

## 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 6月 10日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22792008

研究課題名（和文） Hedgehog シグナルを標的とした口腔癌の新規治療法の開発

研究課題名（英文） Development of novel treatment targeting Hedgehog signal in oral cancer

研究代表者

田中 章夫 (TANAKA AKIO)

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教

研究者番号：30406392

研究成果の概要（和文）：本研究では、口腔扁平上皮癌における Hh シグナルの検索およびシグナル制御について検索した。免疫組織化学的検索の結果、Shh および Ptch1 の高い発現を認めた。培養細胞では Shh、SMO の強い発現を認めた。RealTime PCR では、Cyclopamine によって各種 Hh シグナル関連因子の発現は抑制傾向を示した。以上の結果から、Hh シグナル伝達経路を制御することにより口腔扁平上皮癌の増殖・進展を阻止する新たな治療法の開発の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the Hh signaling transduction pathway and signal inhibition in the oral squamous cell carcinoma. Immunohistochemical method showed high expression of Shh and Ptch1. Culture cells showed high expression of Shh and SMO protein. RealTime PCR showed that the expressions of Hh signaling factors were inhibited by cyclopamine. These findings suggest that the possibility of novel treatment targeting in oral cancer by Hh signal inhibition.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2012年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 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：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：Hedgehog シグナル、口腔扁平上皮癌、Sonic Hedgehog、Ptch1、Gli1、Smoothed

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 癌は高い自己複製能と多分化能を有する癌幹細胞を中心に、限定した増殖能力を有する癌前駆細胞と分裂能力を失った癌細胞から構成されている。癌組織中における癌幹細胞の占める割合は数%以下と少数であるが、抗癌剤や放射線療法に強い耐性を示すことから、再発や転移などの原因細胞として考えられている。近年、様々な抗癌剤による化学療法の実施により悪性腫瘍の治療は目覚

しく進歩しているが、このような抗癌剤耐性をもつ一部の細胞の存在が臨床状の問題となる。そのため、癌幹細胞を標的とした治療法の開発が現在求められている。癌幹細胞に対する治療はその特徴である自己複製能を制御することが重要であり、癌幹細胞の自己複製は正常組織幹細胞と同じ分子機構を利用していることから、Hh、Wnt、Notchなどのシグナル伝達系は癌治療の標的として特に注目されている。

(2) ヒトの Hh シグナルは、3 種類のリガンド (Sonic Hedgehog (Shh)、Indian Hedgehog (Ihh)、Desert Hedgehog (Dhh)) によって調節されている。産生細胞より分泌されたこれらのリガンドは濃度依存性に受容体である膜貫通型蛋白の Patched1 (Ptch1) に結合することにより、受容体複合体のコンポーネントである Smoothened (Smo) の抑制がはずれ、細胞内にシグナルが伝わり、その下流に存在する 5 つのジンク・フィンガーを持つ転写因子 Gli ファミリー (Gli1、Gli2、Gli3) を介して様々な標的遺伝子の転写が活性化される。また、シグナルの構成因子である Ptch1、Gli1 もその標的遺伝子であり、Hh シグナル活性化の指標となっている。一方、受容体に結合できる Hh リガンドの量は、Hh リガンド結合蛋白である Hh interacting protein (Hip) や growth arrest-specific gene (Gas-1) によって厳密にコントロールされている (図 1)。

(3) 悪性腫瘍ではこれまで、肺小細胞癌や多くの消化器癌で Hh リガンドの一つである Shh が過剰発現を示し、リガンド依存性にシグナルが活性化され癌細胞の増殖に関与していることから、これらの癌細胞が Hh シグナル伝達により制御できる可能性が考えられている。癌の増殖や転移には癌幹細胞による上皮-間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) が深く関わっていることから、申請者らはこれまで、口腔扁平上皮癌における EMT について in vivo および in vitro に検索を行ってきた。近年、癌幹細胞では Hh、TGF- $\beta$ 、Wnt シグナルに関する遺伝子が高発現し、これらの遺伝子プロファイルは予後を推定するのに役立つことや、Hh シグナルが E-カドヘリンの転写抑制因子を制御していることが報告されており、Hh シグナルと EMT との関係が徐々に解明されつつある。我々はこれまでの予備実験から、口腔扁平上皮癌では TGF- $\beta$  誘導による EMT が生じており、その主体を成す E-カドヘリンの発現減弱・消失には Hh シグナルにより制御されている転写抑制因子が関与していることを確認している (ORAL ONCOLOGY Vol. 12 193-196, 2008)。また、CD44+ を示す頭頸部扁平上皮癌の癌幹細胞では、幹細胞の自己複製に関与しているポリコム遺伝子の一つである Bmi-1 遺伝子が発現し、Bmi-1 の up-regulate には Hh シグナルが関与していることが報告されている。これらの知見より、Hh シグナルが EMT により癌幹細胞を制御することで、口腔扁平上皮癌の増殖や転移に大きく関与していることが示唆されることから、本研究において、口腔癌で未だ不明である Hh シグナル伝達経路の詳細を明らかにし、そのシグナル制御を解析することは、口腔癌の増殖・進展で重要な役割を果たす癌幹細胞を標的とした新規治療法

の開発に繋がるものとする。

## 2. 研究の目的

Hedgehog (Hh) シグナルは、胎生期の形態形成に重要な役割を果たすシグナル伝達経路の一つであるが、近年、様々な癌でリガンド依存性に Hh シグナルが活性化し、癌の発生・進展に関与していることが明らかにされている。これは、これらの癌細胞がシグナル伝達により制御できる可能性を示しており、Hh シグナル制御が新たな分子標的治療の候補と考えられる。本研究では、口腔癌では未だ解明されていない Hh シグナルについて、その関連因子の発現を検索してシグナル伝達経路を明らかにし、さらにそのシグナルを制御することにより癌の増殖・進展を阻止する新たな治療法の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究を遂行するにあたり、口腔癌における Hh シグナル関連因子の発現を検索してシグナル伝達経路を明らかにする必要がある。

1) 口腔癌の手術症例から得られた原発巣および転移リンパ節のホルマリン固定パラフィン包埋材料を用いて免疫組織化学的検索および in situ hybridization を行なう。得られた検索結果は臨床病理学的所見と比較検討を行ない、Hh シグナル関連因子の発現と口腔癌の悪性度との相関関係を検討する。

2) 各種口腔癌由来細胞株を用いて関連因子の発現を免疫細胞学的に検索する。また、RT-PCR、Western blotting 法を用いて関連因子の mRNA およびタンパクレベルの発現を検出し、Hh リガンドに関しては ELISA 法にて分泌濃度をする。

3) さらに、Hh シグナル制御による口腔癌の増殖・進展の阻止を明らかにするため、シグナル抑制因子を培養細胞に加えて、各種関連因子の発現や癌細胞の運動能・浸潤能について評価を行なう。

## 4. 研究成果

1) Sonic Hedgehog (Shh) は 38 例中 27 例 (71.1%) に発現を認め、浸潤部の腫瘍細胞に強く発現している傾向が見られた。また、Patched1 (Ptch1) は 38 例中 34 例 (89.5%) で高い発現率を示した。一方、Smoothened (Smo) および Gli1 は 38 例中 15 例 (39.5%) で、その発現は弱く部分的であった。更に Gli2 は全ての症例で発現を認めなかった。今回の研究で、これまで明らかにされていなかった口腔扁平上皮癌における Shh の発現を確認することが出来た。受容体である膜貫通型蛋白の Ptch1 も高い発現を示しており、腫瘍細胞が autocrinel により Hh シグナルの調節を行い、癌の増殖や転移に大きく関与している可能性が考えられた。また、受容体複合体のコンポーネントである Smo や、その下流に存在する転写因子 Gli ファミリーを介した標的遺伝子の転写・活性化につい

ては、更なる解析が必要であると考えられた。

2) SHH、SMOはいずれの細胞株においても強い発現を認めた。一方Gli1の発現は全ての細胞株で認めたが、その発現は弱いものであった。また、Ptchの発現はSAのみで認められた。各種口腔扁平上皮癌由来細胞株におけるShhの高い発現を認めたが、その受容体である膜貫通型蛋白のPtch1は細胞株によってその発現度が異り、遺伝子レベルでの制御が行なわれていることが考えられた。一方、Ptch1によって抑制されるはずのSMOの発現は高く、腫瘍細胞が自立的にSMOを活性化させることによって、癌の増殖や転移に大きく関与している可能性が考えられた。以上の結果から、シグナル阻害因子によるHhシグナルの制御の可能性を含めた遺伝子レベルでの解析が必要であると考えられた。

3) 本研究室で保有する口腔扁平上皮癌由来細胞株のH1、H1R、SA、SARに最終濃度10mMのCyclopamineを添加し、time course (24, 48, 72時間) でRNAを抽出し、RealTime PCRを用いて各種Hhシグナル関連因子の遺伝子レベルでの発現状況について検索した。その結果、各種Hhシグナル関連因子の発現はCyclopamineにより抑制傾向を認めた。一方、時間依存性には直接の抑制ターゲットであるSMOが48hでほぼ抑制のピークを示したが、それ以外の関連因子の発現強度は増加を示した。Cyclopamine添加により各種Hhシグナル関連因子の発現は抑制傾向を示したことから、そのシグナル伝達経路を制御することにより癌の増殖・進展を阻止する新たな治療法の開発の可能性が示唆された。

## 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)

[学会発表] (計4件)

- ① 田中章夫、「最近の口腔癌の話題」：口腔粘膜細胞診による口腔がんスクリーニング、和歌山県歯科医師会研修会、2012年8月17日、和歌山
- ② 和田 健、根来健二、新谷ゆかり、阿河明子、田中章夫、東條 格、藤田茂之、口腔後方部軟組織欠損に対する筋・筋膜弁による再建、第43回日本口腔外科学会近畿地方会、2012年6月23日、大阪
- ③ 東條 格、篠原裕志、田中章夫、木賀紀文、松本隆司、和田 健、藤田茂之、顎関節滑膜軟骨腫症の滑膜における軟骨関連因子の発現、第56回日本口腔外科学会総会・学術大会、2011年10月21-23日、大坂
- ④ 新谷ゆかり、田中章夫、根来健二、東條 格、

小松誉和、藤田茂之、診断に難渋した結節性筋膜炎の1例、第65回日本口腔科学会学術集会、2011年4月21-22日、東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 章夫 (TANAKA AKIO)

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教

研究者番号：30406392