

## 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：14401  
 研究種目：若手研究 B  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22791708  
 研究課題名（和文）小児悪性腫瘍に対するヘッジホッグシグナル系阻害剤を用いた分子標的治療に関する研究  
 研究課題名（英文）Investigation of the molecular-target therapy against child cancers by using the Hedgehog signal inhibitor  
 研究代表者  
 野村 元成 (NOMURA MOTONARI)  
 大阪大学・医学部附属病院・医員  
 研究者番号：40546909

## 研究成果の概要（和文）：

最近 Hedgehog (Hh) シグナル伝達系の変異が種々の成人悪性腫瘍の増殖や腫瘍発生に関与することが注目されているが、小児悪性腫瘍に関しては未だ詳細は不明である。我々は小児悪性腫瘍細胞株を用い、経路上の転写因子 Gli1 の阻害剤 Forskolin 投与による抗腫瘍効果を検討し、小児悪性腫瘍における Hh シグナル伝達系の治療標的の可能性について考察した。

## 研究成果の概要（英文）：

The mutation of Hedgehog (Hh) signal is associated with the proliferation or the carcinogenesis of several adult cancers, but little is known about child cancers. We investigated the antitumor effect of the Gli1 inhibitor Forskolin against child cancer cells, focusing on Hh signal pathway as a therapeutic target.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、小児外科学、小児腫瘍学

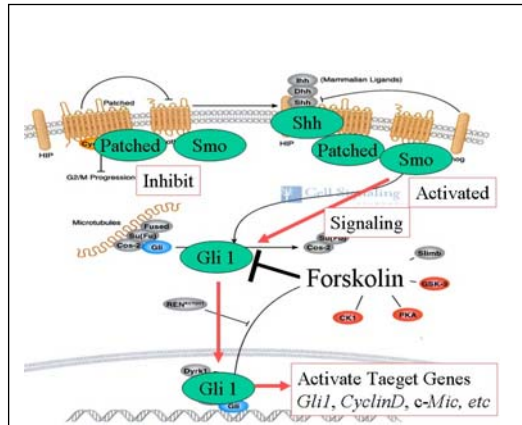
キーワード：小児腫瘍、ヘッジホッグ、Gli1、横紋筋肉腫、分子標的治療

## 1. 研究開始当初の背景

ヘッジホッグ蛋白はショウジョウバエを用いた胚芽発生期のパターン形成変異体のスクリーニングにより発見された。脊椎動物ではこの経路は胚芽時の細胞増殖を制御し、器官形成に関与することが明らかになっている。近年、ヘッジホッグシグナル経路が基底細胞癌、肺癌、髄芽腫、食道癌、胃癌、前立腺癌等種々の成人悪性腫瘍において高発現し、腫瘍の発生に関与することが明らかになってきた。この経路は癌細胞の生存や増殖を維持・推進するなど、悪性腫瘍の発生、進

展にも深く関与することが報告されているが (Nat Rev Cancer 2:361-372, 2002)、小児悪性腫瘍の発癌におけるヘッジホッグシグナル伝達系の関与に関しては少数の報告があるのみで、ほとんど明らかになっていない。最近我々の研究室で、小児悪性腫瘍の細胞株や切除標本において、ヘッジホッグ蛋白の一種である Smooth Hedgehog (Shh)、そのレセプター Patched-1 (Ptch)、細胞内伝達物質である Gli-1 の発現を免疫染色にて検討すると、これら ヘッジホッグシグナル伝達系の構成因子は種々の小児悪性腫瘍において発現

していることが明らかとなり、ヘッジホッグシグナル経路は小児腫瘍の発生に関わっていることが示唆された (Oue et al: J Pediatr Surg44(2):377-80, 2009)。



### ヘッジホッグシグナル伝達系

ヘッジホッグ蛋白の一種である Shh が受容体である Patched と結合すると、膜蛋白 Smo が活性化され、シグナルが細胞内伝達物質 Gli1 に伝達される。Gli-1 は核内に移行して DNA プロモーターと結合し、Gli-1 自身や Cyclin-D、C-myc などの遺伝子を発現させ、細胞の増殖亢進などが引き起こされる。ヘッジホッグ阻害剤である Forskolin は、Gli-1 の活性を特異的に抑制する。

最近ヘッジホッグシグナル系を制御している Gli1 と呼ばれる蛋白が、胃癌や食道癌など成人の消化器癌において高発現を示し、その生理的活性を抑制すると癌細胞の増殖が抑制され apoptosis の亢進が認められることが報告されている (Dev cell 15(6)801-12, 2008)。そこで我々は、ヘッジホッグシグナル系の中でも特にこの Gli1 に着目し、小児の代表的腫瘍である横紋筋肉腫、肝芽腫、神経芽腫において、Gli-1 の特異的抑制剤である Forskolin を用いることにより、成人癌と同様に小児腫瘍の増殖が抑制されるか否かを in vitro 及び in vivo で検討し、Gli1 が小児腫瘍における分子標的治療の標的遺伝子となりうるか否かを明らかにするために本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

胎生期形態形成に重要な役割を持つ

Hedgehog (Hh) シグナル伝達系は種々の成人悪性腫瘍に高発現し、その発生や悪性化に関与することが報告されている。しかし小児悪性腫瘍の発生における Hh シグナル伝達系の関与はほとんど解明されていない。最近我々は Hh シグナル伝達系構成因子である Shh、Ptc1、Gli-1 の発現を免疫組織染色により検討し、小児悪性腫瘍においても広くその発現が亢進していることを明らかにしたが、今回は小児悪性腫瘍由来の細胞株を用い、ヘッジホッグシグナル伝達系の抑制が腫瘍増殖を抑制するか否かを RNA 干渉及び、シグナル伝達系阻害薬 Cyclopermine 及び Forskolin により検討する。さらにヌードマウス移植腫瘍にヘッジホッグ阻害薬を投与して腫瘍増殖抑制効果を検討し、小児悪性腫瘍においてヘッジホッグシグナル伝達系が治療の標的となりうるか否かを検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 小児腫瘍細胞株における RNA 干渉を用いた Gli1 発現の抑制

肝芽腫由来の細胞株 Huh6、神経芽腫由来の細胞 NB19、横紋筋肉腫由来の細胞株 RMS-YM、RD、RH30 において siRNA を用いた RNA 干渉により Gli1 遺伝子の発現を抑制する。Gli1 に対する siRNA は SANTA CRUZ 社 (USA) 等で市販されているものを用いるか、新たに合成する。コントロールとしていずれの遺伝子配列にも対応しない non specific siRNA を用いる。siRNA の導入は導入試薬 (HyperFect, Qiagen, USA) を用いて行うが、導入高率の悪い細胞株については、Gene Pulser Xcell エレクトロポレーションシステム (BIO-RAD) を用い、エレクトロポレーション法にて導入を行なう。Gli1 の mRNA 及び蛋白の発現抑制は定量的 PCR 法及び Western blot 法により確認する。導入後 1, 2, 3, 4, 5, 7 日後の mRNA 及び蛋白の発現を検討するが、最も発現が抑制されるのは経験的には導入 3 日後前後である。

### (2) RNA 干渉による Gli1 mRNA 発現の抑制による細胞増殖抑制効果及び apoptosis 促進効果

96 well のプレートに各細胞を 5000/100  $\mu$ l の割合で撒き、コントロール群 (無処理の細胞)、siRNA 群 (Gli1 に対する siRNA を導入した群) 及び NS 群 (non-specific な siRNA を導入した群) の 3 群を作成する。細胞増殖に関しては Cell Counting Kit (Dojin co., Japan) を用いて WST assay により検討する。siRNA 導入 0, 1, 2, 3, 5, 7 日後にマイクロプレートリーダーにて 414nm における吸光度を

測定し、各細胞の増殖曲線を作成し、3群間で増殖の違いを比較する。測定は3回以上行ない、実験の再現性を確認する。Apoptosisの評価は、TUNEL法にて行なう。組織染色用のculture slide上に各細胞を5000/100 $\mu$ lの割合で撒き、コントロール群、siRNA群及びNS群の3群を作成する。細胞をエタノールで固定後ApopTag Plus in Situ Fluorescein Apoptosis Detection Kit (Serological Corp, USA)にてApoptosisをきたした細胞を検出し、腫瘍細胞1000個あたりのApoptosis数をカウントし、3群間で比較検討する。測定はsiRNA導入3日後に行ない、3回以上検討して実験の再現性を確認する。

### (3) ヘッジホッグシグナルの特異的阻害薬による細胞増殖抑制及びapoptosis促進効果の検討

ヘッジホッグシグナルを特異的に阻害する薬剤としてCyclopamine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 及び Forskolin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) の2種類を用いる。それぞれ培養液中の濃度が5 $\cdot$ M、10 $\cdot$ M、25 $\cdot$ Mになるように調整し、阻害剤を含まない培養液をコントロール群として計7群を作成する。細胞増殖抑制効果は、上記WST assayにより検討する。96 wellのプレートに各細胞を5000/100 $\mu$ lの割合で撒き、0, 1, 2, 3, 5, 7日後にWST assayを行ない、各ヘッジホッグシグナル系阻害薬の濃度別に細胞増殖曲線を作成する。各細胞株において、ヘッジホッグシグナル系阻害薬によりdose-dependentに細胞増殖が抑制されるか否かを検討する。Apoptosisの評価はTUNEL法により行なう。siRNA導入後3日目の細胞においてapoptosisに陥った細胞を検出し、陽性細胞の割合を計測する。各細胞株において、ヘッジホッグ阻害薬によりdose-dependentにapoptosisが促進されるか否かを検討する。各実験は3回以上行ない再現性を確認する。

### (4) ノードマウス移植腫瘍における、ヘッジホッグシグナル阻害剤の増殖抑制効果の検討

#### 小児腫瘍細胞株をノードマウス皮下に移植腫瘍 (横紋筋肉腫細胞による検討例)

上記実験で、In Vitroで腫瘍細胞のヘッジホッグシグナル阻害剤により増殖抑制が確認された細胞株についてノードマウスの皮下に移植し、腫瘍を形成させる。過去の検討

で、いくつかの小児腫瘍細胞株に関して腫瘍形成に成功している。



これら腫瘍を形成したマウスに、ヘッジホッグシグナルの特異的阻害薬 Cyclopamine 及び Forskolin をそれぞれ 1mg/kg, 2mg/kg, 5mg/kg を隔日皮下投与し、コントロール群には生食を投与する。経時的にマウスの体重及び腫瘍数、腫瘍径(cm)を計測し、以下の検討を行う。

- ① 腫瘍容積を0.5 x 短径<sup>2</sup> x 長径(mg)にて計算し、腫瘍の増殖曲線を作成して各阻害剤で、dose-dependent に抗腫瘍効果が得られるか否かを検討する。
- ② 阻害薬投与5週間後に腫瘍を摘出してパラフィンブロックを作製し、Ki67の免疫染色により腫瘍増殖能を、TUNEL法にてapoptosisの割合を評価する。同様の実験を経口投与、静注、局所注入にて検討する。
- ③ マウス固体に対する安全性は、体重変化など外観の観察から評価できるもので行い、また末梢血液像、生化学データを測定して安全性の確認を行ない、将来ヒトへの臨床応用の際の基礎データとする。

### (5) 総括、発表

以上得られた結果を総括して学会発表し、英文雑誌に論文発表を行なう。

#### 4. 研究成果

最近 Hedgehog (Hh) シグナル伝達系の変異が種々の成人悪性腫瘍の増殖や腫瘍発生に関与することが注目されているが、小児悪性腫瘍に関しては未だ詳細は不明である。我々は小児悪性腫瘍細胞株を用い、経路上の転写因子 Gli1 の阻害剤 Forskolin 投与による抗腫瘍効果を検討し、小児悪性腫瘍における Hh シグナル伝達系の治療標的の可能性について考察した。

#### 【対象及び方法】

- (1) 神経芽腫、肝芽腫、横紋筋肉腫細胞株

において、Hh シグナル活性化の指標とされる Gli1 の発現を RT-PCR, qPCR 法にて検討した。

(2) Forskolin 投与による Gli1 の発現変化、細胞増殖抑制効果、Apoptosis の変化を検討した。

(3) in vitro にて抑制効果の見られた細胞株について、ヌードマウス移植担癌マウスを作製し、Forskolin を皮下注して腫瘍増殖抑制効果および予後を検討した。

#### 【結果】

(1) Gli1 発現は、横紋筋肉腫細胞株で特に高い発現を認め、神経芽腫と肝芽腫で中等度の発現を認めた。

(2) 全ての細胞株において Forskolin の添加により Gli1 の発現は濃度依存性に減少した。

(3) NB1 を除く全ての細胞において Forskolin の添加により細胞増殖は濃度依存性に抑制された。HepG2 を除く全ての細胞株で Apoptosis は有意に亢進した。(4) Forskolin 皮下投与により、マウス移植腫瘍の増殖は横紋筋肉腫では抑制されたが、神経芽腫、肝芽腫では縮小効果は得られなかった。横紋筋肉腫の担癌マウスにおいて、治療群はコントロール群よりも有意な予後の改善を認め、副作用も特に認めなかった。

#### 【総括】

Hh シグナル伝達経路の構成因子を阻害することで特に横紋筋肉腫における in vitro および in vivo での抗腫瘍効果が確認された。以上より Hh シグナル伝達経路は小児悪性腫瘍の治療において新たな分子標的治療の候補となりうることが証明された。

#### 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 1 件)

- ① Motonari Nomura, 13-Cis retinoic acid can enhance the antitumor activity of non-replicating Sendai virus particle against neuroblastoma, Cancer Science, 査読有、104 巻、(2013)、238-244

[学会発表] (計 4 件)

- ① 野村 元成、神経芽腫に対する不活化ウイルス粒子 HVJ-E の抗腫瘍効果の検討、第 46 回日本小児外科学会、2012. 5. 14、横浜  
② 野村 元成、骨髄転移、骨髄転移、腋窩リンパ節転移を来した前腕原発横紋筋肉腫の 1 例、第 26 回日本小児がん学会、2011. 12. 17、大阪  
③ 野村 元成、門脈内進展をきたし AFP 高値のまま生体肝移植を実施した肝芽腫

の 1 例、第 46 回日本小児外科学会、2011. 7. 20、東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 元成 (NOMURA MOTONARI)  
大阪大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：40546909

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：