

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 13 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17147

研究課題名（和文）3次元培養デバイスを用いた糖鎖シグナルを介する口腔がん幹細胞化の分子基盤の解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanisms of oral cancer stem cell formation using 3D-culture device

研究代表者

西牟田 文香（Nishimuta, Fumika）

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：20808406

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：組織内で微小環境を形成するがん細胞の形態学的・遺伝学的特性の維持のため、従来の低接着性プレートでは困難な、均一かつ大量のスフェロイドを作製可能なマイクロウェルチップを開発した。このチップに播種した口腔がん細胞は速やかに凝集後、辺縁平滑なスフェロイドを形成し、その形態は培養後5日目においても維持されていた。形成されたスフェロイドは生細胞を主体としていた。スフェロイドの構成細胞は、従来の2次元培養群と比較して幹細胞性が亢進しており、抗がん剤に対する感受性の低下が観察された。さらにスフェロイドよりoutgrowthさせた細胞についても幹細胞性の維持が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん幹細胞は、難治性の根源であると考えられ、これらを標的とした治療が新たな治療戦略として注目を集めている。口腔がんに対しても、同様の治療戦略の確立が急務であるが、従来の2次元培養した口腔がん細胞に含まれる幹細胞は20%以下であり、その単離は煩雑である。本申請で開発したマイクロウェルチップは、簡便に口腔がん細胞の幹細胞化が誘導可能であり、幹細胞化の分子機構の解明や、関連分子の標的化による薬剤抵抗性の獲得防止を目的とした治療戦略の提案へと繋がること期待される。

また同チップはデザインの自由度が高く、がん細胞以外の細胞にも応用可能な汎用性の高い、革新的な3次元培養法を提案できるものと確信している。

研究成果の概要（英文）：To maintain the morphological and genetic characteristics of cancer cells that form microenvironments in tissues, we developed a micro-well chip that can produce uniform and large numbers of spheroids, which is difficult to achieve with conventional low-adherent plates. Oral cancer cells seeded on this device quickly aggregated and formed smooth-edged spheroids, which maintained their morphology even at 5 days of culture. The formed spheroids were mainly composed of viable cells. Compared to the conventional 2-dimensional culture cells, the constituent cells of the spheroids were more stem cell-like and less sensitive to anticancer drugs. Furthermore, the cells outgrowth from the spheroids also maintained their stemness.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔がん スフェロイド 3次元培養 がん幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

近年、さまざまな分子標的薬が新規抗がん剤として開発されている。その一方で、肺がん、乳がん、大腸がんなど多くのがん種において、がん幹細胞が同定され、これらはがんの持つ再発、転移、治療抵抗性などの難治性の根源であると考えられており、実際にはがん幹細胞マーカー遺伝子 (*CD44v3*, *Oct4*) が高発現している舌扁平上皮がんは予後が悪化する傾向にあると報告されている (Rodrigues *et al.*, *Head Neck*, 2018)。そこで、がん幹細胞を標的とした治療が新たながん治療戦略の1つとして注目を集めている。口腔がん領域では、舌がん細胞株において、*CD44v3* 陽性、*ALDH* 陽性の幹細胞が存在し、同細胞は抗がん剤に対して高い抵抗性を示し、50個程度でヌードマウスに腫瘍を形成することが報告されている (Bourguignon LYW *et al.*, *J Biol Chem*, 2016)。このことから、顎口腔領域のがんに対しても、がん幹細胞をターゲティングした治療戦略の確立が必須であると考えられる。しかしながら、二次元培養した舌がん細胞に含まれる幹細胞は20%以下であり、その分離には、FACSなど煩雑な手技が要求される。それに対して、本申請で予定しているマイクロウェル型チップを用いたスフェロイド三次元培養法では、特殊なマトリックスを使用しない簡便な手技で、均一のがん幹細胞の集団を大量に作製することが可能である。これを基盤にハイスループットな治療法のスクリーニングのフォーマットを提案し、病態解明に繋げていく予定である。

## 2. 研究の目的

近年のがん研究では、元来の腫瘍に具備された分化状態の維持のために、患者の腫瘍組織をスフェロイド化したがん細胞培養 (PDC) とがん移植モデル (PDX) が積極的に使用されているが、顎口腔領域のがん研究は大幅に遅れを取っている。そこで、北九州市立大学との共同研究により、生体類似構造の再構築が可能なスフェロイドを均一かつ大量に形成可能なマイクロウェルチップの開発を行った。本申請研究では、将来的な PDC や PDX への応用を見据え、各種株化細胞に対して最適化したスフェロイド培養法を確立し、そのがん幹細胞化や薬剤耐性亢進のメカニズムを解明することを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) 口腔がんスフェロイドの作製・評価

共同開発したマイクロウェルチップを用いて、各種口腔扁平上皮がん細胞株のスフェロイドを作製する。なお、予備実験において、HSC-3 細胞はマイクロウェル内に播種後、直ちに凝集し、スフェロイドを形成すること、そしてその形態が長期間維持されていることを確認している。作製したスフェロイドの形態的評価およびスフェロイド構成細胞の生存を確認した。

### (2) 口腔がんスフェロイドの幹細胞性の評価

作製したスフェロイドより RNA を回収し、real-time RT-qPCR 法を用いて、幹細胞性マーカー遺伝子の発現を確認し、2次元培養群との比較を行った。

### (3) 口腔がんスフェロイドの抗がん剤に対する感受性の評価

作製したスフェロイドに種々の濃度の抗がん剤 (CDDP) を添加して、48時間後の細胞数を WST-8 assay を用いて確認し、2次元培養群との比較を行った。

### (4) スフェロイド由来 outgrowth 細胞の培養・評価

形成後のスフェロイドを接着性プレートに再播種し、outgrowth させた細胞を回収し、幹細胞マーカー遺伝子発現を確認した。

## 4. 研究成果

### (1) 口腔がんスフェロイドの作製・評価

開発したマイクロウェルチップ内で2種の口腔がん細胞株を培養した結果、ともに速やかに凝集を開始し、辺縁平滑なスフェロイドを形成した。そのサイズは次第に減少傾向を示すも、培養5日群においてもその形態は維持された (図1A)。

また、LIVE/DEAD 染色による生存判定の結果、スフェロイド構成細胞は calcein 陽性の生細胞を主体としていることが示され、懸念された中心部細胞の壊死は否定された (図1B)。

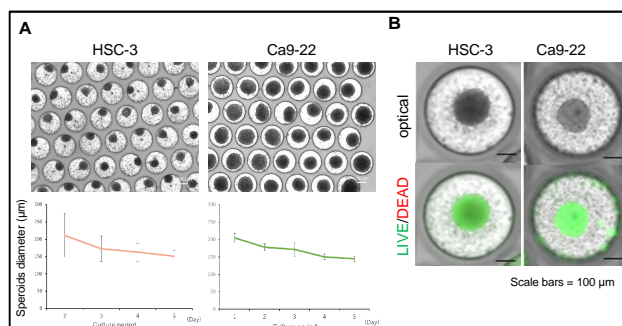


図1 口腔がんスフェロイドの作製・評価  
マイクロウェルチップ内で、口腔がん細胞株 (HSC-3, Ca9-22) はスフェロイドを形成し、形態とサイズは維持された (A)。スフェロイド構成細胞は、calcein 陽性の生細胞 (緑色) を主体としており、死細胞 (赤色) は検出されなかった。

## (2) 口腔がんスフェロイドの幹細胞性の評価

培養 3、および 5 日目の口腔がんスフェロイドの幹細胞マーカー (*CD44*, *Oct4*, *Nanog*, *Sox2*) および低酸素マーカー (*VEGF*) の遺伝子発現を 2 次元培養群と比較した。HSC-3、Ca9-22 細胞の両スフェロイドともに、構成細胞の幹細胞マーカーの発現は 2 次元培養に比べて増加しており、スフェロイド培養による幹細胞化の誘導が示唆された (図 2)。

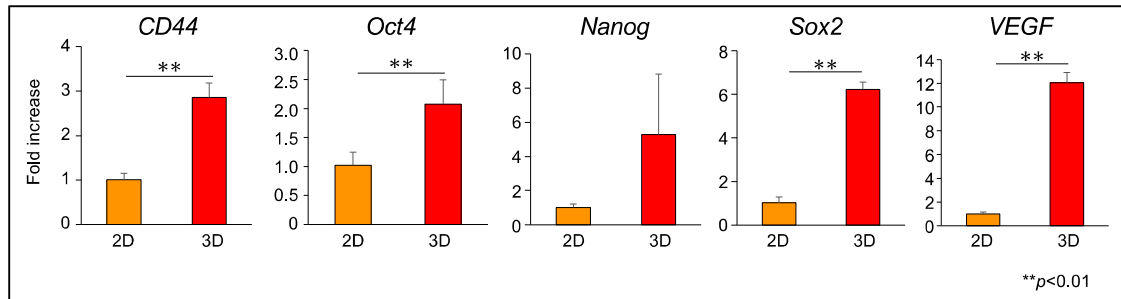


図 2 口腔がんスフェロイドの幹細胞性の評価

培養 5 日目に回収した Ca9-22 スフェロイドの幹細胞性マーカーおよび低酸素マーカー遺伝子の発現は 2 次元培養群と比較して、有意に増加していた。この遺伝子の発現増強は、培養 3 日目から観察され、HSC-3 細胞でも同様の傾向を示した (データ未掲載)。

## (3) 口腔がんスフェロイドの抗がん剤に対する感受性の評価

スフェロイド培養群による口腔がん細胞の幹細胞化の抗がん剤抵抗性への関与を証明するため、マイクロウェルチップ内で形成した口腔がんスフェロイドに抗がん剤 (CDDP; 0~100  $\mu$ M) を添加し、48 時間培養を行った。培養後の細胞に対して WST-8 assay を行い、残存細胞数を確認したところ、20  $\mu$ M 以上の抗がん剤の添加では、2 次元培養群と比べて、スフェロイド培養群において残存細胞数の有意な増加が確認された (図 3)。この結果より、形成された口腔がんスフェロイドでは、抗がん剤に対する感受性が低下しており、その背景に構成細胞の幹細胞性の亢進の関与が示唆された。

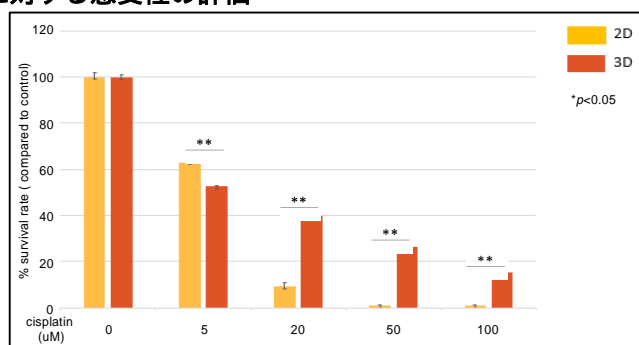


図 3 口腔がんスフェロイドの抗がん剤に対する感受性の評価

2 次元培養およびスフェロイド培養した Ca9-22 細胞に cisplatin を添加し、48 時間培養した。生存細胞を WST-8 assay により定量したところ、スフェロイド培養群では、残存細胞の割合が 2 次元培養群と比較して、有意に増加していた。同様の傾向が HSC-3 細胞でも観察された (データ未掲載)。

## (4) スフェロイド由来 outgrowth 細胞の培養・評価

作製した口腔がんスフェロイドを接着性プレートに再播種して、outgrowth させたところ、ただちに増殖を開始し、約 1 週間でコンフルエントに到達した。同細胞を回収し、(2) と同様に幹細胞性マーカー遺伝子発現について、real-time RT-qPCR 法で確認を行った。その結果、outgrowth 細胞についても parental の 2 次元細胞と比較して、幹細胞性の亢進が維持されていた (図 4)。

この結果を踏まえて、スフェロイド由来の幹細胞の腫瘍原性の評価のため、スフェロイド培養後の口腔がん細胞をヌードマウスに移植し、形成される腫瘍の形態的变化を観察している。さらに形成された腫瘍を採取し、病理組織学的な検討を遂行中である。

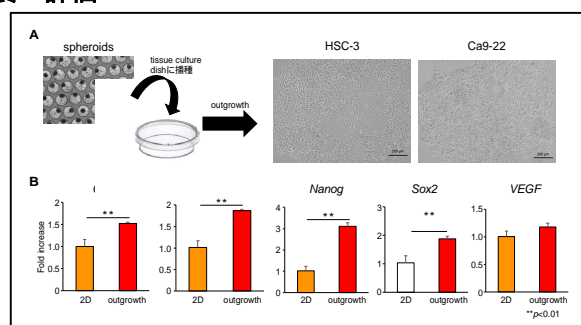


図 4 スフェロイド由来細胞における幹細胞性の維持

形成後のスフェロイドを接着性プレートに再播種し、outgrowth したところ 1 週間程度でコンフルエントに達した (A)。同細胞では、parental 細胞 (2D) と比較して、低酸素マーカーである VEGF の発現亢進は解除されていたものの、各種幹細胞性マーカーの発現亢進は維持されていた (B: Ca9-22 の結果を示す)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 水田 奏、吉賀大午、西牟田文香、大谷泰志、鶴島弘基、土生 学、笹栗正明、富永和宏、吉岡 泉	4. 巻 75 (3, 4)
2. 論文標題 直接経口抗血液凝固薬（DOAC）服用患者の抜歯に関する臨床的検討	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 九州歯科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 39-45
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 西村 瞬、小田昌史、西牟田（平林）文香、藤田優子、松本（武田）忍、若杉（佐藤）奈緒、西田郁子、吉岡 泉、森本泰宏	4. 巻 76 (3, 4)
2. 論文標題 上顎智歯に発症した歯内歯の1例	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 九州歯科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 in print
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 高橋 理、鶴島弘基、矢田直美、西牟田文香、天本晋輔、富永和宏、吉岡 泉	4. 巻 74 (3・4)
2. 論文標題 口蓋に生じた色素沈着に乏しい母斑細胞母斑の1例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 九州歯科学会誌	6. 最初と最後の頁 56・60
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 TABE Shirou, YOSHIOKA Izumi, NISHIMUTA Fumika, YADA Naomi, MATSUO Kou, TOMINAGA Kazuhiro	4. 巻 67
2. 論文標題 A case of cyst of the papilla palatina	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 606～610
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5794/jjoms.67.606	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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 池田礼子、西牟田文香、阿比留衣祝、山崎亮太、岩永賢二郎、吉賀大午、吉岡 泉、有吉 涉
2. 発表標題 口腔扁平上皮がん細胞による2次元培養法と2次元培養法の比較
3. 学会等名 第81回九州歯科学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ikeda R, Nishimuta F, Iwanaga K, Yamasaki R, Yoshioka Y, Yoshiga D, Yoshioka I, Ariyoshi W
2. 発表標題 Establishment and evaluation of spheroid for oral squamous cell carcinoma cells
3. 学会等名 Asia-Pacific Conference in Fukuoka 2022- International Symposium on Oral Education and Research in Kitakyushu (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西牟田文香、岩永賢二郎、國領真也、大渡凡人、吉岡 泉
2. 発表標題 未修復の極型Fallot四徴症を伴う22q11.2欠失症候群患者の抜歯経験
3. 学会等名 第90回（公社）日本口腔外科学会九州支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池田礼子、西牟田文香、岩永賢二郎、吉賀大午、吉岡 泉
2. 発表標題 専用デバイスによる口腔扁平上皮癌3次元培養の確立と評価
3. 学会等名 第55回NPO法人日本口腔科学会九州地方部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鶴島弘基, 土生学, 笹栗正明, 吉賀大午, 大谷泰志, 高橋 理, 三次 翔, 坂口 修, 田中純平, 西牟田文香, 富永和宏, 吉岡 泉
2. 発表標題 顎矯正前後における下顎頭の位置変化の評価
3. 学会等名 第80回九州歯科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西牟田文香, 矢田直美, 田中純平, 坂口 修, 鶴島弘基, 大谷泰志, 吉賀大午, 松尾 拓, 吉岡 泉
2. 発表標題 当科における口腔粘膜疾患に対する擦過細胞診の検討
3. 学会等名 第34回日本口腔診断学会・第31回口腔内科学会合同学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三次 翔, 土生 学, 鶴島弘基, 坂口 修, 西牟田文香, 吉岡 泉, 富永和宏
2. 発表標題 咀嚼筋腱・腱膜過形成症の手術を安全に行うための超音波骨メスとカッピングガイドの応用
3. 学会等名 第34回日本顎関節学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂口 修, 土生 学, 大谷泰志, 鶴島弘基, 西牟田文香, 三次 翔, 白川 智彦, 川元龍夫, 富永和宏, 吉岡 泉
2. 発表標題 下顎骨前方移動術後の下顎頭の三次元的形態変化
3. 学会等名 第34回日本顎関節学会学術大会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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