

学位論文の要約 (研究成果のまとめ)

氏 名 眞田 朋昌

学位論文名

頭頸部扁平上皮がん細胞由来エクソソーム画分に含有される LOXL2 の
転移危険性診断指標および抗転移治療標的としての可能性

学位論文の要約

背景：頭頸部扁平上皮がん（HNSCC）の進行様式として、多くの場合で遠隔転移よりリンパ節転移が先行する。このことはリンパ節転移がその後の遠隔転移にも影響を及ぼす可能性を示唆している。したがってリンパ節転移の早期診断、抑制は HNSCC 予後改善に重要な意味を持つと考えられ、有効な診断法、および転移抑制法の開発が期待されている。また近年、生理的および病態生理的いずれの局面においても、細胞外小胞である exosome が観察され、当該画分に miRNA や DNA、病原性タンパク質が含有されることから、liquid biopsy 系としても治療標的としても、その可能性に注目が集まっている。我々はこれまでに、HNSCC 転移の標的リンパ節における前転移ニッチ形成を誘発する候補因子として LOXL2 を同定しており、その解析を行ってきた。

目的：リジロキシダーゼ様因子 2（LOXL2）に着目し、頭頸部扁平上皮がんの検出、およびその転移危険性診断の liquid biopsy 標的としての有用性を検討する

リジロキシダーゼ（LOX）は ECM 再構成や EMT への関与を通じてがん転移に寄与する分泌性の酵素として知られており、われわれもこれまでに高転移性 HNSCC 細胞において LOX ファミリーの一つである LOXL2 の遺伝子発現亢進を見出している。このことから今般、HNSCC の検出やその転移の危険性診断における LOXL2 の liquid biopsy の標的としての有用性について、特に exosome 画分に注目して検討した。

方法：イムノブロット解析によりヒト血清中における LOXL2 の存在を査定し、さらに exosome 画分への局在の有無を検討した。さらに健常者と患者間での血清 exosome 中 LOXL2 含量の差異を統計学的に査定した。有意性を検討するため数十症例を集めて検討した。また、血清中および血清 exosome 中の LOXL2 が HNSCC 細胞に由来するの否か、ヒト HNSCC 組織における LOXL2 分布を免疫組織学的に検討し、またその特徴を検索した。このヒト血清、組織を用いた実験を行うにあたり、愛媛大学医学部研究倫理審査委員会の承認を得た。

イムノブロット解析に供した exosome 画分の調製は超遠心法にて行い、上清画分との比較を行った。統計学的な検討はポリマー沈殿法により調製した exosome 画分サンプルの ELISA 法

を用いた LOXL2 量測定によって行った。

結果：無作為に抽出した健常者、HNSCC 患者それぞれ 3 例、いずれものヒト血清において LOXL2 タンパク質の存在を観察した。さらにこの LOXL2 は特に exosome 画分に局在していることを見出した。ヒト HNSCC 組織においても LOXL2 染色シグナルを腫瘍細胞において確認し、患者血清 exosome 中に検出した LOXL2 が腫瘍細胞由来であることが強く示唆された。なお同組織非がん部の脂肪細胞や筋肉細胞の一部にも陽性シグナルを観察し、健常者血清 exosome が非がん細胞に由来することの示唆も得た。注目すべきことに患者血清 exosome における LOXL2 含量は健常者に比して約 3 倍に亢進していた。さらに、いずれの exosome 画分においても LOX 酵素活性は観察された。また組織分布を詳細に検討すると、強陽性シグナルは舌組織内部に浸潤した腫瘍細胞において顆粒状の形態をもって観察され、原発巣周辺とみられる組織表層においてはびまん性の弱陽性シグナルが観察され、悪性度がより高いと思われる部位に優位に LOXL2 が分布している傾向が見られた。

計 38 例の初診時の患者血清 exosome LOXL2 含量について計 7 例の健常者血清 exosome LOXL2 含量と比較したところ、LOXL2 含量の有意な亢進を認めた。病期ごとに検討すると、ステージ分類における I/II、および III 期、また TNM 分類における N0、および N1 群において、健常者との有意な差を検出したが、病期の進行度合いと LOXL2 含量差には相関は観察されなかった。

結論：血清 exosome 画分中の LOXL2 含量に注目することで、HNSCC の検出、さらにはリンパ節転移を起こす危険性の診断・判定系が構築できる可能性がある。また想定される LOXL2 の機能、およびこれまでの解析から、LOXL2 の抗転移治療標的としての可能性についても、さらなる解析を進行中である。

なお、この学位論文の内容は、以下の原著論文に既に公表済みである。

主論文：Sanada T et al. : Elevated exosomal lysyl oxidase like 2 is a potential biomarker for head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*. 2019 Jun 20. DOI: 10.1002/lary.28142.