

令和 4 年 4 月 8 日現在

機関番号：35413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08984

研究課題名(和文) 癌微小環境制御因子netrin-1シグナルを標的とする新規髄芽腫治療法の開発

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、髄芽腫細胞が分泌する『軸索誘導因子netrin-1』が髄芽腫細胞の浸潤性や血管新生を誘導することを見出し、小児髄芽腫患者の尿サンプルを用いて髄芽腫の有無、悪性度、術後の経過を予測するバイオマーカーとしての有用性を報告してきた。本研究期間においてはnetrin-1シグナルがTGF β 、BMPシグナルと密接に関連して髄芽腫の癌幹細胞制御に関与しており、強力な転移能を獲得していることが明らかとなった。つまり、netrin-1が髄芽腫とその周辺組織(微小血管ネットワーク、細胞外基質や炎症など)に影響を与える『癌微小環境制御因子』として機能している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軸索誘導因子(リガンド)およびそのレセプターは、神経軸索伸長の制御因子として同定、解析されてきた。その後の解析によって、軸索誘導因子およびそのレセプターが腫瘍や血管新生にも影響をもたらすことが理解され、腫瘍の治療標的として研究が進んでいる。よって、本研究で明らかになった髄芽腫におけるnetrin-1の分子機序をさらに解析することによって腫瘍・血管新生に対する阻害剤開発に貢献するだけでなく、その他の分野(特に神経変性疾患、炎症関連疾患)への応用も可能であり創薬分野に大きく貢献できるものと考えられる。

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 cell invasiveness and angiogenesis in vitro and in vivo. Here, we analyze biological mechanism of netrin-1 in medulloblastoma using mouse model. In a xenograft model, tumor growth was increased when medulloblastoma cells overexpressing netrin-1 were implanted vs. parental cells. Furthermore, immunohistochemical analysis of CD31-expressing endothelial cell demonstrated numerous blood vessels in netrin-1-medulloblastoma. As a molecular mechanism, we find that epithelial mesenchymal transition (EMT)-related molecules are upregulated in netrin-1-medulloblastoma.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：軸索誘導因子 血管新生 転移 上皮間葉転換 netrin-1 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

小児脳腫瘍である髄芽腫は、小脳に発症する悪性腫瘍である。髄芽腫細胞は非常に細胞遊走・転移能が高いため、小脳から脳実質、脊髄に播種転移する傾向があり、この場合、予後は非常に悪い。髄芽腫に対しては外科的手術後、放射線や化学療法が一般的であるが、とくに高転移タイプ髄芽腫に対してははまだ確立された治療法はなく、髄芽腫の発症メカニズムも含めてさらなる基礎的研究が必要とされている。

我々は、軸索誘導因子のひとつ netrin-1 とそのレセプター群 (少なくとも 7 種類) によるシグナルが髄芽腫細胞の遊走・浸潤能を亢進させること、血管内皮細胞の遊走を促進して血管新生を誘導すること、尿中 netrin-1 が髄芽腫バイオマーカーとして有用なことを報告してきた [1, 2] さらに近年 netrin-1 が CD4 陽性 T 細胞の遊走を亢進させて、免疫・炎症反応に重要なシグナルであることを見出した [3]

これまでに sonic hedgehog (Shh) とそのレセプターによるシグナルが髄芽腫形成や癌幹細胞の維持に重要であると考えられているため、Shh 阻害剤が髄芽腫治療薬として開発されてきたが、その治療効果は限定的であったことから癌幹細胞維持には複数の分子が関与していることが示唆されている。そこで私は髄芽腫細胞を非接着環境下で培養して癌幹細胞集団を濃縮し、遺伝子発現解析を行った。その結果、癌幹細胞集団では netrin-1 およびそのレセプター DCC, UNC5C が顕著に上昇していること (図 1)、TGFβ と BMP シグナルが活性化していることを見出した。以上の結果から、netrin-1 は Shh や TGFβ、BMP シグナルと密接に関連して癌幹細胞維持機構に関与していることが推察され、netrin-1 が髄芽腫とその周辺組織 (微小血管ネットワーク、細胞外基質や炎症など) に影響を与える『癌微小環境制御因子』として機能しているのではないかと考えている。そこで、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、腫瘍細胞の転移を止めることが可能ではないかという着想に至った。

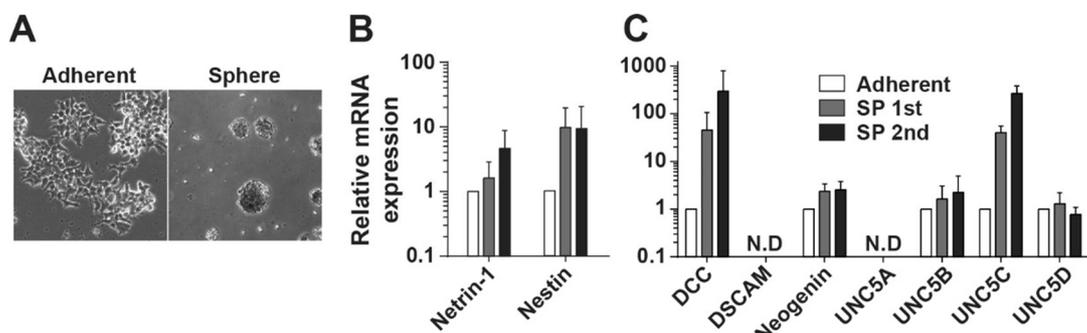


図 1：髄芽腫癌幹細胞における netrin-1 リガンドおよびレセプター発現解析

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

B, C：作成した SP 1st を懸濁して再度 SP を作成した (SP 2nd)。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。

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 netrin-1 の髄芽腫に与える影響を評価し、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

髄芽腫モデル動物は、ヒト髄芽腫細胞株 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 5×10^4 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。

髄芽腫自発発生モデル (smo/smo) は、12-16 週齢マウスから小脳を摘出して解析を行った。蛋白質発現はウエスタンブロットにて、遺伝子発現は定量 PCR にて解析を行った。

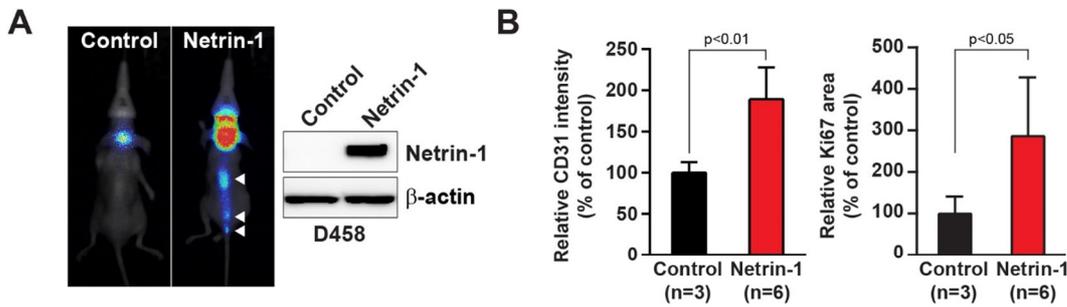


図2：髄芽腫におけるnetrin-1の影響

A：髄芽腫細胞株D458にnetrin-1を遺伝子導入して安定株を作成した。さらにルシフェラーゼ遺伝子を導入してin vivo imagingを行い、腫瘍細胞の転移の様子を観察した。矢頭は脊髄への転移を示している。

B：マウスから髄芽腫を摘出して免疫染色（CD31およびKi67）を行った。

4．研究成果

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。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2A）。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（約2倍）しており血管新生が増加していることを示唆していた（図2B）。さらに細胞増殖マーカーであるKi67陽性細胞も約3倍に増加しており（図2B）、netrin-1による髄芽腫増殖、転移能が亢進していることが示唆された。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。

髄芽腫自発発症モデル(smo/smo)における解析では、小脳におけるnetrin-1リガンドおよびレセプター群の発現を評価した。その結果、smo/smoマウスではnetrin-1およびneogenin, UCN5C受容体が増加していることが明らかとなった。さらにEMTマーカーであるvimentin, β -cateninが上昇していた。移植に用いたD458細胞においてEMTマーカー発現を評価すると、netrin-1過剰発現細胞において数種のEMTマーカーが上昇していることが明らかとなった。これらの結果から、netrin-1がEMTを誘導し髄芽腫の転移を促進している可能性が示唆された。

今後は、引き続きnetrin-1シグナルとTGF β シグナルのクロストークを解析し、両者のシグナルを制御することで髄芽腫の増殖、転移に効果があるのか検討を行う予定である。

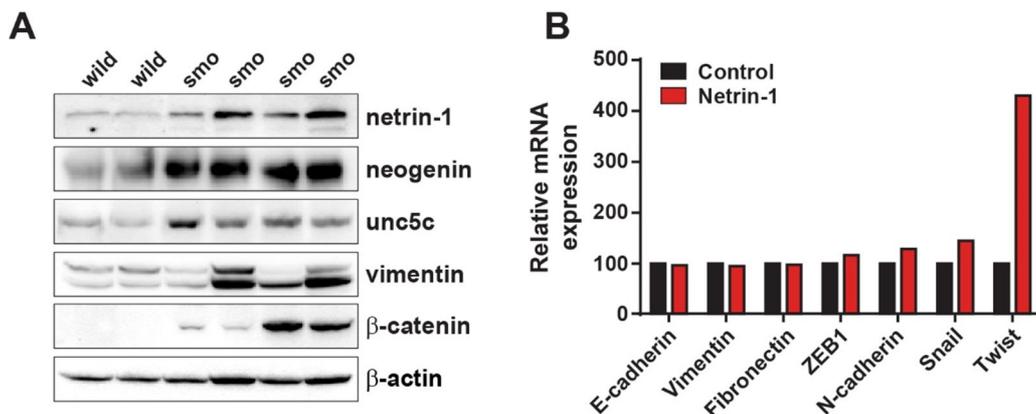


図3：Netrin-1とEMTとの関係

A：野生型マウス(wild)と髄芽腫マウス(smo/smo)の腫瘍部位における各種蛋白質発現の比較検討。

B：EMTマーカーを定量PCRにて比較検討した。

引用文献

1. **Nakayama H.**, Kusumoto C., Nakahara M., Fujiwara A., and Higashiyama S. Semaphorin 3F and Netrin-1: The Novel Function as a Regulator of Tumor Microenvironment. *Front Physiol*, 9, 1662, 2018.
2. Akino T., Han X., **Nakayama H.**, McNeish B., Zurakowski D., Mammoto A., Klagsbrun M., and 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, 3716-3726, 2014.
3. Boneschansker L., **Nakayama H.**, Eisenga M., Wedel J., Klagsbrun M., Irimia D., and Briscoe D. M. Netrin-1 Augments Chemokinesis in CD4+ T Cells In Vitro and Elicits a Proinflammatory Response In Vivo. *J Immunol*, 197, 1389-1398, 2016.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakayama Hironao, Nakahara Masako, Matsugi Erina, Soda Midori, Hattori Tomoka, Hara Koki, Usami Ayuki, Kusumoto Chiaki, Higashiyama Shigeki, Kitaichi Kiyoyuki	4. 巻 26
2. 論文標題 Protective Effect of Ferulic Acid against Hydrogen Peroxide Induced Apoptosis in PC12 Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 90～90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules26010090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Matsushima Shoko, Shimizu Akio, Kondo Manami, Asano Hirotsugu, Ueno Nobuhiro, Nakayama Hironao, Sato Naoko, Komeno Masahiro, Ogita Hisakazu, Kurokawa-Seo Misuzu	4. 巻 10
2. 論文標題 Anosmin-1 activates vascular endothelial growth factor receptor and its related signaling pathway for olfactory bulb angiogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-57040-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama Hironao, Kusumoto Chiaki, Nakahara Masako, Fujiwara Akira, Higashiyama Shigeki	4. 巻 9
2. 論文標題 Semaphorin 3F and Netrin-1: The Novel Function as a Regulator of Tumor Microenvironment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 eCollection
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2018.01662	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中原正子, 松木依理奈, 楠本智章, 曾田翠, 原巨輝, 宇佐美歩樹, 服部友香, 東山繁樹, 北市清幸, 中山寛尚
2. 発表標題 フェルラ酸による神経細胞保護作用の分子メカニズム解析
3. 学会等名 第61回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松木依理奈, 中原正子, 楠本智章, 東山繁樹, 中山寛尚
2. 発表標題 PTEN欠損乳癌細胞における軸索誘導因子セマフォリン3Fシグナル解析
3. 学会等名 第61回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hironao Nakayama, Akari Murakami, 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79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北市清幸, 中山寛尚
2. 発表標題 フェルラ酸の生体内挙動と脳機能への影響
3. 学会等名 第11回フェルラ酸研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 後藤大尚, 尾野達郎, 中原正子, 楠本智章, 藤原章, 東山繁樹, 中山寛尚
2. 発表標題 Netrin-1シグナルに着目した髄芽腫転移メカニズム解析
3. 学会等名 第14回日本臨床検査学教育学会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------