

ヒト神経芽腫細胞株における  
Semaphorin 3A による腫瘍制御機構の検討  
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程  
生理系機能生理学専攻

石塚悦昭

修了年 2017 年

指導教員 越永從道

## 【論文要約】

### はじめに

神経芽腫は、白血病、脳腫瘍について頻度が高い小児固形腫瘍である。胎児期の神経堤細胞を起源とし、同細胞に由来する交感神経節および副腎髄質に多く発生する。高リスク群に対しては、手術療法、放射線療法、末梢血幹細胞移植併用大量化学療法などを組み合わせた、集学的治療が行われているにもかかわらず、5年生存率は50%未満にとどまっており、新たな治療法の開発が喫緊の課題となっている。

胎児期の神経組織の形成過程において、神経堤から発生した細胞は、神経成長因子（Nerve Growth Factor: NGF）の刺激を受けて分化するが、神経芽腫は、複数の遺伝子変異が誘因となり、分化が停止した状態で腫瘍形成する。神経芽腫の遺伝子解析では、発現と予後に相関のある *MYCN*、*PHOX2B*、*ALK* など多数の遺伝子について詳細な解析が行われてきたが、神経芽腫の病態には、既知の遺伝子変異だけでは規定できない多様性があることから、新規の予後規定因子の探索が必要と考えられる。近年の神経芽腫治療に対する研究では、13-*cis* レチノイン酸（Retinoic Acid: RA）が、NGF 受容体の TrkA や神経栄養因子受容体 Ret の発現を高め、未分化な神経芽腫細胞を成熟した神経節腫細胞へ良性転化させることが認められている。欧米では、高リスク群の神経芽腫に対する維持療法として、13-*cis*RA を投与した結果、3年以内の再発・死亡率を15%減少させることが報告されているが、神経芽腫は腫瘍特性が多様であり、RA を投与しても再発・転移が生じることが多く、さらなる治療法の開発が必要である。

秩序だった神経組織の形成には、NGF のほかに、無秩序な神経伸長を抑制する神経ガイダンスシグナルも必要であり、Semaphorin 3A (SEMA3A) は受容体の Neuropilin1 (NRP1) と結合すると、神経成長円錐の崩壊を引き起こし、神経伸長反発因子として機能する。これまでに、神経芽腫では NRP1 の発現異常が指摘されており、フィラデルフィア小児病院の神経芽腫 88 例における遺伝子解析の結果、NRP1 は予後不良群で低発現であることが認められている。

Fakhari らは神経芽腫臨床検体 37 例の発現解析から、神経芽腫では病期の進行に従い、NRP1 の発現が低下することを報告している。しかしながら、NRP1 が神経芽腫の悪性化において果たす役割については明らかでは

ない。また、NRP1 と結合する SEMA3A は、神経ガイダンスシグナルとして神経伸長を抑制するほか、近年、種々の固形腫瘍で腫瘍進展を抑制する効果が認められているが、神経芽腫に対する効果は報告されていない。神経堤細胞由来の神経芽腫において、神経伸長を抑制する SEMA3A は腫瘍制御に関連する可能性があり、受容体である NRP1 の発現異常は、腫瘍形成の過程に大きく関与している可能性が高い。以上より、本研究では、ヒト神経芽腫細胞株を用いて、NRP1 発現抑制による腫瘍細胞特性の変化を解析するとともに、NRP1 リガンドの SEMA3A による腫瘍制御機構について検証する実験を企画した。

## 目的

ヒト神経芽腫細胞株を用いて、NRP1 の発現抑制による腫瘍細胞特性の変化を解析する。また、NRP1 リガンドの SEMA3A による腫瘍制御機構を検討する。

## 対象と方法

ヒト神経芽腫細胞株の選定には、NRP1 遺伝子 (*NRP1*) および SEMA3A 遺伝子 (*SEMA3A*) 高発現のヒト神経芽腫細胞株、SK-N-AS を使用した。SK-N-AS に対し、Lipofection 法により siRNA を導入し、*NRP1* の発現抑制による、増殖・浸潤・遊走能の変化を解析した。*SEMA3A* についても、*NRP1* の発現抑制と同様に SK-N-AS に対して siRNA を導入し、増殖・浸潤・遊走能の変化について解析した。

*NRP1*、*SEMA3A* の発現を抑制し、浸潤能に関与する蛋白として Integrin  $\beta$  1、Vimentin、E-Cadherin、N-Cadherin、Matrix Metalloproteinase (MMP) -2、MMP-9 の発現を Western blotting により解析した。Integrin  $\beta$  1 下流の活性について、FAK-PI3K 経路のリン酸化状態を Western blotting で解析し、Integrin  $\beta$  1 下流の F-actin の重合を Phalloidin 染色で評価した。

SEMA3A は、0、5、10、50nM の各濃度で SK-N-AS へ投与し、24 時間後の変化について増殖・浸潤能を解析した。また、50nM の SEMA3A を投与し、24 時間後の遊走能の変化を解析した。

SEMA3A を 0、5、10、50nM で SK-N-AS へ投与し、1 時間後に蛋白を

回収したのち、Integrin  $\beta$  1 および下流の FAK-PI3K 経路のリン酸化状態を Western blotting で解析した。さらに、50nM の SEMA3A を SK-N-AS へ投与し、1 時間後の F-actin の重合を Phalloidin 染色で解析した。

## 結果

ヒト神経芽腫細胞株 SK-N-AS において、*NRP1* の発現抑制の結果、Control 群と比較して細胞増殖能について有意な変化を認めなかったが (P=0.29)、浸潤能の亢進 (P=0.00063)、および遊走能の亢進 (P=0.032) を認めた。*SEMA3A* の発現抑制の結果も、*NRP1* の発現抑制の結果と同様に、増殖能について有意差はなく (P=0.20)、浸潤能の亢進 (P=0.000059)、および遊走能の亢進 (P=0.015) を認めた。

浸潤・遊走能の亢進に関与する因子として、*NRP1*、*SEMA3A* の発現抑制により、Integrin  $\beta$  1 が mRNA レベル、蛋白レベルでともに発現が亢進した。さらに Integrin  $\beta$  1 下流の FAK-PI3K 蛋白のリン酸化の亢進と F-actin の重合の亢進を認めた。

*SEMA3A* の投与の結果、増殖能に有意差は認めなかったが、*SEMA3A* の投与により低下する傾向がみられた。浸潤能は *SEMA3A* の濃度勾配に従って低下し、50nM の *SEMA3A* 投与により有意に抑制された (P=0.0033)。遊走能は *SEMA3A* 非投与と比較して 50nM 投与で有意に低下した (P=0.0056)。

*SEMA3A* の発現抑制とは反対に、*SEMA3A* の投与では、濃度依存性に Integrin  $\beta$  1 の発現と下流の FAK-PI3K 経路のリン酸化が抑制され、50nM の *SEMA3A* 投与により有意に F-actin の重合が退縮することを確認した (P=0.00036)。

## 考察

本実験の結果、ヒト神経芽腫細胞株 SK-N-AS において、*NRP1* と *SEMA3A* の発現抑制により、細胞の浸潤・遊走能が亢進すること、逆に *SEMA3A* の投与により細胞の浸潤・遊走能が抑制されることが判った。さらに、これらの変化は *SEMA3A* による Integrin $\beta$ 1 の発現制御を介して生じていることを発見した。

Integrin  $\beta$  1 は細胞膜上で Integrin  $\alpha$  とサブユニットを形成し、細胞外基

質との結合性を高め、腫瘍の進展に関与するほか、細胞内では、FAK-PI3K 経路を介して細胞浸潤・遊走のシグナルを伝達する。SEMA3A は Integrin  $\beta 1$  の発現抑制を介し、細胞外では基質との結合を低下させ、細胞内では FAK-PI3K 経路を抑制し、細胞の浸潤・遊走能を抑制すると考えられる。

このことは、NRP1 発現の減弱による、SEMA3A シグナル伝達の低下により増加した Integrin  $\beta 1$  発現によって、神経芽腫細胞の浸潤や転移が起こりやすくなる可能性を示唆している。

### 結語

ヒト神経芽腫細胞株 SK-N-AS において、NRP1 の発現抑制により Integrin  $\beta 1$  の発現が上昇し、腫瘍細胞の浸潤・遊走能が亢進した。一方、NRP1 リガンドの SEMA3A は Integrin  $\beta 1$  の発現を制御し、腫瘍細胞の浸潤・遊走能を抑制した。この結果から神経芽腫に対し、SEMA3A が腫瘍の浸潤・転移を制御する可能性が示唆された。