

氏 名 村上 翔子

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博士甲第 896

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項

学 位 授 与 年 月 日 令和 3 年 3 月 9 日

学 位 論 文 題 目 Similarities and differences in metabolites of tongue cancer cells among in 2D culture, in 3D culture and xenografts

(2D 培養、3D 培養、異種移植片における舌がん細胞代謝物の類似点と相違点)

審 査 委 員 主査 教授 醍醐 弥太郎

副査 教授 扇田 久和

副査 教授 依馬 正次

論文内容要旨

*整理番号	905	(ふりがな) 氏名	むらかみ しょうこ 村上 翔子
学位論文題目	Similarities and differences in metabolites of tongue cancer cells among in 2D culture, in 3D culture and xenografts (2D 培養、3D 培養、異種移植片における舌がん細胞代謝物の類似点と相違点)		
<p>【目的】</p> <p>従来からの 2D 培養では、細胞は生体とは違った構造や機能を示すことが報告されてきた。一方、3D 培養は、経済面や倫理面から動物実験の代替となりうると期待されており、最近では、スフェロイドやコラーゲンなどの細胞外基質を用いた 3D 培養系、がんオルガノイド系などが報告されている。本研究では、足場として Cellbed™(Japan Vilene Co., Tokyo)を使った新たな 3D 培養系“tissueoid cell culture system”を用いた。Cellbed は超微細シリカファイバーでできた線維集合体であり、その格子状構造は、生体の疎性結合組織の組織骨格に類似している。この空隙を通して、細胞は自由に移動できるため、生体に近い立体構造を呈する。細胞外基質を使用せず、純粋ながん細胞のみを取り扱うために、純粋ながん細胞から代謝物を抽出し、解析に使用することができる。本研究では、4 種類の舌癌細胞株を用いて、従来からの 2D 培養群(以下、2D)、tissueoid cell culture system を用いた 3D 培養群(以下、3D)、舌癌細胞をヌードマウスに異種移植した xenograft 群 (以下、xenograft) の 3 群を作成し、網羅的な代謝解析を行った。生体組織に近い xenograft を基準とし、3 群の代謝物の類似点と相違点を比較検討した。さらに、がん細胞の増殖、腫瘍生長に必要な不可欠なミトコンドリア代謝に注目し、ミトコンドリア機能解析を行った。</p> <p>【方法】</p> <p>細胞株は、舌扁平上皮癌 (HSC-3, HSC-4, SCC-4, SCC-15) を用いた。動物実験は本学動物実験委員会の承認を得て行った (2019-4-1)。3 群で最終細胞数が等しくなるよう調整し、代謝解析を Human Metabolome Technologies, Inc.に委託した。HE 染色、ウェスタンブロット解析は、過去の報告 (参考論文) に準じて行った。細胞外フラックス解析は、2D と 3D で最終細胞濃度が等しくなるよう調整し、XF24[®] 細胞外 Flux analyzer(Seahorse Bioscience, North Billerica, MA)を用いて行った。統計解析は、代謝解析のみ Welch の t 検定を用い (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)、それ以外は student's t-test を用いた (*p<0.05, **p<0.01)。</p> <p>【結果】</p> <p>以下に主な結果を示す。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ HE 染色：2D ではすべての細胞株で単層構造が認められた。3D では高分化型の細胞株 			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等を用いて印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

別紙様式3の2 (課程博士・論文博士共用)

(続紙)

(HSC-4, SCC-15)で扁平上皮癌に特徴的な層構造や異常角化が確認できた。xenograft ではすべての細胞株でシート様構造が認められ、高分化型(HSC-4, SCC-4, SCC-15)では低分化型(HSC-3)より大きな腫瘍胞巣が確認できた。

・代謝解析：主成分解析では、2D では3D, xenograft と異なり、ほとんどのプロットが狭い範囲に集まっていた。クラスタリング解析では、2D は3D, xenograft と比較しほとんどの代謝物のピーク値が著しく低かった。3D と xenograft では高いピーク値が類似している代謝物が多かった。3群のうち xenograft のみ低いピーク値を示したものは解糖中間体が多く、xenograft のみ高いピーク値を示したものは肝臓での代謝物である尿素やコリン代謝物、プリン代謝物が多かった。

・解糖系：乳酸量は2D では低値であったが、3D では高値であり、xenograft に近い値を示した。細胞外フラックス解析では2D と比較し、3Dの方がより高い解糖能を示した。

・ミトコンドリア代謝：ATP, ADP, AMP, 総アデニレート量は、2D ではすべて有意に低値であったが、3D と xenograft では高値であった。ウェスタンプロット解析にて、呼吸鎖関連酵素の発現は2D では低く、3D と xenograft では高発現を示した。細胞外フラックス解析にて、進行癌の細胞株(HSC-3, HSC-4)ではOCR(酸素消費速度)は2D より3Dの方が高値であった。全ての細胞株で3Dでは予備呼吸能が低下していた。

・Biomassの生合成：20種類のアミノ酸産生量やプリンヌクレオチド産生量は、2Dでは低値であったが、3Dとxenograftではともに高値を示した。

・酸化還元バランスの維持：PPPの過程で主に産生され強い還元作用を持つNADPHは細胞を酸化ストレスから保護する役割がある。NADPH/NADP⁺比は3Dではxenograftと同様に低値であり、NADPHが活性酸素消去のために消費されていることが分かった。ウェスタンプロット解析にて、活性酸素消去系酵素の発現は2Dでは低く、3Dとxenograftでは高発現を示した。

【考察】

2Dと3Dでは舌がん代謝は大きく異なっていた。一方、3Dの代謝物の多くはxenograftの代謝物と類似していた。しかし、xenograftはがん細胞周囲にある宿主由来の間質や血流の影響を受けるため、これらに起因する代謝物が他の群との違いとして現れていた。3Dでは、がん細胞のミトコンドリア機能は障害されておらず、がん細胞は好氣的解糖と同時にミトコンドリアによるエネルギー産生を行っていること、がん細胞が酸素を有効に使ってbiomassを生合成していること、酸化還元バランスを維持していることが示唆された。一方、2Dでは生体とは異なる条件下で生き抜くためにそれぞれの細胞独自の特徴が薄れ、単層培養特有の特殊な代謝が行われていることが示唆された。

【結論】

3Dとxenograftでは、グルコースなどの栄養素を使って解糖系やTCA回路を活性化し、biomass生合成、酸化的リン酸化によるATP産生、酸化還元バランスの維持を行っていることが明らかとなった。生体がん組織の形態と機能を模倣することができる3Dの代謝解析では、これまで報告されてきたがん代謝の理論に合った結果が得られた。

別紙様式9 (課程博士・論文博士共用)

博士論文審査の結果の要旨

整理番号	905	氏名	村上 翔子
論文審査委員			
<p>(博士論文審査の結果の要旨)</p> <p>本論文では、超微細シリカファイバーを用いた3D培養系と従来の2D培養系やヌードマウス xenograft を用いて舌癌細胞株における網羅的な代謝解析を行い、3群の代謝物の類似点や相違点を明らかにすることを目的として研究を行った。そのため、4種類の舌扁平上皮癌株で3D培養群、2D培養群及び xenograft 群を設定し、HE染色による形態学的解析と網羅的代謝解析、その比較解析について検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 3D培養下の舌癌細胞株では高分化型株で扁平上皮癌に特徴的な層構造や異常角化が確認される。 2) 舌癌細胞株の3D培養と xenograft では解糖系やTCA回路が活性化し、biomass 生合成がなされ、また、酸化的リン酸化によるATP産生が行われ、酸化還元バランスが維持されている。 3) 3D培養下の舌癌細胞株では癌代謝の理論にあった代謝が行われている。 4) 2D培養下の舌癌細胞株では細胞の特徴が薄れ単層培養細胞特有の代謝が行われている。 <p>本論文は、超微細シリカファイバーを用いた3D培養系を用いて舌癌細胞株における代謝産物を解析し、生体組織に近い立体構造と機能を有する腫瘍細胞培養系の有用性と応用展開の可能性について新たな知見を与えたものであり、また最終試験として論文内容に関連した試問を実施したところ合格と判断されたので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(令和3年1月27日)</p>			