

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09862

研究課題名（和文）転移性口腔癌細胞を用いた鶏卵漿尿膜移植法の確立と治療標的分子の同定

研究課題名（英文）Establishment of chorioallantoic membrane assay using oral cancer cells with high metastatic ability and identification of therapeutic target molecules

研究代表者

櫻井 浩平（Sakurai, Kouhei）

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：10608756

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）：複雑なステップを経て成立する口腔癌の転移を解析するためには、癌進展を模倣した癌細胞モデルと動物実験モデルが必要である。本研究では、細胞モデルとしてHSC-3細胞とHSC-3-M3細胞を利用して、遺伝子発現解析を行った。発現変動遺伝子の中から予後に関与する遺伝子を複数見出した。また動物実験モデルとして鶏卵漿尿膜移植法を確立した。移植部の腫瘍はHE染色や免疫染色によって病理組織学的に詳細に解析できることから、遺伝子の発現・機能解析を安価、迅速に行う基盤を構築することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌の研究には様々な癌細胞株が利用されているが、各細胞株の特性・背景は異なっているため、解析結果を直接比較することが困難な場合も多い。本研究で用いたHSC-3細胞とHSC-3-M3細胞は同一患者の癌進展モデルとして有用と考えられた。また、本研究で確立した鶏卵漿尿膜移植法は、安価かつ迅速に癌進展を再現することができ、マウス実験に代わる（あるいはマウス実験の前段階で行う）動物実験と考えられた。

研究成果の概要（英文）：Appropriate cancer cell models and animal experimental models that mimic cancer progression are required to analyze the metastasis of oral cancer cells, which occurs through complex steps. In this study, gene expression analysis was performed using HSC-3 cells and HSC-3-M3 cells and several genes related to prognosis were identified. In addition, chorioallantoic membrane assay was established as an animal experimental model. The tumors at the transplanted site could be histologically analyzed in detail using HE staining and immunohistochemical staining, and we have established the inexpensive and rapid analysis for gene expression and function.

研究分野：分子病理学

キーワード：口腔癌 転移 鶏卵漿尿膜移植法 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の90%以上を占める口腔扁平上皮癌の治療は外科的切除が第一選択であり、早期癌は根治も見込める。しかし口腔領域には脈管が豊富に存在するため転移をきたす症例も少なくない。頸部リンパ節や遠隔臓器へ転移した口腔癌症例は、予後不良となる。転移に対する集学的治療法の開発が行われているが、転移の分子機構は不明な点も多い。

複雑なステップを経て成立する口腔癌の転移を解析するためには、癌進展を模倣した「癌細胞モデル」と「動物実験モデル」が必要である。口腔癌の研究には、様々な癌細胞株が利用されているが、各細胞株の特性・背景は異なっているため、解析結果を直接比較することが困難な場合も多い。またヌードマウスへの癌細胞移植実験によって *in vivo* における機能を解析することが広く行われているが、一般的にコストや時間がかかることからマウス実験に代わる（あるいはマウス実験の前段階で行う）動物実験も求められている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、癌細胞モデルと動物実験モデルを組み合わせることで口腔癌の転移に対する治療標的分子を同定することである。癌細胞モデルとして、口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3 とその高転移能株 HSC-3-M3 細胞を用いる。HSC-3 細胞をヌードマウスの舌に移植し、頸部リンパ節転移した細胞を回収して樹立した細胞が HSC-3-M3 細胞である (Oral Oncology, 34(4), 253-256, 1998)。HSC-3-M3 細胞は、親株である HSC-3 細胞よりも高い転移能を有するが遺伝的背景は類似している。従って、この2つの細胞は同一患者の癌進展モデルとして有用と考えられる。

動物実験モデルとして、鶏卵漿尿膜移植法 (Chorioallantoic membrane assay : CAM assay) を用いる。漿尿膜は鳥類などの発生中の卵殻直下に存在する構造物であり呼吸器官として働く。漿尿膜は栄養に富んだ組織であり、免疫系が未発達であることからヒト癌細胞を移植すると拒絶されることなく腫瘍塊が形成される。さらに漿尿膜中には脈管が豊富に存在し、浸潤した癌細胞が脈管を介してニワトリ胚の臓器へ転移するため、転移能も評価できるとされている。これらの細胞株と動物実験を、口腔癌転移の研究に利用するための基盤を構築することから開始した。

3. 研究の方法

(1) HSC-3 細胞と HSC-3-M3 細胞の遺伝子発現比較解析

我々は HSC-3 細胞と HSC-3-M3 細胞の遺伝子発現を網羅的に比較解析して報告してきた (Ideta Y et al. Cancer Genomics & Proteomics, 18(1):17-27, 2021)。この結果を再利用して、転移に関する経路や遺伝子の探索を行った。

(2) CAM assay の確立

ニワトリ有精卵を孵卵器 (Rcom ビッグママ 20、ベルバード) 内へ入れ、37.5°C、湿度 65%、転卵 1 時間に 1 回の設定で孵卵を開始した。孵卵開始 9~10 日目にラウンドバーで卵に穴を開け、漿尿膜を露出させた。HSC-3 細胞あるいは HSC-3-M3 細胞を漿尿膜上へ移植して、転卵設定を停止した孵卵器へ戻した。その後 4~9 日間にわたって移植部の腫瘍の形成を観察し、実験終了時には発生中のニワトリ胚を安楽死させた。移植部の腫瘍を摘出してホルマリン固定パラフィン包埋標本を作製した。HE 染色および免疫染色を行い顕微鏡で観察した。また、口腔癌細胞以外に肺癌細胞株 VMRC-LCD を用いて同様の実験を行い、RNAscope *in situ* hybridization (IHC) による病理解析をした。

(3) CAM assay における HSC-3-M3 細胞移植実験

上記と同様の実験手順に従いながら、HSC-3-M3 細胞の移植細胞数を変えて CAM assay を行った。実験終了時には、移植部の腫瘍だけでなく、ニワトリ胚から肝臓、肺、脳も摘出してホルマリン固定パラフィン包埋標本を作製して、顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) HSC-3細胞と HSC-3-M3細胞から抽出したRNAで遺伝子発現マイクロアレイを行ったところ、1,018個の発現変動遺伝子を認めた (Ideta Y et al. *Cancer Genomics & Proteomics*, 18(1):17-27, 2021)。Gene Set Enrichment Analysisによって、HSC-3-M3細胞で発現増加する遺伝子の中には、転移で発現増加する遺伝子が有意に含まれていた。その中で *DEP domain containing 1* (*DEPDC1*) と *striatin 3* (*STRN3*) に注目して、予後解析をした。The Cancer Genome Atlas (TCGA) の Head and Neck Squamous Cell Carcinoma dataset を用いて解析したところ、*DEPDC1*、*STRN3* いずれも、発現が高い頭頸部癌症例は予後不良となることが明らかになった。*DEPDC1* と *STRN3* のノックダウン細胞株を作製し、細胞増殖等の表現型について引き続き解析している。

(2) CAM assay において HSC-3 細胞、HSC-3-M3 細胞いずれも移植部に腫瘍を形成した。同一細胞数で移植した場合でも、形成された腫瘍の重量に差は見出されなかった。CK5/6 陽性、p40 陽性の細胞が密に増殖しながら、漿尿膜組織に浸潤する像が認められた。

肺癌細胞株 VMRC-LCD を移植した場合も腫瘍が形成された。ホルマリン固定パラフィン包埋標本で、long non-coding RNA である *Downregulated RNA In Cancer, Inhibitor of Cell Invasion and Migration* (*DRAIC*) を RNAscope ISH で解析すると、核内および細胞質内に茶褐色で染色された *DRAIC* の発現が認められた。これらの結果から、移植部の腫瘍は HE 染色による観察だけでなく、免疫染色や ISH で病理学的に解析できることが分かった。

(3) 移植する細胞数を変えながら、HSC-3-M3 細胞で CAM assay を行った。1x10⁶ 個以上の細胞数

を移植すると肉眼的に認識可能な腫瘍が形成された。5x10⁶ 個の細胞数を移植した 1 個体のニワトリ胚で、肝臓内に HSC-3-M3 細胞と思われる数個の細胞が HE 染色で観察された。再びパラフィンブロックを薄切し、新たに作製した標本で CK5/6、p40 の免疫染色を行ったが、HSC-3-M3 細胞と思われた細胞が消失したため検索不可能であった。

過去の報告では、移植する癌細胞の種類によってニワトリ胚への転移が認められる場合と認められない場合があった。CAM assay は孵化前（孵卵開始後 21 日目）に実験を終了するため、実験期間が短期間となり、転移が成立することが移植細胞によっては困難となると考えられる。今回は HE 染色と免疫染色で転移を検討したが、ニワトリ胚の臓器から DNA を抽出し、ヒトゲノム DNA を特異的に検出する PCR で転移を検討することも有用であると思われる。また、漿尿膜の血管内へヒト癌細胞を直接注入する実験も行われている。今後はこれらの手法を検討しながら、上記 (1) で見出した *DEPCI* や *STRN3* の機能解析に結びつけていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 5件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Kouhei Sakurai, Akira Nagai, Tatsuya Ando, Yasuhiro Sakai, Yuka Ideta, Yuichiro Hayashi, Junichi Baba, Kenji Mitsudo, Masaharu Akita, Nobutake Yamamichi, Hidetsugu Fujigaki, Taku Kato, Hiroyasu Ito | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 Cytomorphology and Gene Expression Signatures of Anchorage-independent Aggregations of Oral Cancer Cells | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Genomics & Proteomics | 6. 最初と最後の頁 64-74 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/cgp.20365. | 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 該当する |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Daisuke Ohki, Nobutake Yamamichi, Yoshiki Sakaguchi, Yu Takahashi, Natsuko Kageyama-Yahara, Mitsue Yamamichi, Chihiro Takeuchi, Yosuke Tsuji, Yasuhiro Sakai, Kouhei Sakurai, Shuta Tomida, Kazuhiko Koike, Mitsuhiro Fujishiro | 4. 巻 0 |
| 2. 論文標題 Transcriptome of sessile serrated adenoma/polyps is associated with MSI-high colorectal cancer and decreased expression of CDX2 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Medicine | 6. 最初と最後の頁 1-13 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.4810. | 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 該当する |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Taku Kato, Kyojiro Kawakami, Kosuke Mizutani, Tatsuya Ando, Yasuhiro Sakai, Kouhei Sakurai, Shohei Toyota, Hidetoshi Ehara, Hiroyasu Ito, Masafumi Ito | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 H19 in serum extracellular vesicles reflects resistance to AR axis-targeted therapy among CRPC patients | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Genomics & Proteomics | 6. 最初と最後の頁 456-468 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/cgp.20397 | 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 該当する |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kouhei Sakurai, Tatsuya Ando, Yuka Ideta, Yuichiro Hayashi, Junichi Baba, Kenji Mitsudo, Hiroyasu Ito | 4. 巻 43 |
| 2. 論文標題 Transcriptome of oral cancer cells adapted to suspension culture is potentially related to cancer progressive phenotypes | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Anticancer Research | 6. 最初と最後の頁 3905-3911 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticanres.16578 | 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 該当する |

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Takeuchi C., Sato J., Yamamichi N., Kageyama-Yahara N., Sasaki A., Akahane T., Aoki R., Nakajima S., Ito M., Yamamichi M., Liu YY., Sakuma N., Takahashi Y., Sakaguchi Y., Tsuji Y., Sakurai K., Tomida S., Niimi K., Ushijima T., Fujishiro M. | 4. 巻 59 |
| 2. 論文標題 Marked intestinal trans-differentiation by autoimmune gastritis along with ectopic pancreatic and pulmonary trans-differentiation | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology | 6. 最初と最後の頁 95-108 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-023-02055-x | 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 該当する |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Kouhei Sakurai, Seiji Yamada, Rika Ito, Mako Ochiai, Tatsuya Ando, Yasuhiro Sakai, Taku Kato, Hiroyasu Ito | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Chromogenic in situ hybridization reveals specific expression pattern of long non-coding RNA DRAIC in formalin-fixed paraffin embedded specimen | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Non-coding RNA Research | 6. 最初と最後の頁 76-83 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ncrna.2023.11.004 | 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 該当する |

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Kouhei Sakurai, Hiroyasu Ito | 4. 巻 343 |
| 2. 論文標題 Multifaced roles of the long non-coding RNA DRAIC in cancer progression | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Life Sciences | 6. 最初と最後の頁 1-13 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2024.122544 | 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 該当する |

〔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 櫻井浩平、永井徳、秋田正治、安藤達也、酒井康弘、加藤卓、伊藤弘康 |
| 2. 発表標題 足場喪失によって形成される癌細胞クラスターの分子病理学的解析 |
| 3. 学会等名 第35回 日本動物実験代替法学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 永井徳、櫻井浩平、酒井康弘、安藤達也、加藤卓、伊藤弘康 |
| 2. 発表標題 足場非依存的な癌細胞クラスター形成を制御する分子機構の解析 |
| 3. 学会等名 第112回 日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| researchmap https://researchmap.jp/kousaku |
|--|

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 | 酒井 康弘 (Sakai Yasuhiro) (20754394) | 藤田医科大学・医学部・講師 (33916) | |
| 研究分担者 | 林 雄一郎 (Hayashi Yuichiro) (80806464) | 横浜市立大学・医学研究科・客員研究員 (22701) | |
| 研究分担者 | 山田 勢至 (Yamada Seiji) (00566870) | 藤田医科大学・医学部・准教授 (33916) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|