

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：33941

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590434

研究課題名(和文) 交感神経系神経堤幹細胞及び神経芽腫幹細胞の分離同定と分化階層の解析

研究課題名(英文) Identification and analysis of the stem cells and its differentiation in sympathetic neural crest cells and neuroblastoma cells

研究代表者

黒川 景 (Kurokawa, Kei)

日本赤十字豊田看護大学・看護学部・教授

研究者番号：90399030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：神経芽腫細胞株では、神経突起様の形態を示すN-typeと、平たく広い細胞質を示すS-typeの形態が認められ、相互に形態変化を示す現象(transconversion)が知られる。細胞株SK-N-SHで表面マーカーを検討した結果、transconversionを反映する表面マーカーの相互変化が観察された。相互変化を示す細胞集団から、変化しない固定した分画が生じるが、この分画は増殖が速く、N-typeの形態を示し、相互変化する細胞集団よりもマーカー上、分化の下位に相当するものと考えられた。神経芽腫細胞株においては、生理的な神経堤細胞の分化にみられる明らかなピラミッド型の階層は見出されなかった。

研究成果の概要(英文)：In neuroblastoma cell lines, morphological transconversion between cells with neuronal process (N-type) and flat cells (S-type) are observed. Transconversion of cell surface markers correlating with morphological changes and differentiation of neuroblastoma cells were found. From several transconverting cell fractions, a cell population with a fixed combination of cell surface markers was derived. This population was morphologically N-type with rapid proliferation. It was suggested that this population forms a lower rank of differentiation than transconverting cell populations from the view point of cell surface markers. A definite hierarchy like developmental process of neural crest cell differentiation was not observed in neuroblastoma.

研究分野：実験病理学

キーワード：神経芽細胞腫 表面マーカー 幹細胞

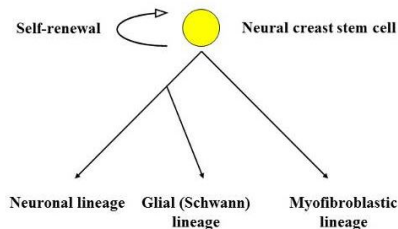
1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は神経堤由来の交感神経系から発生する悪性腫瘍で、小児固形腫瘍の中では最も頻度が高い。近年、白血病のみならず様々な固形腫瘍で腫瘍幹細胞を起点とする分化階層性が示され、造腫瘍能や治療ターゲットとしての重要性が注目されている。神経芽腫の幹細胞についても報告がみられるが、その細胞学的特徴を分化マーカーに基づいて厳密に規定するに至っているとは言い難い。また、神経芽腫の発生母地と考えられる副腎髄質交感神経系からの神経堤幹細胞の分離方法は、未だ確立されていない。

2. 研究の目的

神経堤に由来する細胞の生理的な発生においては、幹細胞からの分化は一方方向性で階層があると考えられている(図1)。

図1 神経堤幹細胞とその分化



神経芽腫においても、神経系、グリア系、myofibroblast 系への分化を示す細胞がみられ、幹細胞に相当する細胞の性質を明らかにすることが、造腫瘍能や治療ターゲットを明らかにする観点から重要と考えられる。神経芽腫細胞株では、神経突起様の形態を示す N-type、平たく広い細胞質を示す S-type、その中間の性質を持つ I-type の細胞が混在し、これらの形態が相互変化する transconversion という現象が古くから知られているが、この現象が神経芽腫細胞の分化階層の観点からどのように説明されるのかを明らかにすることが鍵になると考えた。そこで、以下の項目を研究目的とした。

神経堤幹細胞生物学の知見をもとに、神経芽腫細胞の分化の階層性を明らかにする。

神経芽腫幹細胞を、細胞表面マーカーを用いて prospective に分離同定する方法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 神経芽腫細胞株表面マーカーの検討

これまでの研究で、神経芽細胞種細胞株 SK-N-SH をクローン化し、クローン化する前の親株 (P と表記) N-type、S-type、両者の中間の性質を持つ N/S-type (I-type) の各クローンで、real time-PCR (RT-PCR) を用いて約 150 の CD number のついた表面マーカー発現のスクリーニングを行った。この結果をもとに、FACS および蛍光抗体法で表面マーカータンパクの発現を検討した。また、蛍光抗

体法を用いて、神経系細胞マーカー (neurofilament, peripherin)、グリア (シュワン) 系細胞マーカー (GFAP)、myofibroblast 系細胞マーカー (SMA) の発現と細胞表面マーカーとの相関を検討した。

(2) 神経芽腫細胞株表面マーカーの変化と階層の検討

(1) で得られた細胞表面マーカーの組み合わせによって、セルソーターで細胞分画を分取し 2 週間、4 週間培養した。各分画より分取した細胞が発現する表面マーカーを、FACS で検討した。

(3) SK-N-SH のクローン株、分画の増殖アッセイ

SK-N-SH 細胞の親株や、N-type、S-type のクローン、表面マーカーによる細胞分画ごとの増殖の差を、MTT アッセイ法で検討した。

4. 研究成果

(1) 神経芽腫細胞株表面マーカーの検討

SK-N-SH を用いた RT-PCR による検討では、親株及びクローン化した株によって発現に差のみられた分子は、発現の強さの順から下記の 5 つのパターンに分類された (2007 ~ 2008 年度基盤研究 C 研究成果報告書に報告済)。

P, N/S, S > N
p75 (CD271), 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

p75 を発現している神経芽細胞種細胞株は少なく、SK-N-SH でも細胞バンクに登録され市販されている細胞株を取り寄せ検討したところ p75 を発現していなかったが、愛知医科大学医学部病理学講座で維持されている SK-N-SH は、University of Southern California, Keck School of Medicine より分与されたもので、p75 を発現する分画がみられた。RT-PCR による mRNA レベルの発現では、上記、より、CD133、CD117 が神経芽細胞腫や副腎髄質交感神経系の神経堤幹細胞のマーカー候補となる可能性が考えられたが、FACS および蛍光抗体法による検討では、SK-N-SH に全く発現がみられなかった。上記マーカーのうち、FACS および蛍光抗体法で安定してタンパクの発現が確認できたのは CD24、CD44、CD90.2 であった。CD24 陽性細胞は、N-type の形態と対応した (図 2, 3a, 3c)。一方、CD44 や CD90.2 は大型の平たい細胞質を示す S-type の形態に対応した (図 2, 3e,

3g)。CD24、CD44 いずれにも陰性の細胞に、p75 陽性を示す細胞がみられた。p75 陽性細胞は、小型の多角形や(図2)紡錘形を示す細胞で、N-type と S-type ともいえない、両者の中間の性質を示し、I-type と記載されているものに相当すると考えられた(図2)。

図2 SK-N-SH 細胞の蛍光抗体法による表面マーカーの発現(共焦点レーザー顕微鏡)

緑:p75、赤:CD24、橙:CD44

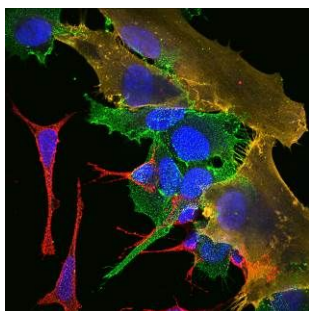
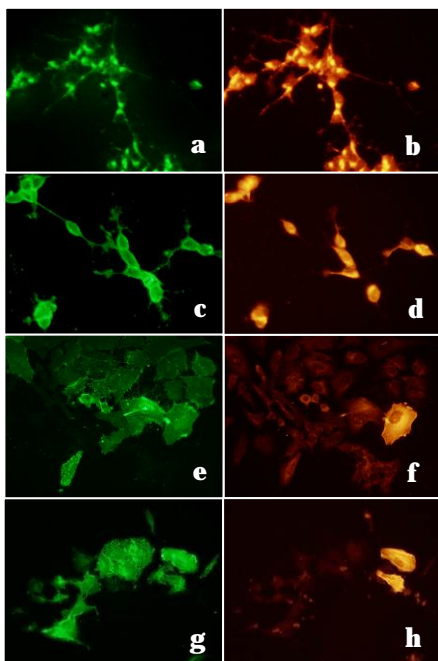


図3 SK-N-SH 細胞の表面マーカーと分化マーカーの発現

a, c: CD24; b: peripherin; d: GFAP;
e: CD44; f, h: SMA; g: CD90.2



神経芽腫の細胞には、neurofilament、peripherin 陽性といった神経系細胞の性質を示す細胞、GFAP に陽性を示すグリア(シュワン)系細胞、SMA に陽性を示す myofibroblast 系細胞の3系統への分化がみられる。CD24(+)/CD44(-)に対応する N-type は neurofilament、peripherin に陽性を示すとともに、GFAP にも陽性で、neuroglial な性質をもつものと評価される(図3a~d)。CD44 ないし CD90.2 に陽性を示す細胞のうち、一部は SMA 陽性の myofibroblast 系の分化を示すが、いずれの分化マーカーにも陽性所見を示さない細胞が多い(図3e~h)。p75 陽

性細胞も、peripherin、GFAP、SMA といった分化マーカーに陰性である(2007~2008年度基盤研究C研究成果報告書に報告済)。以上より、p75、CD24、CD44 の細胞表面マーカーの組み合わせと、神経芽細胞腫の分化とは相関するものと考えられた。

(2) 神経芽腫細胞株表面マーカーの変化と階層の検討

(1)での検討を踏まえて、SK-N-SH の細胞を、p75、CD24、CD44 の各表面マーカーの陽性、陰性で分画して培養し、2週間後及び4週間後の各分画のマーカーの変化を検討した(図4)。

p75(-)で CD24(+)/CD44(+)の細胞はみられず、p75(+)で CD44(+)の細胞は CD24 陽性陰性にかかわらずごく少数であったため、以下の6分画を分取した。

- A: p75(-)CD24(-)CD44(-)
- B: p75(-)CD24(+)/CD44(-)
- C: p75(-)CD24(-)CD44(+)
- D: p75(+)/CD24(-)CD44(-)
- E: p75(+)/CD24(+)/CD44(-)
- F: p75(+)/CD24(+/-)CD44(+)

このうち、B 以外の分画からは、各マーカーの陽性、陰性細胞が混在したが、B の分画のみ細胞表面マーカーに変化がみられなかった。B 以外の分画で、相互に表面マーカーの発現が変化する現象は、神経芽細胞腫の細胞にみられる transconversion を反映しているものと考えられる。一方、B の分画のみ変化しないことは、この分画が多様な細胞集団を生ずることのない、表面マーカー上の分化の最下層に位置することを示唆するものと考えられた。この分画の細胞形態は、神経系マーカーに陽性を示す N-type に相当する。SK-N-SH からクローン化された細胞株として知られる SK-N-SY5Y は、N-type に相当する形態を示し、transconversion がみられないが、検討の結果、p75(-)CD24(+)/CD44(-)で、B の分画に相当する細胞をクローン化した株であることが明らかになった。

(3) SK-N-SH のクローン株、分画の増殖アッセイ

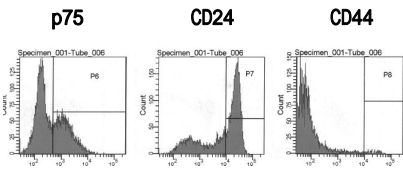
N-type のクローン細胞株の増殖は、親株や S-type のクローン細胞株と比べて速かった(図5)。また、p75 陰性細胞は p75 陽性細胞に比べて増殖が速く(図5)、CD24(+)/CD44(-)細胞の増殖は他の分画の細胞よりも速かった(図5)。p75(-)CD24(+)/CD44(-)の細胞分画は、他の分画に比べて増殖の速い分画である。

(4) 考察と課題

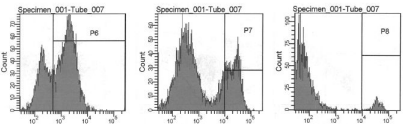
本研究から、神経芽細胞種における神経系、グリア系、myofibroblast 系への分化に対応する細胞表面マーカーの組み合わせが明らかとなった。神経堤の発生においてみられる、幹細胞を頂点とする生理的な分化階層(図1)

図 4 SK-N-SH の表面マーカーによる分画とその 4 週間後の変化

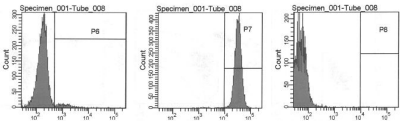
SK-N-SH 分画前



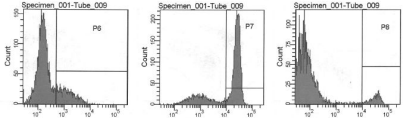
A: p75(-)CD24(-)CD44(-)



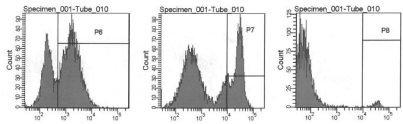
B: p75(-)CD24(+)CD44(-)



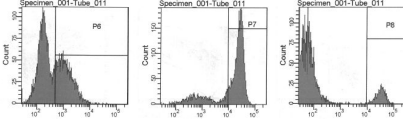
C: p75(-)CD24(-)CD44(+)



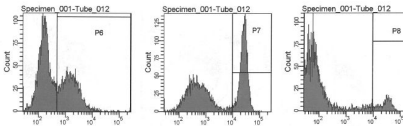
D: p75(+)-CD24(-)CD44(-)



E: p75(+)-CD24(+)-CD44(-)



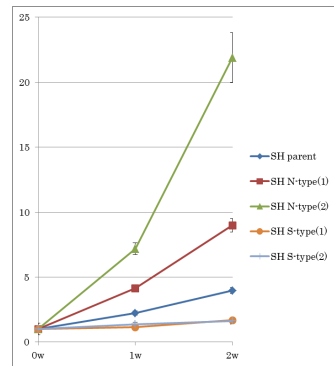
F: p75(+)-CD24(+/-)-CD44(+)



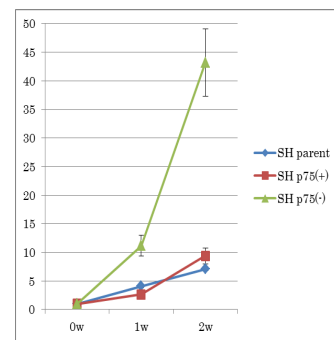
から、神経芽細胞腫においても神経系、グリア系、myofibroblast 系を含む多分化能を示す腫瘍幹細胞の存在を作業仮説とし、これを prospective に分取することを目的として表面マーカーの解析を進めた。p75 陽性や CD44 陽性細胞に分化の方向性ははっきりしない細胞が認められたものの、表面マーカー上、p75 陰性細胞からも陽性細胞が発生したり、CD44 陰性細胞からも陽性細胞が発生することから、p75 陽性や CD44 陽性細胞が神経芽腫の幹細胞的性質を有するものと結論付けることはできなかった。このことは、むしろ神経芽腫において古くから観察されている transconversion の現象をよく反映した所見

図 5 SK-N-SH のクローン株、分画の増殖アッセイ

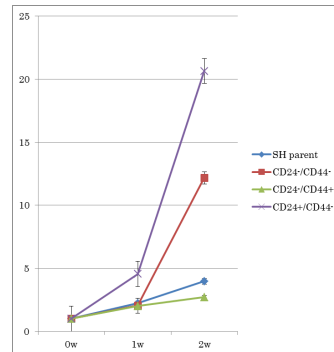
親株とクローン株の増殖アッセイ



p75 による分画の増殖アッセイ



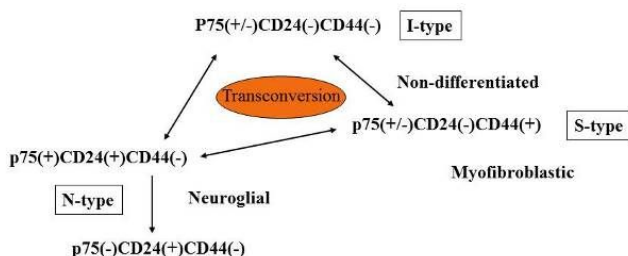
CD24、CD44 による分画の増殖アッセイ



と解釈できる。すなわち、神経芽腫においては分化の方向性が保たれず、p75 陰性となった細胞が再び陽性に戻り、neuroglial、myofibroblastic な各細胞系へ相互に分化する細胞集団が存在する。p75(-)CD24(+)-CD44(-)を示す neuroglial な細胞集団 (N-type) は、transconversion を示し多分化能を保った細胞集団から外れ、元の細胞集団に戻ることなく、分化の最下層を形成するものと考えられる (図 6)。

細胞増殖能の検討より、p75(-)CD24(+)-CD44(-)の細胞集団は、増殖能の強い腫瘍細胞の集団である。研究に使用した SK-N-SH は、当初かなり強い p75 の発現を示す細胞集団がみられたが、p75 陰性細胞の方が増殖能の強いことを反映してか、継代を続けるうちに p75 の発現が低下し、実験の再現性に苦慮す

図 6 本研究より想定される神経芽腫細胞の形態変化と表面マーカーと、分化マーカーとの関連



る状況となった。そこで細胞バンクや他の研究室から SK-N-SH の細胞株を取り寄せて検討したが、p75 の発現は全くみられなかった。おそらく、広く行きわたっている SK-N-SH 細胞株は、p75 の発現において、当初の性質から変化したものの可能性が考えられる。

本研究では、single cell clone から増殖させた細胞の表面マーカーや分化マーカーの検討には至らなかった。Low attachment 6well dish の 1 well あたり、神経芽腫細胞 SK-N-SH 500 個を、bFGF、EGF を添加した DMEM/F12 培養液からなる neural stem cell の培養条件下で培養すると、 10.7 ± 2.7 個 ($2.14 \pm 0.054\%$, $n=24$) の sphere 形成を認めたが、96well dish に FACS で single cell に分取した実験系では sphere 形成は得られなかった。p75、CD24、CD44 の各表面マーカーの陽性、陰性分画を single cell で分取する実験も、セルソーターでの細胞の損傷のためか、細胞の増殖が得られず解析に至らなかった。神経芽細胞種における transconversion のメカニズムと分化階層性を詳細に検討するためには、神経芽細胞種において single cell からの解析を可能とする細胞培養系、実験系の確立が必要であり、今後の課題と考える。ただ、多数の細胞を含む population でも、p75(-)CD24(+/-)CD44(-) の分画において細胞の性質が変わらず、分化の最下層に位置づけられると考えられること、また、この分画の細胞増殖が速いことは、神経芽細胞腫の治療戦略につながる biological behavior を考える上で示唆に富む所見と考えられる。

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 5 件)

1. Ishiguro F, Murakami H, Mizuno T, Fujii M, Kondo Y, Usami N, Yokoi K, Osada H, Sekido Y. Activated Leukocyte Cell-Adhesion Molecule (ALCAM) Promotes Malignant Phenotypes of Malignant Mesothelioma. Journal of Thoracic Oncology. 7:890-899, 2012.

2. Akamatsu T, Arai Y, Kosugi I, Kawasaki H, Meguro S, Sakao M, Shibata K, Suda T, Chida K, Iwashita T. Direct isolation of myofibroblasts and fibroblasts from bleomycin-injured lungs reveals their functional similarities and differences. Fibrogenesis Tissue Repair.8:15, 2013.
3. Ishiguro F, Murakami H, Mizuno T, Fujii M, Kondo Y, Usami N, Taniguchi T, Yokoi K, Osada H, Sekido Y. Membranous expression of activated leukocyte cell adhesion molecule contributes to poor prognosis and malignant phenotypes of non-small-cell lung cancer. J Surg Res. 179:24-32, 2013
4. Kominami A, Fujino M, Murakami H, Ito M. β -catenin mutation in ovarian solid pseudopapillary neoplasm. Pathology int. 64:460-464, 2014.
5. 黒川 景. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた組織立体モデルの制作 3D プリンターの活用を含めた教育用画像の作製法. 日本赤十字豊田看護大学紀要, 10:97-107, 2015.

[学会発表](計 0 件)

[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)
日本赤十字豊田看護大学・看護学部・教授
研究者番号：9 0 3 9 9 0 3 0

(2)研究分担者

岩下 寿秀 (IWASHITA, Toshihide)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：0 0 2 8 3 4 3 2

村上 秀樹 (MURAKAMI, Hideki)
愛知医科大学・医学部・准教授
研究者番号：9 0 3 0 3 6 1 9

佐賀 信介 (Saga, Shinsuke)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号：4 0 1 4 4 1 4 1

(3)連携研究者

高橋 義行 (TAKAHASHI, Yoshiyuki)
名古屋大学・医学部・准教授
研究者番号：4 0 4 3 2 2 7 3