

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11872

研究課題名(和文) ヒト3次元組織体モデルを用いた口腔癌の浸潤・転移機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of invasion and metastasis in oral cancer using human a three-dimensional cultured tissue model

研究代表者

岩井 聡一 (Iwai, Soichi)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：10362675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌の浸潤・転移のメカニズムの解明は、治療薬開発に繋がる重要な研究である。これまで癌細胞の遊走・浸潤過程を、実験動物への癌細胞の移植実験、2次元培養法による解析を進めてきた。しかし、動物実験は、異種移植となりヒト組織内環境を反映せず、2次元培養法による解析は3次元生体組織を反映していない点がある。我々は、新開発した血管及びリンパ管様組織を伴ったヒト3次元組織体モデルを癌細胞の浸潤・遊走の解析に用い、従来の解析方法と比較して、より生体に近い解析方法であることを示した。さらに、3次元組織体に上皮細胞を積層し、口腔粘膜上皮を模倣した組織体を開発した。これは癌の浸潤を解析する有用なツールとなり得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌の浸潤・転移のメカニズムの解明は、がんの治療薬開発に繋がる重要な研究である。今まで癌細胞の遊走・浸潤過程を、実験動物への癌細胞の移植実験や2次元培養法による解析を進めてきた。しかし、動物実験は異種移植でありヒト組織内環境を反映せず、2次元培養法による解析は3次元生体組織を反映していない点がある。我々が開発した血管及びリンパ管様組織を伴ったヒト3次元組織体モデルを癌細胞の浸潤・遊走の解析に用い、従来の方法と比較して、より生体に近い解析方法であることを示すことができた。さらに、3次元組織体に上皮細胞を積層し、口腔粘膜上皮を模倣した組織を開発した。これは癌浸潤を解析する有用なツールとなり得る。

研究成果の概要(英文)：Preventing cancer metastasis requires a thorough understanding of cancer cell invasion. In vivo transplantation in animals is typically have some problems. In vitro conventional analysis of migration/invasion ability based on 2D culture methods may not reflect actual events that occur in living tissues, because these phenomena occur in human 3D living tissues.

We developed a human cell-based 3D-cultured tissue constructs with blood/lymphatic capillaries that imitate in vivo human tissue organization by which it can be used to analyze the invasion of human oral squamous cell carcinoma cells. This system allowed detailed analysis of cancer cell migration and invasion in an environment that mimics actual human tissue. Moreover, we developed further the construction of epithelialized 3D-cell cultured tissue system. The constructed epithelialized 3D cell culture system with blood capillaries are useful for vitro/ex vivo research models of the analysis of tumor cell invasion.

研究分野：口腔外科

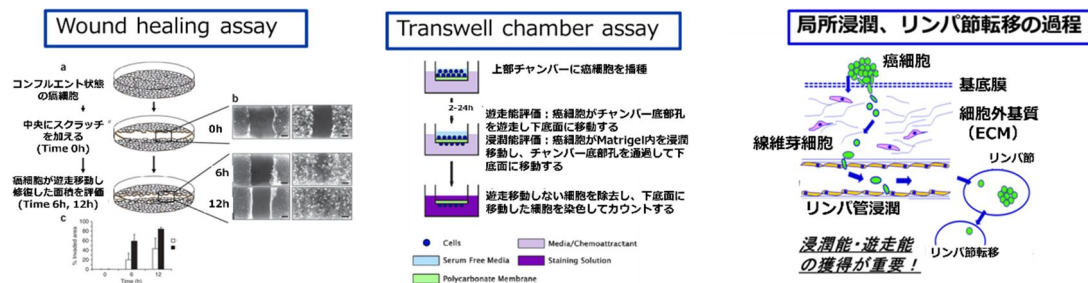
キーワード：ヒト3次元組織体モデル 癌の浸潤・転移 組織工学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の治療において、局所再発・頸部リンパ節転移・遠隔転移を制御することが重要である。局所浸潤・転移過程は多段階から成り立っているが、癌細胞の周囲組織への遊走及び浸潤、血管やリンパ管への浸潤過程が重要となる。我々は、これまで Wnt シグナル伝達系が、癌細胞の遊走能、浸潤能等に関与しているか解析を進めてきた。口腔扁平上皮癌において、 β -カテニンの細胞質、核への集積が認めること(*1 Iwai S et al. J Cancer Res Clin Oncol 2005, 131:773-782.)、一方 β -カテニン経路以外に、Rho family を介して細胞運動に影響を及ぼす PCP 経路、PKC や CaMKII などを活性化する Ca^{2+} 経路が細胞の遊走・浸潤に関与することを報告した。(*2 Iwai S et al. Int J Oncol 2010, 37:1095-1103.) さらに Wnt5b が β -カテニン非依存性経路を介して、遊走能・浸潤能を亢進することを明らかにした。(*3 Takeshita A, Iwai S et al. Int J Oncol 2014, 44:59-68.)

一連の研究において、癌細胞の遊走・浸潤過程を、in vivo ではマウス等の実験動物への移植実験、in vitro では従来の 2 次元培養法による解析を進めてきた。しかしながら、マウス等の動物へのヒト癌細胞の移植実験は異種移植であり、また動物の個体差の問題、個体数の制限の問題なども生じてくる。一方、従来の 2 次元培養法による Wound healing assay や Transwell chamber assay/ Matrigel chamber assay 方法は、現象を単純化して解析する意味で非常に有意義な解析方法であるが、ヒト 3 次元生体組織中の現象を必ずしも反映しないリスクを持っている。



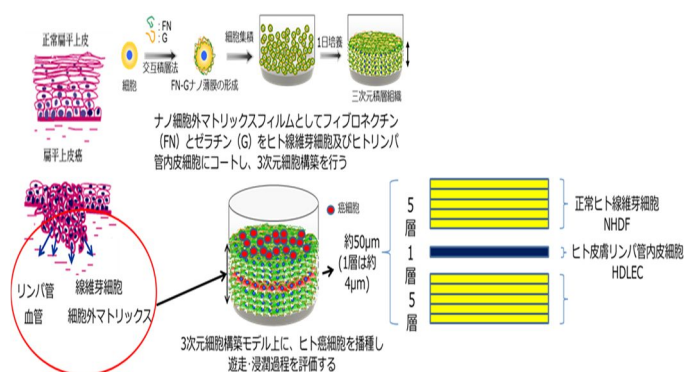
接着細胞は生体において 3 次的に構築されており、細胞間相互作用や細胞—細胞外マトリックス相互作用という環境に置かれている。従来の 2 次的な単層培養では必ずしも生体における生理的機能を再現しえず、近年多くの 3 次元組織体構築の試みがなされている。岡野光夫らの研究グループは、血管床を利用したがん細胞シート 3 次元組織モデルを開発している。(*4 Sakaguchi K et al. Sci. Rep. 2013, 3) しかし、3 次元組織体モデルを使用して、生体の遊走・浸潤過程を解析した報告は少なく、特に口腔扁平上皮癌細胞ではまだ報告はない。

2. 研究の目的

大阪大学工学研究科の明石満、松崎典弥らは細胞外マトリックス(ECM)の成分であるフィブロネクチン(F)とゼラチン(G)を交互積層法によりナノレベルでコートした細胞を立体的に培養し、3 次元組織体モデルの開発を行ってきた。また、リンパ管及び血管ネットワークを構築し、より生体に近い環境を開発しつつある。(*5 Nishiguchi A et al. Adv. Mater. 2011.23.3506-10)

我々はこの 3 次元生体組織を模倣したヒト 3 次元組織体モデルを用いて、従来行われてきた解析方法に比べて、より生体に近い癌細胞の遊走・浸潤過程を解析するシステムを確立する。

< 口腔扁平上皮癌細胞が線維化細胞、細胞外マトリックス、リンパ管等を含む 3 次元ヒト生体組織中を浸潤する過程を模倣した 3 次元組織体モデル >



3. 研究の方法

(1) 高転移能株を複数の口腔扁平上皮癌株で作成し、in vivo でのリンパ節転移能及び in vitro での遊走能、浸潤能を解析する。遊走、浸潤に関連する Wnt シグナル経路の因子を同定する。

ヒト低分化型舌扁平上皮癌由来細胞株 SAS に緑色蛍光タンパク質 (GFP) 発現ベクターを導入した SAS-GFP と SAS-GFP をマウス舌に接種し、リンパ節転移形成後、再び in vitro に分離する in vivo selection を繰り返すことにより、高転移能株 SAS-LM8 を獲得した。細胞特異性現象を否定するために、他の口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3,4, KB, Ca9-22 等においても、高転移能株を獲得する。これら多数の高転移能株において in vivo でのマウスの頸部リンパ節転移実験、in vitro での遊走能、浸潤能解析を行い、生物学的特性と β -カテニン経路および β -カテニン非依存性経路の活性化の変化を解析し、Wnt シグナル経路の因子を同定する。

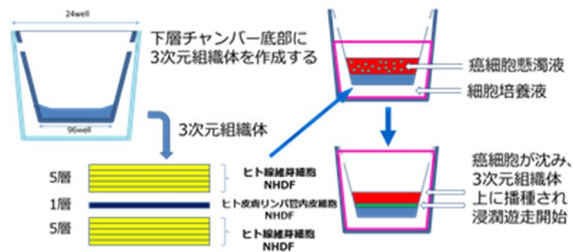
(2) 新しい 3 次元生体構築モデルを用いて、口腔扁平上皮癌の転移能・浸潤能の解析し、浸潤過程におけるタンパク質発現、遺伝子発現を同定する。

明石、松崎らの開発した細胞集積法を用いて、下底に $0.4 \mu\text{m}$ の小孔を有するメンブレンが張られた 24 well カルチャープレートのインサート内に、正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF)10 層にヒト皮膚リンパ管内皮細胞 (HDLEC)1 層をサンドイッチした構造、即ち NHDF:HDLEC:NHDF を 5:1:5 で有する 3 次元組織体を構築する。この上に癌細胞を播種し、下底まで癌細胞が遊走・浸潤し到達する効率を測定すると同時に浸潤する過程において時期特異的に発現するタンパク質、遺伝子を同定する。(1)において、高転移能株において有意に発現の差を認められた Wnt シグナル経路関連因子等について、3 次元生体構築モデルの浸潤途中の組織標本を作成し、その発現を解析することによって、生体における浸潤過程で発現機能する因子を同定する。

(3) 3 次元生体組織モデルにおいて、より生体に近いリンパ管、血管ネットワークを構築する。それにより、癌細胞がリンパ管や血管に浸潤する過程を解析する。

3 次元生体構築モデル中に、HDLEC やヒト血管内皮細胞 (HUVEC) 等を培養し、管腔形成させたリンパ管或いは血管ネットワークを作成する。より管腔を長く分枝したネットワークを開発する。

癌細胞がリンパ管・血管に遊走し、浸潤する過程を解析し、発現機能する因子を同定する。



(4) 口腔扁平上皮組織を作成する。

ヒト3次元真皮組織体モデルの上に、ヒトケラチノサイトを播種、培養し、ヒト3次元口腔粘膜モデルを作製する。上皮組織上に癌細胞が浸潤するモデルを作成する。

4. 研究成果

(1) 口腔扁平上皮癌株から複数の高転移能株を作成し、in vivo でのリンパ節転移能及び in vitro での遊走能、浸潤能を解析した。ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株 SAS 及び HSC-3 に in vivo selection を繰り返すことにより、高転移能株 SAS-LM8、HSC-LM3 を獲得した。これらの高転移能株において in vivo でのマウスの頸部リンパ節転移実験、in vitro での遊走能、浸潤能解析を行い、生物学的特性を解析した。癌微小環境において、Wnt シグナル経路のリガンドとして作用する Wnt5b は、migration assay, invasion assay にて、遊走能および浸潤能を増強した。間葉細胞マーカーである vimentin および N-cadherin の mRNA の発現の上昇を認めた。

(2) 新しいヒト3次元生体組織モデルを作成し、口腔扁平上皮癌の浸潤能を解析した。この組織体上にヒト口腔癌細胞を播種し、下底まで癌細胞が遊走・浸潤し到達する過程を観察した。この3次元生体組織モデルを用いた、癌細胞の浸潤解析の結果は、in vivo 及び従来の2次元培養に基づく遊走・浸潤能の解析法の結果と矛盾せず、さらに、細胞蛍光染色法による癌細胞が遊走・浸潤する過程を明視化することができた。この結果、ヒト3次元組織モデルが、in vivo に近い、癌細胞の浸潤過程を解析する有用なモデルとなりうることを示すことができた。このシステムを使用して、浸潤に関連する因子の発現を解析した。

これらの成果は、Iwai S., Kishimoto S., et al Journal of Biomedical Materials research Part A, 107, 292-300, 2018. に掲載した。

(3) 口腔扁平上皮組織の作成を行った。さらに、ヒト3次元真皮組織体モデルの上に、ヒトケラチノサイトを播種、培養し、ヒト3次元上皮モデルを作製することに成功した。さらに、口腔粘膜由来のケラチノサイトと口腔粘膜由来の線維芽細胞を使用し、口腔粘膜上皮モデルを作成した。さらに、上皮組織上に癌細胞が浸潤する過程を観察することが可能となった。これらの成果の一部は、Nishiyama K., Akagi T., Iwai S., Akashi M. Tissue Engineering, Part C Methods, 25, 262-275, 2019 に掲載した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Iwai Soichi, Kishimoto Satoko, Amano Yuto, Nishiguchi Akihiro, Matsusaki Michiya, Takeshita Akinori, Akashi Mitsuru	4. 巻 107
2. 論文標題 Three-dimensional cultured tissue constructs that imitate human living tissue organization for analysis of tumor cell invasion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part A	6. 最初と最後の頁 292 ~ 300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.a.36319	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iwai Soichi, Kishimoto Satoko, Amano Yuto, Nishiguchi Akihiro, Matsusaki Michiya, Takeshita Akinori, Akashi Mitsuru	4. 巻 -
2. 論文標題 Three-dimensional cultured tissue constructs that imitate human living tissue organization for analysis of tumor cell invasion	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research PartA	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.a.36319	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishiyama K., Akagi T., Iwai S., Akashi M.	4. 巻 25
2. 論文標題 Construction of Vascularized Oral Mucosa Equivalents Using a Layer-by-layer Cell Coating Technology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tissue Engineering, Part C Methods	6. 最初と最後の頁 262-275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ten.TEC.2018.0337	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 西山今日子、岩井聡一、岸本聡子、松崎典弥、赤木隆美、明石 満
2. 発表標題 脈管系を含む三次元生体組織モデルを用いた口腔扁平上皮癌の遊走・浸潤能の解析
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Soichi Iwai, Satoko Kishimoto, Kyoko Nishiyama, Michiya Matsusaki, Takami Akagi, Mitsuru Akashi
2. 発表標題 Novel analysis of cancer cell invasion using a three-dimensional cultured tissue model mimics human tissue organization
3. 学会等名 EACR25 Amsterdam Netherland (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kyoko Nishiyama, Soichi Iwai, Satoko Kishimoto, Narikazu Uzawa, Mitsuru Akashi
2. 発表標題 Analysis of tumor cell invasion using three-dimensional cultured tissue model with blood/lymph-capillaries network
3. 学会等名 第77回日本癌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Soichi Iwai, Satoko Kishimoto, Kyoko Nishiyama, Michiya Matsusaki, Takami Akagi, Mitsuru Akashi
2. 発表標題 Novel analysis system of cancer cell invasion using a three-dimensional cultured tissue model mimics human tissue organization.
3. 学会等名 EACR-AACR-ISCR Conference The cutting Edge of Contemporary Cancer Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西山今日子、岩井聡一、赤木隆美、明石満
2. 発表標題 細胞コーティング技術を用いた三次元培養口腔歯肉・粘膜モデルの開発
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩井聡一、岸本聡子、西山今日子、濱田正和、松崎典弥、明石満
2. 発表標題 ヒト組織を模倣したリンパ管ネットワーク付き3次元組織体による口腔扁平上皮癌の遊走能、浸潤能の解析
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西山今日子、岩井聡一、岸本聡子、松崎典弥、赤木隆美、明石満
2. 発表標題 脈管系を含む三次元生体組織モデルを用いた口腔扁平上皮癌の遊走・浸潤能の解析
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西山今日子、岩井聡一、赤木隆美、明石満
2. 発表標題 細胞コーティング技術を用いた脈管系を含む三次元口腔粘膜モデルの構築
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西山今日子、岩井聡一、岸本聡子、森田祥弘、竹下彰範、鶴澤成一
2. 発表標題 ヒト生体組織を模倣した三次元組織体を用いた口腔扁平上皮癌の浸潤能の解析
3. 学会等名 第38回日本口腔腫瘍学会学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----