

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10053

研究課題名（和文）舌癌WP01-5の成立と予後を決定する癌微小環境の解析

研究課題名（英文）An analysis of the cancer microenvironment's role in the establishment and prognosis of WP01-5 in tongue squamous cell carcinoma

研究代表者

工藤 朝雄（KUDO, Tomoo）

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：60709781

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、舌癌患者の予後不良と関連するWP01-5の病態解明を目指して、分化度・性質の異なる口腔癌細胞株を用いたスフェロイド培養・オルガノイド培養を行い、癌細胞の挙動と形態・免疫表現型の変化を明らかにした。オルガノイド培養時の癌細胞の挙動は、癌細胞の分化度・性質に依存していた。EMT様形質を有するOSC-20では、間質環境での培養によりVimentin陽性細胞の増殖を主体としたスフェロイドの大型化、周囲基質への浸潤が生じていた。本研究で確立した口腔癌スフェロイドを用いた間質オルガノイド培養は、癌細胞株の性質を反映した挙動をin vitroで評価可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌切除後に生体内に残存した癌細胞の挙動が癌患者の予後に重要であることは広く知られている。本研究で確立した癌細胞スフェロイドを用いたオルガノイド培養法は、in vivoにおける癌細胞の挙動を模倣しており、生体内における癌細胞の挙動を予測するための有用な実験ツールとして期待出来る。また、脂肪組織・筋組織などの間質環境オルガノイドと組み合わせた実験系を構築することで、間質環境変化が癌細胞の運動性（ハイブリッドEMT、集団遊走）や癌形成能に与える影響を明らかに出来るものと考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed spheroid and organoid cultures using oral cancer cell lines with distinct characteristics. These culture models allowed us to clarify the changes in morphology and immunophenotype of cancer spheroids and their behavior in the stromal microenvironment. The behavior of cancer cells during organoid culture depended on the differentiation and characteristics of the cancer cells. Notably, OSC-20 cells with EMT-like traits showed increased spheroid size characterized by the proliferation of vimentin+/cytokeratin+ cells, and invasion into the surrounding ECM under organoid culture conditions. The stromal organoid culture using oral cancer spheroids established in this study allowed us to evaluate behaviors that reflect the nature of the cancer cell line in vitro.

研究分野：実験病理学

キーワード：舌扁平上皮癌 WP01-5 口腔癌スフェロイド オルガノイド培養 3次元形態解析

1. 研究開始当初の背景

本邦における口腔癌の推定死亡者は増加し続けており、特に発生頻度の高い舌扁平上皮癌(舌癌)の征圧は歯科領域における最も重要な課題の一つである。癌が小さく、リンパ節転移を認めない早期癌症例の5年生存率は90%に達するが、癌切除部位での“局所再発”や、術後期間を置いて頸部リンパ節に癌病変が発覚する“後発転移”によって予後不良となることもあり、病態の見極めと治療法の開発が急務となっている。

病理診断の観点では、早期癌の予後評価に関わる様々なパラメータが検討され、癌細胞の深部方向への浸潤程度を評価する「深達度」や、癌細胞が周囲組織にどのように浸潤しているかを評価する「浸潤様式分類」の有用性が示されてきた。浸潤様式分類は、癌胞巣の大きさや癌と周囲組織との境界面の形状などを基準にして評価される。本邦で広く用いられている山本-小浜分類(YK分類)やその他の浸潤様式分類においても、胞巣が小さく、バラバラに浸潤しているほど悪性度が高い。米国で確立されたWorst Pattern of Invasion(WPOI)は、先端部の癌胞巣集団から遊離・孤立した癌胞巣までの距離をカットオフ値として病型を識別するユニークな浸潤様式分類で、特に「浸潤先端部の癌胞巣集団から1mm以上離れた遊離胞巣が存在している状態」と定義される病型“WPOI-5”は患者の生存率と有意な関連性を示すことから注目されるようになった。近年、本邦でもWPOI-5判定の有用性が複数の研究グループから報告されており、申請者が所属する研究グループの解析でもWPOI-5と患者生存率低下との関連が明らかとなっている。しかしながら、WPOI-5症例は他の悪性度の高い病型(YK-4Cなど)と必ずしも一致せず、なぜWPOI-5症例が高い確率で予後不良となるのかについては依然明確な根拠は挙げられていない。WPOI-5判定の臨床疫学的な意義を明確にするためには“どのようにして腫瘍母体から大きく離れた遊離胞巣が生じるのか”という問いを生物学的・病理学的な観点から追求することが鍵となる。

癌胞巣の分断・分散に関しては、上皮系癌細胞が間葉形質を発現することによって運動性を獲得する「上皮間葉形質転換(EMT)」の関与が知られてきた。近年ではこの(完全な)EMTに至る過程で、上皮系細胞としてCytokeratin/E-cadherinの発現を保持しながら間葉系細胞骨格であるVimentinも発現する「ハイブリッドEMT」の状態が注目されている。癌細胞の“単一細胞遊走”に繋がるEMTやハイブリッドEMTがWPOI-5の病態に促進的に働く可能性は高い。また、癌関連線維芽細胞(CAF)や特殊な細胞形質を示すリーダー細胞により多数の癌細胞が集団で牽引される“集団遊走”についても、口腔癌細胞で実験的に再現されている。しかし、いずれの機構が働いているとしても、なぜ特定の胞巣のみが胞巣集団から大きく逸脱した組織配置を示すのかを的確に説明できない。他方、舌組織に注目すると、WPOI-5の遊離胞巣と母体となる胞巣集団は健常組織で隔たれている。実際に、癌細胞の脈管内浸潤や末梢神経に沿った浸潤もWPOI-5判定に含まれており、既存の組織要素との相互関係は多岐に渡る。我々の研究グループによる早期癌症例の解析では、WPOI-5症例の半数以上が深達度3mm以上であり、癌組織は舌筋・脂肪組織に到達していた。これらの事実から演繹される仮説として、“WPOI-5の遊離胞巣は、癌細胞自体の形質に周囲組織要素との相互作用が加わり、複数の成立経路が混在している”ことが考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、口腔癌の予後不良を方向付ける要因として「WPOI-5病態における遊離胞巣の形成機序」を明らかにするため、口腔癌スフェロイドと間質細胞との共培養(口腔癌オルガノイド培養)モデル、ヌードマウス舌移植への癌スフェロイド移植モデルを確立することにより、口腔癌細胞による運動性(ハイブリッドEMT、集団遊走)や胞巣形成能の違い、癌細胞と間質細胞との相互作用による応答の差を観察することを目的とした(図1)。

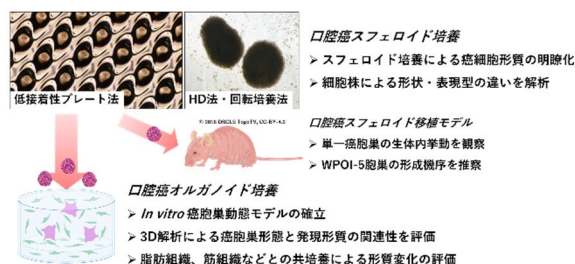


図1. WPOI-5病態における遊離胞巣の形成機序の解明

3. 研究の方法

WPOI-5病態では癌胞巣の分断・分散により、癌胞巣母体から大きく離れた位置に遊離胞巣が形成されるため、単一の癌胞巣挙動を追跡可能な実験モデルを確立する必要があった。既存の癌細胞移植マウスモデルでは、癌細胞注入時に組織間隙へ癌細胞が拡散し、単一胞巣の挙動解析には不向きであることが予想された。そこで、分化度・性質の異なる口腔癌細胞株から均質なスフェロイドが形成可能な培養条件を確立することを目指した。

これまでのヌードマウス移植実験において異なる性質(HSC-2、KOSC-2:中分化型の扁平上皮

癌を形成、OSC-19、OSC-20：低分化型で浸潤性の強い扁平上皮癌を形成、OSC-20：他の癌細胞株とは異なり、浸潤先端部に Vimentin+ / Cytokeratin+ 癌細胞が出現するハイブリッド EMT 様形質) が確認出来た 4 種類の口腔癌細胞株を使用した。スフェロイド培養法には、アガロースコーティングなど低接着性培養プレートの使用、Hanging-drop 法や回転培養法など細胞凝集によるスフェロイド形成などが知られているが、培養手法によるスフェロイドの性質の違いは明らかではないこと、また、同一系統の癌細胞であっても、細胞株により形状や性質は異なることが報告されていることから、上記の口腔癌細胞株とスフェロイド培養法 (Hanging-drop 法・回転培養法、低接着性プレート法) を用いて、ヒト口腔癌細胞スフェロイドの表現形質について、形態観察、分子発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト口腔癌スフェロイドの形成手法による形状比較

表現型解析の可能な均質な大きさのスフェロイドを形成するため、口腔癌細胞株 (HSC-2、KOSC-2、OSC-19、OSC-20) を用いて Hanging-drop 法、低接着性プレート法によるスフェロイド培養を実施した。Hanging-drop 法では、24 時間培養にて単～数層からなる類円形のスフェロイドが形成された。OSC-20 スフェロイドは接着性に乏しく、安定したスフェロイド形成には 48 時間培養を要した。Hanging-drop 法で形成されるスフェロイドは単層構造からなり、分化・極性形成に乏しいことが判明したため、回転培養による二次培養を実施した。培地中のスフェロイド数が増えるとスフェロイド同士の癒合が認められる傾向にあり、口腔癌細胞株により融合のし易さは異なっていた。Hanging-drop 法・回転培養法を組み合わせたスフェロイド培養により、最大で直径 1.5~2 mm の口腔癌スフェロイドを形成する至適条件を得ることができた (図 2)。

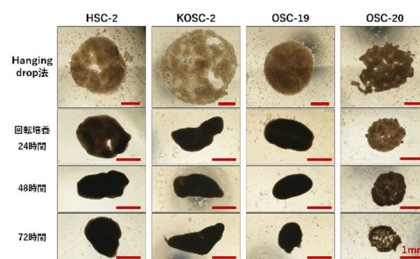


図 2. Hanging-drop 法・回転培養法によるスフェロイドの形状変化

低接着性プレート法では、複数の市販されているスフェロイド培養プレート (NanoCulture® Plate、ディンプルプレート、EZSPHERE®SP) を用いて口腔癌スフェロイドの形成を試みた。NanoCulture® Plate では小型のスフェロイドが多数得られたが、スフェロイドサイズの調整が困難であり、継時的な培養によりスフェロイドの遊走・融合が生じていた。ディンプルプレートでは、均質な大きさのスフェロイドが得られる一方、連結した細胞凝集体が複数形成される傾向にあった。EZSPHERE®SP プレートでは、小型で均質なスフェロイドを多数得ることが可能であり、異なる Microwell 径の培養プレートを選択することで、スフェロイドサイズが調整可能 (直径 0.2~1 mm) であったことから (図 3)、本研究の目的には EZSPHERE®SP プレートが適していると判断した。また、EZSPHERE®SP プレート法により形成されたスフェロイドを用いて、回転培養による二次培養も実施したが、明らかなスフェロイドの融合・サイズ増大は認められなかった。

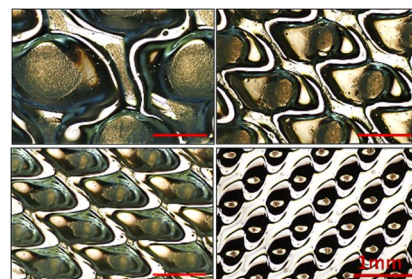


図 3. EZSPHERE®SP プレート法により形成されるスフェロイド

(2) ヒト口腔癌スフェロイドの表現型解析

上記で形成した口腔癌スフェロイドの形態観察を実施するため、組成の異なるゲル (アルギン酸ナトリウム、アガロース、ゼラチン、アガロース:ゼラチン) にスフェロイドを埋入して、解析標本 (パラフィン包埋試料) の作製条件を検討した。アルギン酸ナトリウムゲルではゲル化が不均一でスフェロイド回収が困難であり、アガロースゲルでは回収が容易であったが薄切時のスフェロイド崩壊が顕著であった。ゼラチンゲルではゲル試料の硬化が顕著で薄切が難しく、アガロース:ゼラチンゲルを用いた包埋が最適であった。Hanging-drop 法・回転培養法の口腔癌スフェロイドのパラフィン包埋試料から形態観察を実施したところ、スフェロイドの立体形状や大きさは癌細胞株の分化傾向に依存しており、HSC-2、KOSC-2 では有棘細胞様の癌細胞も出現していた。また、回転培養の継続時間により、スフェロイドの小型化や中心部の壊死が認められ、細胞接着因子や細胞増殖マーカーの発現にも変化が生じていた (図 4)。

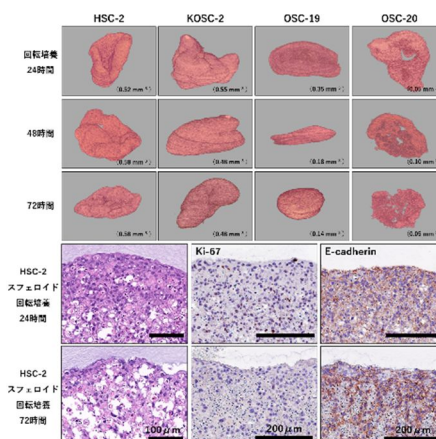


図 4. Hanging-drop 法・回転培養法によるスフェロイドの立体形状、表現型変化

低接着性プレート法では、スフェロイド内に少数の死細胞が散見されるものの、Hanging-drop 法・回転培養法と比較して、全ての口腔癌スフェロイドにおいて細胞増殖マーカーと細胞接着因子が高い発現を示した (図 5)。

ヌードマウス移植腫瘍組織では間質境界面の癌細胞に CD44 発現などの極性が認められるが、本研究で形成した口腔癌スフェロイドでは、Hanging-drop 法・回転培養法、低接着性プレート法のいずれにおいても、形質の極性は確認できなかった。癌スフェロイドの形質は腫瘍移植片組織の癌細胞に類似すると想定していたが、間質・足場シグナルを欠いた培養環境下では、生物学的性状が異なるものと考えられた。

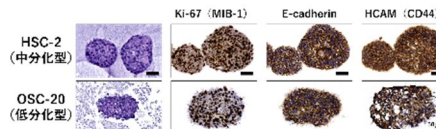


図5. 低接着性プレート法により形成したスフェロイドの表現型解析

(3) ヒト口腔癌スフェロイドを用いた癌細胞の動態解析モデル

口腔癌スフェロイドの表現型解析から、Hanging-drop 法・回転培養法のスフェロイドでは細胞の分化傾向や細胞接着因子の局在化が認められたが、スフェロイド内の細胞死や増殖活性の低下も生じていたことから、検討準備していたマウス舌組織への移植には不向きと判断した。Hanging-drop 法・回転培養法のスフェロイド小型化は断念して、低接着性培養プレート法の口腔癌スフェロイドの移植を目的として、*in vitro*においてハイドロゲル内へのスフェロイド注入を試みた。安定した単一スフェロイドの吸引やハイドロゲル内の注入が困難であったため(図6) ヒト口腔癌スフェロイドを用いた癌細胞の動態解析可能なモデルの作製を中心に進めた。

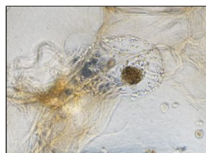


図6 スフェロイド注入の予備検討。スフェロイドのハイドロゲル内への注入成功率は低く、微小なスフェロイドも散見される

ハイドロゲル埋入後の口腔癌スフェロイドの変化は、埋入方法や基質ゲルの種類によって異なっており、マトリゲル-Type 1 コラーゲンの混合ハイドロゲル中に口腔癌スフェロイドを混ぜ込み培養する方法が、培養期間中のスフェロイド構造の維持、構成細胞の生存に最適であった。また、口腔癌スフェロイド単独でハイドロゲル内に埋入した場合、口腔癌オルガノイド辺縁の癌細胞には核の偏在など極性変化が観察されたものの、ハイドロゲル内への侵入は仮足形成に留まっていた。口腔癌スフェロイドと線維芽細胞との共培養(口腔癌オルガノイド培養)では、ハイドロゲル内に埋入する口腔癌スフェロイド/線維芽細胞の数、ゲル中の基質濃度が、癌細胞の挙動に差を生じさせることが分かった。一部の口腔癌細胞株では、癌細胞がハイドロゲル内に索状浸潤する様子も認められたが、スフェロイド構成細胞の細胞死が顕著であったため、スフェロイドのサイズ・数、埋入方法、線維芽細胞添加などの設定条件を見直して培養環境の最適化を行った。特に、ハイドロゲルの表面・底面にスフェロイドが露出すると間質内での癌細胞挙動の観察が困難となるため、ハイドロゲルに厚みを持たせる工夫を加え、継時観察の安定性を高めることで、*in vitro*で癌細胞の挙動観察が可能な口腔癌オルガノイドモデルを確立した。

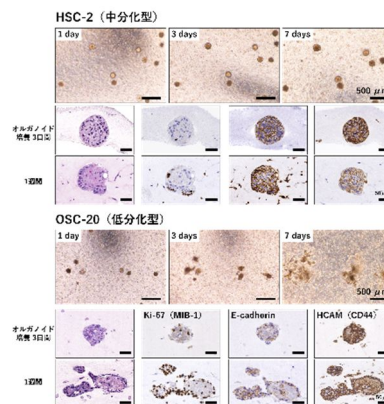


図7. 口腔癌オルガノイド培養における細胞増殖・細胞遊走の違い

間質オルガノイド環境における口腔癌スフェロイドの挙動として、中分化型細胞株(HSC-2、KOSC-2)では細胞外基質との接触により細胞増殖の抑制と極性形成が生じていたが、低分化型細胞株(OSC-19、OSC-20)では、細胞増殖・細胞遊走が亢進していた(図7)。また、EMT様形質を有するOSC-20では、間質環境での培養により Cytokeratin + /Vimentin+癌細胞の増殖を主体としたスフェロイドの大型化・周囲基質への浸潤が認められた(図8)。

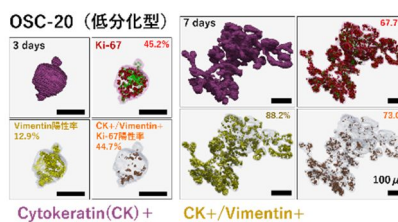


図8. OSC-20 オルガノイドにおける EMT 様形質 (CK+ /Vimentin+) を有する癌細胞を主体とした浸潤・増殖

(4) 総括

今回確立した口腔癌スフェロイドを用いた間質オルガノイド培養法により、口腔癌細胞株の性質を反映した癌細胞挙動を *in vitro*で評価することが可能となった。本研究で確立したモデルでは、スフェロイドが継時的に増殖・浸潤する様子が捉えられたが、遊離細胞の形成に相当する“スフェロイドからの癌細胞集団の分離”は確認出来なかった。

本研究期間内では、間質環境が口腔癌スフェロイドの胞巣形成にどのような影響を与えるかの検証は困難であった。WPO1-5 病態の全容解明のためには、深達度による間質微小環境(線維組織、筋組織、脂肪組織)の遷移や線維芽細胞・マクロファージなどの形質変化が重要と考えられた。本研究で確立した間質オルガノイド培養をベースとするアッセンブロイド(間質オルガノイドと舌筋・脂肪組織オルガノイドとの組み合わせ)・共培養(CAF・TAMとの共培養)は、間質微小環境の変化による癌細胞の形質変化の促進、癌細胞の挙動に与える影響を検証可能な有用なモデルと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 工藤朝雄, 埴 太宥, 佐藤かおり, 田谷雄二, 添野雄一
2. 発表標題 間質オルガノイド環境での口腔癌スフェロイドの表現型・形態解析
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 工藤朝雄, 埴 太宥, 川本沙也華, 坪崎健斗, 村樫悦子, 佐藤かおり, 田谷雄二, 添野雄一
2. 発表標題 リンパ管オルガノイドを用いた癌-間質微小環境の動態評価モデル
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 工藤朝雄, 埴 太宥, 川本沙也華, 佐藤かおり, 田谷雄二, 添野雄一
2. 発表標題 口腔癌スフェロイドの表現型スクリーニングと3次元形態解析
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 工藤朝雄, 埴 太宥, 川本沙也華, 佐藤かおり, 田谷雄二, 添野雄一
2. 発表標題 低接着性培養による口腔癌スフェロイド形成と3次元形態・免疫表現型の解析
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021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	辺見 卓男 (HENMI Takuo) (20814883)	日本歯科大学・生命歯学部・講師 (32667)	
研究 分担者	島津 徳人 (SHIMAZU Yoshihito) (10297947)	麻布大学・生命・環境科学部・教授 (32701)	
研究 分担者	添野 雄一 (SOENO Yuuichi) (70350139)	日本歯科大学・生命歯学部・教授 (32667)	

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