

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09799

研究課題名（和文）舌癌PDXモデルの確立と前臨床応用に関する検討

研究課題名（英文）Establishment of tongue cancer PDX model and study on preclinical application

研究代表者

菅原 圭亮 (Sugahara, Keisuke)

東京歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：10506926

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：新規治療開発のために、患者舌癌手術検体を用いたPDXモデルを樹立することを目的に研究を行ってきた。また、癌内線維芽細胞（CAFs）が癌細胞の浸潤、転移の促進や治療抵抗性獲得に関与にも注目した。

舌癌PDXモデルの樹立については舌への同所移植を容易にするために患者癌塊をNOGマウスの皮下に移植することを試み、患者舌癌切除検体をマトリゲルとともにNOGマウスの皮下に移植した。同時にCAFsをprimary cultureした。半年後に皮下で増殖した癌をCollagenaseで消化しsingle cell suspensionを作製し、新たなNOGマウス舌部にCAFsあるいは線維芽細胞を共移植した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌治療における外科療法は、術後の食事摂取や会話を困難にし、患者のQOLを著しく低下させる。また化学療法・放射線療法の効果も現行の治療では非常に限られており、根治的治療の開発が望まれる。本申請研究は舌癌悪性化の原因を解明することの前臨床応用のきっかけとなった。

研究成果の概要（英文）：For the development of novel tongue cancer therapies, we have been working to establish a PDX model using patient tongue cancer surgical specimens. We also focused on the involvement of intra-cancer fibroblasts (CAFs) in promoting cancer cell invasion, metastasis, and resistance to therapy.

To establish a PDX model of tongue cancer, we attempted to transplant a patient's cancer mass into the subcutaneous tissues of NOG mice to facilitate orthotopic transplantation to the tongue. Simultaneously, CAFs were primary cultured. Six months later, the subcutaneously grown carcinoma was digested with collagenase to produce a single cell suspension, and CAFs or fibroblasts were co-transplanted into the tongue of a new NOG mouse.

研究分野：分子生物学

キーワード：口腔がん 舌癌 PDXモデル CAFs

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔癌、特に舌癌における外科療法は、術後の食事摂取や会話を困難にし、患者の QOL を著しく低下させる。また化学療法・放射線療法の効果も現行の治療では非常に限られており、根治的治療の開発が望まれる。舌癌は口腔がんの中で最も多く、舌は口腔機能の多くを司るため舌癌悪性化の原因を解明することが望まれる。

2. 研究の目的

患者舌癌由来 CAFs を抽出し、舌癌との共移植系 PDX モデルを確立する。さらに CAFs が口腔癌の浸潤、転移や薬剤抵抗性に与える影響を解明し、CAFs と舌癌の相互作用を媒介する遺伝子やシグナルを同定し、新規治療法の基礎を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

舌癌 PDX モデルの樹立

舌部への同所移植を容易にするためにまず患者癌塊を NOG マウスの皮下に移植することを試みる。患者舌癌切除検体 (直径 7 mm 程度) をマトリゲル® (Falcon) とともに NOG マウスの皮下に移植する。同検体より同時に CAFs を primary culture する。対照の正常線維芽細胞は舌の非癌部より抽出する。数か月後、皮下で増殖した癌塊を collagenase で消化し single cell suspension を作製し、新たな NOG マウスの舌部に CAFs あるいは対照線維芽細胞と共に移植する。マウスの舌が小さい為、移植が困難な場合は、数種類の注入針のサイズ (23~30G) を検討し、細胞に与えるダメージを最小化しかつ最も細い注射針を用いる。NOG マウスに同所移植後 6 か月間経過を観察し、原発巣の増殖や転移の有無を評価する。

口腔癌組織より CAFs の分離および舌癌 PDX との共移植系の確立

申請者らは、先行研究で PDX 由来大腸癌細胞と CAFs の共移植モデルを作製し、対照の非癌部由来線維芽細胞が移植された場合と比較し、CAFs が優位に肝臓や肺への転移を促進することを明らかにした。申請研究では、舌癌由来 CAFs あるいは対照の非癌部由来線維芽細胞と移植された舌癌塊の増殖能、partial EMT および遠隔臓器への転移能に関して、各グループ間で比較する。申請者は CAFs が癌塊に存在することにより、近傍の癌細胞に partial EMT を誘導し、転移形成を促進することを予測している。また、マウスより定期的な採血を行い、サイトスピンを用いて血液スメアを作成する。Partial EMT を有した E-cadherin 陽性癌細胞クラスターが血中に存在しているか否かを上皮系癌細胞のマーカーである E-cadherin や間葉系癌細胞のマーカーである ZEB1, vimentin や fibronectin に対する抗体を使用した免疫組織染色を用いて調査する。CTCs における上皮系および間葉系マーカー発現が陽性の癌細胞クラスターが検出された場合は、partial EMT を支持する結果となりえる。

CAFs の癌転移促進作用や治療抵抗性獲得の分子機構を解明する為に、舌癌由来 CAFs あるいは対照の非癌部由来線維芽細胞と移植された舌癌塊より癌 organoids を培養する。申請者らは癌 organoids 培養に精通している。これらの organoids より RNA を抽出し DNA マイクロアレイ解析を施行し、各グループ間で遺伝子発現を比較する。

CAFs による舌癌浸潤・転移促進や治療抵抗性に関するメカニズムの調査

DNA マイクロアレイ解析にて同定された上位 5 つの遺伝子の発現を shRNA を用いて抑制する。また、ZEB1 および E-cadherin に対する shRNA を導入した口腔癌 PDX 由来 organoid を作成し、NOG マウスに移植後、転移の有無を観察する。申請者は、EMT 誘導転写因子である ZEB1 の発現が癌細胞の原発巣よりの局所浸潤や遠隔臓器に播種した癌細胞の tumor initiating ability を維持することに重要であることを推測している。E-cadherin の発現も遠隔臓器に播種した癌細胞の colonization に必須であることを予測している。以上より、CAFs により E-cadherin および ZEB1 陽性の partial EMT を有した癌細胞が誘導され、転移形成能を顕著に亢進することが予測される。

CAFs が治療抵抗性に寄与しているか否かを調査するために、CAFs あるいは対照非癌部由来線維芽細胞と移植された舌癌塊より抽出された organoids を使用する。これらの organoids にセツキシマブやシスプラチンを添加し、in vitro の細胞増殖能や in vivo 癌形成能を、各群で比較する。CAFs と移植された舌癌塊より抽出された organoids で薬剤抵抗性が増強していることが予測される。また、partial EMT の抑制が、治療抵抗性を改善するか否かを調査する。CAF と共移植された舌癌 PDX 由来 organoids に ZEB1, E-cadherin および上記で同定された遺伝子に対する

る shRNA を発現させ、NOG マウスに同所移植後、セツキシマブやシスプラチンを投与し、原発巣や転移巣の程度を比較検討する。

4 . 研究成果

今後の舌癌の新規治療開発に役立てるために、患者舌癌手術検体を用いた patient-derived tumor xenograft (PDX)モデルを樹立することを目的に研究を行ってきた。また、舌癌間質に多く存在する癌内線維芽細胞 (CAFs)は癌細胞の浸潤、転移の促進や治療抵抗性獲得に関与しているが、その分子機構はまだ不明な点が多いことにも注目した。PDX モデルの樹立および癌患者よりの CAFs の抽出を行い、CAFs がヒト乳癌や大腸癌細胞の増殖、浸潤や転移を促進する事を明らかにした実績がある。申請研究では、患者舌癌由来 CAFs を抽出し、舌癌との共移植系 PDX モデルを確立する。さらに CAFs が口腔癌の浸潤、転移や薬剤抵抗性に与える影響を解明し、CAFs と舌癌の相互作用を媒介する遺伝子やシグナルを同定し、新規治療法の基礎を確立する。舌癌 PDX モデルの樹立については舌への同所移植を容易にするために患者癌塊を NOG マウスの皮下に移植することを試み、患者舌癌切除検体をマトリゲルとともに NOG マウスの皮下に移植した。同検体より同時に CAFs を primary culture した。半年後に皮下で増殖した癌を Collagenase で消化し single cell suspension を作製し、新たな NOG マウス舌部に CAFs あるいは線維芽細胞とともに移植した。今後は、CAFs による舌癌浸潤・転移促進や治療抵抗性に関するメカニズムについて DNA マイクロアレイ解析を行う。ZEB1 および E-cadherin に対する shRNA を導入した口腔癌 PDX 由来 organoid を作成し、NOG マウスに移植後、転移の有無を観察していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kiyohiro Kasahara, Keisuke Sugahara, Tomohiro Yamauchi, Hiroki Bessho, Chiharu Ogawa, Kenichi Matsuzaka, Akira Katakura	4. 巻 20
2. 論文標題 Therapeutic Effects of Green Tea Catechin Ointment on Oral Leukoplakia and Its Penetration into the Oral Mucosa	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Oral-Med Sci	6. 最初と最後の頁 57-67
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5466/ijoms.20.57	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 K. Munakata, H. Miyashita, T. Nakahara, H. Shiba, K. Sugahara, A. Katakura, T. Nakagawa	4. 巻 -
2. 論文標題 The use of SPECT/CT to assess resorptive activity in mandibular condyles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	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） 10.1016/j.ijom.2021.11.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sugahara K, Koyama Y, Koyachi M, Matsunaga S, Odaka K, Kitamura K, Nakajima K, Matsuzaka K, Abe S, Katakura A.	4. 巻 20
2. 論文標題 Relationship between the immunohistological examination and fluorescence visualization of oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters.	6. 最初と最後の頁 2153-2160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Sugahara K, Koyachi M, Koyama Y, Sugimoto M, Matsunaga S, Odaka K, Abe S, Katakura A	4. 巻 11
2. 論文標題 Mixed Reality and Three-Dimensional Printed Models for resection of maxillary tumor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Quantitative Imaging in Medicine and Surgery	6. 最初と最後の頁 2187-2194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Masayuki Takano, Keisuke Sugahara, Masahide Koyachi, Yu Koyama, Kento Odaka, Satoru Matsunaga, Shinya Homma, Shinichi Abe, Akira Katakura, Takahiko Shibahara	4. 巻 41
2. 論文標題 Maxillary reconstruction using tunneling flap technique with 3D custom-made titanium mesh plate and particulate cancellous bone and marrow graft: a case report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Maxillofac Plast Reconstr Surg	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40902-019-0228-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 菅原圭亮、片倉 朗	4. 巻 72
2. 論文標題 口腔顎顔面領域におけるデジタルファブリケーション-3Dプリンタ・Mixed Reality技術の応用-	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本歯科医師会雑誌	6. 最初と最後の頁 31-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugahara K, Katsumi Y, Koyachi M, Koyama Y, Matsunaga S, Odaka K, Abe S, Takano M, Katakura A.	4. 巻 40
2. 論文標題 Novel condylar repositioning method for 3D-printed models.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Maxillofac Plast Reconstr Surg	6. 最初と最後の頁 143-147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40902-018-0143-7. eCollection 2018 Dec.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Sugahara K, Koyama Y, Katakura A
2. 発表標題 "Relationship between the immunohistological examination and fluorescence visualization of oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 66th JSOMS Congress Clinical & Translational Research on Oral Cancer
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 12.Takumi Koyama, Yoshihiro Mezawa, Kazunari Yamashita, Zixu Wang, Atsushi Takano, Yohei Miyagi, Tomoyuki Yokose, Toshinari Yamashita, Yuu Koyama, Keisuke Sugahara, Yataro Daigo, Akira Katakura, Akira Orimo
2. 発表標題 FOXO1 expression mediates activated, tumor-promoting traits in CAFs.
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takumi Koyama, Yoshihiro Mezawa, Yu Koyama, Keisuke Sugahara, Akira Katakura, Akira Orimo
2. 発表標題 Forkhead box protein O1 mediates tumor-promoting ability in carcinoma-associated fibroblasts via regulating both myofibroblastic and inflammatory traits
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yu Koyama, Yoshihiro Mezawa, Yasuhiko Ito, Takumi Koyama, Keisuke Sugahara, Okio Hino, Akira Katakura, and Akira Orimo
2. 発表標題 RUNX3 expression mediates TGF- and SDF-1 autocrine signaling in human breast CAF myofibroblasts
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takumi Koyama, Yoshihiro Mezawa, Yu Koyama, Yasuhiko Ito, Keisuke Sugahara, Okio Hino, Akira Katakura, and Akira Orimo
2. 発表標題 Forkhead box protein O1 mediates the activated myofibroblastic state in carcinoma-associated fibroblasts
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiyohiro Kasahara, Keisuke Sugahara, Masahide Koyachi, Mayu Shin, Yu Koyama, Kento Odaka, Satoru Matsunaga, Shinichi Abe, Akira Katakura
2. 発表標題 Technical report of Le Fort I osteotomy using Microsoft®HoloLens and 3D devices
3. 学会等名 ADT2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keisuke Sugahara, Masahide Koyachi, Kento Odaka, Satoru Matsunaga, Shinichi Abe, Akira Katakura
2. 発表標題 Surgical Application of 3D devices and Mixed Reality in Oral and Maxillofacial Surgery
3. 学会等名 ADT2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yu Koyama, Shiori Sakayori, Yasuhiko Ito, Yoshihiro Mezawa, Takumi Koyama, Keisuke Sugahara, Okio Hino, Akira Katakura, and Akira Orimo
2. 発表標題 RUNX3 expression mediates TGF- and SDF-1 autocrine signaling in human breast CAF myofibroblasts
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keisuke Sugahara, Yu Koyama, Kei Kitamura, Kei Nakajima, Kenichi Matsuzaka, Kento Odaka, Satoru Matsunaga, Shinichi Abe, Akira Katakura
2. 発表標題 Histopathological verification of fluorescence images of the oral mucosa
3. 学会等名 24th Congress of the European Association for Cranio Maxillo Facial Surgery (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masahide Koyachi, Keisuke Sugahara, Mayu Shin, Yu Koyama, Kiyohiro Kasahara, Kento Odaka, Satoru Matsunaga, Shinichi Abe, Akira Katakura
2. 発表標題 Technical report of Le Fort I osteotomy using Microsoft®; HoloLens and 3D devices
3. 学会等名 24th Congress of the European Association for Cranio Maxillo Facial Surgery (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kento Odaka, Satoru Matsunaga, Masahito Yamamoto, Masahide Koyachi, Keisuke Sugahara, Akira Katakura, Shinichi Abe
2. 発表標題 Application of novel techniques to transfer the position designed at virtual operation by assembling additive manufactured devices in Le Fort I osteotomy
3. 学会等名 24th Congress of the European Association for Cranio Maxillo Facial Surgery (国際学会)
4. 発表年 2018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
研究分担者	片倉 朗 (Katakura Akira) (10233743)	東京歯科大学・歯学部・教授 (32650)	
研究分担者	折茂 彰 (Orimo Akira) (70275866)	順天堂大学・大学院医学研究科・教授 (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------