

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18663

研究課題名(和文) 口腔癌とがん関連線維芽細胞の3次元培養による非侵襲的癌浸潤解析モデルの確立

研究課題名(英文) Development of a methodology to non-invasively analyze cancer invasion by using a three-dimensional in vitro model consisting of oral cancer cells and cancer-associated fibroblasts.

研究代表者

齋藤 夕子(原夕子)(Saito, Yuko)

新潟大学・医歯学総合病院・専任助教

研究者番号：80827676

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)：本研究では、我々のプロトコルで癌関連線維芽細胞(CAF)または正常口腔線維芽細胞(NOF)をコラーゲンゲルに組み込んだ3次元口腔がんモデルを作製した。これらに対し、OCTを利用し、経時的かつ非侵襲的に癌細胞の間質への浸潤を撮像することが可能であった。さらに、OCT画像をHE染色像と比較することで、3次元モデルにおける癌細胞の浸潤も、経時的に評価することが十分可能であった。具体的には、CAFモデルでは間質内へ癌細胞が浸潤する傾向があるのに対し、NOFsモデルでは明らかではなかった。以上より、OCTは3次元モデルにおいて、癌細胞の浸潤と経時な変化を評価するのに有効なツールであることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔がんの治療成績の向上のため、新たな治療戦略の開発は喫緊の課題である。癌の悪性度を左右する浸潤能は癌細胞自身が有する遺伝的、生物学的因子だけでなく、癌微小環境に存在するCAFの影響を受けると考えられ、癌微小環境における相互作用に注目することは新規治療ターゲットの開発に有用である。申請者のラボで確立した、口腔がん3次元モデルはCAFをターゲットした癌微小環境に対する研究ツールとして有用であると考えているが、これにOCTを適用したところ、画像解析評価により経時的な癌浸潤像の観察が可能で、OCTの利用可能性が証明された。OCT画像に加え、深層学習法を適用することで、さらに定量的評価も可能となる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we manufactured 3D in vitro oral cancer models consisting of OSCC cells and the underlying collagen gel (stromal layer) in which either CAFs or NOFs are repopulated, according to our platform technology of a tissue-engineered oral mucosa fabrication. Subsequently, the OCT imaging technology was applied to those models. As a result, we were able to obtain clear OCT images of the 3D in vitro oral cancer models because the stromal layer was distinct from the overlying cancer cells. The interface between the cancer cells and the stroma was also distinguishable. Therefore, it was successful to conduct non-invasive evaluation of the invasion of OSCC cells into the underlying stromal layer over time when comparing with the conventional histologic examinations stained with HE. Specifically, the invasion was more severe in the model using CAF than NOF. This suggested the OCT imaging is a useful tool to non-invasively evaluate oral cancer cell invasion in our 3D models over time.

研究分野：口腔外科

キーワード：がん関連線維芽細胞 口腔がん 浸潤 OCT(光干渉断層撮影) 非侵襲解析

## 1. 研究開始当初の背景

癌組織は癌細胞と間質から構成され、間質の主要な構成細胞である線維芽細胞は**がん関連線維芽細胞 (CAFs)**と呼ばれる。癌の浸潤に重要な役割を担っているとされる **CAFs 組み込み癌微小環境を再現した3次元培養モデル**は、他臓器癌では確立しているが、**口腔癌での報告はない**。その上、モデルの評価方法は、固定・染色した組織学的評価に留まっており、経時的かつ非侵襲的に評価する方法はいまだに確立されていない。本研究では**口腔癌細胞と CAFs の相互作用による癌浸潤を解析するために**、3次元口腔癌モデルを作成した上で、光干渉式断層撮影システムによって、**経時的、非侵襲的、定量的に3次元レベルで癌浸潤を評価する方法を確立することを目的とする**。本研究は CAFs の機能解析や癌細胞・CAFs 相互作用を標的とした薬剤感受性の解明における新たな視点となり、新規治療ターゲットの開発と治療効果の評価方法にも貢献できると考えられる。

## 2. 研究の目的

本課題では、癌微小環境を構成する CAFs を組み込んだ口腔癌3次元 in vitro モデルの開発に取り組み、その有効活用のために、次の4点について明らかにする。

- (1) - CAFs およびその対照として、正常口腔粘膜線維芽細胞を、コラーゲンゲルに組み込み、その上に口腔癌細胞を播種する口腔癌3次元 in vitro モデルの作成。
- (1) - ② 口腔癌3次元 in vitro モデルの in vivo 組織との比較検討を含めた組織学的評価。
- (2) - OCT 断層撮像による口腔癌3次元 in vitro モデルの非侵襲的、経時的評価・解析。
- (2) - ② OCT 断層撮像の定量的評価方法の確立。

## 3. 研究の方法

### (1) - CAFs をコラーゲンゲルに組み込んだ口腔癌3次元 in vitro モデルの作成

口腔癌3次元 in vitro モデルは、CAFs をコラーゲンゲルに混ぜ、培養インサート内で7日間液相培養。それから、ゲル上に癌細胞を播種して7日間液相培養し、さらに7日間を気相液相培養して作成する。固定後、HE染色で組織像を観察する。対照としては、CAFs に替えて、正常口腔粘膜線維芽細胞を組み込んだモデルとする。また、用いる癌細胞は、申請者が所有している、ヒト口腔扁平上皮癌由来の株化細胞で、高分化型の Ca9-22, HSC-2, HSC-4、および低分化型の SAS, HSC-3 を用いる。

### (1) - ② 口腔癌3次元 in vitro モデルの組織学的評価 - in vivo 組織との比較検討 -

免疫組織化学的に組織学的検討を行い、本モデルの評価を行う。

### (2) - OCT 断層撮像による口腔癌3次元 in vitro モデルの非侵襲的、経時的評価・解析

口腔癌3次元 in vitro モデルの作成プロトコルを用いて、癌細胞播種後の液相培養中、気相液相培養期間中、およびモデル完成後の合計3回に渡り、経時的に OCT 撮影を行い、OCT 技術の有用性を評価する。**癌細胞層の組織学的所見や、コラーゲンゲル内の癌浸潤像や CAFs 自身が、コラーゲンゲルと癌細胞層が、十分に識別可能な解像度を持って OCT 画像に反映されているかを評価する。**

### (2) - ② OCT 断層撮像の定量的評価方法の確立

撮影した OCT 画像に対して、以下の3つの定量的評価法を実施し、OCT 技術の有効性を検証する。評価は、高分化型と低分化型癌細胞それぞれに対して実施し、**CAFs と正常口腔粘膜線維芽細胞を組み込んだモデルの平均値の統計学的検討**で評価する。

- (A) **浸潤深さ** : Image J を用いて癌細胞層表面から癌細胞の最深部までの距離を計測。
- (B) **境界明瞭度** : ゲル内への浸潤先端を含んだ癌細胞層とコラーゲンゲルの境界にラインを描記し、Image J を用いてラインの長さを計測する。
- (C) **画像の不均一度** : 癌細胞層や、浸潤様癌細胞を含むコラーゲンゲル部などを、矩形にランダムに抽出し、各画像を Image J を用いて2次元高速フーリエ変換 (2D FFT) し、1次元パワースペクトルの分布から傾きを求め、“OCT 画像の不均一さ”を数値化する。これらの定量的評価方法で有意差がでるか統計解析する。

## 4. 研究成果

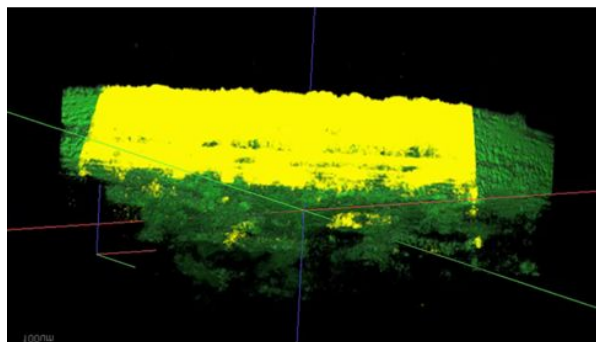
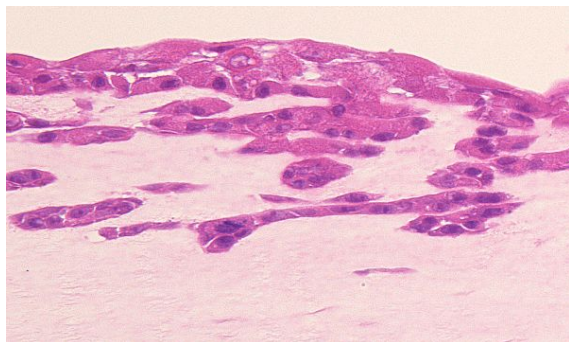
### 口腔癌 3 次元 in vitro モデルの作製

対照群として NOFs を組み込んだモデルでは、癌細胞層と下部のコラーゲンゲルの境界が比較的明瞭で間質への進展が少ないのに対し、CAF<sub>s</sub> を用いると、ゲル上の播種した癌細胞(HSC-2、HSC-3) がコラーゲンゲル内に著明に進展しており、上部の癌細胞層から離れて存在し、“癌局所浸潤像”を認めた。この像は、HSC-3 においてより顕著であった。CAF<sub>s</sub> モデルでは免疫染色において、CAF は SMA 陽性であり、正常口腔粘膜線維芽細胞は陰性であった。EMT マーカーである E-cadherin、Twist、Vimentin においては浸潤した癌細胞においては、E-cadherin(-)、Twist(+)、Vimentin(+ ) を呈していた。一方、正常口腔粘膜線維芽細胞モデルでは E-cadherin(+ )、Twist(-)、Vimentin(-) であり、癌細胞の浸潤には EMT の関与が示唆された。

### OCT 断層撮像による口腔癌 3 次元 in vitro モデルの浸潤パターンの評価

各モデルに対して、経時的に OCT 撮影し、比較検討した。癌細胞は OCT において輝度が高いのに対して、間質の CAF<sub>s</sub> および NOFs は輝度が低かった。このことから癌細胞と間質を区別することが可能であった。CAF<sub>s</sub> モデルでは、癌細胞が間質へと著明に浸潤しており、OCT 画像では CAF<sub>s</sub> モデルでは間質へと進展する輝度の高い像を認めており、HE 染色組織像でみられた癌細胞の浸潤像と同様な画像が得られた。(図 1)

図 1 : CAF<sub>s</sub> モデルにおける HE 染色像と OCT データを 3 次元構築した画像の比較



(左図) CAF<sub>s</sub> モデルにおける HE 染色像

癌細胞が間質の方へ浸潤している像を認めた。

(右図) CAF<sub>s</sub> モデルにおける OCT データを 3 次元構築した画像

黄色：実質（非浸潤層）をイメージング

緑色：間質（浸潤層）へ進展した癌細胞をイメージング

得られた OCT データから輝度の高い像を 3 次元構築したことで非浸潤層から間質へ浸潤した像が認められた。HE 染色像および OCT 像において、癌細胞は周囲の癌細胞と連続するように浸潤する集団浸潤の像を呈していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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