

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591663

研究課題名(和文) Smoothenedの機能とシグナルクロストーク解明による骨肉腫分子標的治療開発

研究課題名(英文) Functional analysis of Smoothened in osteosarcoma via signal cross talk

研究代表者

山元 拓哉(YAMAMOTO TAKUYA)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：40381157

研究成果の概要(和文)：

我々は骨肉腫の発生・増殖・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行ってきた。ヒト骨肉腫において Hedgehog シグナルが活性化しているのを確認した後に Smoothened (SMO) をターゲットとして阻害したところ、*in vitro*, *in vivo* において細胞周期制御による骨肉腫の増殖抑制作用を示すことを報告した。さらに横紋筋肉腫においても Hedgehog シグナルを SMO, 下流の転写因子である GLI を薬剤にて阻害すると増殖を抑制可能なことを見いだした。さらに骨肉腫において Hedgehog シグナル下流の転写因子である GLI2 を阻害すると骨肉腫細胞の増殖・浸潤・転移能が低下した。GLI の下流で転移を制御する他のシグナル分子も明らかとした。

研究成果の概要(英文)：

We have examined the function of Hedgehog pathway in osteosarcoma cell proliferation, metastasis, and cancer stem cells. We found activation of Hedgehog pathway in human osteosarcoma. Inhibition of Smoothened (SMO) prevented osteosarcoma cell proliferation by cell cycle regulation *in vitro* and *in vivo*. In addition, pharmacological inhibition of SMO or GLI prevents human rhabdomyosarcoma cell proliferation. Furthermore, inhibition of GLI2 prevents osteosarcoma cell proliferation, invasion, and lung metastasis. We have already found that other signal related molecule regulate the osteosarcoma cell metastasis by Hedgehog signal activation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨肉腫 Hedgehog Smoothened 転移

## 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。

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。

しかし骨肉腫における Hedgehog シグナルの機能は不明であった。

## 2. 研究の目的

骨肉腫における Hedgehog シグナルの機能解析と新規ターゲット遺伝子や他シグナルとのクロストークを明らかにすること。

## 3. 研究の方法

骨肉腫細胞で Hedgehog シグナル下流因子の細胞増殖・細胞浸潤への機能評価を行う。具体的には Hedgehog シグナルの正の制御因子である SMO を siRNA, shRNA を用いてノックダウンして骨肉腫細胞に対する効果を in vitro において wound healing assay, membrane mobility assay を使用して評価する。さらに GFP で標識した SMO をノックダウンした骨肉腫細胞株をヌードマウスに移植して in vivo における転移能を in vivo imaging を用いて評価する。

また Hedgehog シグナルの下流転写因子を阻害して上記と同様の研究を行う。

また Hedgehog シグナル下流の転写因子である GLI2 をノックダウンして発現が変化する遺伝子をマイクロアレイで同定して、骨肉腫の増殖・転移能を制御する新規因子を同定する。

具体的には候補因子の蛋白質の発現レベルを western blot, 免疫染色で確認する。

C, 候補因子を siRNA や shRNA でノックダウン、もしくは expression vector を用いて強制発現させて細胞の浸潤能を in vitro で評価する。

D, 候補因子を siRNA や shRNA でノックダウン、もしくは expression vector を用いて強制発現させてヌードマウスに移植して転移能を in vivo imaging を用いて評価する。上記すべての遺伝子群の活性を臨床検体で

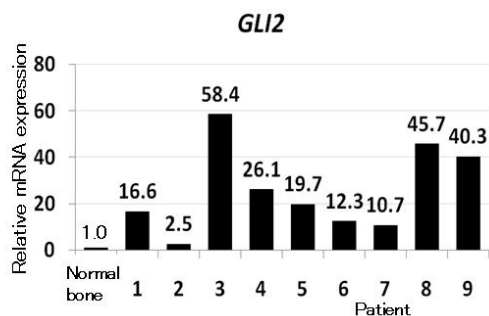
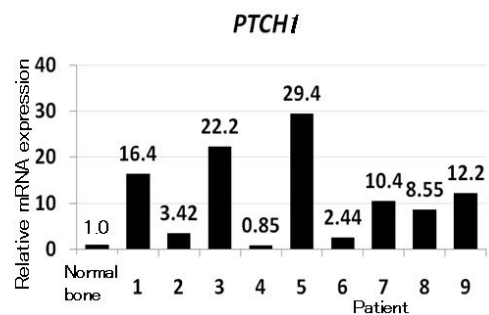
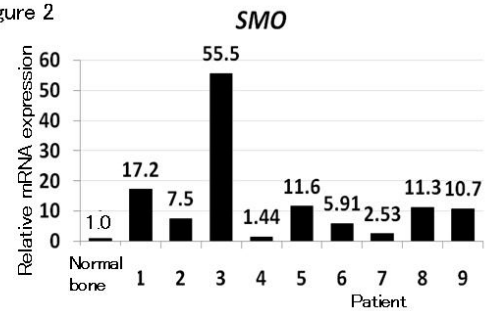
検討して肺転移・化学療法の効果・予後予測に応用するための統計学的解析を行う。

また臨床応用のために上記シグナルを抑制する低分子化合物で臨床応用可能なものについて骨肉腫・横紋筋肉腫における細胞増殖・細胞浸潤能への効果を in vitro, in vivo で評価する。

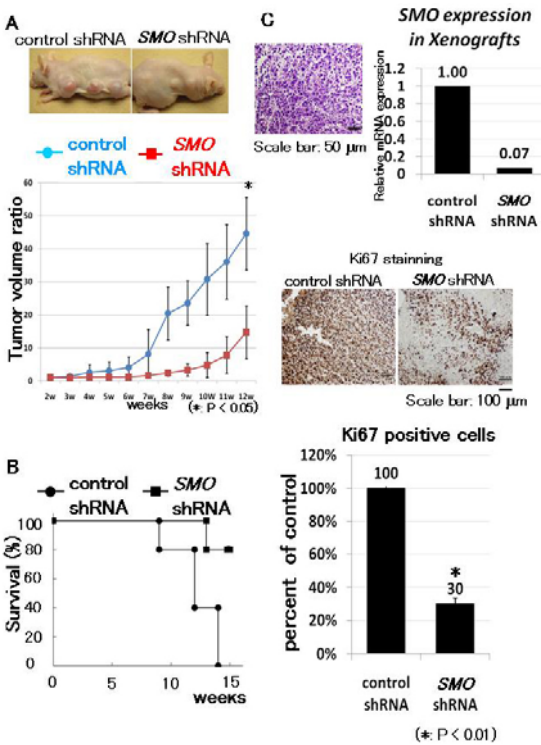
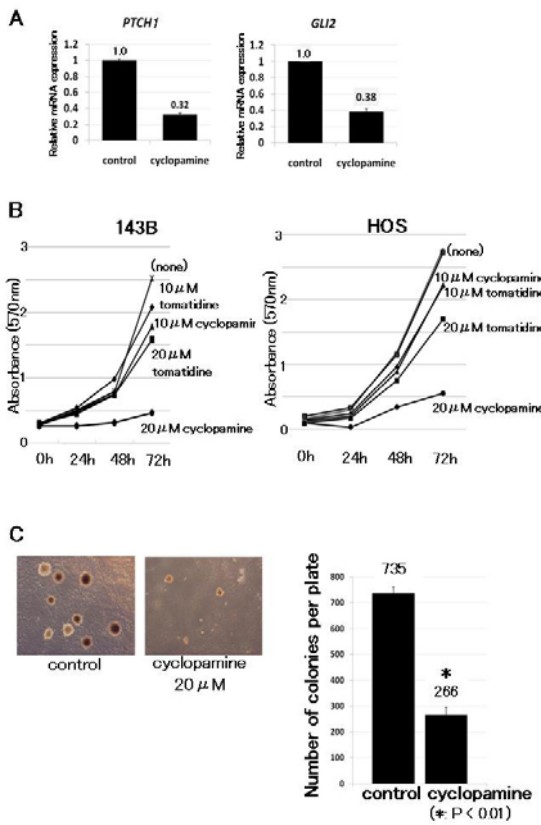
## 4. 研究成果

そこで申請者らはまず骨肉腫の発生・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、骨肉腫の細胞株、臨床検体とも Hedgehog シグナル分子の強発現を認めた。

Figure 2



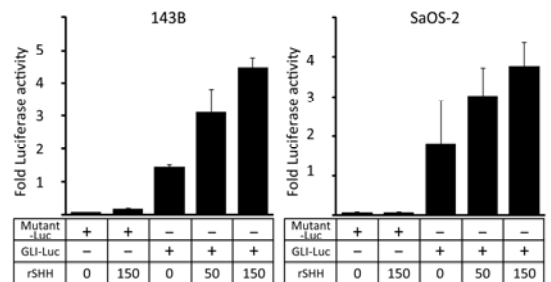
また Hedgehog シグナル特異的阻害剤である cyclopamine 投与や receptor である SMO を siRNA, shRNA を用いて選択的に阻害すると細胞周期関連因子の発現を制御して細胞周期を G1 arrest することにより骨肉腫の成長を in vitro, in vivo で抑制することを確認した。(Fig. 1)



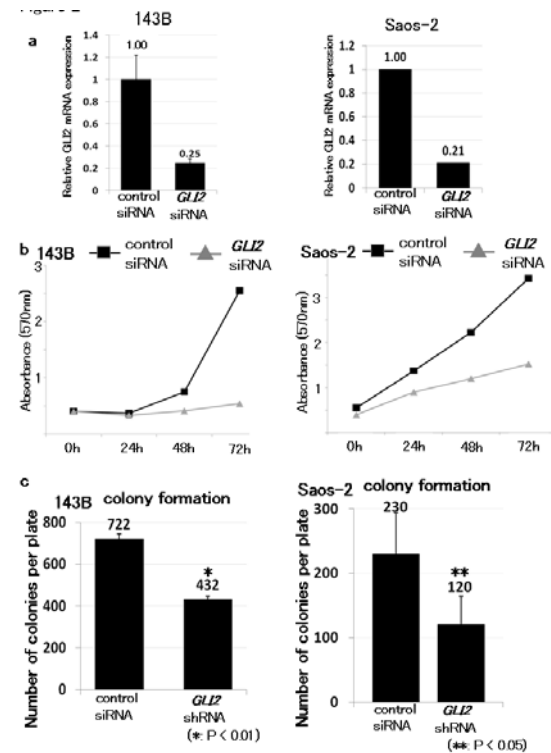
次にヒト横紋筋肉腫における Hedgehog シグナルの機能解析を行った。Real-time PCR にてヒト横紋筋肉腫 cell line と臨床検体で Hedgehog 関連遺伝子の発現上昇を認め、免疫染色法にてヒト横紋筋肉腫 cell line と臨床検体で SMO や GLI2 タンパクの発現を認めた。

また、WST assay において Hedgehog シグナルを阻害する Cyclopamine (SMO inhibitor) や GANT61 (GLI inhibitor) の投与により腫瘍増殖抑制効果認め、cell proliferation assay, cell death detection assay により細胞分裂抑制と細胞死誘導による腫瘍増殖抑制が起こっていると考えられた。Hedgehog シグナルが横紋筋肉腫の増殖に関与していることが明らかとなった。横紋筋肉腫の治療において Hedgehog シグナルの制御が新たな治療ターゲットとなり得ることを示唆している。

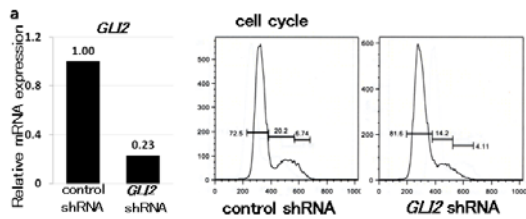
またヒト骨肉腫において、1. ヒト骨肉腫細胞株及び臨床検体において GLI2 の発現上昇を認めた。また GLI2 結合配列を用いた luciferase assay にて骨肉腫細胞における GLI2 転写の亢進を認めた。



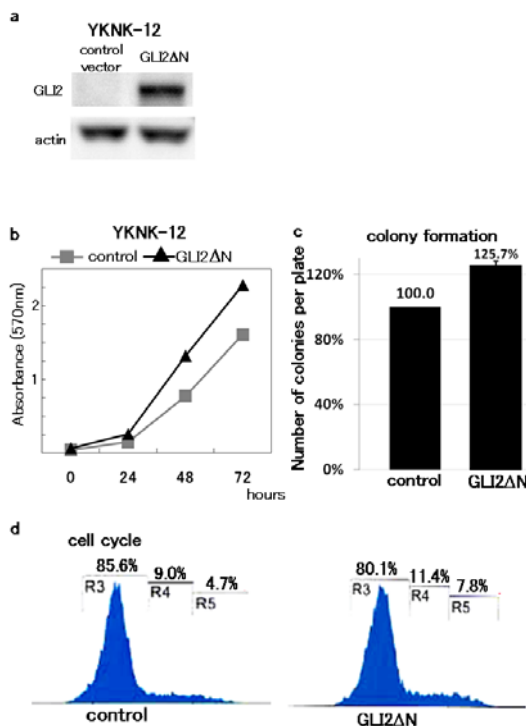
2. GLI2 阻害剤や siRNA を用いて GLI2 を抑制すると、正常骨芽細胞では増殖抑制作用を示さないが、骨肉腫細胞では増殖が抑制することを見いだした。



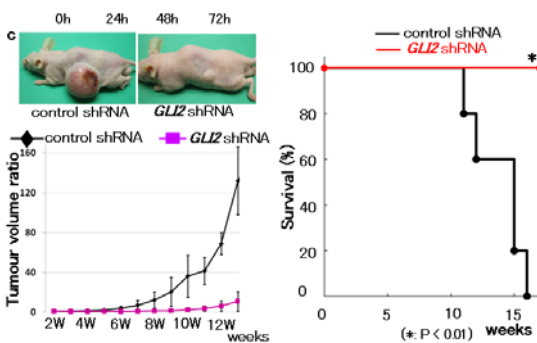
3. GLI2 の抑制により、細胞周期の正の制御因子 cyclinD1、SKP2、pRb の発現減少と負の制御因子 p21 の発現上昇が見られ、骨肉腫細胞株が G1 arrest を起こしていることが示された。



4. 恒常活性型 GLI2 の強制発現により、間葉系幹細胞株の増殖は促進し、細胞周期は正に制御されていることが示された。



5. GLI2 shRNA を遺伝子導入した骨肉腫細胞株をヌードマウスに移植すると、有意な腫瘍増殖抑制効果を認め、生存期間も延長した。



次に GLI2 を標的とした骨肉腫転移抑制効果について解析を行った。

【方法・結果】1. 定量的 PCR 法により、ヒト骨肉腫細胞株及び臨床検体において、Hedgehog シグナル関連遺伝子群 (PTCH1, SMO, GLI2) の発現上昇を認めた。2. RNAi を用いて GLI2 の発現を抑制すると Migration assay および Wound healing assay で、骨肉腫細胞株の移動能が抑制されていた。3. GLI2 の発現を抑制すると、Invasion assay にて骨肉腫細胞株の浸潤能が抑制されていた。4. 恒常活性型 GLI2 を強制発現させた間葉系幹細胞株では、移動能及び浸潤能が促進した。

【考察】骨肉腫において GLI2 の機能を抑制すると、in vitro において移動能及び浸潤能が抑制されることを明らかとし、GLI2 が骨肉腫転移抑制治療において有用な標的分子となり得ることが示唆された。GLI の下流で転移を制御する他のシグナル分子も明らかとした。この遺伝子をノックダウンすると骨肉腫細胞の浸潤能が低下していることも明らかとした。

次に Hedgehog シグナルを抑制する薬剤による臨床応用のための研究を開始した。また、三酸化ヒ素 (ATO) が、Hh 下流の転写因子である GLI の転写を抑制し、悪性腫瘍の増殖を抑制することが報告された。本研究では、骨肉腫において、ATO の GLI 転写・増殖抑制効果について報告する。

【方法・結果】1. 定量的 PCR にて、骨肉腫細胞株では GLI 標的遺伝子の発現上昇が ATO 投与にて低下し、2. WST assay, colony formation assay で、ATO による増殖抑制効果が示された。3. FACS による解析にて、ATO 投与で subG1 期の増加を認めた。4. Western blot 法にて、ATO 投与により  $\gamma$ H2AX, cleaved caspase3, cleaved PARP は増加し、Bcl-2, Bcl-xL は低下し、アポトーシス誘導が示唆された。6. 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。cisplatin 処理された骨肉腫細胞株に Sonic Hedgehog (rSHH) を投与することで  $\gamma$ H2AX の発現が低下しており、Hedgehog pathway の活性化が DNA 損傷を減弱することが示された。また、rSHH 投与で低下した  $\gamma$ H2AX の発現は ATO を投与することで発現が亢進し、Hedgehog pathway が亢進していても、ATO は骨肉腫細胞に DNA 損傷を引き起こすことが示唆された。7. 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。

【考察】骨肉腫において ATO を投与することで GLI の転写が抑制され、腫瘍増殖が抑制されることを、in vitro、in vivo で明らかとした。ATO は GLI の活性化により増殖効果を示す骨肉腫の治療において有用な治療薬と

なり得ることが示唆された。

## 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 4 件)

(全て査読あり)

(1) Pharmacological inhibition of the Hedgehog pathway prevents human rhabdomyosarcoma cell growth.

Kawabata N, Ijiri K, Ishidou Y, Yamamoto T, Nagao H, Nagano S, Maeda S, Komiya S, Setoguchi T†.

† Corresponding author

Int J Oncol. 2011; 399: 899-906

(2) Role of GLI2 in the growth of human osteosarcoma

Nagao H., Ijiri K., Hirotsu M., Ishidou Y., Yamamoto T., Nagano S., Takizawa T., Nakashima K.,

Komiya S., and Setoguchi T. †

† Corresponding author

The Journal of Pathology. 2011; 224: 169-79

(3) Suppression of Osteosarcoma Cell Invasion by Chemotherapy Is Mediated by Urokinase Plasminogen Activator Activity via Up-Regulation of EGFR.

Matsunoshita Y, Ijiri K, Ishidou Y, Nagano S, Yamamoto T, Nagao H, Komiya S, Setoguchi T. †

† Corresponding author

PLoS ONE. 2011; 6(1):e16234.

doi: 10.1371/journal.pone.0016234

(4) Smoothed as a new therapeutic target for human osteosarcoma

Hirotsu M. §, Setoguchi T. § †, Sasaki H. §, Matsunoshita Y., Gao H., Nagao H., Kunigou O., Komiya S.

§ These three authors contributed equally. † Corresponding author

Molecular Cancer. 2010; (9):5

doi: 10.1186/1476-4598-9-5.

[学会発表] (計 12 件)

2012 年 10 月 26 日 名古屋国際会議場

日本整形外科学会基礎学術集会

シンポジウム 骨軟部肉腫に対する新規分子標的治療 瀬戸口啓夫、小宮節郎

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山元 拓哉 (YAMAMOTO TAKUYA)

鹿児島大学・医学部・学部附属病院・講師

研究者番号：40381157

### (2) 研究分担者

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

### (3) 連携研究者

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