OUKA
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

学位論文

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

大阪大学大学院歯学研究科　口腔科学専攻

顎口腔病因病態制御学講座　口腔外科学第二教室

西山　今日子

目次

緒論 1

本論

1. 三次元口腔粘膜間質モデルの構築 4

1-1 材料と方法

1-2 結果

1-3 考察

2. 口腔癌浸潤モデルの構築 10

2-1 材料と方法

2-2 結果

2-3 考察

3. 口腔粘膜モデルの構築 17

3-1. 材料と方法

3-2. 結果

3-3. 考察

総括 28

結論 28

脚注・謝辞 29

引用文献 30

緒論

ヒト生体は，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などで用いられてきた解析方法として，*in vitro* では二次元的な細胞培養法・反応試験が，*in vivo* では動物実験が一般的に行われてきた．しかし，これらの方法は実際のヒト生体と比較すると，二次元と三次元，ヒトと動物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生体環境に近い三次元的な培養を行うことで，単一細胞または従来の二次元細胞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 [1)]．三次元培養技術は既に多くの報告があり，科学研究や臨床応用・産業分野において多目的に利便性の高い方法として発展してきた．最近では，より生体組織に近似した複雑な構造を有し，組織・臓器としての機能性も向上させた三次元培養ヒト生体組織が報告されている [2)]．三次元培養ヒト生体組織は，移植材料として医療分野で応用されるだけでなく，動物実験の代替となる *in vitro* での解析手段としても注目されている [3)]．さらに，炎症や創傷，感染，癌などの疾患モデルへの応用も行われるようになり，従来の解析方法では限界のあった生体メカニズムの解明が期待される [4)]．

近年，口腔癌研究においても三次元培養技術を用いた研究が展開されている．特に細胞凝集体であるスフェロイド培養法は代表的な方法であり，種々の細胞で使用されているが，内部細胞の壊死，内部構造・配列の意図的な制御，多種細胞との共培養に関して様々な課題を有している [5)]．他の方法として，コラーゲンゲルやマトリゲルを用いた癌細胞の浸潤・増殖過程の観察や液性因子の解析も多く行

われているが [6], 癌微小環境を再現するには ECM 成分だけでなく線維芽細胞や血管・リンパ管などの脈管構造も伴う三次元環境の再現が求められている.

従来の三次元培養技術の欠点・課題に対して, fibronectin (FN) と gelatin (G) を用いた交互積層(Layer-by-layer; LbL)細胞コート法が開発された [7,8]. この LbL 細胞コート法は, FN がインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ と collagen に結合するドメインを有していることに着目し [9], 細胞表面に FN と collagen の変性体である G を交互に積層させナノ薄膜を形成させる手法である. 細胞表面に形成されたナノ薄膜が細胞間の糊付け・足場の役割を果たすことで, 細胞間接着を誘起し短期間で三次元的な細胞積層体の構築が可能になる. 本手法を用いて, 皮膚真皮由来線維芽細胞や血管内皮細胞 [10], 肝細胞 [11], 膵 β 細胞 [12], iPS 細胞由来心筋細胞 [13]など様々な細胞で既に三次元組織構築が行われている.

LbL 細胞コート法を用いて構築した三次元組織の応用例として, 癌浸潤モデルがある [14]. これは, 構築した三次元皮膚真皮モデルに癌細胞を播種し, 三次元組織中における癌細胞の増殖や浸潤挙動を観察・解析したものである. 我々は, この皮膚真皮モデルに口腔癌細胞を播種した口腔癌浸潤モデルの検討を行い, *in vivo* との相関性を明らかにしてきた [15]. しかし, この三次元組織が口腔癌研究に今後応用され, 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, 口腔粘膜由来細胞を用いた三次元間質組織モデルの構築が必要であると考えられる. また, 口腔扁平上皮癌などの生体における口腔癌細胞は, 単に間質組織における増殖・浸潤挙動のみで悪性度を評価することはできない. 癌が発生する上皮層や, 間質に到達するには破壊しなければならない基底膜の存在は重要であり, これら上皮層や基底膜も伴う口腔粘膜モデルの構築が求められる.

組織工学・再生医療研究分野において報告されている従来の口腔粘膜モデルとして, 上皮細胞のみを培養した上皮細胞シート [16]およびコラーゲンゲル等に線維

芽細胞を混合した間質モデル上に上皮細胞を播種した複合体[17]の２種類が存在する．これらのモデルは，口腔外科領域における移植材料[18, 19]や，動物実験に代わる薬剤刺激・毒性試験への使用[20]，口腔癌や歯周病といった疾患モデル[21]への応用など幅広く活用されつつある．しかし，より生体口腔粘膜組織に近似したモデル構築のためには，口腔粘膜組織に特徴的な角化/非角化，分化程度が異なる上皮構造や，様々な付属器・周囲の器官を伴わせる必要がある．とりわけ脈管構造を含む口腔粘膜モデルの構築は，口腔癌研究や再生医療への応用を目指すには非常に重要である．癌細胞の脈管侵襲や癌組織における腫瘍血管への変性のメカニズムの解明，さらに，再生医療分野において移植材料として応用された場合は，脈管構造を有することで移植後の酸素・栄養供給や老廃物の代謝による生着率の向上が望まれる．しかしながら，血管・リンパ管様構造を含む口腔粘膜モデルの構築は未だ報告されていない．

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，上皮と間質から成る口腔粘膜モデル，血管様構造を含む口腔粘膜モデルの構築について検討を行った．

本論

1. 三次元口腔粘膜間質モデルの構築

1-1. 材料と方法

1-1-1. 細胞，培地，培養方法

細胞には，ヒト口腔粘膜線維芽細胞 human oral mucosal fibroblasts (HOMF; Cell Research Corporation, Singapore)，ヒト臍帯静脈内皮細胞 human umbilical vein endothelial cells (HUVEC; Lonza, Basel, Switzerland)を使用した. HOMF は Dulbecco 変法 Eagle 培地 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Nacalai tesque, Kyoto, Japan) に 10% 牛胎児血清 fetal bovine serum (FBS; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 100 units/mL ペニシリン, 100 μg/mL ストレプトマイシン, 0.25 μg/mL アムホテリシン B を添加した培養液にて培養した. HUVEC は内皮細胞増殖培地 MV 2 キット endothelial cell growth medium MV 2 kit BulletKit™ 培地（EGM-2MV; Lonza）にて培養した. これらの細胞は 5% CO_2 気相下にて 37 ℃で培養し，細胞継代には, 0.02 % ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)を含む 0.05% trypsin を用いた.

1-1-2. LbL 細胞コート法を用いた HOMF への FN, G コーティング

Nishiguchi らにより報告された [8] 遠心-交互積層（layer-by-layer; LbL）細胞コート法を用いて HOMF に ECM 成分をコートした. すなわち, PBS に 0.04 mg/mL で溶解した fibronectin（FN; Sigma-Aldrich, MO, USA）または gelatin (G; Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)溶液を, HOMF 2×10^7 個に対し 1 mL 加え懸濁した. 室温で 1 分間インキュベートした後, FN または G 溶液の倍量の PBS を加え, 800 *g*・2300 rpm で 1 分間遠心し，細胞表面に吸着しなかった FN または G を含む上清を除去した. この行程を 9 回（FN 5 回, G 4 回）くり返すことで,

単一 HOMF 細胞表面に FN と G から成るナノ薄膜を形成させた．この FN-G 薄膜を確認するため，LbL 細胞コートに用いる FN 溶液・G 溶液のうち，使用溶液量の 20 %を Rhodamine で蛍光標識した FN（Rh-FN）溶液（Denver, CO, USA, Cat. FNR01）と fluorescein isothiocyanate で蛍光標識した G（FITC-G）溶液を用いて，LbL 細胞コートを HOMF に行い共焦点レーザー走査型顕微鏡 FLUOVIEW FV10i（Olympus, Tokyo, Japan）にて観察した．

1-1-3. LbL 細胞コート法を用いた口腔粘膜間質モデルの構築

前述（1-1-2）の方法で FN, G のコーティングを行った HOMF 1×10^6 個/300 μL を 0.2 mg/mL FN 溶液で前処理したカルチャーインサート（0.33cm^2）内に播種した．カルチャーインサートはポリエステルメンブレンが 0.4 μm pore のものを使用した（Corning, NY, USA, Cat. No. 3470）．10% FBS 含有 DMEM 培地 1 mL をカルチャーインサート外に加え 1 時間静置後，さらに培地 1 mL を加え 5% CO_2 気相下にて 37 ℃で培養した．1 日後，HOMF から成る積層体（口腔粘膜間質モデル）がカルチャーインサートメンブレン上に構築された（図 1a）．

また，LbL 細胞コートを行った HOMF 1×10^6 個と LbL 細胞コートを行っていない HUVEC を各条件の細胞数（$0.5, 1, 2\times10^5$ 個）で混合した細胞懸濁液を，FN 溶液で前処理したカルチャーインサート内に播種し同様に培養することで，HOMF と HUVEC から成る積層体（血管様構造を含む口腔粘膜間質モデル）がカルチャーインサートメンブレン上に構築された（図 1b）．

1-1-4. 口腔粘膜間質モデルの観察

口腔粘膜間質モデルは，培養 1 日後に 10%中性緩衝ホルマリン溶液（Wako Pure Chemical Industries）にて組織固定後パラフィン包埋を行い 4 μm の厚みで切片

を作製し hematoxylin-eosin (HE) 染色を行った．血管様構造を含む口腔粘膜間質モデルは，培養 1, 3, 5 日後に 4%パラホルムアルデヒド溶液(Wako Pure Chemical Industries）で固定した．後述（2-1-3, 3-1-5）の方法で, HUVEC のカルチャーインサート内組織における蛍光免疫細胞染色とパラフィン包埋後の薄切切片における免疫組織化学染色を行った．すなわち, 1 次抗体として抗 CD31 マウスモノクローナル抗体（DAKO, Glostrup, Denmark, Cat. M0823）, 2 次抗体として蛍光免疫細胞染色には Alexa Fluor® 546 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, Cat. A11003）を，免疫組織化学染色には EnVision System-HRP ラベル化ポリマー抗マウス IgG 抗体（DAKO）を用いた．蛍光免疫細胞染色を行った組織の観察は共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて，染色切片の観察は光学顕微鏡 EVOS® FL Auto Cell Imaging System（Life Technologies）を用いて行った．

1-1-5. LbL 細胞コートの有無による構築三次元組織の比較

三次元組織構築における LbL 細胞コート法の細胞間接着に対する効果を検証するために, LbL 細胞コートを行った HOMF を用いて構築した三次元組織（LbL(+)）と LbL 細胞コートを行っていない HOMF を用いて構築した組織（LbL(-)）の厚みと空隙率を測定し比較した．組織の厚みは, HE 染色を行った異なる 4 組織切片画像・各 5 点を計測した．さらに, Image J 1.45I software (National Institutes of Health, USA）を用いて異なる 4 組織切片画像の撮影画像をコンピュータ上で解析し，組織の空隙率（%）を測定した．空隙率（%）は，以下の数式で算定した．

P（%）=I/T×100（P：組織空隙率(%), T：組織全体の領域（pixel）, I：ImageJ software で測定した細胞間隙（pixel））

また，血管様構造を含む口腔粘膜間質モデルについても，LbL 細胞コートの有無による血管網構造形成の差を比較した．すなわち，後述（2-1-3）の方法で構築組織を抗 CD31 抗体にて蛍光免疫細胞染色し，各サンプルの異なる 7 点を共焦点レーザー走査型顕微鏡にて撮影した画像における血管様構造の占有率（%）を ImageJ software にて算出することで定量的に比較した．

1-1-6. 有意差検定

実験結果は平均値±標準偏差で表し，2 群間の比較は Welch's *t*-test を，多重比較には Tukey Kramer's test を用いた．

1-2. 結果

1-2-1. LbL 細胞コート法による HOMF への FN, G コーティングの確認

蛍光標識した FN と G を用いて LbL 細胞コートを HOMF に行い，共焦点レーザー走査型顕微鏡にて観察した．その結果，各単一 HOMF 表面に，赤色に観察される Rh-FN と緑色に観察される FITC-G でコーティングされていることが確認でき，両者の画像を重ね合わせると HOMF 表面が黄色のリング状に観察され，FN と G の共局在が確認された（図 2a）．

1-2-2. 口腔粘膜間質モデルの組織像観察および LbL 細胞コート法の影響

LbL 細胞コートを行った HOMF 1×10^6 個をカルチャーインサートメンブレン上に播種後，構築組織を観察した．その結果，50 μm 程度の厚みを有する HOMF の積層体の構築が可能であった．また，LbL 細胞コート法の三次元組織構築における影響について，培養 1 日後の LbL(+)と LbL(-)で組織構造を比較した結果，HE 組織染色画像において，LbL(+)は LbL（-）よりも細胞間空隙が少なく，細胞

が凝集した細胞密度の高い三次元組織を形成していることが観察できた（図 2b）. LbL 細胞コートによる細胞間接着の影響を評価する指標として，構築組織の厚み（μm）と空隙率（%）を測定した. LbL(+)の厚みの平均が 46.2 μm に対し LbL(-)は 113.1 μm であった（図 2c）. また, LbL(+)の空隙率の平均が 21.7%に対し LbL(-)は 48.1%であった（図 2d）. 厚み・空隙率ともに LbL(+)は LbL(-)に対し有意に低値を示した.

1-2-3. 血管様構造を含む口腔粘膜間質モデルの観察および LbL 細胞コート法の影響

LbL 細胞コートを行った HOMF 1×10^6 個と HUVEC を各条件の細胞数（0.5, 1, 2×10^5 個）で混合播種し，培養 1, 3, 5 日後の構築組織の構造を観察・評価した.

カルチャーインサート内に構築された組織における HUVEC の膜内在性糖タンパク質を抗 CD31 抗体で蛍光免疫細胞染色し，共焦点レーザー走査型顕微鏡にて観察したところ，培養 1 日後では組織中に均一に散在していた HUVEC が経時的に毛細血管様の網状構造を構築していくことが確認できた. また, ImageJ software にて算出した組織中の網状構造が占める割合は，混合する HUVEC 細胞数に比例して増加した（図 3a, c）.

さらに, Z 軸方向に焦点面をずらしながら撮影した画像を再構成した Z-stack 画像を X-Z または Y-Z 面から観察したところ，三次元的な血管様構造が構築され, その断面は管腔状を呈していた(図 3a, b). 組織切片における免疫組織化学染色においても，三次元組織中に HUVEC が管腔構造を構築していることが観察された（図 4）.

血管様構造の構築における LbL 細胞コート法の影響について, LbL(+)と LbL(-)の抗 CD31 抗体を用いた蛍光免疫細胞染色画像で比較した(図 5a). ImageJ

software にて算出した各 HUVEC 混合条件における組織中の網状構造が占める割合は，いずれにおいても LbL(+)は LbL(-)よりも有意に高値を示した（図 5b）．

1-3. 考察

三次元組織構築技術は，単に細胞を積層し立体的な構造物を構築するというだけではなく，本来の細胞形態や機能がその性質通りに，または三次元組織の使用目的によってはその機能をさらに増強させる要素を有していなければならないと考える．スフェロイド培養法[5]や細胞シート法[22]，多層構造の足場の使用[23]，3D プリント技術[24]など様々な三次元組織構築技術がこれまでに報告されているが，煩雑な操作・脆弱な組織・組織内への足場の残存といった欠点が存在する．これらの欠点を補い，三次元的な細胞積層体を容易に構築することが可能な LbL 細胞コート法を用いて，口腔粘膜由来線維芽細胞（HOMF）から成る三次元組織の構築が可能か検証した．

HOMF に LbL 細胞コートを行うことで，従来の他細胞種を用いた報告と同様に密に積層した組織を構築でき，これが HUVEC の血管様構造の形成促進に関与すると考えられる．他の線維芽細胞と HUVEC から血管様構造を構築した報告では，LbL 細胞コート法を用いることで vascular endothelial growth factor（VEGF）の産生が有意に増加することが明らかとなっている[25]．細胞への FN と G のコーティングは，単に細胞間接着を高めるだけでは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推測され，HOMF においても LbL 細胞コート法を用いることで同様の効果があったと示唆される．

2. 口腔癌浸潤モデルの構築

2-1. 材料と方法

2-1-1. 細胞，培地，培養方法

ヒト舌扁平上皮癌細胞株である SAS 細胞（The Japanese Collection of Research Bioresources, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan ）[26]および HSC-3 細胞（Riken BioResource Center, Cell Engineering Division, Ibaraki, Japan）[27]に，緑色蛍光タンパク質（Green Fluorescent Protein; GFP）遺伝子を導入した SAS-GFP 細胞と HSC3-GFP 細胞を使用した．SAS-GFP 細胞は GFP 遺伝子導入にレンチウイルス発現ベクター（pLenti6 / V5 ベクター）を用いて当研究科生化学教室にて確立・分与された [28]．HSC3-GFP 細胞は pZGreen1-N1 ベクター（Clontech, CA, USA）を用いて当研究科口腔外科第二教室岩井聡一博士，岸本聡子博士により樹立された [15]．SAS-GFP 細胞と HSC3-GFP 細胞は，DMEM に 10 % FBS, 100 units/mL ペニシリン, 100 μg/mL ストレプトマイシン, 0.25 μg/mL アムホテリシン B を添加した培養液にて，5 % CO_2 気相下・37 ℃で培養した．細胞継代・回収には 0.02 % EDTA を含む 0.25 % trypsin を用いた．また，SAS-GFP 細胞と HSC3-GFP 細胞を播種する三次元組織には，HOMF, HUVEC，ヒト新生児から採取された正常ヒト皮膚線維芽細胞 normal human dermal fibroblasts (NHDF; Lonza）を用いた．HOMF と HUVEC は前述（1-1-1）の方法で，NHDF は HOMF と同様の方法で培養を行った．

2-1-2. 口腔癌浸潤モデルの構築

SAS-GFP 細胞および HSC3-GFP 細胞を播種する三次元組織として，前述（1-1-3）の方法で構築した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および皮膚真皮モデルを用いた．血管様構造を含む口腔粘膜間質モデル構築に

用いたHUVECの播種数は0.5×10^5個とした．また，皮膚真皮モデルはLbL細胞コートを行った NHDF 1×10^6個を用いて他の三次元組織と同様の方法で構築した．各三次元組織の培養開始3日後に，SAS-GFP細胞またはHSC3-GFP細胞1×10^4個を三次元組織上に播種し5日間培養した．培養期間中，カルチャーインサート外の培地交換は毎日実施した（図6）．

2-1-3. 蛍光免疫細胞染色

構築組織を4%パラホルムアルデヒド溶液で固定後，0.2% Triton X-100を加え15分間処理した．1% BSA溶液にて60分間ブロッキング後，組織中のHUVECの染色のため，1次抗体として1%BSA溶液で1/50に希釈した抗CD31抗体を添加し室温で60分間静置後，PBSにて組織を洗浄した．2次抗体として1%BSA溶液で1/200に希釈したAlexa Fluor® 546標識ヤギ抗マウスIgG抗体を添加し，室温で60分間静置後，PBS洗浄を行った．4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride（DAPI, Thermo Fisher Scientific, Cat. D21490）を10 mg/mLに調整したDAPI-PBS溶液を1%BSA溶液で1/1000に希釈したものを添加し，室温で10分間静置後，PBS洗浄を行った．

2-1-4. 口腔癌浸潤挙動の観察

構築した口腔癌浸潤モデルについて，SAS-GFP細胞またはHSC3-GFP細胞を播種して1，3，5日後の組織において，前述（2-1-3）の方法で蛍光免疫細胞染色を実施後，共焦点レーザー走査型顕微鏡にて観察した．

2-1-5. 口腔癌浸潤モデルにおけるMMP-2, MMP-9産生量の測定

各口腔癌浸潤モデルにおける培養1，3，5日後において，培地交換前にカルチ

ャーインサート中の培養上清を回収した．比較として，癌細胞を播種せず同様に培養した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，皮膚真皮モデルおよび SAS-GFP 細胞または HSC3-GFP 細胞 1×10^4 個のみをカルチャーインサート内に播種し培養した二次元癌細胞培養，HUVEC 0.5×10^5 個のみをカルチャーインサート内に播種し培養した二次元HUVEC培養の上清も同様に回収した．Enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）法のサンドイッチ法を用いて，回収した培養上清における MMP-2（Proteintech, IL, USA）および MMP-9（Thermo Fisher Scientific, CA, USA）産生量をキット添付のマニュアルに沿って測定した．

2-1-6. 有意差検定

実験結果は平均値±標準偏差で表し，Tukey Kramer's test を用いて多重比較を行った．

2-2. 結果

2-2-1. 口腔癌浸潤モデルの経時的な観察

共焦点レーザー走査型顕微鏡にて，各三次元組織に SAS-GFP 細胞（図 7a）または HSC3-GFP 細胞（図 7b）を播種し構築した口腔癌浸潤モデルを経時的に観察した．口腔癌細胞を浸潤させる三次元間質組織または真皮組織は，核を DAPI にて，HUVEC を抗 CD31 抗体で染色することで，三次元組織中に増殖・浸潤している GFP を含む口腔癌細胞の挙動の観察・評価が可能になった．口腔癌細胞は，構築した三次元組織中で経時的に増殖し，カルチャーインサート下底方向に浸潤していく過程が観察された．また，口腔癌細胞の浸潤過程で三次元組織全体の厚みは変化を認めず，線維芽細胞や血管内皮細胞に及ぼす影響は特に観察されなか

った.

2-2-2. 口腔癌浸潤モデルにおけるコラゲナーゼ産生

口腔癌細胞を播種し 5 日後の培養上清を回収し，口腔癌浸潤モデルにおける MMP-2, MMP-9 産生量を測定した. SAS-GFP 細胞, HSC3-GFP 細胞の二次元単層培養時における MMP 産生量と比較したところ，三次元組織中に癌細胞を播種した口腔癌浸潤モデルはいずれもその値が有意に増加した（図 8 黒線）. 口腔癌細胞を播種していない，線維芽細胞や血管内皮細胞から構成される三次元組織のみでも, MMP-2 産生は認められたが，口腔癌細胞を播種することで口腔癌浸潤モデルにおける MMP 産生量は上昇した（図 8 青線）. また，従来の癌浸潤モデルで用いてきた三次元真皮組織と，本研究で構築した三次元間質組織を用いた口腔癌浸潤モデルでは，間質組織を用いたモデルの方が MMP 産生量の有意な増加を示した（図 8 赤線）. 三次元間質組織中の血管様構造の有無における，癌浸潤モデルの MMP 産生量の差は認められなかった.

2-3. 考察

頭頸部癌のうち，その大半が口腔扁平上皮癌に分類される. 上皮組織において扁平上皮癌細胞への癌性形質転換が起こると，癌細胞は基底膜を破壊し上皮下組織(間質)へ浸潤していく [29, 30]. 周囲組織への増殖や浸潤，血管・リンパ管への浸潤による遠隔転移や所属リンパ節転移といった悪性腫瘍としての癌細胞の挙動は，単に癌細胞自身の性質のみに起因するのではなく，癌組織を構成する線維芽細胞や内皮細胞，炎症細胞，免疫担当細胞，その他 ECM 成分などが相互に作用し，癌の悪性度の高い性質の亢進に有利な微小環境を構築するというダイナミックな現象に依る影響が大きい [31-33].

口腔癌研究において，wound healing assay や transwell chamber を用いた migration assay, matrigel を伴う transwell chamber を用いた invasion assay が従来から一般的に行われてきた．しかしながら，これらの解析法は，癌細胞が培養皿上を平面的に移動したり，単にメンブレンの小孔を通過する能力を評価しているに過ぎない．直接基板上に接着した二次元培養下の細胞は，周囲の細胞または基質に保護される三次元培養下と比較し，ストレスに晒され，細胞本来の機能や活性を発現できないことがこれまでに報告されている [34]．そこで，生体における癌細胞の挙動や特徴を再現するために，三次元培養モデルの構築が行われるようになったが，これまでの報告ではスフェロイドや matrigel を用いた解析 [35-37]が多く，生体における癌組織環境とはかけ離れていると考えられる．

これに対して，LbL 細胞コート法を用いて構築した三次元組織を利用した癌細胞の浸潤能・遊走能の評価は，より生体に近い環境を再現していると考えられ，口腔癌をはじめとした様々な癌細胞を用いた癌浸潤モデルの検討により，その有用性が報告されている [14, 15]．しかし，これら報告されている LbL 細胞コート法を用いた癌浸潤モデルは，検討する癌細胞種に関わらず，いずれも皮膚真皮由来線維芽細胞（NHDF）から構築された三次元組織が使用されてきた．そこで，口腔癌細胞周囲環境を考慮し，口腔粘膜間質モデル（1-1-2）の癌浸潤モデルとしての応用を検討した．

本研究で構築した口腔癌浸潤モデルは，共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いた経時的な口腔癌の増殖・浸潤過程の観察が可能であった．これは従来の動物実験では観察することが出来なかった浸潤初期の癌細胞の挙動の解明につながると考えられる．本研究において，コラゲナーゼである MMP-2 と MMP-9 の産生量を測定したところ，二次元癌細胞培養と比較し，口腔癌浸潤モデルでは MMP 産生量が有意に増加した．癌環境を構成する線維芽細胞や内皮細胞，ECM 成分を有す

る三次元環境下に口腔癌細胞を置くことで，細胞間・細胞-ECM 成分間の相互作用を誘起し MMP 産生に影響したと示唆される．また，従来の NHDF から成る三次元組織を用いた口腔癌浸潤モデルと比較し，口腔粘膜由来線維芽細胞（HOMF）から成る三次元組織を用いたモデルでは MMP 産生量の有意な増加が認められた．皮膚と口腔の線維芽細胞では，細胞活性や MMP-2・MMP-9 産生量に差があることが報告されている [38]が，その差が口腔癌細胞の挙動にどのような影響を与えるかについての報告はない．三次元組織の構成細胞の違いが口腔癌の悪性度にどう変化を与えるかは今後の検討課題となるが，癌細胞の由来に合わせた三次元組織を選択する必要性が示唆された．血管様構造の有無における MMP 産生量の比較では，血管様構造の存在による MMP 産生量への影響は認められなかった．Nishiguchi らの検討した癌浸潤モデルでは，血管またはリンパ管指向性の高い癌細胞を用いることで，その性質に一致した MMP 産生・癌細胞の挙動・組織変化（血管新生）が観察できたことが報告されており [14]，本研究の結果は，用いた口腔癌細胞の血管指向性が影響している可能性が考えられる．MMP は癌の成長，変化，遊走，浸潤，アポトーシスに深く関与する [39,40]が，従来の二次元培養や動物実験では，癌浸潤過程における MMP 産生の詳細な解析は困難であった．本研究で構築した癌浸潤モデルでは，各浸潤・増殖ステージにおける癌組織からの MMP 産生の解析を行うことが可能であることが示された．

本研究で検討した三次元口腔癌浸潤モデルは，口腔扁平上皮癌細胞の遊走・浸潤能の解析法として，従来の二次元培養と比較し非常に有益なものであり，癌微小環境を構成する細胞や ECM 成分が癌の進展に深く影響するという近年の癌研究における概念に則したものであるといえる．この癌浸潤モデルを用いることで，癌浸潤過程における時期・部位特異的な癌細胞または周囲細胞の遺伝子発現・タンパク質産生を解析することが可能になる．癌微小環境を考慮した，癌の悪性度

の亢進に関わる周囲環境との相互作用メカニズムの解明や抗癌剤開発など，今後の口腔癌研究に大いに貢献すると期待される．

3. 口腔粘膜モデルの構築

3-1. 材料と方法

3-1-1. 細胞，培地，培養方法

細胞には，ヒト成人口腔歯肉から採取されたヒト口腔角化粘膜上皮細胞 human oral mucosal keratinocytes （HOMK; Cell Research Corporation），ヒト成人口腔粘膜から採取されたヒト口腔非角化粘膜上皮細胞 human oral keratinocytes (HOK; ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA)，ヒト新生児から採取された正常ヒト表皮角化細胞 normal human skin epidermal keratinocytes (NHEK; KURABO, Osaka, Japan), HOMF, HUVEC を用いた．HOMK, HOK, NHEK は, 60 μM カルシウム含有 EpiLife 培地（Life Technologies)に, HuMedia-KG 成長因子(KURABO)を添加した培養液にて培養した．HOMF と HUVEC は前述(1-1-1)の方法で培養した．

3-1-2. 口腔粘膜モデルの構築

前述（1-1-3）の方法で構築した口腔粘膜間質モデル上に上皮層を構築した．上皮層と間質の接着を高めるため，口腔粘膜間質モデル上にヒト胎盤から精製された Collagen IV（Sigma-Aldrich）を PBS で 0.2 mg/mL に調整した溶液 100 μL を加え 30 分間静置した．1, 3, 6×10^5 個/300 μL で懸濁した HOMK または HOK を口腔粘膜間質モデル上に播種し, DMEM と Epilife を 1:1 で混合した培地 2 mL をカルチャーインサートプレート内に加え，5% CO_2 気相下にて 37 ℃で培養した．1 日後, HOMF と HOMK，または HOMF と HOK から構築された組織を気相-液相界面（air-lift）培養方法を用いて 7 日間培養した．すなわち，カルチャーインサートプレート中の培地を全て除去し，分化専用培（DMEM と Epilife を 1:1 で混合した培地にアスコルビン酸を 25 μg/mL の濃度になるよう加え調整したもの）

をカルチャーインサートカップ外に 500 μL 加え, 5% CO_2 気相下にて 37 ℃で培養した. 7 日間の培養中, 毎日培地交換を実施した. 上皮の角化を伴う口腔粘膜モデル(keratinized oral mucosa equivalents; K-OMEs)と角化を伴わない口腔粘膜モデル(non-keratinized oral mucosa equivalents; N-OMEs)を 10%中性緩衝ホルマリン溶液にて組織固定後, パラフィン包埋を行い, 4 μm の厚みで切片を作製し HE 染色または後述（3-1-5）の方法で免疫組織化学染色を行った（図 9-a）. 作製した染色切片を光学顕微鏡で観察し, K-OMEs の角化層・角化層を除く上皮層・間質部, N-OMEs の上皮層・間質部の厚みについて, 異なる 4 組織切片画像・各 5 点を計測した.

3-1-3. 血管様構造を含む口腔粘膜モデルの構築

前述（1-1-3）の方法で構築した血管様構造を含む口腔粘膜間質モデル上に, 前述（3-1-2）の口腔粘膜モデル構築と同様の方法で HOMK または HOK 6×10^5 個を播種し air-lift 培養を行った. 7 日間培養後, 構築された血管様構造を伴う口腔粘膜モデルを 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した. 前述（2-1-3）の方法で, HUVEC を抗 CD31 抗体にて蛍光免疫細胞染色し共焦点レーザー走査型顕微鏡にて観察した. 口腔粘膜モデル内に構築された血管様構造を定量的に解析するため, 間質組織中の血管様構造の占有率(%)を ImageJ software にて算出した. さらに, パラフィン包埋を行い, 4 μm の厚みで切片を作製し HE 染色または後述(3-1-5)の方法で免疫組織化学染色を行った(図 9-b). 作製した染色切片を光学顕微鏡で観察し, K-OMEs の角化層・角化層を除く上皮層・間質部, N-OMEs の上皮層・間質部の厚みについて, 異なる 4 組織切片画像・各 5 点を計測した.

3-1-4. 皮膚モデルの構築

構築した口腔粘膜モデルを組織学的に評価するにあたり，上皮と間質から構成される口腔粘膜モデル（OMEs）に対し，上皮と真皮から構成される皮膚モデル(dermis-epithelium skin equivalents; DESEs)を，LbL 細胞コート法を用いて構築した[41,42]．すなわち，LbL 細胞コートを行った NHDF 1×10^6 個を用いて構築した皮膚真皮モデル上に NHEK 6×10^5 個を播種し air-lift 培養を行った．7 日間培養後，10%中性緩衝ホルマリン溶液にて組織固定し，パラフィン包埋を行い 4 μm の厚みで切片を作製した．HE 染色または後述（3-1-5）の方法で免疫組織化学染色を行った．

3-1-5. 組織学・免疫組織化学染色

構築した OMEs と DESEs の免疫組織化学染色を行うにあたり，1 次抗体として抗ヒト cytokeratin（CK）(AE1/AE3) マウスモノクローナル抗体（DAKO, Cat. N1590），抗ヒト cytokeratin 10（CK10）マウスモノクローナル抗体（Thermo Fisher Scientific, Cat. MS-611-P0），抗ヒト cytokeratin 13（CK13）マウスモノクローナル抗体（Abcam, Cambridge, UK, Cat. ab16112），抗ヒト cytokeratin 14（CK14）マウスモノクローナル抗体（Thermo Fisher Scientific, Cat. MS-115-P0），抗ヒト E-cadherin マウスモノクローナル抗体（DAKO, Cat. M3612），抗ヒト Ki67 マウスモノクローナル抗体（Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, Cat. 9449），抗ヒト collagen IV マウスモノクローナル抗体(DAKO, Cat. M0785)，抗ヒト laminin マウスモノクローナル抗体（Leica Biosystems Newcastle Ltd., Newcastke, Tyne, UK, Cat. NCL-LAMININ），抗ヒト CD31 マウスモノクローナル抗体を用いた．ホルマリン固定後の三次元組織をメンブレンごとカルチャーインサートカップより外し，パラフィン包埋後，4μm の厚みで薄切切片を作製し

た. 切片を脱パラフィン化し，クエン酸緩衝液（pH6），トリス塩酸緩衝液（pH9）またはProteinaseK（DAKO）を用いて抗原賦活化処理を行った. 切片を3%過酸化水素溶液に室温10分間浸漬し，5% bovine serum albumin（BSA；Sigma-Aldrich）で室温 1 時間ブロッキングを行った. 5% BSA で 1/500 に希釈した抗 CK（AE1/AE3）抗体, 1/200 に希釈した抗 CK10 抗体, 1/100 に希釈した抗 CK13 抗体, 1/1000 に希釈した抗 CK14 抗体, 1/100 に希釈した抗 E-cadherin 抗体, 1/400 に希釈した抗 Ki67 抗体, 1/2000 に希釈した抗 collagen IV 抗体, 1/100 に希釈した抗 laminin 抗体, 1/200 に希釈した抗 CD31 抗体を添加し，4℃で一晩静置した. PBS にて切片を洗浄後，2 次抗体として EnVision System-HRP ラベル化ポリマー抗マウス IgG 抗体（DAKO）を滴下し室温で 30 分間静置した. 洗浄後，diaminobenzidine（DAB; DAKO）を滴下し発色させ，Mayer's Hematoxylin に浸漬し核染色後，スライドガラスで封入した.

3-1-6. 口腔粘膜モデルならびに血管様構造を含む口腔粘膜モデルの経皮的電気抵抗値測定

Air-lift 培養 7 日後の OMEs 及び血管様構造を含む OMEs の経皮的電気抵抗 transepithelial electrical resistance（TEER）値（$\Omega \times cm^2$）を Millicell ERS-2（Millipore Co. Ltd., Darmstadt, Germany）を用いて測定した. 測定時，組織を PBS にて洗浄後，カルチャーインサート内に 300 μL，カルチャーインサート外に 1mL の PBS を加えた. TEER 値は各サンプルにつき 3 回測定し平均値を算出した.

3-1-7. 有意差検定

実験結果は平均値±標準偏差で表し，Welch's *t*-test を用いて 2 群間の比較を行った.

3-2. 結果

3-2-1. 角化口腔粘膜モデル（K-OMEs）の構築

LbL 細胞コートを行った HOMF 1×10^6 個から構築された口腔粘膜間質モデル上に HOMK を各条件（1, 3, 6×10^5 個）で播種し, air-lift 培養 1, 3, 7 日後の組織についてその構造を観察・評価した（図 10a-f）. HOMK 3×10^5, 6×10^5 個播種した組織では，角化層において核が消失した正角化が認められた（図 10b, c）. 7 日後の各 HOMK 播種条件における構築組織の厚みを測定したところ，上皮層の厚みは HOMK 播種細胞数に比例していた（図 10g）. また，上皮層は経時的に厚みを増し，正角化を伴う角化層も厚くなっていた（図 10h）.

3-2-2. 非角化口腔粘膜モデル（N-OMEs）の構築

LbL 細胞コートを行った HOMF 1×10^6 個から構築された口腔粘膜間質モデル上に HOK を各条件（1, 3, 6×10^5 個）で播種し, air-lift 培養 1, 3, 7 日後の組織について，その構造を観察・評価した（図 11a-f）. いずれの組織においても上皮層表層は核が残存した非角化を呈していた（図 11a-c）. 7 日後の各 HOK 播種条件における構築組織の厚みを測定したところ，上皮層の厚みは HOK 播種細胞数に比例していた（図 11g）. また，上皮層の厚みは経時的に増加する傾向が示された（図 11h）.

3-2-3. 口腔粘膜モデルの免疫組織化学染色

構築した K-OMEs と N-OMEs, 比較参考として構築した DESESs の組織切片を用いて, CK（AE1/AE3）, CK10, CK13, CK14, E-cadherin, Ki67, collagen IV, laminin について免疫組織化学染色を行った（図 12）. 比較する OMEs と DESEs は，いずれも上皮細胞 6×10^5 個と線維芽細胞 1×10^6 個で構築したモデルを用い

た.

CK (AE1/AE3) は全モデルの上皮層で強く染色された. 角化上皮に特異的に発現する CK10 は K-OMEs・DESEs の基底層を除く上皮層で強く発現し, N-OMEs では発現が認められなかった. 上皮基底層のマーカーである CK14 は全モデルで基底層を含めた上皮層で発現が認められた. 細胞間接着に関する E-cadherin は全モデルの上皮細胞間に特異的に発現した. 増殖活性に関するマーカーである Ki67 は K-OMEs・N-OMEs ともに発現が認められず, DESEs では上皮基底細胞に限局して発現していた. 口腔粘膜や皮膚の基底膜を構成する collagen IV と laminin は, OMEs・DESEs において, 間質または真皮層で一様に発現され, 加えて laminin は上皮基底層にも発現していた. 口腔粘膜をはじめとした非角化上皮に特異的に発現するマーカーである CK13 は K-OMEs・N-OMEs の上皮層において強く発現していたが, DESEs では発現が弱かった.

3-2-4. 口腔粘膜モデルのバリア機能

K-OMEs, N-OMEs, DESEs の上皮層におけるバリア機能を比較するため, 分化誘導を行った 7 日間中の各モデルの TEER 値を測定した. これらのモデルの TEER 値は上皮分化に伴い経時的に増加した（図 13）. 分化誘導 7 日後の TEER 値では DESEs が最も高値を示し, 次いで K-OMES, N-OMEs となった（DESEs ＞K-OMEs＞N-OMEs）. OMEs では, 測定した分化誘導 1, 3, 5, 7 日後のいずれにおいても, K-OMEs は N-OMEs よりも有意に高値を示した（図 13a）.

3-2-5. 血管様構造を含む口腔粘膜モデルの組織学的・機能的評価

LbL 細胞コートを行った HOMF 1×10^6 個と HUVEC 0.5×10^5, 1×10^5, 2×10^6 個から構成される血管様構造を含む間質組織上に HOMK または HOK を 6×10^5

個播種し, air-lift 培養 7 日後の組織についてその構造を観察・評価した.

Air-lift 培養 7 日後の組織の HE 染色および抗 CK13 抗体・抗 CD31 抗体による免疫組織化学染色を行った組織切片を観察したところ, 上皮層は HUVEC を間質部に含まない K-OMEs, N-OMEs と同一の分化・階層構造の特徴をもつ組織像が得られた（図 14a-c, 15a-c）. 上皮層は CK13 の発現を認め（図 14d-f, 15d-f）, 間質部は円状に細胞が存在しない箇所が観察され, HUVEC 播種数に比例してその数は増加傾向を示した. 抗 CD31 抗体を用いた免疫組織化学染色にて, その箇所を裏打ちするように CD31 陽性細胞が存在していた（図 14g-i, 15g-i）. 上皮層の分化・階層構造は血管様構造を含まない OMEs と同様の特徴が観察され, HUVEC の播種数により上皮構造が変化することはなかった（図 14m, 15m）.

抗 CD31 抗体を用いて蛍光免疫細胞染色を行い共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察したところ, 間質部において CD31 陽性の管腔構造が三次元的に構築されており, HUVEC 播種細胞数に比例して網状構造の組織中に占める割合は, K-OMEs, N-OMEs ともに増加した（図 14j-l, 15j-l）.

血管様構造を含む OMEs におけるバリア機能を評価するために TEER 値を測定した. 血管様構造を含まない OMEs と比較すると, 血管様構造を含む OMEs は低値であったが, K-OMEs は N-OMEs よりも TEER 値は有意に高値を示し, バリア機能の差は維持されていることが確認された（図 16）.

3-3. 考察

生体の口腔粘膜や皮膚組織に近似した組織を *in vitro* で再現するために, これまでに様々な培養方法が考案され多くの三次元組織モデルが報告されてきた. LbL 細胞コート法を用いた三次元組織モデルとして, 皮膚モデルが既に確立されている [41, 42]. 口腔粘膜上皮は皮膚と同様に重層扁平上皮構造を有するが, 部位に

より角化・分化程度に差が認められるのが皮膚と異なる大きな特徴の一つである[43, 44].

今回，採取部位の異なる 2 種類の口腔粘膜上皮細胞（角化粘膜由来; HOMK，非角化粘膜由来; HOK）と口腔粘膜線維芽細胞（HOMF）を用いて，三次元組織モデルの構築を検討した．構築したモデルの組織構造を観察したところ，HOMK を使用したモデル（K-OMEs）では角化口腔粘膜上皮，HOK を使用したモデル（N-OMEs）では非角化口腔粘膜上皮に特有の分化・組織構造が観察された．本研究において，口腔粘膜に特有の角化程度が異なる 2 種類の口腔粘膜モデル（角化/非角化）を構築することが可能であった．

構築した K-OMEs と N-OMEs について組織構造を観察・評価した．OMEs と DESEs で上皮層および間質/真皮層の厚さに差が生じたのは，口腔粘膜と皮膚の上皮細胞と線維芽細胞では増殖活性やターンオーバーに違いがあるためと推測される[45, 46]．顆粒層～有棘層において特異的に発現する CK10 は，角化傾向が強い口蓋粘膜や皮膚ではその発現が認められるのに対し，非角化上皮を有する口底部や頬粘膜では発現しないことが一般的に知られている．本研究で構築したモデルはその角化傾向と CK10 の発現が一致し，各モデルにおける分化傾向の特徴を裏付ける結果となった．CK14 は上皮基底層に発現することが一般的に知られているが，本研究の構築モデルでは CK14 は上皮層全層で発現していた．しかし，有棘層より上方の上皮層に特異的に発現した CK10 の染色結果と比較すると，上皮最下層の細胞は CK14(+)，CK10(-)であり，基底層の形成が示唆された．E-cadherin は全てのモデルの上皮細胞間で特異的に発現が認められ，正常上皮として上皮細胞間接着分子が産生されていることが証明された．増殖活性を有する細胞に特異的に発現する Ki67 は， OMEs ではその発現が認められず，DESEs では基底層細胞に発現を認めた．他の報告されている口腔粘膜モデルにおいても Ki67

の発現が弱い/認められないものは多く，その理由として，口腔粘膜は皮膚よりも上皮増殖活性が高くターンオーバーのサイクルが早いため，*in vitro* で三次元構築した口腔粘膜モデルでは培養期間中の早期で活性が減少していくのではないかと推測される[47]．本研究で構築した OMEs は，培養日数と共に上皮層の厚みは増加傾向にあるため，上皮分化と共に細胞増殖（ターンオーバー）は伴っていると示唆される．基底膜を構成する collagen IV と laminin は，本研究においては間質/真皮も一様に発現が認められた．線維芽細胞と上皮細胞を共培養した場合に，collagen IV は線維芽細胞から優先的に産生されることが報告されており，今回構築したモデルでは主に間質/真皮の線維芽細胞から産生されたと推測された．Laminin は複数のアイソタイプが存在し，上皮基底細胞と線維芽細胞から様々な種類の laminin が産生されることが知られており[48-51]，それらの報告と一致する染色結果を得た．基底膜形成に必要な成分の産生を確認できたことから，今後，分化をさらに促進させる培養条件の検討によって，より明瞭な基底膜構造の構築が可能になると考えられる．非角化上皮のマーカーである CK13 は，OMEs では強く発現し，DESEs ではその発現が弱かった．N-OMEs の CK10 の染色結果も併せて考察すると，非角化上皮という組織構造を裏付ける結果となった．しかし，K-OMEs は DESEs と同様に，角化層の正角化と CK10 の発現が認められたにもかかわらず，CK13 の発現について両モデルで差が認められた．これは，K-OMEs で使用した HOMK が歯肉由来細胞であり角化/非角化の中間的特徴も有しているためと推測される．実生体口腔粘膜における CK 発現についての報告によると，非角化粘膜に近接した角化歯肉粘膜や錯角化上皮では CK10・CK13 の発現は明確に区別できない場合がある[43, 44]．組織切片染色結果から，本研究では角化程度が異なる 2 種類の OMEs が構築でき，DESEs も用いて組織像とタンパク質発現を比較することで，モデルの上皮分化について詳細に理解することが可能であった．

構築したモデルを今後応用していくには，実生体に近似した組織構造の再現だけでなく，その組織構造とリンクした機能を有していなければならない．構築したモデルのバリア機能を評価するために TEER 値を測定した．この値は，モデルの角化層側からメンブレン側へのイオン透過性を測定することで，組織の厚みや角化レベル，細胞間接着の程度を定量化したものである．K-OMEs は N-OMEs よりも TEER 値が有意に高く，角化の有無や細胞間接着・各上皮細胞自身の性質の差を反映していると考えられる．また，DESEs は OMEs と比較して顕著に高い TEER 値を示し，組織切片における角化・分化の明らかな差を裏付ける結果となった．構築した組織モデルの構造の差をこのように数値化できることは，今後，目的に合わせたモデル構築や最適化が可能になり，他の報告されているモデルを含め三次元組織モデルの標準化につながると考えられる．

生体口腔粘膜では，単に角化程度が異なる上皮と間質からのみ構成されるわけではなく，血管やリンパ管，免疫細胞，その他様々な付属器を有しているからこそ，多様で複雑な組織反応・現象が観察される．癌研究において癌の浸潤・転移や血管新生など，癌と血管の関連性は高い．その他，疾患モデルや感染・炎症モデルへの応用も期待される．また，再生医療分野においては，脈管系を有する三次元組織を移植材料として用いることで，生体側の血管と癒合し，栄養や酸素の供給と老廃物の代謝が行われ，移植組織の癒合不全・壊死・脱落の回避が期待できる．脈管系を有する三次元真皮組織をマウスに移植したところ，宿主側脈管と移植組織中の脈管構造が癒合することが既に報告されている [52, 53]．実臨床において，構築した口腔粘膜モデルを，手術により欠損した患者の口腔内に移植した報告はあるが，本研究で確立した血管様構造を含む口腔粘膜モデルも同様に臨床応用することが可能であると考えられる．また，間質部に血管様構造を有していても上皮構造が維持され，血管様構造の形成量・管腔サイズをコントロールできたことは，

本研究で構築したモデルを様々な用途で今後応用していく際に，目的に応じた組織設計・至適化が可能であることを示している．しかしながら，今回構築した血管様構造は，単に HUVEC が管腔構造を呈しているものであり，タイトジャンクションや周皮細胞，灌流の存在といった，生体に近似した血管を構築することは今後の大きな課題であると考える．

口腔粘膜モデルよりも先に構築技術が発展した皮膚モデルでは，薬剤反応試験・毒性試験に使われるモデルの条件が OECD ガイドラインにより標準化されているにもかかわらず，口腔粘膜モデルでは個々にその反応性を評価した報告が散見されるのみで基準となる統一された定量的指標が存在しない．口腔粘膜モデルを用いた反応性試験を評価するには，その使用した口腔粘膜モデルと実生体口腔粘膜の相違点を明確にしなければならないという課題も存在する [54]．

また，上皮層の分化は，単に上皮細胞そのものの部位特異的な遺伝子発現により特徴付けられるのではなく，上皮下に存在する線維芽細胞の存在が大いに影響することが最近の報告で明らかになっている [55] が，その詳細は未だ不明であり，そのメカニズムの解明に本モデルの応用が期待される．本研究における口腔粘膜モデル構築技術では，間質部に様々な細胞を含有することが可能であり，今回は血管様構造を含む口腔粘膜組織モデルの確立に成功した．さらに，炎症細胞や内皮細胞，幹細胞，唾液腺，骨などを伴わせることで，より複雑な生体環境を再現した口腔粘膜モデルとしての応用が期待される．

総括

1. 口腔粘膜由来線維芽細胞に LbL 細胞コートを行うことで，細胞を積層させ，口腔粘膜間質モデルを構築することが可能であった．
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．

結論

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することが可能であった．また，上皮と血管様構造を含む間質から構成される，口腔粘膜モデルを構築した．

《脚注》

大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座　口腔外科第二教室

主任：鵜澤　成一　教授

本論文の要旨の一部は，第 17 回日本再生医療学会総会（平成 30 年，横浜），第 77 回日本癌学会学術総会（平成 30 年，大阪），第 40 回日本バイオマテリアル学会大会（平成 30 年，神戸）において発表した．

《謝辞》

稿を終えるにあたり，本研究を行う機会を与えていただき，御指導と御校閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学（口腔外科第二教室）鵜澤成一教授，ならびに本研究計画と立案に際し，終始御懇篤なる御指導を賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学（口腔外科第二教室）岩井聡一博士に謹んで感謝の意を表します．また，多大なる御指導，御協力いただきました大阪大学大学院生命機能研究科明石 満特任教授，赤木隆美特任准教授，明石研究室の皆様，LION 株式会社奥田卓馬研究員に心より感謝申し上げます．また，細胞を提供していただいた当研究科口腔生化学教室波多賢二准教授に厚く御礼申し上げます．また，研究の遂行にあたり，特別のご配慮と御協力を頂戴しました本学部口腔外科第二教室の皆様に厚く御礼申し上げます．

《引用文献》

1. Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R. and Kunz-Schughart, L.A. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. Nat Protoc **4,** 309, 2009.
2. Khademhosseini, A. and Langer, R. A decade of progress in tissue engineering. Nat Protoc **10,** 1775, 2016.
3. Groeber, F., Holeiter, M., Hampel, M., Hinderer, S. and Schenke-Layland, K. Skin tissue engineering-in vivo and in vitro applications. Adv Drug Deliv Rev **63,** 352, 2011.
4. Alemany-Ribes, M. and Semino, C.E. Bioengineering 3D environments for cancer models. Adv Drug Deliv Rev **79,** 40, 2014.
5. Lin, R.Z. and Chang, H.Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. Biotechnol J **3,** 1172, 2008.
6. Duong, H.S., Le, A.D., Zhang, Q. and Messadi, D.V. A novel 3-dimensional culture system as an in vitro model for studying oral cancer cell invasion. Int. J. Exp. Pathol **86,** 365, 2005.
7. Matsusaki, M., Kadowaki, K., Nakahara, Y. and Akashi, M. Fabrication of cellular multilayers with nanometer-sized extracellular matrix films. Angew Chem Int Ed Engl **46,** 4689, 2007.
8. Nishiguchi, A., Yoshida, H., Matsusaki, M. and Akashi, M. Rapid construction of three-dimensional multilayered tissues with endothelial tube networks by the cell-accumulation technique. Adv. Mater **23,** 3506, 2011.
9. Erat, M.C., Slatter, D.A., Lowe, E.D., Millard, C.J., Farndale, R.W., Campbell, I. D. and Vakonakis, I. Identification and structural analysis of type I collagen sites in complex with fibronectin fragments. Proc Natl Acad Sci U S A **106,** 4195, 2009.

10. Nishiguchi, A., Matsusaki, M., Asano, Y., Shimoda, H. and Akashi, M. Effects of Angiogenic Factors and 3D-microenvironments on vascularization within sandwich culture. Biomaterials **35,** 4739, 2014.

11. Matsuzawa, A., Matsusaki, M. and Akashi, M. Construction of three-dimensional liver tissue models by cell accumulation technique and maintaining their metabolic functions for long-term culture without medium change. Biomed Mater Res A **103,** 1554, 2015.

12. Fukuda, Y., Akagi, T., Asaoka, T., Eguchi, H., Sasaki, K., Iwagami, Y., Yamada, D., Noda, T., Kawamoto, K., Gotoh, K., Kobayashi, S., Mori, M., Doki, Y. and Akashi, M. Layer by layer cell coating technique using extracellular matrix facilitates rapid fabrication and function of pancreatic β-cell spheroids. Biomaterials **160,** 82, 2018.

13. Amano, Y., Nishiguchi, A., Matsusaki, M., Iseoka, H., Miyagawa, S., Sawa, Y., Seo, M., Yamaguchi, T. and Akashi, M. Development of vascularized iPSC derived 3D-cardiomyocyte tissues by filtration Layer-by-Layer technique and their application for pharmaceutical assays. Acta Biomater **33,** 110, 2016.

14. Nishiguchi, A., Matsusaki, M., Kano, M.R., Nishihara, H., Okano, D., Asano, Y., Shimoda, H., Kishimoto, S., Iwai, S. and Akashi, M. In vitro 3D blood/lymph-vascularized human stromal tissues for preclinical assays of cancer metastasis. Biomaterials **179,** 144, 2018.

15. Iwai, S., Kishimoto, S., Amano, Y., Nishiguchi, A., Matsusaki, M., Takeshita, A. and Akashi, M. Three-dimensional cultured tissue constructs that mimics human living tissue organization for analysis of tumor cell invasion. J Biomed Mater Res A, doi: 10.1002/jbm.a.36319, 2018.

16. Jacobsen, J., Nielsen, E.B., Brùndum-Nielsen, K., Christensen, M.E., Olin, H-B.D., Tommerup, N. and Rassing, M.R. Filter-grown TR146 cells as an in vitro model of human buccal epithelial permeability. Eur J Oral Sci **107,** 138, 1999.

17. Moharamzadeh, K., Brook, I.M., Van Noort, R., Scutt, A.M., Smith, K.G. and Thornhill, M.H. Development, optimization and characterization of a full-thickness tissue engineered human oral mucosal model for biological assessment of dental biomaterials. J Mater Sci Mater Med **19,** 1793, 2008.

18. Izumi, K., Feinberg, S.E., Iida, A. and Yoshizawa, M. Intraoral grafting of an ex vivo produced oral mucosa equivalent: a preliminary report. Int. J. Oral Maxillofac. Surg **32,** 188, 2003.

19. Hotta, T., Yokoo, S., Terashi, H. and Komori, T. Clinical and histopathological analysis of healing process of intraoral reconstruction with ex vivo produced oral mucosa equivalent. Kobe J. Med. Sci **53,** 1, 2007.

20. Moharamzadeh, K., Franklin, K.L., Brook, I.M. and van Noort, R. Biologic assessment of antiseptic mouthwashes using a three-dimensional human oral mucosal model. J Periodontol **80,** 769, 2009.

21. Gursoy, U.K., Pöllänen, M., Könönen, E. and Uitto, V.J. Biofilm formation enhances the oxygen tolerance and invasiveness of Fusobacterium nucleatum in an oral mucosa culture model. J Periodontol **81,** 1084, 2010.

22. Matsuura, K., Utoh, R., Nagase, K., and Okano, T. Cell sheet approach for tissue engineering and regenerative medicine. J Control Release **190,** 228, 2014.

23. Stevens, M.M., and George, J.H. Exploring and engineering the cell surface interface. Science **310,** 1135, 2005.

24. Gao, G., and Cui, X. Three-dimensional bioprinting in tissue engineering and

regenerative medicine. Biotechnol Lett **38,** 203, 2016.

25. Sasaki, K., Akagi, T., Asaoka, T., Eguchi, H., Fukuda, Y., Iwagami, Y., Yamada, D., Noda, T., Wada, H., Gotoh, K., Kawamoto, K., Doki, Y., Mori, M. and Akashi, M. Construction of three-dimensional vascularized functional human liver tissue using a layer-by-layer cell coating technique. Biomaterials **133,** 263, 2017.
26. Takahashi, K., Kanazawa, H., Akiyama, Y., Tazaki, S., Takahara, M., Muto, T., Tanzawa, H. and Sato, K. Establishment and characterization of a cell line (SAS) from poorly differentiated human squamous cell carcinoma of the tongue. J. Jpn. Stomatol. Soc **38,** 20, 1989.
27. Momose, F., Hirata, S., Araida, T., Tanaka, N. and Shioda, S. Characters of three oral squamous cell carcinoma cell lines. J. Jpn. Stomatol. Soc. **35,** 485, 1986.
28. Morita, Y., Hata, K., Nakanishi, M., Nishisho, T., Yura, Y. and Yoneda, T. Cyclooxygenase-2 promotes tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. Int. J. Oncol **41,** 885, 2012.
29. Pittayapruek, P., Meephansan, J., Prapapan, O., Komine, M. and Ohtsuki, M. Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis. Int J Mol Sci **17,** 868, 2016.
30. Martín-Villar, E., Borda-d'Agua, B., Carrasco-Ramirez, P., Renart, J., Parsons, M., Quintanilla, M., and Jones, G.E. Podoplanin mediates ECM degradation by squamous carcinoma cells through control of invadopodia stability. Oncogene **34,** 4531, 2015.
31. Steeg, P.S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. Nat. Med **12,** 895, 2006.
32. Joyce, J.A. and Pollard, J.W. Microenvironmental regulation of metastasis. Nat.

Rev. Cancer **9,** 239, 2009.

33. Weis, S.M. and Cheresh, D.A. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. Nat. Med **17,** 1359, 2011.
34. Kadowaki, K., Matsusaki, M. and Akashi, M. Three-dimensional Constructs Induce High Cellular Activity: Structural Stability and the Specific Production of Proteins and Cytokines. Biochem. Biophys. Res. Commun **402,** 153, 2010.
35. Rodenhizer, D., Gaude, E., Cojocari, D., Mahadevan, R., Frezza, C., Wouters, B.G. and McGuigan, A.P. A three-dimensional engineered tumor for spatial snapshot analysis of cell metabolism and phenotype in hypoxic gradients. Nat. Mater **15,** 227, 2016.
36. Kenny, P.A., Lee, G.Y., Myers, C.A., Neve, R.M., Semeiks, J.R., Spellman, P.T., Lorenz, K., Lee, E.H., Barcellos-Hoff, M.H., Peterson, O.W. and Gray, J.W. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with these profiles of gene expression. Mol. Oncol **1,** 84, 2007.
37. Noma, K., Smalley, K.S., Lioni, M., Naomoto, Y., Tanaka, N., El-Deiry, W., King, A.J., Nakazawa, H. and Herlyn, M. The essential role of fibroblasts in esophageal squamous cell carcinoma-induced angiogenesis. Gastroenterology **134,** 1981, 2008.
38. Stephens, P., Davies, K.J., Occleston, N., Pleass, R.D., Kon, C., Daniels, J., Khaw, P.T., and Thomas, D.W. Skin and oral fibroblasts exhibit phenotypic differences in extracellular matrix reorganization and matrix metalloproteinase activity. British Journal of Dermatology **144,** 229, 2001.
39. Egeblad, M. and Werb, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat. Rev. Cancer **2,** 161, 2002.

40. Benson, J.D., Chen, Y.N., Cornel-Kennon, S.A., Dorsch, M., Kim, S., Leszczyniecka, M., Sellers, W.R. and Lengauer, C. Validating cancer drug targets. Nature **441,** 451, 2006.

41. Matsusaki, M., Fujimoto, K., Shirakata, Y., Hirakawa, S., Hashimoto, K. and Akashi, M. Development of full-thickness human skin equivalents with blood and lymph-like capillary networks by cell coating technology. J. Biomed. Mater. Res. Part A **103,** 3386, 2015.

42. Akagi, T., Nagura, M., Hiura, A., Kojima, H. and Akashi, M. Construction of three-dimensional dermo-epidermal skin equivalents using cell coating technology and their utilization as alternative skin for permeation studies and skin irritation tests. Tissue Eng Part A **23,** 481, 2017.

43. Winning, T.A. and Townsend, G.C. Oral mucosal embryology and histology. Clin Dermatol **18,** 499, 2000.

44. Squier, C.A. and Kremer, M.J. Biology of Oral Mucosa and Esophagus. J Natl Cancer Inst Monogr **29,** 7, 2001.

45. Shannon, D.B., McKeown, S.T., Lundy, F.T. and Irwin, C.R. Phenotypic differences between oral and skin fibroblasts in wound contraction and growth factor expression. Wound Rep Reg **14,** 172, 2006.

46. Schrementi, M.E., Ferreira, A.M., Zender, C. and DiPietro, L.A. Site-specific production of TGF-b in oral mucosal and cutaneous wounds. Wound Rep Reg **16,** 80, 2008.

47. Kinikoglu, B., Auxenfans, C., Pierrillas, P., Justin, V., Breton, P., Burillon, C., Hasirci, V. and Damour, O. Reconstruction of a full-thickness collagen-based human oral mucosal equivalent. Biomaterials **30,** 6418, 2009.

48. Amano, S., Ogura, Y., Akutsu, N., Matsunaga, Y., Kadoya, K., Adachi, E. and Nishiyama, T. Protective effect of matrix metalloproteinase inhibitors against epidermal basement membrane damage: skin equivalents partially mimic photoageing process. Br J Dermatol **153,** 37, 2005.

49. Kishimoto, Y., Saito, N., Kurita, K., Shimokado, K., Maruyama, N. and Ishigami, A. Ascorbic acid enhances the expression of type 1 and type 4 collagen and SVCT2 in cultured human skin fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun **430,** 579, 2013.

50. Marinkovich, M.P., Keene, D.R., Rimberg, C.S. and Burgeson, R.E. Cellular origin of the dermal-epidermal basement membrane. Dev Dyn **197,** 255, 1993.

51. Murakami, H., Okamura, K., Aoki, S., Sakagami, R. and Yamazaki, J. Association of caspase-14 and filaggrin expression with keratinization of the oral mucosa and reconstruction culture rat models. J Periodontal Res **49,** 703, 2014.

52. Asano, Y., Nishiguchi, A., Matsusaki, M., Okano, D., Saito, E., Akashi, M. and Shimoda, H. Ultrastructure of blood and lymphatic vascular networks in three-dimensional cultured tissues fabricated by extracellular matrix nanofilm-based cell accumulation technique. Microscopy **63,** 219, 2014.

53. Asano, Y., Shimoda. H., Okano, D., Matsusaki, M. and Akashi M. Transplantation of three-dimensional artificial human vascular tissues fabricated using an extracellular matrix nanofilm-based cell-accumulation technique. J Tissue Eng Regen Med **11,** 1303, 2017.

54. Kojima, H., Katoh, M., Shinoda, S., Hagiwara, S., Suzuki, T., Izumi, R., Yamaguchi, Y., Nakamura, M., Kasahawa, T., and Shibai, A. A catch-up validation study of an in vitro skin irritation test method using reconstructed human epi-dermis LabCyte EPI-MODEL24. J Appl Toxicol **34,** 766, 2014.

55. Okazaki, M., Yoshimura, K., Suzuki, Y. and Harii, K. Effects of subepithelial fibroblasts on epithelial differentiation in human skin and oral mucosa: heterotypically recombined organotypic culture model. Plast Reconstr Surg **112,** 784, 2003.

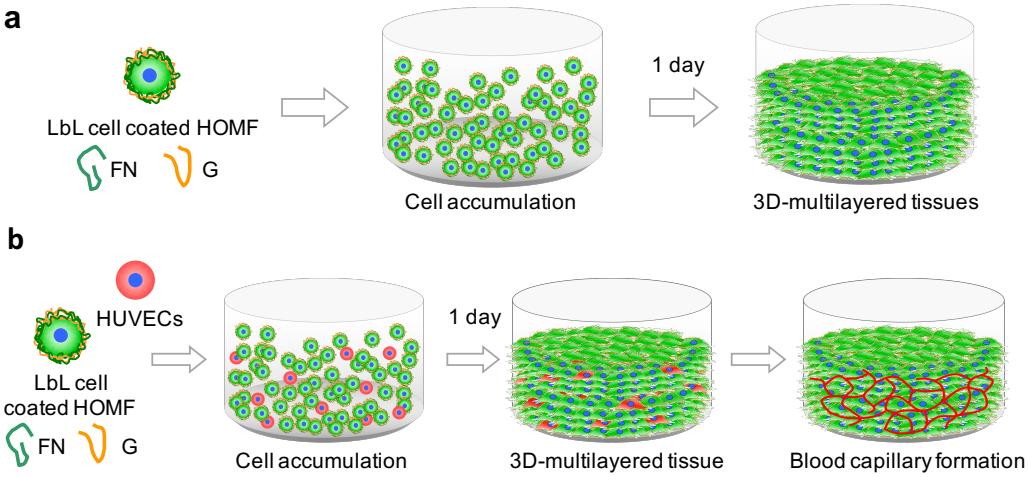

図 1

(a) LbL 細胞コート法を用いた口腔粘膜間質モデルの構築.

細胞を FN および G 溶液に交互浸漬することで，細胞表面に FN-G 薄膜が形成され，短期間で目的サイズの三次元組織体を構築することが可能である．HOMF に LbL 細胞コートを行うことによって，口腔粘膜間質モデルを構築した．

(b) LbL 細胞コート法を用いた血管様構造を含む口腔粘膜間質モデルの構築.

HUVEC を，LbL 細胞コートを行った HOMF と共培養することで，三次元的な血管様構造を有する口腔粘膜間質モデルを構築した．

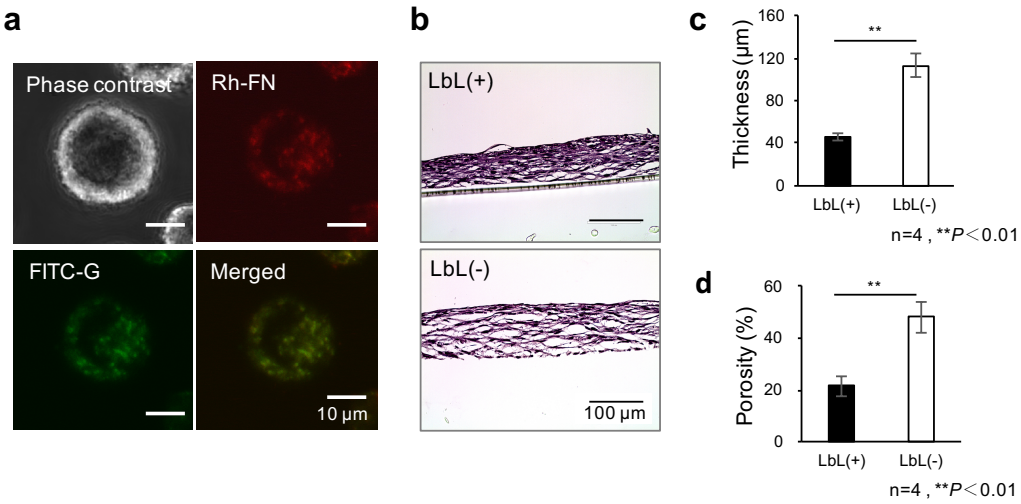

図 2

(a) LbL 細胞コートを行った HOMF の観察.

共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて，Rhodamine で蛍光標識した FN(赤)と，FITC で蛍光標識した G(緑)が HOMF 周囲にコーティングされていることが確認できた.

(b) LbL 細胞コートを用いて構築した組織(LbL(+))と，用いずに構築した組織(LbL(-))の比較.

組織培養 1 日後の LbL(+)と LbL(-)の HE 染色組織切片を用いて，構築組織を比較した. LbL(+)は LbL(-)と比較し，組織中の空隙が少なく，密に凝集していることが観察された.

(c) LbL(+)と LbL(-)の厚み(μm)の比較.

LbL(+)は LbL(-)と比較し，組織の厚みが有意に低値を示した.

(d) LbL(+)と LbL(-)の空隙率(%)の比較.

LbL(+)は LbL(-)と比較し，組織空隙率が有意に低値を示した.

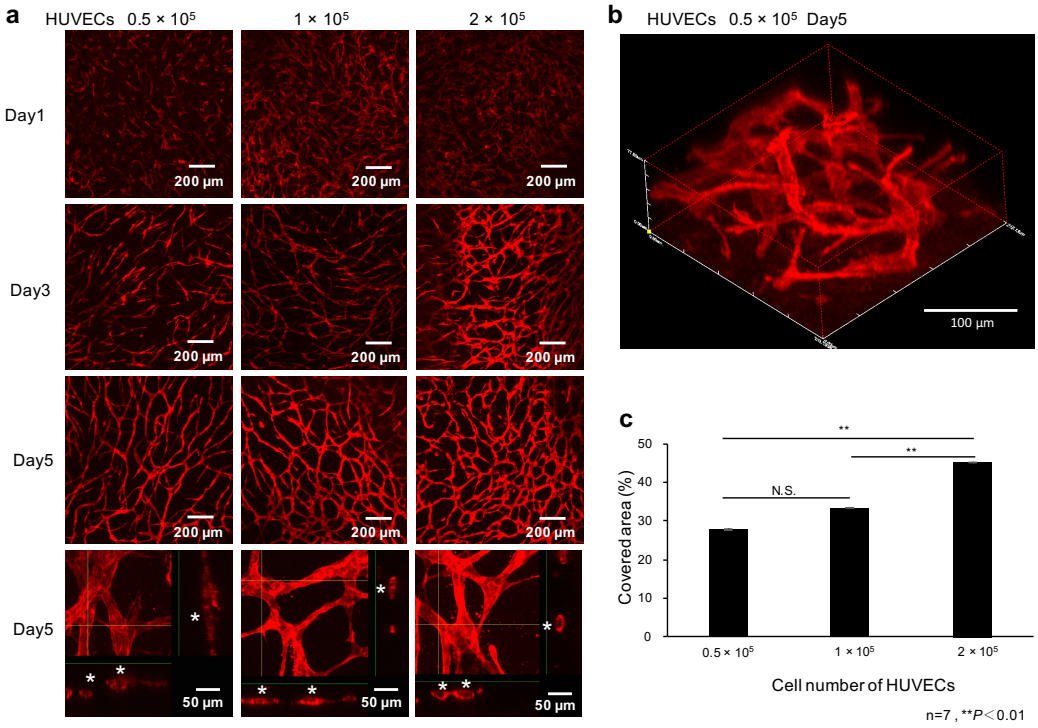

図 3

(a) 血管様構造を含む口腔粘膜間質モデルの観察

HUVEC 各播種数における構築組織を，抗 CD31 抗体を用いて蛍光細胞免疫染色を行い共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察した．HUVEC 播種数，培養日数に比例して，管腔形態(*)を伴う血管様網状構造が構築されていることが観察できた．

(b) 血管様構造を含む口腔粘膜間質モデルの，共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いた Z-stack 構築画像.

HUVEC 0.5 × 10^5 個を用いた血管様構造を含む口腔粘膜間質モデルにおいて，三次元立体的に血管様構造が構築されていることが，共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いた Z-stack 構築により観察できた．

(c) 各 HUVEC 播種数における血管様構造の構築の比較.

(a)Day5 の各 HUVEC 播種細胞数における蛍光免疫細胞染色画像を用いて，構築された血管様網状構造を定量的に比較したところ，HUVEC 播種数に比例して有意に増加することが示された．

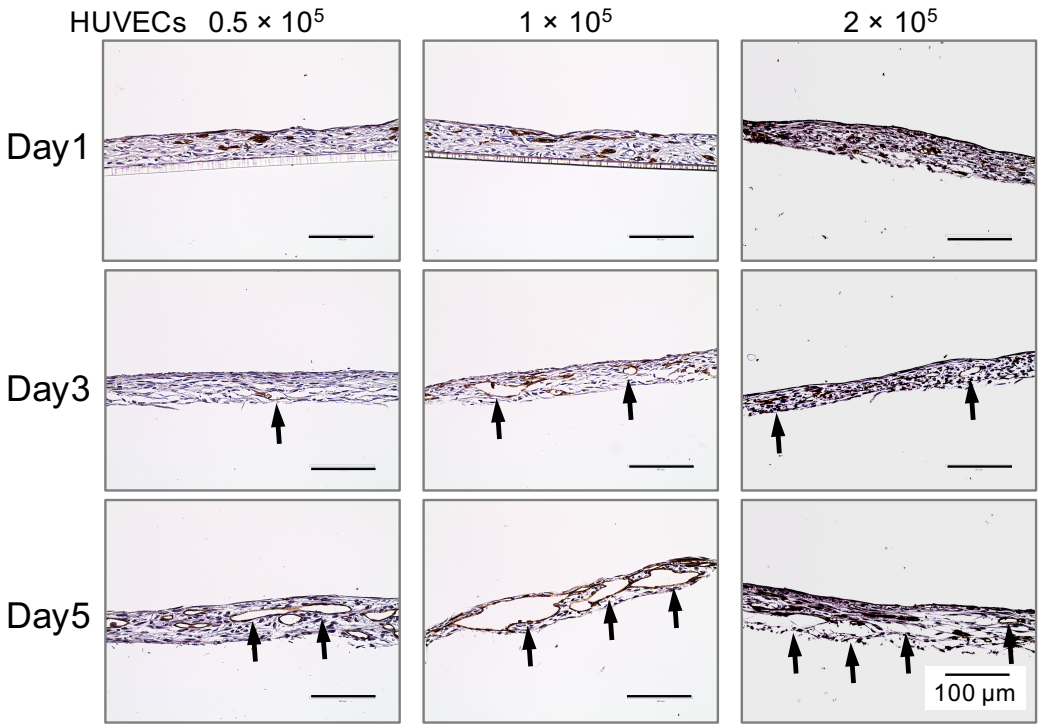

図 4

各 HUVEC 播種数における三次元組織の抗 CD31 抗体を用いた免疫組織化学染色画像.

CD31 陽性の HUVEC に裏打ちされた管腔構造(矢印)の形成が認められた.HUVEC 播種数・培養日数の増加に伴い, 管腔構造の数や大きさが増加することが観察できた.

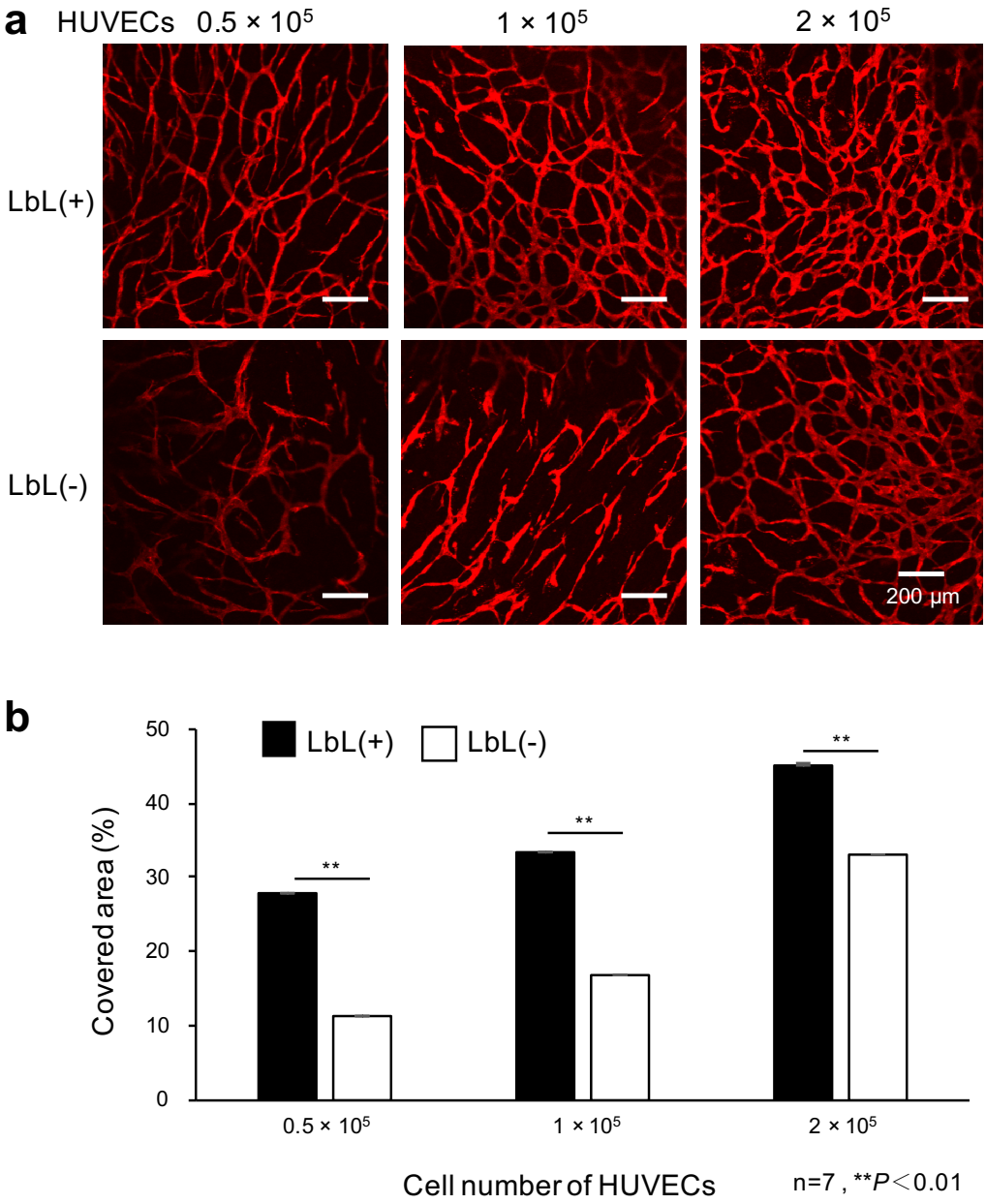

図 5

(a) LbL 細胞コートの有無における血管様構造を含む口腔粘膜間質モデルの観察.

血管様構造を含む口腔粘膜間質モデルについて, LbL 細胞コートの有無による血管様構造構築への影響を比較した. 抗 CD31 抗体を用いた蛍光免疫細胞染色を行い, LbL(+)と LbL(-)を比較したところ, LbL(+)の方が, 網状構造の形成が多い傾向にあることが観察された.

(b) LbL 細胞コートの有無における血管様構造構築の定量的な比較.

(a)の画像を用いて, 組織中の血管様構造の占有率(%)を算出したところ, LbL(+)は LbL(-)と比較し, 構築される血管様構造が有意に増加することが示された.

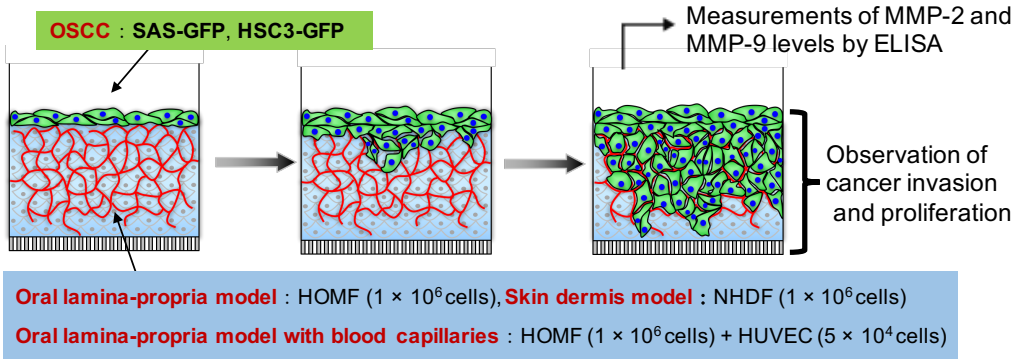

図 6

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，皮膚真皮モデルに口腔癌細胞(SAS-GFP 細胞または HSC3-GFP 細胞)を播種し，浸潤・増殖過程を観察した．また，癌細胞播種 5 日後におけるコラゲナーゼ(MMP-2, MMP-9)産生量を ELISA 法を用いて測定した．

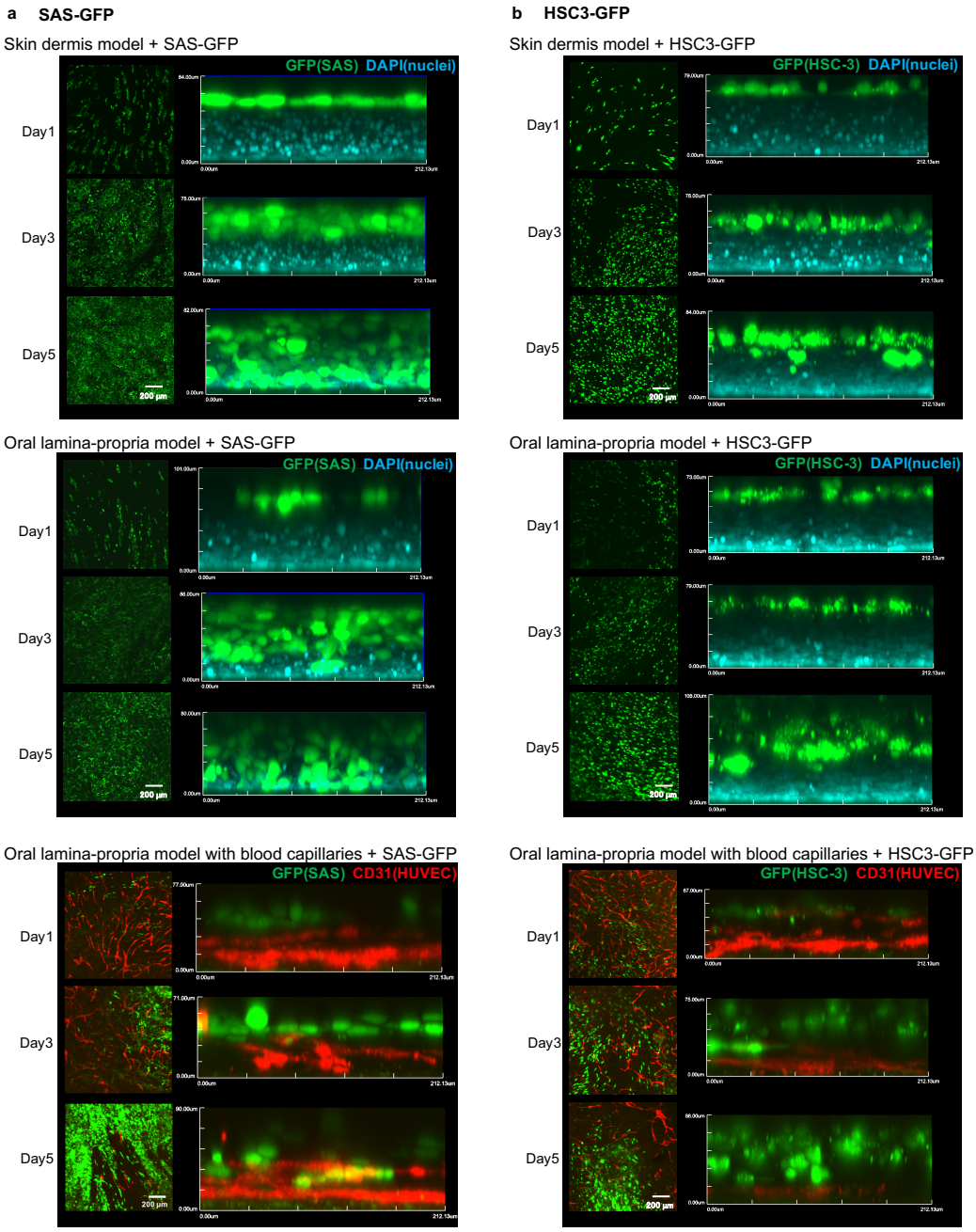

図 7

口腔癌浸潤モデルの観察(a; SAS-GFP 細胞, b; HSC3-GFP 細胞).

HUVEC は抗 CD31 抗体，細胞核は DAPI を用いて蛍光免疫細胞染色を行い，癌細胞播種後 1, 3, 5 日における浸潤モデルの観察を，共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて行った．皮膚真皮モデル，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に口腔癌細胞が経時的に増殖・浸潤していく過程を観察することが可能であった．

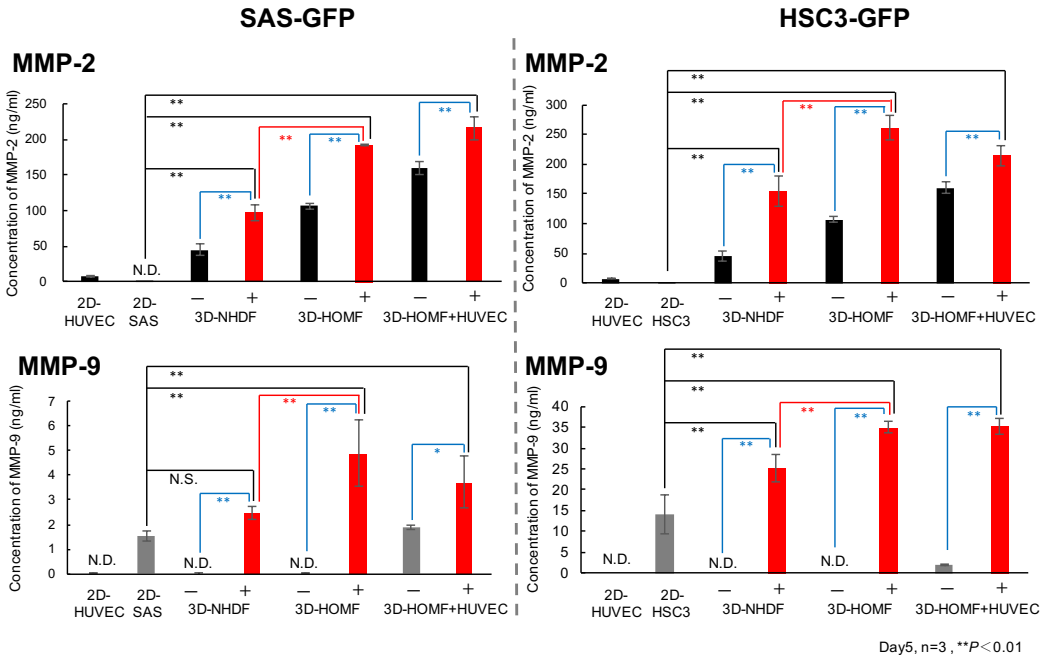

図 8

口腔癌浸潤モデルにおける MMP-2, MMP-9 産生量の測定.

二次元口腔癌細胞培養と比較し，三次元組織を用いた癌浸潤モデルでは，ほとんどのモデルにおいて MMP 産生量が有意に増加した（黒線）．皮膚真皮モデルを用いた癌浸潤モデルと口腔粘膜間質モデルを用いた癌浸潤モデルでは，後者における MMP 産生量が有意に増加した（赤線）．（横軸(-): 癌細胞を播種していない三次元組織体モデル，(+): 癌細胞を三次元組織体に播種した癌浸潤モデル）

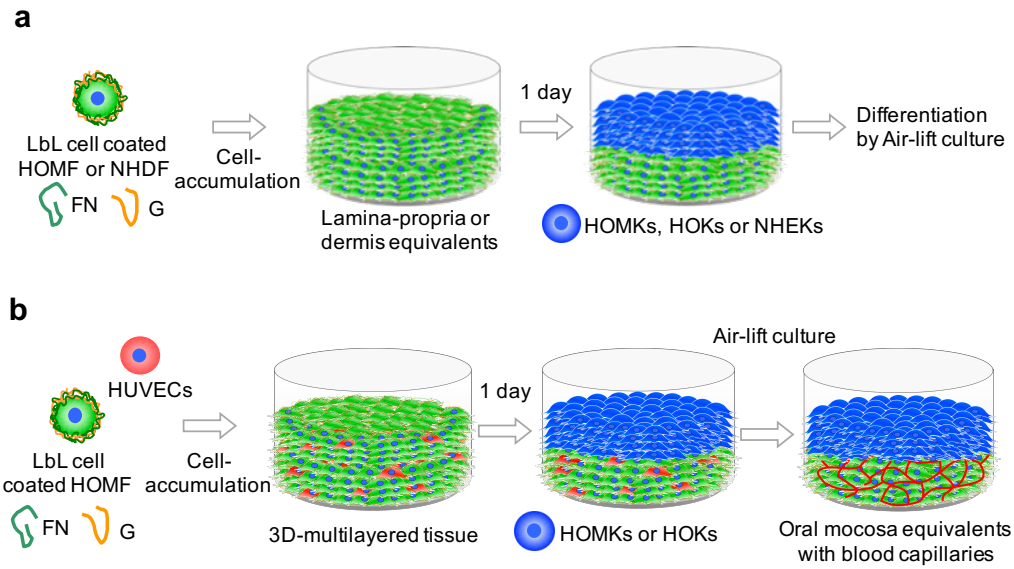

図 9

(a) LbL 細胞コート法を用いた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，口腔粘膜由来上皮細胞(HOMK または HOK)を播種し，air-lift 培養による分化誘導を行うことで，口腔粘膜モデルを構築した.

(b) LbL 細胞コート法を用いた血管様構造を含む口腔粘膜モデルの構築.

(a)口腔粘膜モデル構築過程における間質作製時に HUVEC を共培養することで，血管様構造を伴う口腔粘膜モデルを構築した.

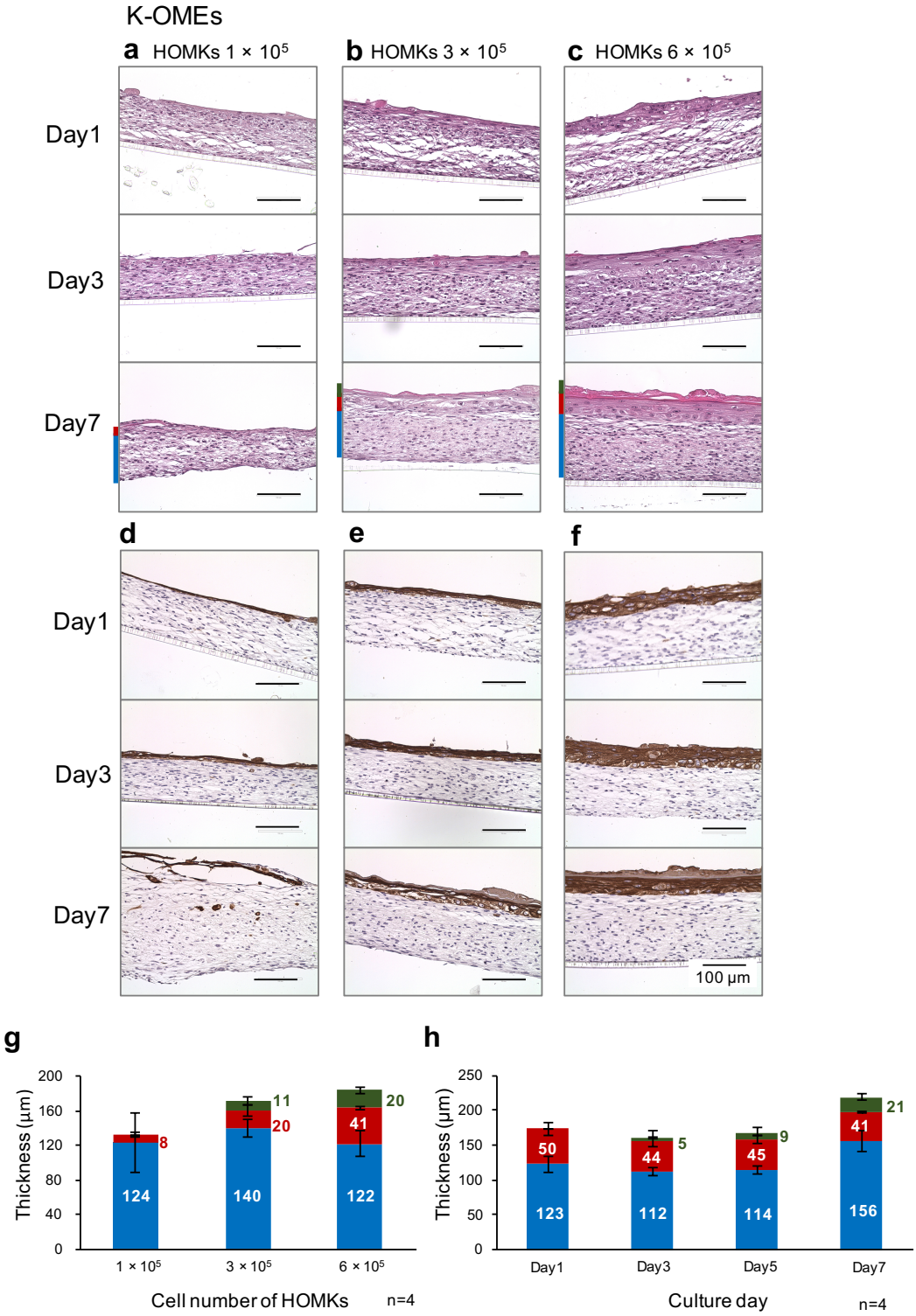
K-OMEs
a HOMKs 1 × 10^5
b HOMKs 3 × 10^5
c HOMKs 6 × 10^5
Day1
Day3
Day7
d
e
f
100 μm
g
Thickness (μm)
200
160
120
80
40
0
124
8
140
20
11
122
41
20
1 × 10^5
3 × 10^5
6 × 10^5
Cell number of HOMKs
n=4
h
Thickness (μm)
250
200
150
100
50
0
123
50
112
44
5
114
45
9
156
41
21
Day1
Day3
Day5
Day7
Culture day
n=4

図 10

(a)～(c) 各 HOMK 播種数・培養日数における角化口腔粘膜モデル（K-OMEs）の経時的観察(HE 染色).

(d)～(f) 各 HOMK 播種数・培養日数における K-OMEs の経時的な観察(CK(AE1/AE3)抗体を用いた免疫組織化学染色).

HE 染色画像と免疫組織化学染色画像を合わせて観察することで, HOMF から成る間質上に, HOMK から成る上皮層が構築されていることが確認できた. (b),(c) Day7 では上皮層の正角化が認められた.

(g) 各 HOMK 播種数における培養 7 日後の K-OMEs の厚みの比較.

HOMK 播種数に比例して, 上皮層の厚みが増加し, 角化層の厚みも増加することが示された（緑：角化層, 赤：角化層を除く上皮層, 青：間質の厚みを示す.）

(h) HOMK 6×10^5 個播種し構築した K-OMEs の経時的な厚みの変化.

経時的に上皮層の厚みが増加し, 角化層が形成されることが示された. （緑：角化層, 赤：角化層を除く上皮層, 青：間質の厚みを示す.）

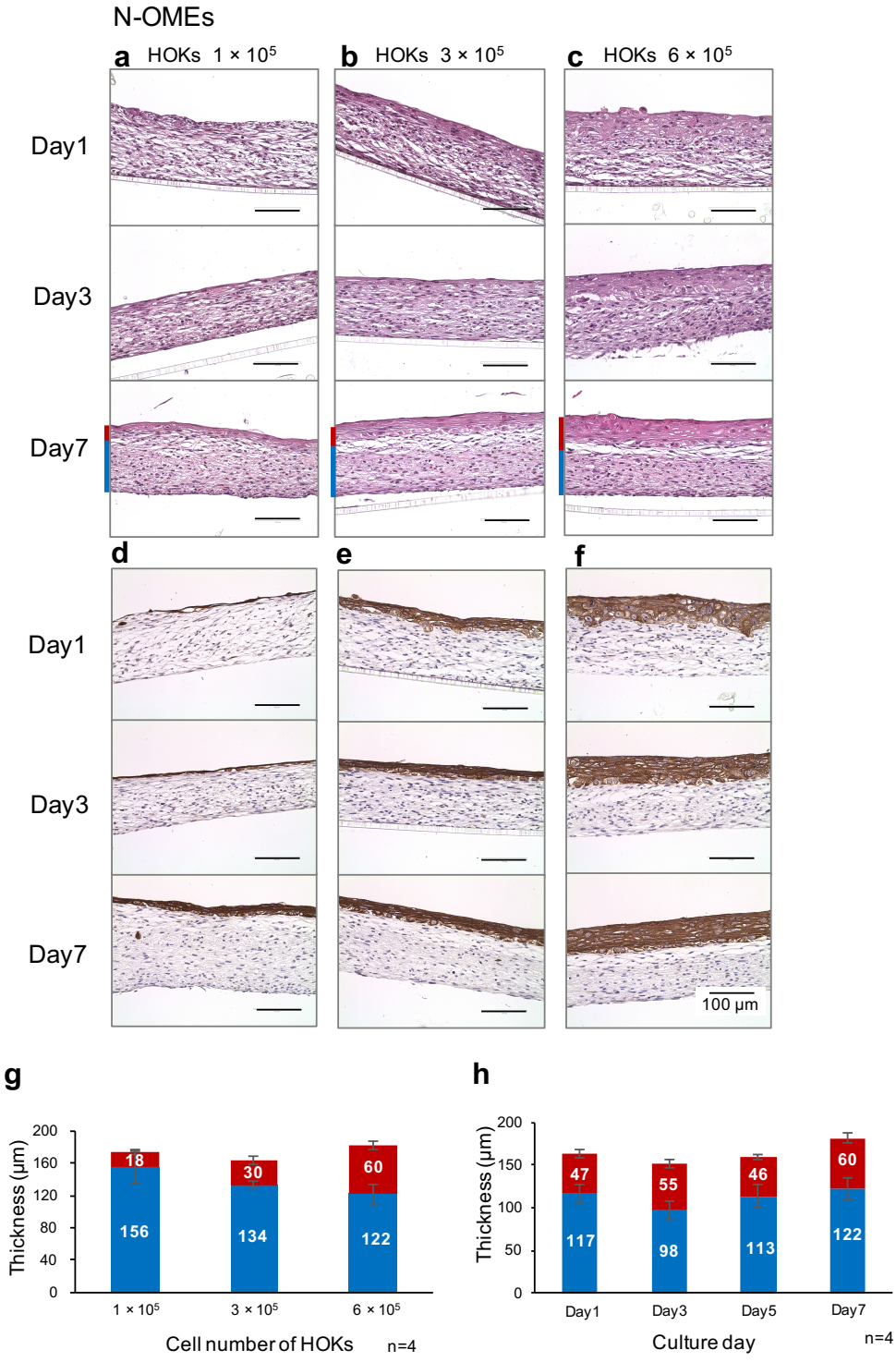
N-OMEs
a HOKs 1 × 10^5
b HOKs 3 × 10^5
c HOKs 6 × 10^5
Day1
Day3
Day7
d
e
f
100 μm
g
Thickness (μm)
200
160
120
80
40
0
18
156
30
134
60
122
1 × 10^5
3 × 10^5
6 × 10^5
Cell number of HOKs
n=4
h
Thickness (μm)
200
150
100
50
0
47
117
55
98
46
113
60
122
Day1
Day3
Day5
Day7
Culture day
n=4

図 11

(a)～(c) 各 HOK 播種数・培養日数における非角化口腔粘膜モデル（N-OMEs）の経時的観察(HE 染色).

(d)～(f) 各 HOK 播種数・培養日数における N-OMEs の経時的な観察(抗 CK(AE1/AE3)抗体を用いた免疫組織化学染色).

HE 染色画像と免疫組織化学染色画像を合わせて観察することで, HOMF から成る間質上に, HOK から成る上皮層が構築されていることが確認できた. 上皮表層は非角化であった.

(g) 各 HOK 播種数における培養 7 日後の N-OMEs の厚みの比較.

HOK 播種数に比例して, 上皮層の厚みが増加することが示された.（赤：上皮層, 青：間質の厚みを示す.）

(h) HOK 6×10^5 個播種し構築した N-OMEs の経時的な厚みの変化.

培養日数に従い上皮層の厚みは増加傾向にあった.（赤：上皮層, 青：間質の厚みを示す.）

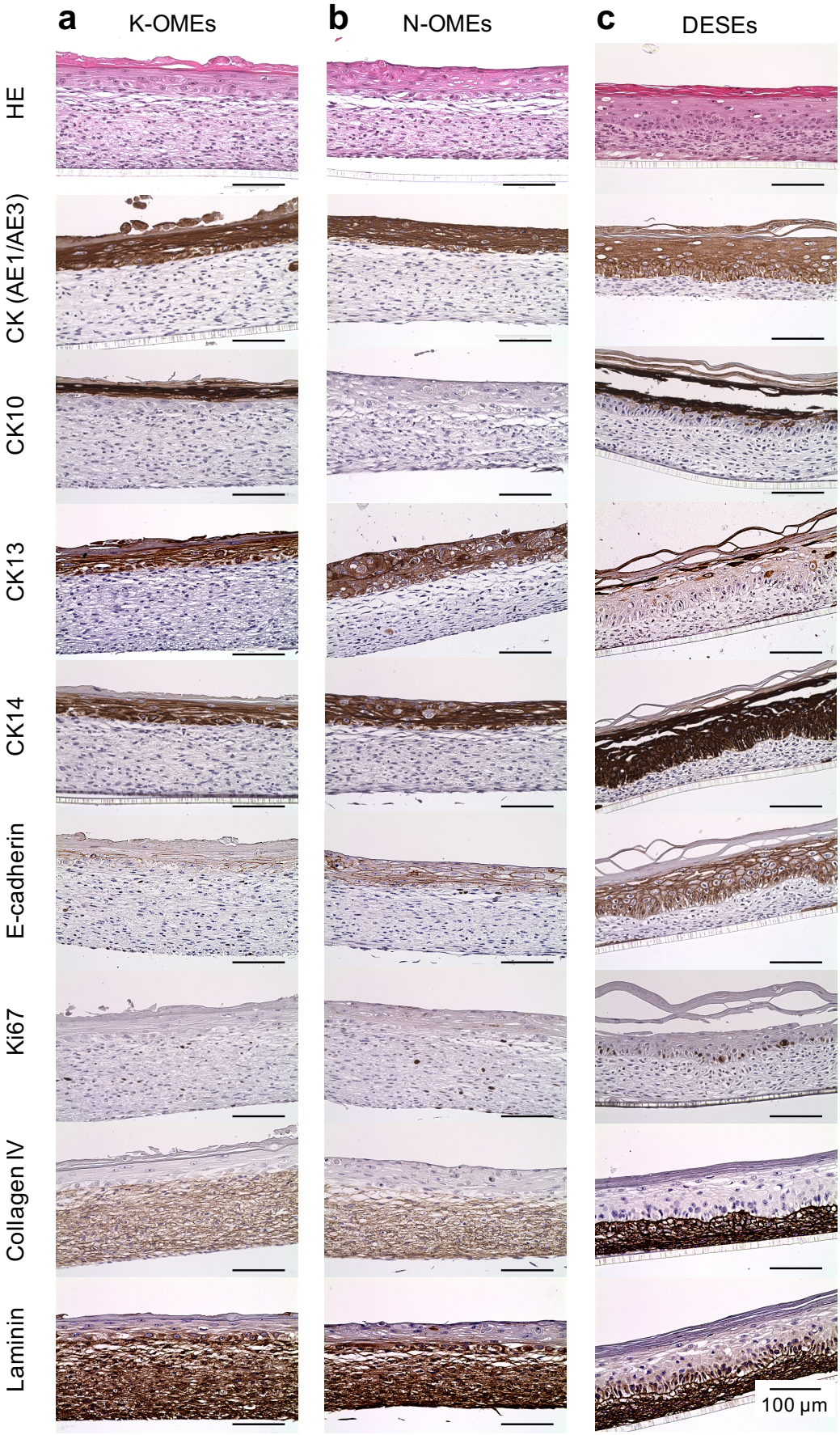
a
K-OMEs
b
N-OMEs
c
DESEs
HE
CK (AE1/AE3)
CK10
CK13
CK14
E-cadherin
Ki67
Collagen IV
Laminin
100 µm

図 12

(a)角化口腔粘膜モデル（K-OMEs），(b)非角化口腔粘膜モデル（N-OMEs），(c)皮膚モデル（DESEs）における HE 染色，免疫組織化学染色切片画像.

Air-lift 培養 7 日後の各モデルについて，上段から HE 染色，抗 CK(AE1/AE3)抗体・抗 CK10 抗体・抗 CK13 抗体・抗 CK14 抗体・抗 E-cadherin 抗体・抗 Ki67 抗体・抗 collagen IV 抗体・抗 laminin 抗体を用いた免疫組織化学染色画像を示す.

角化上皮に特異的な CK10 は K-OMEs と DESEs で発現し，非角化上皮に特異的な CK13 は OMEs で強く発現した. CK10(有棘層より上方で特異的に発現)と CK14(基底層に特異的に発現)の染色箇所を比較することで，基底層が形成されていることが示唆された. 細胞間接着に関する E-cadherin はいずれも上皮細胞周囲で発現した. 増殖活性に関する Ki67 は OMEs では発現が認められなかった. 基底膜を構成する collagen IV と laminin は間質・真皮に一様に発現し，基底膜相当部に特異的な染色結果は得られなかった.

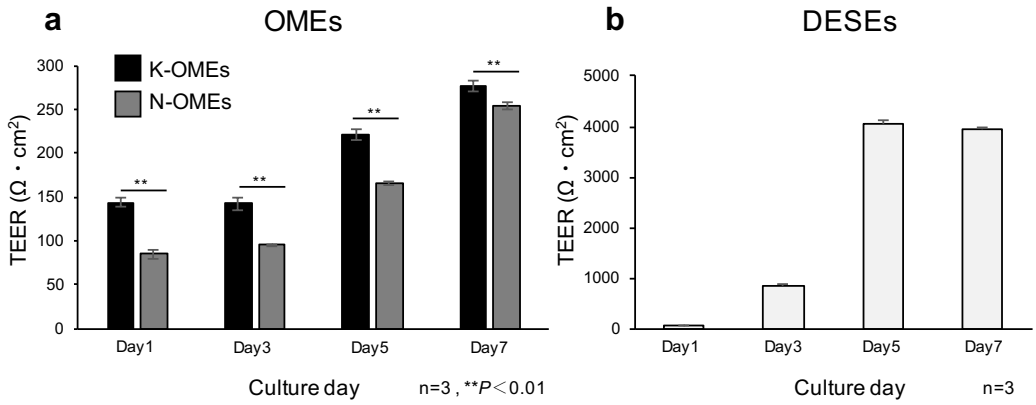

図 13

(a)角化口腔粘膜モデル（K-OMEs）/非角化口腔粘膜モデル（N-OMEs），(b)皮膚モデル（DESEs）における経皮的電気抵抗(TEER)値の測定.

OMEs の TEER 値は経時的に増加し，K-OMEs は N-OMEs と比較し TEER 値が有意に高値を示し，角化程度の違いを定量的な差として評価することが可能であった.

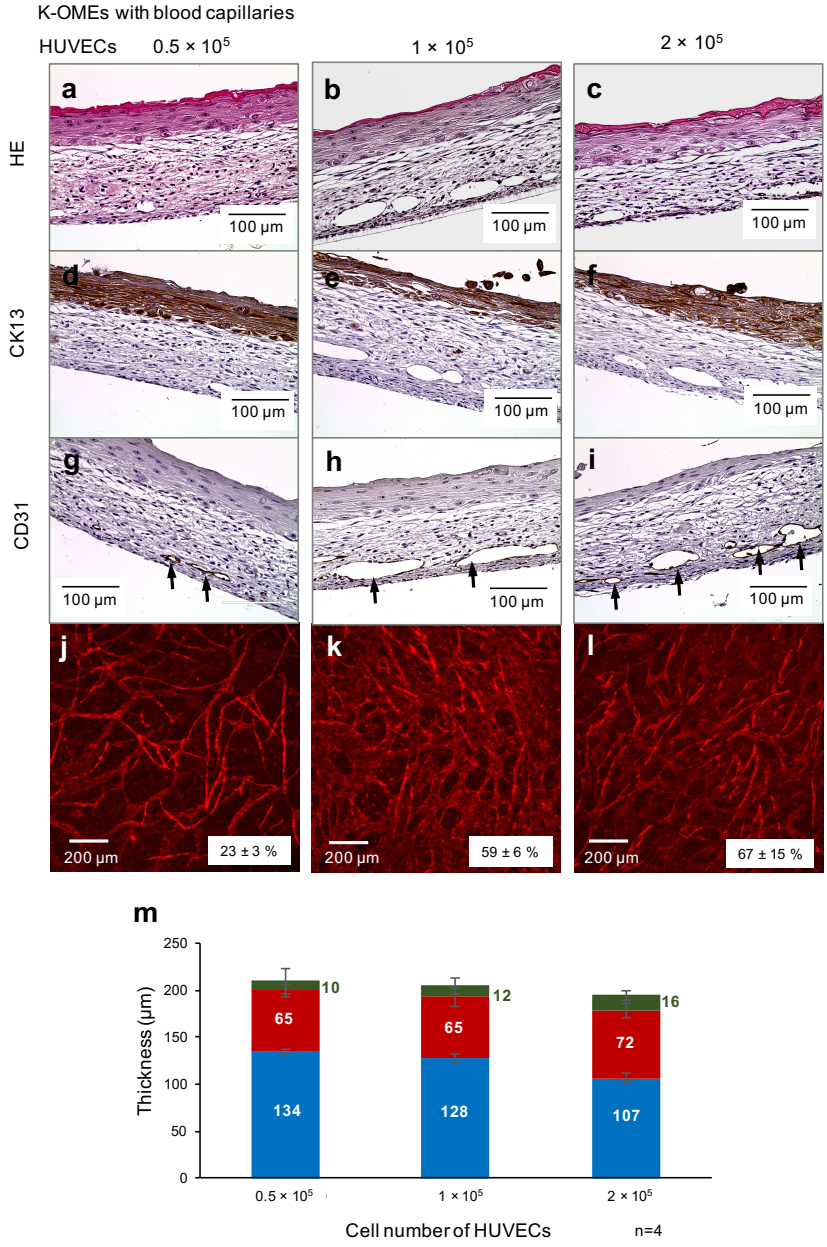

図 14

(a～c) 各 HUVEC 播種数における血管様構造を含む角化口腔粘膜モデル（K-OMEs）の HE 染色画像.

(d～f) 抗 CK13 抗体を用いた免疫組織化学染色画像.

(g～i) 抗 CD31 抗体を用いた免疫組織化学染色画像.

血管様構造を含まない K-OMEs と同様に，上皮層は正角化と CK13 の発現が認められた．間質部では，CD31 陽性の HUVEC に裏打ちされた管腔構造の形成(矢印)が認められた．

(j～l) 共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いた血管様構造の観察.

HUVEC 播種数に比例して，構築される血管様構造の増加を認めた．(右下の数値は，血管様構造占有率(%)を示す．(n=4))

(m) 各 HUVEC 播種数における血管様構造を含む K-OMEs の厚みの測定.

組織の厚みや上皮分化は，血管様構造の存在に影響を受けないことが示された．(緑：角化層，赤：角化層を除く上皮層，青：間質部の厚みを示す.)

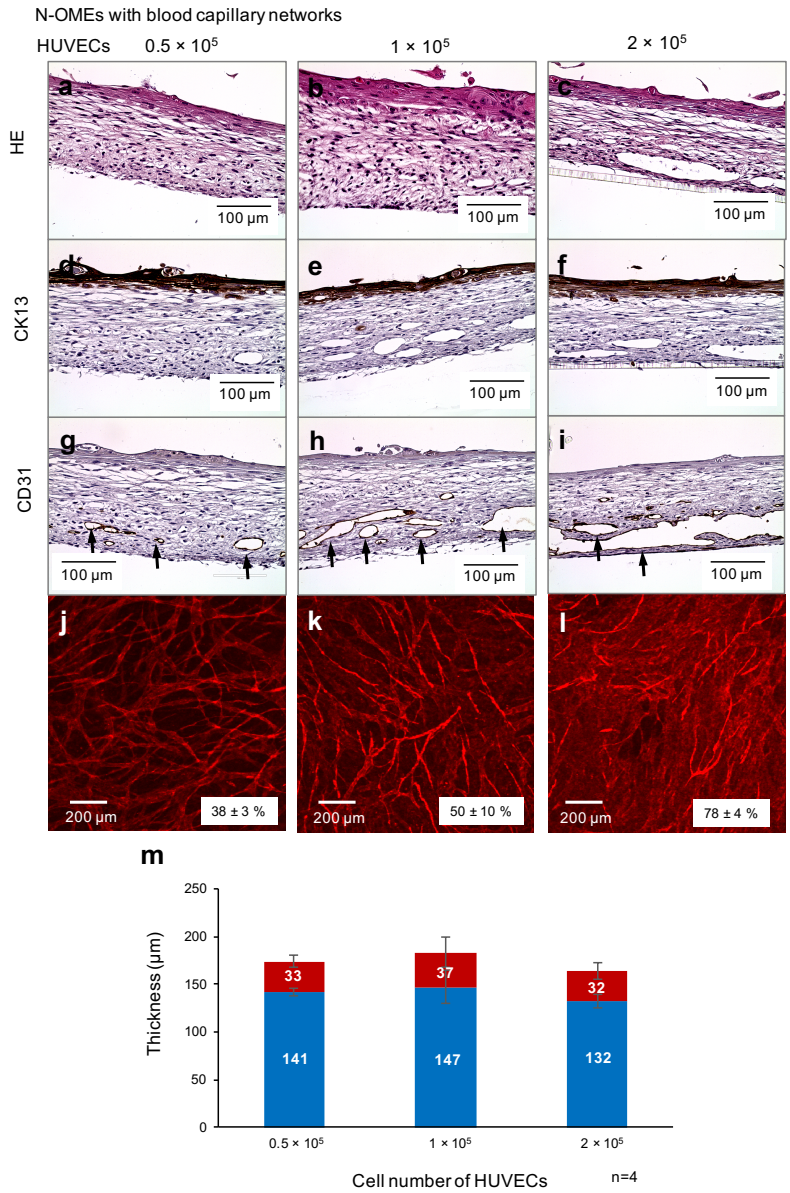

図 15

(a～c) 各 HUVEC 播種数における血管様構造を含む非角化口腔粘膜モデル (N-OMEs) の HE 染色画像.

(d～f) 抗 CK13 抗体を用いた免疫組織化学染色画像.

(g～i) 抗 CD31 抗体を用いた免疫組織化学染色画像.

血管様構造を含まない N-OMEs と同様に，上皮層は正角化と CK13 の発現が認められた．間質部では，CD31 陽性の HUVEC に裏打ちされた管腔構造の形成(矢印)が認められた．

(j～l) 共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いた血管様構造の観察.

HUVEC 播種数に比例して，構築される血管様構造の増加を認めた．(右下の数値は，血管様構造占有率(%)を示す．(n=4))

(m) 各 HUVEC 播種数における血管様構造を含む N-OMEs の厚みの測定.

組織の厚みは血管様構造の存在に影響を受けないことが示された．（赤：上皮層，青：間質部の厚みを示す.）

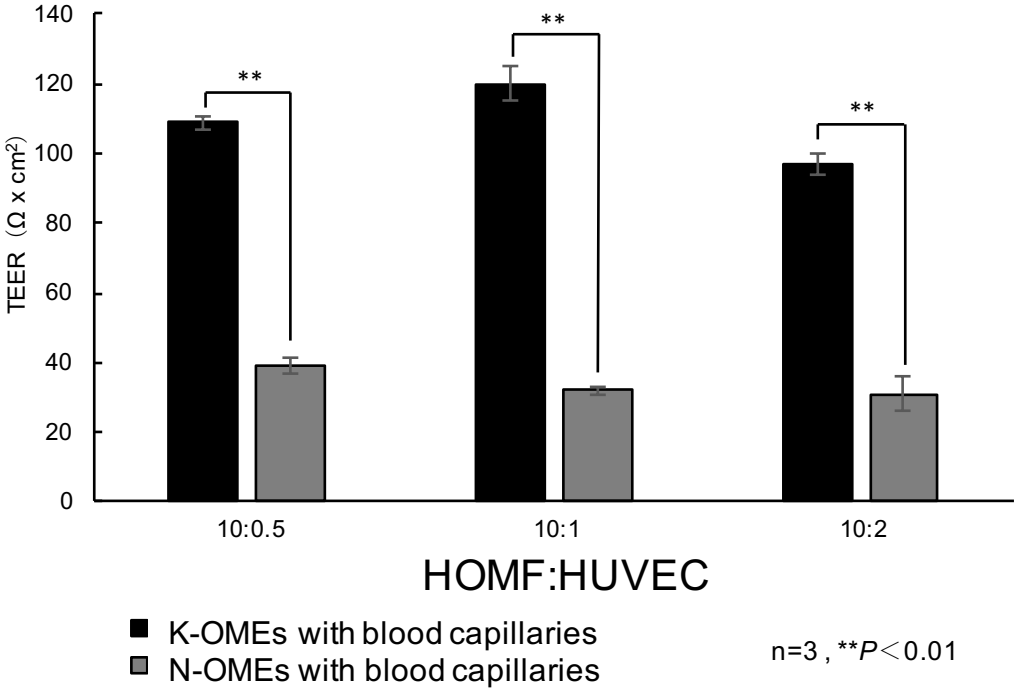

図 16

HUVEC 各播種数における血管様構造を含む口腔粘膜モデル（OMEs）の TEER 値の比較.

血管様構造を有していても, K-OMEs と N-OMEs のバリア機能の差が維持されていることが示された.