

ヒト膵癌細胞株における神経栄養因子の発現に関する実験的研究 膵癌神経浸潤の機序の解明をめざして

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9215

ヒト膵癌細胞株における神経栄養因子の発現に関する実験的研究

—膵癌神経浸潤の機序の解明をめざして—

金沢大学医学部医学科外科学第二講座 (主任: 宮崎逸夫教授)

月 岡 雄 治

膵癌の神経浸潤の機序を解明するために、膵癌において癌巣周囲で神経線維が増加していることに着目し、膵癌細胞が神経栄養因子を分泌し、末梢神経増生を促す作用を有するか否かを検討した。5種のヒト膵癌培養細胞 Panc-1, BxPC-3, AsPC-1, MIA PaCa-2, Capan-1 と神経細胞のモデルとしてラット褐色細胞腫から樹立された PC12 細胞を用いて以下の実験を行った。第1にヒト膵癌培養細胞と PC12 の混合培養を行い、第2にヒト膵癌培養細胞の培養上清において PC12 細胞を培養し、それぞれにおける PC12 細胞の突起伸長を調べた。第3に PC12 の突起伸長ならびに、ヒト末梢神経線維の増加をも惹起しうる代表的神経栄養因子である神経成長因子 (nerve growth factor, NGF), ニューロトロフィン 3 (neurotrophin-3, NT-3), 塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor, b-FGF) に着目し、これら3種類の神経栄養因子 (neurotrophic factor) の膵癌細胞での発現を mRNA レベルで調べた。その結果 BxPC-3, AsPC-1, Capan-1 の3種類の細胞がコントロールに比して有意な神経突起伸長を認め、Panc-1, MIA PaCa-2 においても有意ではないが、突起伸長を認めた。また、ヒト膵癌細胞の培養上清の PC12 に対する影響でも、5種類すべての細胞培養上清によって有意に PC12 の突起伸長を認めた。次に神経栄養因子のヒト膵癌培養細胞での発現は、BxPC-3, AsPC-1, MIA PaCa-2, Capan-1 で NT-3 の発現を認め、Panc-1, AsPC-1, MIA PaCa-2 で b-FGF の発現を認めたが、NGF はいずれにおいても発現を認めなかった。以上の結果、ヒト膵癌細胞では NT-3 あるいは b-FGF を分泌して、PC12 の突起伸長に深く関わっていることが示唆された。

Key words pancreatic cancer, PC12, neurite outgrowth, neurotrophin-3, basic fibroblast growth factor

膵癌は、固形癌のなかでも特に予後不良な疾患の1つであるが、この臓器の持つ解剖学的特性と癌の生物学的特性、進展様式のために、十分な根治手術が妨げられていることも手術後の遠隔成績を悪くしている原因と考えられる¹⁾。神経浸潤は、膵癌に高率に認められ根治手術を妨げる重要な要因²⁻⁴⁾と考えられているが、その成立機序や進展様式に関する研究は少ない⁵⁻⁸⁾。金沢大学第2外科学教室では、これまでに膵癌の病理組織標本の観察から膵癌病巣周囲において神経線維が増加していることに着目し、このことが神経浸潤の成立機序や進展様式に大きく関与していると考え研究を行ってきたが、いまだその機序を解明するには至っていないのが現状である。

ところで、最近神経生理学領域の研究分野において神経栄養因子が末梢神経の神経突起の伸長をうながすことが報告されている^{9,10)}。そこで本研究では、膵癌細胞が神経栄養因子を発現し、実際に神経線維を増加させる作用を持つかどうかを調べる目的で、5種類のヒト膵癌培養細胞と神経細胞のモデルとして PC12 細胞 (ラット褐色細胞腫から樹立)¹¹⁾ を用いて混合培養を行い¹²⁾ 膵癌細胞の神経細胞への影響を調べた。また、近年報告されている接着分子等による細胞相互作用¹³⁻¹⁵⁾ を除外する目的

で膵癌細胞培養上清を PC12 培養培地中に添加して神経細胞への影響を調べ、末梢神経や PC12 細胞の突起伸長を促すと言われている神経成長因子 (nerve growth factor, NGF), ニューロトロフィン 3 (neurotrophin-3, NT-3), 塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor, b-FGF) の3種の神経栄養因子^{9,10,16,17)} のヒト膵癌細胞での発現について検討した。

材料および方法

1. 細胞

1. ヒト膵癌培養細胞

今回の実験に使用したヒト膵癌培養細胞は、Capan-1 (高分化腺癌), AsPC-1 (中分化腺癌), Panc-1 (低分化腺癌), BxPC 3 (高-中分化腺癌) (American Type Culture Collection, Rockville, USA より購入して使用) と MIA PaCa-2 (未分化癌) (国立衛生試験所細胞バンクより供与) の5種類を使用した。細胞の培養には、10%牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS) (GIBCO, Grand Island, USA) と 0.3mg/ml グルタミン (日水製薬, 東京) を含む RPMI-1640 培地 (日水製薬) を用い、5% CO₂ 濃度、37℃ の条件下で培養した。

平成8年3月5日受付, 平成8年3月28日受理

Abbreviations: b-FGF, basic fibroblast growth factor; DCC, deleted in colon carcinoma; EGFR, epidermal growth factor receptor; FCS, fetal calf serum; NCAM, neural cell adhesion molecular; NGF, nerve growth factor; NT-3, neurotrophin-3; PBS, phosphate-buffered saline; RT-PCR, reverse transcription-PCR; SW-EIA, sandwich-enzyme immunoassay; TGF- α , transforming growth factor- α

2. PC12 細胞

神経細胞のモデルとして、ラット褐色細胞腫から樹立された細胞株である PC12 細胞を使用した。細胞の培養には、5%FCS と 10%馬血清 (horse serum) (GIBCO) と 0.3mg/ml グルタミンを含む RPMI-1640 培地を用い、5% CO₂ 濃度、37℃ の条件下で培養した。

II. 混合培養

Lab Tech チャンバー (Nunc, Naperville, USA) に各種肝癌培養細胞を 5×10^4 /ml の濃度で播種し、37℃、48時間培養後、0.15M リン酸緩衝生理食塩液 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH7.2) を用いて 3 回洗浄し、各チャンバー内に、5%FCS、10%馬血清を含む RPMI-1640 培地で 5×10^5 /ml の濃度に調節した PC12 細胞を播種し、37℃、48時間混合培養を行った。

48時間の混合培養後、PC12 細胞を各種肝癌培養細胞と区別する目的で、マウス抗ラット Thy-1 モノクローナル抗体 (GIBCO) を用いて蛍光抗体染色を行った¹²⁾。すなわち、混合培養後のチャンバーを PBS にて 3 回洗浄後、15分間冷アセトン固定し、PBS にて 2 回洗浄後、100倍希釈のマウス抗ラット Thy-1 モノクローナル抗体を一次抗体として 37℃、60分間反応させ、PBS にて 3 回洗浄後、2 次抗体として蛍光標識ウサギ抗マウスポリクローナル抗体を 37℃、60分間反応させてからパラフェニレンジアミン加グリセロール液でカバーして蛍光顕微鏡オリンパス U-ND25 (オリンパス、東京) にて観察した。

各種肝癌細胞に対する PC12 細胞の突起伸長の定量化のために、各々無作為に 100 個の細胞を抽出して最大長径を計測して、その平均値を算出し、コントロール群の最大長径の平均値と比較した。

III. 肝癌培養細胞上清による PC12 細胞培養

各種肝癌培養細胞を 1×10^5 /ml の濃度で 10%FCS を含む RPMI-1640 培地で、37℃、5% CO₂、72時間培養後、ほぼコンフルエントになった状態で、PBS で 3 回洗浄後、10% FCS、5%馬血清を含む RPMI-1640 培地で 37℃、5% CO₂、24時間培養。その培養上清を 1000rpm、10分間遠心して、沈査を取り除いた溶液を PC12 細胞を培養する各種肝癌培養細胞上清として用いた。

PC12 細胞は、0.02% EDTA 加 PBS にて細胞を剥離後、PBS にて 2 回洗浄し、各種肝癌培養細胞上清で 1×10^4 /ml に希釈してコラーゲンコートした細胞培養シャーレ (住友ベークライト、東京) にて 37℃、5% CO₂、48時間培養後、突起伸長を計測した。

IV. RNA の分離

各種肝癌培養細胞を 150cm² の細胞培養用フラスコの中で培養し、コンフルエントになった時点で細胞に応じて 0.1~0.25% トリプシン-0.2%EDTA を含む PBS を用いて細胞を剥離し、PBS にて 3 回洗浄後、ホットフェノールグアニジウムチオシアネート法にて全 RNA を分離した¹³⁾。

V. 定量的逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 法

1. プライマーおよびプローブ

NGF, NT-3, b-FGF, β -アクチンに対する mRNA 検出用プライマーおよびプローブとして以下のオリゴデオキシリボヌクレオチドを設計して日本バイオサービス株式会社 (新座、日本) より購入して使用した。NGF: センスプライマー 5'-GTTCTA-

CACTCTGATCACAGCT-3', アンチセンスプライマー 5'-GATGATGACCGCTTGCTCCTGTGA-3', プローブ 5'-GTCCTGCAGGGACATTGCTCTCTGA-3', NT-3: センス 5'-CCAGAAGACTCGCTCAATTCC-3', アンチセンス 5'-GACAGGAGAGTTGCCCGTTT-3', プローブ 5'-GGTGC-TCTGGTAATTTTCCTTAACGTCCACCATCTGCTTGA-3', b-FGF: センスプライマー 5'-CGGCTGTACTGCAAGAACCGG-3', アンチセンスプライマー 5'-GCTCTTAGCAGACATTGGAAG-3', プローブ 5'-CTTTCATAGCAAGGTAACGGTTTGCA-3', β -アクチン: センスプライマー 5'-GAAAACTGGCA CCACACCTT-3' アンチセンスプライマー 5'-GTTGAAGGTAGTTTCGTGGAT-3' プローブ 5'-GATCTTCATGAGGTAGTCAGT-3'.

2. RT-PCR 法

1 μ g 全 RNA を 65℃、15分間変性後、1本鎖 cDNA 合成キット (CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, USA) を用いて、逆転写反応にて cDNA を合成した¹⁴⁾。すなわち、200ユニットのモロネー白血病ウイルス逆転写酵素と 0.5mM のデオキシリボヌクレオチド (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 混合液、オリゴ dT プライマー、1単位 RNase 阻害因子、50mM Tris-HCl (pH8.3)、75mM KCl、3mM MgCl₂ を 37℃、90分間反応させた。

次に上記に述べた、各 mRNA に特異的なプライマーと Taq DNA ポリメラーゼ (宝酒造、京都) を用いて DNA サーマルサイクラー (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA) にて DNA を増幅した。

なお、PCR 反応は、熱変性を 94℃、30秒間、アニーリングを 60℃、1分間、DNA の伸長を 72℃、2分間とし、これを 1 サイクルとして β -アクチンは、18サイクル、他は、25サイクルにて行った。

3. サザンブロット法による PCR 産物の定量

PCR 産物を、1.5%アガロースゲルにて電気泳動し、0.2 N NaOH 溶液にて変性後、中和してからナイロンメンブレンフィルター (Pall BioSupport, East Hills, USA) に転写した。転写したナイロンメンブレンフィルターに紫外線を照射して DNA をフィルターに固定した。フィルターは 6 時間ブレイブリダイゼーションを行った後、3'末端を [α -³²P] dCTP にて標識した特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドプローブにてハイブリダイゼーションを行った²⁰⁾。ハイブリダイゼーション後、2 $\times$ SSC、0.1% SDS の条件で室温で 30分間洗浄後、2 $\times$ SSC、0.1% SDS の条件で 20分間洗浄した。Kodak XAR film にオートラジオグラフィーを行った後にフジイメージアナライザー BAS 2000 (富士フイルム、東京) を使用して放射活性を測定した。

VI. 培養上清中 b-FGF 濃度の測定

Watanabe ら²¹⁾の方法に従って挟撃的酵素抗体法 (sandwich-enzyme immunoassay, SW-EIA) 法にて肝癌細胞培養上清中の b-FGF 濃度の測定を行った。

VII. 統計学的検討

成績は平均土標準偏差で表し、統計学的検討は正規分布検定を用いて、危険率 5%未満の場合に有意差ありと判定した。

成 績

I. 混合培養における PC12 細胞の突起伸長

図 1 に肝癌培養細胞と PC12 細胞の混合培養における

PC12 細胞の形態の変化を示した。通常の PC12 細胞の形態は、A のコントロール群に示されるように直径 25–30 μm 程度の球形であるが、膵癌培養細胞との混合培養によって神経突起の伸長が起こっている。また、各種膵癌細胞による突起伸長作用の違いを検討する目的で PC12 細胞の最大長径の平均値の比較を行った (表 1)。BxPC-3, AsPC-1, Capan-1 の 3 群においてコントロール群に比して有意な突起伸長を示し、Panc-1, MIA PaCa-2 の 2 種類の細胞との混合培養では、有意差は認めなかったが、コントロールに比して突起の伸長がみられた。

II. 膵癌細胞培養上清による PC12 細胞の突起伸長

混合培養における接着分子等による細胞相互作用^{12)~14)}を除外する目的で膵癌培養上清による PC12 細胞の突起伸長を検討し

た (図 2, 表 2)。混合培養と同様に 5 種類の細胞培養上清に有意な突起伸長を示した。

III. 神経栄養因子のヒト膵癌細胞での発現

PC12 細胞の突起伸長の原因を調べるために、末梢神経や PC12 細胞の突起伸長を促すと言われている NGF, NT-3, b-FGF の 3 種の神経栄養因子の膵癌培養細胞での発現について検討した。なお NGF と NT-3 は、同じタンパク質のファミリーに属し、アミノ酸一次構造で、50%を越える高い相同性を持つことから¹⁵⁾、通常のノーザンブロット法では、両者を識別できない可能性が考えられたため、塩基配列の異なる部位より選択された特異的なプライマーをもちいて RT-PCR 法にて 3 種の mRNA の発現を検討した。

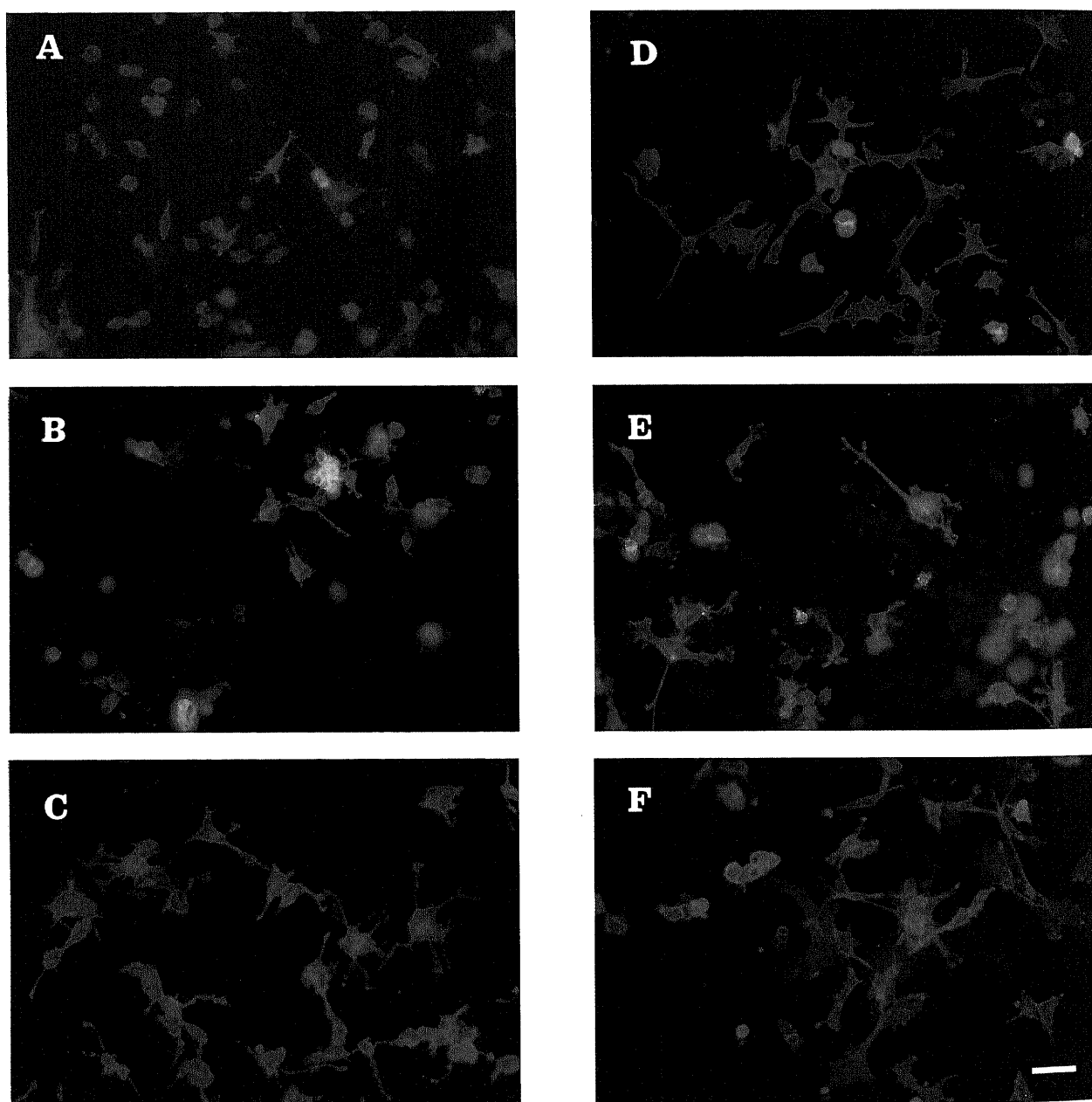


Fig. 1. Effects of the co-culture with human pancreatic cancer cell lines on neurite outgrowth of PC12 cells. Pancreatic cancer cells stimulated neurite outgrowth of PC12 cells (C, D and F). PC12 cells are stained with a mouse anti-rat Thy-1 monoclonal antibody. (A) Control. (B) Panc-1. (C) BxPC-3. (D) AsPC-1. (E) MIA PaCa-2. (F) Capan-1. Bar, 100 μm .

Table 1. Neurite length of PC12 cells in co-culture with human pancreatic cancer cell lines

Cell line of co-culture	Neurite length (μ m)/cell (PC12) ($\bar{X} \pm \text{SD}$, n=100)
—	44.22 $\pm$ 35.41
Panc-1	56.83 $\pm$ 20.28
BxPC-3	135.22 $\pm$ 47.76
AsPC-1	129.31 $\pm$ 65.04
MIA PaCa-2	52.40 $\pm$ 17.76
Capan-1	93.68 $\pm$ 47.78

* p<0.01

Table 2. Neurite length of PC12 cells cultured in supernatant of medium of pancreatic cancer cell lines

Added medium of cell line	Neurite length (μ m)/cell (PC12) ($\bar{X} \pm \text{SD}$, n=100)
—	36.93 $\pm$ 5.99
Panc-1	68.31 $\pm$ 26.63 *
BxPC-3	109.26 $\pm$ 56.29 *
AsPC-1	125.67 $\pm$ 67.96 *
MIA PaCa-2	69.04 $\pm$ 38.08 *
Capan-1	133.06 $\pm$ 59.09 *

* p<0.01

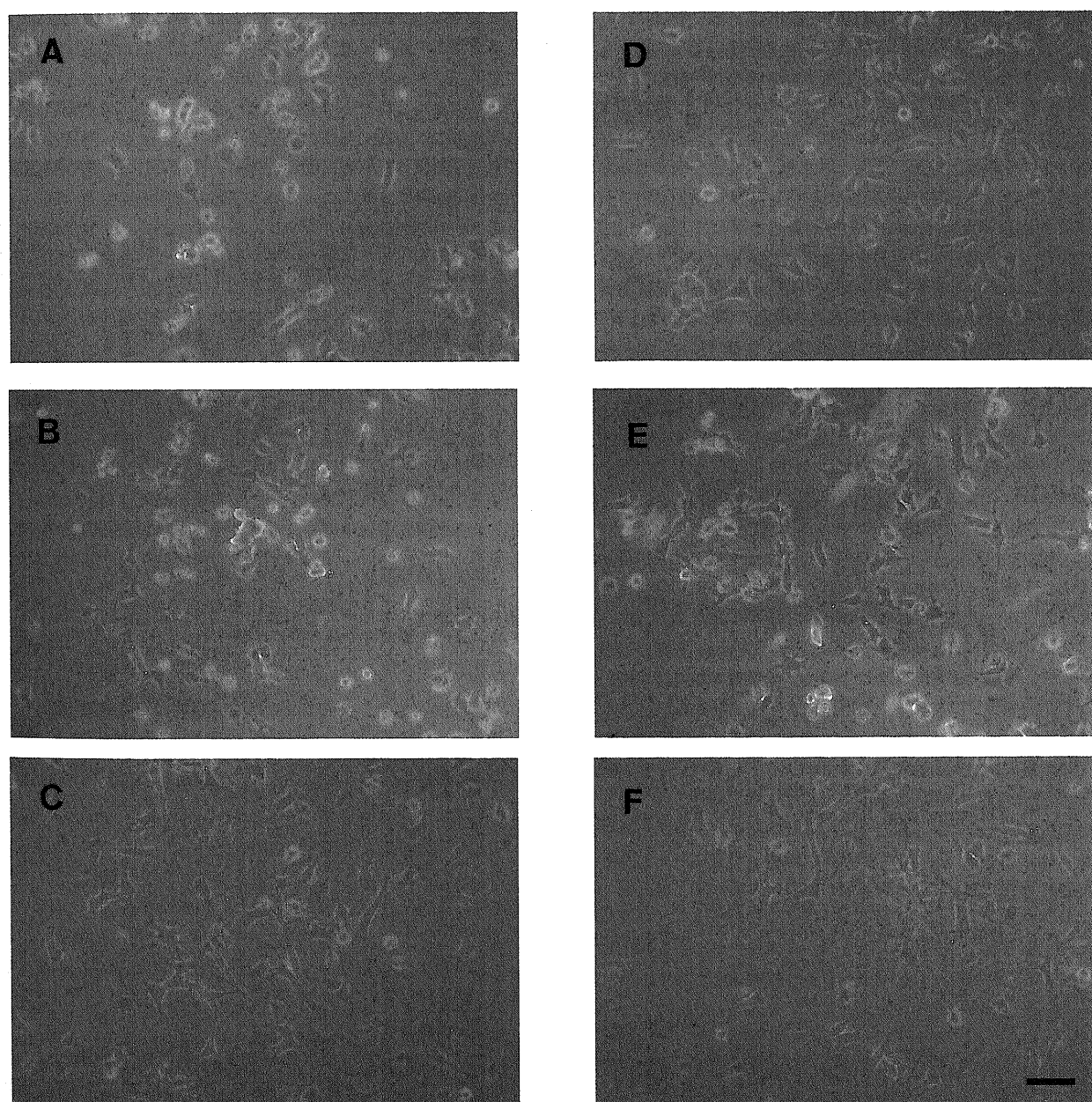


Fig.2. Neurite outgrowth of PC12 cells cultured in supernatant of medium of Pancreatic cancer cell lines. Supernatant of culture medium stimulated neurite outgrowth of PC12 cells (B, C, D, E and F). (A) Control. (B) Panc-1. (C) BxPC-3. (D) AsPC-1. (E) MIA PaCa-2. (F) CaPan-1. Bar, 100 μ m.

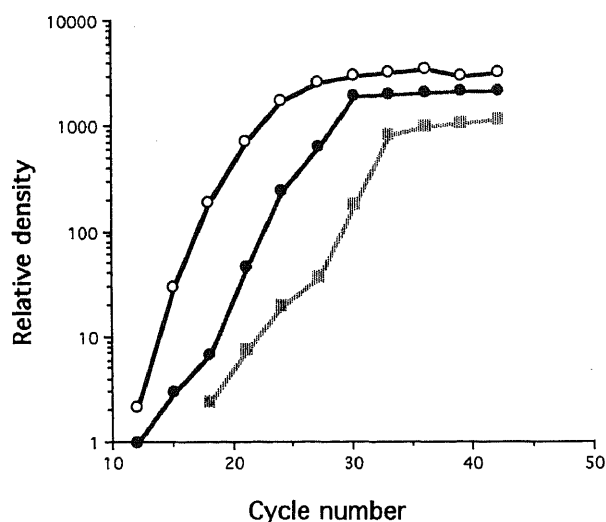


Fig. 3. Determination of the exponential phase of amplification in PCR reaction. The expression levels of these genes was examined with 25 cycles for NT-3 and b-FGF, and 18 cycles for β -actin. ○, β -actin; ●, NT-3; ■, b-FGF.

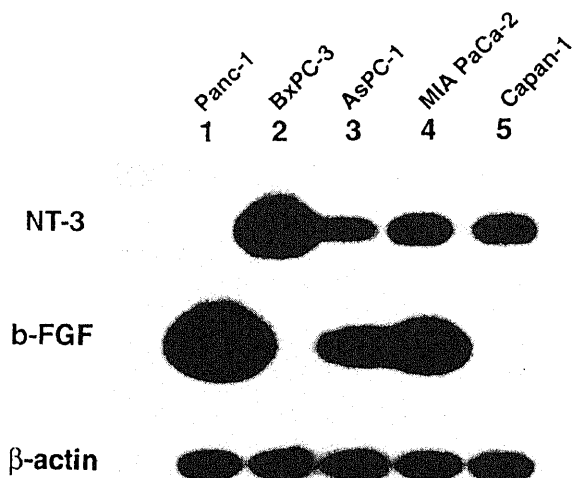


Fig. 4. Southern blot analysis of PCR-amplified products of mRNA in human Pancreatic cancer cell lines with the specific probes for NT-3, b-FGF and β -actin. NT-3 was expressed in lanes 2-5 and b-FGF was done in lanes 1, 3 and 4. Lanes 1, Panc-1; 2, BxPC-3; 3, AsPC-1; 4, MIA PaCa-2; 5, Capan-1. NT-3, 480 base pair fragment; b-FGF, 372 base pair fragment; β -actin, 592 base pair fragment.

定量的 RT-PCR 法にて mRNA 量を比較検討するために、図 3 に示した検量曲線からそれぞれの PCR サイクル数を指数増殖期にあたる NT-3 と b-FGF では 25 サイクル、 β -アクトチンでは 18 サイクルとした²²⁾。

図 4 に RT-PCR サザンブロット法による各種膵癌培養細胞における NT-3 と b-FGF の mRNA の発現を示した。NGF は、発現を認めなかった (ただし NGF のプライマーおよびプローブの有効性は NGF 産生脳腫瘍培養細胞を用いて確認済)。NT-3 は、BxPC-3, AsPC-1, MIA PaCa-2, Capan-1 の 4 種の細胞で発現が認められ、特に BxPC-3 において高い発現が認めら

Table 3. Relative density ratio of RT-PCR products between NT-3 and β -actin, b-FGF and β -actin in human pancreatic cancer cell lines

Cell line	NT-3/ β -actin [§]	b-FGF/ β -actin [§]
Panc-1	0	9.99 $\pm$ 1.24
BxPC-3	3.41 $\pm$ 0.66	0
AsPC-1	1.29 $\pm$ 0.16	1.16 $\pm$ 0.14
MIA PaCa-2	1.22 $\pm$ 0.14	3.09 $\pm$ 0.22
Capan-1	1.91 $\pm$ 0.37	0

[§] The results are expressed as $\bar{X} \pm SD$ of three independent RT-PCR determinations.

Table 4. Levels of b-FGF in supernatant of culture medium of human pancreatic cancer cell lines

Cell line	Levels of b-FGF (pg/ml) in supernatant ($\bar{X} \pm SD$, n=3)
Panc-1	35.563 $\pm$ 2.20
BxPC-3	0
AsPC-1	3.588 $\pm$ 0.61
MIA PaCa-2	7.118 $\pm$ 0.13
Capan-1	0

れた。また、b-FGF は、Panc-1, AsPC-1, MIA PaCa-2 の 3 種の細胞において高い発現が認められ、特に Panc-1 においてその発現が著明であった (表 3)。

Ⅳ. 膵癌培養液上清中の b-FGF 濃度の測定

Watanabe ら²¹⁾の方法による SW-EIA 法にて膵癌細胞上清中の b-FGF 濃度の測定を行った。表 4 に示すように Panc-1, AsPC-1, MIA PaCa-2 の 3 種において発現が認められ、特に Panc-1 において高く、上清中の b-FGF の濃度は、膵癌細胞の mRNA の発現量によく一致していた。

考 察

膵癌は固形腫瘍の中でも特に予後不良な疾患の 1 つであり、その原因としてこの臓器の持つ解剖学的特性による診断の遅れ、腹部主要血管の扇の要に位置することによる手術の煩雑さと根治手術の難しさ、肝転移、神経浸潤、後腹膜浸潤等に代表される、この癌の持つ生物学的特性、進展様式などがあげられる。

このような問題点を打破し、膵癌の治療成績の向上を目的として、教室では 1973 年以来徐々に郭清範囲を拡大し、1977 年に経外側の後腹膜到達法 (translateral retroperitoneal approach) による広範囲拡大郭清膵切除術を開発し²³⁾、徐々に治療成績が向上してきた。しかし、このような拡大郭清を施行しても神経浸潤が局所浸潤の先進部を形成し、剝離断端陽性となることが多いことより、当教室では、神経浸潤の重要性を強調し、現在、膵癌の基本術式を、上腸間膜動脈神経叢全周性郭清を伴う、膵外神経叢を含む後方組織の en bloc 切除とし^{24,25)}、次第に長期生存者が増加しつつある。

一方、1973 年に Fortner が拡大郭清膵切除術 (regional pancreatectomy) を提唱して以来、我が国においても拡大手術が導入され、全国の多数の施設で行われるようになったが、神経叢の完全郭清は重篤な下痢を惹起するため神経叢郭清を手控える施設も多く、最近では、クオリティオブライフの言葉の元

にこの流れが次第に大きくなってきている。しかし、上腸間膜動脈神経叢の温存手術は、本質的には、クオリティオブライフという言葉によって肺癌の生物学的特異性を、特に神経浸潤の臨床学的重要性を曖昧なものとした癌の特性に対応しない非合理的な手術といえよう。

この神経浸潤の臨床学的重要性を曖昧なものとしている要因の1つとして、肺癌神経浸潤の機序、進展様式、臨床病理学的重要性等についての研究が少なく、不明な点が多いことがあげられる。すなわち、癌がどこからどのようにして神経内に浸潤してくるのか、神経に浸潤した癌細胞がどのように進展するのか、なぜ肺癌において神経浸潤が高率に認められるのか、神経浸潤が癌にとって何らかのメリット、デメリットがあるのか等である。

癌がどのようにして神経内に浸潤するのかについては、鉤⁷⁾は、末梢神経の光学顕微鏡および電子顕微鏡の所見より、神経周膜の末端開放部および血管が神経の被膜を貫通する部は抵抗減弱部となっていることから、これらの部位から癌細胞が浸潤する可能性を指摘している。また、鈴木ら^{26,27)}は、胆管癌での実験であるが、コンピューターを使った神経、脈管の3次元再構成画像の検討より、脈管は神経の周囲に密な叢を形成しており、一部の枝は神経周囲に達しており、この部より癌細胞が浸潤するのであろうと述べている。このように癌の神経への浸潤経路として、現在のところ、解剖学的な検討より、脈管の神経被膜の貫通部から浸潤するとの意見が多いようであるが、臨床病理学的には、脈管浸潤と神経浸潤の間には、はっきりとした相関は見いだせないようである⁸⁾。次に、神経に浸潤した癌の進展様式としては、萱原⁹⁾の腓頭部癌切除例の連続切片による組織学的検索より神経周囲間隙 (perineural space) に入った癌細胞は、主に神経周囲間隙内を連続的に進展し、神経浸潤の先進部を形成するとの実験結果がある。そして、この進展機序として、従来より、神経周囲は、マトリックスが粗で、癌の進展に対して物理的抵抗が少ないことと、肺癌の神経親和性の2点について論じられてきたが、最近では、Bockman ら⁸⁾は、神経に豊富に存在するトランスフォーミング増殖因子 α (transforming growth factor- α , TGF- α) と肺癌に存在する上皮増殖因子レセプター (epidermal growth factor receptor, EGFR) のパラクライン作用により神経周囲での癌の増殖の可能性を論じており、また、剣持²⁸⁾は、肺癌細胞の神経接着分子である神経細胞接着分子 (neural cell adhesion molecular, NCAM) の発現より神経との親和性を論じており、やや親和性を主張する論文が多いようである。このように神経浸潤に関する研究は、徐々に進んできているようであるが、その機序の解明には程遠く、臨床的重要性の割に研究面では実像がつかめていない現状である。これまでに教室では、肺癌の病理組織標本の観察から肺癌病巣周囲において神経線維が増加していることに着目してきた。この事象が、肺癌細胞自体によって引き起こされているとすれば、神経浸潤の成立機序や進展様式に大きく関与していると考えられ、また、肺癌の神経浸潤のもつ癌自身における意義の解明にも有力な手がかりとなり、肺癌神経浸潤の研究に新たな局面を迎えることができると考えられる。そこで本研究では、肺癌細胞が、実際に神経増生を引き起こすことが可能かどうかを検討する目的で、5種類のヒト肺癌培養細胞と神経細胞のモデルとしてしばしば実験に用いられるラット褐色細胞種から樹立された PC12 細胞を用いて肺癌細胞の神経細胞への影響を調べ

た。

まず、最初に行った混合培養の実験では、BxPC-3, AsPC-1, Capan-1 の3種が PC12 の有意な神経突起伸長作用を有していた。また、残りの2種類も有意差はないが神経突起伸長作用を有していた。一方、培養上清における実験においては、5種類すべての細胞が有意な突起伸長作用を有していた。これらのうち、BxPC-3 は高-中分化腺癌、Capan-1 は高分化腺癌、AsPC-1 は中分化腺癌であるのに対し、Panc-1 は低分化腺癌であり MIA PaCa-2 は未分化癌である。肺癌培養細胞の培地中での増殖形態でも、BxPC-3 と Capan-1 の2種は、細胞集塊を形成しながら増殖しているのに対し、Panc-1 と MIA PaCa-2 は、1個1個の細胞がばらばらのまま増殖しているのが観察された。次に、接着分子等による肺癌細胞と神経細胞の細胞相互作用を除外する目的で、肺癌細胞培養上清による PC12 の突起伸長への影響を調べた。この実験では、混合培養実験と異なり、5種すべての細胞において、突起伸長を認めた。しかし、特に強く突起伸長を引き起こしたのは、混合培養実験で突起伸長を引き起こしたのと同じ BxPC-3, AsPC-1, Capan-1 の3種であった。今回は、この培養上清中に存在し、PC12 の突起伸長をさせる因子として、そして、実際に人体組織の中でも末梢神経の神経線維を増加させる可能性のある因子として NGF, NT-3, b-FGF の3種の神経栄養因子 (neurotrophic factor) の発現について検討を行った。その結果、今回の実験では、代表的な神経栄養因子である NGF の発現は、観察されなかったが、NT-3 と b-FGF の2種類の神経栄養因子の発現が確認された。その中でも NT-3 を発現している3種類の細胞に比して b-FGF を高発現している Panc-1 は、神経突起伸長作用が弱いことより、今回の実験からは、b-FGF よりも NT-3 の方が肺癌細胞においては、強い神経突起伸長作用を持つと考えられた。

今回、培養上清の b-FGF の濃度は、定量的 RT-PCR 法によって得られた mRNA の発現量とよく一致していた。本来ならば、NT-3 の上清中濃度も検討すべき項目であるが、NT-3 は、発見されてまだ日が浅く、研究データも少ないうえに、確立された実験系も少なく、今回濃度測定を試みるも残念ながら結果を得ることができなかった。このように肺癌では、神経栄養因子を発現し、PC12 細胞の突起伸長を、ヒト組織中においては、末梢神経の神経増生を促すことが示唆された。

さて、肺癌病巣における末梢神経増生と肺癌の神経浸潤とどのような関連があるのであろうか。先ず単純に、神経線維が癌周囲で増加すれば、それだけ物理的に神経周膜内に癌細胞が入りやすくなるであろう。また、Bockman らの電顕的研究²⁹⁾で、慢性肺炎では、機能的にバリアーを形成している神経周膜の構造がダメージを受け、疼痛の原因となりうるとの報告があるが、肺癌でも高い確率で周囲に慢性肺炎を有しており、神経が増えれば、それだけ、ダメージを受けた神経周膜内部への癌の侵入を許すことになりやすい。また、推測ではあるが、癌によって引き起こされる新生血管においては、血管構造が未熟で弱いため癌が侵入しやすいと言われているが、新たに新生された神経においても構造が未熟で癌の侵入を許しやすいと考えられる。我々の肺癌の電顕での観察でも、正常肺に存在する神経に比し、癌症例では、末梢神経の構造がやや異なるようであり、現在研究中である。また、前述したように、NCAM, TGF- α , EGFR 等の関与による肺癌の神経親和性が論じられており、最近、今回調べた神経栄養因子以外にも NT-4, NT-5 等

の神経栄養因子^{10,30)}が発見されており、これら新たな因子の研究により、末梢神経の増加と神経の親和性が証明されれば神経浸潤の機序の解明におおいに役立つと考えられる。

このように考えてくると、膵癌が、神経線維を増加させるニューロゲネシス (neurogenesis) という概念が確立すれば、今後の神経浸潤の機序の解明に大きな役割を果たすとともに、今後の膵癌に対する手術において、当教室で現在行っている上腸間膜動脈周囲神経叢の完全郭清の必要性が、改めて再認識されることであろう。

結 論

ヒト膵癌培養細胞の神経細胞 PC12 への影響について検討した。BxPC-3, AsPC-1, Capan-1 の 3 種類の細胞は、混合培養、培養上清のいずれにおいても PC12 の神経突起伸長を促した。Panc-1, MIA PaCa-2 の 2 種類の細胞は、培養上清によってのみ有意な PC12 の突起伸長を促した。これらの結果から、ヒト膵癌培養細胞は、神経細胞の突起伸長、臨床的には神経線維の増加を促す作用を有することが示唆された。また、神経栄養因子の検討より、ヒト膵癌細胞では b-FGF と NT-3 の発現を認め、特に NT-3 が神経細胞の突起伸長、神経線維の増加に強い影響を持つと考えられた。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師宮崎逸夫教授に深甚なる謝意を捧げます。また、始終御指導、御教示をいただいた金沢大学医学部保健学科永川宅和教授、ならびに御教示、御助言をいただいた金沢大学医学部第 1 解剖学教室井関尚一教授、沼田雅行助手、当教室太田哲生講師、萱原正都講師、および第 1 解剖学教室、本教室の諸兄、実験手法に関し御助言いただいた金沢大学第 2 生化学教室山本 博教授に深く感謝の意を表します。なお、本研究の一部は、第 32 回日本癌治療学会総会にて発表した。

文 献

- 1) 宮崎逸夫, 上野桂一, 永川宅和: 膵癌治療における日本の現状. 手術, 44, 1411-1417 (1990).
- 2) 永川宅和, 東野義信, 宮崎逸夫: 膵・胆道系癌の神経周囲浸潤について. 胆と膵, 5, 1031-1033 (1984).
- 3) 松田真佐男, 二村雄次: 膵頭部癌における神経周囲侵襲. 日外会誌, 84, 719-728 (1983).
- 4) 萱原正都, 永川宅和, 上野桂一, 太田哲生, 小林弘信, 角谷直孝, 森 和弘, 中野達夫, 宮崎逸夫: 膵頭部癌における神経浸潤とリンパ節転移. 日消外会誌, 24, 813-817 (1991).
- 5) 萱原正都: 膵癌進展様式の臨床病理学的ならびに実験的研究—とくに膵外神経叢内神経浸潤について—. 日消外会誌, 21, 1363-1372 (1988).
- 6) 萱原正都, 永川宅和, 宮崎逸夫: 膵癌における神経浸潤の成立機序と進展様式. 胆と膵, 12, 139-144 (1991).
- 7) 鈎スミ子: 神経束の脈管外通液路とリンパ管—膵癌の神経浸潤に注目して—. 胆と膵, 12, 121-127 (1991).
- 8) Bockman, D. E., Buchler, M. & Beger, H. G.: Interaction of pancreatic ductal carcinoma with nerves leads to nerve damage. Gastroenterology, 107, 219-230 (1994).
- 9) Garner, A. S. & Large, T. H.: Isoforms of the avian TrkC receptor: A novel kinase insertion dissociates transformation and process outgrowth from survival.

Neuron, 13, 457-472 (1994).

- 10) Korsching, S.: The neurotrophic factor concept: A reexamination. J. Neuroscience, 13, 2739-2748 (1993).
- 11) Green, L. A. & Tischler, A. S.: Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 73, 2424-2428 (1976).
- 12) Pierceall, W. E., Cho, K. R., Getzenberg, R. H., Reale, M. A., Hedrick, L., Vogelstein, B. & Fearon, E. R.: NIH3T3 cells expressing the deleted in colorectal cancer tumor suppressor gene product stimulate neurite outgrowth in rat PC12 pheochromocytoma cells. J. Cell Biol., 124, 1017-1027 (1994).
- 13) Simon, B., Weinel, R., Hohne, M., Watz, J., Schmidt, J., Kortner, G. & Arnold, R.: Frequent alterations of the tumor suppressor genes p53 and DCC in human pancreatic carcinoma. Gastroenterology, 106, 1645-1651 (1994).
- 14) Aoki, J., Umeda, M., Takio, K., Titani, K., Utsumi, H., Sasaki, M. & Inoue, K.: Neural cell adhesion molecule mediates contact-dependent inhibition of growth of near-diploid mouse fibroblast cell line m5S/1M. J. Cell Biol., 115, 1751-1761 (1991).
- 15) Schwaebler, W., Kerlin, M., Meyer, K. H. & Dippold, W.: De novo expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1, CD54) in pancreatic cancer. Int. J. Cancer, 53, 328-333 (1993).
- 16) Rosenthal, A., Goeddel, D. V., Nguyen, T., Lewis, M., Shih, A., Laramie, G. R., Nikolics, K. & Winslow, J. W.: Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. Neuron, 4, 767-773 (1990).
- 17) Maisonpierre, P. C., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N. Y., Furth, M. E., Lindsay, R. M. & Yancopoulos, G. D.: Neurotrophin-3: A neurotrophic factor related to NGF and BDNF. Science, 247, 1446-1451 (1990).
- 18) Wang, T. Y. & Cox, R. A.: Isolation of total nucleic acid. In S. P. Colowick & N. O. Kaplan, Method in Enzymology, 12B, p115-129, Academic Press, New York, 1968.
- 19) Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T.: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., p7. 30-7.79, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.
- 20) Numata, M., Ono, T. & Iseki, S.: Expression and localization of the mRNA for DNA (cytosin-5)-methyltransferase in mouse seminiferous tubules. J. Histochem. Cytochem., 42, 1271-1276 (1994).
- 21) Watanabe, H., Hori, A., Seno, M., Kozai, Y., Igarashi, K., Ichimori, Y. & Kondo, K.: A sensitive enzyme immunoassay for human basic fibroblast growth factor. Biochem. Biophys. Res. Commun., 175, 229-235 (1991).
- 22) Chelly, J., Kaplan, J., Mairee, P., Gautron, S. & Kahn, A.: Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissue. Nature, 333, 858-860 (1988).
- 23) 永川宅和, 倉知 圓, 小西孝司, 宮崎逸夫: 膵癌における

後腹膜郭清法 translateral retroperitoneal approach. 医学のあゆみ, 111, 339-341 (1979).

24) 永川宅和, 宮崎逸夫: 進行膵癌に対する拡大郭清膵十二指腸切除術. 胆と膵, 10, 151-158 (1989).

25) Nagakawa, T., Konishi, I., Ueno, K., Ohta, T., Akiyama, T., Kanno, M., Kayahara, M. & Miyazaki, I.: The results and problems of extensive radical surgery for carcinoma of the head of the pancreas. Jpn. J. Surg., 21, 262-267 (1991).

26) 鈴木正徳, 高橋 徹, 大内清昭, 松野正紀: 胆管癌における神経周囲浸潤—その成立機序と臨床病理学的意義について—. 癌の臨床, 34, 2080-2090 (1988).

27) 鈴木正徳, 高橋 徹, 大内清昭, 松野正紀: 胆道癌におけ

る神経浸潤の成立機序と targeting chemotherapy の臨床的意義. 胆と膵, 12, 157-164 (1991).

28) 剣持雅一: 膵癌の神経浸潤と神経特異抗原および神経接着分子 (NCAM) との関連. 日消外会誌, 23, 2580-2585 (1990).

29) Bockman, D. E., Buchler, M., Malfertheiner, P. & Beger, H. G.: Analysis of nerves in chronic pancreatitis. Gastroenterology, 94, 1459-1469 (1988).

30) Davies, A. M., Horton, A., Burton, L. E., Schmelzer, C., Vandlen, R. & Rosenthal, A.: Neurotrophin-4/5 is a mammalian-specific survival factor for distinct populations of sensory neurons. J. Neurosci., 13, 4961-4967 (1993).

Expression of Neurotrophic Factors in Human Pancreatic Cancer Cell Lines Yuji Tsukioka, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. Surg., 105, 392—399 (1996)

Key words pancreatic cancer, PC12, neurite outgrowth, neurotrophin-3, basic fibroblast growth factor

Abstract

The purpose of the present study is to examine biochemically the expression and secretion of neurotrophic factors causing peripheral neuritic sprouting (*neurogenesis*) in pancreatic cancer. Five human pancreatic cancer cell lines (Panc-1, BxPC-3, AsPC-1, MIA PaCa-2 and Capan-1) and rat pheochromocytoma cell line (PC12) were co-cultured. PC12 cells were cultured in cell-culture supernatant of pancreatic cancer cell lines. The expression of three neurotrophic factors, nerve growth factor (NGF), neurotrophin-3 (NT-3) and basic fibroblast growth factor (b-FGF), which induce neurite outgrowth of PC12 and human peripheral neuron sprouting, was investigated at the mRNA levels in 5 human pancreatic cancer cell lines. In co-culture and cell-culture in supernatant, neurite outgrowth of PC12 cells was caused by all 5 pancreatic cancer cell lines, significantly by BxPC-3, AsPC-1 and Capan-1. NT-3 mRNA was expressed in BxPC-3, AsPC-1, MIA PaCa-2 and Capan-1, b-FGF was expressed in Panc-1, AsPC-1 and MIA PaCa-2, but NGF was not detected in any cell lines. These data suggest that human pancreatic cancer cell lines secrete NT-3 and/or b-FGF, and induce neurite outgrowth of PC12 cells.