

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08682

研究課題名(和文)がん疼痛形成における腫瘍細胞由来セマフォリン3Aの役割

研究課題名(英文)Role of tumor-derived semaphorin 3A in the development of cancer pain

研究代表者

前田 武彦 (Maeda, Takehiko)

新潟薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50271010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：癌性骨痛の新たな治療標的の解明により、難渋する疼痛緩和や個別化医療実現への貢献が期待される。癌性骨痛モデルマウスのマイクロアレイ解析の結果より、腫瘍細胞由来の骨痛発現分子としてのセマフォリン3A (Sema3A) を見出した。Sema3A遺伝子のノックダウンやSema3A細胞内シグナルの阻害により、腫瘍細胞の増殖や癌性骨痛の形成が抑えられた。本研究結果は、Sema3Aが難治性の骨転移痛に対する治療標的になりうることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Elucidation of potential therapeutic targets for bone cancer pain would contribute to relief of the intractable and unbearable pain. We used microarray analysis to reveal upregulation of semaphorin 3A (Sema3A) in the model mice for bone cancer pain. Knockdown of Sema3A and inhibition of Sema3A cellular signaling attenuated the tumor growth and the development of the pain. These results suggest that Sema3A is a potential therapeutic target molecule for the development of bone cancer pain.

研究分野：薬理学

キーワード：セマフォリン3A がん性疼痛 mTOR がん幹細胞 薬剤抵抗性

1. 研究開始当初の背景

がん性疼痛は、QOLの著しい低下を招く。痛みの原発部位の多くは骨組織であり、そのほとんどが骨転移に起因する。現在、オピオイドを中心とする疼痛治療がWHO方式に従って行われてきたが、疼痛緩和が不十分な症例が報告されている。さらに、骨転移痛の存在が生存率の低下と相関するという臨床成績もあり、緩和療法の質のさらなる向上が急務とされている。がん性骨痛は、国内外の基礎研究の成果から、腫瘍由来疼痛物質や破骨細胞による骨破壊が侵害受容器を刺激することにより生じるとされている。しかし、骨微小環境においていかなる細胞種が、どの疼痛惹起分子の産生を介して細胞間相互作用を生じ、痛みが発生するのか、その全容は解明されていない。さらに、転移の進行、腫瘍の増殖、そして骨痛を含む骨関連事象の包括的治療は十分とはいえない。

セマフォリンファミリーは神経軸索伸長のガイダンス因子として同定され、その後、免疫、がん、骨代謝への関与が示されてきた。Sema3A はがん抑制分子として考えられてきたが、最近では、むしろがんを進行させる補助因子としての報告もある。一方、疼痛分野の研究においては、sema3Aの機能的役割について1件のみ報告されている。しかし、末梢神経障害性疼痛モデルを用いたものであり、がん性骨痛への関与についての報告は全くない。

2. 研究の目的

本研究では、申請者らが見出した sema3A によるがん性骨痛の制御機構を解明する。『溶骨性骨がん痛において、腫瘍細胞由来 sema3A は疼痛形成分子としてはたらき、そのシグナルの賦活は骨痛を進展させる』とする仮説を提唱し、がん性骨痛モデルを用いた以下の実験により検証した。

3. 研究の方法

(1) がん性骨痛モデルを用いた sema3A シグナルの機能的関与の解明

C57/Bl6 マウスにマウス肺癌由来腫瘍細胞 LLC を大腿骨骨髓腔に移植して、癌性骨痛モデルマウスを作製した。腫瘍の増殖と Sema3A 発現量について解析し、骨痛強度との相関性を調べた (図1)。

Sema3A の発現細胞種を免疫組織化学的染色により決定した (図2)。

(2) 培養細胞を用いた sema3A シグナルの細胞表現型に及ぼす影響の解明

loss of function の視点から、Sema3A 産生細胞の表現型変化における sema3A の機能的役割を決定した。具体的には、レンチウイルスベクターを用いた RNAi 法にて、Sema3A

遺伝子をノックダウンした LLC 株 (shSema3A-LLC) を樹立し、マウスに移植することにより腫瘍形成能ならびに疼痛行動の発現について解析した。対照群として、scramble shRNA を導入した LLC 株 (scramble-LLC) を使用した。(図3)

sema3A 細胞内シグナル伝達を解析するために、sema3A およびその受容体である PlexA1 をノックダウンした LLC 細胞を用いて、その増殖および mTOR 阻害剤の効果を検討した。

LLC 腫瘍細胞の悪性度評価の観点から、抗癌剤感受性及び幹細胞生存に及ぼす Sema3A ノックダウンの影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 骨がん性疼痛モデルにおける腫瘍細胞増殖と Sema3A の上方調節

マウス肺癌細胞由来 LLC 細胞をマウス大腿骨に移植すると、進行性に増殖し (図1A)、大腿骨における Sema3A mRNA の発現上昇が見られた (図1B)。これに伴い、移植側後肢への体重負荷が減少した (図1C)。

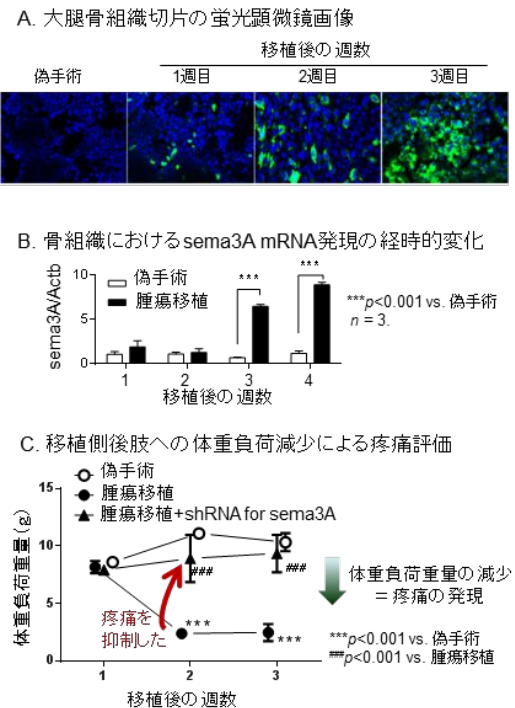


図1. がん細胞移植後の増殖と疼痛発現

マウス右側大腿骨の骨髓腔内にGFPを発現する腫瘍細胞 (LLC-GFP: Lewis Lung Cancer GFP) を移植した。A) 黒灰色は核を、白色はGFPを示す。B) リアルタイムPCRにて評価した。C) sema3Aに対するshRNAをレンチウイルス感染により導入したLLC-GFPを移植した (▲)。

大腿骨組織切片の免疫組織化学的染色実験により、抗 Sema3A 抗体免疫陽性反応が骨皮質および骨髓腔内にみとめられた。このうち、移植 LLC 細胞における発現が顕著であった (図2)。

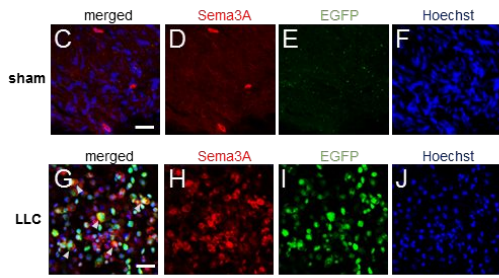


図2. 大腿骨に移植した移植LLC細胞における sema3A の発現

(2) 移植腫瘍細胞の増殖に及ぼす Sema3A 遺伝子ノックダウンの影響

レンチウイルスベクターを用いた RNAi 法にて、Sema3A 遺伝子をノックダウンした LLC 株 (shSema3A-LLC) を樹立し、腫瘍増殖に及ぼす影響を調べた。shSema3A ベクターを導入した LLC 細胞のうち、Sema3A mRNA ノックダウンが 2 つのクローンでみとめられた (shSema3A #1 および shSema3A #2; 図 3A)。これらを移植したところ、対照群である Scramble ベクターを導入した細胞の移植群に比べて、骨髄腔内における増殖は減弱していた (図 3B-E)。移植マウスについて、weight bearing 法による疼痛測定を行ったところ、scramble 群における体重負荷重量の低下は、shSema3A #1 移植群および shSema3A #2 移植群の何れにおいても、減弱していた。

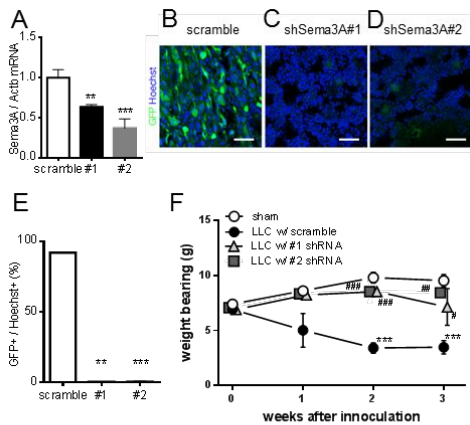


図3. 大腿骨に移植したLLC細胞の増殖と骨がん疼痛に及ぼすSema3Aノックダウンの影響

(3) 腫瘍細胞増殖における Sema3A シグナルの関与

培養実験における細胞増殖曲線の検討から、shSema3A#1 および#2 群は scramble 群と比較して、増殖の速度が低下していた (図 4A)。Sema3A ノックダウン株の樹立と同様の方法で、Sema3A の膜受容体である PlxnA1 のノックダウン LLC 細胞株を樹立し (shPlxnA1#1 および shPlxnA1#2)、Sema3A の細胞シグナルの関与を検討した。増殖曲線の結果より、PlxnA1 のノックダウンは増殖速度が低下した (図 4B)。続いて、Sema3A が自己分泌により細胞増殖を促進性

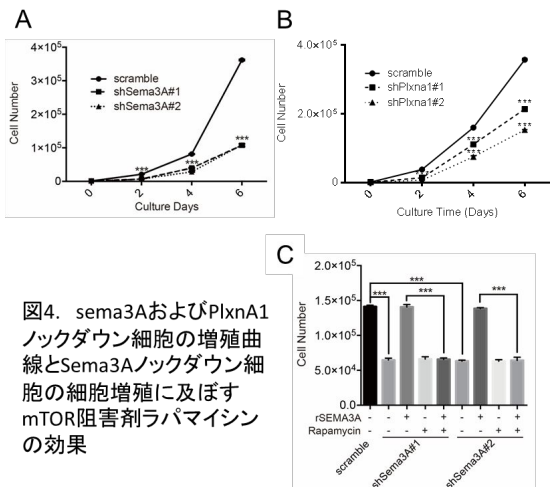


図4. sema3AおよびPlxnA1ノックダウン細胞の増殖曲線とSema3Aノックダウン細胞の細胞増殖に及ぼすmTOR阻害剤ラパマイシンの効果

に制御し、その細胞内シグナル伝達系として mTOR 経路を介するという仮説を考案し、これを検証した。組換え型 Sema3A の培養液中への添加は、細胞増殖の低下を減弱した。さらに mTOR 阻害剤の rapamycin の添加は組換え型 Sema3A による細胞増殖能の回復を抑制した (図 4C)。

(4) 抗がん薬感受性および癌幹細胞増殖能に対する Sema3A ノックダウンの影響

LLC細胞の悪性度における Sema3A の関与を調べるために、チロシンキナーゼ阻害薬ゲフィチニブの毒性及び LLC 癌幹細胞のスフィア形成能に及ぼす影響を検討した。ゲフィチニブの毒性は shSema3A#1 および#2 何れのクローンにおいても低下していた (図 5A)。浮遊培養法により形成する LLC 癌幹細胞のスフィアの数評価したところ、shSema3A#1 および#2 何れのクローンにおいても、scramble 群に比べてスフィア数は減少していた (図 5B)。

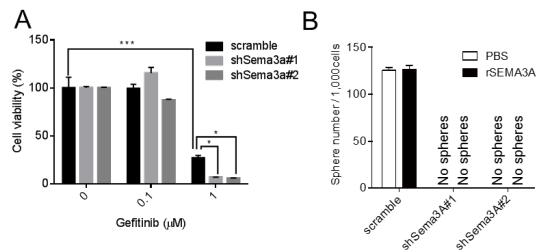


図5. ゲフィチニブ毒性およびLLC細胞幹細胞スフィア形成能に対するSema3Aノックダウンの影響

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 7 件)

N Effendia, 他 8 名省略 (代表者 8 番目):
Synthesis and evaluation of
radioiodinated
1-{2-[5-(2-methoxyethoxy)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl]quinolin-8-yl}piperidin-4-
amine derivatives for platelet-derived
growth factor receptor (PDGFR)
imaging, Bioorg Med Chem, 2017; 25:
5576-5585. doi:

10.1016/j.bmc.2017.08.025.

Yamada D, Takahashi K, Kawahara K, Maeda T. Autocrine Semaphorin3A signaling is essential for the maintenance of stem-like cells in lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016; 480:375-379. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.057.

Yamada D, Watanabe S, Kawahara K, Maeda T. Plexin A1 signaling confers malignant phenotypes in lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016; 480:75-80. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.006.

Maeda T, Yamada D, Kawahara K. Cancer pain relief achieved by disrupting tumor-driven semaphorin 3A signaling in mice. *Neurosci Lett*. 2016; 632:147-51. doi: 10.1016/j.neulet.2016.08.060.

Yamada D, Kawahara K, Maeda T. mTORC1 is a critical mediator of oncogenic Semaphorin3A signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016; 476:475-80. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.05.147.

Kawahara K, 他 10 名省略(代表者 8 番目): The novel monoclonal antibody 9F5 reveals expression of a fragment of GPNMB/osteostatin processed by furin-like protease(s) in a subpopulation of microglia in neonatal rat brain. *Glia*. 2016; 64:1938-61. doi: 10.1002/glia.23034.

Yamada D, Kawahara K, Ozaki M, Maeda T. Tumor cell-derived secretory factor downregulates Semaphorin-3a in osteoblasts by activating mammalian target of rapamycin pathway, *Biosci Biotechnol Biochem*, 80, 2016, 942-944. doi: 10.1080/09168451.2015.1136881.

〔学会発表〕(計 6 件)

山田大祐, 前田武彦 “セマフォリン 6B は肺がん幹細胞の維持に関与する” 第 76 回日本癌学会学術総会. 2017 年 10 月. 横浜.

前田武彦, 山田大祐, 川原浩一 “がん疼痛形成のセマフォリン 3a による制御機構” 生体機能と創薬シンポジウム 2016 (招待講演). 2016 年 08 月. 仙台.

前田武彦, 山田大祐, 川原浩一, 池田崇志, 丸山光, 塚本敬, 五十嵐悠亮, 中沢美穂 “癌性疼痛下のモルヒネ報酬効果減弱におけるミクログリアの機能的関与” 第 6 回日本薬理学会北部会. 2016 年 09 月. 札幌.

前田武彦, 池田崇志, 丸山光, 塚本敬, 五十嵐悠亮, 山田大祐, 川原浩一 “がん疼痛下のモルヒネ報酬効果減弱におけるミクログリアの関与” 第 36 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム. 2016 年 08 月. 札幌.

前田武彦, 丸山恵奈, 柳 真美, 山岸 明, 山田大祐, 川原浩一: “骨がん性疼痛モデルマウスの特性とオキシコドンの効果” 第 66 回日本薬理学会北部会. 2015 年 09 月. 富山.

前田武彦: “がん疼痛モデルの特性とがん分子機構の研究” 第 9 回日本緩和医療薬学会年会 (招待講演). 2015 年 10 月. 横浜.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 武彦 (MAEDA TAKEHIKO)
新潟薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 50271010

(2) 研究分担者

山田 大祐 (YAMADA DAISUKE)
新潟薬科大学・薬学部・助手
研究者番号: 50733680

川原 浩一 (KAWAHARA KOUICHI)
新潟薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号: 10347015