニン、 β アクチンといった因子群が検出され、これらについてもアクチン以外は SASL1m においてより多量に含有されていた (Figure 2)。Exosome は正常・疾患を問わずほとんどすべての細胞から分泌されるウイルスほどの大きさの小胞であり⁽²⁾、その内容物について、疾患との有意に相関する因子を検索する、熾烈な解析競争が展開されている⁽³⁾。この解析のパブリックなデータベースが構築されており、その意義についての論文報告のない因子についても情報が蓄積されている (<http://exocarta.org/>)。今般われわれは因子 A に着目しているが、本因子とともに NHE1、 β カテニンともに登録があり、今後の展開に興味もたれる。

2. ヒト血清からの因子 A の検出

愛媛大学附属病院の倫理委員会の審査を経て、耳鼻咽喉科受診患者血液を採集し、解析に供した。まず患者血液から血清を調製し、exosome 濃縮試薬 (Invitrogen) を用いて exosome 画分を調製した。細胞での解析経験から、血清画分では夾雑蛋白質が過多で目的を達しないことが強く予想されたので、開始から exosome 画分とした。しかしながら、血液試料の場合、exosome 画分であっても夾雑物過多のため、特異的検出は不可であった。

3. CD9 exosome が有用である可能性の発見

そこでさらに exosome 純度を高めるため、exosome 膜に含まれているテトラスパニン蛋白質である CD63, CD9, CD81 それぞれに対する抗体を用いた免疫沈降を行うことで特異的シグナ

ルの検出に成功した。Figure3aに示すのがその最初の解析例で、抗-因子A抗体によるイムノブロット解析の結果である。注目すべきことに、患者試料のCD63, CD81 画分ではほぼ健常者試料と同等の因子Aが検出されたのに比して、特にCD9画分(矢頭)において、患者試料における含量亢進が観察された (Figure3a)。この際、免疫沈降されたCD63, CD9, CD81 蛋白質量は健常者・患者間で同等であった (Figure3b) ことから、因子A量の差が保証される。

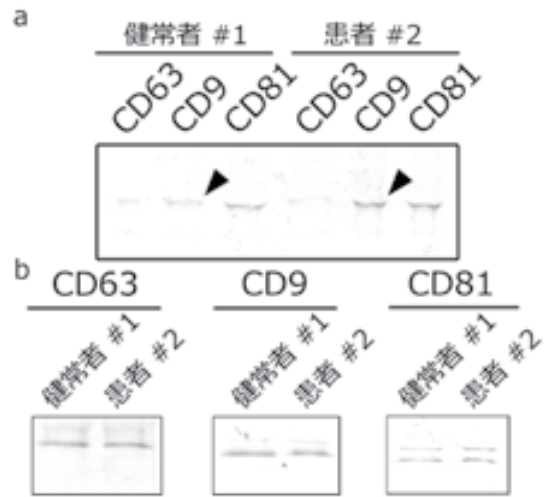


Figure 3 ヒト血清 exosome 画分中の因子 A の検出
a: 抗 CD63, 9, 81 抗体を用いた免疫沈降により各 exosome を得、それらに分布する因子 A を検討した b: 沈降した CD 抗原量の比較

これに力を得て、得られた健常者・患者試料にさらに当たった。現在までに、健常者計3例、患者計4例についての解析を完了し、デンストメトリーによりシグナルを数値化して“患者/健常者”の比としてまとめた (Figure4)。これまでの健常者三例においていずれも因子A高発現は認めず、患者4例中2例においてCD9 exosome画分における高含有量を観察した。現在さらなる患者試料の採集中であり、今後もこの解析を継続する。

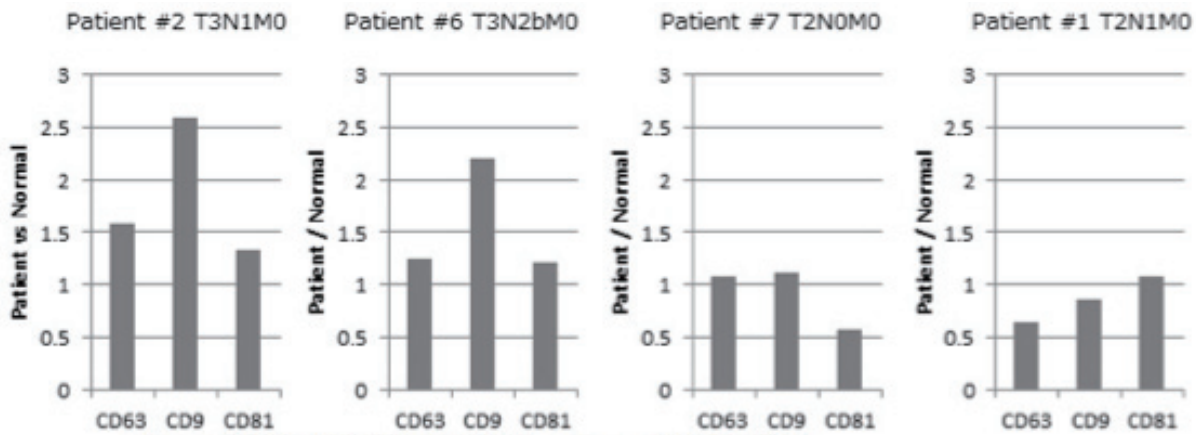


Figure 4 患者 / 健常者 比較における exosome 中因子 A 含量
患者 #2, 6 の、特に CD9 exosome において顕著な患者 / 健常者の相違を認める
この特徴は患者 #1, 7 において際立って異なっている

4. 病歴、予後との関連

Figure4に得られた因子A含量の患者/健常者比を臨床所見と対応させると、さらに興味深い結果となる (Table1)。すなわち、CD9 exosome画分における因子A高発現はTNM分類におけるリンパ節転移の存在と4例中2例において一致しており (患者#2, 6)、転移の不在は因

子A低発現と一致していた（患者#7）。1例において転移が存在しながら因子A量が低い事例も観察された（患者#1）。

患者	CD9 exosome 中 因子A 高含量	TNMスコア	仮説との合致
#2 下咽頭がん	+	T3 N 1M0	○
#6 中咽頭がん	+	T3 N 2 b M0	○
#7 舌がん	-	T2 N 0M0	○
#1 舌がん	-	T2 N 1M0	×

Table 1 血清 exosome 中因子 A 含量と臨床所見、および仮説との対応
TNMスコアの内訳は、T: 原発巣、N: リンパ節転移、M: 遠隔転移
数値の高さが進行を反映し、2b は多発性、6cm 以下をしめす

考 察

本助成により得られた結果は、

1. ヒト血清中から因子Aを特異的に検出する系を確立できたこと、
2. 特にCD9画分に注目することで特異的な検討ができる可能性が示されたこと、
3. 「転移リスクあるいは転移の存在と exosome 中の因子A含量が正に相関する」という仮説を支持したが、一部支持しないものも観察される、というものであった。

冒頭に既述したように、バイオマーカー開発、特に有用な liquid biopsy の開発は国家的要請をとまなっており、本テーマは完遂できればこの要請にこたえることができると期待される。特に腫瘍領域ですでに実用化され繁用されているものに Prostate Specific Antigen (PSA: 前立腺特異的抗原) がある。前立腺がん診断の liquid biopsy 系としてゆるぎない地位を築いており、まさに本研究のモデルとして好適である。健常者における血中含量が 4ng/ml 以下とされ、グレイゾーンと呼ばれる 4 ~ 10ng/ml の検査値を示す症例中、30%程度にがんが発見される一方、この腫瘍検出力は高い検査値域においてより高く信頼性を増す。

今後本テーマを実用に近づけるためには、

1. 診断力という点でどこまで PSA に比肩しうるか、
2. 「4ng/ml」にあたる基準値の策定は可能か、
3. ELISA 法等で測定を簡略化できるか、

といった問題が考えられる。1.、2. に関して今後も統計的有意性を求め、解析を継続する予定である。その効率化のため、3. の技術的改善を早い時期に完了したい。しかしながら現時点までのところ、大変有望な結果が得られていると考えている。

一方、PSA は liquid biopsy においては大変有用であるが、その生理的機能（精液の粘性の調節ではないかと考えられている）およびその前立腺がんとの因果関係については不明で

ある。ところが因子Aは、転移機構の解析から見出した候補責任因子であるため、治療標的となりうる可能性も秘めている。因子Aに着目した研究の本流は元来そちらであり、その試みも継続するため、Liquid biopsy系としての実用化はそれと補完関係をなすことが期待される。

また、基礎生物学としてのexosomeも大変興味深い。特に今般見出したCD抗原三画分の違いの意義は近い将来必ず追求したいテーマとなった。

総じて、本助成により因子Aを中心とした基礎生物学的・応用医学的に大きな進展が得られたと考えており、財団の助成に心から感謝したい。

要 約

本助成の対象課題は、「転移リスクあるいは転移の存在とexosome中の因子A含量が正に相関する」という仮説の検証であった。この目的の達成のためにいくつかの技術的困難が存在していたがそれらを解決し、示唆に富む結果を得た。それらは

1. ヒト血清中から因子Aを特異的に検出する系を確立できたこと、
2. 特にCD9 exosome画分に注目することで因子Aの特異的な検討ができる可能性が示されたこと、
3. 「転移リスクあるいは転移の存在とexosome中の因子A含量が正に相関する」という仮説が基本的に支持されたが、一部支持されない例も観察される、というものであった。

本研究の目標において、Prostate Specific Antigen (PSA: 前立腺特異的抗原) などによるliquid biopsy系がモデル系たると考えられる。PSA検出下限付近における前立腺がん検出力は30%程度とされており、現在までのところわれわれの結果の仮説との合致率は十分に高く、有望であると考えられる。今後は、統計学的有意性を得て本系を実用化にまでもっていくべく、さらなる解析を行う価値があると結論した。

文 献

1. Mayorca-Guiliani A E, **Yano H**, Nakashiro K, Hamakawa H, Tanaka J. Premetastatic vasculogenesis in oral squamous cell carcinoma xenograft-draining lymph nodes. *Oral Oncology* **48**, 663-758, 2012.
2. Neviani P, Fabbri M. Exosomal microRNAs in the tumor microenvironment. *Front. Med.* **2**, Article 47, 1-6, 2015.
3. Peterson MF, Otoc N, Sethi JK, Gupta A, Antes TJ. Integrated systems for **exosome** investigation. *Methods* S1046-2023 (15) 00161-00169, 2015.