

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20302

研究課題名(和文) 神経芽腫における血管新生系を標的としたPIポリアミドによる抗腫瘍効果の検討

研究課題名(英文) Anti-tumor effect of Pyrrole-Imidazole Polyamide(PIP) targeting angiogenic system in neuroblastoma

研究代表者

植草 省太 (UEKUSA, Shota)

日本大学・医学部・専修医

研究者番号：70746338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：悪性腫瘍が増殖・進展する上で必須の血管新生機構において、neuropilin1 (NRP1)は促進因子として働いている。しかし、神経芽腫におけるNRP1の役割は不明な点も多く、神経芽腫の細胞機能に対するNRP1の役割を検討した。さらにNRP1を標的とした遺伝子選択的発現制御薬Pyrrole-Imidazole Polyamide (PIP)を用い、神経芽腫に対する新規治療薬となり得るかを検討した。その結果、PIPの投与では有意な抑制効果は得られなかった。また、ヒト神経芽腫細胞株SK-N-ASにおいて、NRP1の発現抑制によりIntegrin 1の発現が上昇し、腫瘍細胞の浸潤・遊走能が亢進した。

研究成果の概要(英文)：Although it has been known that neuropilin1 (NRP1) has a promoting effect in vascularization, which is critical process in growth and progression of malignant tumors, the function of NRP1 in neuroblastoma cells is still unclear. In the present study, we conducted functional analyses of NRP1 to elucidate its roles in the development and/or promotion of neuroblastoma. In addition, we synthesized pyrrole imidazole polyamides (PIP) targeting to NRP1, and investigated its potential as therapeutic agents for neuroblastoma. Our current result demonstrated that the PIPs we designed did not suppress the expression of NRP1 in neuroblastoma cells. siRNA mediated silencing of NRP1 in neuroblastoma derived SK-N-AS cells resulted in up-regulation of Integrin b1, and promotion of cell migration and invasion.

研究分野：小児腫瘍学

キーワード：神経芽腫 機能解析 細胞浸潤能

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は、交感神経節や副腎髄質などクロム親和性細胞を有する組織に多く発生する腫瘍である。小児がんの中で、白血病、脳腫瘍に次いで見られ、年間で約 200 症例が新規に発症している。治療には、手術療法、化学療法、放射線療法を組み合わせた集学的治療が行われているが、進行例の 5 年生存率は 40%程度であり、腫瘍特異的に作用する新規治療薬の開発が喫緊の課題となっている。

低酸素・低栄養状態に置かれる悪性腫瘍において、血管新生は増殖・浸潤の重要な因子である。その促進因子として、血管内皮細胞の活性を促す Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs) や、血管周囲の基底膜や間質成分を分解する

Matrix Metalloproteinases (MMPs) の過剰発現が大きく関与している。血管新生におけるシグナル伝達経路は、VEGFs が各々の受容体に結合することで生じるものが増えている。その中でも、VEGFA の splicing variant の一つである VEGFA₁₆₅ が受容体型チロシンキナーゼである VEGFR2 と結合し自己リン酸化する経路が明らかとなっており、Neuropilin 1 (NRP1) が VEGFA₁₆₅ の結合ドメインと結合し、シグナル伝達を増強させることが知られており、VEGFs や MMPs に加え、NRP1 も悪性腫瘍の血管新生において重要な因子であると考えられる。

これらの神経芽腫における機構は種々解析されており、MMPs については、進行例で isoform である MMP2 および MMP9 の高発現状態と、浸潤・遊走の促進が明らかとなっている (Lu HF, et al. Neurochem Res. 2009)。また、VEGFA、NRP1 については病期の進行に伴い発現に負の相関があることが確認されている (Fakhari M, et al. Cancer. 2002) が、神経芽腫における NRP1 の役割に関しては不明な点も多い。

我々は、ヒト神経芽腫細胞株 (NB1、NB9、NB69、SK-N-SH) を用いて NRP1 の発現状態を確認し、NB1 において siRNA による発現抑制を行った。その結果、siRNA 投与群で形態的に細胞質の縮小が見られ、cell viability の低下がみられた。これらの結果より、NRP1 が神経芽腫において細胞増殖に関与している可能性が示唆される。

Pyrrrole-Imidazole Polyamide (PIP) は、その配列デザインにより任意の塩基配列特異的に認識・結合することが可能な、生体にも投与できる化合物である。また、細胞内容易に取り込まれ、siRNA よりも安定であることから、新規ゲノム制御薬として非常に有望な分子である。我々は、腎細胞癌において MMP9 の promoter 領域の AP-1 結合領域を標的とした PIP を合成し、抗腫瘍効果が得られたことを報告した (Sato A, et al. Int J Oncol. 2013)。

さらに我々は、MMP9 の promoter 領域の AP-1 結合領域を標的とした PIP に加え、NRP1

の promoter 領域に位置し、NRP1 の発現を制御する Sp1 結合領域を標的とした PIP をそれぞれ作製し、配列特異的遺伝子への結合を確認している。

2. 研究の目的

悪性腫瘍の増殖・進展に重要な血管新生因子の中で Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs)、Neuropilin 1 (NRP1) が促進因子として大きく関わっている。神経芽腫においては VEGFs が腫瘍の増殖・浸潤に重要な因子であることが既に報告されているものの、VEGFs が受容体と結合する際に親和性を高めるとされる NRP1 の役割については不明な点が多い。今回我々は、NRP1 に着目し、神経芽腫における NRP1 の機能を解析する。さらに NRP1 を標的とした PIP を用い、神経芽腫に対する将来の新規治療薬となり得るかを検討する。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* における PIP の抗腫瘍効果の検討

NRP1 の promoter 領域に位置し、NRP1 の発現を制御する Sp1 結合領域を標的とした Pyrrole-Imidazole Polyamide (PIP) を作製し、NRP1 抑制による神経芽腫細胞の特性の変化を *in vitro* において検証する。

ヒト神経芽腫細胞株を用い、PIP による NRP1 抑制効果を解析するため、濃度、時間を変えて PIP を投与し、Real-time RT-PCR で解析する。

一方、MMP9 高発現の神経芽腫細胞株に対し、MMP9 を標的とした PIP による発現抑制効果を同様に解析した。

(2) NRP1 高発現株の機能解析

ヒト神経芽腫細胞株 (NB1、NB9、NB69、SK-N-SH) のうち、NRP1 の高発現を示す細胞株に Lipofection 法で siRNA を導入する。NRP1 の発現抑制による腫瘍への影響を細胞増殖能: WST-8 assay、細胞浸潤能: Matrigel invasion assay、細胞遊走能: Wound healing assay を行い、検討する。

細胞増殖能: WST-8 assay

NRP1 siRNA、および Control siRNA を SK-N-AS に transfect し、 1.0×10^4 個/100 μ l/well になるように 96well plate に播種した。その後培養を行い、12、24、36、48 時間後に吸光度を測定した。

細胞浸潤能: Matrigel invasion assay
予め Fibronectin (Sigma Aldrich, St Louis, Mo, USA) でコートした invasion chamber (Corning, NY, USA) に NRP1 siRNA、および Control siRNA を transfect した SK-N-AS を 7.5×10^4 個/300 μ l/well に調

整して播種した。48 時間後に Gimsa 染色で通過した細胞を染色し、光学顕微鏡 200 倍で各 5 視野ずつ 3well カウントした。

細胞遊走能:Wound healing assay

24well plate に 2.0×10^5 個/500 μ l/well となるように SK-N-AS を播種し、NRP1 siRNA、および Control siRNA を transfect した。siRNA 投与 24 時間後に Cell Scratcher Scratch stick (AGC TECHNO GLASS, Shizuoka, Japan) を用いて dish の底面を擦過し、間隙を作製した。48 時間培養し、擦過直後と 48 時間培養後の間隙面積を Lumina Vision (Mitani co, Tokyo, Japan) を用いて算出した。

(3) 関連因子の解析

上記(2)において、浸潤・遊走能に変化があった。NRP1 の発現を抑制し、浸潤・遊走能に 関与する蛋白として Integrin 1、Vimentin、E-Cadherin、N-Cadherin、Matrix Metalloproteinase(MMP)-2、MMP-9 の発現を Western blotting により解析した。Integrin 1 下流の活性について、FAK-PI3K 経路のリン酸化状態を Western blotting で解析し、Integrin 1 下流の F-actin の重合を Phalloidin 染色で評価した。

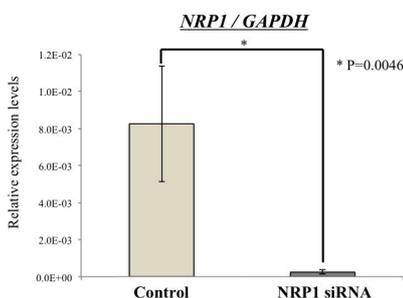
4. 研究成果

(1) *in vitro* における PIP の抗腫瘍効果の検討

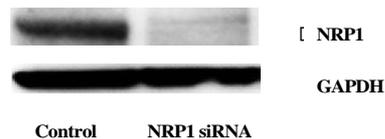
ヒト神経芽腫細胞株で NRP1 高発現の SK-N-AS を用い、濃度、時間を変えて PIP を投与したが、有意な NRP1 の抑制効果は得られなかった。また、MMP9 を標的とした実験において濃度、時間を変えて PIP を投与したが、有意な MMP9 の抑制効果は得られなかった。

(2) NRP1 高発現株の機能解析

SK-N-AS に対し、NRP1 siRNA および Control siRNA を投与し、48 時間後に、Real-time RT PCR により mRNA レベルの発現を定量した結果、NRP1 siRNA 投与群で有意な発現低下を認めた ($P=0.0046$)。



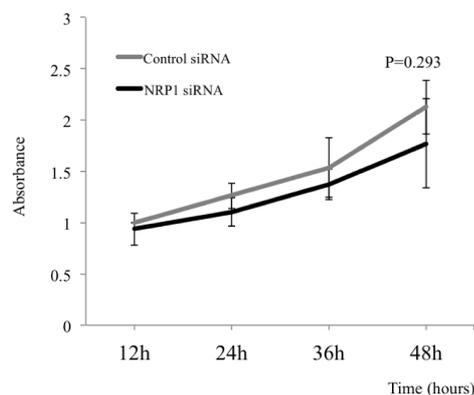
また、蛋白レベルにおける NRP1 の発現も NRP1 siRNA 投与群で十分に抑制されていることを Western blotting により確認した。



NRP1 抑制状態で、以下の検討を行った。

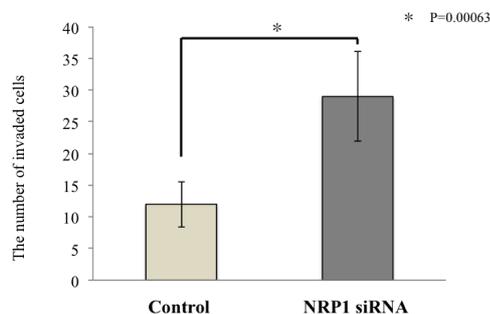
細胞増殖能:WST-8 assay

Control 群と比較して、NRP1 siRNA 投与群は類似した増殖曲線を示し、48 時間後においても有意な生存率の差は認めなかった ($P=0.293$)。



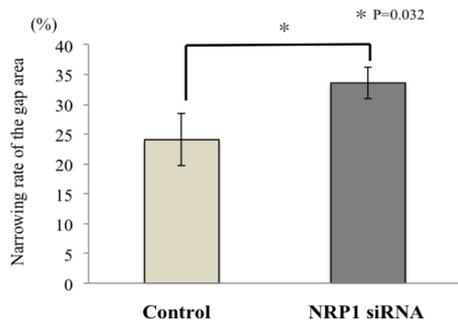
細胞浸潤能:Matrigel invasion assay

Control 群では 12.0 ± 3.6 個であったのに対して、SEMA3A siRNA 投与群では 28.8 ± 4.5 個であり、有意な細胞浸潤能の亢進を認めた ($P=0.000059$)



細胞遊走能:Wound healing assay

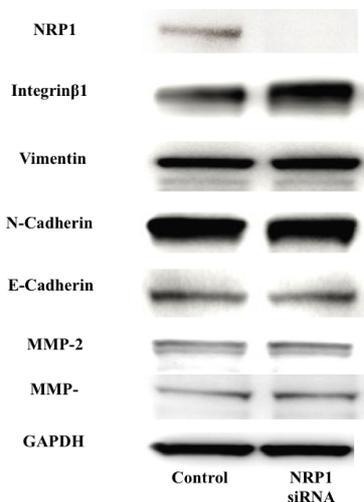
Control 群では縮小率の平均値は $24.0 \pm 4.4\%$ だったのに対し、SEMA3A siRNA 投与群では $37.5 \pm 3.6\%$ であり、遊走能の有意な亢進を認めた ($P=0.015$)



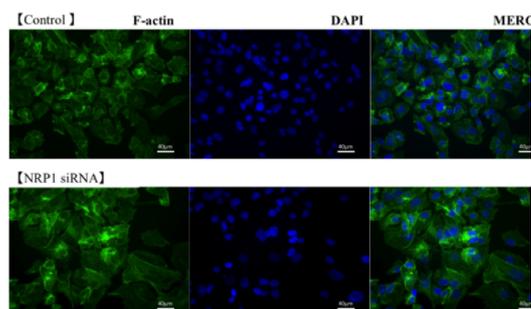
(3) 関連遺伝子の解析

NRP1 の発現抑制により、Integrin 1 の発現が亢進した(i)。さらに Integrin 1 下流の FAK-PI3K 蛋白のリン酸化の亢進と F-actin の重合の亢進を認めた(ii)。

(i)



(ii)



Integrin 1 は細胞膜上で Integrin とサブユニットを形成し、細胞外基質との結合性を高め、腫瘍の進展に関与するほか、細胞内では、FAK-PI3K 経路を介して細胞浸潤・遊走のシグナルを伝達する。本実験の結果、NRP1 発現の減弱により増加した Integrin 1 発現によって、神経芽腫細胞の浸潤や転移が起こりやすくなる可能性が示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

石塚悦昭、植草省太、越永従道(11人中7番) ヒト神経芽腫における NRP1 の機能の検討、第 53 回日本小児外科学会学術集会、2016 年 5 月 24 日、ヒルトン福岡シーホーク(福岡県・福岡市)

石塚悦昭、植草省太、越永従道、神経芽腫における NRP1 を介した腫瘍制御機構の検討、(12 人中 6 番) 第 116 回日本外科学会定期学術集会、2016 年 4 月 15 日、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

石塚悦昭、植草省太、越永従道(12 人中 6 番) 神経芽腫における SEMA3A による腫瘍制御機構の検討、第 57 回日本小児血液・がん学会学術集会、2015 年 11 月 27 日、甲府富士屋ホテル(山梨県・甲府市)

〔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〕

ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植草 省太 (UEKUSA, Shota)

日本大学・医学部・専修医

研究者番号：70746338