

Original Article

Int J Oral Biol 48:1-7, 2023
 pISSN: 1226-7155 • eISSN: 2287-6618
<https://doi.org/10.11620/IJOB.2023.48.1.1>

Long-term exposure to gefitinib differentially regulates the endosomal sorting complex required for transport machinery, which accelerates the metastatic potential of oral squamous cell carcinoma cells

Mi Seong Kim^{1,2} and Min Seuk Kim^{1*}

¹Department of Oral Physiology, Institute of Biomaterial-Implant, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan 54538, Republic of Korea

²Wonkwang Dental Research Institute, School of Dentistry, Wonkwang University, Iksan 54538, Republic of Korea

Oral squamous cell carcinoma (OSCC), which accounts for approximately 90% of oral cancers, has a high rate of local recurrence and a poor prognosis despite improvements in treatment. Exosomes released from OSCC cells promote cell proliferation and metastasis. Although it is clear that the biogenesis of exosomes is mediated by the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery, the gene expression pattern of ESCRT, depending on the cell type, remains elusive. The exosomal release from the human OSCC cell lines, HSC-3 and HSC-4, and their corresponding gefitinib-resistant sub-cell lines, HSC-3/GR and HSC-4/GR, was assessed by western blot and flow cytometry. The levels of ESCRT machinery proteins, including Hrs, Tsg101, and Alix, and whole-cell ubiquitination were evaluated by western blot. We observed that the basal level of exosomal release was higher in HSC-3/GR and HSC-4/GR cells than in HSC-3 and HSC-4 cells, respectively. Long-term gefitinib exposure of each cell line and its corresponding gefitinib-resistant sub-cell line differentially induced the expression of the ESCRT machinery. Furthermore, whole-cell ubiquitination and autophagic flux were shown to be increased in gefitinib-treated HSC-3 and HSC-4 cells. Our data indicate that the expression patterns of the ESCRT machinery genes are differentially regulated by the characteristics of cells, such as intracellular energy metabolism. Therefore, the expression patterns of the ESCRT machinery should be considered as a key factor to improve the treatment strategy for OSCC.


Keywords: Squamous cell carcinoma of head and neck, Gefitinib, Drug resistance, Endosomal sorting complexes required for transport

Introduction

구강암은 전 세계적으로 가장 흔한 악성종양 중 하나이며, 담배와 알코올이 주요 병인인 편평세포상피암(squamous cell carcinoma)은 조직학적 구강암으로 그중 90% 이상을 차지한다[1]. Human tongue

squamous carcinoma-3 (HSC-3) 및 HSC-4 세포주는 인체 구강 편평세포암(oral squamous cell carcinoma) 세포주로서, pyruvate kinase M2의 유전자 결손을 통한 두 세포주 간 에너지 대사(energy metabolism)의 차이를 나타낸다. HSC-3 세포 내 lactate 및 ATP 생성 수준은 HSC-4 세포의 그것보다 높은 것으로 확인되었으며, 높은 에

Received February 8, 2023; Revised February 20, 2023; Accepted February 20, 2023

*Correspondence to: Min Seuk Kim, E-mail: happy1487@wku.ac.kr  <https://orcid.org/0000-0003-0071-0830>

Copyright © The Korean Academy of Oral Biology

© This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

너지 대사를 수행하는 HSC-3 세포는 암세포 성장, 조직 침투 및 전이 가능성이 높은 반면, HSC-4 세포는 높은 종양원성(tumorigenicity)과 암줄기세포능(cancer stemness)을 나타낸다[2,3]. 이러한 특성으로 인해 HSC-3 및 HSC-4 세포는 암세포의 조직 침투 및 전이 과정에서 matrix metalloproteinases 단백질의 기능을 분석하는 다양한 연구에 사용되고 있다[4,5].

엑소좀(exosome)은 다중소포체(multivesicle bodies, MVBs)의 막에서 발생하는 직경 50–150 nm 크기의 지질이중막 구조물로서, 세포-세포 간 상호작용에서 다양한 역할을 수행한다[6]. 엑소좀은 엑소좀 생성에 관여하는 CD63, ALIX, Tsg101 등의 endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery 단백질들을 포함한 다양한 mRNA, miRNA를 포함하며, MVBs의 원형질 막으로의 막 전이(anterograde membrane trafficking) 과정을 통해 엑소좀은 세포 외 공간으로 방출된다[7]. 엑소좀 내 물질들은 수용체세포로 전달되어 다양한 생물학적 활성을 유도한다[8]. 최근, 암세포-유래 엑소좀의 전달은 수용 암세포 내 약물 내성과 관련된 여러 활성을 유도하는 것으로 확인되고 있으며[9,10], 유방암, 직장암, 대장암, 위암 등의 다양한 암 종에서 엑소좀에 의한 항암제 내성 획득에 대한 연구가 축적되고 있다[11–14].

다중소포체 내 엑소좀 생성은 ESCRT-0 (HRS), -I (Tsg101), -II, -III 및 vps4 복합체 그리고 syntenin-ALIX 등의 다양한 ESCRT machinery 단백질들에 의해 조절된다[15,16]. 최종적으로 엑소좀의 세포 외 방출과정에서 MVBs와 원형질막의 막 융합이 유도되며, 막 융합은 세포 내 칼슘신호와 synaptotagmin-7 (Syt-VII)에 의해 조절되는 것으로 확인되었다[17]. 그러나 장기간의 항암제 노출에 따른 구강편평세포암 세포주별 엑소좀 분비량의 변화 및 ESCRTs machinery-관련 유전자 발현 정도에 대한 정확한 분석은 아직 이뤄지지 않고 있다.

우리는 이번 연구를 통해 구강편평세포암 세포주별 gefitinib 내성 암세포에서의 엑소좀 분비 정도를 분석하고 관련 ESCRT machinery 유전자의 발현 변화를 확인하였다. 연구결과, HSC-3 및 HSC-4 각각의 gefitinib-내성 세포주에서 엑소좀 분비 및 ESCRT machinery 유전자의 발현이 유의미하게 증가됨을 확인하였으며, 흥미롭게도, HSC-3 세포주와 HSC-4 세포주 간 그 변화의 양상이 다르게 나타남을 확인하였다. 위 결과는 동일한 구강편평세포암 치료에서 세포 내 에너지 대사 등의 차이를 고려해야 하며, 이는 항암제 민감성을 향상시키기 위한 중요한 전략이 될 수 있음을 시사한다.

Materials and Methods

1. 세포 배양 및 시약

본 연구에 사용된 구강편평세포암 세포주, HSC-3, HSC-4 세포는 서울대학교 치과대학 구강병리학교실 조성대 교수로부터 제공받았다. 각 세포주는 10% fetal bovine serum (FBS)과 항생제(100 U/mL penicillin 및 100 µg/mL streptomycin)가 첨가된 DMEM/F12 (Welgene Inc.)에서 배양하였다(37°C, 5% CO₂). HSC-3 및 -4 세포

를 gefitinib에 4개월 동안 반복적으로 노출시킴으로써 gefitinib-내성 세포주를 각각 확립하였다.

2. 엑소좀 분리

세포-유래 엑소좀을 분리하기 위해, 엑소좀-결여 FBS가 포함된 세포 배지에 세포를 48시간 동안 유지하였다. 엑소좀의 분리는 ExoQuick-TC 엑소좀 침전 키트(System Biosciences)를 사용하여 제공된 실험 방법에 따라 분리하였다. 간략히 기술하면, 세포 배지 교체 48시간 뒤, 수집된 배양액은 3,000 × g에서 15분 동안 원심분리하여 배지 내 부유 세포 및 잔해물을 제거했다. 정제된 상층액의 20%에 해당하는 엑소좀 분리 시약을 첨가하여 4°C에서 밤새 반응시켰다. 다음날, 샘플을 3,000 × g에서 15분 동안 원심분리하고, 엑소좀이 포함된 침전물을 phosphate buffered saline에 재부유하고 다음 실험을 진행하였다.

3. Western blot analysis

단백질 발현 수준은 Western blot 표준 프로토콜에 따라 분석하였다. 수집된 세포는 proteases와 phosphatase inhibitor (Invitrogen)가 첨가된 RIPA buffer (Invitrogen)를 첨가함으로써 완전 용해시킨 후, BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher)를 사용하여 정량하였다. 정량된 샘플은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis에서 분자량에 따라 분리되었으며, 이후 polyvinylidene difluoride membrane (0.2-µm pore size)에 옮겨 항체 반응을 진행하였다. 1차 항체인 Hrs (1:1,000), Tsg101 (1:1,000), Alix (1:1,000), Syntenin-1 (1:1,000), Syt-VII (1:1,000), β-actin (1:1,000), LC3 (1:1,000), Hsp70 (1:1,000), CD9 (1:1,000)을 각 멤브레인에 처리하여 4°C에서 밤새 반응시켰다. 다음날 HRP-conjugated IgG (Santa Cruz Biotechnology) 2차 항체를 사용하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 AzureSpot 2.0 (Azure Biosystems Inc.)를 사용하여 검출하였다. 각 단백질의 발현 정도는 동일 샘플의 β-actin의 발현 정도를 기준으로 분석되었다.

4. Flow cytometry

배양 배지 내 엑소좀은 Exo-Flow capture kit (System Biosciences)를 사용하여 제공된 실험방법에 따라 정량하였다. Magnetic beads를 biotinylated capture 항체(CD63)와 반응시킨 후, 수집된 엑소좀을 첨가하고 4°C에서 밤새 회전하여 반응시켰다. 다음날, magnetic beads를 엑소좀 염색 용액과 Exo-FITC와 2차 반응시켰다. 4°C에서 2시간 반응시킨 후 샘플을 세척하고, 최종적으로 침전물을 세척 용액 300 µL로 재부유시켰다. 샘플은 90초 동안 FACScan 분석기(BD Biosciences)에 흘려보내어 분석하였다.

5. Ubiquitination assay

UBI-QAPTURE-Q Kit (Enzo Life Sciences Inc.)를 사용하여 제공된 실험방법에 따라 세포 전체 유비퀴틴화(ubiquitination) 분석을 수행했다. 요약하자면, 세포 전체 용해물을 수집하고 250 µg/mL의 단백질을 UBI-QAPTURE-Q matrix와 혼합한 후 HEPES 버퍼로 세척하였다. 세척된 matrix를 HEPES 버퍼에 재부유시킨 후 4°C에서 밤새 반

응시켰다. 다음날, 샘플을 5,000 × g에서 30초 동안 원심분리하고 5X 샘플버퍼를 첨가한 후 95°C에서 10분 동안 끓여서 이후 Western blot 분석에 사용했다.

6. Statistical analysis

Origin 2020 소프트웨어(OriginLab Corporation)를 사용하여 통계

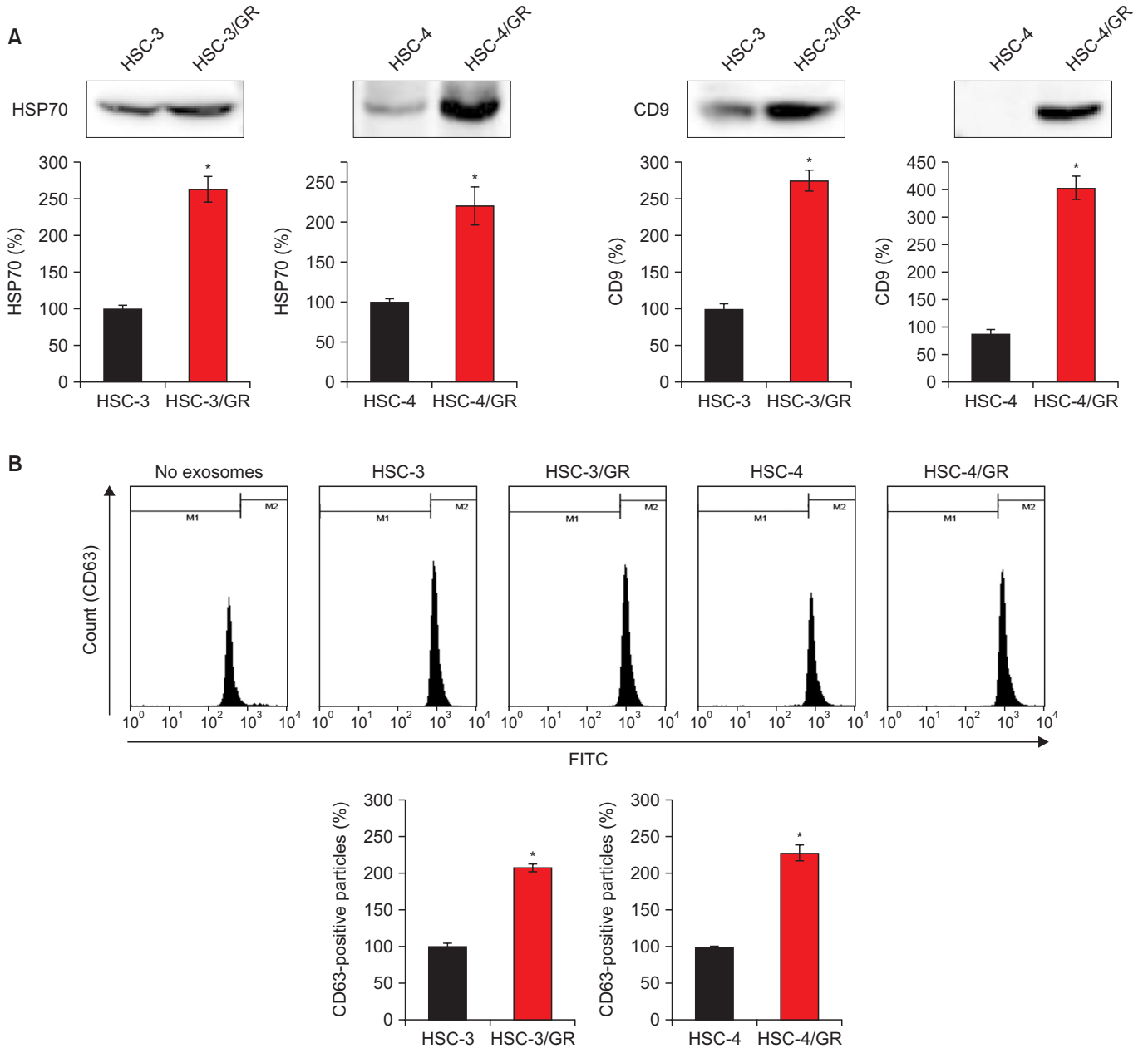


Fig. 1. A basal level of exosomal release in HSC-3, HSC-4, and gefitinib-resistant sub-cell line, HSC-3/GR and HSC-4/GR. (A) A basal expression level of HSP70 and CD9 in exosomes released from each cell line. The column graphs indicate the percentage of gene expression level compared to its control (HSC-3 and HSC-4 respectively; n = 3). (B) FITC-conjugated CD63 positive particles were counted for 90 seconds using flow cytometry. The column graphs indicate the percentage of the count of FITC-CD63 positive particle compared to control (HSC-3 and HSC-4 respectively; n = 3). Data are presented as the mean ± standard deviation. Student's t-test was used to establish statistical significance (*p < 0.05).

분석을 수행하였다. 데이터는 최소 세 번의 독립적인 실험에서 얻은 관찰의 평균 ± 표준편차로 제공되었다. 통계적 유의성은 일원 분산 분석 (ANOVA) 또는 paired Student's t-test에 이어 Turkey의 사후 테스트를 사용하여 분석했다. 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 로 설정되었다.

Results

1. Gefitinib-내성 획득으로 인한 구강편평세포암 세포 유래 엑소솜 생성 증가

첫 번째 질문은 gefitinib-민감성 세포와 비교하여 gefitinib-내성 세포에서 엑소솜의 지속적인 세포외 방출이 변화되는가였다. 이를 확인하기 위해, 구강편평세포암 세포주 HSC-3 및 HSC-4 세포와 이로부터 파생된 gefitinib-내성 세포주(HSC-3/GR, HSC-4/GR)를 정상적인 환경에서 48시간 동안 배양시켰다. 각각의 배양액으로부터 분리된 엑소솜을 대상으로 HSP70과 CD9 발현 정도를 비교하였으며, HSC-3/GR 및 HSC-4/GR 세포로부터 준비된 샘플 내 HSP70, CD9의 발현

정도는 각각의 gefitinib-민감성 세포들로부터 유래된 샘플의 그것에 비해 현저히 증가됨을 확인하였다(Fig. 1A). 또한, flow cytometry 실험을 통해 CD63-양성의 입자를 측정된 결과 HSC-3/GR (2.073 ± 0.053) 및 HSC-4/GR (2.271 ± 0.101) 세포로부터 분리된 샘플에서 2배 이상 증가되어 있는 것을 관찰하였다(Fig. 1B). 위 결과는 gefitinib-내성 세포로부터 지속적으로 생성, 방출되는 엑소솜의 양이 민감성 세포의 그것에 비해 증가되어 있음을 나타낸다.

2. 구강편평세포암 세포주별 gefitinib-내성 획득에 따른 ESCRTs machinery 단백질 발현 변화

Hrs와 Tsg101 단백질을 포함한 ESCRT machinery 구성요소들은 엑소솜 생성을 조절하는 핵심인자로 보고되고 있다[18]. 본 연구에서 장시간 gefitinib 처리에 의한 ESCRT machinery 구성요소들의 구강편평세포암 세포주별 발현 변화를 확인하고자 하였다. ESCRT-0 복합체 구성요소 중 하나인 Hrs의 경우, 휴지상태의 HSC-3 세포와 HSC-3/GR 세포에서 발현 정도의 차이는 없었으나, 두 세포 모두 gefitinib

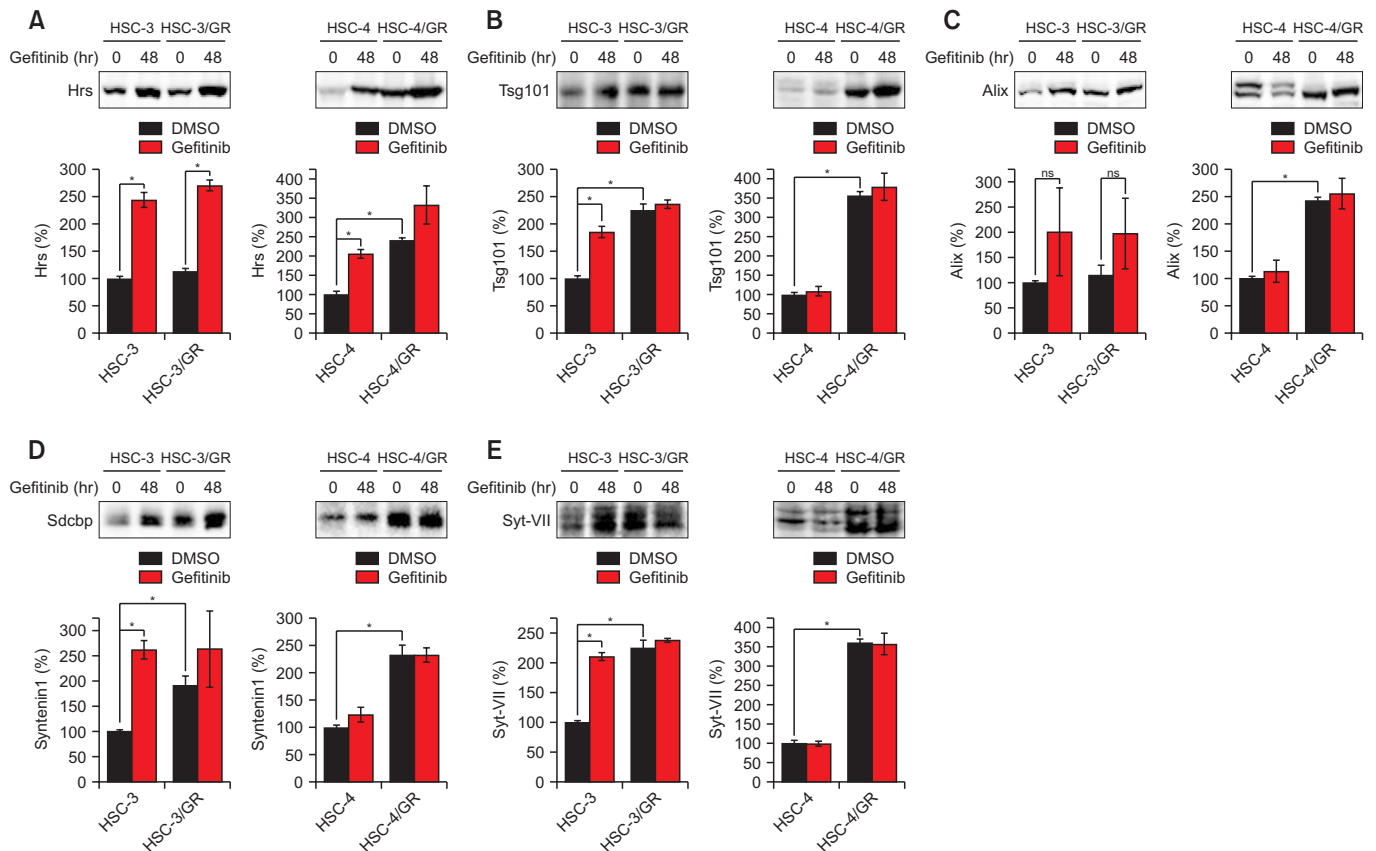


Fig. 2. The differential expression patterns of ESCRT machinery genes in gefitinib-treated HSC-3, HSC-4, and its gefitinib-resistant cell lines. HSC-3 and HSC-3/GR cells were treated with 50 μ M gefitinib for 48 hours, and HSC-4 and HSC-4/GR cells were treated with 20 μ M gefitinib for 48 hours. The expression levels of (A) Hrs, (B) Tsg101, (C) Alix, (D) Sdcbp, and (E) Syt-VII were determined by Western blot assay. The column graphs indicate the percentage of each protein level compared to control (HSC-3 and HSC-4; $n = 3$). Data are presented as the mean \pm standard deviation. Statistical analysis was using the one-way ANOVA compared to the HSC-3 and HSC-4 cells (* $p < 0.05$). ESCRT, endosomal sorting complex required for transport; Syt-VII, synaptotagmin-7; ns, not significant.

에 의해 각각 약 2배 이상(2.438 ± 0.139 for HSC-3, 2.701 ± 0.097 for HSC-3/GR) 발현이 증가되는 것을 관찰하였다. HSC-4 세포 내 Hrs는 gefitinib-내성 획득 세포주(HSC-4/GR)에서 지속적으로 증가되어 있음을 확인하였으며, gefitinib 처리에 의한 Hrs 발현 정도는 HSC-4 세포에서 2배 이상 유의성 있게 증가함을 확인하였다(Fig. 2A). ESCRT-I 복합체 구성요소 중 하나인 Tsg101의 경우, HSC-3 세포와 비교하여 HSC-3/GR 세포에서 약 2배 정도 발현이 증가되었으며, gefitinib 처리 시, HSC-3 세포에서 유의적으로 증가함이 관찰되었다. HSC-4 세포와 비교하여 HSC-4/GR 세포에서 대략 3.5배 증가했으며, gefitinib에 의한 Tsg101 발현은 HSC-4와 HSC-4/GR 세포 모두에서 변화가 없었다(Fig. 2B). ESCRT-III 복합체 구성요소 중 하나인 Alix는 HSC-3 세포와 HSC-3/GR 세포에서 유의적인 발현의 차이가 없었으며, 두 세포 모두 gefitinib 자극에 의해 약 2배 이상(2.007 ± 0.871 for HSC-3, 1.977 ± 0.697 for HSC-3/GR) 증가하는 경향을 보였으나, 유의성을 나타내지 않았다. HSC-4 세포와 비교하여 HSC-4/GR 세포에서 Alix 발현은 증가하였으나, gefitinib 자극에 의한 Alix 발현 증가는 확인되지 않았다(Fig. 2C). Alix와 함께 상호작용함으로써 엑소좀 형성에 관여하는 것으로 알려진 Sdcbp (Syntenin)의 경우, HSC-3 세포와 비교하여 HSC-3/GR 세포에서 대략 2배 정도의 발현 증가가 확인되었으며, gefitinib 자극에 의해 HSC-3, HSC-3/GR 세포 모두에서 발현 정도의 증가가 확인되었다. HSC-4 세포와 비교하여 HSC-4/GR 세포에서 sdcbp 발현은 대략 2.3배 증가하였으나, gefitinib 자극에 의한 sdcbp 발현의 증가는 HSC-4, HSC-4/GR 세포 모두에서 변화가 관찰되지 않았다. 엑소좀의 세포 외 방출과 Syt-VII 간의 상관성을 확인하기 위하여 세포 내 Syt-VII의 발현 정도를 확인하였다. HSC-3 세포와 비교하여 HSC-3/GR 세포에서 Syt-VII 발현이 대략 2배 정도 증가했으며, gefitinib 자극에 의한 Syt-VII 발현은 HSC-3 세포에서만 유의적으로 증가했다(2.101 ± 0.068 for HSC-3, 2.372 ± 0.032 for HSC-3/GR). HSC-4 세포와 비교하여 HSC-4/GR에서 Syt-VII 발현은 대략 3.6배 증가하였으며, gefitinib 자극에 의한 Syt-VII 발현은 HSC-4, HSC-4/GR 세포 모두에서 유의적인 변화가 없었다.

3. 구강편평세포암 세포주별 gefitinib-내성 획득에 따른 세포 내 유비퀴틴화 및 자가포식 정도(autophagic flux)의 변화

세포 내 물질수송 과정에서 ESCRT machinery는 유비퀴틴화된 엔도솜 막 단백질과 상호 작용하며[19], 세포 내 유비퀴틴화의 축적은 LC3 lipidation을 증가시켜 자가포식을 활성화시키는 것으로 보고된 바 있다[20]. 이에 근거하여 HSC-3 및 HSC-4 세포와 각각의 gefitinib-내성 세포 내 유비퀴틴화와 자가포식 정도를 분석하였다. 실험결과, gefitinib-민감성 세포에 비교하여 각각의 gefitinib-내성 세포에서 유비퀴틴화 및 자가포식 정도가 현저히 증가됨을 확인하였으며(Fig. 3), HSC-3, HSC-4 세포에서 모두 gefitinib 자극에 의한 유비퀴틴화 및 자가포식 정도의 증가를 확인하였다. 위 결과들은 HSC-3, HSC-4 세포 모두 gefitinib 내성을 획득함에 따라 엑소좀 분비량의 증가와 세포

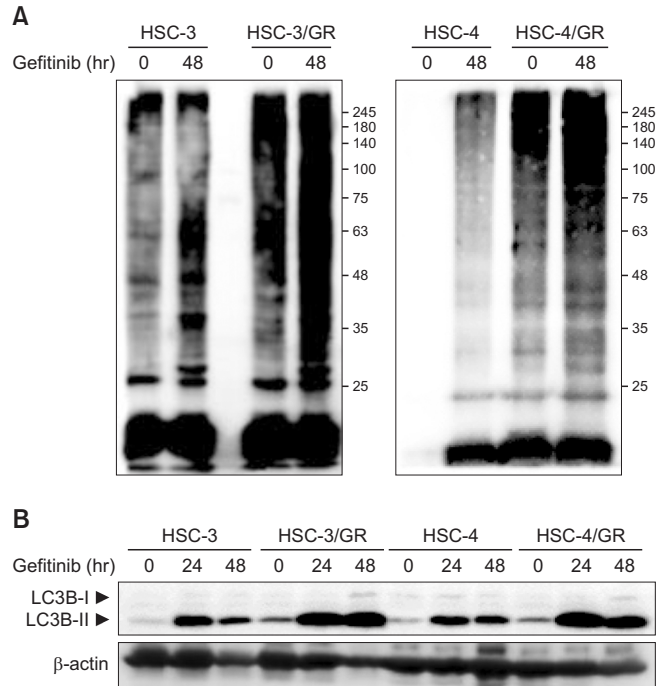


Fig. 3. Gefitinib-mediated whole cell ubiquitination and autophagy flux in HSC-3, HSC-4, and gefitinib-resistant sub-cell line, HSC-3/GR and HSC-4/GR. (A) HSC-3 and HSC-3/GR cells were treated with 50 μ M gefitinib for 48 hours, and HSC-4 and HSC-4/GR cells were treated with 20 μ M gefitinib for 48 hours. Whole cell ubiquitination was assessed using the UBI-QAPTURE-Q Kit. (B) Cleavage of LC3B was evaluated using Western blot assay.

내 유비퀴틴화 및 자가포식 정도는 정비례하며, 각각의 세포 내 ESCRT machinery 복합체 형성에는 차이가 있다는 것을 나타낸다.

Discussion

종양세포 유래 엑소좀은 주변의 종양세포에 전달됨으로써 수용세포의 세포 증식 또는 전이를 매개하는 종양미세환경을 제공한다[21,22]. 암 전이 과정에서 엑소좀은 종양미세환경 구성[23,24], 항암화학요법 반응에 대한 적응[25,26] 등의 다양한 역할을 수행하며, 이러한 엑소좀의 생성 및 분비에는 ESCRT machinery와 같은 다양한 분자들의 복합체를 필요로 한다. ESCRT machinery에 의한 엑소좀 생성은 ESCRT-0, -I, -II 그리고 ESCRT-III-related protein인 Alix와 상호 결합하는 syndecan-syntenin이 순차적으로 구성되는 것으로 보고되고 있다[27,28]. 본 연구에서는 각각 특성이 다른 두 구강편평세포암 세포주를 대상으로 엑소좀 생성을 매개하는 ESCRT machinery 복합체 구성요소들의 발현 정도를 분석하고자 하였다. 실험결과, 장기간 반복적인 gefitinib 노출에 의한 gefitinib 내성 획득에 따라 HSC-3, HSC-4 세포 모두 휴지상태에서 지속적인 엑소좀 분비가 증가됨을 확인하였으나, 장기간의 gefitinib 노출에 의한 Hrs, Tsg101, Alix 등의 ESCRT machinery 유전자 발현 정도는 두 세포에서 각기 다른 양상을 나타냄

을 확인하였다. 또한, ESCRT machinery 과정에서 엔도솜 막 단백질의 유비퀴틴화는 필수적인데 이번 실험결과에서 보이듯이 gefitinib-민감성 세포에 비해 gefitinib-내성 세포에서 강한 유비퀴틴화 정도가 관찰되었다. HSC-4 세포는 HSC-3 세포에 비해 조직 전이성이 낮은 세포로 알려져 있으며, 본 실험결과를 통해 항암제 내성 획득에 따른 엑소솜 생성의 증가는 암 조직 전이성과 큰 연관성이 없을 수 있다는 가능성을 제시했다. 또한, 세포 내에서 생성된 엑소솜이 세포 밖으로 분비되는데 역할을 하는 synaptotagmin의 gefitinib-내성 세포 내 발현 증가는 항암제 내성 세포와 엑소솜 분비의 증가 사이에 상관관계가 있음을 시사한다. 다만, synaptotagmin에 의한 막 융합 과정은 세포 내 칼슘신호에 의해 정밀하게 조절되는 생리기전으로서 본 연구결과와 같이 외부 자극 없이 휴지상태에서 엑소솜의 분비가 증가되는 결과는 다소 모순된다는 것을 알 수 있다. 본 연구에서 다루지는 않았으나 추후 항암제 내성 획득 세포에서 휴지상태의 세포 내 칼슘신호의 변화를 분석할 필요성이 있다.

요약하면, 본 연구는 항암제의 지속적 노출에 의한 ESCRT machinery와 관련 단백질의 발현 정도는 에너지 대사 등의 세포 특성에 따라 다르게 유도되나, 최종적으로 항암제 내성 획득 세포주로부터 생성, 분비되는 엑소솜의 양은 공히 증가되었음을 확인해 주었다. 본 연구는 ESCRT machinery 요소들과 관련 단백질들은 엑소솜 생성 및 분비를 조절함으로써 구강암 전이 또는 내성 극복에 효율적인 전략을 제시할 수 있을 것으로 생각한다.

Funding

No funding to declare.

Acknowledgements

We would like to thank prof. Sung Dae Cho in Seoul National University, who has kindly gifted us oral squamous cell carcinoma cell-line, HSC-3 and HSC-4.

Conflicts of Interest

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

References

- Montero PH, Patel SG. Cancer of the oral cavity. *Surg Oncol Clin N Am* 2015;24:491-508. doi: 10.1016/j.soc.2015.03.006
- Kurihara-Shimomura M, Sasahira T, Nakashima C, Kuniyasu H, Shimomura H, Kirita T. The multifarious functions of pyruvate kinase M2 in oral cancer cells. *Int J Mol Sci* 2018;19:2907. doi: 10.3390/ijms19102907
- Sasahira T, Kurihara M, Yamamoto K, Ueda N, Nakashima C, Matsushima S, Bhawal UK, Kirita T, Kuniyasu H. HuD promotes progression of oral squamous cell carcinoma. *Pathobiology* 2014;81:206-14. doi: 10.1159/000366022
- Väyrynen O, Åström P, Nyberg P, Alahuhta I, Pirilä E, Vilen ST, Aikio M, Heljasvaara R, Risteli M, Sutinen M, Salo T. Matrix metalloproteinase 9 inhibits the motility of highly aggressive HSC-3 oral squamous cell carcinoma cells. *Exp Cell Res* 2019;376:18-26. doi: 10.1016/j.yexcr.2019.01.018
- Hino M, Kamo M, Saito D, Kyakumoto S, Shibata T, Mizuki H, Ishisaki A. Transforming growth factor- β 1 induces invasion ability of HSC-4 human oral squamous cell carcinoma cells through the Slug/Wnt-5b/MMP-10 signalling axis. *J Biochem* 2016;159:631-40. doi: 10.1093/jb/mvw007
- Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci* 2019;9:19. doi: 10.1186/s13578-019-0282-2
- Willms E, Johansson HJ, Mäger I, Lee Y, Blomberg KE, Sadiq M, Alaarg A, Smith CI, Lehtio J, El Andaloussi S, Wood MJ, Vader P. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Sci Rep* 2016;6:22519. doi: 10.1038/srep22519
- Larios J, Mercier V, Roux A, Gruenberg J. ALIX- and ESCRT-III-dependent sorting of tetraspanins to exosomes. *J Cell Biol* 2020;219:e201904113. doi: 10.1083/jcb.201904113
- Maacha S, Bhat AA, Jimenez L, Raza A, Haris M, Uddin S, Grivel JC. Extracellular vesicles-mediated intercellular communication: roles in the tumor microenvironment and anti-cancer drug resistance. *Mol Cancer* 2019;18:55. doi: 10.1186/s12943-019-0965-7
- Mashouri L, Yousefi H, Aref AR, Ahadi AM, Molaei F, Alahari SK. Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Mol Cancer* 2019;18:75. doi: 10.1186/s12943-019-0991-5
- Dong X, Bai X, Ni J, Zhang H, Duan W, Graham P, Li Y. Exosomes and breast cancer drug resistance. *Cell Death Dis* 2020;11:987. doi: 10.1038/s41419-020-03189-z
- Hu JL, Wang W, Lan XL, Zeng ZC, Liang YS, Yan YR, Song FY, Wang FF, Zhu XH, Liao WJ, Liao WT, Ding YQ, Liang L. CAFs secreted exosomes promote metastasis and chemotherapy resistance by enhancing cell stemness and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Mol Cancer* 2019;18:91. doi: 10.1186/s12943-019-1019-x
- Wang X, Zhang H, Yang H, Bai M, Ning T, Deng T, Liu R, Fan Q, Zhu K, Li J, Zhan Y, Ying G, Ba Y. Exosome-delivered circRNA promotes glycolysis to induce chemoresistance through

- the miR-122-PKM2 axis in colorectal cancer. *Mol Oncol* 2020;14:539-55. doi: 10.1002/1878-0261.12629
14. Zheng P, Chen L, Yuan X, Luo Q, Liu Y, Xie G, Ma Y, Shen L. Exosomal transfer of tumor-associated macrophage-derived miR-21 confers cisplatin resistance in gastric cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2017;36:53. doi: 10.1186/s13046-017-0528-y
 15. Ju Y, Bai H, Ren L, Zhang L. The role of exosome and the ESCRT pathway on enveloped virus infection. *Int J Mol Sci* 2021; 22:9060. doi: 10.3390/ijms22169060
 16. Zhang L, Yu D. Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2019;1871: 455-68. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.04.004
 17. Tucker WC, Chapman ER. Role of synaptotagmin in Ca²⁺-triggered exocytosis. *Biochem J* 2002;366(Pt 1):1-13. doi: 10.1042/BJ20020776
 18. Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, Baruteau J. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal* 2021;19:47. doi: 10.1186/s12964-021-00730-1
 19. Schmidt O, Teis D. The ESCRT machinery. *Curr Biol* 2012;22: R116-20. doi: 10.1016/j.cub.2012.01.028
 20. Peng H, Yang J, Li G, You Q, Han W, Li T, Gao D, Xie X, Lee BH, Du J, Hou J, Zhang T, Rao H, Huang Y, Li Q, Zeng R, Hui L, Wang H, Xia Q, Zhang X, He Y, Komatsu M, Dikic I, Finley D, Hu R. Ubiquitylation of p62/sequestosome1 activates its autophagy receptor function and controls selective autophagy upon ubiquitin stress. *Cell Res* 2017;27:657-74. doi: 10.1038/cr.2017.40
 21. Palacios-Ferrer JL, García-Ortega MB, Gallardo-Gómez M, García MÁ, Díaz C, Boulaiz H, Valdivia J, Jurado JM, Almazan-Fernandez FM, Arias-Santiago S, Amezcua V, Peinado H, Vicente F, Pérez Del Palacio J, Marchal JA. Metabolomic profile of cancer stem cell-derived exosomes from patients with malignant melanoma. *Mol Oncol* 2021;15:407-28. doi: 10.1002/1878-0261.12823
 22. Jouda A, McCarthy C, Fabre A, Keane MP. Exosomes: a new perspective in EGFR-mutated lung cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2021;40:589-601. doi: 10.1007/s10555-021-09962-6
 23. Löffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G, Stocsits C, Hacker-müller J, Kretzschmar AK, Burger R, Gramatzki M, Blumert C, Bauer K, Cvijic H, Ullmann AK, Stadler PF, Horn F. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood* 2007;110:1330-3. doi: 10.1182/blood-2007-03-081133
 24. Pessolano E, Belvedere R, Bizzarro V, Franco P, Marco I, Porta A, Tosco A, Parente L, Perretti M, Petrella A. Annexin A1 may induce pancreatic cancer progression as a key player of extracellular vesicles effects as evidenced in the in vitro MIA PaCa-2 model system. *Int J Mol Sci* 2018;19:3878. doi: 10.3390/ijms19123878
 25. Zhu X, Shen H, Yin X, Yang M, Wei H, Chen Q, Feng F, Liu Y, Xu W, Li Y. Macrophages derived exosomes deliver miR-223 to epithelial ovarian cancer cells to elicit a chemoresistant phenotype. *J Exp Clin Cancer Res* 2019;38:81. doi: 10.1186/s13046-019-1095-1
 26. Keklikoglou I, Cianciaruso C, Güç E, Squadrito ML, Spring LM, Tazzyman S, Lambein L, Poissonnier A, Ferraro GB, Baer C, Cassarà A, Guichard A, Iruela-Arispe ML, Lewis CE, Coussens LM, Bardia A, Jain RK, Pollard JW, De Palma M. Chemotherapy elicits pro-metastatic extracellular vesicles in breast cancer models. *Nat Cell Biol* 2019;21(2):190-202. doi: 10.1038/s41556-018-0256-3
 27. Han QF, Li WJ, Hu KS, Gao J, Zhai WL, Yang JH, Zhang SJ. Exosome biogenesis: machinery, regulation, and therapeutic implications in cancer. *Mol Cancer* 2022;21:207. doi: 10.1186/s12943-022-01671-0
 28. Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci* 2018;75:193-208. doi: 10.1007/s00018-017-2595-9