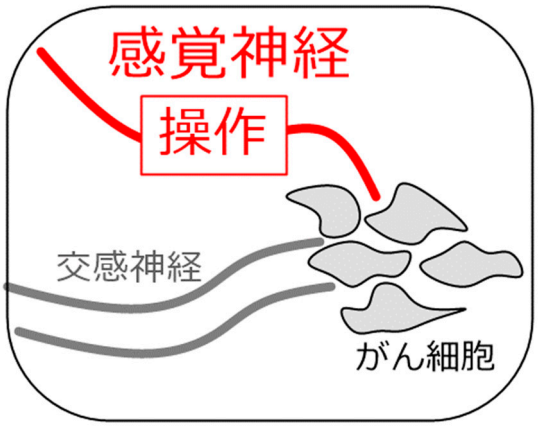
78　神経のイメージングと操作によるがん神経医療の開発	神谷　厚範

【目的】自律神経系（および感覚神経）は、正常な器官に対して分布して機能調節するだけでなく、最近、がん組織と連関する可能性が見出されている。たとえば、がん細胞には、交感神経や副交感神経の神経伝達物質を受け取ることの出来る、受容体が発現していることが多くある。また、がん組織は、がん細胞だけでなく、非がん細胞（免疫細胞、内皮細胞、線維芽細胞など）によって、腫瘍微小環境を構成している。この腫瘍微小環境内の非がん細胞もまた、交感神経や副交感神経の神経伝達物質に対する受容体が発現していることが多くある。このため、自律神経系は、がん細胞に直接影響を及ぼしたり、また、非がん細胞に作用して間接的にがんに影響を及ぼしたりすることによって、がんの動態に連関する可能性が高い。そこで、本研究では、皮膚に発生する悪性黒色腫（メラノーマ）を対象として、感覚神経ががん組織に分布するかどうか、また、感覚神経ががんにどのように影響し得るかを、検討することを目的とした。

【方法】C57BL6/J マウスにカプサイシンを複数回に渡って皮下注射し（1 日目と 2 日目、カプサイシン 10 mg/kg ; 3 日目、15 mg/kg ; 11 日目と 12 日目、10 mg/kg ; 13 日目、15 mg/kg）、感覚神経を除去した。C57BL6/J マウス由来のメラノーマ細胞である B16-F10 細胞（5.0×10^4個）をマトリゲルと混合して、マウス右腹部（鼠径部）の皮下に移植し、メラノーマモデルマウスを作製した。細胞移植 9 日後に、マウスを灌流固定し、腫瘍サイズを計測し、腫瘍組織の凍結切片を作製して免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡でイメージング解析した。

【結果】がん組織に分布する神経のイメージング解析 : B16F10 細胞をマウスの右腹部の皮下に移植して 9 日後にマウスから摘出したがん組織を免疫染色解析したところ、感覚神経マーカーCGRP 陽性神経が腫瘍組織に分布し、特に、腫瘍塊内の辺縁部と腫瘍塊周囲の間質部分に相対的に高い頻度で走行していた。さらに、血管内皮細胞マーカーCD31 を用いて多重染色したところ、この CGRP 陽性の感覚神経は、CD31 陽性の血管の近くを走行することが多いことが、観察された。辛み成分受容体 TRPV1 のアゴニストであるカプサイシンを投与して、感覚神経を除去した後、B16-F10 細胞をマウスに細胞移植して、メラノーマモデルマウスを作製したところ、細胞移植 9 日後のがんの大きさは、カプサイシン投与群では、コントール群に比べて、腫瘍サイズが有意に大きかった。

神経系とがんの連関、および、神経系の操作によってがんを抑制する構想



78. 神経のイメージングと操作によるがん神経医療の開発

神谷　厚範

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 細胞生理学

Key words：感覚神経，自律神経，がん

緒　言

自律神経系（および感覚神経）は、全身のほとんど全ての器官に分布して、その臓器機能を調節することによって、生体恒常性（循環器系、消化器系、エネルギー代謝系、体温調節系、呼吸器系、免疫系など）を維持する役割を果たしている［1〜2］。この正常な器官に対する機能調節に加えて、自律神経系（および感覚神経）は、最近、がん組織と連関する可能性が見出されている［3〜5］。たとえば、がん細胞には、交感神経や副交感神経の神経伝達物質を受け取ることの出来る、受容体が発現していることが多くある。また、がん組織は、がん細胞だけでなく、非がん細胞（免疫細胞、内皮細胞、線維芽細胞など）によって、腫瘍微小環境を構成している。この腫瘍微小環境内の非がん細胞もまた、交感神経や副交感神経の神経伝達物質に対する受容体が発現していることが多くある。このため、自律神経系は、がん細胞に直接影響を及ぼしたり、また、非がん細胞に作用して間接的にがんに影響を及ぼしたりすることによって、がんの動態に連関する可能性が高い。そこで、本研究では、皮膚に発生する悪性黒色腫（メラノーマ）を対象として、感覚神経ががん組織に分布するかどうか、また、感覚神経ががんにどのように影響し得るかを、検討することを目的とした。

方　法

1. メラノーマモデルマウスの作製、および、がん組織に分布する神経のイメージング解析

本実験は動物実験委員会で承認され、岡山大学動物実験実施規則に従って実施した。C57BL6/J マウス由来のメラノーマ細胞である B16-F10 細胞（5.0×10^4個）を、マトリゲルと混合し、マウス右腹部（鼠径部）の皮下に移植することによって、メラノーマモデルマウスを作製した。細胞移植 9 日後に、マウスに麻酔をかけて、灌流固定した。そして腫瘍塊を摘出、後固定し、スクロースで処理した後、O.C.T compound（サクラファインテック）と液体窒素を用いて包埋した。クライオスタット（ライカ）を用いて、凍結切片を作製し、抗原賦活化、透過処理、ブロッキング、1 次抗体および 2 次抗体による処理、DAPI による核染色を行った。1 次抗体として、CGRP（カルシトニン遺伝子関連ペプチド）抗体、および、CD31（PECAM-1）抗体を用いた。CGRP 抗体は、感覚神経のマーカー、CD31 は、血管内皮細胞のマーカーとして用いた。この免疫染色したスライドガラスを、共焦点レーザー顕微鏡（FV1000、OLYMPUS）で観察し、イメージング解析した。

2. 感覚神経の除去、および、がんの測定

アトロピンを腹腔内注射（5 mg/kg）した直後に、感覚神経を除去するために、12 週齢 C57BL6/J マウスにカプサイシン（sigma、M2028-1G）を皮下注射した。カプサイシンは、10%エタノール、10% Tween-80、80% PBS に溶解し、濃度調整し、複数回に渡って皮下注射した（1 日目と 2 日目、カプサイシン 10 mg/kg；3 日目、15 mg/kg；11 日目と 12 日目、10 mg/kg；13 日目、15 mg/kg）。感覚神経の除去率を、非がん組織の皮膚の CGRP 免疫染色で評価した。そのあと、B16-F10 細胞をマウス皮下に細胞移植し、9 日後に、マウスを灌流固定し、がんの大きさを測定し、さらに、上記 1 のように、がん組織のイメージング解析を行った。また、腫瘍微小環境や皮膚、骨髄における免疫細胞の解析にも取り組んだ。

結　果

1. がん組織に分布する神経のイメージング解析

C57BL6/J マウス由来の B16F10 メラノーマがん細胞を同系統のマウスの右腹部の皮下に移植して、9 日後にがん組織を摘出し、免疫染色解析した。その結果、感覚神経マーカーCGRP 陽性神経が腫瘍組織に分布し、特に、腫瘍塊内の辺縁部と腫瘍塊周囲の間質部分に相対的に高い頻度で走行していることが明らかになった（図 1）。健常組織では、神経は、血管と並走することが良く観察される。そこで、血管内皮細胞マーカーCD31 を用いて多重染色したところ、この CGRP 陽性の感覚神経は、CD31 陽性の血管の近くを走行することが多いことが、観察された。

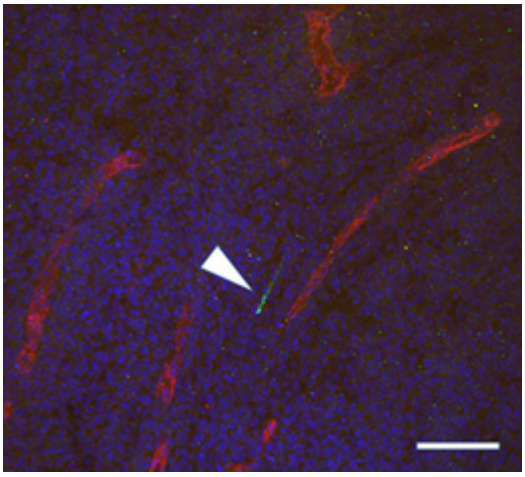


図 1. メラノーマの腫瘍微小環境に分布する感覚神経
マウスにメラノーマ細胞を移植することによって、担がんモデルマウスを作製し、9 日後に、腫瘍を摘出、固定し、がん組織の免疫染色解析を行った。CGRP（緑色）、CD31（赤色）、DAPI（青色）。図中▽は、CGRP 陽性の感覚神経線維を示す。スケールバー：100μm。

2. 感覚神経の除去が、がんに及ぼす影響

唐辛子辛み成分の受容体である TRPV1 のアゴニストであるカプサイシンを投与して、感覚神経を除去した。その後、B16-F10 細胞をマウスに細胞移植して、メラノーマモデルマウスを作製した。細胞移植 9 日後のがんの大きさを計測したところ、カプサイシン投与群では、コントール群に比べて、腫瘍サイズが有意に大きかった（図 2）。

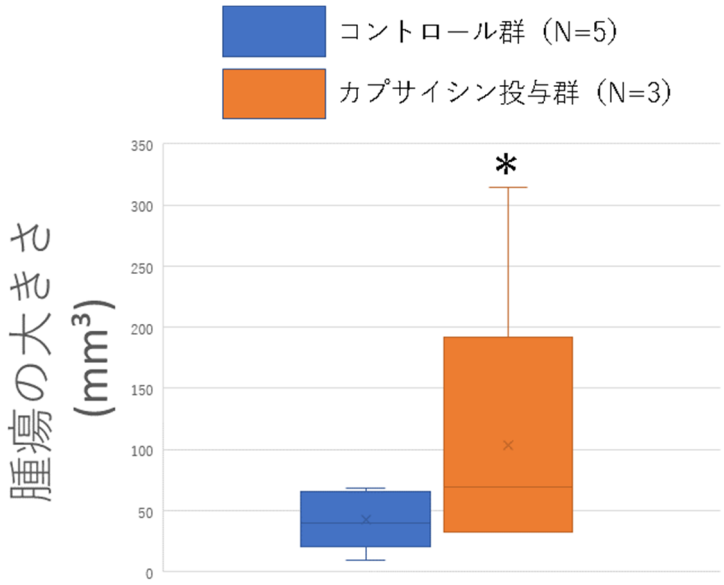


図 2. 感覚神経除去がメラノーマ腫瘍サイズに及ぼす影響

カプサイシンを複数回投与（あるいは、コントロール群として生理食塩水を投与）して、感覚神経を除去した。その後、マウスにメラノーマ細胞を移植することによって、担がんモデルマウスを作製し、9 日後の腫瘍サイズを検討した。カプサイシン投与群では、コントロール群と比して、9 日後の腫瘍の大きさが、有意に大きかった。カプサイシン投与群、N=3；コントール群、N=5。箱ひげ図で表示。統計はマン・ホイットニーU 検定を用い、＊は P<0.05 を示す。

考　察

神経系は、血管と同じく、すべての正常組織や器官に分布する基本的な構造物であるにも関わらず、がん組織に神経が分布する可能性については、長い間、注目されてこなかった。がん細胞には、神経細胞から分泌される神経伝達物質やペプチドに対する、神経系受容体（アドレナリン受容体、ムスカリン受容体、神経ペプチドに対する各種受容体等）が発現していることが多く観察される。また、非がん細胞（免疫細胞、内皮細胞、線維芽細胞等）もまた、これらの神経系受容体を発現していることが多い。このため、腫瘍微小環境に神経が分布し、がん細胞や非がん細胞に作用して、がんの動態に影響を及ぼす可能性が、大いに考えられる。本研究は、このような考えに基づいて、感覚神経とメラノーマの連関について検討した。マウスのメラノーマモデルにおいて、感覚神経線維はがん組織に分布していた。また、このがん組織に分布する感覚神経を人為的に除去したところ、腫瘍がより増大したことから、この感覚神経線維は、腫瘍増大を抑制するような機能を持つ可能性が示唆された。メラノーマは、多くのがん種の中において最も治療困難で生命予後の悪いがんであるため、従来研究とは異なる視点からの治療法の開発が必要とされている。本研究で観察された、メラノーマと神経系の連関は、この新たな治療に繋がる端緒となる可能性がある。

共同研究者

本研究の共同研究者は、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞生理学研究室の檜山武史である。

文 献

1) Karemaker JM. An introduction into autonomic nervous function. Physiol Meas 2017; 38:R89–R118. PMID: 28304283 DOI: 10.1088/1361-6579/aa6782
2) Wehrwein EA, Orer HS, Barman SM. Overview of the anatomy, physiology, and pharmacology of the autonomic nervous system. Compr Physiol 2016; 6:1239–1278. PMID: 27347892 DOI: 10.1002/cphy.c150037
3) Cole SW, Nagaraja AS, Lutgendorf SK, Green PA, Sood AK. Sympathetic nervous system regulation of the tumour microenvironment. Nat Rev Cancer 2015; 15:563–572.PMID: 26299593 PMCID: PMC4828959 DOI: 10.1038/nrc3978
4) Hanoun M, Maryanovich M, Arnal-Estape A, Frenette PS. Neural regulation of hematopoiesis, infammation, and cancer. Neuron 2015; 86:360–373. PMID: 25905810 PMCID: PMC4416657 DOI: 10.1016/j.neuron.2015.01.026
5) Zahalka AH, Frenette PS. Nerves in cancer. Nat Rev Cancer 2020; 20:143–157. PMID: 31974491 PMCID: PMC7709871 DOI: 10.1038/s41568-019-0237-