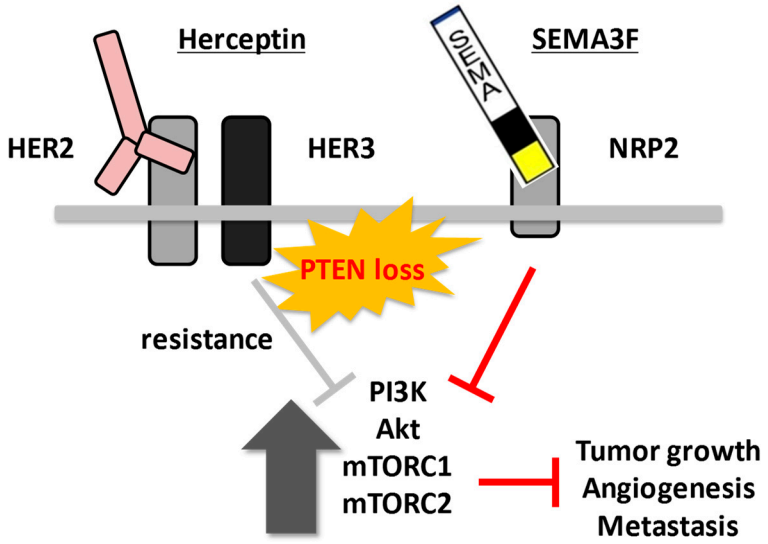
163　乳癌転移抑制因子セマフォリンペプチドの開発	中山　寛尚

【目的】HER2 分子標的薬ハーセプチンは乳癌患者の生存率改善に大きく貢献している一方、一部の患者に対する元々の耐性や獲得耐性が大きな課題となっている。耐性機序には PI3K／AktK／mTOR 経路の活性化が関与しており、ハーセプチン処置に加えて、この経路の遮断が効果的な治療に重要であることが分かってきた。私の研究グループでは、抗腫瘍・抗血管新生効果を有する軸索誘導因子セマフォリン 3F（SEMA3F）の細胞内シグナル解析から、SEMA3F が様々な細胞の PI3K／AktK／mTOR 経路を抑制することを明らかにしてきた。本研究では、SEMA3F が新たな乳癌治療分子になるかどうか検証するため、SEMA3F が乳癌細胞に与える影響、およびマウスを用いた乳癌細胞移植モデルによって評価を行った。本研究成果を基に、SEMA3F の効果を利用した乳癌治療の臨床応用を目指すため、*in vivo* 環境下で、より安定な『セマフォリンペプチド』の開発を目指し、より効果的・安全な新規乳癌治療薬開発を目指す。

【方法】移植実験には、SEMA3F 安定発現株 4T1 細胞（同種移植）、あるいは MDA-MB-231 細胞（異種移植）をそれぞれマウス乳腺に移植して検討を行った。これらの細胞にはルシフェラーゼ遺伝子が導入されているため、発光イメージングを用いて他臓器への転移をモニターした。移植 24 日後に、腫瘍を摘出し免疫染色によって増殖マーカーKi67、血管内皮マーカーCD31 で観察を行い、SEMA3F による効果を評価した。

【結果】SEMA3F 過剰発現 4T1 細胞（SEMA3F-4T1）を移植した群では、コントロール 4T1 細胞を移植した群に比べて、腫瘍サイズが有意に低下していることが明らかとなった。移植 24 日後には、コントロール 4T1 群では肺、肝臓への転移が確認されたが、SEMA3F 群では転移が抑制されていた。腫瘍組織の免疫染色では、SEMA3F 群において Ki67 および CD31 陽性細胞が低下していたことから腫瘍増殖能、血管新生が抑制されていることが分かった。また、腫瘍における細胞内シグナルを解析すると Akt-mTOR シグナルが SEMA3F によって抑制されていた。一方で MDA-MB-231 細胞を用いた異種移植モデルではコントロール群と SEMA3F 過剰発現群において原発部位の腫瘍サイズに変化は無かったが、肺への転移が SEMA3F 群において抑制されていることが明らかとなった。以上のデータから、SEMA3F が乳癌の増殖、血管新生、転移を阻害する新たな治療標的となりうることが示された。

セマフォリン 3F による乳癌転移抑制メカニズム



163. 乳癌転移抑制因子セマフォリンペプチドの開発

中山　寛尚

広島国際大学 保健医療学部 医療技術学科

Key words：乳癌，セマフォリン，転移，血管新生

緒　言

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］。そこで私は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／AktK／mTOR 経路を抑制することを明らかにした［3, 4］。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］。

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／AktK／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／AktK／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／AktK／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。

方法および結果

1. SEMA3F は乳癌細胞の浸潤能を阻害する

培養細胞として 7 種の乳癌細胞（MCF7、T47D、MDA-MB-231、MDA-MB-436、MDA-MB-453、SKBR3、BT-549）を準備した。まずは SEMA3F レセプターである neuropilin-2（NRP2）の発現解析を行ったところ、すべての細胞に発現が確認された（図 1A)。一方で neuropilin-1（NRP1）は MDA-MB-231 のみで発現が確認された。次に SEMA3F による効果を確認するために MCF7 および MDA-MB-231 細胞を用いて検討を行った。細胞に SEMA3F（600 ng/mL）を処理して 15、30 分後に細胞を回収して細胞内シグナル解析を行った。その結果、両細胞において SEMA3F は経時的に Akt および S6K（mTOR 下流因子）のリン酸化を抑制することが明らかとなった（図 1B)。つまり、乳癌細胞において SEMA3F が Akt-mTOR シグナルを阻害することが確認された。

次に細胞浸潤能を確認するためにトランスウェルアッセイを行った。上層に細胞 MDA-MB-231 を、下層に SEMA3F を異なる濃度（600、1,800 ng/mL）処理して翌日、浸潤した細胞数をカウントして評価した。その結果、SEMA3F 処理によって乳癌細胞の浸潤が抑制されていることが明らかとなった（図 1C)。

これらの SEMA3F による効果は NRP2 レセプターをノックアウトした細胞において消失したことから、SEMA3F の効果は NRP2 レセプター依存的であることを確認している。

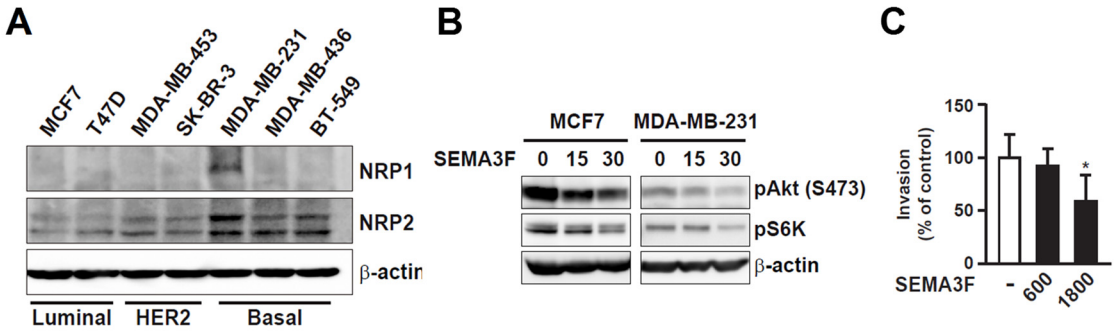


図 1. SEMA3F は乳癌細胞の浸潤能を阻害する

A) 各種乳癌細胞株におけるセマフォリンレセプターNRP1 および NRP2 発現。

B) 乳癌細胞株 MCF7 および MDA-MB-231 細胞に SEMA3F（600 ng/mL）を処理して経時的に細胞内シグナルを観察した。

C) MDA-MB-231 細胞を用いてトランスウェルアッセイを行い、細胞浸潤能を評価した。トランスウェル上層にはマトリゲルを塗布し細胞を入れ、下層には SEMA3F（600、1,800 ng/mL）を含む培地をいれ、18 時間インキュベートし浸潤した細胞をカウントした。有意差はコントロールに対してノンパラメトリック Mann-Whitney U test によって解析した。* $P < 0.05$。

2. SEMA3F は乳癌の増殖、血管新生、転移を阻害する

本研究では、2 種の移植モデル（同種移植と異種移植）によって検討を行った。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（図 2）。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。SEMA3F の発現はウエスタンブロットによって確認した（図 2A）。親株 4T1 あるいは作製した 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（図 2A）。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 2B）。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 SEMA3F によって 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（図 2C）。

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）（図 3）。MDA-MB-231 細胞にヒト SEMA3F 遺伝子を導入して安定発現株を作製した。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 3A）。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。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 3B）。

3. セマフォリンペプチドの作製

上記の結果を基に、*in vivo* 環境下で安定な SEMA3F ペプチドの作製を進めている。まずは全長 SEMA3F にビオチンタグをつけた遺伝子を作製し、共同研究先である愛媛大学東山繁樹教授の協力の下、コムギ無細胞タンパク質合成技術によって SEMA3F タンパク質合成を開始している。蛋白質の可溶化条件を再検討し、大量合成できる条件を決定する予定である。その後、全長 SEMA3F を断片化していき、NRP2（SEMA3F レセプター）に結合する最小単位のペプチドを同定し生理活性を評価する。その結果、より安定的なセマフォリンペプチドが作製できるものと考えている。

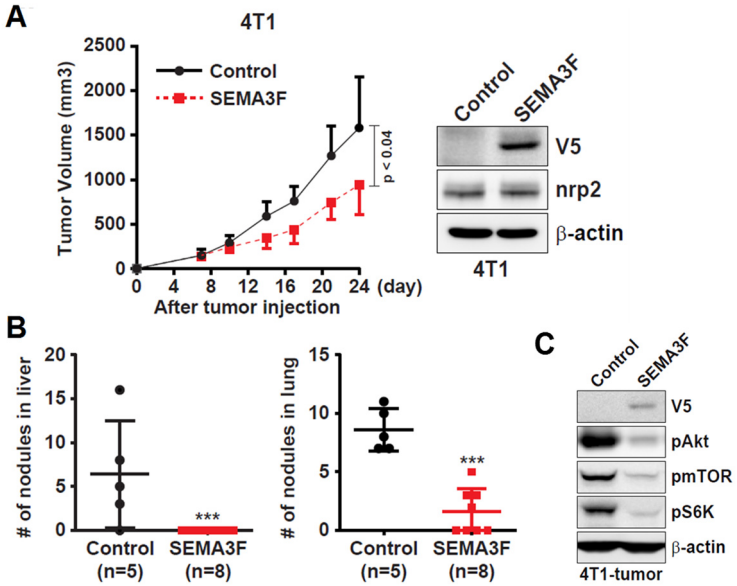


図 2. SEMA3F は乳癌の増殖、血管新生、転移を阻害する（同種移植モデル）

A) マウス乳癌細胞株 4T1 細胞（親株または SEMA3F 安定発現株）を Balb/c マウス乳腺に移植した。移植後に腫瘍サイズを経時的に測定した。ウエスタンブロット法によって 4T1 細胞における SEMA3F（V5 タグ）の発現を確認した。

B) 移植後 24 日に腫瘍および各種臓器を摘出した。肝臓、肺における転移の有無を評価した。有意差はコントロールに対してノンパラメトリック Mann-Whitney U test によって解析した。***P < 0.01。

C) 摘出した腫瘍サンプルを用いてウエスタンブロットを行い、細胞内シグナルを観察した。

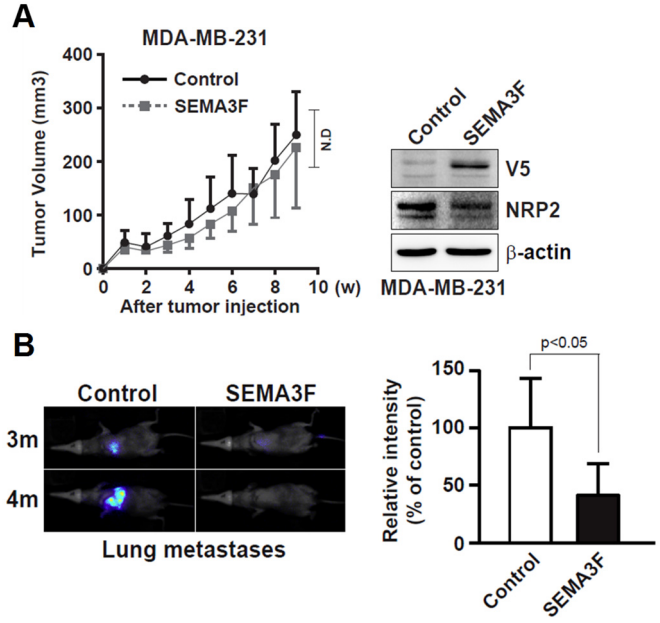


図 3. SEMA3F は乳癌転移を阻害する（異種移植モデル）

A) ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 細胞（親株または SEMA3F 安定発現株）をヌードマウス乳腺に移植した。移植後に腫瘍サイズを経時的に測定した。ウエスタンブロット法によって MDA-MB-231 細胞における SEMA3F（V5 タグ）の発現を確認した。

B) MDA-MB-231 細胞（親株または SEMA3F 安定発現株）をそれぞれマウス尾静脈より投与し、*in vivo* imaging によって体内局在を評価した。有意差はコントロールに対してノンパラメトリック Mann-Whitney U test によって解析した。

考　察

以上の検討から、SEMA3F は乳癌細胞の増殖・血管新生・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。つまり、SEMA3F を用いた新たな乳癌治療の可能性が示された。今後はこれらの知見を基に、*in vivo* 環境でも安定なセマフォリンペプチドを合成し、臨床応用を目指した創薬へ繋げたいと考えている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、愛媛大学プロテオサイエンスセンター細胞増殖腫瘍制御部門の東山繁樹教授である。東山研究室の教室員皆様のご協力に感謝申し上げます。また、広島国際大学保健医療学部医療技術学科の教員および研究室の皆様に感謝申し上げます。

文　献

1） 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. doi: 10.1074/jbc.M804520200. Epub 2008 Jul 25.

2） 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. doi: 10.1172/JCI200421378

3） 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. doi: 10.1038/srep11789.

4） 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. doi: 10.3389/fphys.2018.01662. eCollection 2018.

5） 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. doi: 10.1016/j.ccr.2009.03.020.