

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10553

研究課題名(和文) 軸索誘導因子セマフォリンによる薬剤抵抗性乳癌を標的にした新規治療戦略

研究課題名(英文) Semaphorin 3F inhibits breast tumor angiogenesis and metastasis via Akt-mTOR pathway.

研究代表者

亀井 義明 (Kamei, Yoshiaki)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90623702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では抗癌剤抵抗性乳癌に対する軸索誘導因子セマフォリン3F(SEMA3F)の効果を検証した。その結果、SEMA3Fが乳癌細胞に対して薬剤抵抗性形成に關与するAkt-mTORシグナルを抑制することを確認した。また、SEMA3FはPTEN欠損細胞においてもAkt-mTORシグナルを抑制し、細胞浸潤能を阻害した。つまり薬剤耐性を獲得した細胞においても効果を有している可能性が示唆された。さらにその効果は、in vivo系においても同様に確認され、SEMA3Fが乳癌の増殖、転移、血管新生を阻害する新たな治療標的となりうることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳癌の罹患率は女性の癌の中で最も高く、現在でも増加の一途をたどっている。一方で、分子標的薬ハーセプチンの登場によって1年生存率が大きく改善したが、ハーセプチンへの元々の耐性や獲得耐性も大きな課題となっており、乳癌を克服するためには新たな治療薬の開発が必要である。本研究で着目したセマフォリン3Fは乳癌細胞の浸潤能を抑制し、動物実験においても肝臓・肺への転移を抑制することが明らかとなった。この効果を利用し、既存の抗癌剤と併用することによって、より効果的な治療が望めると考えており今後の研究で追及していく。

研究成果の概要(英文)：Semaphorin 3F (SEMA3F), a member of class three semaphorin, is a potent inhibitor of angiogenesis and tumor progression in various tumors. In this study, we evaluated the function of SEMA3F using breast tumor cells in vitro and in vivo. As a result, SEMA3F inhibited phosphorylation of Akt and mTOR signaling in breast cancer cells. We also examined the effect of SEMA3F on breast tumor progression in vivo allograft model. We found that tumor volume was significantly inhibited in SEMA3F injected mice compared to controls. Importantly, we observed that mice treated with SEMA3F had minimal metastasis into the liver and lung, compared to controls. We conclude that SEMA3F is a promising inhibitor of breast tumor growth, angiogenesis and metastasis.

研究分野：乳腺外科学

キーワード：軸索誘導因子 セマフォリン 転移 乳癌 血管新生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでに我々は、軸索誘導因子に着目して研究を行ってきた。なかでも、分泌タンパク質である『セマフォリン 3F (SEMA3F)』はもともと、軸索伸長を負に制御する因子として同定されたが、その後の解析により肺小細胞癌で欠損する癌抑制因子としての機能が明らかとなり、様々な癌種において腫瘍血管新生、転移抑制因子として機能することが明らかになってきた[1, 2]。その後の、脳腫瘍細胞を用いて SEMA3F による細胞内シグナル解析を行なったところ、PI3K/Akt/mTOR 経路が抑制されることが明らかとなった。しかもこの SEMA3F の効果は脳腫瘍細胞のみならず PTEN 欠損脳腫瘍細胞、メラノーマ、血管内皮細胞、T 細胞を含む様々な細胞において観察された。さらに SEMA3F は mTOR 複合体 1(mTORC1)と mTORC2 の両方の複合体形成を阻害して、両複合体の機能を阻害していることが分かった[3, 4]。

2. 研究の目的

以上の知見を基に我々は、乳癌における分子標的薬剤ハーセプチン耐性化問題を解決すべく研究を開始した。これまでに、乳癌では PI3K/Akt/mTOR 経路の活性化がハーセプチン耐性化形成に極めて重要であり、ハーセプチン処置に加えて PI3K/Akt/mTOR 経路の遮断が効果的であることが報告されている[5]。そこで私は、SEMA3F による PI3K/Akt/mTOR 抑制効果を利用して、乳癌治療におけるハーセプチン耐性化問題を克服できるのではないかと考えた。また、SEMA3F を用いた臨床応用を目指すためには *in vivo* 環境下で、より安定なペプチドを用いることが求められる。そこで、より安定な構造を持つ『セマフォリンペプチド』開発を目指すため、SEMA3F が持つ乳癌抑制効果の分子機構を解明して、より効果的・安全な新規乳癌治療薬開発を目指すための礎を築くことを目的とする。

3. 研究の方法

(1)乳癌モデル動物(異種移植)は、ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 をヌードマウス乳腺に移植することで作成した。まず、MDA-MB-231 細胞にヒト SEMA3F 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 SEMA3F 過剰発現細胞はヌードマウス(メス6週齢)乳腺に 1×10^6 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、各マウスから腫瘍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。

(2)MDA-MB-231 細胞に対して、遺伝子編集技術である CRISPR/Cas9 を用いて PTEN ノックアウトを行った。MDA-MB-231 細胞に遺伝子導入試薬を用いて、PTEN 遺伝子を標的とする2種類の CRISPR ベクター(#1、#2)をそれぞれ導入した。その後、フローサイトメーターによって CRISPR 遺伝子が導入された細胞(GFP 陽性細胞)を確認し、それぞれ単離して培養を行った。各クローンは、ウエスタンブロット法により解析を行い、PTEN が欠損していることを確認した。

(3)セマフォリンペプチドの合成は、小麦胚芽を利用した無細胞タンパク質合成システムによって行った。合成したタンパク質はアクリルアミドゲル電気泳動にて、分子量や精製度を確認した。

4. 研究成果

(1)SEMA3F が乳癌細胞に与える影響を細胞レベルおよび移植モデルで評価する

まず SEMA3F の乳癌細胞に対する効果を *in vitro* 系で評価を行った。乳癌細胞株 MCF7 と MDA-MB-231 細胞に SEMA3F (640 ng/ml)を処理して15、30分後に細胞を回収した。その後、ウエスタンブロットによって細胞内シグナルを観察した。その結果、Akt と mTOR 下流分子である S6K のリン酸化が抑制されることが分かった。これは、これまで脳腫瘍細胞、血管内皮細胞で観察されたのと同様に乳癌細胞においても SEMA3F が Akt-mTOR シグナルを抑制することが明らかになった。

次に、SEMA3F の効果をマウス乳癌細胞移植モデルによって検討した。まず、マウス乳癌細胞株 4T1 を用いる同種移植モデル(allograft model)によって検討を行った。4T1 細胞にヒト SEMA3F 遺伝子を導入して安定発現株を樹立した。親株 4T1 あるいは作成した SEMA3F-4T1 細胞をそれぞれ、Balb/c マウスの乳腺に移植し経時的に腫瘍サイズを計測した。その結果、SEMA3F-4T1 移植

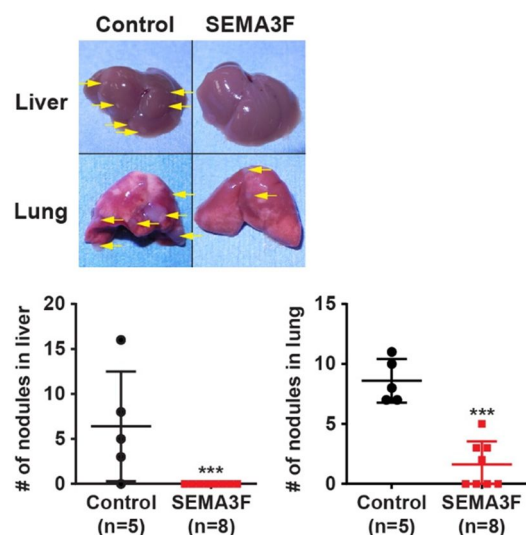


図1: 乳癌細胞同種移植モデルによる検討結果
マウス乳癌細胞4T1にSEMA3Fを導入した細胞をBalb/c マウスに移植して腫瘍の転移を評価した。

群で有意に腫瘍サイズが低下していることが明らかとなった。さらに、移植 24 日後に腫瘍および各種臓器を摘出して細胞内シグナル、転移の有無を検討した。乳癌の転移好発部位として肺と肝臓が知られているため、これらの臓器における結節 (nodule) の数を評価した。その結果、SEMA3F-4T1 移植群では肺、および肝臓ともに転移が抑制されていることが明らかとなった (図 1)。また腫瘍における細胞内シグナルを見ると、*in vitro* 系で確認した結果と同様に Akt-mTOR シグナルのリン酸化が抑制されていることを確認した。

さらに私はヒト乳癌細胞 MDA-MB-231 をヌードマウスに移植し、SEMA3F の腫瘍抑制効果を検討した (xenograft model)。MDA-MB-231 細胞にヒト SEMA3F 遺伝子を導入して安定発現株を作成した。親株あるいは SEMA3F 発現細胞をヌードマウス乳腺に移植し経時的に腫瘍サイズを測定した。移植後 10 週まで計測したが、両群に有意な差は認められなかった (図 2A)。さらに MDA-MB-231 細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入して *in vivo* imaging の手法を用いて腫瘍サイズを測定したが、上記と同様に両群に差は認められなかった (図 2B)。一方で、MDA-MB-231 細胞をヌードマウス尾静脈より投与して肺への生着を *in vivo* imaging で観察した。その結果、コントロールでは肺への生着が確認されたが、SEMA3F-MDA-MB-231 細胞では肺への生着が抑制されることが明らかとなった (図 2C)。

以上の検討から、SEMA3F は乳癌細胞の転移を抑制する効果を有していることが明らかとなった。この時、腫瘍の細胞内シグナル解析結果から Akt-mTOR シグナルのリン酸化が抑制されていることから、この現象は SEMA3F の Akt-mTOR シグナル抑制効果が関与していることが示唆された。

(2)SEMA3F がハーセプチン耐性 HER2 陽性乳癌に対する効果を評価する

まずはハーセプチン耐性形成に重要である PI3K/Akt/mTOR シグナルを活性化するため、CRISPR-Cas9 技術を用いて PTEN ノックアウト細胞を作成した。その結果、Akt と S6K のリン酸化が親株に比べて上昇していることを確認した (図 3A)。この細胞に SEMA3F を処理したところ、Akt および S6K のリン酸化を抑制することが明らかとなった (図 3A)。つまり、乳癌細胞において SEMA3F が PTEN 非依存的に Akt-mTOR シグナルを阻害することを示唆している。さらに細胞浸潤能を評価するためにトランスウェルを用いて SEMA3F の効果を検討した。その結果、SEMA3F は親株と PTEN ノックアウト細胞の細胞浸潤を抑制していることが明らかとなった (図 3B)。つまり、SEMA3F は PTEN 欠損乳癌細胞においても効果を有していることが分かった。

以上の検討結果から、SEMA3F が乳癌細胞に対して Akt-mTOR シグナルを抑制する効果を有することを確認した。さらにその効果は、*in vivo* 系においても同様に確認され、SEMA3F が乳癌の増殖、転移、血管新生を阻害する新たな治療標的となりうることが示唆された。

一方で、本研究の目的であるハーセプチン耐性化に関する実験は現在進行中である。図 3 に示すように SEMA3F は PTEN 欠損細胞においても

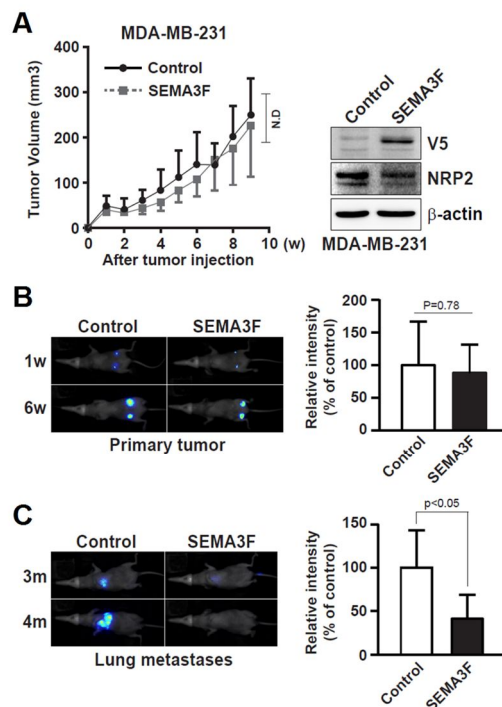


図2: 乳癌細胞異種移植モデルによる検討結果
(A) ヒト乳癌細胞MDA-MB-231にSEMA3Fを導入した細胞をヌードマウス乳腺に移植して腫瘍のサイズおよび転移の様子を観察した。
(B) 腫瘍細胞にルシフェラーゼ遺伝子を導入して*in vivo*イメージングによって評価した。
(C) 腫瘍をマウス尾静脈に投与して肺へ生着したものを観察した。

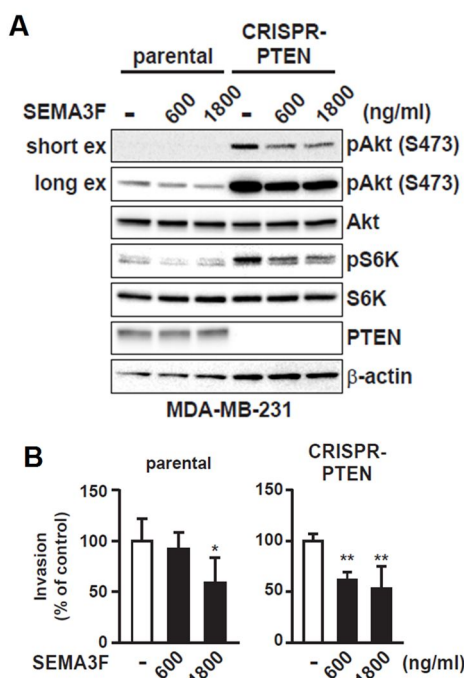


図3: PTENノックアウト細胞に対するSEMA3Fの効果
(A) MDA-MB-231細胞にCRISPR-Cas9技術によってPTEN発現をノックアウトした。SEMA3Fを処理してAkt-mTORシグナルに対する影響を検討した。
(B) PTENノックアウト細胞を用いて、細胞浸潤能をトランスウェルアッセイによって評価した。

Akt-mTOR シグナルを抑制し、細胞浸潤能を阻害した。つまりハーセプチン耐性化を獲得した細胞においても効果を有している可能性が示唆される。今後は、HER2 を過剰発現した SKBR3 細胞を用いて同様な検証を行い、薬剤耐性乳癌に対する SEMA3F の効果を詳細に検討したい。さらなるデータの蓄積を目指し、国際雑誌への投稿および学会発表を検討している。

引用文献

Shimizu A, Mammoto A, Italiano JE Jr, Pravda E, Dudley AC, Ingber DE, Klagsbrun M. ABL2/ARG tyrosine kinase mediates SEMA3F-induced RhoA inactivation and cytoskeleton collapse in human glioma cells. *J Biol Chem*. 2008 Oct 3;283(40):27230-8.

Bielenberg DR, Hida Y, Shimizu A, Kaipainen A, Kreuter M, Kim CC, Klagsbrun M. Semaphorin 3F, a chemorepulsant for endothelial cells, induces a poorly vascularized, encapsulated, nonmetastatic tumor phenotype. *J Clin Invest*. 2004 Nov;114(9):1260-71.

Nakayama H, Bruneau S, Kochupurakkal N, Coma S, Briscoe DM, Klagsbrun M. Regulation of mTOR Signaling by Semaphorin 3F-Neuropilin 2 Interactions In Vitro and In Vivo. *Sci Rep*. 2015 Jul 9;5:11789.

Nakayama H, Kusumoto C, Nakahara M, Fujiwara A, Higashiyama S. Semaphorin 3F and Netrin-1: The Novel Function as a Regulator of Tumor Microenvironment. *Front Physiol*. 2018 Nov 23;9:1662.

Junttila TT1, Akita RW, Parsons K, Fields C, Lewis Phillips GD, Friedman LS, Sampath D, Sliwkowski MX. Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. *Cancer Cell*. 2009 May 5;15(5):429-40.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hironao Nakayama, Ayumi Nakazawa, Natsuki Sawatari, Akari Murakami, Hisayo Nishida-Fukuda, Yoshiaki Kamei, Yasutsugu Takada and Shigeki Higashiyama
2. 発表標題 Semaphorin 3F inhibits breast tumor angiogenesis and metastasis via Akt-mTOR pathway.
3. 学会等名 International Vascular Biology Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山寛尚, 村上朱里, 福田尚代, 亀井義明, 高田泰次, 東山繁樹.
2. 発表標題 セマフォリン3Fは乳癌の血管新生と転移を抑制する.
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会 第90回日本生化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hironao Nakayama, Akari Murakami, Hisayo Nishida-Fukuda, Yoshiaki Kamei, Yasutsugu Takada and Shigeki Higashiyama.
2. 発表標題 Semaphorin 3F inhibits breast tumor angiogenesis and metastasis via Akt-mTOR pathway.
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中山 寛尚 (Nakayama Hironao) (40512132)	広島国際大学・保健医療学部・講師 (35413)	