

平成22年 4月 8日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590409
 研究課題名 (和文) 交感神経系神経堤幹細胞及び神経芽腫 cancer stem cells の分離・同定
 研究課題名 (英文) Identification and purification of sympathetic nerve neural crest stem cells and neuroblastoma cancer stem cells
 研究代表者
 黒川 景 (KUROKAWA KEI)
 愛知医科大学・医学部・講師
 研究者番号：90399030

研究成果の概要：

ラット新生児副腎髄質より神経堤幹細胞の分離を試み、p75 陽性分画に神経細胞とシュワン細胞の両方向性分化能を示すコロニー形成を確認した。p75 発現を認める神経芽腫細胞株で、p75 陽性分画が分化階層の上位にあることを細胞培養レベルで確認した。神経芽腫細胞株を用いたスクリーニングで、神経芽腫 cancer stem cell や交感神経系神経堤幹細胞の細胞表面マーカー候補となりうる分子についてのデータを得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は神経堤由来の交感神経系（副腎髄質または交感神経節）から生じる小児悪性固形腫瘍であり、小児癌全体の約14%を占め、白血病に次いで頻度が高い。神経芽腫の起源となる副腎髄質と交感神経節は、未分化な神経堤幹細胞から分化する。副腎髄質と交感神経節は、交感神経細胞とシュワン細胞の2種類で構成されていることから、将来、副腎髄質と交感神経節を構成することを運命づけられている未分化な交感神経系神経堤細胞

は、神経細胞とシュワン細胞に分化する能力を持つと考えられる。同様に、神経芽腫の腫瘍細胞も神経細胞への分化とシュワン細胞への分化の両方向、つまり bipotential な分化能を有すると考えられている。今日、白血病をはじめとして、乳癌、大腸癌、膠芽腫等の固形癌についても、正常組織と類似の幹細胞あるいは前駆細胞を起点とする階層性が存在することが示され、癌幹細胞(cancer stem cell)、あるいは癌開始細胞(stem-like cancer initiating cell) の同定、解析が進んでいる。神経芽腫についても、作業仮説として

は bipotential な分化能を有する未分化な神経堤細胞と類似の階層性をもつ腫瘍であることが考えられる。しかし、まだ十分な解明には至っていない。また、現在までに交感神経系幹細胞の分離は報告されておらず、その方法論から開発しなければならない。

我々は、本科学研究費を取得する前の予備実験として、既に報告されている腸管や坐骨神経の神経堤由来幹細胞を分離する方法をもとに (Bixby S et al. *Neuron*. 35: 643–656, 2002)、生後半日のラット新生児から副腎髄質交感神経系神経堤幹細胞の分離を試みた。副腎の single cell suspension を、NGF receptor の subunit である p75 蛋白の細胞外ドメインに対する抗体である抗 p75 抗体と反応させた後、FITC を conjugate した二次抗体と反応させた。セルソーター (FACS vantage) を使って、p75 が強く発現する分画 (p75 high population) を分離し、self-renewal media (Chicken embryo extract、Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)、Basic fibroblast growth factor (bFGF) が豊富な培養液) 中で 7 日間培養し、その後 differentiation media (Chicken embryo extract、Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)、Basic fibroblast growth factor (bFGF) が少ない培養液) の中で 5 日間培養した。コロニーを末梢神経細胞に特異的なマーカーである peripherin とシュワン細胞に特異的なマーカーである GFAP (glial fibrillary acidic protein) に対する抗体で免疫染色を施行したところ、神経細胞とシュワン細胞がコロニーの中で共存していた。以上の結果から、副腎由来の p75 high population に少数ながら、神経堤幹細胞が存在することが証明された。しかし、plating efficiency (1 つのウェルに入れた p75 high 細胞の数のうち、生き残った細胞の割合) が非常に低く、3%程度であった。そして、神経細胞とシュワン細胞がコロニーの中で共存していたコロニー (交感神経系神経堤幹細胞由来のコロニー) はその 1/3 程度であり、全体として幹細胞の frequency は 1%程度であった。Plating efficiency を改善するため、さらに細胞の調整と培養方法、p75 以外の表面マーカーの併用について検討を要した。

2. 研究の目的

- (1) 交感神経系神経堤細胞幹細胞及び神経芽腫の癌幹細胞を prospective に分離同定するために、分化段階と相関性のある細胞表面マーカーを検索し、分化の階層性を明らかにする。
- (2) 幹細胞の維持には、組織の微小環境が大きく関与していることが知られている。交感

神経系神経堤幹細胞や神経芽腫 cancer stem cell についても、組織におけるニッチが存在するかどうか検討する。

(3) Cancer stem cell が存在する癌では、腫瘍は自己複製能を持つ cancer stem cell とその子孫の細胞で構成されること、一般に cancer stem cell は薬剤排泄能が高く抗癌剤耐性であることが示されていることから、cancer stem cell を根絶することが癌治療の究極的な目標であるという考えのもとに、治療の target として cancer stem cell が注目されている。(1)(2) で得られた神経芽腫の分化の階層性や cancer stem cell のニッチについての解析、知見をもとに、特に治療の困難な予後不良の進行期神経芽腫における治療への新たなアプローチを解明する。

3. 研究の方法

(1) セルソーターを用いた SK-N-SH 細胞株の p75 陽性細胞と陰性細胞の分取

文献的には、神経芽腫の細胞株では、予後不良と相関する N-myc 増幅を示すもの、N-myc 増幅のみられないものを含め、多くの細胞株において p75 の発現が観察されないが (Schulte JH et al. *Int. J. Cancer*. 124: 2488-2494, 2009)、我々は、神経芽腫細胞株のうち N-myc 増幅を示さない SK-N-SH において、一部の細胞に p75 陽性細胞が存在することを、FACS 及び蛍光抗体法で確認した。SK-N-SH は、文献的に N-type と記載される小型で神経突起様の突起を伸ばす細胞と、S-type と呼ばれる平たい細胞の双方の形態の混在が容易に観察される。すなわち SK-N-SH は、p75 陽性で形態的に bipotency を有し、交感神経系神経堤幹細胞を起点とした分化の階層性のある程度反映した神経芽腫細胞株である可能性が考えられた。

FACS で p75 の発現を検討すると、SK-N-SH の親株では陽性と陰性の 2 峰性のパターンが認められた。p75 陽性と陰性の分画をセルソーター (BD 社 FACS Vantage) で分取し、培養後それぞれの分画の p75 の発現の変化を経過観察した。

(2) SK-N-SH 細胞株の NOD-SCID マウスにおける腫瘍形成能の検討

本報告書作成時点では、(1) で分取した SK-N-SH 細胞株の p75 陽性分画と陰性分画の免疫不全マウスでの腫瘍形成能について検討中である。予備実験として、SK-N-SH の親株を 2 匹の NOD-SCID マウスの両側側腹部、計 4 か所に、1 か所当たり 2×10^6 ずつ皮下注した。6 週の間 1 匹ずつ計 2 か所に腫瘍形成が得られた。腫瘍を採取し、4%PFA 固定の後ゼラチン包埋し、凍結切片を作製し

て p75 の蛍光抗体法を実施し、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss 社 LMS710) で観察した。

(3) SK-N-SH のクローン株を用いた細胞表面マーカーのスクリーニング

「1. 研究開始当初の背景」で記したラット新生児副腎髄質交感神経系神経堤幹細胞の分離の系で、plating efficiency を上げるために、細胞の調整、培養方法と合わせて、p75 以外の表面マーカーの併用で幹細胞の purity を上昇させることを検討する必要があると考えられた。しかし、表面マーカーの検索には多量の細胞を必要とし、新生児副腎髄質細胞の系でのクリーニングは困難であった。p75 についてはヒトとラットとで共通性のあるマーカーの可能性が考えられたが、他の表面マーカーについてはヒトとラットとで異なることも考えられた。p75 陽性細胞分画が存在するヒト神経芽腫細胞株 SK-N-SH は、副腎髄質交感神経系の分化の階層性のモデルをある程度反映する細胞株である可能性が考えられたため、SK-N-SH を用いて表面マーカーの検索を行う方針とした。SK-N-SH を single cell clone 化したところ、得られた 26 クローンのうち 24 クローンが N-type、1 クローンが S-type、1 クローンが N-type 及び S-type 双方の形態の出現する細胞株 (以降 N/S-type と表記) であった。これらクローン細胞株と元の親株の SK-N-SH について、抗体の市販されている CD number を有する表面マーカー約 150 について real time PCR 法で発現を比較し、細胞株の表面マーカーの比較を行った。

4. 研究成果

(1) SK-N-SH における p75 の発現

SK-N-SH における p75 発現を FACS で検討した結果、p75 陽性と陰性の 2 峰性のパターンが認められ、陽性分画は全体の約 20~30% に相当した (図 1a)。SK-N-SH の培養細胞による p75 の蛍光抗体法でも、FACS の所見と合致して、一部の細胞の細胞膜に陽性所見を確認した (図 2a、b)。SK-N-SH の single cell clone のうち、N-type 及び S-type 双方の形態の出現する細胞株 (N/S-type) では、p75 の発現は親株の陽性細胞のピークより低い 1 峰性のパターンを示した (図 1b)。一方、N-type のクローンには、明らかな p75 陽性のピークは認められなかった (図 1c)。S-type のクローンは、大半は p75 陰性であるが、一部に若干の発現を示す population が見られた (図 1d)。

図 1 神経芽腫細胞株 SK-N-SH における p75 の発現

a. 親株、b. N/S type、c. N-type、
d. S-type

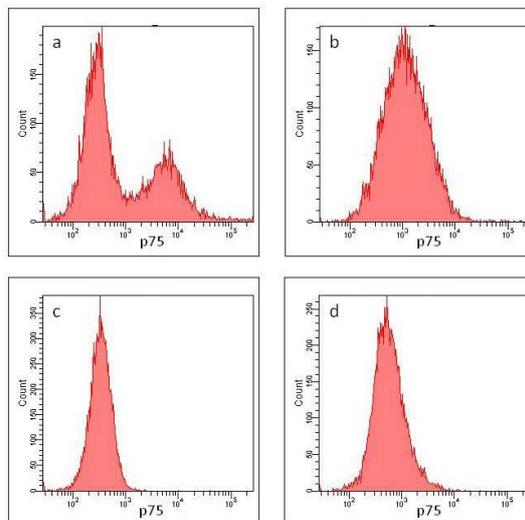
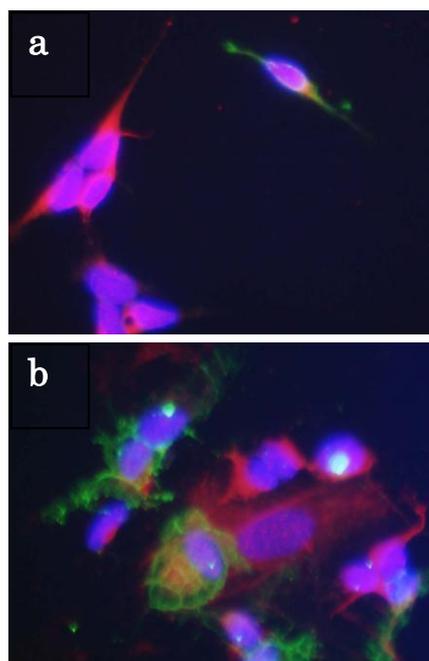


図 2 神経芽腫細胞株 SK-N-SH の蛍光抗体法

a. 緑 : p75、赤 : peripherin
b. 緑 : p75、赤 : GFAP



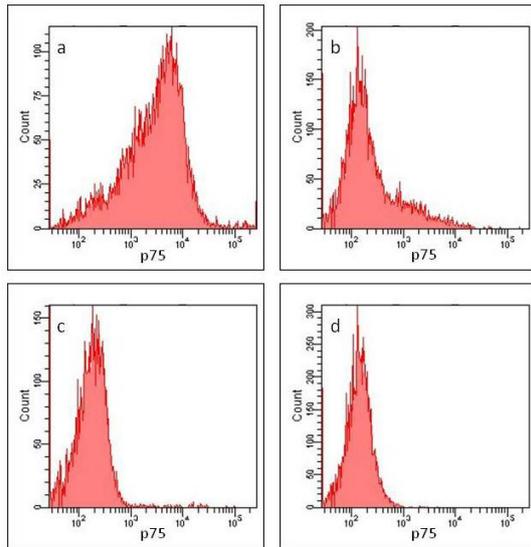
(2) セルソーターを用いた SK-N-SH の p75 陽性細胞と陰性細胞の分取と時間経過による p75 発現の変化

セルソーターを用いて SK-N-SH 親株の p75 陽性と陰性の分画を分取し、培養 2 週後、4 週後で、それぞれの分画の p75 の発現の経時変化を観察した (図 3)。p75 陽性の分画からは、p75 陽性細胞と陰性細胞が出現し、5 週後より 10 週後で p75 陰性細胞の割合が増加

するのに対し、p75 陰性の分画からは p75 陽性の分画は現れなかった。このことから、p75 陽性の分画が分化の階層として上位に位置することが示唆された。

図 3 SK-N-SH の p75 陽性分画と陰性分画の時間経過による p75 発現の変化

- p75 陽性分画 5 週間後
- p75 陽性分画 10 週間後
- p75 陰性分画 5 週間後
- p75 陰性分画 10 週間後

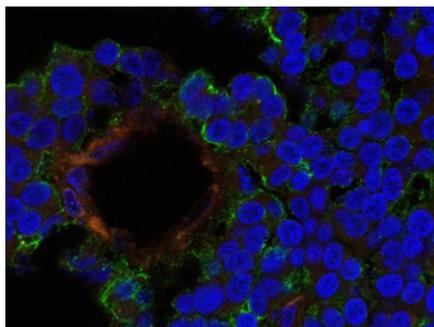


(3) SK-N-SH の NOD-SCID マウスにおける腫瘍形成と p75 の発現

SK-N-SH の親株を NOD-SCID マウスの側腹部に皮下注射された腫瘍を 4%PFA で固定し、ゼラチン包埋下に凍結し切片を作製、抗 p75 抗体による蛍光抗体法を実施し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。組織切片では、腫瘍細胞は高率に細胞膜に p75 陽性を示し(図 4)、p75 陽性細胞の腫瘍増生能が示唆された。

図 4 NOD-SCID マウスで増殖した SK-N-SH 細胞株の腫瘍組織切片における蛍光抗体法 (共焦点レーザー顕微鏡)

緑 : p75、赤 : mouse CD31



我々は、過去にラットの膠芽腫細胞株 C6 を KSN ノードマウスに皮下注射して得た腫瘍で、cancer stem cell と相関すると考えられている side population の分画の細胞が nestin 陽性であり、腫瘍中の血管周囲に集簇する傾向があることを見出しており、膠芽腫の cancer stem cell のニッチを示唆する 1 つの所見である可能性が考えられたが、NOD-SCID で形成された SK-N-SH の腫瘍では、p75 陽性細胞の割合が比較的高く、腫瘍内血管との関係については評価困難であった(図 4)。

(4) SK-N-SH のクローン株を用いた細胞表面マーカーのスクリーニング

SK-N-SH の親株 (P と表記)、N-type、S-type、N/S-type それぞれの single cell clone を用いて、抗体の市販されている CD number のついた表面マーカー約 150 について real time PCR 法で発現を比較し、細胞株の表面マーカーの比較を行った。その結果、細胞株によって発現に差のみられた分子は、細胞株ごとの発現の強さの順番から下記の 5 つのパターンに分類された。

- P, N/S, S > N
p75, CD133
- N/S, P > N > S
CD117
- S > P, N/S > N
CD9, CD10, CD44, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD54, CD73, CD77, CD95, CD137
- P, N/S, N > S
CD24, CD184
- S > P, N/S, N
CD68

①②のように、p75 陽性で bipotent な性質をもつ親株や N/S-type で発現の高い CD133 や CD117 は、副腎髄質交感神経系神経堤幹細胞や神経芽腫 cancer stem cell のマーカー候補となる可能性が考えられたため、SK-N-SH の親株で CD133 や CD117 の発現を FACS 及び蛍光抗体法で検討したが、p75 のような明らかな発現は認められなかった。

(5) 今後の検討課題

in vitro である細胞培養の系では、SK-N-SH の p75 陽性分画が p75 陰性分画に対して分化の階層として上位に位置することが示唆され、NOD-SCID マウスで形成させた SK-N-SH の腫瘍では、p75 をかなりの割合で発現していることから、p75 陽性細胞が神経芽腫細胞株 SK-N-SH において分化や腫瘍形成能の鍵となる分子であることが示

唆される。p75 陽性分画と陰性分画について、NOD-SCID マウスにおける腫瘍形成能を比較検討する必要があり、本報告書作成時において検討中である。

副腎髄質交感神経系の細胞では、p75 陽性による分画の分取のみでは plating efficiency が低く、細胞の調整、培養方法、p75 以外の表面マーカーの併用について検討しなければならない。SK-N-SH の細胞株を用いた real time PCR 法によるスクリーニングによって拾い上げられた細胞表面マーカーは、大部分は分化マーカーの候補と考えられ、交感神経神経幹細胞や神経芽腫 cancer stem cell の分離、同定に関しては negative marker となる分子を多く含むと考えられるが、今後 FACS や蛍光抗体法を用いて有効なマーカーを絞り込むためのものとなるデータが得られたものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Kurotsuchi A, Murakumo Y, Jijiwa M, Kurokawa K, Itoh Y, Kodama Y, Kato T, Enomoto A, Asai N, Terasaki H, Takahashi M. Analysis of DOK-6 function in downstream signaling of RET in human neuroblastoma cells. *Cancer Sci.* in press. 査読有
- ② Kurokawa K, Mouri Y, Asano A, Kamei K, Iwata Y, Isogai M, Saga S, Ichihara S. Pleomorphic carcinoma of the breast with osteoclastic giant cells. *Pathol Int.* 2009; 59: 91-97. 査読有
- ③ He S, Iwashita T, Buchstaller J, Molofsky AV, Thomas D, Morrison SJ. Bmi-1 over-expression in neural stem/progenitor cells increases proliferation and neurogenesis in culture but has little effect on these functions in vivo. *Dev Biol.* 2009; 328: 257-272. 査読有
- ④ Kanazawa T, Kommareddi PK, Iwashita T, Kumar B, Misawa K, Misawa Y, Jang I, Nair TS, Iino Y, Carey TE. Galanin receptor subtype 2 suppresses cell proliferation and induces apoptosis in p53 mutant head and neck cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2009; 15: 2222-2230. 査読有
- ⑤ Qiao S, Iwashita T, Ichihara M, Murakumo Y, Yamaguchi A, Isogai M, Sakata K and Takahashi M. Increased

expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin in a case of colon adenocarcinoma associated with diffuse ganglioneuromatosis. *Clin Neuropathol.* 2009; 28:105-112. 査読有

- ⑥ Kanazawa T, Iwashita T, Kommareddi P, Nair T, Misawa K, Misawa Y, Ueda Y, Tono T, and Carey TE. Galanin and Galanin Receptor Type 1 Suppress Proliferation in Squamous Carcinoma Cells: Activation of the Extracellular Signal Regulated Kinase Pathway and Induction of Cyclin-dependent Kinase Inhibitors. *Oncogene.* 2007, 26: 5762-5771. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 黒川景、喬善楼、佐賀信介、岩下寿秀、ラットグリオーマ組織内における SP (side-population) 細胞の局在、第 97 回日本病理学会総会、2008 年 5 月 17 日、金沢
- ② 黒川景、喬善楼、川井久美、佐賀信介、岩下寿秀、Rat グリオーマ組織内に存在する bipotent な分化能を有する細胞の同定、第 98 回日本病理学会総会、2009 年 5 月 1 日、京都
- ③ オリゴデンドロサイトの発生制御における BAX/BAK の役割の解析、川井久美、伊藤高行、黒川景、岩下寿秀、佐賀信介、第 98 回日本病理学会総会、2009 年 5 月 1 日、京都

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒川 景 (KUROKAWA KEI)
愛知医科大学・医学部・講師
研究者番号：90399030

(2) 研究分担者

岩下 寿秀 (IWASHITA TOSHIHIDE)
愛知医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00283432

(3) 連携研究者