

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16329

研究課題名（和文）舌がんの代謝解析による新たな治療戦略の開発

研究課題名（英文）Metabolic analysis of tongue cancer to develop new therapeutic strategies

研究代表者

村上 翔子（Murakami, Shoko）

滋賀医科大学・医学部・医師（非常勤）

研究者番号：50773975

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：舌がん代謝を解明するため、従来からの2D培養群(2D)、新規3D培養系を用いた3D培養群(3D)、異種移植群(xenograft)の3群で網羅的代謝解析を行った。その結果2Dと3Dでは舌がん代謝は大きく異なっていた。3Dの代謝物の多くはxenograftの代謝物と類似していた。3Dではミトコンドリア機能は障害されておらず、3Dとxenograftでは細胞増殖を促進するように代謝性変化が起きていた。一方、2Dでは生体とは異なる条件下で生き抜くため特殊な代謝が行われていることが示唆された。生体がん組織の形態と機能を模倣することができる3Dの代謝解析では、過去のがん代謝の理論に合った結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

3Dとxenograftでは、がん細胞は、グルコースなどの栄養素を用いて解糖系やクエン酸回路を活発に利用することにより、バイオマスの生合成と酸化的リン酸化によるエネルギー産生、酸化還元バランスの維持を行っていることが明らかとなった。本3D培養系は形態だけでなく、機能的にもバイオマス生合成とエネルギー産生の面で、生体に近い状態を再現できた。本3D培養系は極めて新規性の高い、がん研究において重要な実験ツールであると考えられた。今後は本3D培養系を応用して抗がん剤のターゲットとなりうるがん代謝関連酵素の同定が期待できる。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the metabolism of tongue cancer, we performed comprehensive metabolic analysis in three groups: a conventional 2D culture group (2D), a 3D culture group using a novel 3D culture system, a “tissueoid cell culture system” (3D), and a xenograft group in which tongue cancer cells were xenografted into nude mice. The results showed that tongue cancer metabolism differed significantly between 2D and 3D; many metabolites in 3D were similar to those in xenografts; mitochondrial function was not impaired in 3D, and metabolic reprogramming occurred to promote cell proliferation in 3D and xenografts. On the other hand, 2D underwent specialized metabolism to survive under conditions different from those in vivo. Metabolic analysis of 3D, which can mimic the morphology and function of living cancer tissue, yielded results consistent with previously reported theories of cancer metabolism.

研究分野：腫瘍生物学関連

キーワード：がん代謝 舌がん 3次元培養

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん細胞の代謝性変化は、形質転換や腫瘍成長に寄与している。がん代謝を理解することにより、基本的ながん病態生理学を理解することができる。*in vitro* の実験モデルとして、従来からの2D培養があり、簡便で容易に使用できるが、細胞は生体とは違った構造や機能を示すことが報告されてきた。一方、生体に近い環境を再現できる3D培養系は、経済面や倫理面から動物実験の代替となりうると期待されている。最近では、細胞外基質を用いた3D培養系、がんオルガノイド系などが報告されている。本研究では、足場としてCellbed™(Japan Vilene Co., Tokyo)を使った新たな3D培養系“tissueoid cell culture system”を用いた。Cellbed™は超微細シリカファイバーでできた線維集合体であり、その格子状構造は、生体の疎性結合組織の組織骨格に類似している(文献)。この空隙を通して、細胞は自由に移動できるため、生体に近い立体構造を呈する。細胞外基質を使用せず、純粋ながん細胞のみを取り扱うために、純粋ながん細胞から代謝物を抽出し、解析に使用することができる。本研究では、本3D培養系を用いて舌がんの代謝解析を行い、舌がん代謝を明らかにすることにより、新規治療戦略の開発を目指した。

2. 研究の目的

本研究では、舌がん代謝を解明するために、従来からの2D培養群(以下、2D)、tissueoid cell culture systemを用いた3D培養群(以下、3D)、舌がん細胞をヌードマウスに異種移植したxenograft群(以下、xenograft)の3群を作成し、網羅的な代謝解析を行った。生体組織に近いxenograftを基準とし、3群の代謝物の類似点と相違点を比較検討した。さらに、がん細胞の増殖、腫瘍生長に必要な不可欠なミトコンドリア代謝に注目し、ミトコンドリア機能解析を行った。

3. 研究の方法

細胞株は、舌扁平上皮癌(HSC-3, HSC-4, SCC-4, SCC-15)を用いた。動物実験は本学動物実験委員会の承認を得て行った。3群で最終細胞数が等しくなるよう調整し、代謝解析をヒューマン・メタローム・テクノロジーズに委託した。HE染色、ウェスタンブロット解析は、過去の報告(文献)に準じて行った。細胞外フラックス解析は、2Dと3Dで最終細胞濃度が等しくなるよう調整し、XF24[®]細胞外Flux analyzer(Seahorse Bioscience, North Billerica, MA)を用いて行った。統計解析は、代謝解析のみWelchのt検定を用い(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)、それ以外はstudent's t-testを用いた(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

4. 研究成果

(1) HE染色: 2Dではすべての細胞株で単層構造が認められた。3Dでは高分化型の細胞株(HSC-4, SCC-15)で扁平上皮癌に特徴的な層構造や異常角化が確認できた。xenograftではすべての細胞株でシート様構造が認められ、高分化型(HSC-4, SCC-4, SCC-15)では低分化型(HSC-3)より大きな腫瘍胞巣が確認できた(図1)。

(2) 代謝解析

主成分解析

2Dでは3D, xenograftと異なり、ほとんどのプロットが狭い範囲に集まっていた(図2)。3Dとxenograftのプロットでは、それぞれの細胞株がグループ化していた。

クラスタリング解析

2Dは3D, xenograftと比較しほとんどの代謝物のピーク値が著しく低かった。3Dとxenograftでは高いピーク値が類似している代謝物が多かった。

3群のうちxenograftのみ低いピーク値を示したものは解糖中間体が多く、xenograftのみ高いピーク値を示したものは肝臓での代謝物である尿素やコリン代謝物、プリン代謝物が多かった。

解糖系

乳酸量は2Dでは低値であったが、3Dで

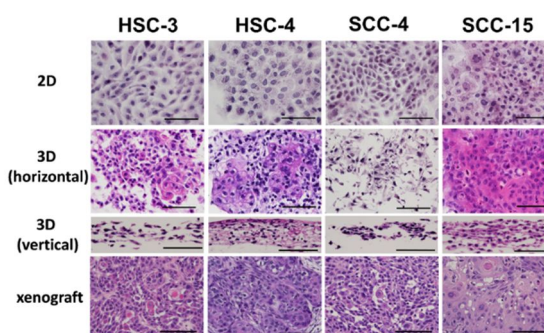


図1: 2D, 3D, xenograftにおける組織学的所見 (HE染色; スケールバー=100 μ m)

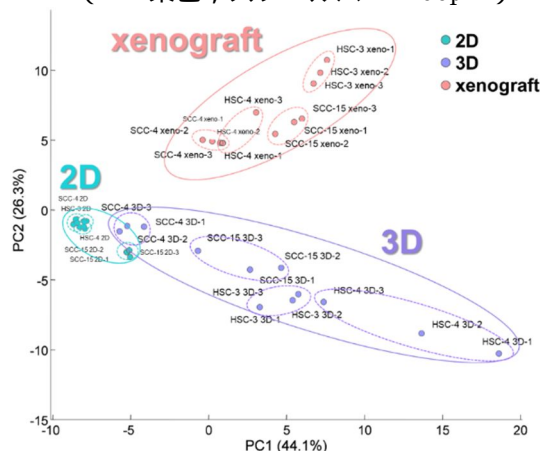


図2: 2D, 3D, xenograftにおける舌癌細胞の代謝解析(主成分解析)

は高値であり、xenograft に近い値を示した。

細胞外フラックス解析では2Dと比較し3Dの方がより高い解糖能を示した。

ミトコンドリア代謝

エネルギー産生量はATP量、ADP量ともに2Dでは有意に低値であったが、3Dではxenograftに近い値であった(図3)。

ウェスタンブロット解析では、呼吸鎖関連酵素(SDHA, COX IV, PDH)の発現は2Dでは低く、3Dとxenograftでは高発現を示した(図4)。

細胞外フラックス解析では、進行がんの細胞株(HSC-3, HSC-4)では酸素消費速度は2Dより3Dの方が高値であった。3Dでは予備呼吸能が低下していた(図5)。

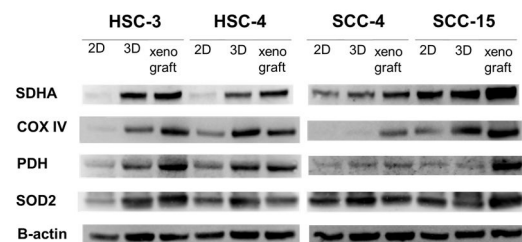


図4：ウェスタンブロット解析

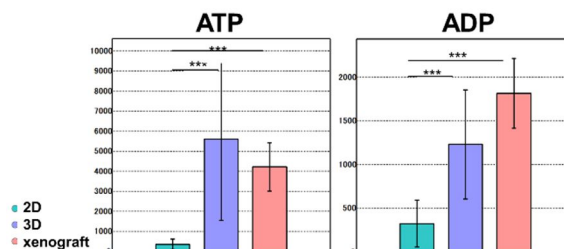


図3：ATP量、ADP量

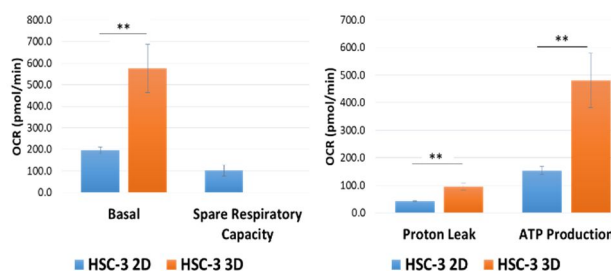


図5：細胞外フラックス解析(進行がんの細胞株)

バイオマスの合成

20種類のアミノ酸産生量は、2Dでは低値であったが、3Dとxenograftではともに高値を示した(図6)。

プリンヌクオチド産生量は、2Dでは低値であったが、3Dとxenograftではともに高値を示した。

酸化還元バランスの維持

PPPの過程で主に産生され強い還元作用を持つNADPHは細胞を酸化ストレスから保護する役割がある。NADPH/NADP⁺比は3Dではxenograftと同様に低値であり、NADPHが活性酸素消去のために消費されていることが分かった。

ウェスタンブロット解析にて、活性酸素消去系酵素(SOD2)の発現は2Dでは低く、3Dとxenograftでは高発現を示した(図4)。

以上より、2Dと3Dでは舌がん代謝が大きく異なっていた。一方、3Dでは生体と同様の構造を呈しているため、がん細胞間でインタラクションが働き、多くの代謝産物の値がxenograftの代謝産物の値に近い値であった。しかし、xenograftはがん細胞周囲にある宿主由来の間質や血流の影響を受けるため、これらに起因する代謝物が他の群との違いとして現れていた。

まとめると、3Dでは、がん細胞のミトコンドリア機能は障害されておらず、がん細胞は好氣的解糖と同時にミトコンドリアによるエネルギー産生を行っていること、がん細胞が酸素を有効に使ってバイオマスを生合成していること、酸化還元バランスを維持していることが示唆された。一方、2Dでは生体とは異なる条件下で生き抜くためにそれぞれの細胞独自の特徴が薄れ、単層培養特有の特殊な代謝が行われていることが示唆された。3Dとxenograftでは、グルコースなどの栄養素を使って解糖系やTCA回路を活性化し、バイオマス生合成、酸化的リン酸化によるエネルギー産生、酸化還元バランスの維持を行っていることが明らかとなった。生体ががん組織の形態と機能を模倣することができる3Dの代謝解析では、これまで報告されてきたがん代謝の理論に合った結果が得られた(文献)。本3D培養系は、極めて新規性の高い、がん研究において重要な実験ツールであると考えられた。

今後は、生体疎性結合組織に類似した構造のCellbed™にコラーゲンなどの間質成分を添加したり、培地内に肝臓で作られる酵素などを添加したりするなどして、より生体に近づく実験系の確立を目指すことができると考えられた。

われわれはCellbed™にコラーゲンIVを添加して培養した舌がん細胞は、浸潤能や増殖能が強化したことを報告してきた(文献)。

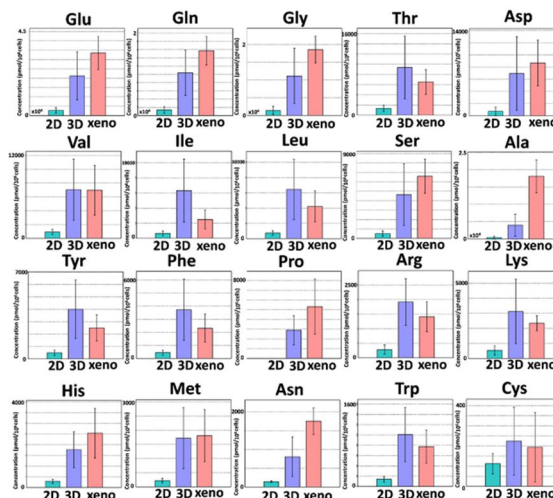


図6：アミノ酸産生量

そこで、本研究では、本 3D 培養系を用いてコラーゲン IV 添加群と非添加群で舌がんの代謝解析を行い、舌がん代謝におけるコラーゲン IV の役割を検証した。

(3) Tissueoid cell culture system を用いて検証した舌癌代謝におけるコラーゲン IV の役割

研究方法：舌がん細胞株 (HSC-4) を使用し、Cellbed にコラーゲン IV を添加した群 (以下、ColIV) と非添加群 (以下、non) で 2 週間培養し、代謝解析を行った。中枢エネルギー代謝に関するメタローム測定はヒューマン・メタローム・テクノロジーズに委託した。

研究成果：代謝解析のクラスタリング解析では代謝物のピーク値が低い方が緑、高い方を赤で示す。ColIV 群と non 群間で代謝物によってピーク値に差を認めた (図 7)。

ColIV 群では、non 群と比較し、総アセチル CoA 関連アミノ酸産生総量、総分岐鎖アミノ酸産生総量などが有意に高値であった (図 8)。過去の文献より、アセチル CoA は脂質代謝とヒストンのアセチル化とリンクし、がん細胞の増殖、侵襲性に影響する制御システムを作り出しているといわれている。分岐鎖アミノ酸は、ヌクレオチドなどの高分子を生成する窒素供与体として機能し、がん細胞の増殖に不可欠であるといわれている。

以上より、コラーゲン IV はがん細胞の増殖、侵襲性に参与している可能性が示唆された。

今後も、生体がん組織の形態と機能を模倣することができる本 3D 培養系を応用して、さらなる舌がんの代謝解析を進め、抗舌がん剤の標的となりうる代謝関連酵素を同定し、画期的な治療戦略の開発を目指したい。

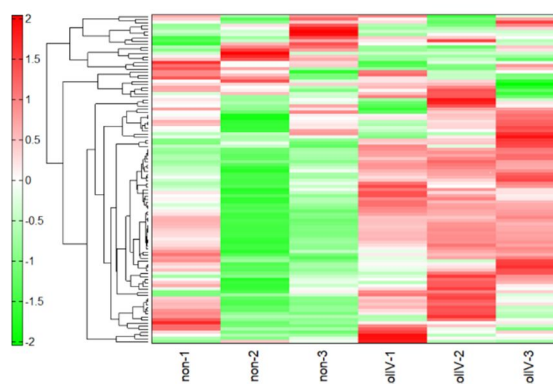


図 7: 代謝解析(クラスタリング解析)

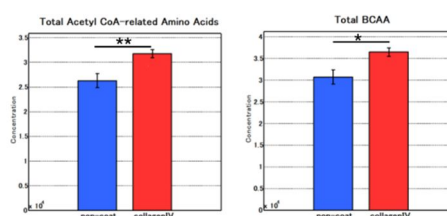


図 8: 総アセチル CoA 関連アミノ酸産生総量、総分岐鎖アミノ酸産生総量

<文献>

Murakami S, Mukaisho KI, Iwasa T, Kawabe M, Yoshida S, Taniura N, Nakayama T, Noi M, Yamamoto G, Sugihara H. Application of “tissueoid cell culture system” using a silicate fiber scaffold for cancer research. *Pathobiology*. 2020;87:291-301.

Noi M, Mukaisho KI, Yoshida S, Murakami S, Koshinuma S, Adachi T, Machida Y, Yamori M, Nakayama T, Yamamoto G, Sugihara H. ERK phosphorylation functions in invadopodia formation in tongue cancer cells in a novel silicate fiber-based 3D cell culture system. *Int J Oral Sci*. 2018;10:30.

Murakami S, Tanaka H, Nakayama T, Taniura N, Miyake T, Tani M, Kushima R, Yamamoto G, Sugihara H, Mukaisho KI. Similarities and differences in metabolites of tongue cancer cells among two- and three-dimensional cultures and xenografts. *Cancer Sci*. 2021;112:918-931.

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 Shoko Murakami, Ken-ichi Mukaisho, Takuya Iwasa, Masaaki Kawabe, Saori Yoshida, Naoko Taniura, Takahisa Nakayama, Masaharu Noi, Gaku Yamamoto, Hiroyuki Sugihara	4. 巻 87
2. 論文標題 Application of “Tissueoid Cell Culture System” Using a Silicate Fiber Scaffold for Cancer Research	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathobiology	6. 最初と最後の頁 291～301
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000509133	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 Shoko Murakami, Hiroyuki Tanaka, Takahisa Nakayama, Naoko Taniura, Toru Miyake, Masaji Tani, Ryoji Kushima, Gaku Yamamoto, Hiroyuki Sugihara, Ken-Ichi Mukaisho	4. 巻 112
2. 論文標題 Similarities and differences in metabolites of tongue cancer cells among two- and three-dimensional cultures and xenografts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 918～931
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14749.	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 Ryo Ikari, Ken-Ichi Mukaisho, Susumu Kageyama, Masayuki Nagasawa, Shigehisa Kubota, Takahisa Nakayama, Shoko Murakami, Naoko Taniura, Hiroyuki Tanaka, Ryoji P Kushima, Akihiro Kawauchi	4. 巻 22
2. 論文標題 Differences in the Central Energy Metabolism of Cancer Cells between Conventional 2D and Novel 3D Culture Systems	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1805
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22041805.	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村上翔子、越沼伸也、町田好聡、家森正志、岡野健、西村一行、山本学
2. 発表標題 2D培養と3D培養、xenograftを用いた舌がん代謝の比較
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上翔子、仲山貴永、岩佐卓哉、杉原洋行、向所賢一
2. 発表標題 2D培養と3D培養(Tissueoid cell culture system)を用いた舌がん代謝の比較
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 村上翔子、野井将大、白井悠貴、浅田泰幸、越沼伸也、町田好聡、家森正志、山本学
2. 発表標題 舌がん代謝における2D培養と3D培養システム(Tissueoid cell culture system)の比較
3. 学会等名 第74回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村上翔子、仲山貴永、向所賢一
2. 発表標題 3次元培養システムを用いて検証した舌癌代謝におけるCollagen IVの役割
3. 学会等名 第83回日本癌学会総会
4. 発表年 2024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
研究協力者	向所 賢一 (Mukaisho Ken-ichi)		

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
---------	---------