

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18489

研究課題名（和文）癌オルガノイドを用いた口腔扁平上皮癌幹細胞の治療標的分子の探索

研究課題名（英文）A search for the characteristic molecules of oral squamous cell carcinoma stem cells by generating organoid-like structures

研究代表者

平島 寛司（Hirashima, Kanji）

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：50824661

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）：本研究の目的は、口腔扁平上皮癌(OSCC)幹細胞を標的とする新規治療法の開発に向け、オルガノイド培養技術を用いた癌幹細胞(CSC)の特性分子の探索を行うことである。まず4種類のOSCC細胞株(舌癌HSC-3-M3株・HSC-3株、口底癌KON株、歯肉癌Ca9-22株)にリプログラミングを行い、CSC類似の性質を持つ細胞の抽出を試みた。次にOSCC幹細胞が腫瘍組織を形成するプロセスをin vitroで評価するため、三次元培養を行った。これらの検討の結果、Tra-1-60陽性リプログラミングOSCC細胞をもとに、オルガノイド様構造と、5-FUに対する薬剤耐性を持つ細胞の作製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、口腔扁平上皮癌(OSCC)幹細胞による腫瘍組織構築のプロセスを明らかにし、口腔癌幹細胞に対する新規治療法の開発につなげようとする点に特色と意義を持つ。これまで困難を極めてきた癌幹細胞の特性分子の探索に向け、OSCC細胞のリプログラミングによる分化段階の巻き戻しと、Tra-1-60陽性細胞のソーティングによる幹細胞様の性質を有する細胞の維持培養法の確立、三次元培養によるOSCCオルガノイド様細胞集塊の誘導を行った。この結果を踏まえ、OSCC幹細胞の特性分子を明らかにし、腫瘍組織構築プロセスやOSCC幹細胞の治療標的分子の解明による革新的な分子標的治療法の開発に向けた展開が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to develop a new treatment method targeting oral squamous cell carcinoma (OSCC) stem cells by using organoid culture technology. First, we transduced four reprogramming factors, Oct3/4, Sox2, Klf4, L-myc, into the OSCC cell lines HSC-3-M3 (metastatic lingual carcinoma), HSC-3(lingual carcinoma), KON(oral floor carcinoma), Ca9-22(gingival carcinoma). Tra-1-60 positive cells were obtained from reprogrammed OSCC cells showed cancer stem cell (CSC) properties, including ES/iPS cell like colony formation and increasing expressions of CSC markers. Organoid-like structures and 5-FU resistant cells were successfully prepared from Tra-1-60 positive reprogrammed OSCC cells.

研究分野：再生医学

キーワード：がん幹細胞 リプログラミング iPS細胞 口腔扁平上皮癌

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

わが国における悪性腫瘍(癌、肉腫等)の新規診断数は年間約 100 万人を数え、国民の 2 人に 1 人が生涯の間に癌や肉腫等の悪性腫瘍に罹患する。診断・治療技術の向上にもかかわらず、その治療は悪性腫瘍の特徴でもある転移や再発によってより困難なものとなり、2021 年においても 38 万 1 千人以上が悪性腫瘍によって命を落とすことが知られる。全悪性腫瘍の 1%を占める口腔癌においても、転移・再発症例の治療成績の向上なくして口腔癌克服への道のりは遠いと言わざるを得ない。

この転移・再発の原因として、癌組織中にごくわずかに存在する癌幹細胞の存在が挙げられる。癌幹細胞は組織幹細胞や ES/iPS 細胞と類似の性質を持ち、自己複製能や薬剤耐性能を持つとされる。この細胞が起点となり腫瘍組織が構築されるとする癌幹細胞仮説に基づくならば、癌の根治には癌幹細胞の撲滅が不可欠であり、癌幹細胞を重要な治療標的とする多くの研究が行われている。しかし、癌幹細胞はその希少性から腫瘍組織中より分離することは極めて困難で、今なお多くの癌において未解明の点が多い。

我々は口腔扁平上皮癌(OSCC)を対象に、OSCC 幹細胞に類似した細胞を作り出すことがその特性を解明する足掛かりになると考え、iPS 細胞作製に用いる山中因子の導入、すなわちリプログラミング技術を用いた検討を行った。また、リプログラミングを行った癌細胞株より、癌幹細胞と特性の似た細胞を抽出し、癌組織を模した“癌オルガノイド”を作成することで、腫瘍組織が形成されるプロセスを明らかにし、OSCC の治療標的分子の解明に向けた検討を行った。

### 2. 研究の目的

本研究は口腔扁平上皮癌(OSCC)幹細胞に対する新規治療法の開発に向け、癌治療の最大の障壁となる転移・再発の元凶とされる癌幹細胞(CSC)の特性解析を行うことを目的とする。癌細胞に iPS 細胞作製時に用いる手法である“リプログラミング”によって分化段階を巻き戻すことで CSC をいわば人工的に作り出し、その細胞の性状を詳細に解析することで、実在の OSCC 幹細胞の細胞特性を明らかにしようとするものである。

また、リプログラミング OSCC の三次元培養によりオルガノイドを作製し、OSCC 組織が形成されるプロセスを *in vitro* で再現する。これらを総合的に評価することで、OSCC 幹細胞の治療標的分子を明らかにすることが本研究の最終目標である。

### 3. 研究の方法

#### (1)口腔癌細胞株のリプログラミング

口腔癌細胞株は HSC-3-M3(舌癌転移巣由来)、HSC-3(舌癌由来)、KON(口底癌由来)、Ca9-22(歯肉癌由来)の 4 株を用いた。センダイウイルスベクターを用いてこれらの口腔癌細胞株にリプログラミングを行い、細胞の分化段階の巻き戻しを行った。ベクター感染後、フィーダー細胞であるマウス線維芽細胞上に播種して ES/iPS 細胞用培地中で培養することで、ES/iPS 細胞様のコロニーが形成された。

#### (2)リプログラミング口腔癌細胞の特性評価

Real time-PCR および蛍光免疫染色による CD133、CD44、CD24、ALDH1 等既知の癌幹細胞マーカーおよび、未分化マーカー Oct3/4 および Nanog の評価を行った。リプログラミング直後は一過性に未分化マーカーや既知の癌幹細胞マーカーの高発現がみられたが、継代を重ねるに従いそれらのマーカーの発現は低下し、細胞形態もリプログラミング前の状態に近くなった。

#### (3)口腔癌幹細胞様細胞の回収と継続培養法の確立

リプログラミング OSCC 細胞の中から磁器細胞分離装置(MACS)を用いて Tra-1-60 陽性細胞を単離・継代することで、未分化マーカー(Nanog, Oct3/4 等)や既知の癌細胞マーカー(CD133, CD90, CD24 等)を高発現している細胞集団を維持することに成功した。

#### (4)口腔癌オルガノイド様構造作成法の確立

マトリゲルを用いた三次元培養を行い、口腔癌細胞株由来のオルガノイド様構造を作成した。Tra-1-60 陽性リプログラミング OSCC 細胞は、オルガノイド形成用培地に浸漬したマトリゲル中に播種することで細胞集塊を形成した。また、口腔癌細胞株の元株および Tra-1-60 陰性リプログラミング OSCC 細胞を用いた場合も細胞集塊の形成がみられたが、Tra-1-60 陽性細胞を用いた場合と比較して細胞増殖速度が速い結果となった。

#### (5)リプログラミング OSCC 細胞の 5-FU に対する耐性の評価

Tra-1-60 陽性リプログラミング OSCC 細胞の抗腫瘍薬耐性能を評価するため、50  $\mu\text{g/ml}$  の 5-FU 処理を 48 時間行い、元株および Tra-1-60 陰性リプログラミング OSCC 細胞と比較検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 口腔癌細胞株のリプログラミングと長期培養法の開発

本研究では、研究代表者らが大腸癌細胞において確立した方法<sup>1</sup>を改変し、HSC-3-M3 株(舌癌転移巣由来)、HSC3 株(舌癌由来)、KON 株(口底癌由来)、Ca9-22 株(歯肉癌由来)の4種類の口腔癌細胞株に対してリプログラミングを行った。リプログラミング直後の口腔癌細胞株は、ES/iPS 細胞様のコロニーを形成するが、培養を継続する過程でリプログラミング前の形態へと戻った。継代時に Tra-1-60 陽性細胞を磁気細胞分離装置(MACS)で分離・継代し、フィーダー細胞上で継続培養することで、ES/iPS 細胞様のコロニーの維持が可能となった(図1)。また、リプログラミング後には一過性に Oct3/4 や Nanog 等の未分化マーカーや CD133 や ALDH1 等の既知の癌幹細胞マーカーの発現上昇を認めたが、培養を継続する過程でそれらの発現は低下し、リプログラミング前と同水準まで発現は低下した。継代のたびに Tra-1-60 陽性細胞を MACS で分離して培養することで、各種未分化マーカーや癌幹細胞マーカーの

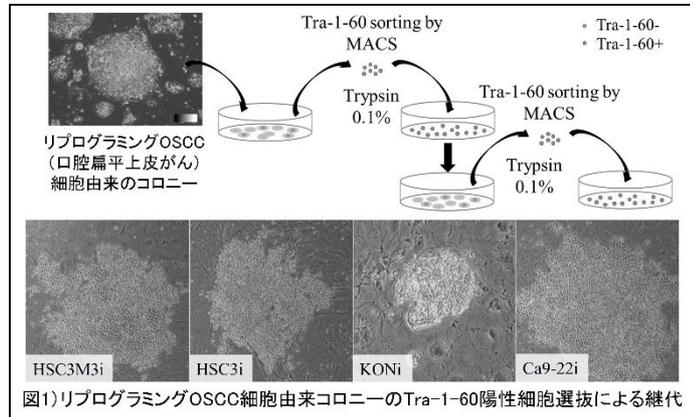


図1)リプログラミングOSCC細胞由来コロニーのTra-1-60陽性細胞選抜による継代

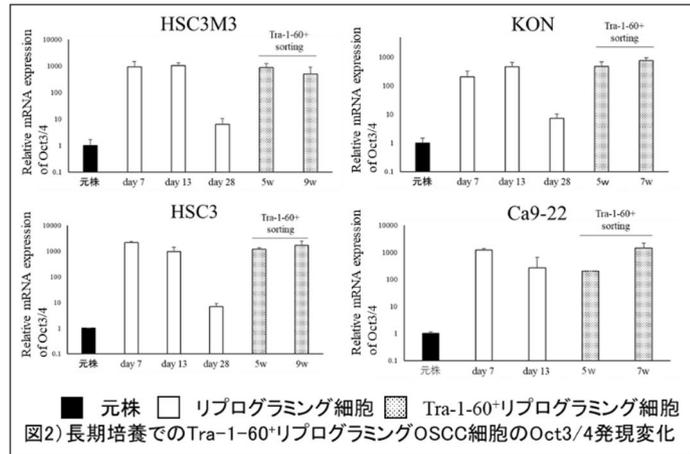


図2)長期培養でのTra-1-60<sup>+</sup>リプログラミングOSCC細胞のOct3/4発現変化

発現がリプログラミング直後の水準にあり(図2)、かつ ES/iPS 細胞様コロニーを形成することが明らかになった。この細胞集団はリプログラミング前の細胞や Tra-1-60 陰性細胞と比較して著しく細胞増殖能が低く、10~14日に1回の頻度で継代を行った。

##### (2) リプログラミング OSCC 細胞由来の三次元培養と 5-FU に対する薬剤耐性の獲得

Tra-1-60 陽性リプログラミング OSCC 細胞の特性評価と、*in vitro* での腫瘍組織評価系の構築に向けた口腔癌細胞の三次元培養を行った。既報の舌上皮細胞由来オルガノイド形成法<sup>2</sup>を参考にマトリゲルを用いた三次元培養によってリプログラミング OSCC 細胞由来の細胞集塊が形成された(図3)。また Tra-1-60 陽性リプログラミング OSCC 細胞は、元株および Tra-1-60 陰性リプログラミング OSCC 細胞と比較し 50 μg/ml 5-FU 処理に対して有意に耐性を示した(図4, p<0.05)。

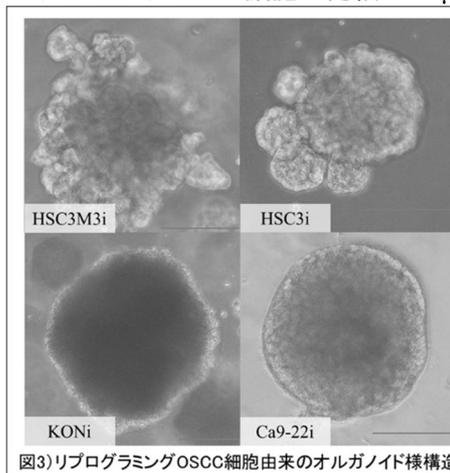


図3)リプログラミングOSCC細胞由来のオルガノイド様構造

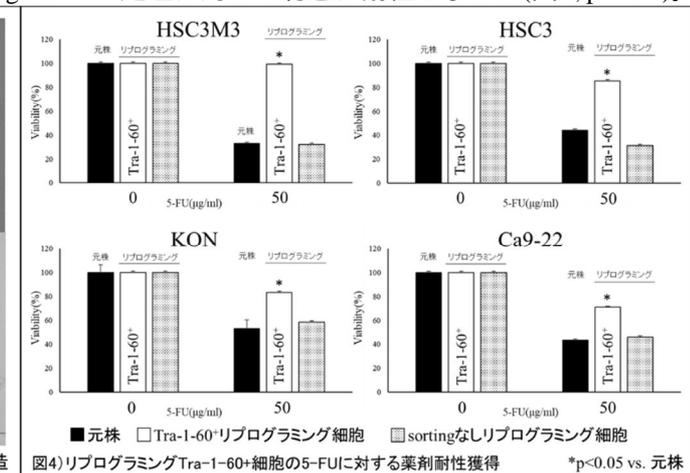


図4)リプログラミングTra-1-60<sup>+</sup>細胞の5-FUに対する薬剤耐性獲得 \*p<0.05 vs. 元株

#### 【参考・引用文献】

- [1] Hirashima K, et al 「Cell biological profiling of reprogrammed cancer stem cell-like colon cancer cells maintained in culture」 Cell Tissue Res, 375, 2019
- [2] Hisha H, et al 「Establishment of a Novel Lingual Organoid Culture System: Generation of Organoids Having Mature Keratinized Epithelium from Adult Epithelial Stem Cells」 Sci Rep, 3:3224, 2013

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平島 寛司、柴垣 皓一、齋藤 敦史、佐藤 住美江、高田 清美、池田 利恵、菊池 憲一郎
2. 発表標題 リプログラミング細胞を用いた口腔がんオルガノイド樹立の試み
3. 学会等名 第21回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平島 寛司、齋藤 敦史、宮坂 彩子、澤野 和生、佐藤 住美江、高田 清美、池田 利恵、菊池 憲一郎
2. 発表標題 リプログラミングによる口腔がん幹細胞様細胞の作製と評価
3. 学会等名 第19回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020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
---------	---------