

## 大腸癌における神経成長因子の発現

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: 安居, 利晃 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9425">http://hdl.handle.net/2297/9425</a>

## 大腸癌における神経成長因子の発現

金沢大学医学部医学科外科学第二講座 (主任: 三輪晃一教授)

安居利晃

神経成長因子 (nerve growth factor, NGF) は、神経細胞の細胞分化と生存維持に作用するだけでなく、肥満細胞・マクロファージおよびリンパ球などの免疫担当細胞に対しても分化誘導と生存維持で関与することが知られている。大腸癌組織にはこれらの細胞浸潤がしばしば観察され、癌細胞から分泌される NGF が癌組織内の免疫担当細胞に作用し、浸潤・転移に影響を与えている可能性が示唆される。本研究では大腸癌細胞に NGF の発現があるか否かを、ヒト大腸癌培養細胞 12 株 (CaR-1, RCM-1, SW837, SW48, SW480, SW620, Colo201, Colo320DM, HT-29, LS174T, HCT-15, DLD-1) および外科的に切除された原発性大腸癌 27 例で検索した。逆転写-PCR 法による NGF mRNA の発現は、培養細胞株の 75% (9 株)、切除大腸癌の 95% (25 例) に認められ、その局在は遺伝子組織化学法により癌細胞であることが確かめられた。免疫組織化学染色法による NGF 蛋白は NGF mRNA の発現をみた癌細胞質内に発現し、培養細胞株では mRNA 発現株の全てに、切除大腸癌では 20 例に陽性であった。NGF の発現を認めた培養細胞株の上清をラット褐色細胞腫から樹立された PC12 細胞に添加したところ PC12 細胞の突起は有意に伸長し、この突起伸長は抗 NGF モノクローナル抗体により抑制された。以上の成績は、大腸癌細胞が生物学的活性を有する NGF 蛋白を合成・分泌していることを示している。

**Key words** colorectal cancer, nerve growth factor, *in situ* hybridization, reverse transcription-PCR, immunohistochemical staining

神経成長因子 (Nerve growth factor, NGF) は、中枢神経のみならず末梢神経のニューロンの生存維持と細胞分化を調節する代表的な神経栄養因子である<sup>1)~3)</sup>。この NGF は、他の多くの神経栄養因子とは違って、肥満細胞、マクロファージやリンパ球などの免疫担当細胞に作用して、これら細胞の生存維持、分化誘導や化学伝達物質の分泌促進などに関わる機能も有している<sup>4)~10)</sup>。一方、消化器癌の病巣部には、肥満細胞、マクロファージやリンパ球の浸潤がしばしば観察され<sup>11)~15)</sup>、癌関連肥満細胞 (tumor-associated mast cells)、癌関連マクロファージ (tumor-associated macrophages) および腫瘍浸潤リンパ球 (tumor infiltrating lymphocytes) の別名で呼ばれており、腫瘍免疫だけでなく腫瘍の増殖および転移・浸潤とも深く関わりのあることが知られている<sup>16)~20)</sup>。これら免疫担当細胞を誘導するサイトカインとしては、以前より癌細胞から分泌されるコロニー刺激因子 (colony-stimulating factor, CSF) が知られており、消化器癌における CSF 発現についての研究が散見される<sup>21)~22)</sup>。しかし、これまでに消化器癌における NGF の発現についての報告はない。そこで本研究では、大腸癌細胞における NGF の発現について研究した。

## 材料および方法

## I. 培養細胞株

1. ヒト大腸癌培養細胞株と NGF 産生ヒト悪性グリオーマ細胞株

今回の実験には、ヒューマンサイエンス資源研究バンクより購入した CaR-1, RCM-1, SW837, 大日本製薬よりの SW48, SW480, SW620, Colo201, Colo320DM, HT-29, LS174T, HCT-15, DLD-1 の 12 種類の大腸癌培養細胞株を使用した。

また、NGF を産生していることで知られているヒト悪性グリオーマ培養細胞株である U87MG<sup>23)</sup> を金沢大学脳神経外科学教室より供与して頂き、陽性コントロールとした。

上記 13 種類の細胞培養には、10% 牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Cell Culture Laboratories, Cleveland, USA) と 0.3 mg/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% CO<sub>2</sub> 濃度で 37℃ の条件下で培養した。

## 2. PC12 細胞株

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 細胞株をヒューマンサイエンス資源研究バンクより購入して使用した。細胞の培養には、5% FBS と 10% 馬血清 (horse serum) (Gibco BRL, New York, USA) と 0.3 mg/ml グルタミンを含む RPMI-1640 培地を用い、5% CO<sub>2</sub> 濃度で 37℃ の条件下で培養した。

## II. 臨床材料

1997年8月より1998年3月の8ヶ月間に金沢大学第二外科で切除された原発性大腸癌33例のうち、新鮮材料で遺伝子レベルの検索が可能であった27例を対象とした。

大腸癌症例の内訳は、男性17例、女性10例、平均年齢は63.4歳、組織学的病期では0期1例、I期4例、II期10例、III a

平成11年3月23日受付, 平成11年5月26日受理

Abbreviations: CSF, colony-stimulating factor; FBS, fetal bovine serum; ISH, *in situ* hybridization; NGF, nerve growth factor; PBS, phosphate buffered saline; RT-PCR, reverse transcription-PCR

期3例, III b期6例, IV期3例であった。

なお, 各臨床病理学的因子の記載は大腸癌取り扱い規約(改訂第5版)<sup>20)</sup>に従った。

原発性大腸癌のNGF蛋白の発現は, 10%ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて免疫組織化学染色により調べ, また, 癌組織内でのNGF mRNAの発現と局在を明らかにする目的で, 原発性大腸癌27例の癌部および非癌部の新鮮材料を用いて, 逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応(reverse transcription-PCR, RT-PCR)法および遺伝子組織化学法(*in situ* hybridization, ISH)を行った。RT-PCR法のために採取した組織は, 直ちに液体窒素により凍結し, RNAを抽出するまで-80℃で保存した。また, ISHのために採取した組織は, 4%パラホルムアルデヒド/0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.2)により4℃で8時間固定した。固定後, 4℃で一晩, 30%しょ糖を含んだ0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.2)で置換した。

### III. RT-PCR法を用いたNGF mRNA発現の解析

#### 1. 総RNAの抽出

培養細胞株と凍結した切除標本から酸性グアニジン/フェノール/クロロホルム法<sup>20)</sup>により総RNAを抽出した。

#### 2. プライマーおよびプローブ用オリゴヌクレオチドの作成

$\beta$ -NGF,  $\beta$ -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合成した(宝酒造, 京都)。それぞれの塩基配列は $\beta$ -NGF: センスプライマー5'-GTTCTACACTCTGATCACAGCT-3', アンチセンスプライマー5'-AGCCTTCCTGCTGAGCACAC-3', プローブ5'-GATGATGACCGCTTGTCTCCTGTGA-3',  $\beta$ -アクチン: センスプライマー5'-GAAATCTGGCACCACACCTT-3', アンチセンスプライマー5'-GTTGAAGGTAGTTTCGTGGAT-3', プローブ5'-GATCTTCATGAGGTAGTCAGT-3'とした。プローブの<sup>32</sup>P標識は, ターミナルデオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ(BRL, Gaithersburg, USA)を用いた3'末端標識法により, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (222 Tbq/mmol, Du Pont, Wilmington, USA)で標識した。

#### 3. RT-PCR法

1  $\mu$ gの総RNAを65℃で15分間変性後, 1本鎖cDNA合成キット(Clontech, Palo Alto, USA)を用いて, 逆転写反応にてcDNAを合成した<sup>20)</sup>。すなわち, 200ユニットのモノネー白血病毒逆転写酵素と0.5 mMのデオキシリボヌクレオチド(dATP, dCTP, dGTA, dTTP)混合液, 75  $\mu$ g/mlオリゴdTプライマー, 1単位RNA阻害因子, 50mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>を37℃で90分間反応させた。引き続き94℃において5分間加熱し, 逆転写酵素を失活させた。

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)を用いてプログラマブル・サーマル・コントローラー(フナコシ, 東京)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, NGFは30サイクル,  $\beta$ -アクチンは18サイクルにて行った。

#### 4. サザンプロット法

PCR産物を1%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, New York, USA)に一晩転写し, UVストラタリンカー1800(Stratagene, California, USA)により, 120ミリジュー

ール, 波長254 nmの紫外線を照射してフィルターに固着させた。このメンブレンについて, 1 M塩化ナトリウム, 50 mM Tris-HCl緩衝液(pH7.5), 10Xデンハルト溶液(1Xデンハルト溶液は, 0.02%ポリビニルピロリドン, 0.02%フィコール, 0.02%ウシ血清アルブミン), 0.1% N-ラウリルサルコシン酸ナトリウム, 10 mM EDTA, 250  $\mu$ g/ml熱変性サケ精子DNAからなるプレハイブリダイゼーション溶液を用いて, 55℃で2時間のプレハイブリダイゼーションを行った。続いて, プレハイブリダイゼーション溶液に熱変性した<sup>32</sup>P標識プローブを加え, 55℃で16時間のハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後, メンブレンを6X SSC(1X SSCは0.15 M塩化ナトリウム, 0.015 Mクエン酸ナトリウム)で10分間ずつ2回洗浄し, ついで0.1% N-ラウリルサルコシン酸ナトリウムを含む6X SSCにより55℃で15分間ずつ2回洗浄した。洗浄後, X線フィルム(Kodak, New York, USA)を用いてオートラジオグラフィを行った。

### IV. 大腸癌培養細胞上清中のNGF蛋白によるPC12細胞の突起伸長作用の検索

各大腸癌培養細胞をそれぞれ $1 \times 10^5$ /mlの濃度で10% FBSを含むRPMI-1640培地で, 5% CO<sub>2</sub>濃度で37℃の条件下で72時間培養した。ほぼコンフルエントになった状態で, リン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline, PBS)にて3回洗浄後, 10% FBSと5%馬血清を含むRPMI-1640培地で, 5% CO<sub>2</sub>濃度で37℃の条件下で24時間培養した。その培養上清を1000 rpm, 10分間遠心し, 沈査を取り除いた溶液をPC12細胞の培養上清として用いた。

PC12細胞を0.02% EDTA添加0.25%トリプシン含有のPBSにて剥離後, PBSにて2回洗浄し, それぞれの大腸癌培養細胞上清にて $1 \times 10^4$ /mlに希釈後, 6ウェル平底マイクロプレートに播種し, 5% CO<sub>2</sub>濃度で37℃の条件下で48時間培養した。その後, 10% FBSと5%馬血清を含むRPMI-1640培地にて, 同様の条件で培養したもの(コントロール)と比較し, PC12細胞の突起伸長の有無を観察した。各大腸癌培養細胞上清を添加することによるPC12細胞の突起伸長についてはOhtaら<sup>21)</sup>の方法を用いて定量化した。すなわち, 各々2回の実験を行い, 無作為に10視野を観察し, 細胞の中心から突起の先端までの長さが40  $\mu$ m以上の突起を有する細胞を突起伸長陽性細胞として, 突起伸長陽性細胞率を算出した。さらに, 特異性がすでに確認されている抗ヒトNGFマウスモノクローナル抗体<sup>25)</sup>(Austral Biologicals, California, USA)を中和抗体として1  $\mu$ g/mlとなるようにPC12細胞の培養液中に添加することにより, 突起伸長が抑制されるか否かについても観察した。

### V. ISHを用いた大腸癌組織におけるNGF mRNAの局在についての検索

#### 1. プローブの作製

プローブは, ヒト $\beta$ -NGF cDNAをもとに合成した。 $\beta$ -NGF cDNAは, RT-PCR法によりヒト $\beta$ -NGFを増幅してプラスミドベクター(プロメガ, 東京)に組み込み, クローニングして得た。すなわち,  $\beta$ -NGFを発現していることで知られているU87MGのcDNAより,  $\beta$ -NGF mRNA検出用に使用したものと同様のプライマーを用いて得られたRT-PCR産物を0.5 mg/mlの臭化エチジウムを含む泳動緩衝液(40 mM Tris, 20 mM 酢酸ナトリウム, 1 mM EDTA)中で, 1%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。泳動後のアガロースゲルに紫外線

を照射し、増幅されたバンドをアガロースゲルから切り出した。切り出したアガロースゲルスライスから Gene Clean II キット (フナコシ) を用いて PCR 産物を 20  $\mu$ l の蒸留水で抽出した。さらに、T4 DNA ポリメラーゼ (宝酒造) を用いて、PCR 産物の末端を平坦末端に加工し、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造) を用いて 5' 末端をリン酸化した。これらの処理を施した PCR 産物をプラスミド pGEM3Zf (+) のマルチクローニングサイト *Sma* I の位置に組み込んだ。このプラスミドで形質転換された大腸菌 XL2-Blue 株を LB 培地 (バクトトリプトン 10 g, 酵母エキス 5 g, 塩化ナトリウム 10 g, アンピシリン 50  $\mu$ g/l) で 37°C, 16 時間培養した。培養終了後、遠心にて集菌し、菌体より Plasmid Midi kit (25) (QIAGEN, Chatsworth, USA) によりプラスミドを回収した。得られたプラスミドがヒト  $\beta$ -NGF であることを塩基配列を決定 (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, RE Applied Biosystems, USA) することにより確認した。プラスミドを *Bam*H I を用いて線状にした後、T7 RNA ポリメラーゼ (宝酒造) によりアンチセンスプローブを作製した。一方、このプラスミドを *Sma* I を用いて線状にした後、SP6 RNA ポリメラーゼ (Gibco BRL) によりセンスプローブを作製した。試験管内転写法により合成したこれらのプローブは [ $\alpha$ -thio- $^{35}$ S] dUTP (46.3 Tbq/mmol, NEN<sup>TM</sup> Life Science Products, Boston, USA) により標識した。

## 2. ISH

組織片をクライオスタットにより 14  $\mu$ m の厚さで薄切し、ゼラチンを塗布したスライドガラス上に貼付した。風乾後の切片を、4% パラホルムアルデヒド/0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) で 15 分間の後固定を行い、2 mg/ml のグリシンを含んだ PBS で洗浄し、0.25% 無水酢酸を含んだ 0.1 M 四エタノールアミンでアセチル化した後、プレハイブリダイゼーションを室温で 2 時間行った。プレハイブリダイゼーション溶液は、50% 脱イオン化ホルムアミド、4XSSC、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2)、1X デンハルト溶液、2% N-ラウリルサルコシン酸ナトリウム、20 mM 2-メルカプトエタノール、250  $\mu$ g/ml 熱変性サケ精子 DNA からなるものを用いた。プレハイブリダイゼーション後、2X SSC で洗浄し、エタノールにより脱水して風乾した。その後、スライドガラスあたり 100  $\mu$ l のプレハイブリダイゼーション溶液に  $^{35}$ S 標識したプローブを加えて、ハイブリダイゼーションを行った。また同時に、2 種類の陰性対照実験を行った。1 つは、センスプローブを標識して同様にハイブリダイゼーションを行い、もう 1 つは、標識したアンチセンスプローブに対して

200 倍の未標識アンチセンスプローブを加えることにより競合阻害をさせてハイブリダイゼーションを行った。37°C で 16 時間反応後、スライドガラスを 0.1% N-ラウリルサルコシン酸ナトリウムを含んだ 0.3 X SSC により 37°C で 1 時間ずつ 3 回、合計 3 時間洗浄した。洗浄後、0.3 M 酢酸アンモニウムを含んだエタノールにより脱水して風乾した。スライドガラスを風乾した後、乳剤 NTB-2 (Kodak) を切片の上に塗り、4°C で 2 週間の感光を行った。感光後、現像液 D19 (Kodak) で現像し、HE 染色した。標本の観察は、明視野と暗視野の条件で光学顕微鏡 BH-2 (オリンパス、東京) により行った。

## VI. 免疫組織化学染色

臨床症例の免疫組織化学染色は、パラフィン包埋 10% ホルマリン固定標本より 4  $\mu$ m の切片を作成し、脱パラフィン後、Catalyzed Signal Amplification System (DAKO, California, USA) を用いて行った。また、培養細胞は、Lab-Tek チャンバー スライド (Nunc, Naperville, USA) にて培養後、アセトン加メタノールにより固定したものをを用いて行った。一次抗体として抗ヒト NGF マウスモノクローナル抗体 (Austral Biologicals) を用いた。0.01% ジアミノベンチジン (Sigma, St. Louis, USA) 溶液で発色させ、0.03% メチルグリーンで核染色を行った。なお、免疫染色時には、NGF 蛋白の発現が認められる悪性グリオーマ培養細胞株 (U87MG) をアセトン加メタノールにて固定したものを陽性コントロールとして用いた。また、一次抗体の代わりに PBS を用いたものを陰性コントロールとした。癌細胞の染色率が 5% 未満を陰性、5% 以上 25% 未満を軽度陽性、25% 以上 50% 未満を中等度陽性、50% 以上を高度陽性と判定した。

## VI. 統計学的解析

PC12 細胞の突起伸長陽性細胞率の検討には、Mann-Whitney の U 検定を用いて判定し、危険率 5% 未満の場合に有意差ありと判定した。

## 成 績

### I. ヒト大腸癌培養細胞株における NGF の遺伝子および蛋白レベルでの発現

RT-PCR 法では、NGF に対するプライマーペアにより NGF 由来の 700 塩基対の増幅 DNA 断片が特異的に検出され、また  $\beta$ -アクチンに対するプライマーペアにより  $\beta$ -アクチン由来の 592 塩基対の増幅 DNA 断片が特異的に検出された。これらの断片はサザンプロットハイブリダイゼーション法では、各々が単一のバンドとして検出された (図 1)。

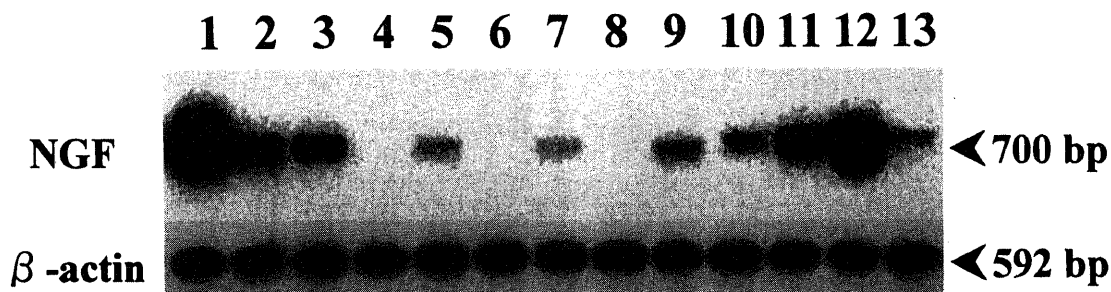


Fig. 1. Southern blot analysis of RT-PCR amplified products of mRNA with the specific probes for NGF and  $\beta$ -actin in a human malignant glioma cell line (U87MG) and twelve human colorectal cancer cell lines. NGF is expressed in the lanes 1-3, 5, 7, and 9-13. The lanes 1, U87MG (positive control); 2, CaR-1; 3, RCM-1; 4, SW480; 5, SW620; 6, SW837; 7, Colo320DM; 8, DLD-1; 9, HT-29; 10, HCT-15; 11, LS174T; 12, SW48; and 13, Colo201. The expressed sizes (bp) of the RT-PCR products were indicated at the right with arrows.

免疫組織化学染色では、免疫反応物質は細胞質内に粗顆粒状に存在していた (図2)。

表1には、各培養細胞株における NGF mRNA および NGF 蛋白の発現の解析結果をまとめて示した。12種の大腸癌培養細胞株のうち SW480, SW837 および DLD-1 の3株を除いた9株 (75%) において NGF mRNA の発現が認められ、特に CaR-1,

RCM-1, LS174T および SW48 に強いバンドが認められた。

免疫組織化学染色による検討では、SW480, SW837 および DLD-1 の3株を除いた9株において NGF 蛋白の発現が陽性で、NGF mRNA の発現と一致する結果であった。

また、RT-PCR 法により NGF mRNA の強い発現を認めた CaR-1 と SW48 では、免疫組織化学染色においても強く染色さ

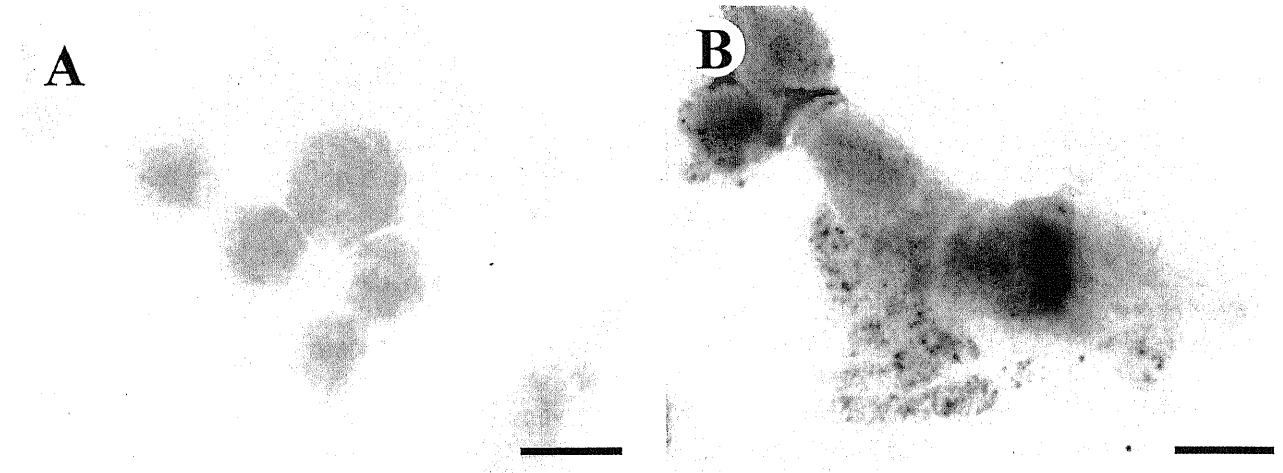


Fig. 2. Microscopic photographs with immunostaining for NGF protein in human colorectal cancer cell lines. (A) No stained cells were found in the SW480. (B) Cytoplasmic immunoreactivity was observed in the CaR-1 cells. The scale bar, 10  $\mu$ m.

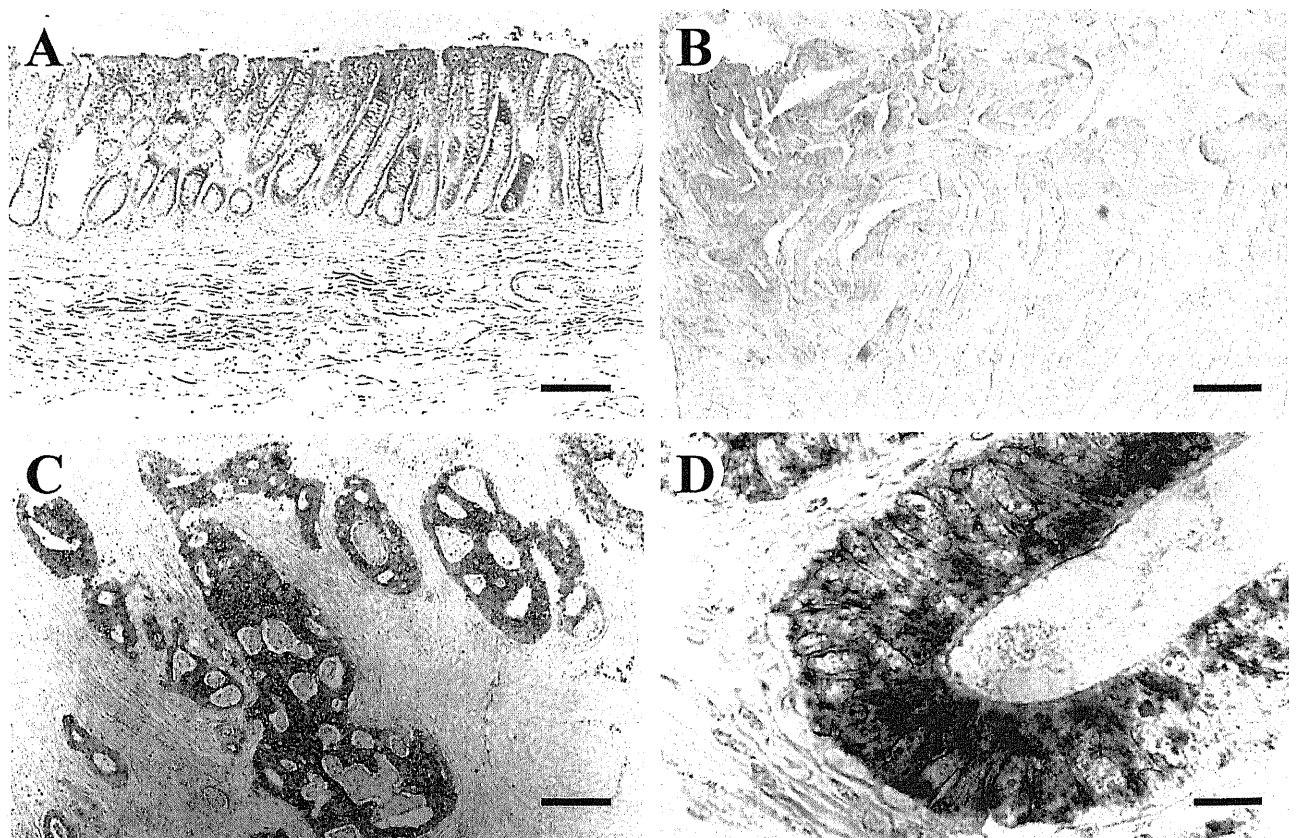


Fig. 9. Microscopic photographs with immunostaining for NGF protein in human normal colorectal mucosa and cancer tissues. (A) There was no positive staining in normal mucosa. (B) There was no positive staining in cancer cells of Case 14. (C) and (D) Positive cytoplasmic immunoreactivity for NGF protein was observed in cancer cells of Case 16. Each case number corresponded to that in Table 2. (A), (B) and (C) The scale bar, 100  $\mu$ m. (D) The scale bar, 10  $\mu$ m.

Table 1. NGF expression in colorectal cancer cell lines at mRNA and protein levels

Cell line	Expression of NGF	
	mRNA	Protein
CaR-1	+	S
RCM-1	+	W
SW480	-	-
SW620	+	W
SW837	-	-
Colo 320DM	+	W
DLD-1	-	-
HT-29	+	W
HCT-15	+	W
LS 174T	+	W
SW48	+	S
Colo 201	+	W

The expression patterns of NGF mRNA were classified into two groups. -, negative; +, positive. The expression patterns of NGF protein were classified into three groups. -, no staining; W, weak staining; S, strong staining.

れており、NGF の mRNA レベルでの発現程度は、蛋白レベルでの発現程度と相関した。

## II. 大腸癌培養細胞上清中の NGF 蛋白の生物学的活性について

大腸癌培養細胞から分泌される NGF 蛋白が生物学的活性を有する蛋白であるか否かを、PC12 細胞に対する突起伸長作用の有無で評価した。

その結果、大腸癌培養細胞上清を添加しなかったコントロール群の PC12 細胞では、48 時間の観察期間内には突起伸長を示す細胞はほとんど見られなかった (図 3A)。また、免疫組織化学的に NGF 蛋白の発現を認めなかった SW480 の培養細胞上清の添加では、PC12 細胞の突起伸長はほとんどみられずコントロール群と同じ程度であった (図 3B)。しかし、NGF 蛋白の発現が認められた CaR-1 および SW48 の培養細胞上清の PC12 細胞への添加では、コントロール群に比して多くの PC12 細胞の突起が著明に伸長した (図 3C, D)。

図 4 には、各大腸癌培養細胞株の培養細胞上清を PC12 細胞に添加した時の突起伸長陽性細胞率を示したが、これらの結果

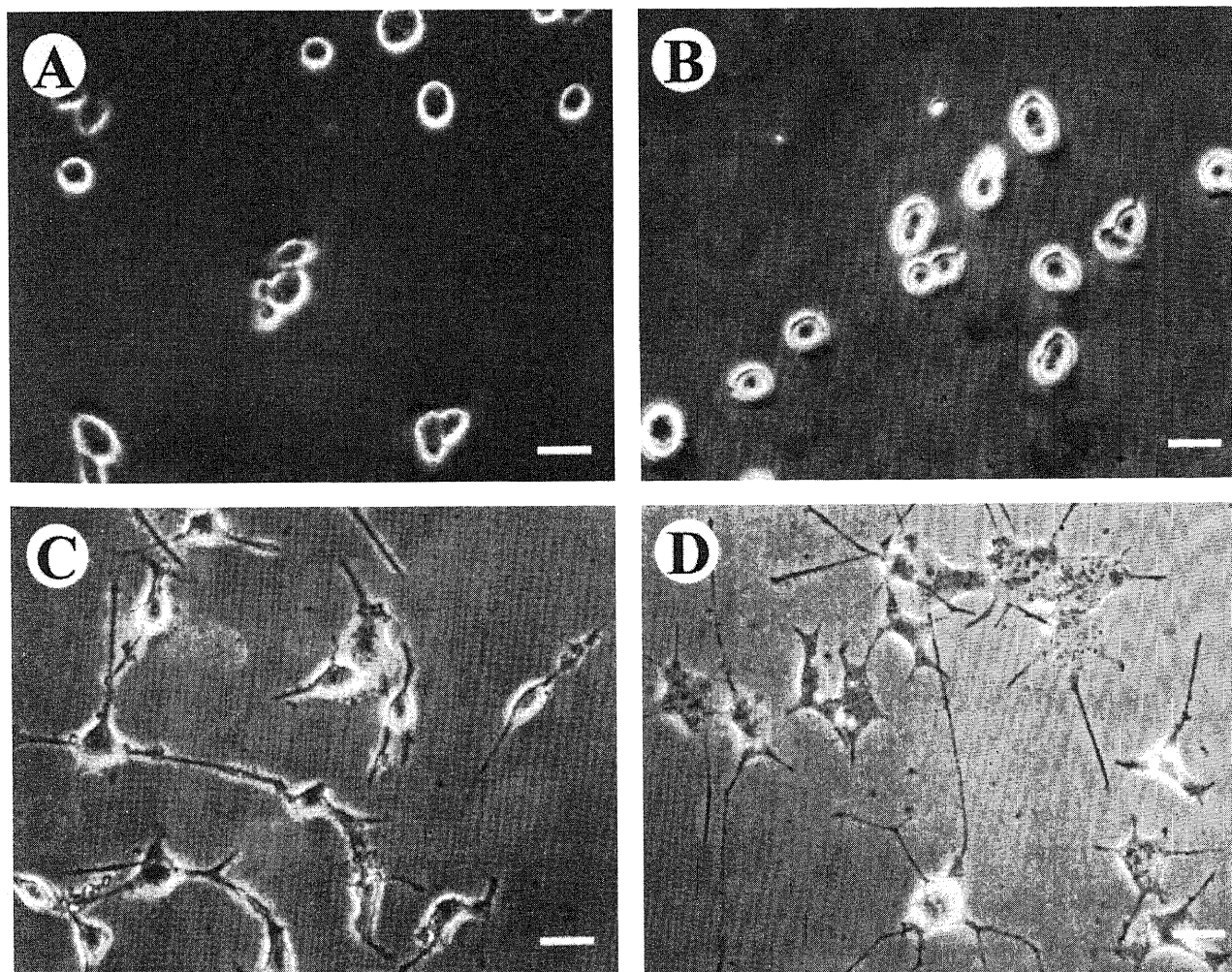


Fig. 3. Induction of neurite outgrowth of PC12 cells cultured in the medium conditioned by each colorectal cancer cell lines. (A) and (B) Outgrowth of the neurite was not observed in neither the control (A) nor the SW480 (B). (C) and (D) Intensely developed neurite outgrowth in the CaR-1 (C) and the SW48 (D).

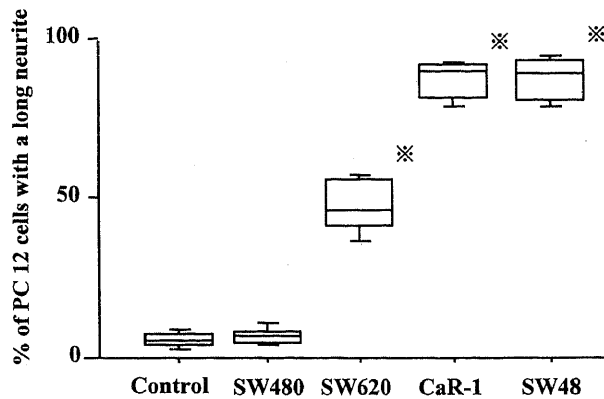


Fig. 4. Quantification of neurite outgrowth of PC12 cells. "The PC12 cells with a long neurite" was defined as the cells having at least one neurite longer than  $40 \mu\text{m}$ . The test was twice tried, and the data were expressed as a median value in the ten randomly selected fields. \*,  $P < 0.01$  vs. control.

は、大腸癌培養細胞株における NGF mRNA および NGF 蛋白の発現程度と一致した。

また、この突起伸長作用は、中和抗体として抗 NGF モノクローナル抗体を添加することにより著明に抑制された (図 5)。

### Ⅲ. 切除大腸癌組織における NGF の遺伝子および蛋白レベルでの発現と局在

外科的に切除された原発性大腸癌 27 例を対象にして、癌部および非癌部大腸粘膜における NGF mRNA の発現を RT-PCR 法により検討した。その結果、癌部においては 27 例中 25 例 (95%) に NGF mRNA の発現が認められた (図 6, 表 2)。しかし、非癌部粘膜に発現は認められなかった (図 7)。

次に、ISH により、癌組織内でオートラジオグラフィーの銀粒子として示される NGF mRNA のシグナルの細胞局在を検討した。なお、標識したセンスプローブを用いた陰性対照実験と過剰量の未標識アンチセンスプローブを加えて競合阻害させた陰性対照実験のいずれにおいても反応は陰性で、アンチセンス

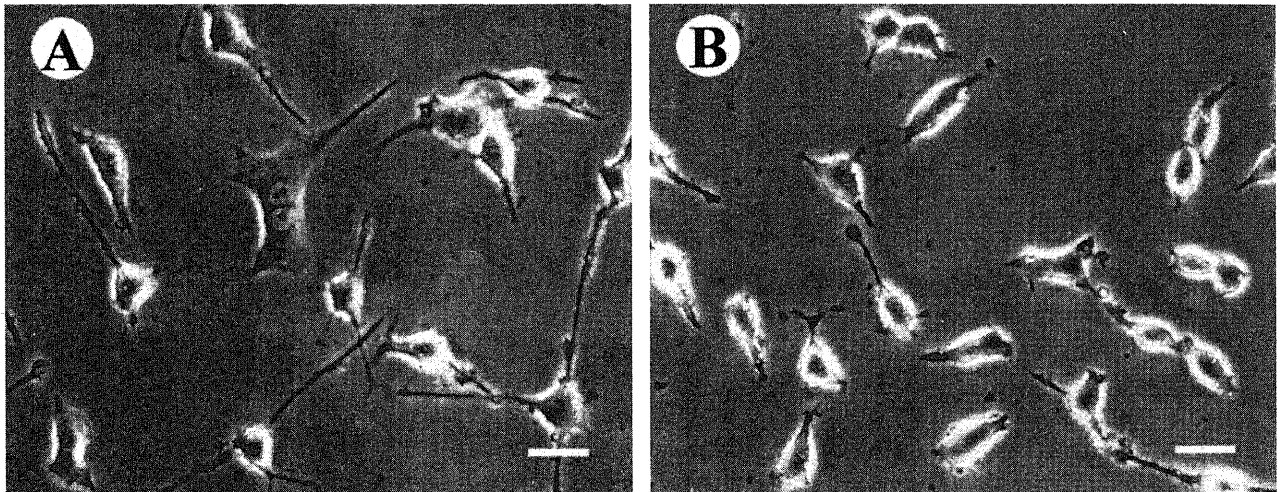


Fig. 5. Microscopic photographs of neurite outgrowth of PC12 cells in the medium having cultured the CaR-1. Adding the anti-NGF monoclonal antibody (B) into the medium obviously inhibited development of neurite outgrowth of PC12 cells, when compared without treatment (A). The scale bar,  $50 \mu\text{m}$ .

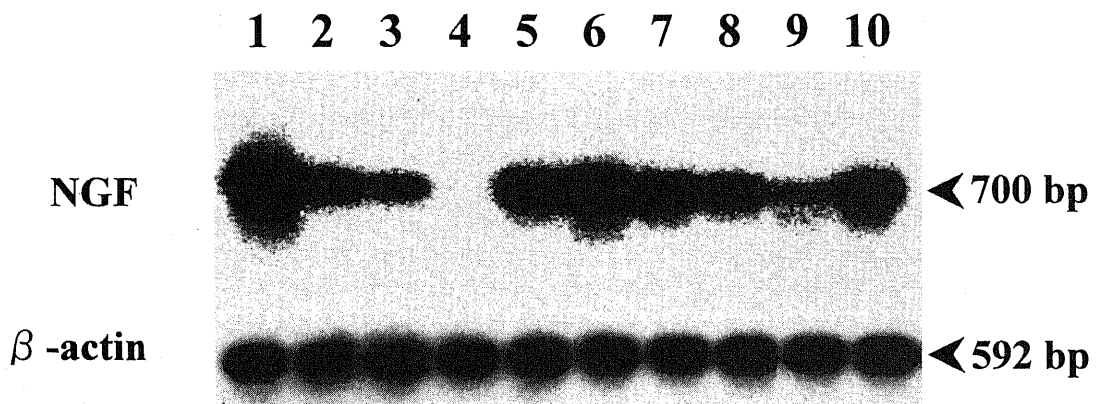


Fig. 6. Southern blot analysis of RT-PCR amplified products of mRNA with the specific probes for NGF and  $\beta$ -actin in a human malignant glioma cell line (U87MG) and nine surgically resected primary colorectal cancer specimens. Every lane expressed NGF except the lane 4. The lanes 1, U87MG (positive control); 2, Case 19; 3, Case 6; 4, Case 1; 5, Case 7; 6, Case 20; 7, Case 8; 8, Case 2; 9, Case 15; 10, Case 25. Each case number corresponded to that in Table 2. The expressed sizes (bp) of the RT-PCR products were indicated at the right with arrows.

Table 2. NGF expression in colorectal cancer specimens at mRNA and protein levels

Case No.	Age	Sex	NGF expression		Depth of Invasion	Stage	Pathology
			mRNA	Protein			
Early cancer							
1	71	M	-	-	m	0	Well
2	55	F	+	-	sm	I	Well
3	71	M	+	+	sm	I	Well
4	75	M	+	+	sm	I	Well
Advanced cancer							
5	55	M	+	+	mp	I	Mod
6	72	M	+	+	a <sub>2</sub>	II	Well
7	65	M	+	+	ss	II	Mod
8	62	F	+	++	ss	II	Mod
9	80	F	+	++	ss	II	Mod
10	65	F	+	-	ss	II	Mod
11	65	M	+	++	a <sub>1</sub>	II	Mod
12	62	M	+	-	a <sub>1</sub>	II	Mod
13	56	F	+	+	ss	II	Well
14	62	F	-	-	ss	II	Mod
15	66	M	+	-	a <sub>1</sub>	II	Mod
16	69	M	+	+++	si	III a	Mod
17	62	F	+	+	ss	III a	Mod
18	64	M	+	+	se	III a	Mod
19	69	M	+	+	a <sub>2</sub>	III b	Mod
20	59	M	+	+++	a <sub>1</sub>	III b	Well
21	71	M	+	-	a <sub>2</sub>	III b	Well
22	49	M	+	+	se	III b	Mod
23	55	F	+	++	ss	III b	Well
24	79	F	+	+++	ss	III b	Mod
25	57	F	+	++	a <sub>1</sub>	IV	Mod
26	59	M	+	+	se	IV	Muc
27	37	M	+	+++	si	IV	Muc

The expression patterns of  $\beta$ -NGF gene were classified into two groups. -, negative; +, positive. The expression of NGF protein were classified into four groups. -, all carcinoma cells negative or <5 per cent carcinoma cells positive; +, 5-25 per cent of carcinoma cells positive; ++, 25-50 per cent of carcinoma cells positive; +++, 50-100 per cent of carcinoma cells positive. m, tumor invasion in mucosa; sm, tumor invasion in submucosa; mp, tumor invasion in muscularis propria; ss, tumor invasion in subserosa; se, tumor invasion in serosa; a<sub>1</sub>, tumor invasion through muscularis propria into non-peritonealized part; a<sub>2</sub>, tumor invasion in non-peritonealized, pericolic, or perirectal tissues; si, ai, direct tumor invasion in other organs or structures. well, well-differentiated adenocarcinoma; mod, moderately differentiated adenocarcinoma; muc, mucinous adenocarcinoma.

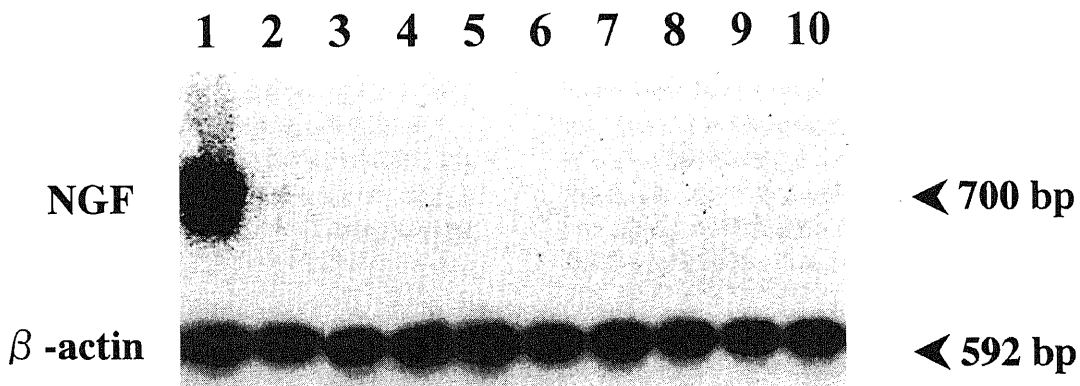


Fig. 7. Southern blot analysis of RT-PCR amplified products of mRNA with the specific probes for NGF and  $\beta$ -actin. NGF in a human malignant glioma cell line (U87MG) and nine human normal colorectal mucosa. NGF was expressed in the lane 1. The lanes 1, U87MG (positive control); 2, Case 19; 3, Case 6; 4, Case 1; 5, Case 7; 6, Case 20; 7, Case 8; 8, Case 2; 9, Case 15; 10, Case 25. Each case number corresponded to that in Table 2. The expressed sizes (bp) of the RT-PCR products were indicated at the right with arrows.



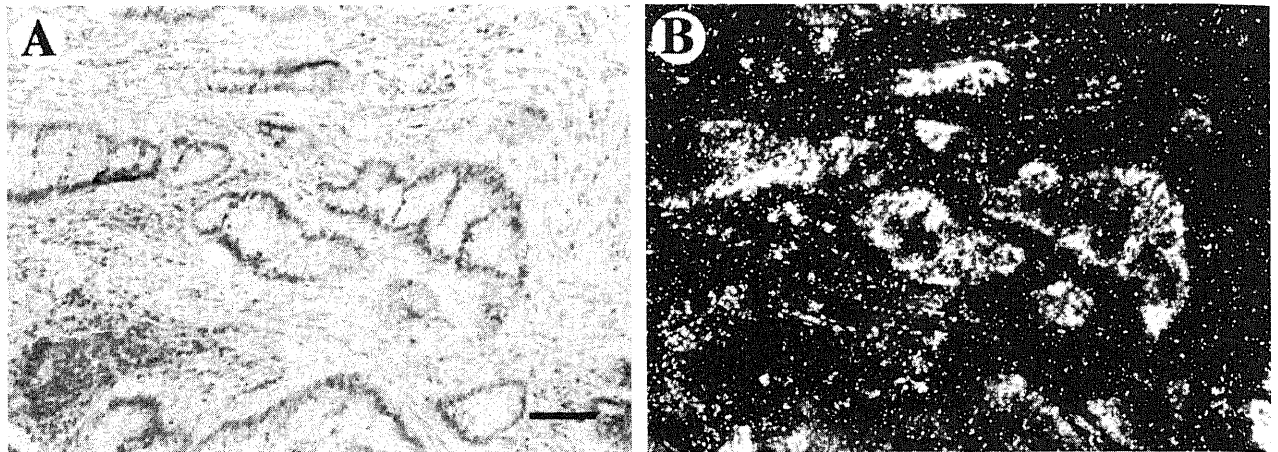


Fig. 8. Autoradiograms in bright (A) and dark fields (B) showing *in situ* hybridization of primary colorectal cancer specimens with  $^{35}\text{S}$ -labeled  $\beta$ -NGF probe. The signal was localized in cancer cells of Case 20. The case number corresponded to that in Table 2. The scale bar, 50  $\mu\text{m}$ .

プローブの特異性が確認された。 $^{35}\text{S}$ 標識NGFアンチセンスプローブを用いたハイブリダイゼーションにより、癌細胞に一致して強いNGF mRNAのシグナルを示す銀粒子が認められた(図8)。

さらに、免疫組織化学染色によりNGF蛋白の発現について検討した。その結果、27例中20例(74%)にNGF蛋白の発現を認めた。この20例は、いずれもNGF mRNAの発現が認められた材料であった。NGF蛋白発現陽性例では、抗NGF抗体に対する免疫反応物質は癌細胞の細胞質内で粗顆粒状に存在していた(図9C, D)。しかし、NGF mRNAの発現を認めなかった材料では、全例免疫組織化学染色においても、NGF蛋白の発現は認められなかった(図9B)。一方、非癌部大腸粘膜は、染色陰性であった(図9A)。

表2には、大腸癌組織におけるNGFの遺伝子および蛋白レベルでの発現結果をまとめて示した。早期癌の4例中3例(75%)にNGF mRNAの発現を認め、そのうち2例(50%)にはNGF蛋白の発現も認めた。また、進行癌においては、23例中22例(96%)にNGF mRNAの発現を認め、そのうち18例(78%)はNGF蛋白の発現も陽性であった。なおNGF mRNA発現陰性例は、いずれもNGF蛋白発現陰性であった。

#### 考 察

NGFは、脳由来神経成長因子(brain-derived neurotrophic factor)<sup>29)</sup>、ニューロトロピン3(neurotrophin-3)<sup>30)</sup>、ニューロトロピン4/5(neurotrophin-4/5)<sup>31)</sup>とともに神経成長因子ファミリーを形成し、中枢神経のみならず末梢神経のニューロンの生存維持と細胞分化を調節する代表的な神経栄養因子である。

このNGFは他の神経栄養因子とは違い、神経系以外の免疫担当細胞に対する作用も有することが知られている<sup>30)~32)</sup>。そして、1991年にtrkA遺伝子産物がNGFに対するレセプターであることが報告され<sup>32)</sup>、チロシンキナーゼ活性を有するtrkAが神経組織のみならず単球<sup>33)</sup>、リンパ球<sup>34)</sup>および肥満細胞<sup>35)</sup>といった血液細胞にも発現していることが示されたのである。このように、NGFは肥満細胞の生存を延長させ、さらに肥満細胞を活性化させヒスタミンなどの化学伝達物質の分泌を促進させ

る<sup>33)~37)</sup>、リンパ球の増殖や分化を促進させる<sup>38)</sup>、単球の活性化を促す<sup>39)</sup>、などの作用を持ち、これらはすべてチロシンキナーゼ活性を有するtrkAレセプターを介して行われていることが明らかにされたのである。

ところで、消化器癌の病巣部には、肥満細胞、マクロファージやリンパ球の浸潤がしばしば観察され<sup>13)~15)</sup>、癌関連肥満細胞(tumor-associated mast cells)、癌関連マクロファージ(tumor-associated macrophages)および腫瘍浸潤リンパ球(tumor infiltrating lymphocytes)の別名で呼ばれている。これら免疫担当細胞は腫瘍免疫に関与するだけでなく、それら免疫担当細胞が様々なプロテアーゼ、さらに成長因子やサイトカインを分泌することにより、癌の増殖および浸潤・転移に重要な影響を与えていると考えられている<sup>16)~20)</sup>。これら免疫担当細胞を癌巣周囲に誘導するサイトカインとしてこれまでに癌細胞から分泌されるCSFが知られており、癌細胞とこれら免疫担当細胞との相互作用が固形腫瘍の増殖や浸潤・転移に深く関与すると一般的に考えられている。このCSFが消化器癌で発現しているとの報告は数多くあるものの、NGFの発現については、アストロサイトーマ<sup>34)</sup>、グリオーマ<sup>23)34)</sup>、プロラクチノーマ<sup>35)</sup>などの脳腫瘍と前立腺癌<sup>36)</sup>での研究があるのみで、消化器癌での発現についての報告はこれまでに見られない。そこで本研究では、近年増加傾向にある大腸癌を対象に、NGFの遺伝子レベル、および蛋白レベルでの発現とその局在について検討した。

今回の大腸癌培養細胞株を用いた検討では、遺伝子レベル、および蛋白レベルでのNGFの発現が12株中9株(75%)に確認された。さらに、PC12細胞にNGF蛋白発現細胞株であるSW620, CaR-1, およびSW48の培養細胞上清を添加することにより有意な突起伸長を示し、その突起伸長は、中和抗体として抗NGFモノクローナル抗体を加えることにより抑制された。また、臨床材料での検討でも、RT-PCR法および免疫組織化学染色を用いた検討により、癌組織における遺伝子レベル、および蛋白レベルでのNGFの発現が高率に確認され、ISHによりNGF mRNAの局在が癌細胞にあることが証明された。以上より、大腸癌細胞は、生物学的活性を有するNGF蛋白を合成・分泌していることが証明された。この結果より、大腸癌組織内

においては、癌細胞から分泌されたNGF蛋白は、腫瘍組織内に浸潤してきた肥満細胞、マクロファージやリンパ球などの間質細胞に対しパラクリン的に作用している可能性が示唆された。すなわち、癌細胞から分泌されたNGF蛋白は、腫瘍組織内に浸潤している免疫担当細胞を介して、間接的ではあるが、癌の増殖や浸潤・転移に少なからず影響を与えている可能性が推察された。

ところで、NGFには前述したような神経系への作用や免疫担当細胞への作用以外にも、trkAレセプターを有する腫瘍細胞に対して様々な作用を有しているとの報告が最近になり散見されるようになった<sup>35)37)~39)</sup>。例えば、NGF蛋白はtrkAレセプターを発現しているプロラクチノーマ細胞の分化を誘導することにより、悪性を低下させたり<sup>35)</sup>、trkAレセプターを強制発現させた髄芽細胞腫のアポトーシスを誘導するなど<sup>37)</sup>、trkAレセプターを発現している腫瘍細胞の増殖に対して抑制的に働くとの報告が見られる。またそれとは逆に、trkAを発現している前立腺癌細胞やメラノーマ細胞では、NGF蛋白はその浸潤能を高めたり<sup>38)39)</sup>、乳癌細胞においては、その増殖を促進させるとの報告も見られる<sup>40)</sup>。このように、現時点では腫瘍細胞に対するNGF蛋白の役割に関しては、意見の一致を見ていないのが実状である。ただし、最近行った抗ヒトtrkAポリクローナル抗体(Santa Cruz, California, USA)を用いた免疫組織化学染色による予備実験では、大腸癌細胞におけるtrkAの発現はないか、あっても極めて弱く、その発現頻度は極めて低いとの結果を得ている。したがって、現時点では大腸癌細胞より分泌されたNGF蛋白は、主にtrkAレセプターを有する肥満細胞、マクロファージやリンパ球に対してパラクリン的に作用するものであり、trkAレセプターの発現頻度が低い大腸癌細胞に対しては、オートクライン的には作用しがたいものと考えている。

今回の研究で初めて、大腸癌細胞が生物学的活性を有するNGF蛋白を合成・分泌することが証明された。今後、大腸癌のみならず、他の消化器癌においてもNGF蛋白の発現程度が詳細に検討され、消化器癌の増殖および浸潤・転移におけるNGF蛋白の役割について分子生物学的レベルで解明されることを期待したい。

## 結 論

ヒト大腸癌培養細胞株および外科的に切除された大腸癌組織におけるNGF mRNAならびにNGF蛋白の発現とその生物学的活性の有無について検討し、以下の結果を得た。

1. ヒト大腸癌培養細胞株におけるNGF mRNAと蛋白の発現をそれぞれRT-PCR法、および免疫組織化学染色により解析した結果、12株中9株(75%)に発現を認めた。

2. NGFの発現を認めたSW620, CaR-1, およびSW48細胞株の培養細胞上清をPC12細胞に添加することにより、PC12細胞の有意な突起伸長が認められた。また、この突起伸長は抗NGF中和抗体により著明に抑制された。

3. 原発性大腸癌組織におけるNGF mRNAの発現をRT-PCR法により検討した結果、27例中25例(95%)にNGF mRNAの発現を認めた。

4. 原発性大腸癌組織におけるNGF蛋白の発現を免疫組織化学染色により検討した結果、27例中20例(74%)にNGF蛋白の発現を認めた。

以上の結果から、大腸癌細胞は生物学的活性を有するNGF

蛋白を合成・分泌していることを示している。

## 謝 辞

本稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師三輪晃一教授に深甚なる謝意を表します。本研究の遂行にあたり、終始直接御指導、御鞭撻を賜りました金沢大学外科学第二講座太田哲生講師、西村元一講師、同解剖学第一講座井関尚一教授ならびに若山友彦助手に心より感謝致します。さらに本研究遂行に際し、御支援と御協力を頂きました金沢大学医学部外科学第二講座ならびに解剖学第一講座の皆様は厚く御礼申し上げます。

尚、本論文の要旨の一部は第98回日本外科学会総会(1998, 東京)、第57回日本癌学会総会(1998, 横浜)において発表した。

## 文 献

- 1) Batistatou A, Greene LA. Aurintricarboxylic acid rescues PC12 cells and sympathetic neurons from cell death caused by nerve growth factor deprivation: correlation with suppression of endonuclease activity. *J Cell Biol* 115: 461-471, 1991
- 2) Tischer AS, Greene LA. Nerve growth factor induced process formation by cultured rat pheochromocytoma cells. *Nature* 258: 341-342, 1975
- 3) Korsching S, Thoenen H. Nerve growth factor in sympathetic ganglia and corresponding target organs of the rat: correlation with density of sympathetic innervation. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 3513-3516, 1983
- 4) Scully JL, Otten U. NGF: Not just for neurons. *Cell Biol Int* 19: 459-469, 1995
- 5) Frederick LP, Heren LT. Some characteristics of histamine secretion from rat peritoneal mast cells stimulated with nerve growth factor. *J Physiol* 372: 379-393, 1986
- 6) Horigome K, Pryor JC, Bullock ED, Johnson EM Jr. Mediator release from mast cells by nerve growth factor. *J Biol Chem* 268: 14881-14887, 1993
- 7) Horigome K, Bullock ED, Johnson EM Jr. Effect of nerve growth factor on rat peritoneal mast cells. *J Biol Chem* 269: 2695-2702, 1994
- 8) Auffray I, Chevalier S, Froger J, Izac B, Vainchenker W, Gascan H, Coulombel L. Nerve growth factor is involved in the supportive effect by bone marrow-derived stromal cells of the factor-dependent human cell line UT-7. *Blood* 88: 1608-1618, 1996
- 9) Otten U, Ehrhard P, Peck R. Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 10059-10063, 1989
- 10) Thorpe LW, Perez-Polo JR. The influence of nerve growth factor on the in vitro proliferative response of rat spleen lymphocyte. *J Neurosci Res* 18: 134-139, 1987
- 11) Matsuda H, Coughlin MD, Bienenstock J, Denburg JA. Nerve growth factor promotes human hemopoietic colony growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6508-6512, 1988
- 12) Matsuda H, Kannan Y, Ushio H, Kiso Y, Kanemoto T, Suzuki H, Kitamura Y. Nerve growth factor induces development of connective tissue-type mast cells in vitro from murine bone marrow cells. *J Exp Med* 174: 7-14, 1991
- 13) Lachter J, Stein M, Lichting C, Eidelman S, Municor M.

- Mast cells in colorectal neoplasias and premalignant disorders. *Dis Colon Rectum* 38: 290-293, 1995
- 14) 佐藤 晋, 中島 厚, 小柳泰久. 大腸癌における PyNPase 産生活性化マクロファージと血管新生の検討. *日本大腸肛門病会誌* 51: 267-275, 1998
- 15) Hakansson L, Adell G, Boeryd B, Sjogren F, Sjodahl R. Infiltration of mononuclear inflammatory cells into primary colorectal carcinoma: an immunohistological analysis. *Br J Cancer* 75: 374-380, 1997
- 16) Dimitriadou V, Koutsilieris M. Mast cell-tumor cell interactions: for or against tumor growth and metastasis? *Anticancer Res* 17: 1541-1549, 1997
- 17) Ohtani H. Stromal reaction in cancer tissue: pathophysiologic significance of the expression of matrix-degrading enzymes in relation to matrix turnover and immune/inflammatory reactions. *Pathol Int* 48: 1-9, 1998
- 18) Kowalczyk D, Skorupski W, Kwias Z, Nowak J. Flow cytometric analysis of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with renal cell carcinoma. *Br J Urol* 80: 543-547, 1997
- 19) Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 267: 10931-10934, 1992
- 20) Sunderkotter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. Macrophage and angiogenesis. *J Leukoc Biol* 55: 420-422, 1994
- 21) Lahm H, Wyniger J, Hertig S, Yilmaz A, Fischer JR, Givel JC, Odartchenko N. Secretion of bioactive granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human colorectal carcinoma cells. *Cancer Res* 54: 3700-3702, 1994
- 22) Trutmann M, Terracciano L, Noppen C, Kloth J, Kaspar M, Peterli R, Tondelli P, Schaefer C, Zajac P, Heberer M, Spagnoli GC. GM-CSF gene expression and protein production in human colorectal cancer cell lines and clinical tumor specimens. *Int J Cancer* 77: 378-385, 1998
- 23) 鎌田 一, 村上普美, 佐土根朗, 池田政彦, 山口日出志, 松本明彦, 井出 渉, 橋本郁郎, 浮田博之. プロベントフィリンによるヒトグリオーマ細胞における NGF, trkA, Fas の up-regulation および bcl-2 の down-regulation とアポトーシスの誘導. *脳神経* 48: 1022-1028, 1996
- 24) 大腸癌研究会編. 大腸癌取り扱い規約, 改訂第5版, 金原出版, 東京, 1994
- 25) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
- 26) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed, p7-8, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989
- 27) Ohta T, Numata M, Tsukioka Y, Futagami F, Kayahara M, Kitagawa H, Nagakawa T, Yamamoto M, Wakayama T, Kitamura Y, Terada T, Nakanuma Y. Neurotrophin-3 expression in human pancreatic cancers. *J Pathol* 181: 405-412, 1997
- 28) 太田哲生, 北川裕久, 萱原正都, 伏田幸夫, 西村元一, 藤村 隆, 清水康一, 三輪晃一. 肝内結石症での慢性増殖性胆管炎における nerve growth factor (NGF) 蛋白の発現について. *胆と膵* 19: 1043-1049, 1998
- 29) Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, Hofer M, Hengerer B, Masiakowski P, Thoenen H, Barde YA. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341: 149-152, 1989
- 30) Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344: 339-341, 1990
- 31) Berkemeier LR, Winslow JW, Kaplan DR, Nikolics K, Goeddel DV, Rosenthal A. Neurotrophin-5: A novel neurotrophic factor that activates trk and trk B. *Neuron* 7: 857-866, 1991
- 32) Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF, Chao MV. High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 350: 678-683, 1991
- 33) Ehrhard PB, Erb P, Grawmann U, Otten U. Expression of functional trk protooncogene in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5423-5427, 1993
- 34) Emmett CJ, Mcneeley PA, Johnson RM. Evaluation of human astrocytoma and glioblastoma cell lines for nerve growth factor release. *Neurochem Int* 30: 465-474, 1997
- 35) Missale C, Iosa M, Sigala S, Balsari A, Giovannelli M, Spano PF. Nerve growth factor controls proliferation and progression of human prolactinoma cell lines through an autocrine mechanism. *Mol Endocrinol* 10: 272-285, 1996
- 36) Paul AB, Grant FS, Habib FK. The expression and localization of  $\beta$ -nerve growth factor ( $\beta$ -NGF) in benign and malignant human prostate tissue: relationship to neuroendocrine differentiation. *Br J Cancer* 74: 1990-1996, 1996
- 37) Muragaki Y, Chou TT, Kaplan DR, Trojanowski JQ, Lee VM. Nerve growth factor induces apoptosis in human medulloblastoma cell lines that express Trk A receptors. *J Neurosci* 17: 530-542, 1997
- 38) Geldof AA, Kleijn MATD, Rao BR, Newling DWW. Nerve growth factor stimulates in vitro invasive capacity of DU145 human prostatic cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 123: 107-112, 1997
- 39) Marchetti D, Menter D, Jin L, Nakajima M, Nicolson GL. Nerve growth factor effects on human and mouse melanoma cell invasion and heparanase production. *Int J Cancer* 55: 692-699, 1993
- 40) Descamps S, Lebourhis X, Delehedde M, Boilly B, Hondermarck. Nerve growth factor is mitogenic for cancerous but not normal human breast epithelial cells. *J Biol Chem* 273: 16659-16662, 1998

**Expression of nerve growth factor in colorectal cancer cells** Toshiaki Yasui, Department of Surgery II, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **108**, 349 — 359 (1999)

**Key words** colorectal cancer, nerve growth factor, *in situ* hybridization, reverse transcription-PCR, immunohistochemical staining

#### Abstract

Nerve growth factor (NGF) has well-characterized effects on the development and survival of neuronal cells. Moreover, it is also associated with the differentiation and survival of cells of the immune system. Colorectal cancers usually contain infiltrating migratory cells such as mast cells, macrophages and lymphocytes. It is hypothesised that colorectal cancer cells produce NGF, which acts on the immunocytes in colorectal cancer tissue and also affects the process of metastasis. This study was therefore designed to examine the expression of NGF at the mRNA and protein levels in colorectal cancers. Materials included 12 colorectal cancer cell lines, CaR-1, RCM-1, SW837, SW48, SW480, SW620, Colo201, Colo320DM, HT-29, LS174T, HCT-15 and DLD-1, also 27 surgically resected colorectal cancers. In 9 of 12 (75 %) colorectal cancer cell lines and in 25 of 27 (95 %) resected clinical colorectal cancer tissues the mRNA were positive in reverse transcription-PCR and *in situ* hybridization. Immunohistochemical staining demonstrated NGF protein in a fine granular pattern diffusely in the cytoplasm of the cancer cells in 9 of the cell lines and in 20 of the clinical samples. Every material positive for NGF protein inevitably showed positive expression of NGF at the mRNA level. The supernatant of the cell cultures which showed NGF protein expression stimulated neurite outgrowth in PC12 rat pheochromocytoma cells, and this phenomenon was inhibited by the addition of an anti-NGF monoclonal antibody. These findings suggest that most colorectal cancer cells synthesize and secrete biologically active NGF protein.