

機関番号： 24701

研究種目： 基盤研究（C）

研究期間： 2008～ 2010

課題番号： 20592055

研究課題名（和文） 網膜芽細胞腫に対する新治療法開発に関する研究

研究課題名（英文） Experimental study on new treatment strategy of retinoblastoma

研究代表者 宮崎 賢一 (MIYAZAKI KENICHI)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号： 40382329

研究成果の概要（和文）：網膜芽細胞腫のパラフィン切片で免疫組織組織学的検討を行った。HE 染色に加え、Sonic hedgehog/Gli シグナル関連抗体と増殖系グナルのマーカーを検討した。Sonic hedgehog, Smoothend, Patched, Gli-1 は、どれも腫瘍細胞内の随所で強発現していた。Rb、Erk-1 についても同様の所見が観察された。網膜芽細胞腫において Sonic hedgehog/Gli シグナル経路の活性化が腫瘍増大に関与することが示された。また、増殖系グナルのマーカーが強発現していたことで腫瘍特有の細胞増殖が示された。

正常ヒト皮膚繊維芽細胞と血管内皮細胞の共培養を用いて、マーカーCD31 の免疫組織化学的発現から *in vitro* の血管新生に対する内因性 Sonic hedgehog シグナルの抑制の効果をシクロパミンを用いて検討した。シクロパミンは、CD31 陽性の管腔形成を抑制し、内因性 Sonic hedgehog シグナルは血管増生に関与していることが判明した。*in vivo* での網膜芽細胞腫の血管新生阻害による増殖抑制効果が示唆されたが、*In vivo* での研究は今後の課題である。

網膜芽細胞腫由来の細胞株を遠沈し、ペレット状にして、26G 針でマウス眼の前房内に移植した。一定期間後に屠殺、眼球摘出し、パラフィン切片を作成した。腫瘍細胞の著しい増殖は観察されず、隅角に細胞が少数増殖していた。シクロパミンの全身投与に寄る実験的な眼内の腫瘍に対する治療効果の判定には、さらに、眼内で腫瘍細胞が増殖できるシステムを開発する必要があると結論した。

研究成果の概要（英文）：The study was conducted for the purpose of development of a new strategy of treatment of retinoblastoma by targeting Sonic Hedgehog (Shh) signal. First, immunohistochemistry was carried out to examine the status of Shh signal and cell-growth related signals. Shh, Smoothened Patched and Gli-1 were readily detected in retinoblastoma cells. Rb and Erk-1 was also observed. These findings suggest that Shh signal is active in retinoblastoma cells.

A culture of a cell line established from retinoblastoma (Y79) was treated with cyclopamine and cell proliferation was assayed by using MTT assay. Although adding cyclopamine seemed to suppress cell proliferation of Y79 retinoblastome cell line, the data did not exhibit statistical significancy.

Neovascularization is critical in tumor growth. We showed that blocking Shh signal by addition of cyclopamine inhibited neovascularization by cultured vascular endothelial cells cultured on the fibroblast layer.

Finally, we implanted Y79 cells into the anterior chamber of a C57BL/6 mouse. However, the

cells did not form tumor growth and settled around the anterior chamber angle. Further improvement of cell implantation is to be developed for the purpose of establishment of retinoblastoma mouse model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：(1) 小児悪性腫瘍 (2) Sonic hedgehog (3) Smad (4) Y79 (5) 網膜芽細胞腫

1. 研究開始当初の背景

我々は、これまで Sonic hedgehog/Gli シグナル伝達経路の阻害天然物質シクロパミンによる眼科悪性腫瘍の治療法の開発を研究してきた。培養扁平上皮癌細胞株でのシクロパミンの増殖抑制効果と同細胞のヌードマウスに移植した細胞による in vivo 腫瘍モデルでの治療効果を確認した。さらに小児発癌モデルである遮断色素性乾皮症モデルマウス(XPC ノックアウトマウス)を用いて眼瞼に化学発癌を行い、シクロパミンによる Sonic hedgehog 伝達経路の遮断による治療効果を確認した。

網膜芽細胞腫は小児眼悪性腫瘍の代表で、時に両眼性に発症する。片側の場合は腫瘍の進行度に応じて、化学療法、放射線療法、レーザー凝固、光線力学療法や眼球摘出が検討され、可能であれば眼球保存を目指す。両眼性の場合、片眼性の場合以上に片眼の眼球保存が要求される。この場合、保存眼球で上記の治療が行われるが、患児に全身負担の少ないより良い薬物治療の開発が望まれる。

和歌山県立医科大学教室では癌悪性腫瘍の治療を、臨床での専門領域の一つとしている。そのため、網膜芽細胞腫の組織病理学研究材料が多数蓄積している。予備的研究では、網膜芽細胞腫では、Sonic

hedgehog/Gli シグナルが亢進しているという免疫組織化学による結果を得た。網膜芽細胞腫細胞株である Y79 細胞を保有、実験に使用しており、本申請研究課題のための予備実験として、シクロパミンが Y79 細胞の増殖を抑制するという可能性を示唆するデータをアラマーブルーアッセイで得た。

2. 研究の目的

網膜芽細胞腫での Sonic hedgehog/Gli シグナル伝達経路の役割を解明し、このシグナルの阻害天然物質シクロパミンによる同伝達経路の遮断による網膜芽細胞腫の非外科的治療方法の開発を目的とする。シクロパミンによる悪性腫瘍治療に関する研究は大腸癌モデルなどの動物実験での成果がこれまで Nature 誌(2004年)などに報告されているが、腫瘍組織のみの切除、摘出の困難な眼内の腫瘍こそ、非外科的治療方法の研究対象として重要であると考えられる。網膜芽細胞腫細胞株である Y79 細胞での培養研究とマウスに移植した細胞による in vivo 腫瘍モデルの確立とそれを用いた研究を目指す。

3. 研究の方法

組織病理標本による免疫組織化学的検索  
予備的研究を継続した。人眼摘出網膜芽細胞腫のブロック収集後、パラフィン切片を作成し、免疫組織学的検討を行った。抗体は、Sonic

hedgehog/Gli シグナル関連抗体 (Sonic hedgehog, Smoothend, Patched, Gli-1) と増殖系シグナルのマーカー (Rb, Erk-1 及び BrdU) を用いた。

#### 網膜芽細胞腫培養細胞株を用いた研究

網膜芽細胞腫培養細胞株の浮遊培養で MTT アッセイを用いて *in vitro* でのシクロパミンの細胞増殖抑制の検討を行った。培養液にシクロパミンの添加群で、無添加群と比較して吸光度から増殖の抑制が示唆された。着培養の腫瘍細胞株である扁平上皮癌細胞株を比較実験として使用した。

#### 血管新生への Shh シグナルの関与の検討

正常ヒト皮膚繊維芽細胞と血管内皮細胞の共培養キットを用いて、マーカー CD31 の免疫組織化学的発現から *in vitro* の血管新生に対する内因性 Sonic hedgehog シグナルの抑制の効果をシクロパミンを用いて検討した。血管内皮細胞は、血管様の構造を形成すると CD31 陽性となるので、その長さと同分化数を測定することで血管新生作用を評価した。

#### *in vivo* 腫瘍モデルでの研究

ヌードマウスに培養細胞株を移植したものの、扁平上皮癌の細胞株のような明確な腫瘍形成が得られなかった点、およびより病態に近い状態での細胞移植を考慮し、マウス前房に細胞ペレットを移植しての腫瘍モデル作成を行った。

腫瘍形成が得られた場合、下記の検討を行う予定であった。腫瘍作成シクロパミン投与群と非投与群で腫瘍径の計時変化計測を行う。腫瘍から total RNA を抽出し、real-time RT-PCR で各種遺伝子発現を成長因子関連を中心に検討する。発現パターンに変化が検出された RNA については、ジゴキシゲニンを使用した *in situ* ハイブリダイゼーションで組織内の発現パターンを評価する。Sonic hedgehog/Gli シグナル関係の評価は、腫瘍のパラフィン切片と腫瘍組織での免疫組織化学と

western blot で培養細胞の場合と同じ抗体を用いて検討する。Apoptosis については、TUNEDL と DNA ラダーで検討する。

#### 4. 研究成果

Sonic hedgehog, Smoothend, Patched, Gli-1 は、どれも腫瘍細胞内の随所で強発現していた。Rb, Erk-1 についても同様の所見が観察された。網膜芽細胞腫において Sonic hedgehog/Gli シグナル経路の活性化が腫瘍増大に関与することが示された。また、増殖系シグナルのマーカーが強発現していたことで腫瘍特有の細胞増殖が示された。

網膜芽細胞腫培養細胞株の浮遊培養でのシクロパミンの細胞増殖抑制の検討を行ったが、データにばらつきがあり、一定した成果を得られなかったが、培養液にシクロパミンの添加群で、無添加群と比較して吸光度から増殖の抑制が示唆された。一方、固着培養の腫瘍細胞株である扁平上皮癌細胞株を比較実験として使用した。同細胞では、外因性の Sonic hedgehog が腫瘍細胞の Gli-1 の核内移行と相まって増殖を促進すると同時に、シクロパミンが、Gli-1 の核内移行を抑制した。

正常ヒト皮膚繊維芽細胞と血管内皮細胞の共培養を用いて、*in vitro* の血管新生に対する内因性 Sonic hedgehog シグナルの抑制の効果をシクロパミンを用いて検討した。シクロパミンは、CD31 陽性の管腔形成をよくせいし、内因性 Sonic hedgehog シグナルは血管増生に関与していることが判明した。*in vivo* での網膜芽細胞腫の血管新生阻害による増殖抑制効果が示唆されたが、*In vivo* での研究は今後の課題である。

網膜芽細胞腫由来の細胞株を遠沈し、ペレット状にして、26G 針でマウス眼の前房内に移植した。一定期間後に屠殺、眼球摘出し、型どおりにパラフィン切片を作成した。腫瘍細胞の著しい増殖は観察されず、隅角に細胞が少数増殖していた。虹彩に付着増生下細胞は観察されなかった。シクロパミンの全身投与に寄る実験的な眼内の腫瘍に対

する治療効果の判定には、さらに、眼内で腫瘍細胞が増殖できるシステムを開発する必要があると結論した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

①宮崎賢一, 山中修, 河島義治, 雑賀司珠也. 双生児にみられた網膜血管走行異常. 臨床眼科. 査読有り(0370-5579)64 巻 5 号 Page797-800(2010.05)

②Yamanaka O, Miyazaki K, Kitano A, Saika S, Nakajima Y, Ikeda K. Suppression of injury-induced conjunctiva scarring by peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene transfer in mice. Invest Ophthalmol Vis Sci. 査読有り. 2009 Jan;50(1):187-93. Epub 2008 Jul 24.

③田中才一, 宮崎賢一, 白井久美, 雑賀司珠也. 後発白内障での水晶体細胞での Smad リン酸化の状態. 日本眼科学会雑誌. 査読有り.(0029-0203)113 巻臨増 Page291(2009.03)

④宮崎賢一, 山中修, 宮嶋正康, 田中才一, 岡田由香, 雑賀司珠也. テネーシンノックアウトマウスを用いた角膜創傷治癒に関する研究. 日本眼科学会雑誌. 査読有り.(0029-0203)113 巻臨増 Page281(2009.03)

⑤中田元子, 岡田由香, 山中修, 宮崎賢一, 雑賀司珠也. 眼内レンズ二次縫着(片側縫着)術成績の検討. IOL & RS. 査読有り.(1341-3678)23 巻 1 号 Page67-69(2009.03)

⑥Miyazaki K, Okada Y, Yamanaka O, Kitano A, Ikeda K, Kon S, Uede T, Rittling SR, Denhardt DT, Kao WW, Saika S. Corneal wound healing in an osteopontin-deficient mouse. Invest Ophthalmol Vis Sci. 査読有り. 2008 Apr;49(4):1367-75

[学会発表] (計 10 件)

① 住岡孝吉, 宮崎賢一, 小門正英, 田中才一, 岡田由香, 雑賀司珠也. 光線力学療法後における施行後視力と自覚症状の関係に対する静的視野検査を用いた検討. 第 63 回日本臨床眼科学会. 2009. 10. 11. 福岡

② 井上晃宏, 宮崎賢一, 雑賀司珠也. 和歌山県立医大眼科における強度近視の白内障手術の評価. 第 48 回日本白内障学会総会・第 24 回日本眼内レンズ屈折手術学会総会・第 45 回日本眼科学学会総会. 2009. 6. 27. 東京

③ 宮崎賢一, 山中修, 宮嶋正康, 田中才一, 岡田由香, 雑賀司珠也. テネーシンノックアウトマウスを用いた角膜創傷治癒に関する研究. 第 113 回日本眼科学会総会. 2009. 4. 16. 東京

④田中才一, 宮崎賢一, 白井久美, 雑賀司珠也. 後発白内障での水晶体細胞での Smad リン

酸化の状態. 第 113 回日本眼科学会総会. 2009. 4. 17. 東京

⑤井上晃宏, 宮崎賢一, 雑賀司珠也. 長期間拡大傾向を示さなかった真菌性角膜潰瘍の 1 症例. 第 33 回角膜カンファレンス. 2009. 2. 20. 大阪

⑥ 宮崎賢一, 藤田識人, 友寄勝夫, 田中才一, 山中修, 森田展雄, 雑賀司珠也. 生体吸収プレートを用いたクレンライン手術の経験. 第 32 回日本眼科手術学会総会. 2009. 1. 23. 神戸

⑦ 中田元子, 岡田由香, 宮崎賢一, 山中修, 雑賀司珠也. 眼内レンズ二次縫着(片側縫着)術成績の検討. 第 47 回日本白内障学会総会・第 23 回日本眼内レンズ屈折手術学会総会. 2008. 6. 21. 東京

⑧ 芦田淳, 宮崎賢一, 岡田由香, 宮嶋正康, 雑賀司珠也. 正常マウスとレプチン受容性 ob-Rb 欠損 ab/db マウスのアルカリ外傷後角膜の創傷治癒. 第 112 回日本眼科学会総会. 2008. 4. 18. 横浜

⑨ 宮崎賢一, 山中修, 藤田恭子, 藤田周子, 石川伸之, 北野愛, 友寄勝夫, 住岡孝吉, 宮本武, 田中才一, 岡田由香, 雑賀司珠也. 実験的脈絡膜線維血管増生モデルを用いた研究. 第 112 回日本眼科学会総会. 2008. 4. 18. 横浜

⑩ 田中才一, 宮崎賢一, 宮嶋正康, 雑賀司珠也. テネーシン欠損による外傷水晶体に於ける上皮-間葉系移行の変化. 第 112 回日本眼科学会総会. 2008. 4. 18. 横浜

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

宮崎 賢一 (MIYAZAKI KENICHI)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員  
研究者番号: 40382329

##### (2) 研究分担者

雑賀 司珠也 (SAIKA SHIZUYA) 和歌山県立  
医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 40254544

岡田 由香 (OKADA YUKA)  
和歌山県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 50264891

友寄 勝夫 (TOMOYOSE KATSUO)  
和歌山県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 00453176

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

