

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10557

研究課題名(和文)新規モデル系を用いた癌の神経浸潤における細胞間相互作用因子の探索

研究課題名(英文) Investigation for intercellular interaction factors in perineural invasion using a novel model system

研究代表者

岡本 理志 (Okamoto, Satoshi)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：50509106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞由来神経堤細胞から誘導した神経細胞と、膵癌細胞株の共培養系を用いて、これらの相互作用における重要因子の探索を行った。癌細胞が神経突起に沿って増殖・進展する様子が観察された。一方で、両細胞種が直接接触する以前の過程においては、神経突起の伸長方向や癌細胞の伸展方向に、相互作用は認められなかった。癌細胞が進展時の足場とし得る神経細胞種については一定の知見は得られたが、相互作用の原因因子同定にはさらなる研究を要する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

予後の悪い癌である膵癌の病理組織においては、神経浸潤として知られる癌細胞による神経繊維への浸潤現象が極めて高い確率で確認されており、また、他の癌種においても神経浸潤の発生と術後予後との相関が議論されている。

これまで主流であったin vitro実験系においては、実験材料の入手難易度の点から動物の神経細胞を用いたものがほとんどであったが、本研究においては、半永久定期的に増殖可能なヒトiPS細胞より神経細胞を誘導して、神経細胞と癌細胞間の相互作用を調べた。未熟な神経細胞が足場として好まれる傾向が確認されており、今後の神経浸潤現象解明の一助となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Using a co-culture system of neural cells derived from human iPS cell-derived neural crest cells and pancreatic cancer cell lines, we searched for important factors in the interaction among these cells. It was observed that the cancer cells proliferated and spread along the neurites. On the other hand, in the process before direct contact of the both cell types, no interaction was observed in the neurite extension direction or the cancer cell extension direction. In addition, although certain findings have been obtained regarding the neuronal cell types that cancer cells can use as scaffolds during extension, further research is required to identify the causal factors.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：iPS細胞 神経細胞 神経堤細胞 癌細胞 神経浸潤

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は致死率において最も高い癌の1つであることが知られている。膵癌患者の予後は極めて悪く、約75%の患者が診断後1年以内に死亡し、5年生存率は5%以下である。診断時において患部を切除可能な膵癌患者は全体の10~20%のみであるが、これは膵癌の浸潤・転移が早いためであり、症状が現れ診断を受ける頃には既に治療法の選択肢がない場合も多い。幸いにも切除手術が可能であった場合においても、膵癌では再発の頻度が高い。この癌再発の主な原因の1つに、神経浸潤 (perineural invasion: PNI) が知られている。PNIは膵癌においては極めて頻繁に (90%以上の患者で) 見られる現象であり、膵癌の予後を推し量る上で重要な要素となっている。

固形癌の浸潤・転移においては、3つの良く知られた経路が存在する。1つは癌細胞の直接的な (非特異な) 浸潤であり、他の2つはリンパ管及び血管を介した転移である。しかし、近年、4つめの経路として神経に沿った浸潤 (PNI) が注目される様になり、研究も盛んに行われる様になってきた。PNI自体は100年以上前から知られていた病態であるが、長い間、PNIは神経線維とそれを取り巻く結合組織の間の粗な空間を、腫瘍細胞が受動的に広がるものと考えられて来た。しかし近年の研究により、神経周囲はコラーゲンや基底膜が密に詰まった空間であることが分かり、PNIはその抵抗の高い組織中を腫瘍細胞が積極的に浸潤する現象であることが分かって来た。

このように、膵癌を始めとする固形癌で見られるPNIにおいては、その浸潤経路の高い抵抗に打ち勝つだけの強い原動力が必要であることが予想される。これには腫瘍細胞と神経細胞を始めとする、神経周囲の微小環境における細胞間のシグナル相互作用が重要な役割を果たしていることが、多くの *in vitro/in vivo* 研究により明らかとなって来ている。特に *in vitro* 研究においては、マウス/ラットの後根神経節 (DRG) 由来神経細胞と膵癌細胞株を用いた簡便な共培養系により、GDNF、NGF、BDNF 等といった神経成長因子を始めとする多くのサイトカインやケモカインが関わっていることが明らかになりつつある。また、神経成長因子を始めとする関連分子の作用は神経細胞から腫瘍細胞への一方通行の相互作用ではなく、例えば腫瘍細胞からも神経栄養因子が分泌されることも分かっており、腫瘍細胞と神経細胞が相互に正の影響を及ぼし合う構図が描かれて来ている。

また、PNIの進行には腫瘍細胞と神経細胞だけでなく、神経周囲空間の微小環境中に存在する他種細胞の関与も指摘されている。主なものとしては、シュワン細胞、膵星細胞、神経内膜に存在するマクロファージ等が挙げられる。中でもシュワン細胞は神経周囲に最も多く存在する細胞種であり、生理的条件下においては神経細胞の維持に貢献しているが、膵癌のPNIにおいては、NCAM-1等を介した腫瘍細胞との直接相互作用により腫瘍細胞が神経へ浸潤する最初のきっかけを作ると考えられている。

2. 研究の目的

これまでに多くのPNI関連分子に関する研究が報告されているが、これまでに報告されて来た研究における実験モデルはいずれも、マウス/ラットの神経とヒトの腫瘍細胞との相互作用を調べた *in vitro/ex vivo* モデルもしくは腫瘍細胞を動物へ移植する *in vivo* 実験系ばかりであり、これらは必ずしも患者の生体内で起こっているヒト細胞間の現象を反映しているとは限らない。また、神経側モデルとして主にDRG由来の神経細胞が用いられているが、DRGに存在する細胞は主に感覚神経であり、本来膵臓を神経支配している自律神経とは性質が異なることから、患者内の病巣で起こる現象を反映しているとは限らない。現在、多岐にわたるPNI関連分子が見つまっているが、これらのうちいずれが真に重要な因子かは、ますます分からなくなっている。その背景には、こういったモデル系自体が抱える問題点が関係する可能性が考えられる。

そこで、本研究においては、ヒトiPS細胞から分化誘導した神経細胞を用いることにより、腫瘍細胞と神経細胞の両方をヒト細胞で揃えた共培養系を構築し、これを用いてPNIの現象中に見られる真の相互作用を抽出することを目的とする。

3. 研究の方法

ヒトiPS細胞由来神経堤幹細胞から神経細胞へと分化誘導

ヒトiPS細胞から神経堤細胞への分化誘導法は、Menendez L et al, PNAS, 2011, 108:19240-19245を参考に構築した。具体的には、ヒトiPS細胞を Geltrex コーティングした培養皿上に 1×10^5 cells/cm² で播種し、DMEM/F12 + 20% KSR, 2mM L-Gln, 0.1mM NEAA, 0.1mM 2-ME, 20ng/mL EGF, 20ng/mL bFGF, 20uM SB431542, 2uM BIO 中で7日間培養した後に Accutase で剥離して、Geltrex コーティングした培養皿上に 1×10^5 cells/cm² で再播種し、DMEM/F12/Neurobasal medium(1:1) + 2% B27, 20ng/mL EGF, 20ng/mL bFGF, 20uM SB431542 中で培養し、7-14日毎に継代培養した。

神経堤細胞から神経細胞への分化誘導法は、神経堤細胞を Elplasia プレート (Kuraray) を用いて sphere 形成させた後に、プラスチック培養皿上で Matrigel に包埋し、DMEM/F12/Neurobasal medium(1:1) + 2% B27 中で培養した。Matrigel 包埋せずに分化誘導する際は、Geltrex コート上 DMEM/F12/Neurobasal medium(1:1) + 2% B27, 1uM DAPT +/- (BDNF, GDNF, NGF, neurotrophin-3, ascorbic acid, dbcAMP)、または、KBM-NSC + 2% B27, 1uM DAPT 中で培養し

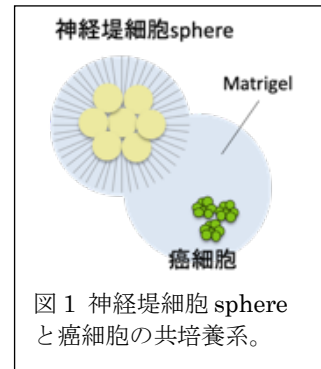
た。

使用癌細胞株

ヒト膵臓癌由来細胞株 Panc1, Panc1-Luc-GFP および MiaPaCa2 を用いた。DMEM + 10% FBS 中で維持培養したものを共培養実験に使用した。後述する研究成果中に図示した癌細胞は、いずれも Panc1-Luc-GFP を用いた。

ヒト iPS 細胞由来神経細胞と癌細胞の共培養

神経堤細胞を Matrigel 包埋中で神経分化させ、神経突起の形成が十分見られた後に、癌細胞を神経突起先端より 1-5 mm 程度離れた位置に Matrigel で包埋固定し、DMEM/F12/Neurobasal medium(1:1) + 2% B27 中で培養を行った (図 1)。



4. 研究成果

まず、ヒト iPS 細胞由来神経堤細胞より神経細胞を効率良く分化誘導する方法を検討した。当初は、培養中の神経堤細胞を酵素で剥離し、分散させた状態、もしくは、sphere 形成させたのちに、マトリゲル土ポリリジンコーティングした培養皿上で培養する方法で培地組成等を検討したが、神経細胞以外の細胞種も多く誘導される、もしくは、神経堤細胞が増殖するため、以後の解析には不相当と考えられた。そこで、神経堤細胞を sphere 形成させた後に、マトリゲル包埋中での培養を検討したところ、長い神経突起伸長が多数見られ、また、神経細胞以外の細胞の出現・増殖があまり認められなかったことから、神経細胞が効率良く誘導されたと考えられた。神経細胞の確認は、Tubb3 等の免疫染色を実施した (図 2)。

次に、ヒト iPS 細胞由来神経細胞と腫瘍細胞の共培養系の検討を実施した。上記と同様、ヒト iPS 細胞由来神経堤細胞を sphere 形成させた後に、まず神経堤 sphere をコーティングフリーな培養皿上で、マトリゲル中に包埋し、続いて膵癌細胞株を神経堤 sphere から 1-5 mm 程度の距離を開けて播種した後に、上からマトリゲルを重層した。その結果、膵癌細胞株の存在下においても神経堤 sphere から神経突起の伸長が多く観察された。一部では、癌細胞が神経突起に沿って増殖・進展する様子が観察された (図 3)。また、神経突起を直接足場として移動する様子も観察された。一方で、神経細胞や神経突起から離れた場所において、癌細胞株が向神経細胞性を示すか、あるいは反対に、神経突起伸長が向癌細胞株性を示すかの検討を行ったが、いずれも否定的な結果であった。このことから、癌細胞の神経浸潤は、癌細胞が神経細胞体もしくは神経突起に直接接触した後に加速する可能性が考えられた。あるいは、今回の実験系では、生体内組織と比較して関与する細胞種が少なく微小環境構造も単純なため、細胞同士の直接相互作用しか検出できない可能性も考えられた。よって以後は、本培養系で検出可能な、癌細胞株と神経細胞の直接相互作用に対象を絞って解析を進めることにした。

癌細胞株が神経突起に沿った増殖・進展を行う際、足場となる神経細胞の種類に特徴があるか検討を行った。癌細胞と神経細胞の共培養を免疫染色したところ、癌細胞が神経突起と直接相互

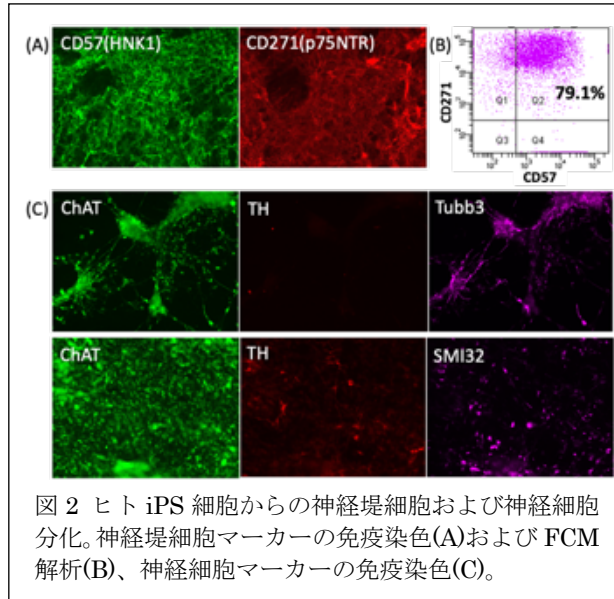


図 2 ヒト iPS 細胞からの神経堤細胞および神経細胞分化。神経堤細胞マーカーの免疫染色(A)および FCM 解析(B)、神経細胞マーカーの免疫染色(C)。

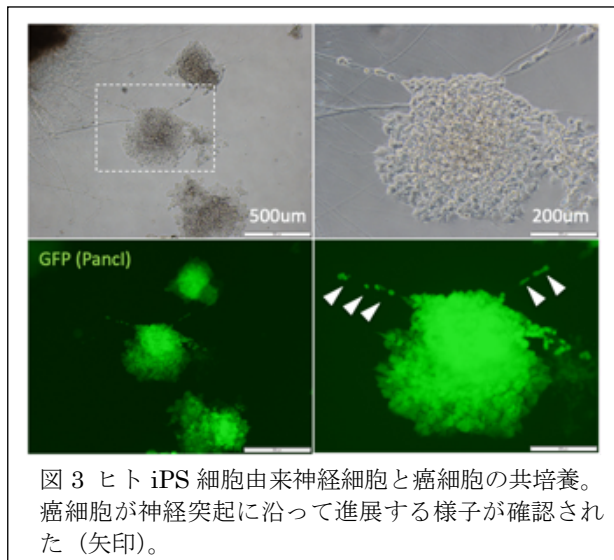


図 3 ヒト iPS 細胞由来神経細胞と癌細胞の共培養。癌細胞が神経突起に沿って進展する様子が確認された (矢印)。

作用している領域では、Choline acetyltransferase (ChAT) 陽性のコリン作動性神経細胞が多く、Tyrosine hydroxylase (TH) 陽性のアドレナリン作動性神経細胞はほとんど見られなかった。また、Doublecortin (DCX) 陽性の神経細胞が多く見られ、主に比較的未成熟なコリン作動性神経細胞が癌細胞進展の足場となっている可能性が示唆された (図 4)。ただし、成体の膝臓内に未熟な神経細胞の存在しないと考えられるため、癌細胞の影響による脱分化が起こる可能性も考えられるが、*in vitro* 実験系における artifact の可能性も否定できない。

本研究では、ヒト iPS 細胞由来神経細胞と癌細胞の共培養系を用いて、これらの相互作用における重要因子の探索を行った。両細胞種が直接接触する以前の過程においては、神経突起の伸長方向や癌細胞の伸展方向に、相互作用は認められなかった。また、癌細胞が進展時の足場とし得る神経細胞種については一定の知見は得られたが、詳細な重要因子の同定にはさらなる研究を要する。

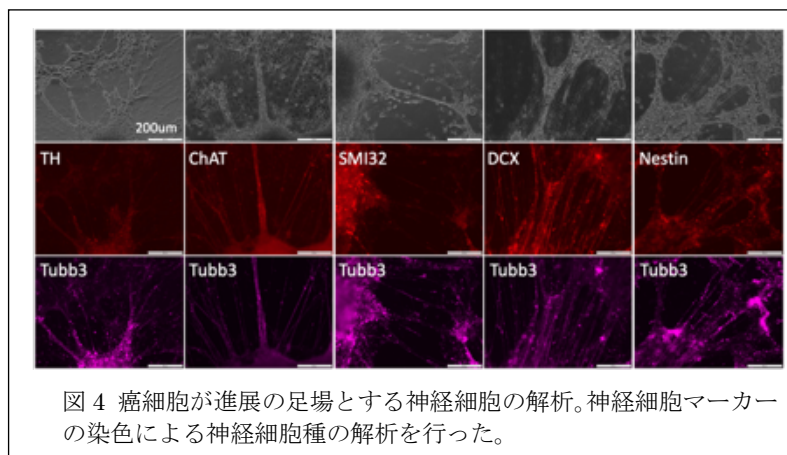


図 4 癌細胞が進展の足場とする神経細胞の解析。神経細胞マーカーの染色による神経細胞種の解析を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sekine K, Tsuzuki S, Yasui R, Kobayashi T, Ikeda K, Hamada Y, Kanai E, Camp JG, Treutlein B, Ueno Y, Okamoto S, Taniguchi H	4. 巻 -
2. 論文標題 Robust detection of undifferentiated iPSC among differentiated cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	谷口 英樹 (Taniguchi Hideki) (70292555)	横浜市立大学・医学研究科・教授 (22701)	
研究分担者	上野 康晴 (Ueno Yasuharu) (60375235)	横浜市立大学・医学研究科・客員研究員 (22701)	