

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592238

研究課題名(和文) Hedgehog 関連遺伝子制御による横紋筋肉腫の治療研究

研究課題名(英文) Inhibition of the Hedgehog pathway prevents human rhabdomyosarcoma cell growth

## 研究代表者

川畑 直也 (Kawabata, Naoya)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・客員研究員

研究者番号：60626836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円

研究成果の概要(和文)：ヒト横紋筋肉腫においてHedgehogシグナル遺伝子が活性化しているのを確認した。Smoothened (SMO)やGLI2の免疫染色を行い、ヒト横紋筋肉腫においてSMOやGLI2の活性化を確認した。SMOやGLIをターゲットとして阻害剤であるcyclopamineやGANT61を使用したところ、in vitroにおいて横紋筋肉腫の増殖抑制作用を示した。また、Hedgehog 阻害剤が細胞分裂抑制と細胞死誘導によりヒト横紋筋肉腫の成長を抑制していた。Hedgehogシグナルを阻害することによって骨肉腫の浸潤能・肺転移が抑制されることが示された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the expression and function of the Hedgehog pathway. Real-time PCR revealed that human rhabdomyosarcoma cell lines and biopsy specimens overexpressed the following genes: Sonic hedgehog, Indian hedgehog, Desert hedgehog, PTCH1, SMO, GLI1, GLI2 and ULK3. Immunohistochemistry revealed that rhabdomyosarcoma cell lines and biopsy specimens expressed SMO and GLI2. Inhibition of SMO by cyclopamine slowed the growth of human rhabdomyosarcoma cell lines. Similarly, inhibition of GLI by GANT61 slowed the growth of human rhabdomyosarcoma cell lines. Inhibition of cell proliferation and apoptotic cell death together prevented the growth of rhabdomyosarcoma cells by cyclopamine and GANT61 treatment. In addition, knockdown of GLI2 inhibited invasion of osteosarcoma cell and decreased lung metastasis of osteosarcomas. Our findings suggest that inhibition of the Hedgehog pathway may be a useful approach for treating rhabdomyosarcoma and osteosarcoma patients.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：横紋筋肉腫 Hedgehog GLI2 骨肉腫

1. 研究開始当初の背景

Hedgehog は胎生期において重要な morphogen で中枢神経系・肺・胃腸系、骨・軟骨などの形態形成に関与していることが知られている。Hedgehog シグナルはリガンドである Hedgehog が細胞膜上のレセプターである Patched (PTCH1) に結合することで開始する。Hedgehog 非存在下では PTCH は細胞膜貫通型蛋白である Smoothened (SMO) を抑制しているが、Hedgehog が結合すると SMO の抑制が解除され SMO が活性化される。活性化された SMO は細胞質内の GLI を活性化して核内へ移動し、転写因子としてターゲット遺伝子を発現させる。このターゲット遺伝子群が細胞増殖やアポトーシス抑制などに関与していることが報告されている。Ruiz i Altaba A. et al. GLI AND HEDGEHOG INCANCER: TUMOURS, EMBRYOS AND STEM CELLS. Nat Rev Cancer 2002;2:361-372.

一方で Hedgehog の異常活性化が B cell lymphoma、基底細胞癌、髄芽腫、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、消化器癌、横紋筋肉腫などの多くの悪性腫瘍に関連していることも報告されている。そこで申請者らはまず横紋筋肉腫の発生・増殖・血管形成・転移・がん幹細胞維持における Hedgehog シグナルの機能の解析を開始した。その結果、横紋筋肉腫の細胞株、臨床検体とも Hedgehog シグナル分子の強発現を認めた。また Hedgehog シグナル特異的阻害剤である cyclopamine や GANT61 を投与することによって横紋筋肉腫の成長を in vitro で抑制することを確認した。

2. 研究の目的

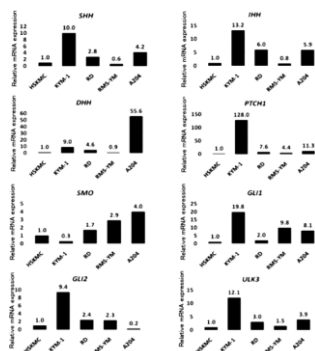
Hedgehog シグナルの細胞増殖・細胞死・細胞浸潤・転移能を制御する分子メカニズムを明らかとし、横紋筋肉腫の新規分子標的治療法の確立に貢献するための研究を行った。

3. 研究の方法

ヒト横紋筋肉腫細胞株と骨肉腫細胞株においての Hedgehog 関連遺伝子の発現を real time PCR と免疫染色を用いて検討した。Hedgehog シグナルを阻害することによる骨肉腫の浸潤能・移動能への機能を in vitro, in vivo で解析した。また骨肉腫細胞株を GLI 転写阻害剤である三酸化ヒ素処理 (arsenic trioxide (ATO) で阻害して骨肉腫の増殖能を検討した。

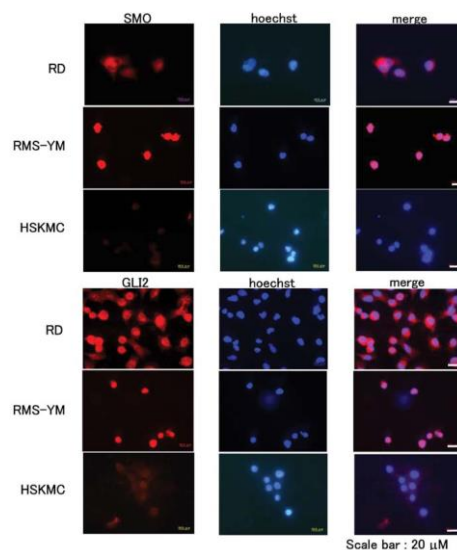
4. 研究成果

real time PCR にてヒト横紋筋肉腫細胞株において hedgehog 関連遺伝子の発現が亢進していた (Fig. 1)。



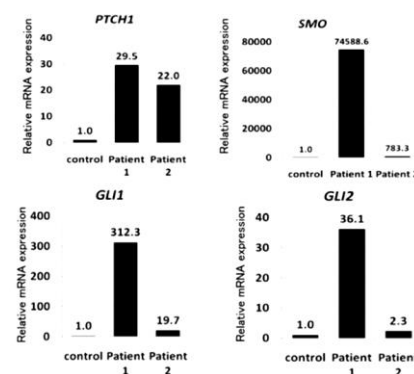
(Fig. 1)

またヒト横紋筋肉腫細胞株で Hedgehog 関連である SMO と GLI2 が正常筋芽細胞と比較して高発現していることが免疫染色で示された (Fig. 2)



(Fig. 2)

また横紋筋肉腫患者組織でも SMO, GLI2 など Hedgehog 関連因子の発現が正常筋組織と比較して亢進していることが示された (Fig. 3)。



(Fig. 3)

また免疫染色でも横紋筋肉腫患者組織で SMO と GLI2 が高発現していることが示された (Fig.4)。

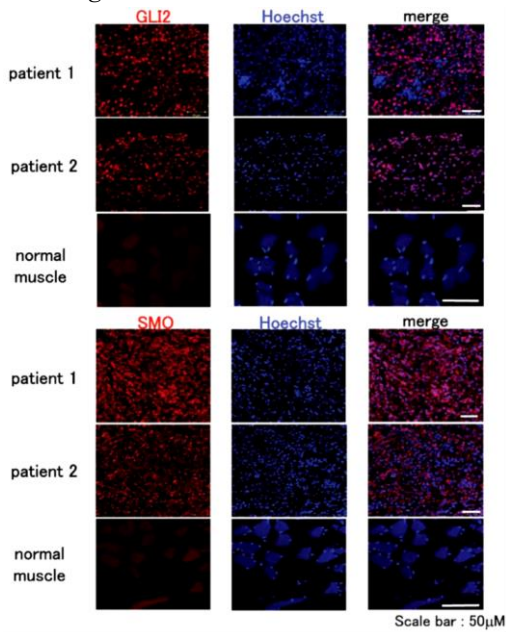


Fig. 4

さらに横紋筋肉腫細胞株で Hedgehog シグナル阻害剤を作用させると横紋筋肉腫の増殖が抑制されることが示された (Fig. 5)。

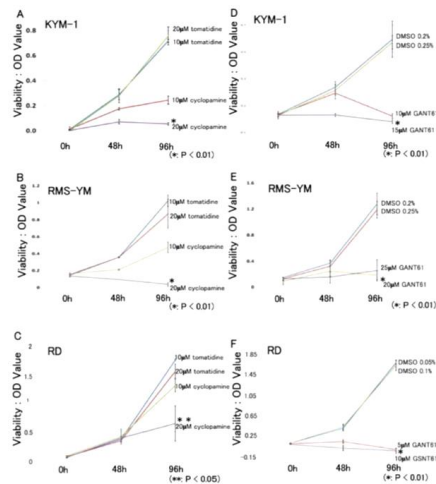


Fig. 5

Hedgehog シグナル阻害作用があることが報告されており、日本でも慢性骨髄性白血病の治療薬として使用されている三酸化ヒ素 (ATO) を骨肉腫細胞株に作用させると

1. WST assay, colony formation assay で、ATO による増殖抑制効果が示された (Fig. 6)。
2. FACS による解析にて、ATO 投与で subG1 期の増加を認めた (Fig. 7)。
3. Comet assay において ATO 投与で single cell においての DNA 損傷が観察された (Fig. 8)。
4. 骨肉腫細胞株を移植したヌードマウスに ATO を投与すると、in vivo でも腫瘍増殖抑

制効果を認めた (Fig. 9)。

Fig. 6

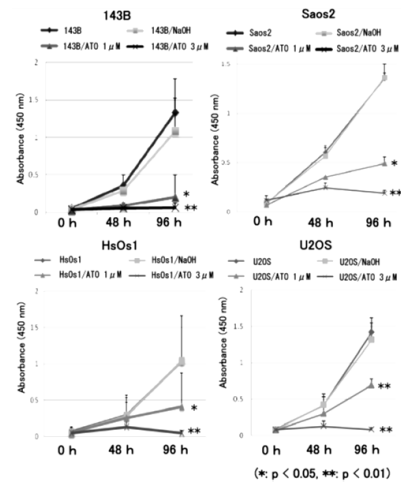


Fig. 7

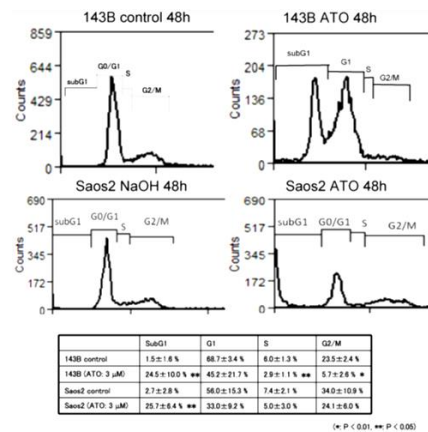


Fig. 8

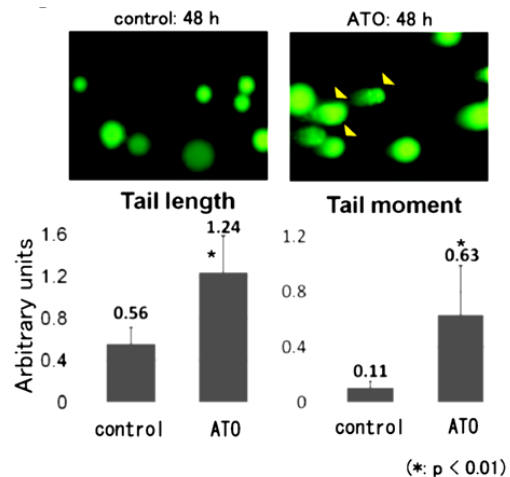
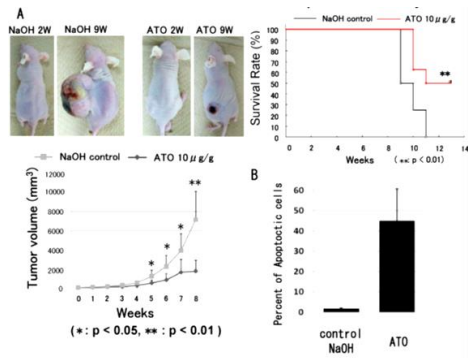


Fig. 9



## 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1件)

①Arsenic trioxide prevents osteosarcoma growth by inhibition of GLI transcription via DNA damage accumulation.

Nakamura S, Nagano S, Nagao H, Ishidou Y, Yokouchi M, Abematsu M, Yamamoto T, Komiya S, Setoguchi T.

PLoS One. 2013 Jul 8;8(7):e69466. 「査読有」

〔学会発表〕(計2件)

①第35回日本分子生物学会年会

三酸化ヒ素はDNA損傷を介してGLIの転写を抑制し骨肉腫の増殖を抑制する

中村俊介、瀬戸口啓夫、小宮節郎ほか

(福岡県福岡市)

平成24年12月11日-14日

②第27回日本整形外科基礎学術集会

Hedgehog pathwayの薬理的抑制によるヒト骨肉腫の増殖抑制効果

中村俊介、瀬戸口啓夫、小宮節郎ほか

名古屋市国際会議場(愛知県名古屋市)

平成24年10月26日-27日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

川畑 直也 (Kawabata Naoya)

鹿児島大学医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号: 60626836

(2) 研究分担者

小宮 節郎 (Komiya Setsuro)

鹿児島大学大学院・医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 30178371

瀬戸口啓夫 (Setoguchi Takao)

鹿児島大学大学院・医歯学総合研究科・特任准教授

研究者番号: 40423727

永野 聡 (Nagano Satoshi)

鹿児島大学医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号: 50373139

あべ松 昌彦 (Abematsu Masahiko)

鹿児島大学医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号: 70448190

田邊 史 (Tanabe Fumito)

鹿児島大学医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号: 60626836