The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	交互積層法を用いて構築した三次元組織体の口腔癌浸潤モデルへの応用および口腔粘膜モデルの構築
Author(s)	西山, 今日子
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72230
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　西山　今日子　）	
論文題名	交互積層法を用いて構築した三次元組織体の口腔癌浸潤モデルへの応用 および口腔粘膜モデルの構築

論文内容の要旨

【背景および目的】

ヒト生体組織は同種・異種の細胞が細胞外マトリックス（extracellular matrix: ECM）成分を介して集積し，組織・器官・臓器を構築することで，単一細胞では得ることのできない多様な機能発現が可能になっている．従来の癌研究や創薬研究で用いられてきた二次元的な細胞培養法や動物実験では，二次元と三次元，動物とヒトという種差の問題があり，ヒト生体内で起こる事象を完全に反映・再現できているとはいえない．近年，*in vitro*において，個々の細胞の配置を空間的に制御した三次元培養組織において，単一細胞または従来の二次元培養では得ることのできない，生体組織が持つ高い機能を示すことが報告されている．三次元培養技術はすでに多くの報告があり,三次元組織を用いた創薬研究，再生医療研究等に対して，基礎から臨床応用まで，多目的に活用されている．しかし，これまでに報告されている三次元培養技術は，組織内部の壊死，使用可能な細胞の選択性，多種細胞との共培養に関して様々な課題を有している．

これに対して，交互積層（layer-by-layer; LbL）細胞コート法を用いた三次元組織構築技術は，細胞表面にfibronectin（FN）とgelatin（G）からなるナノ薄膜をコートすることで，細胞間接着を誘起し，短期間で三次元細胞積層体の構築が可能である．本組織構築技術は，高い細胞生存率を維持したまま，複数細胞の配置制御により血管・リンパ管網を含む多種多様なヒト組織モデルの構築が可能であり，生体組織の構造・機能を反映した正常・疾患組織モデル創出の基盤技術として有用である．我々はこれまでに，ヒト皮膚由来線維芽細胞（normal human dermal fibroblast: NHDF）にLbL細胞コートを行い構築した三次元皮膚真皮モデルに，口腔癌細胞を播種し，三次元組織体中における癌細胞の増殖や浸潤挙動を観察・解析し，*in vivo*との相関性を明らかにしてきた．しかし，今後，この三次元組織が口腔癌研究に応用され，より生体環境に則した口腔癌細胞の挙動を*in vitro*で再現するには，口腔粘膜由来の細胞を用いた口腔粘膜上皮下組織(間質組織)モデルの構築が必要である．さらには，口腔癌組織の微小環境を再現するには，間質のみではなく，上皮層，基底膜および脈管系などの付属器を含む口腔粘膜モデルの創出が求められている．

そこで本研究では，LbL細胞コート法を用いて，口腔粘膜由来線維芽細胞から三次元組口腔粘膜間質モデルを構築し，口腔癌浸潤モデルとして応用可能か検討した．さらに，上皮層と間質部からなる口腔粘膜モデル，血管様構造を伴う口腔粘膜モデルの構築について検討を行った．

【材料および方法】

1.　三次元口腔粘膜間質モデルの構築

LbL細胞コート法を用いて，ヒトロ腔粘膜由来線維芽細胞（human oral mucosal fibroblasts: HOMF）にFNとGのコーティングを行い，三次元組織の構築を行った．さらに，ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（human umbilical vein endothelial cells: HUVEC）と混合培養することで，血管様構造を有する口腔粘膜間質モデルの構築を試みた．また，LbL細胞コート法の使用有無による，HOMFを用いた組織構築の差を比較検討した．

2.　口腔癌浸潤モデルの構築

口腔粘膜間質モデル，血管様構造を含む口腔粘膜間質モデル，NHDFから構築した皮膚真皮モデルに，口腔扁平上皮癌細胞であるSAS-GFP細胞またはHSC3-GFP細胞を播種し培養した.共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて，三次元組織中の口腔癌細胞の経時的な増殖・浸潤挙動の観察を行い，浸潤過程におけるMMP-2,MMP-9の産生量をELISA法にて測定した．

3.　口腔粘膜モデルの構築

LbL細胞コートを行ったHOMFを用いて構築した口腔粘膜間質モデル上に，口腔角化粘膜由来上皮細胞（human oral mucosal keratinocytes: HOMK）または口腔非角化粘膜由来上皮細胞（human oral keratinocytes: HOK）を播種し．気相-液相界面（air-lift）培養を行った．構築した組織は，HE染色，免疫組織化学染色により構造を評価した．また，経皮的電気抵抗（transepithelial electrical resistance: TEER）値を測定しバリア機能を評価した．さらに，間質部の構築時にHUVECを混合し，血管様構造を含む口腔粘膜モデルの構築の検討も行った．同様に組織構造の観察とバリア機能を評価した．

【結果】

1. HOMF にLbL細胞コートすることで，HOMFが積層した口腔粘膜間質モデルが構築できた．
2. LbL細胞コート法を用いることで，構築した三次元口腔粘膜間質モデルにおける細胞間接着や血管様構造の形成が促進されることが明らかとなった．
3. 口腔癌浸潤モデルにおける，口腔癌の増殖・浸潤の挙動を，経時的に観察することができた．
4. 口腔癌細胞の二次元培養と比較し，LbL細胞コート法を用いて構築した三次元組織を応用した口腔癌浸潤モデルでは，MMP産生量が有意に増加した．
5. 皮膚真皮モデルを用いた口腔癌浸潤モデルにおけるMMP産生量と比較し，口腔粘膜間質モデルを用いた口腔癌浸潤モデルではMMP産生量が有意に増加した．
6. LbL細胞コート法を用いて，生体組織に類似した上皮階層構造を有する口腔粘膜モデルを構築することができた．
7. 口腔角化および非角化上皮細胞を用いることで，角化程度の異なる2種類の口腔粘膜モデルを作製し，バリア機能の差異をTEER値の測定により明らかにした．
8. 血管様構造を含む口腔粘膜モデルの構築を行うことができた．

【考察および結論】

本研究では，LbL細胞コート法を用いて，HOMFから三次元組織モデルを構築し，口腔癌浸潤モデルへの応用，さらに上皮と間質部から構成される口腔粘膜モデルの構築について検討を行った．

LbL細胞コート法を用いることで，HOMFにFN/Gがコーティングされ，構築三次元組織における細胞間接着や血管様構造形成の促進が認められた．LbL細胞コート法を用いたHOMFへのECM成分のコーティングは，単に細胞間の糊付けとしての役割だけでなく，細胞間相互作用，細胞機能を高める役割を担うことが明らかとなった．

LbL細胞コート法を用いて構築した三次元組織を使用した口腔癌浸潤モデルにより，従来の癌研究では困難だった，癌浸潤過程の詳細な経時的観察が可能になることが示された．また，二次元癌細胞培養と三次元癌浸潤モデルにおけるMMP産生量に有意な差が認められことは，本モデルにより癌微小環境を*in vitro*で再現しえたことを示唆している.今後，三次元組織中の経時的な癌細胞浸潤過程において，癌細胞または周囲細胞の遺伝子発現・蛋白質産生の解析を行うことで，癌細胞の浸潤メカニズムの解明および転移予防や抗癌剤開発などに大いに貢献することが期待される．

上皮と間質から構成される口腔粘膜モデル構築の検討では，実際の口腔粘膜組織と同様に角化・分化程度の異なる2種類のモデルを構築することが可能であった．その構造の違いは，HE染色・免疫組織化学染色結果だけでなく，バリア機能の差として定量的に示すことが可能であった．さらに，間質部作製時に，HUVECを混合することで，血管様構造を有する口腔粘膜モデルの構築も可能であった．本モデルでは，播種する細胞数や培養日数を制御することで，構築組織の厚みや上皮の分化程度，間質部に含まれる血管様構造の数や大きさをコントロールできることから，目的に合わせたの組織構造の最適化が可能になると考えられる．

本研究で構築したモデルは，再生医療や創薬研究，癌などの疾患モデルへの応用など，様々な分野での活用が期待でき，さらに脈管構造だけでなく炎症細胞や幹細胞，唾液腺，骨などを間質部に伴わせることで，より複雑な生体環境を再現したモデルとして発展することが期待できる．

平成３１年　１月３０日

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　西山　今日子　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教授	鵜澤　成一
	副 査　教授	豊澤　悟
	副 査　准教授	野崎　剛徳
	副 査　講師	住友　倫子

論文審査の結果の要旨

本研究は、交互積層細胞コート法を用いて、口腔粘膜由来細胞から三次元組織モデルを構築し、口腔癌浸潤モデルへの応用、さらに上皮と間質から構成される口腔粘膜モデルの構築について検討したものである。その結果、三次元培養を用いた口腔癌浸潤モデルにおいて、口腔癌細胞の増殖・浸潤挙動を経時的に観察し、二次元培養とは異なる癌細胞の挙動を明らかにした。また、生体組織に類似した角化程度の異なる二種類の口腔粘膜モデルを構築し、さらに間質に血管様構造を導入できることを示した。

以上は、口腔粘膜由来細胞を用いた三次元組織構築の重要性を示し、今後更なる発展が期待されるものであり、本研究は、博士（歯学）の学位論文として価値あるものと認める。