

特集 5

膵癌における神経栄養因子の浸潤誘導作用について

名古屋市立大学医学部第1外科

岡田 祐二 竹山 廣光 佐藤 幹則 真辺 忠夫

膵癌の神経浸潤、特に腹腔神経節浸潤の分子生物学的な機序解明を目的として、神経栄養因子 glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) の膵癌細胞に対する浸潤誘導作用について検討した。まず神経関連細胞の培養上清における GDNF 分泌および、膵癌細胞膜表面の ret 遺伝子 (GDNF receptor) の発現を確認した。そして in vitro invasion assay を用い浸潤誘導の評価を行ったところ、膵癌細胞は神経関連細胞と同時に培養すると膜浸潤能が有意に上昇し、抗 GDNF 抗体により有意に阻止される、という結果を得た。つまり GDNF が膵癌細胞の膜表面の ret receptor を介し、浸潤誘導因子として働いていることが示唆され、これは膵癌の神経浸潤の機序解明への1つの手がかりになると考えられた。

Key words: pancreatic cancer, tumor invasion

はじめに

癌の悪性度はその転移能と浸潤能によって規定されている。近年の分子学的手法の進歩により、発癌のメカニズムや転移成立などに関与する遺伝子群が同定され¹⁾、それらを用いた遺伝子治療も臨床に応用されつつある。しかし、癌の浸潤は、癌細胞の運動能や間質との相互作用などが複雑に絡み合っており、いまだ浸潤の機序解明はなされていない。

膵癌は他の消化器癌に比べ高率に神経浸潤を引き起こし、根治手術の大きな妨げになっている²⁾³⁾。これは解剖学的特徴のためか、また膵癌の悪性度によるものなのか、今のところ不明である。

腹腔神経節は交感神経節であり、ニューロン細胞とそれを取り囲むシュワン細胞やグリア細胞などから成り立っている。近年これら神経関連細胞からの nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3) などの神経栄養因子^{4)~6)}の分泌が確認され、主として神経細胞の分化・生存に大きく関与していることがわかってきた。特に最近、神経栄養因子の1つである glial cell line-derived neurotrophic factor (以下、GDNF と略す)⁷⁾

のレセプターが c-ret proto-oncogene (以下、ret と略す)⁸⁾⁹⁾であることが報告された¹⁰⁾¹¹⁾。

今回、我々は膵癌の神経浸潤の機序解明を目的とし、腹腔神経節より分泌されている神経栄養因子の、膵癌神経浸潤誘導作用について検討した。

対象と方法

ヒト膵癌細胞株として SW1900・PaCa-2・Capan-2・AsPC-1 神経関連細胞としてヒト glioblastoma: T98 G・A172, ヒト neuroblastoma: TGW・Nagai を使用した。

1. in vitro cell invasion assay

Biocoat Matrigel invasion chamber を用い、下層に神経関連細胞を前もって培養しておき、その後、上層の Matrigel で coat してある membrane 上に膵癌細胞を24時間培養し、その membrane を透過浸潤してきた細胞を membrane 裏面においてアルコール固定後、ギムザ染色し、その細胞数を位相差顕微鏡にて count し、浸潤誘導作用を検討した。またその浸潤誘導作用が抗 GDNF 抗体で阻止されるかどうか併せて行った。

2. northern blot

膵癌細胞より Isogen を使用し total RNA を抽出し、GDNF の receptor と報告されている ret gene の発現を northern blot 法にて確認した。

3. RT-PCR

膵癌細胞、神経関連細胞より RNA を抽出し、

* 第50回日消外会総会シンポ2・癌細胞と間質との相互関係からみた転移、浸潤の諸問題

<1997年12月3日受理>別刷請求先: 岡田 祐二

〒467-0001 名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄1 名古屋市

立大学医学部第1外科

GDNF, GDNFR- α , ret の発現を RT-PCR 法にて検討した。

4. EIA

Human GDNF immunoassay (Quantikine) を用いて、神経関連細胞の細胞抽出液、およびその培養上清における GDNF タンパク濃度を測定した。

5. western blot

膵癌細胞より細胞膜部分のタンパクを抽出し、ヒト抗 Ret 抗体を用いて ret タンパクの発現を western blot 法で検討した。

結果

1. in vitro cell invasion assay

膵癌細胞 PaCa-2, および AsPC-1 はヒト glioblastoma T98G・A172 との共培養により有意に浸潤細胞数が増加した (Fig. 1)。この浸潤誘導作用はヒト neuroblastoma TGW・Nagai でも認められたが、あまり著明ではなかった (Table 1)。またこの neural cell との共培養で認められた浸潤能誘導作用は抗 GDNF 抗体にて有意に阻止された (Fig. 2)。

2. northern blot

今回検討したすべての膵癌細胞において ret gene の発現を確認した。その発現程度はほぼ同じであった。

3. RT-PCR

Fig. 1 Induction of the in vitro invasion of pancreatic cancer cells cocultured with glial tumor cell lines.

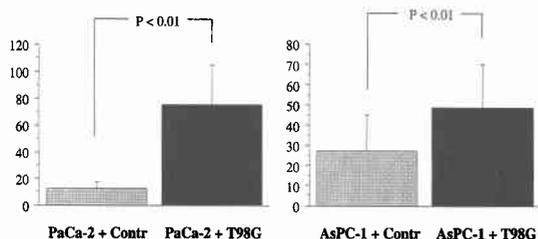
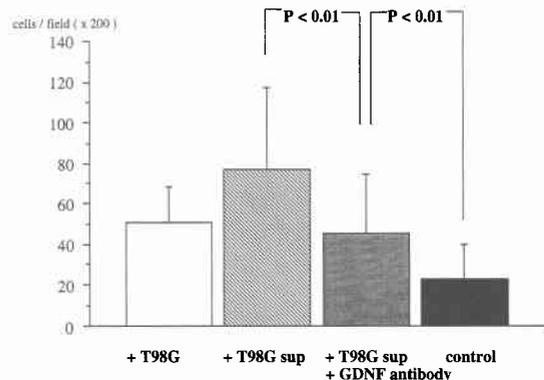


Table 1 Pancreatic-cell invasion induced by cocultured glial and neural tumor cells.

	neural cell			
	T98G	A172	TGW	Nagai
AsPC-1	↑	↑	↑	↑
PaCa-2	↑↑	↑↑	↑	↑
SW1990	↑	—	→	—
Capan-2	↑	—	→	—

Fig. 2 Inhibition by anti GDNF antibody of pancreatic cancer cell migration induced by the conditioned medium of cultured neural tumor cells.



T98G・A172においてGDNF mRNAの発現が認められた。その発現程度はT98Gにおいてより強く認められた。また神経系細胞ではGDNFR- α の発現は見られなかった。retの発現は今回検討したすべての膵癌細胞で認められた。

4. EIA

EIAではT98Gの培養上清においてのみGDNFを検出できた。その他の細胞の培養上清およびすべての細胞抽出液においては検出感度以下であった。

5. western blot

今回検討したすべての膵癌細胞の膜抽出液においてretタンパクの発現を確認した。

考察

腹腔神経節は交感神経であり、ニューロン細胞とその支持細胞であるシュワン細胞、グリア細胞および間質細胞からなっており、種々の神経栄養因子の分泌の可能性がある。

今回検索したすべての膵癌細胞に、GDNFの機能的チロシンキナーゼレセプターであるret geneとretタンパクの発現を認めた。グリア系細胞においてGDNF mRNAとGDNFタンパクの発現を認めた。in vitro invasion assayの結果により、retタンパクを発現している膵癌細胞は選択的にグリア系、神経系細胞に向かって浸潤していくことが明瞭に示された。そして、この浸潤誘導はグリア系、神経系細胞の培養上清に抗GDNF抗体を添加することによって抑えられた。これらの結果より、神経栄養因子GDNFには、膵癌細胞膜表面に存在するretレセプターを介して、膵癌細胞に

対し、浸潤誘導作用があると考えられた。

最近GDNFがリガンド結合タンパクであるGDNFR- α ¹²⁾と複合体を形成し、Retレセプターを介して神経細胞の生存をmediateしている、という報告がなされた。我々も膵癌細胞におけるGDNFR- α の発現の有無をRT-PCR法にて試みたが、今回の検討では発現が認められなかった。つまり、GDNFR- α ではなくretレセプターが主に、GDNFの膵癌細胞に対する浸潤作用を担っていると考えられた。このことはTruppら¹¹⁾¹²⁾が、GDNFはGDNFR- α との相互作用なしで、retレセプターに単独で結合する能力があるという報告によっても支持される。

GDNFはTGF- β superfamilyの1つであり、2量体を形成後、GDNFR- α と結合し、または単独で標的細胞膜表面にあるretレセプターと受容体複合体を形成する。これによりチロシンキナーゼの活性化が生じ、種々のチロシン残基のリン酸化により、細胞内シグナル伝達に関与し、最終的に細胞増殖や細胞運動などに影響を及ぼしていると考えられる。

抗GDNF抗体による浸潤抑制実験では、コントロールのレベルまでの抑制は見られなかった。膵癌の浸潤にはNGF、BDNFなどの他の神経栄養因子やEGF、HGF、VEGF、b-FGF^{14)~16)}などの成長因子の関与も考えられた。

今回使用しているin vitro cell invasion assayは、基底膜の再構成成分でcoatしたmembraneへの癌細胞の浸潤により、独立した因子の浸潤誘導作用が評価可能なmodelであり、各因子ごとの作用を定量化することにより比較検討が可能であり、癌浸潤における各種因子の決定に際し、有用であった。

臨床的に見ると、本研究結果は膵癌の好神経性の機序解明の1つの手掛かりになると考えられ、アンチセンスの導入、アンタゴニストの開発、抗体の使用などにより、この浸潤メカニズムを制御することにより膵癌治療の根治性を高められる可能性が示唆された。

文 献

- 1) Sato M, Narita T, Kimura N et al: Interaction between human cancer cells and cultured murine endothelial cells, and its relationship with metastatic potential. *Int J Oncol* 10 : 1173—1178, 1997
- 2) Conlon KC, Klimstra DS, Brennan MF: Long-term survival after curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. Clinicopathologic analysis of 5-year survivors. *Ann Surg* 223 : 273—279, 1996
- 3) Nagakawa T, Mori K, Nakano T et al: Perineural invasion of carcinoma of the pancreas and biliary tract. *Br J Surg* 80 : 619—621, 1993
- 4) Levi-Montalcini R: The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237 : 1154—1162, 1987
- 5) Barde YA, Edgar D, Thoenen H: Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1 : 549—553, 1982
- 6) Hohn A, Leibrock J, Bailey K et al: Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344 : 339—341, 1990
- 7) Lin LF, Doherty DH, Lile JD et al: GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons [see comments]. *Science* 260 : 1130—1132, 1993
- 8) Takahashi M, Rutz J, Cooper GM: Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell* 42 : 581—588, 1985
- 9) Takahashi M, Buma Y, Iwamoto T et al: Cloning and expression of the ret proto-oncogene encoding a tyrosine kinase with two potential transmembrane domains. *Oncogene* 3 : 571—578, 1988
- 10) Durbec P, Marcos-Gutierrez CV, Kilkenny C et al: GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase [see comments]. *Nature* 381 : 789—793, 1996
- 11) Trupp M, Arenas E, Fainzilber M et al: Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene [see comments]. *Nature* 381 : 785—788, 1996
- 12) Jing S, Wen D, Yu Y et al: GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell* 85 : 1113—1124, 1996
- 13) Trupp M, Belluardo N, Funakoshi H et al: Complementary and overlapping expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), c-ret proto-oncogene, and GDNF receptor-alpha indicates multiple mechanisms of trophic actions in the adult rat CNS. *J Neurosci* 17 : 3554—3567, 1997
- 14) Matsumoto K, Date K, Shimura H et al: Acquisition of invasive phenotype in gallbladder cancer cells via mutual interaction of stromal fibroblasts and cancer cells as mediated by hepatocyte growth factor. *Jpn J Cancer Res* 87 : 702—710, 1996
- 15) Karameris A, Kanavros P, Aninos D et al:

Expression of epidermal growth factor (EGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in gastric and colorectal carcinomas. An immunohistological study of 63 cases. *Pathol Res Pract* **189** : 133–137, 1993

16) Ohta T, Yamamoto M, Numata M et al: Expression of basic fibroblast growth factor and its receptor in human pancreatic carcinomas. *Br J Cancer* **72** : 824–831, 1995

Neurotrophic Factor Derived Invasion of Pancreatic Cancer

Yuji Okada, Hiromitsu Takeyama, Mikinori Sato and Tadao Manabe
First Department of Surgery, Nagoya City University Medical School

Pancreatic cancer characteristically has a high incidence of neural invasion, leading to a pessimistic prognosis of a curative operation. We have recently examined the possibility that trophic action of GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) induces the directed migration of human pancreatic tumor cells toward neural tissues, by using an in vitro invasion assay for assaying chemotaxis and chemokinesis. In the invasion assay, marked migration of pancreatic cancer cells was induced by cocultivation with human glioma cells capable of producing GDNF and its extracellular secretion. Anti-GDNF antibody suppressed a majority of the migratory activity in the conditioned medium of glioma cells. The results led us to postulate that human pancreatic tumor cells expressing a c-ret proto-oncogene invade human ganglions along a concentration of GDNF, produced by neural tissues.

Reprint requests: Yuji Okada First Department of Surgery, Nagoya City University Medical School
1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya, 467-0001 JAPAN
