

令和元年9月2日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17006

研究課題名(和文) ヒト神経芽腫に対するSemaphorin 3による抗腫瘍効果の検討

研究課題名(英文) Anti-tumor effect of class-3 semaphorins in neuroblastoma

研究代表者

星 玲奈 (HOSHI, Reina)

日本大学・医学部・専修医

研究者番号：20793772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Semaphorin 3 (SEMA3)は近年、様々な癌腫で腫瘍の増殖、浸潤、転移を抑制すると報告されている。本研究では神経芽腫におけるSEMA3の抗腫瘍効果について検討した。ヒト神経芽腫細胞株にSEMA3A、3B、3Fを投与し機能解析を行った。その結果、SEMA3A投与により細胞遊走能の抑制が認められた。siRNAによりSEMA3Aの発現を抑制すると、Integrin 1の発現が上昇し、腫瘍細胞の浸潤・遊走能が亢進することが考えられた。このことから、SEMA3Aは神経芽腫においてIntegrin 1を抑制することで抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経芽腫は小児の悪性固形腫瘍では脳腫瘍に次いで頻度が高い疾患である。高リスク群の神経芽腫では集学的治療を行っているものの、未だ予後不良であり、新規治療法の開発が喫緊の課題である。本研究結果から、SEMA3Aは神経芽腫においてIntegrin 1を抑制することで抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。このことから、神経芽腫においてSEMA3Aを標的とした新規治療法の可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The class 3 semaphorins (SEMA3s) have been shown to be tumor suppressors in various cancer. Although it has been reported that Neuropilins (NRPs) are expressed at higher levels in neuroblastoma (NB) tissue compared to normal adrenal tissues, the role of their ligand SEMA3s in NB have not yet been elucidated. In the present study, we investigated the role of SEMA3s in NB. We examined the effects of human recombinant SEMA3A, SEMA3B, SEMA3F on proliferation, migration, and invasion of NB-derived cells. NB-derived SK-N-AS cells exhibited reduced migration when treated with recombinant SEMA3A. The silencing of SEMA3A results in the promotion of the migratory and invasive abilities of SK-N-AS cells, along with the upregulated expression of 1 integrin. The results presented herein indicated that SEMA3A exerts tumor suppressive effects by regulating the expression of 1 integrin in NB.

研究分野：医歯薬学

キーワード：小児腫瘍学 神経芽腫 Semaphorin Neuropilin 細胞浸潤能 細胞遊走能 Integrin 1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は胎生期の神経堤細胞に由来する未分化な胎児性腫瘍であり、小児の悪性固形腫瘍では脳腫瘍に次いで頻度が高い。高リスク群の神経芽腫では、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を行っているものの、未だ予後不良である。難治性の神経芽腫に対し、13-cis Retinoic Acid (RA) が未分化な神経芽腫細胞を成熟した神経節腫細胞に分化を誘導する作用がある (Esposito CL, et al. PLoS One. 2008.) ことから、欧米では治療薬として用いられているが、13-cis RA に反応しない腫瘍も多く (Reynolds CP, et al. Cancer Lett. 2003.) 新規治療法の開発が喫緊の課題である。

一方で、細胞間シグナル伝達に関わるタンパクの Semaphorin 3 (SEMA3) は細胞膜受容体である Neuropilin (NRP) を介して神経軸索伸長を制御するガイダンス因子として知られており (He Z, et al. Cell. 1997.) さらに近年、悪性腫瘍の進展制御にも重要な役割を担うことが明らかとなってきた。SEMA3 は NRP1 および NRP2 の結合ドメインの違いから A~G の7つのサブタイプが存在する。その1つである SEMA3A は、マクロファージや線維芽細胞から分泌され、Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs) シグナルと拮抗することで血管新生を抑制する (McKenna, et al. Dev Biol. 2014.) 他、胃癌 (Tang C, et al. Int J Clin Exp Pathol. 2014.) 皮膚癌 (Chakraborty G, et al. PLoS One. 2012.) など、多くの癌腫で腫瘍の増殖、浸潤、転移を抑制すると報告されている。また、正常組織においては、SEMA3A が特異的受容体である NRP1 を介して骨芽細胞の分化を促進することが認められている (Hayashi M, et al. Nature. 2012.)。このように、SEMA3A は神経ガイダンス、腫瘍進展制御、細胞分化と多彩な機能を有することが明らかとなっている。

神経芽腫において、NRP1 および NRP2 の発現が亢進しているという報告がある (Fakhari M, et al. Neurochem Res. 2009) もの、SEMA3 の役割は明らかでない。我々は、神経芽腫において SEMA3A が抗腫瘍効果を持つか否かを検討するため、ヒト神経芽腫細胞株 SK-N-AS に SEMA3A を投与した。この結果、SEMA3A 50nM 投与 1 時間後に細胞質の縮小を認め (図 1(a)) SEMA3A の投与下において、濃度依存性に細胞浸潤能が低下した (図 1(b))。

一方、siRNA による SEMA3A の発現抑制では、細胞浸潤能が有意に亢進した (図 1(c))。さらに、SEMA3A 投与により細胞接着分子である Integrin 1 の発現とその下流の FAK-P13K 経路のリン酸化を抑制することを発見した (図 2)。これらの結果から、SEMA3A が Integrin 1 の発現とその下流の FAK-P13K 経路を抑制することで細胞浸潤能が低下することが考えられ、SEMA3A がヒト神経芽腫細胞に対し、抗腫瘍効果を示すことを強く示唆される。SEMA3A 以外のサブタイプにおいても、SEMA3F が乳癌に対し腫瘍の進展、遊走を抑制すること (Nasarre P, et al. neoplasia. 2003.) や、SEMA3B が肺癌、乳癌に対しアポトーシスを誘導すること (Castro-Rivera E, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004.) が報告されており、NRP1 および NRP2 高発現の神経芽腫に対する抗腫瘍効果が期待できる。特に SEMA3B、C、D、F は NRP1 および NRP2 の両方に結合作用があり、神経芽腫に対し抗腫瘍効果が得られる可能性が高い。

加えて、神経原性腫瘍である神経芽腫は、分化誘導が治療において重要な因子の1つとなるが、上述の通り SEMA3A は骨芽細胞の分化を促進することから、神経芽腫に対しても SEMA3 による分化誘導が期待できる。

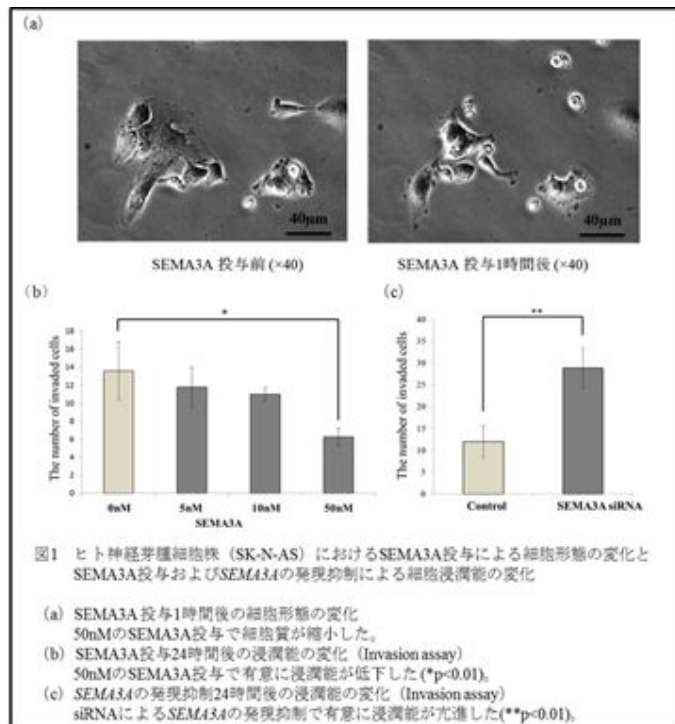


図1 ヒト神経芽腫細胞株 (SK-N-AS) におけるSEMA3A投与による細胞形態の変化とSEMA3A投与およびSEMA3Aの発現抑制による細胞浸潤能の変化

- (a) SEMA3A 投与1時間後の細胞形態の変化
50nMのSEMA3A投与で細胞質が縮小した。
- (b) SEMA3A投与24時間後の浸潤能の変化 (Invasion assay)
50nMのSEMA3A投与で有意に浸潤能が低下した (* $p < 0.01$).
- (c) SEMA3Aの発現抑制24時間後の浸潤能の変化 (Invasion assay)
siRNAによるSEMA3Aの発現抑制で有意に浸潤能が亢進した (** $p < 0.01$).

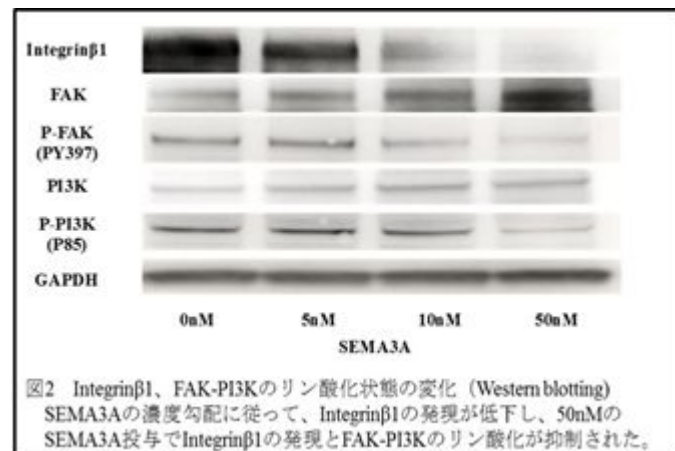


図2 Integrin1、FAK-P13Kのリン酸化状態の変化 (Western blotting)
SEMA3Aの濃度勾配に従って、Integrin1の発現が低下し、50nMのSEMA3A投与でIntegrin1の発現とFAK-P13Kのリン酸化が抑制された。

2. 研究の目的

本研究では、SEMA3のサブタイプのうち特に抗腫瘍効果の報告が多いSEMA3A、SEMA3B、SEMA3Fについて、神経芽腫に対する抗腫瘍効果および分化誘導活性の有無を実験的に検証することで、新規治療法の可能性について検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト神経芽腫細胞株における *NRP1*、*NRP2* の発現の検討

ヒト神経芽腫細胞株 (NB1、NB9、NB69、SK-N-SH、Kelly、SK-N-AS、SH-SY5Y) における、*NRP1* および *NRP2* の発現を、RNA レベルでは Real-time PCR で、蛋白レベルでは Western blotting で解析した。

(2) SEMA3 の各サブタイプ投与下での機能解析

(1) で選択した細胞株に対し、50nM の濃度の SEMA3 の各サブタイプもしくは溶媒のみを投与し、腫瘍への影響を下記の手順で解析した。

細胞増殖能の検討：WST-8 assay

96 well plate にそれぞれ 1.0×10^4 個の細胞を播種した後、SEMA3 の各サブタイプを 0~50nM の濃度でそれぞれ投与し、24 時間後に WST-8 assay にて cell viability を測定した。

細胞浸潤能の検討：Matrigel invasion assay

24 well plate にセットした Matrigel invasion chamber へ 7.5×10^4 個の細胞を播種し、50nM の濃度の SEMA3 の各サブタイプもしくは溶媒のみを投与し、培養を行った。24 時間後に matrigel を通過した浸潤細胞を固定し、ギムザ染色を行い、細胞数をカウントした。

細胞遊走能の検討：Wound healing assay

12 well plate に $10 \mu\text{g/ml}$ の fibronectin 溶液を分注し、dish 底面をコートする。それぞれ 2.0×10^5 個の細胞を播種した後、50nM の濃度の SEMA3 の各サブタイプもしくは溶媒のみを投与し、単一層となるまで 24 時間培養した。各 well の dish 底面をピペットチップで擦過し、生じた間隙を 0、24、48 時間後に顕微鏡下に観察して、間隙の縮小率を測定した。

(3) SEMA3 投与における神経分化誘導の検討

6 well plate にそれぞれ 2.0×10^5 個の細胞を播種し、24 時間後、前述 (2) で抗腫瘍効果を認めた SEMA3 サブタイプ 50nM を培地に投与した。24、48 時間後に神経突起の長さを測定した。

(4) *SEMA3A* 発現抑制下での機能解析

SK-N-AS に対し、Lipofection 法により siRNA を導入し、*SEMA3A* 発現抑制による細胞増殖・浸潤・遊走能の変化を解析した。

(5) *SEMA3A* 発現抑制下における細胞運動関連因子の発現解析

SK-N-AS に対し、Lipofection 法により siRNA を導入し、*SEMA3A* 発現抑制による細胞運動関連因子 (Integrin 1、Vimentin、E-Cadherin、N-Cadherin、Matrix Metalloproteinase (MMP)-2、MMP-9) の発現を、RNA レベルでは Real-time PCR で、蛋白レベルでは Western blotting で解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト神経芽腫細胞株における *NRP1*、*NRP2* の発現の検討

NRP1 は SK-N-AS で、*NRP2* は Kelly で発現が高いことを確認した (図 3)。以降、*NRP1* を受容体とする SEMA3A および SEMA3B の実験では SK-N-AS を、*NRP2* を受容体とする SEMA3F の実験では Kelly を使用することとした。

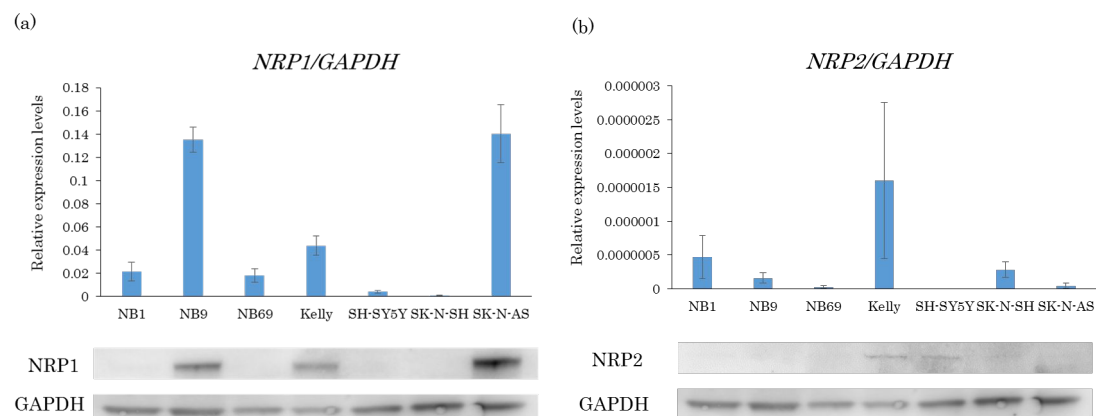


図 3：神経芽腫細胞株における(a) *NRP1* および(b) *NRP2* の発現

(2) SEMA3 の各サブタイプ投与下での機能解析

細胞増殖能の検討：WST-8 assay

SEMA3A、3B、3F いずれにおいても、投与群は非投与群と比較し、有意な増殖抑制効果は認めなかった (図 4)。

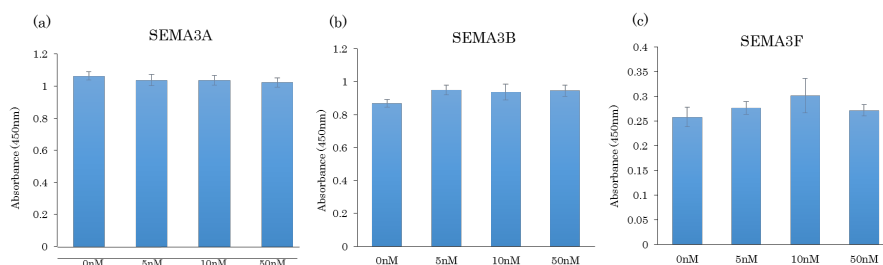


図 4：(a) SEMA3A、(b) SEMA3B、(c) SEMA3F 投与による細胞増殖能の変化

細胞浸潤能の検討：Matrigel invasion assay

SEMA3A については、研究開始当初の予備実験では、50nM の SEMA3A 投与後 24 時間の時点で有意に浸潤能が低下したが、その後、細胞浸潤抑制効果の再現性がとれず実験が難航した。SEMA3B においては、50nM の SEMA3B 投与後 24 時間の時点で有意な抑制効果を認めなかった (図 5(a))。一方、SEMA3F においては、50nM の SEMA3F 投与後 24 時間の時点で有意な浸潤能の亢進を認めた (図 5(b))。

細胞遊走能の検討：Wound healing assay

SEMA3A および SEMA3B においては、それぞれ投与後 24、48 時間の時点で有意な抑制効果を示したが、SEMA3F においては投与後 48 時間までに有意な抑制効果は認めなかった (図 6)。

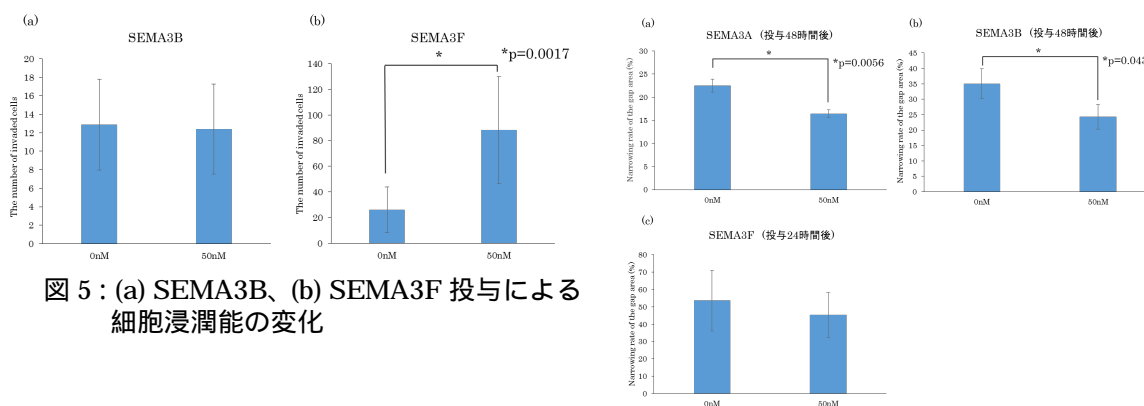


図 5：(a) SEMA3B、(b) SEMA3F 投与による細胞浸潤能の変化

図 6：(a) SEMA3A、(b) SEMA3B、(c) SEMA3F 投与による細胞遊走能の変化

(3) SEMA3 投与における神経分化誘導の検討

SK-N-AS に SEMA3A を 50nM 投与し、24、48 時間後の神経突起長を計測して神経分化能を検討したが、投与群と非投与群とで有意な差を認めなかった (図 7)。

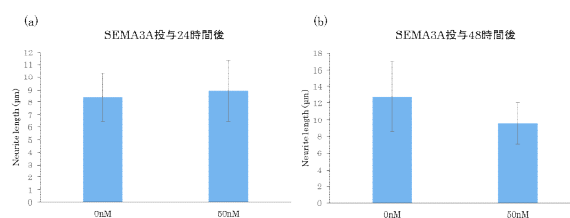


図 7：SEMA3A 投与(a) 24 時間後、(b) 48 時間後の神経突起長の変化

(4) SEMA3A 発現抑制下での機能解析

SEMA3A 投与による細胞浸潤抑制効果の再現性がとれず実験が難航したため、SEMA3A の作用を再検討することを目的に siRNA を用いた実験を行った。

SK-N-AS に対し、Lipofection 法により siRNA を導入し、SEMA3A の発現抑制効果を Real-time PCR および Western blotting により解析した。結果、siRNA の導入により SEMA3A の有意な発現抑制効果が得られた (図 8)。

細胞増殖能の検討：WST-8 assay

siRNA による SEMA3A による発現抑制の結果、control と比較し 48 時間までに増殖能の有意差は認めなかった (図 9)。

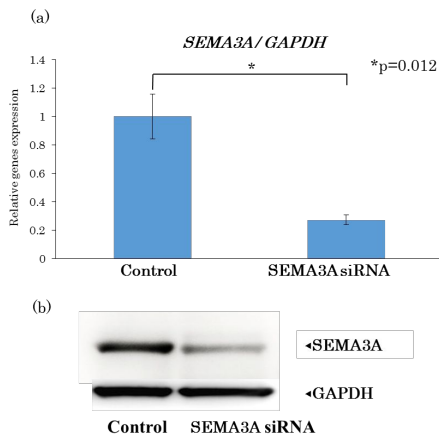


図 8 : siRNA による *SEMA3A* の発現抑制効果.
(a) Real-time PCR、(b) Western blotting

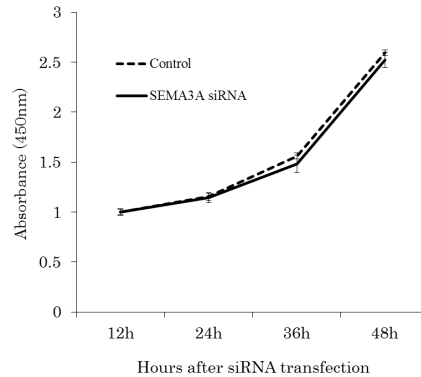


図 9 : *SEMA3A* の発現抑制による細胞増殖能の変化

細胞浸潤能の検討 : Matrigel invasion assay

SEMA3A の発現抑制 48 時間後の細胞浸潤能を Invasion assay で解析すると、siRNA による *SEMA3A* の発現抑制で有意に浸潤能が亢進した (図 10)。

細胞遊走能の検討 : Wound healing assay

SEMA3A の発現抑制 48 時間後の細胞遊走能を Wound healing assay で解析すると、*SEMA3A* の発現抑制で有意に遊走能が亢進した (図 11)。

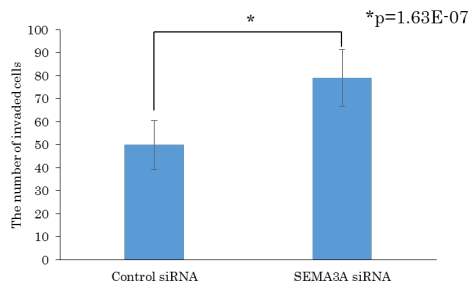


図 10 : *SEMA3A* の発現抑制による細胞浸潤能の変化

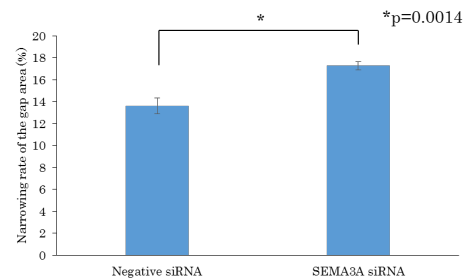


図 11 : *SEMA3A* の発現抑制による細胞遊走能の変化

(5) *SEMA3A* 発現抑制下における細胞運動関連因子の発現解析

SEMA3A の発現抑制による浸潤、遊走に関連する蛋白の発現変化について Western blotting で解析すると、*SEMA3A* の発現抑制により Integrin 1 の発現が亢進することを確認した (図 12) また *Integrin 1* の RNA レベルの発現について Real-time PCR で解析すると、*SEMA3A* の発現抑制により *Integrin 1* の有意な発現亢進を認めた (図 13) 。さらに、*SEMA3A* の発現抑制による Integrin 1 下流経路のリン酸化状態の変化を Western blotting で解析すると、*SEMA3A* の発現抑制で FAK および PI3K のリン酸化が亢進しており、FAK-PI3K 経路の活性化を認めた (図 14) 。

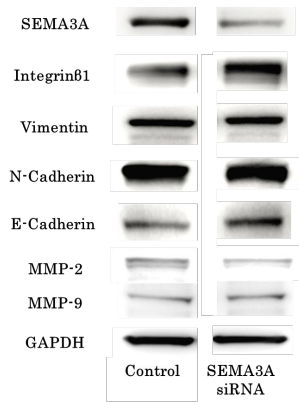


図 12 : *SEMA3A* の発現抑制による Integrin 1 の発現変化 (Western blotting)

(5) 考察

本研究では、SEMA3 蛋白投与による神経芽腫における抗腫瘍効果を証明することはできなかった。しかし、siRNA による発現抑制実験の結果、ヒト神経芽腫細胞株 SK-N-AS において、*SEMA3A* の発現を抑制すると、*Integrin 1* の発現が上昇し、FAK-PI3K 経路が活性化され、腫瘍細胞の浸潤・遊走能が亢進することが考えられた。このことから、*SEMA3A* は神経芽腫において *Integrin 1* を抑制することで抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。

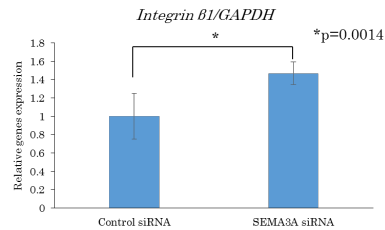


図 13 : *SEMA3A* の発現抑制による Integrin 1 の発現変化 (Real-time PCR)

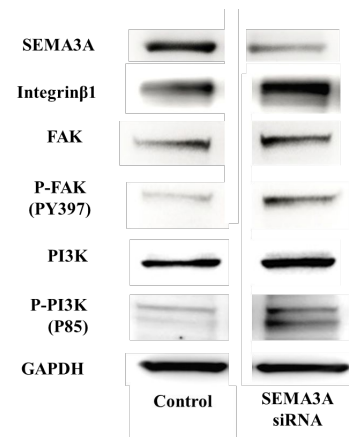


図 14 : *SEMA3A* の発現抑制による Integrin 1 下流経路のリン酸化状態の変化 (Western blotting)

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Ishizuka Y, Koshinaga T, Hirano T, Nagasaki-Maeoka E, Watanabe Y, Hoshi R, Yoshizawa S, Sugito K, Kawashima H, Uekusa S, Fukuda N, Soma M, Fujiwara K. NRP1 knockdown promotes the migration and invasion of human neuroblastoma-derived SK-N-AS cells via the activation of β1 integrin expression. International Journal of Oncology. 2018; 53: 159-166. (査読あり)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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) 研究協力者

研究協力者氏名 : 長崎 瑛里

ローマ字氏名 : (NAGASAKI, Eri)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。