

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：35413

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20013

研究課題名(和文)新規netrin-1シグナル阻害法の開発とShh型髄芽腫治療への応用

研究課題名(英文)Netrin-1 as a novel therapeutic target of medulloblastoma

研究代表者

中山 寛尚(Nakayama, Hironao)

広島国際大学・保健医療学部・講師

研究者番号：40512132

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)：本研究では小児脳腫瘍である髄芽腫に対する新たな治療法を提案するため、軸索誘導因子netrin-1シグナル阻害剤の開発を行った。

Netrin-1には複数のレセプターがあり、そのすべてを阻害することは困難であると考え、どのレセプターの寄与が重要かを解析した。まずは髄芽腫細胞から癌幹細胞集団を単離して、癌幹細胞に特異的な遺伝子プロファイルを解析した結果、netrin-1レセプターのひとつが高発現していることを見出した。このレセプターが新たな癌幹細胞マーカーとして活用できる可能性を精査するとともに、生理的意味を明らかにすることで、このレセプターを標的とした阻害剤開発に繋がるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Netrin-1, a chemoattractant factor in the neuronal system, promotes tumor progression by enhancing angiogenesis and metastasis. Our recent studies demonstrate that netrin-1 promotes medulloblastoma (MB) cell invasiveness and angiogenesis, therefore, we aim to target netrin-1 signaling for MB therapy.

Netrin-1 acts via several receptors, including UNC5A-D, DCC, DSCAM and neogenin. To identify the key netrin receptor in MB, we purified MB cancer stem like cells and carried out microarray. As a result, one of the netrin receptor was elevated in MB cancer stem cells. We will investigate the function of this receptor in MB and expect this receptor as a novel marker of MB stem cell. We will also screen the inhibitor of this receptor and test with MB model mice.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：軸索誘導因子 netrin 髄芽腫 転移 血管新生 癌幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

髄芽腫は小児の中枢神経に発生する胎児性腫瘍の中では最も頻度が高い。髄芽腫の転移、播種を伴わないタイプでは5年生存率が80-90%と良好である一方で、高浸潤能を有し播種転移する場合には5年生存率が30%に低下する。また、高転移タイプ髄芽腫は放射線、化学治療に対する感受性も悪く治療が困難であるため、髄芽腫細胞の浸潤能の程度を『予測』すること、『抑制』することが髄芽腫の診断・治療方針・予後・治療に非常に重要であると考えられている。

これまでに私は小児髄芽腫患者サンプルを用いて軸索誘導因子 netrin-1 と髄芽腫細胞の浸潤性および血管新生に着目して解析を行ってきた。その結果、netrin-1 は髄芽腫細胞の浸潤能・血管新生を誘導する因子であること、netrin-1 あるいはそのレセプター発現抑制によって髄芽腫細胞の浸潤能・血管新生を抑制することが可能であること、尿中 netrin-1 が髄芽腫の有無、浸潤の程度、治療経過を予測するバイオマーカーとして有用なことを明らかにしてきた。これらの知見をもとに、netrin-1 シグナルを抑制することによって、髄芽腫の特性である浸潤能および血管新生を抑制し、髄芽腫の治療が可能ではないかという着想に至った。

### 2. 研究の目的

髄芽腫は高い浸潤能を有するため播種転移する傾向があり、腫瘍の悪性度を評価する上で重要な指標となる。私はこれまでに、髄芽腫細胞自身から遊離される netrin-1 が浸潤能の促進に関わっていることを見出し、バイオマーカーとしての有用性を提案してきた。そこで本研究では既存の netrin-1 中和抗体に加えて、より効果的な netrin-1 シグナル阻害法を開発する。その後、netrin-1 阻害剤の髄芽腫阻害効果を髄芽腫モデルマウス(自発発生モデルと髄芽腫細胞移植モデル)を用いて評価し、髄芽腫治療薬開発に向けた基礎的検討を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究ではまず、netrin-1 機能を阻害する環状ペプチドの探索を行った。環状ペプチドは強固な構造によって標的タンパク質に対する高い親和性をもち、in vivo 環境下においても高い安定性を有しており次世代創薬の新技术として注目されている。

ペプチドスクリーニングのために、netrin-1 タンパク質の精製を行なった。タンパク質は netrin-1 遺伝子を 293 細胞に遺伝子導入し、数日後に培地を回収しニッケルカラムを用いて精製を行った。その後、精製した netrin-1 タンパク質を電気泳動にて精製度を確認した。

(2) 髄芽腫モデル動物は、ヒト髄芽腫細胞株

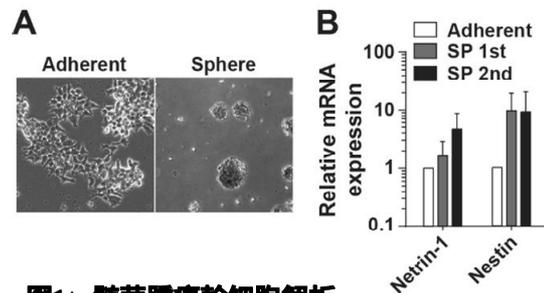


図1: 髄芽腫幹細胞解析

A: 髄芽腫細胞株を、接着または非接着下で培養してsphere(SP)を作成した。

B: 作成したSP1stを懸濁して再度SPを作成した(SP2nd)。接着細胞とSPそれぞれからRNAを抽出して遺伝子発現を検討した。Nestinは幹細胞マーカーである。

D458 をヌードマウス小脳に移植することで作成した。まず、D458 細胞にヒト netrin-1 遺伝子を導入し過剰発現細胞を作成した。さらに細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入して in vivo imaging に使用できるようにした。作成した親株および netrin-1 過剰発現細胞はヌードマウス(オス6週齢)小脳にハミルトンシリンジによって  $5 \times 10^4$  個の細胞を移植した。移植後、in vivo imaging によってサイズ、転移の状況をモニターした。移植後、3週間後において、各マウスから小脳を摘出してパラフィン包埋したのちに、免疫組織染色によって評価を行なった。

### 4. 研究成果

研究実施計画で提案した netrin-1 阻害環状ペプチド探索には、極めて純度の高いリコンビナント蛋白質精製が必要であった。しかし基礎検討の結果、細胞を用いた netrin-1 蛋白質合成系では精製度が低く、ゲルろ過やイオン交換膜を用いた精製を試みたが、精製度、蛋白量ともに探索に必要なレベルに至らなかった。そこで本研究では、netrin-1 リガンド自体の阻害剤開発から、netrin-1 リガンドとレセプター結合を阻害する低分子化合物探索に切り替えて検討を行うことを考えている。

これまでに netrin レセプターには少なくとも7種類あることが知られている。そこで髄芽腫においてどのレセプターの寄与が大きいかわかるように、そのレセプターを標的とする阻害剤開発を目指した。そこで髄芽腫の浸潤性に寄与していると考えられている髄芽腫幹細胞集団に焦点を絞って検討を行った。

髄芽腫細胞を低吸着皿に播種して、1週間後に spheroid (SP)を得た。この分画に癌幹細胞集団が濃縮すると考えられている。さらにSPを懸濁して再度SPを作成した(図1A)。その後、SPを回収してRNAを抽出して遺伝子解析に用いた。対象として通常培養における

接着細胞を解析に用いた。その結果、髄芽腫幹細胞 SP では netrin-1 リガンド遺伝子発現が 10 倍程度上昇すること、特定の netrin レセプターが上昇していることを見出した(図 1B)。陽性コントロールとして幹細胞マーカー nestin 遺伝子発現の上昇が確認されたことから、癌幹細胞の濃縮は成功していると考えている。また SP は 2 回目のほうが癌幹細胞の濃縮が起こるため、より発現が上昇すると考えられる。

今後は、髄芽腫幹細胞で同定された候補レセプターに対する低分子化合物阻害剤を探索を行う。そのために、標的レセプター発現抑制、あるいは netrin-1 リガンド中和抗体による SP 形成に対する影響を評価する。その後、netrin-1 リガンドと候補レセプターを阻害する化合物同定のためのスクリーニング系を作成し、髄芽腫幹細胞を標的とする新たな阻害剤開発を目指す。

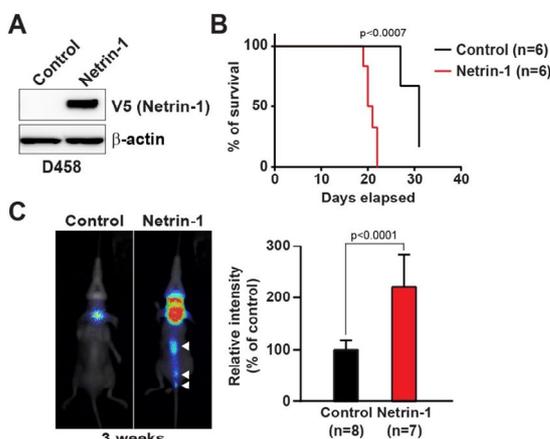


図2: 髄芽腫モデル作成

A: 髄芽腫細胞D458にヒト netrin-1 遺伝子を導入して過剰発現株を作成した。  
B: D458親株またはnetrin-1過剰発現株をヌードマウス小脳に移植して生存曲線を描いた。  
C: 移植して3週間後にin vivo imagingを行った。矢頭は脊椎への転移を示す。右図は発光強度を定量した。

髄芽腫モデルマウス作成に関しては、親株、あるいは netrin-1 過剰発現細胞を移植した両群で比較検討を行った。その結果、netrin-1 を高発現する髄芽腫細胞を移植したマウスでは、親株細胞移植群に比べて生存率が有意に低下していた(図 2A,B)。さらに in vivo imaging 手法を用いて評価したところ、移植後3週間後では腫瘍サイズが有意に(約2倍)増加していることが明らかとなった(図 2C)。また netrin-1 細胞移植群では脊椎への転移が確認された。腫瘍摘出後の小脳検体の免疫組織染色では、CD31 陽性細胞である血管内皮細胞が netrin-1 細胞移植群で有意に上昇しており血管新生が増加していることを示唆していた。これらの結果は、小児髄芽腫サンプルにおける結果と一致するものであり、マウスを用いた髄芽腫移植モデルを作成することに成功したと考えている。今

後は、上記のモデルマウスに加えて、髄芽腫自発発症モデルである Shh シグナル変異マウス(smo/smo マウス)と並行して netrin シグナル阻害剤の効果を評価する。

以上の結果から、髄芽腫幹細胞に焦点を当てて解析した結果、より特異性の高い netrin レセプター候補を決定することに成功し、今後の阻害剤開発に繋がるものと考えている。候補化合物を入手したのちには、すでに作成が完了している移植モデルマウスを用いて迅速に機能評価が行えるものと考えている。

## 引用文献

Akino T, Han X, Nakayama H, McNeish B, Zurakowski D, Mammoto A, Klagsbrun M, Smith E., Netrin-1 promotes medulloblastoma cell invasiveness and angiogenesis, and demonstrates elevated expression in tumor tissue and urine of patients with pediatric medulloblastoma. *Cancer Res.* 74, 2014, 3716-26.

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計5件)

Nakayama H, Sakaue T, Maekawa M, Fujisaki A, Higashiyama S., Cullin 3 regulates ADAMs-mediated ectodomain shedding of amphiregulin. *Biochem Biophys Res Commun.* 499, 2018, 17-23.

Nakayama H, Higashiyama S. Novel function of axon guidance molecule as a regulator of tumor microenvironment. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 150, 2017, 286-292.

Inoue Y, Shimazawa M, Nakamura S, Takata S, Hashimoto Y, Izawa H, Masuda T, Tsuruma K, Sakaue T, Nakayama H, Higashiyama S, Hara H. Both Autocrine Signaling and Paracrine Signaling of HB-EGF Enhance Ocular Neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 38, 2018, 174-185.

Sakaue T, Maekawa M, Nakayama H, Higashiyama S. Prospect of divergent roles for the CUL3 system in vascular endothelial cell function and angiogenesis. *J Biochem.* 162, 2017, 237-245.

Ohno Y, Koizumi M, Nakayama H, Watanabe T, Hirooka M, Tokumoto Y, Kuroda T, Abe M, Fukuda S, Higashiyama S, Kumagi T, Hiasa Y. Downregulation of ANP32B exerts anti-apoptotic effects in hepatocellular carcinoma. *PLoS One.* 12, 2017, e0177343.

(学会発表)(計2件)

中山寛尚, 村上朱里, 福田尚代, 亀井義明, 高田泰次, 東山繁樹. セマフォリン 3F

は乳癌の血管新生と転移を抑制する．セマ  
フォリン 3F は乳癌の血管新生と転移を抑制  
する．生命科学系学会合同年次大会 2017  
年

Hironao Nakayama, Akari Murakami,  
Hisayo Nishida-Fukuda, Yoshiaki Kamei,  
Yasutsugu Takada and Shigeki Higashiyama.  
Semaphorin 3F inhibits breast tumor  
angiogenesis and metastasis via Akt-mTOR  
pathway. 第76回日本癌学会学術総会 2017  
年

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

中山 寛尚 (NAKAYAMA, Hironao)

広島国際大学・保健医療学部・講師

研究者番号：40512132