

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860599

研究課題名(和文) 肺神経内分泌癌におけるHedgehog 経路の治療標的の可能性の探索

研究課題名(英文) The exploration of the Hedgehog pathway as a treatment target in neuroendocrine carcinoma of the lung.

研究代表者

岩澤 俊一郎 (IWASAWA, Shunichiro)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00527913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：肺原発神経内分泌がんは難治がんのひとつである。その増殖および抗がん薬の耐性にSonic Hedgehog経路が関与しているという仮説に基づき、肺原発神経内分泌がんにおける同経路の発現状況を明らかにした。また、同経路を阻害して抗がん薬の効果を改善させることを目的とし、同経路の阻害薬を用いたがん細胞株増殖抑制効果を明らかにした。

また、同経路の重要な伝達因子であるGli1/2をRNAのレベルで阻害し、細胞障害性抗がん薬であるシスプラチンの効果を高めることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Neuroendocrine carcinoma of the lung is a refractory cancer and results in poor survival. However, the standard therapy for patients with advanced neuroendocrine carcinoma of the lung has not been established. We hypothesized that the Sonic Hedgehog (SHH) pathway may play an important role of tumor proliferation and drug resistance and be a new therapeutic target in that cancer. Our study revealed that major signaling factors were expressed in cell lines of neuroendocrine carcinoma of the lung and some inhibitors of the SHH signaling suppressed cell proliferation. In addition, siRNA against Gli1/2 which are major transcription factors in the SHH pathway increased the effect of cisplatin in those cell lines.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：Sonic Hedgehog pathway Smoothened 神経内分泌がん apoptosis Gli1 Gli2

1. 研究開始当初の背景

肺原発神経内分泌癌は、小細胞肺癌 (small-cell lung cancer: SCLC) と神経内分泌大細胞癌 (large-cell neuroendocrine carcinoma: LCNEC) を指し、肺癌のおよそ 20% を占める高悪性度腫瘍である。腫瘍増殖が速く、診断時には既に進行期となっている症例が大半を占めており、シスプラチンを key-drug とした化学療法が治療の中心的役割を果たしている。しかしながら、化学療法による治癒は極めて困難であり、その予後は不良である。

とくに LCNEC は、1999 年の WHO 肺腫瘍組織分類の改訂により新たに追加された比較的新しい疾患概念であり (Travis WD, et al. WHO classification 3rd ed. Springer 1999)、その頻度は、切除肺癌の約 3% と比較的稀であることから (Yamazaki S, et al. Lung Cancer 2005)、病態や分子生物学的の検討は不十分である。その神経内分泌への分化などの生物学的類似性から、SCLC に準じた治療が行われているのが実状だが、標準治療は未確立であり、有効な治療法の確立が求められている。

2. 研究の目的

Hh 経路は、胎生期の臓器形成において重要な役割を果たすシグナル伝達経路として同定されたが、その後の研究によって、成人においても組織維持と再生に関与していることが明らかにされている。複数の悪性腫瘍において、Hh 経路のシグナル活性が亢進していることが報告され (Onishi H and Katano M. Cancer Sci 2011)、悪性腫瘍の発生・増殖についての検討が進められている。哺乳動物においては、Hh 経路のリガンドとして Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog, Desert Hedgehog の 3 つの homologue が存在しているが、ヒトでは、Shh が広範な臓器に発現しており、悪性腫瘍の病態に関しても最も重要な役割を果たしていると考えられている。

リガンドである Shh が存在しない状況では、膜タンパクである Patched1 (Ptch1) が、G タンパク質共役受容体の Smoothened (Smo) の活性化を阻害し、Hh 経路のシグナル伝達を抑制している。一旦、Shh が Ptch1 に結合すると、Smo の阻害が解放され、zinc finger 型転写因子である Glioblastoma-associated oncogene (Gli) family を制御することによって標的遺伝子の発現が調節される。標的遺伝子のひとつに Hedgehog-interacting protein (Hhip) があり、この膜タンパクが Shh の decoy 受容体として作用するため、negative feedback 機構を構成する。図 1 に、Hh 経路の概念図を示す。

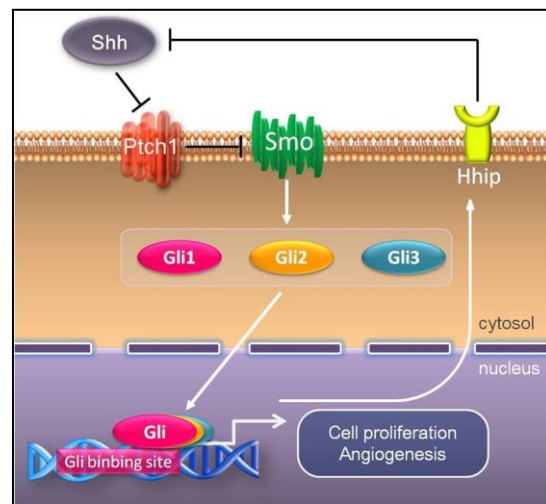


図 1 Hedgehog signaling pathway の主要構成因子とその役割

成人肺組織での Hh 経路は、組織修復と恒常性維持において重要な役割を果たしており、障害を受けた気道上皮細胞が再生する際に、Shh と Gli1 の発現が亢進し、細胞の神経内分泌への分化が誘導され、さらに、SCLC における Shh 依存性の Hh 経路の活性化と、それに伴う腫瘍細胞増殖が報告されている (Watkins DN, et al. Nature 2003)。

Hh 経路が肺原発神経内分泌癌の発生、増殖に大きく関与していることが示唆されており、有望な治療標的のひとつと考えられる。しかしながら、LCNEC における Hh 経路の役割についての検討は現在までに行われていない。このため、その役割を明らかにするとともに、その治療標的としての可能性を探索する必要があると考えた。

Hh 経路の活性化は、腫瘍増殖に関与するのみではなく、Bcl-2, cyclin family, SNAIL などの転写を調節することによって、細胞周期にも関与し、apoptosis を含めた細胞死を抑制することも示されている (Scales SJ, et al. Trends Pharmacol Sci 2009) (図 2)。このため、抗がん薬に対する感受性にも関与していると仮設し、治療標的としての可能性を探索する。

3. 研究の方法

Vismodegib (GDC-0449) は、Hh 経路の主要な positive regulator である Smo を選択的に阻害する薬剤であり、Hh シグナルの活性化が示されている皮膚基底細胞癌に対する有効性が示されている分子標的治療薬である (Sekulic A, et al. N Engl J Med 2012)。米国では新規治療薬として既に承認されている。

ヒトでの安全性が確認されている新規薬

剤を用いて、肺原発神経内分泌癌の Hh 経路のシグナル伝達を阻害し、腫瘍増殖を抑制、抗がん薬の感受性を高めることが示されれば、新たな治療探索の上で極めて重要な知見となるものと考えた。

(1) 肺原発神経内分泌癌細胞株における Hh 経路の構成因子の発現の評価

SCLC, LCNEC 細胞株を用い、mRNA・タンパクレベルでの、Hh 経路の主要構成因子の発現状況を評価する。

(2) Hh 経路の活性化により腫瘍増殖への影響を評価する

in vitro において、リガンドである Shh、TGF- β などの Smo agonist を用い、Hh 経路の活性化を誘導し、Hh 経路構成因子の発現の変化と、腫瘍増殖への影響を評価する。

(3) Hh 経路の主要な制御因子である Smo および Gli1/2 の阻害による腫瘍増殖への影響の評価

in vitro において、vismodegib などの Smo 阻害剤や siRNA を用いて、Hh 経路のシグナル伝達を阻害し、腫瘍増殖の抑制効果を検討する。

(4) 抗腫瘍薬感受性に対する Hh 経路阻害の影響の評価

in vitro において、Hh 経路阻害を行い、シスプラチンに対する細胞株の感受性の変化を検討し、各種構成因子の発現の評価とそのメカニズム解明のための検討を行う。

4. 研究成果

(1) 肺原発神経内分泌癌細胞株における Hh 経路の構成因子の発現の評価

RT-PCR RT-PCR 法により、肺原発神経内分泌癌細胞株(H460, H1299, H810 など)における、Shh, Smo, Gli1/2 などの主要な因子の発現を確認した。蛋白レベルでの発現については、Western blotting による検証を試みたが、Smo など一部の因子では、その発現が少量であると推測され、その確認は困難であった。

(2) Hh 経路の活性化により腫瘍増殖への影響を評価する

Hh 経路の主要な ligand である Shh 蛋白や Smo agonist を用いて、腫瘍細胞株の増殖効果を示すことを試みたが、これらの刺激によって腫瘍の増殖は得られなかった。このことは肺原発神経内分泌癌細胞株の増殖が、Hh 経路にのみ依存して制御されているわけではないということを示したものと思われるが、他の増殖刺激との関連性などを明らかにするまでには至らなかった。

(3) Hh 経路の主要な制御因子である Smo および Gli1/2 の阻害による腫瘍増殖への影響の評価

Hh 経路の主要な positive regulator である Smo を選択的に阻害する薬剤 Vismodegib (GDC-0449) を用いて、肺原発神経内分泌癌

細胞株(H460, H1299, H810)の細胞増殖抑制効果を MTT assay にて検証し、用量依存的な増殖抑制効果を明らかにした。(図 2)

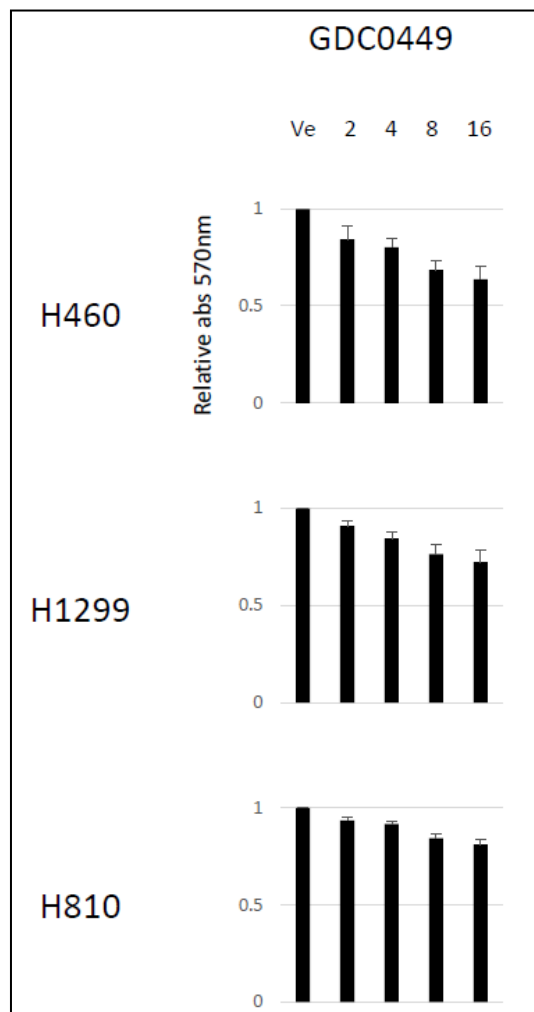


図 2 Vismodegib (GDC-0449) による細胞株増殖抑制効果

また、Gli1/2 の siRNA により腫瘍増殖が抑制されることが示された。(図 3)

(4) 抗腫瘍薬感受性に対する Hh 経路阻害の影響の評価

臨床における肺原発神経内分泌癌の主要な抗腫瘍薬であるシスプラチン(CDDP)について、(3)で示された、Gli1/2 の siRNA を併用することによって抗腫瘍効果が増強されることが示された。(図 4)

(5) まとめ

本研究では、Vismodegib (GDC-0449) による肺原発神経内分泌癌細胞株の増殖抑制効果が示されたが、その効果は劇的なものではなかった。

本研究を進めている間に、肺原発神経内分泌癌のひとつの主要な組織型である、小細胞肺癌を対象とした Vismodegib (GDC-0449) とシスプラチンなどの抗腫瘍薬との併用における有効性を検証する臨床試験の結果が

報告され、Vismodegib (GDC-0449) の併用が大きな効果をもたらすものではないことが示された。

今回の報告では示されていないが、本研究の中でも Vismodegib (GDC-0449) とシスプラチン併用によっては細胞株においても高い効果は示されていない。

一方で、本研究では siRNA による特異的かつ確実な Smo の下流の因子である Gli1/2 の抑制が、肺原発神経内分泌癌細胞株の増殖抑制と、シスプラチン感受性を高めることを示しており、Vismodegib (GDC-0449) による Smo 阻害での Hh 経路抑制では肺原発神経内分泌癌の細胞増殖抑制は不十分であることが推測された。

この機序については今後の検証が必要であると考えている。

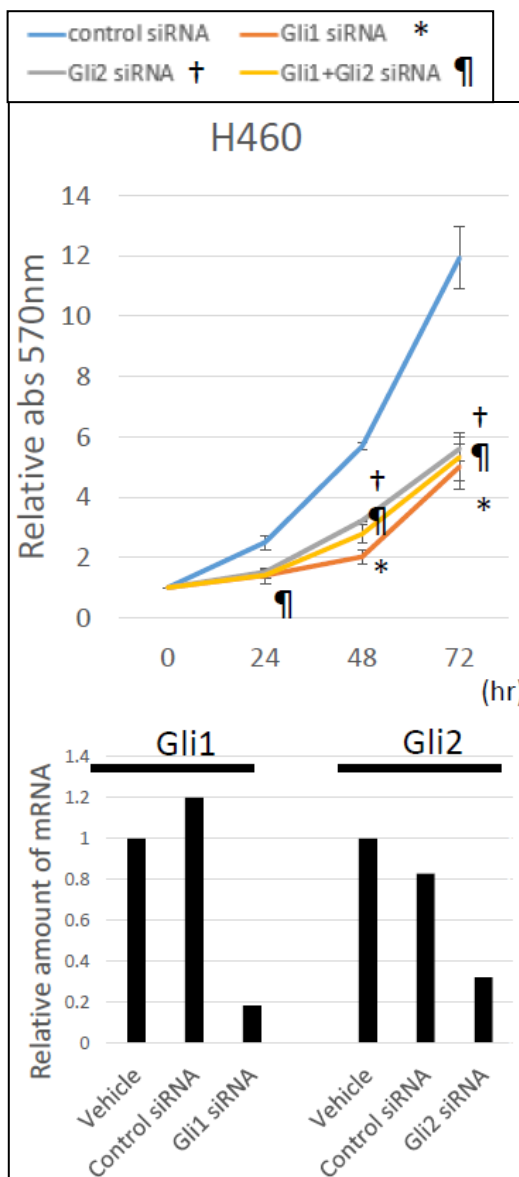


図3 siRNAによるGli1/2の抑制による増殖抑制効果 (一部の細胞株のみ図示)

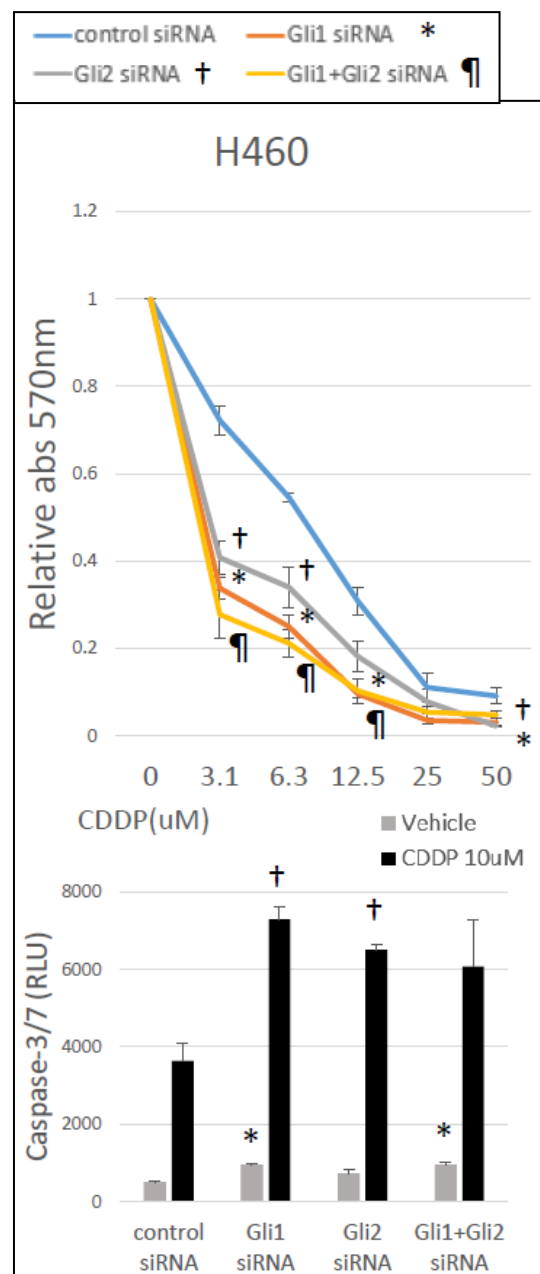


図4 siRNAによるGli1/2の抑制による増殖抑制効果 (一部の細胞株のみ図示)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文]

該当なし

[学会発表]

該当なし

[図書]

該当なし

[産業財産権]

○出願状況 該当なし

○取得状況 該当なし

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩澤 俊一郎 (IWASAWA, Shunichiro)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00527913

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

滝口 裕一 (TAKIGUCHI, Yuichi)

石綿 司 (ISHIWATA, Tsukasa)

江畑 貴大 (EBATA, Takahiro)