

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18449

研究課題名(和文)セマフォリンシグナルの阻害が導くがん治療の新たな展望

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy for sarcomas by targeting PPRX1 positive cancer stem-like cells

研究代表者

山田 大祐 (Yamada, Daisuke)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50733680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：分泌型サイトカインの一種であるセマフォリン3Aが、肺がん治療における新規標的分子となる可能性について検討を行った。肺がん細胞において、セマフォリン3Aの機能を阻害した結果、増殖性の低下とEGFR阻害剤に対する抵抗性の解除が誘導された。腫瘍の根源であると考えられているがん幹細胞において、セマフォリン3Aの機能を阻害した結果、自己複製能の消失と腫瘍形成の抑制効果が観察された。以上の結果から、セマフォリン3Aの阻害によって薬剤抵抗性の解除が誘導されるだけでなく、がん幹細胞の根絶も可能であることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we studied the oncogenic role of semaphorin 3A to establish the novel therapeutic strategy against lung cancer. Inhibition of semaphorin 3A signaling by shRNA system in lung cancer cells decreased their proliferative capacity and increased the sensitivity to EGFR inhibitors. Furthermore, the self-renewal or tumorigenic capacity of cancer stem-like cells, the origin of cancer, was completely abolished by the inhibition of semaphorin 3A signaling. These results demonstrate that the inhibition of semaphorin 3A signaling not only releases the resistance to several drugs but also eradicates cancer stem-like cell in lung cancer.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：セマフォリン 肺がん がん幹細胞 mTORシグナル 薬剤耐性 EGFR阻害剤

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は肺がんの骨転移モデルにおいて、分泌タンパク質・セマフォリン 3A が、腫瘍の進行に伴って発現増大すること、そして、その発現をノックダウンすると、腫瘍細胞の増殖が著しく抑制されることを見出した。本知見は、セマフォリンファミリー分子群は、概して、腫瘍形成に対して抑制的に働くとする従来の考えとは一線を画する。

### 2. 研究の目的

本研究では、骨転移腫瘍の増悪におけるセマフォリン 3A 分子の役割を詳細に解明するとともに、セマフォリン 3A の産生細胞とその標的細胞の同定、セマフォリン 3A シグナルによる薬剤感受性の制御機構の解明を行い、セマフォリン 3A シグナルが骨転移腫瘍における新たな治療標的であることを明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究計画では(1)腫瘍細胞におけるセマフォリンシグナルの機能解明、(2)セマフォリンシグナルの標的分子の探索、(3)セマフォリンシグナル阻害による骨転移腫瘍の治療効果の解析の3つを並行して行った。本研究では主に腫瘍細胞の発現するセマフォリン 3A に着目し、骨転移腫瘍におけるセマフォリン 3A を介した細胞間クロストークの存在、薬剤抵抗性の成立機構およびセマフォリンシグナル阻害による治療効果を解析した。

### 4. 研究成果

申請者はマウス由来肺がん細胞株である Lewis Lung Carcinoma (LLC)を用いて、本研究を行った。まず、LLC における自己分泌型セマフォリン 3A シグナルの役割を解析するために、セマフォリン 3A に対する shRNA を導入することでノックダウンによる影響を解析した。その結果、LLC の増殖性、mammalian target of rapamycin (mTOR) complex1 (mTORC1) 活性、解糖系の活性の低下、腫瘍形成能の損失、そしてゲフィチニブやエルロチニブといった EGFR 阻害剤への抵抗性の解除が誘導された(雑誌論文 2、3)。セマフォリン 3A の受容体である PlexinA1 をノックダウンさせた場合にも同様の表現型が観察されたことから、PlexinA1 を介したシグナル経路が活性化されることが重要であることも判明した(雑誌論文 5)。また、LLC を浮遊培養することでがん幹細胞株を樹立し、同様にセマフォリン 3A のノックダウンを行った結果、自己複製能の損失と mTORC1 活性の低下が確認されたことから、肺がん幹細胞の維持に自己分泌型セマフォリン 3A シグナルが必須であることも判明した(雑誌論文 4)。これらの結果から、セマフォリン 3A シグナルの阻害によって EGFR 阻害剤に対する抵抗性の解除とがん幹細胞の消失が誘導できる

可能性が示唆された。

次に、他のセマフォリンシグナルとのクロストークの可能性を調べるために、セマフォリン 3A もしくは PlexinA1 をノックダウンさせた際の各セマフォリン分子の発現を調べた結果、セマフォリン 6B の発現が低下することが観察された。また、セマフォリン 3A をノックダウンさせた細胞をセマフォリン 6B で刺激を行うと部分的ではあるが増殖性の低下が回復した。次に、セマフォリン 6B のノックダウン実験を行った結果、増殖性の低下と EGFR 阻害剤への抵抗性の獲得が生じることが判明した。さらに、がん幹細胞株でセマフォリン 6B のノックダウン実験を行った結果、自己複製能の消失と腫瘍形成能の消失が観察された。以上の結果から、セマフォリン 6B に関しても、新規の肺がん治療における標的分子となる可能性が示唆された(学会発表 1,2)。

### 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 1-5] (計 5 件)

- [1] Yamada D, Kawahara K, Ozaki M, Maeda T. (2016) Tumor cell-derived secretory factor downregulates Semaphorin-3a in osteoblasts by activating mammalian target of rapamycin pathway. *Biosci Biotechnol Biochem.* 80, 942-944. 査読有, doi: 10.1080/09168451.2015.1136881.
- [2] Yamada D, Kawahara K, Maeda T. (2016) mTORC1 is a critical mediator of oncogenic Semaphorin3A signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 476, 475-480. 査読有, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.05.147.
- [3] Maeda T, Yamada D, Kawahara K. (2016) Cancer pain relief achieved by disrupting tumor-driven semaphorin 3A signaling in mice. *Neurosci Lett.* 632, 147-151. 査読有, doi: 10.1016/j.neulet.2016.08.060.
- [4] Yamada D, Takahashi K, Kawahara K, Maeda T. (2016) Autocrine Semaphorin3A signaling is essential

for the maintenance of stem-like cells in lung cancer. Biochem Biophys Res Commun. 480, 375-379. 査読有, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.057.

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

〔学会発表〕(計8件)

- [1] 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關与する、第76回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)、2017年9月30日
- [2] 山田大祐、川原浩一、前田武彦：セマフォリン 6B は肺がん幹細胞の維持に關与する、第90回日本薬理学会年会、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)、2017年3月15日
- [3] 山田大祐、川原浩一、前田武彦：Sema3A/PlexinA1 signaling confers malignant phenotypes to lung cancer cell、第39回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)、2016年12月1日
- [4] 山田大祐、前田武彦：セマフォリン 3A は mTORC1 を介して発がんを制御する、第75回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)、2016年10月8日
- [5] 山田大祐、川原浩一、前田武彦：Regulatory role of autocrine Semaphorin3a signaling in bone metastatic tumor development、第89回日本薬理学会年会、パシフィコ横浜

(神奈川県・横浜市)、2016年3月10日

- [6] 山田大祐、川原浩一、前田武彦：腫瘍細胞は mTORC1 の活性化を介して骨芽細胞における Sema3a の発現を制御する、第38回日本分子生物学会年会 / 第88回日本生化学会大会・合同大会、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)、2015年12月1日
- [7] 山田大祐、川原浩一、前田武彦：骨転移腫瘍におけるセマフォリンの発現制御機構、第17回応用薬理シンポジウム、新潟大学(新潟県・新潟市)、2015年9月4日
- [8] 山田大祐、川原浩一、前田武彦：骨転移腫瘍におけるセマフォリンの発現制御機構、生体機能と創薬シンポジウム2015、日本大学薬学部(千葉県・船橋市)、2015年8月27日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://soran.cc.okayama-u.ac.jp/view?l=ja&u=7c32cd66e58e20bf74506e4da22f6611&k=%E8%96%AC&sm=affiliation&sl=ja&sp=56>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 大祐 (Daisuke Yamada)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50733680

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )