

学 位 論 文 要 約

研究題目

Sodium Valproate Enhances Semaphorin 3A-mediated Anti-angiogenesis and Tumor Growth Inhibition in Human Osteosarcoma Cells

(バルプロ酸はヒト骨肉腫細胞においてセマフォリン 3A を介して抗血管新生作用と腫瘍成長の抑制を増強する)

兵庫医科大学大学院医学研究科

医科学専攻

高次神経制御系

整形外科学 (指導教授 橘 俊哉)

氏 名 澤井 龍生

【研究目的】

骨肉腫 (OS) は最も頻度の高い原発性悪性骨腫瘍であり多くは小児期に発生する。腫瘍では血管新生が優勢でありそれを抑制することが抗腫瘍効果ならびに血行性遠隔転移を抑制し予後の改善につながると考える。

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) はクロマチンリモデリングや遺伝子転写機構に関与しており、HDAC 阻害剤 (HDACI) 治療はがん細胞の細胞周期停止、アポトーシス、分化、免疫応答の誘導により抗腫瘍効果を発揮する。HDACI であるバルプロ酸 (VPA) やトリコスタチン A (TSA) は、転移および血管新生を抑制する可能性があるとして報告されている。

本研究では HDACI を用いて、OS における SEMA3A を介した腫瘍血管新生阻害について検討した。

【研究方法】

U-2 と Sa の二種類の OS 細胞とヒト微小血管内皮 (HMVE) 細胞を用意し培養皿に播種した。24 時間後 (Day0) に 1.0 mM の VPA または 20 nM の TSA を添加し、7 日間培養した。3 日後 (Day3) に培地を交換し、残りの培養皿はさらに 4 日間培養した (Day7)。この実験で使用した RNA 細胞培養液とタンパク質は、3 日目と 7 日目に採取した。

HDAC 阻害剤の SEMA3A および関連受容体への影響について、U-2 OS 細胞で SEMA3A、NRP1、および PLXNA1 の mRNA 発現を RT-PCR を使用して調べた。

【研究結果】

VPA および TSA の HDACI としての効果は、U-2 OS および SaOS-2 細胞に VPA 1.0 mM または TSA 20 nM を使用して 3 日および 7 日間処理した後、ウェスタンブロット分析を使用して調べた。その結果 VPA および TSA で処理された OS 細胞株の両方で、アセチル化ヒストン H3 レベルが有意に増加した。

SEMA3A、NRP1、および PLXNA1 の mRNA 転写産物レベルは、RT-qPCR を使用して定量し、タンパク質発現レベルはウェスタンブロット分析を使用し調べた。

SEMA3A の mRNA 転写産物は、U2-OS 細胞および SaOS-2 細胞でそれぞれ約 3.0~3.4 倍、3.4~3.7 倍に増加し、NRP1 の mRNA 転写産物は両 OS 細胞株で約 2.3~4.2 倍増加した。また、

タンパク質の発現量も増加した。一方、VPA または TSA による処理では、PLXNA1 の mRNA 転写産物およびタンパク質の発現量は有意に増加しなかった。

HMVE 細胞の SEMA3A およびその関連受容体における HDACI の効果

HMVE 細胞に対する HDACI の効果を Real-time PCR で解析した。その結果、SEMA3A の mRNA 転写産物は 3 日目に約 2.7~3.1 倍、7 日目に約 3.3 倍増加し、NRP1 は 3 日目に約 2.5 倍、7 日目に約 3.5 倍増加した。PLEXINA1 はより効果的であり、3 日目に約 4.3 倍、7 日目に約 5.0 倍増加した。

OS および HMVE 細胞における SEMA3A 分泌に対する HDACI の効果

SEMA3A の分泌に対する HDACI の効果を調べるため、U-2 OS 細胞、SaOS-2 細胞および HMVE 細胞を、1.0mM VPA または 30nM TSA とともに 3 日間および 7 日間培養した。3 日目と 4 日目に培養液中の可溶性 SEMA3A を ELISA で分析した。両 OS 細胞株とも、3 日目には約 2.1~2.3 倍、7 日目には約 3.5 倍に増加した。HMVE 細胞においても HDACI 処理後に 2.5~2.8 倍に増加した。

VPA 誘導 SEMA3A は OS 細胞で血管管形成を抑制

腫瘍細胞からの SEMA3A の分泌が新生血管形成を抑制するのを確認するために、1.0 mM VPA で処理された OS 細胞培地および pSEMA3A-transfected 細胞の影響を評価した。1.0 mM VPA で処理された HMVE 細胞では一部は管腔形成を示したがコントロールよりも少なかった。VPA で処理された OS 細胞培地は管腔形成を有意に抑制した。さらに、pSEMA3A-transfected OS 細胞培地では管腔形成は完全に抑制された。これらの結果から、HDACI による SEMA3A の増産が管腔形成を抑制したことが示唆された。

SEMA3A の誘導は OS 細胞の増殖を抑制する

SEMA3A が腫瘍細胞の増殖に影響を及ぼすかどうかを調べた。SEMA3A cDNA 遺伝子発現、あるいは SEMA3A に対するコントロールベクターまたは siRNA を U-2 OS 細胞および SaOS-2 細胞にトランスフェクションした。可溶性 SEMA3A の分泌量は、SaOS-2 細胞および U-2 OS 細胞でそれぞれ約 7.7~8.7 倍に増加した。SEMA3A に対し siRNA をトランスフェクションすると可溶性 SEMA3A の分泌量が減少した。SEMA3A の過剰発現はコントロールおよび siRNA を導入した細胞と比較して OS 細胞の増殖を有意に阻害した。この増殖阻害が細胞周期停止の影響であるのかを確かめるため、U2-OS 細胞の全タンパク質について細胞周期停止関連タンパク質の解析を行った。ウェスタンブロット解析の結果、サイクル E の発現が減少していた。これらの結果から、SEMA3A の役割は腫瘍の新生血管を阻害するだけでなく、細胞周期停止による直接的な腫瘍細胞の増殖抑制も示唆された。

【考察/結語】

HDACI によって誘導された SEMA3A とその受容体は、パラクリン経路を介して血管管形成をさらに阻害し、HDACI による SEMA3A の誘導は、OS 細胞においてオートクライン経路を介して G1/S 段階での細胞周期停止として直接的な抗腫瘍効果を示す。これらの結果は、HDACI が、SEMA3A および関連受容体の発現を誘導することによって、部分的に抗血管新生を促進し、癌のさらなる増殖と転移を抑制する抗血管新生療法である可能性を示唆している。HDACI によって SEMA3A とその関連受容体の発現を調節することが、骨肉腫の治療戦略として有用な可能性がある。