

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19390337  
 研究課題名（和文）臓器特異的癌制御法開発のための形態形成シグナル系の網羅的解析  
 研究課題名（英文）Comprehensive analysis of morphogenesis signaling pathways for the development of organ-specific anticancer therapy  
 研究代表者  
 片野 光男（KATANO MITSUO）  
 九州大学・大学院医学研究院・教授  
 研究者番号：10145203

## 研究成果の概要：

胃癌、乳癌、膵癌および大腸癌では、それぞれ臓器に特徴的な形態形成シグナル系が再活性化しており、これが臓器特異的な治療標的となる可能性、すなわち、「癌腫別の治療法」という新しい治療法開発の手がかりが示された。さらに、各種癌の特徴的な形態形成シグナルネットワーク解析の結果、Hedgehog シグナルの標的遺伝子であり転写因子である Gli1 が「癌腫を超えた広範囲の癌腫に対する治療標的」となる新たな可能性が示された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
2008年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：

臓器特異的癌治療、形態形成シグナル、Hedgehog シグナル、Wnt シグナル、Notch シグナル、シグナルネットワーク、クロストーク

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、「癌は一種の奇形組織であり、発癌および進展に胎生期の臓器形成を司る形態形成シグナル系が関与している」という作業仮説のもとに、癌と形態形成シグナル系再活性化の関係を解析してきた。その結果、個々の臓器の癌組織に特徴的な形態形成シグナル系ネットワークの存在を示唆する結果を得た。具体的には、我々は、(1) 乳癌組織における Hedgehog シグナル活性化に Estrogen receptor シグナルが関与している

可能性 (Kubo M, Katano M et al. Cancer Res 64: 6071-4, 2004)、(2) 膵癌における Hedgehog シグナル活性化の一因に炎症刺激による NF-κB シグナル系が関与している可能性 (Nakashima H, Katano M et al. Cancer Res 66:7041-9,2006)、(3) 胃癌では分化度と Hedgehog シグナル系に相関がある。(4) 大腸癌では Hedgehog 系と Wnt 系のクロストークが存在し、これらが治療標的となる可能性 (Akiyoshi T, Katano M et al. GUT 55:991-9,2006) などの成果を得ていた。

## 2. 研究の目的

種々の臓器より発生した癌組織の形態シグナル系を網羅的に解析し、個々の臓器の癌組織に特徴的な形態形成シグナル系ネットワーク構築を見出し、これを標的とした「臓器特異的な癌治療法」という新たな治療法を開発する。本研究においては、癌組織として乳癌、胃癌、膵癌、大腸癌、前立腺癌を対象とし、形態形成シグナル系としては、Hedgehogシグナル系、Wntシグナル系、Notchシグナル系、およびBMPシグナル系に焦点を当てる。

## 3. 研究の方法

(1) 免疫組織染色、Real-time PCR法などにより各種癌組織における形態形成シグナル系を探索する。

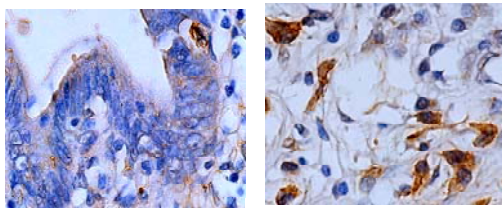
(2) 上記結果をもとに、個々のシグナル系の活性化と抑制により、個々のシグナル系の連関を解析し、臓器特異的な形態形成シグナル系ネットワークを見出す。

(3) 上記結果をもとに、癌組織や類似モデルを用いて癌特異的治療法開発の可能性を検証する。

## 4. 研究成果

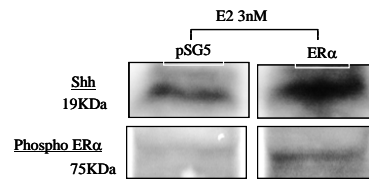
(1) 各種癌組織における形態形成シグナル系の特徴的な再活性化：①乳癌に引き続き、胃癌における組織型特異的なHedgehogシグナルの活性化(論文9)、②大腸癌におけるNotchシグナル活性化(論文7)、③乳癌におけるHedgehogシグナル活性化におけるestrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ )シグナル系の関与(論文6)、④胃癌におけるHedgehogシグナル活性化におけるER $\alpha$ シグナル系の関与(学会発表2)を明らかにした。

### ①胃癌における組織型特異的なHhシグナル活性化



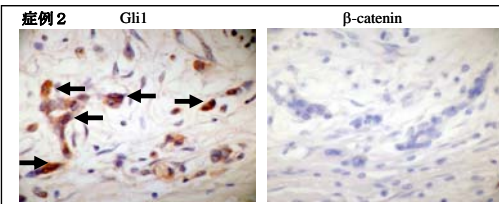
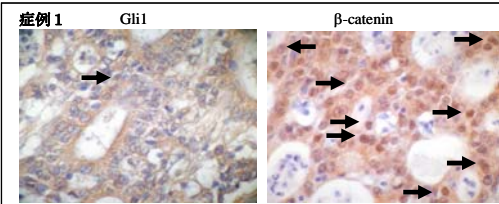
高分化型(左)はほとんどGli1の染色(褐色)が認められないが、低分化型(右)ではGli1染色細胞を多数認める。

### ②乳癌におけるHhシグナル活性化におけるERシグナル系の関与



ER $\alpha$ 陰性乳癌細胞にER $\alpha$ 遺伝子を導入し、Estradiol (E2)を添加。コントロール(左下)に比べ導入細胞(右下)では、ER $\alpha$ のリン酸化が認められる。また、コントロール(左上)に比べ導入細胞(右上)ではShhの発現亢進が認められる。

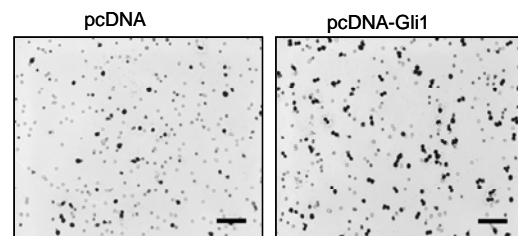
(2) 臓器特異的な形態形成シグナル系の解析：大腸癌同様、胃癌におけるWntシグナル系とHedgehogシグナル系の抑制的クロストークの存在を明らかにした(論文5)。



症例1では、Gli1陽性細胞(→)はほとんど認めないが、 $\beta$ -catenin核内移行(→)を示す細胞は多数みとめる。一方、症例2ではGli1陽性細胞を多数認めるが、 $\beta$ -catenin核内移行を示す細胞は認められない

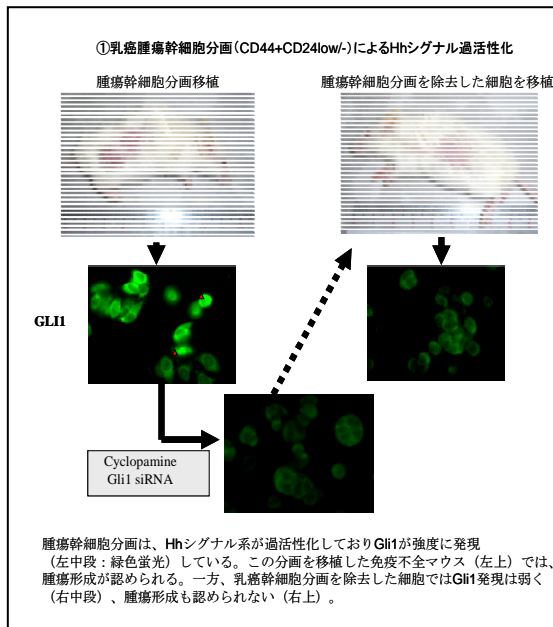
(3) 形態形成シグナル系の生物学的機能解析：①乳癌、胃癌、膵癌におけるHedgehogシグナル系の細胞増殖への関与(論文2、9)。②乳癌および膵癌におけるHedgehogシグナル系、特にGli1の細胞浸潤への関与(論文2、4)を明らかにし、形態形成シグナルが浸潤・転移制御の治療標的となる可能性を示した。

### ②Gli1の細胞浸潤能への関与

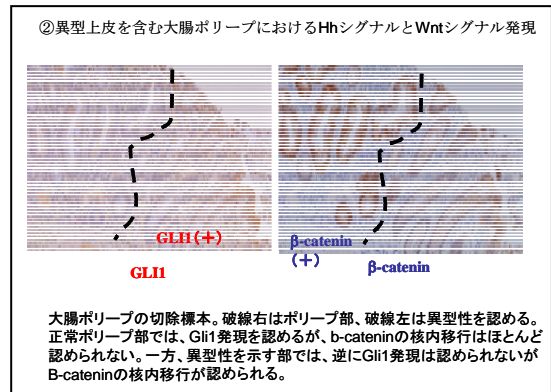


Hhシグナル系の活性化していない膵癌細胞にGli1遺伝子を安定的に発現するクローン(右)を作成。この細胞を用いて、Matrigel invasion assayを施行。親株(左)に比べ、Gli1発現クローンでは著明な浸潤細胞の増加が認められる。

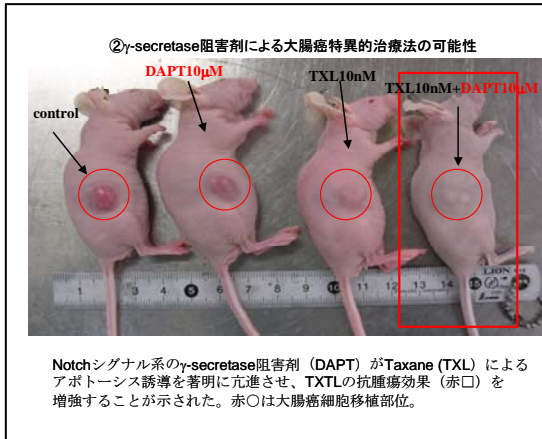
(4) 腫瘍幹細胞に対する治療標的としての可能性：①自己再生能および造腫瘍性を有する乳癌幹細胞類似の CD44<sup>+</sup>CD24<sup>low/-</sup> 分画における Hedgehog シグナル過活性化と治療標的としての可能性を明らかにした (論文 1)。②大腸癌および膵癌において形体形成シグナル系が治療標的となる成果が集積されつつある (学会発表 7、19)。



(5) 治療モデルによる解析：①大腸癌における Hedgehog シグナルと Wnt シグナルのクロストークが治療法として応用しうるかを推測するために、手術時採取大腸癌組織より分離した新鮮腫瘍細胞に Gli1 遺伝子を導入し Wnt シグナルの抑制とコロニー形成能の抑制を確認した (Gli1 遺伝子治療の可能性)。②上記クロストークが実際に癌組織で稼働している可能性を推測するために、癌部を含む大腸ポリープ切除例で Gli1 発現と  $\beta$ -catenin 核内移行を解析した。期待通り、癌部での Wnt シグナル活性化と Gli1 発現抑制、ポリープ部での Gli1 発現亢進と Wnt シグナル抑制が認められた (両シグナル系制御による発癌予防)。③三次元培養モデルにおける Gli1 遺伝子導入による膵癌細胞浸潤能生亢進と cyclopamine による抑制を確認した。④Hedgehog シグナル系の受容体である Patched1 に対するポリクロナル抗体を作成し、膵癌および乳癌細胞の増殖抑制効果を確認した (論文 8)。



(6) その他の成果：①ER $\alpha$ 陽性乳癌における Hedgehog シグナル活性化に ER $\alpha$ シグナル系が関与しており ER $\alpha$ 陽性乳癌ではより完全な ER $\alpha$ シグナル阻害剤開発が有用である可能性を指摘したが、治療法の少ない ER $\alpha$ 陰性乳癌において Hedgehog シグナル阻害が新たな治療法となる可能性を見出した (論文 2)。②大腸癌における形体形成シグナル系解析の結果、Notch シグナルの阻害剤である  $\gamma$ -secretase 阻害が Notch シグナル非依存性に Taxane 系薬剤のアポトーシス誘導作用を著明に亢進するという予想外の結果を見出した。この成果は現在、「科学研究費基盤 (B)：大腸癌特異的な標的分子 (ガンマ・セクレターゼ作用分子) の同定と臨床応用への展開」へと発展している。③また、本研究の成果を総合的に解析した結果、確かに臓器特異的な形体形成シグナル系が存在し、本研究の主目的である「臓器特異的癌制御法」の可能性は in vitro のレベルで検証することができた。一方、Hedgehog シグナルの標的遺伝子である Gli1 が Hedgehog シグナル系以外のシグナル系によって転写制御されている可能性も明らかとなり、Gli1 蛋白が、癌腫を超えた様々な癌の治療標的となる可能性が浮上してきた。この成果は、平成 21 年度より新たな研究テーマとしてスタートする予定である (科学研究費基盤 (B)：広範囲癌腫に対する分子標的治療開発のための Gli1 分子の機能解析)。



## 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 9 件)

- (1) Tanaka H, Nakamura M, Kameda C, Kubo M, Sato N, Kuroki S, Tanaka M, Katano M: The hedgehog signaling pathway plays an essential role in maintaining the CD44+CD24-/low subpopulation and the side population of breast cancer cells. *Anticancer Res*, In press. 査読あり
- (2) Kameda C, Tanaka H, Yamasaki A, Nakamura M, Koga K, Sato N, Kubo M, Tanaka M, Katano M: The hedgehog pathway is a possible therapeutic target for patients with estrogen receptor-negative breast cancer. *Anticancer Res* 29:871-880, 2009 査読あり
- (3) Xu R, Sato N, Yanai K, Akiyoshi T, Nagai S, Wada J, Mibu R, Nakamura M, Katano M: Enhancement of paclitaxel-induced apoptosis by inhibition of mitogen-activated protein kinase pathway in colon cancer cells. *Anticancer Res* 29:261-270, 2009 査読あり
- (4) Nagai S, Nakamura M, Yanai K, Wada J, Akiyoshi T, Nakashima H, Ohuchida K, Sato N, Tanaka M, Katano M: Gli1 contributes to the invasiveness of pancreatic cancer through matrix metalloproteinase-9 activation. *Cancer Sci* 99:1377-1384, 2008 査読あり
- (5) Yanai K, Nakamura M, Akiyoshi T, Nagai S, Wada J, Koga K, Noshiro H, Nagai E, Tsuneyoshi M, Tanaka M, Katano M: Crosstalk of hedgehog and Wnt signaling pathways in gastric cancer. *Cancer Lett* 263:145-156, 2008 査読あり
- (6) Koga K, Nakamura M, Nakashima H, Akiyoshi T, Kubo M, Sato N, Kuroki S,

Nomura M, Tanaka M, Katano M: Novel link between estrogen receptor  $\alpha$  and hedgehog pathway in breast cancer. *Anticancer Res* 28:731-740, 2008 査読あり

(7) Akiyoshi T, Nakamura M, Yanai K, Nagai S, Wada J, Koga K, Nakashima H, Sato N, Tanaka M, Katano M: Gamma-secretase inhibitors enhance taxane-induced mitotic arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Gastroenterology* 134:131-144, 2008 査読あり

(8) Nakamura M, Kubo M, Yanai K, Mikami Y, Ikebe M, Nagai S, Yamaguchi K, Tanaka M, Katano M: Anti-patched-1 antibodies suppress hedgehog signaling pathway and pancreatic cancer proliferation. *Anticancer Res* 27:3743-3748, 2007 査読あり

(9) Yanai K, Nagai S, Wada J, Yamanaka N, Nakamura M, Torata N, Noshiro H, Tsuneyoshi M, Tanaka M, Katano M: Hedgehog signaling pathway is a possible therapeutic target for gastric cancer. *J Surg Oncol* 95:55-62, 2007 査読あり

[学会発表] (計 19 件)

(1) 宗崎正恵: 非浸潤性乳管癌 (DCIS) の浸潤癌への進展: Hedgehog (Hh) シグナル系の関与と乳癌治療への応用。第109回日本外科学会総会、2009年4月4日 (サージカルフォーラム)、福岡国際会議場

(2) 亀田千津: 胃癌における Estrogen receptor  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) の治療標的としての新たな可能性: ER シグナル経路と Hedgehog 経路のクロストーク。2009年4月4日 (サージカルフォーラム)、福岡国際会議場

(3) Tanaka H: Development of novel breast cancer stem cell therapy targeting hedgehog signaling pathway. The 11<sup>th</sup> St. Gallen Breast Cancer Conference, 2009, 3.12, 2009

(4) 田坂健彦:  $\gamma$ -secretase を標的とした新たな膵癌治療法の開発。第21回日本バイオセラピー学会総会 (ワークショップ)、2008年11月18日、東京ドームホテル

(5) 田中晴生: 腫瘍幹細胞を標的とした乳癌治療法の開発。第21回日本バイオセラピー学会総会 (ワークショップ)、2008年11月18日、東京ドームホテル

(6) 永井俊太郎: 膵癌組織での Hedgehog シグナル系の破綻とその制御による膵癌特異的分子標的治療の可能性。第108回日本外科学会総会、2008年5月17日 (サージカルフォーラム)、長崎ブリックホール

(7) 近沢信人: Wnt シグナルを標的とした大腸癌に対する腫瘍幹細胞療法開発の可能性。

第 108 回日本外科学会総会、2008 年 5 月 17 日（サージカルフォーラム）、長崎ブリックホール

(8) 亀田千津：ER 陰性および Triple negative 乳癌に対する新たな治療標的：Hedgehog シグナル。第 109 回日本外科学会総会、2008 年 5 月 15 日（サージカルフォーラム）、長崎ブリックホール

(9) 田坂健彦：膵癌に対する治療法開発を目的とした増殖関連シグナル系の網羅的解析。第 109 回日本外科学会総会、2008 年 5 月 15 日（サージカルフォーラム）、長崎ブリックホール

(10) 梁井公輔：大腸癌における新規の Taxane 系薬剤耐性機序と克服。平成 19 年度 21COE 若手研究者成果発表会、2008 年 1 月 25 日、九州大学コラボレーション I

(11) 古賀健一郎：乳癌における内分泌系シグナル系（ER シグナル）と形態形成シグナル系（Hedgehog シグナル）のクロストーク：新規治療法開発への応用。平成 19 年度 21COE 若手研究者成果発表会、2008 年 1 月 25 日、九州大学コラボレーション I

(12) Katano M: Morphogenesis signaling and cancer. 九州大学 21COE 国際シンポジウム、2007 年 11 月 6 日、九州大学コラボレーション I

(13) 古賀健一郎：Estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) 陽性乳癌における ER $\alpha$  と Hedgehog 経路の連関。第 20 回日本バイオセラピー学会総会（ワークショップ）、2007 年 10 月 11 日、札幌プリンスホテル

(14) 梁井公輔：胃癌における Hedgehog シグナルと Wnt シグナルの Cross talk。第 20 回日本バイオセラピー学会総会（ワークショップ）、2007 年 10 月 11 日、札幌プリンスホテル

(15) 永井俊太郎：膵癌細胞の浸潤能における Hedgehog 系の関与。第 20 回日本バイオセラピー学会総会（ワークショップ）、2007 年 10 月 11 日、札幌プリンスホテル

(16) 片野光男：形態形成シグナルと癌。第 20 回日本バイオセラピー学会総会（特別講演）、2007 年 10 月 11 日、札幌プリンスホテル

(17) 近沢信人：大腸癌における腫瘍幹細胞療法の可能性。第 20 回日本バイオセラピー学会総会、2007 年 10 月 11 日、札幌プリンスホテル

(18) 田中晴生：腫瘍幹細胞 (cancer stem cell) を標的とした乳癌治療法の開発。第 20 回日本バイオセラピー学会総会、2007 年 10 月 11 日、札幌プリンスホテル

(19) 山崎章生：膵癌細胞の増殖に及ぼす癌組織浸潤単核球の役割：Hedgehog signal 活性化。第 20 回日本バイオセラピー学会総会、2007 年 10 月 11 日、札幌プリンスホテル

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tumor.med.kyushu-u.ac.jp/>にて開示予定。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片野 光男 (KATANO MITSUO)  
九州大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：10145203

### (2) 研究分担者

中村 雅史 (NAKAMURA MASAFUMI)  
九州大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号：30372741

佐藤 典宏 (SATO NORIHIRO)  
九州大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号：20423527

野村 政壽 (NOMURA MASATOSHI)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：30315080

### (3) 連携研究者

なし