

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592629

研究課題名(和文)横紋筋肉腫に対するヘッジホグシグナルの阻害による増殖・浸潤・転移抑制に関する研究

研究課題名(英文)Hedgehog signal inhibitors suppress the invasion of human rhabdomyosarcoma cells

研究代表者

大植 孝治(Oue, Takaharu)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50314315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：横紋筋肉腫細胞においてHhシグナル系が細胞浸潤に関与するか否かを検証するためヒト横紋筋肉腫細胞株を用い、Hhシグナル阻害剤としてcyclopamineと、forskolinを用いて実験を行った。Matrigel Invasion AssayではHhシグナル阻害剤の添加により、平均浸潤細胞数は有意に低下し、またWound closure assayでは、細胞層に付けた傷の閉鎖時間は有意に遅延した。以上よりHhシグナル系は横紋筋肉腫の浸潤に関与することが示唆され、浸潤を抑制する新たな治療標的となりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to determine whether Hedgehog signaling plays a role in the invasion of RMS. Two kinds of specific Hh signaling inhibitors, cyclopamine and forskolin, were used to suppress activated Hh signals in three RMS cell lines. The effects of the Hh signaling inhibitors on tumor cell invasion and motility were investigated using Matrigel Invasion assays and wound closure assays, respectively. The number of invaded cells in the Matrigel chambers was significantly decreased. The wound closure assays revealed that a blockade of the Hh signaling pathway impairs RMS cell motility. Both the invasive capacity and motility of RMS cells are significantly suppressed by Hh signaling inhibitors, demonstrating that the Hh pathway plays an important role in the invasion of RMS. Hh inhibitors may provide a new paradigm for the treatment of RMS.

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

キーワード：ヘッジホグ Gli-1 阻害剤 cyclopamine forskolin 細胞増殖 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 (Hh) シグナルは胚芽時の細胞増殖を制御し、器官形成に関与する。近年、Hh シグナル経路が基底細胞癌、肺癌、髄芽腫、食道癌、胃癌、膵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増殖を推進し、浸潤や転移を促進するなど、悪性腫瘍の発生、進展に深く関与することが報告されている (Nat Rev Cancer 2:361-372, 2002)。しかし小児悪性腫瘍における Hh 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かった。最近我々は、小児悪性腫瘍の細胞株や切除標本において、Hh 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し、これら Hh シグナル伝達系の構成因子が種々の小児悪性腫瘍において発現していることを明らかにした (Oue T: J Pediatr Surg 44:377-80, 2009)。さらに我々は、Hh シグナル系の中でも特にこの Gli-1 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、成人癌と同様にこれら腫瘍細胞の増殖が抑制され、apoptosis が亢進することを明らかにした (Yamanaka H: Molecular Medicine Reports 3: 133-139, 2010)。

最近 Hh シグナル系が、種々の細胞の遊走能に関与し、癌細胞の浸潤・転移に関与することが明らかになっており、Hh シグナル阻害剤が消化器癌の浸潤、転移を抑制することが報告されている。(Feldmann G et al: Mol Cancer Ther 7: 2725-35, 2008; Alexaki V, et al: J Natl Cancer Inst 102: 1148-59, 2010;)。しかし、Hh シグナル系が、小児悪性腫瘍の浸潤・転移に関与するか否かに関しては、ほとんど知見が無く、それを検討することが、浸潤や転移の病態解明のために意義深いと考えられた。

2. 研究の目的

我々は、Hh シグナル系が特に高発現であった横紋筋肉腫に注目し、Gli-1 の特異的抑制剤を用いることにより、成人癌と同様に浸潤・転移が抑制されるか否かを *in vitro* 及び *in vivo* で検討し、Hh シグナル系が横紋筋肉腫の浸潤・転移を抑制す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。

3. 研究の方法

横紋筋肉腫において Hh シグナル伝達系が亢進し、その抑制により腫瘍細胞の増殖及び浸潤・転移能が抑制されるという仮説をたて、これを検証するために以下の研究を行う。

(1) *in vivo* での Hh シグナル抑制

免疫染色及び RT-PCR 法により、Gli-1 高抗発現が確認された横紋筋肉腫細胞株 3 種

(RMS-YM, RD, RH30) を用い、これらの細胞において Hh 特異的阻害剤である Forskolin により Hh シグナルを抑制効果が得られるか否かを確認する。抑制の効果判定には Gli-1 の発現の低下を定量的 RT-PCR 法により確認し、さらに Hh 阻害による腫瘍細胞増殖抑制効果を WST assay により確認する。

(2) Hh シグナル抑制による *in vitro* での浸潤能の変化

細胞浸潤能の測定には BD 社のマトリゲルインベーションチャンバーアッセイシステムを用いる。チャンバー上に各細胞株を 50,000/well の割合で播き、上層の培地に Hh 阻害剤 Cyclopermine 及び Forskolin をそれぞれ 50,100,200 μ M の濃度になるように添加し、コントロールには溶媒 (DSMO) のみを添加する。5 時間培養したのち、下層に浸潤した細胞の数を計測し、Hh シグナルの

抑制が浸潤能に影響を及ぼすかを検討する。

(2) Hh シグナル抑制による in vitro での運動能の変化

腫瘍細胞の運動能の評価には wound closure assay を用い、それぞれの細胞株における Hh シグナル阻害剤添加による影響を解析した。横紋筋肉腫細胞の細胞層 (monolayers) にピペットチップでほぼ同じ幅の傷をつけ、継続的に顕微鏡にて観察し、細胞の移動による傷の閉鎖の割合を観察し、Hh シグナル阻害剤を添加による創が完全に閉鎖するまでの時間の変化を評価した。

4. 研究成果

(1) いずれの細胞株も Hh シグナル阻害剤 Forskolin の添加により細胞増殖の抑制が認められた。

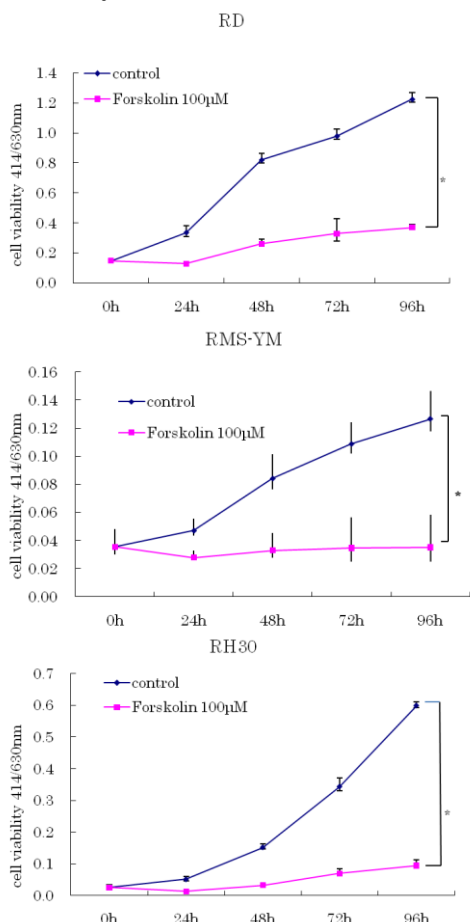


図1 Hh シグナル阻害剤 Forskolin による各細胞株への増殖抑制効果

(2) Matrigel Invasion Assay

膜の裏面に浸潤した細胞数を計測したところ、いずれの細胞株でも Hh シグナル阻害剤 Cyclopermine 及び Forskolin、の添加により、平均浸潤細胞数は有意に低下した。

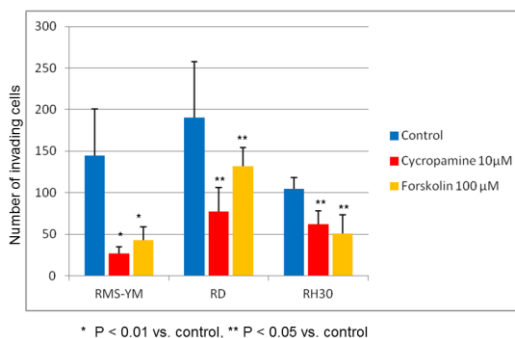
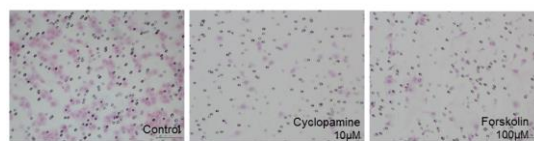


図2 Hh シグナル阻害剤 Cyclopermine 及び Forskolin の添加による平均浸潤細胞数の変化

(3) wound closure assay

各細胞の細胞の運動能は、Hh 阻害剤の添加により、抑制された。

表1 各種細胞株における wound closure assay の結果 4時間毎の閉鎖率の変化 (%)

Hrs.	RMS-YM			RD			RH30		
	Control	CP	FK	Control	CP	FK	control	CP	FK
0	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
4	20	10	10	50	10	10	50	30	20
8	50	30	30	80	30	30	80	60	40
12	60	40	30	90	50	50	100	75	60
16	65	50	40	100	60	60	100	80	70
20	85	60	50	100	70	70	100	90	80
24	100	70	70	100	80	80	100	100	90
28	100	90	80	100	85	90	100	100	100
32	100	95	90	100	90	95	100	100	100
36	100	100	95	100	95	100	100	100	100
40	100	100	100	100	100	100	100	100	100

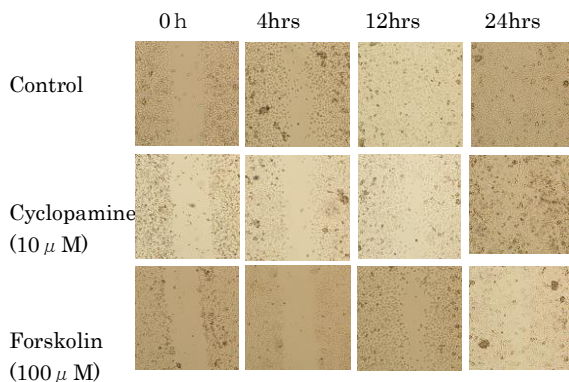


図3 Hh シグナル阻害剤の添加による細胞運動能の抑制効果

以上の結果から、横紋筋肉腫細胞において、Hh シグナル阻害剤の添加により細胞の浸潤能、運動能共に阻害されたことから、Hh シグナル系は横紋筋肉腫の浸潤に関与することが示唆され、浸潤を抑制する新たな治療標的となりう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 6 件)

1. Que T, Uehara S, Yamanaka H, Takama Y, Oji Y, Fukuzawa M. Expression of Wilms tumor 1 gene in a variety of pediatric tumors. J Pediatr Surg 46:2233-8, 2011 (査読有)
2. Wang J, Que T, Uehara S, Yamanaka H, Oji Y, Fukuzawa M. The role of WT1 gene in neuroblastoma. J Pediatr Surg 46:326-31, 2011 (査読有)
3. Yamanaka H, Que T, Uehara S, Fukuzawa M. Hedgehog signal inhibitor forskolin suppresses cell proliferation and tumor growth of human rhabdomyosarcoma xenograft. J Pediatr Surg 46:320-5, 2011 (査読有)
4. Que T, Uehara S, Yamanaka H, Nomura M, Usui N. Hedgehog signal inhibitors suppress

the invasion of human rhabdomyosarcoma cells. Pediatr Surg Int 2013;29:1153-8 (査読有)

5. Miyoshi Y, Ohta H, Namba N, Tachibana M, Miyamura T, Miyashita E, Hashii Y, Que T, Isobe A, Tsutsui T, Kimura T, Ozono K. Low serum concentrations of anti-Mullerian hormone are common in 53 female childhood cancer survivors. Horm Res Paediatr. 2013;79:17-21 (査読有)
6. Que T, Koshinaga T, Okita H, Kaneko Y, Hinotsu S, Fukuzawa M. Bilateral Wilms tumors treated according to the Japan Wilms Tumor Study Group protocol. Pediatr Blood Cancer 2014 Epub ahead of print (査読有)
7. 上原 秀一郎, 太田 秀明, 山本 佳史, 橋井 佳子, 大植 孝治, 福澤 正洋: 頰部横紋筋肉腫に対する集学的治療後 4 年で発生した耳下腺悪性腫瘍の 1 例. 日本小児血液・がん学会雑誌 50 : 232-236, 2013 (査読有)

[学会発表] (計 13 件)

1. 上原 秀一郎, 野村 元成, 山中 宏晃, 大植 孝治, 橋井 佳子, 太田 秀明, 福澤 正洋: 当院における横紋筋肉腫 22 症例の臨床病理学的検討 特に再発・転移症例と大量化学療法について. 第 48 回日本小児外科学会 2011.7.20-22 東京
2. 山中 宏晃, 大植 孝治, 上原 秀一郎, 福澤 正洋: 横紋筋肉腫細胞株に対するヘッジホッグシグナル伝達経路阻害剤フォルスコリンの浸潤抑制効果の検討. 第 53 回日本小児血液がん学会 2011.11.25-27 前橋
3. Que T, Uehara S, Fukuzawa M, Miyoshi Y, Ohta H, Hashii Y: Problema of Childhood Cancer Survivors in Pediatric Surgical Clinic. 44th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, London,

UK,2012

4. Que T, Uehara S, Yamanaka H, Takama Y, Fukuzawa M: Hedgehog Signal Inhibitors Suppress the Invasion of Human Rhabdomyosarcoma Cells. 59th Congress of the British Association of Paediatric Surgeons, Roma, Italy, 2012
5. Uehara S, Kawatsu M, Que T, Fukuzawa M: The expression of survivin and its increased expression after chemotherapy in hepatoblastoma. XXV International Symposium on Paediatric Surgical Research, London, UK, 2012
6. Uehara S, Que T, Takenaka S, Hashimoto N, Adachi K, Matsumura R, Yoshida H, Hashii Y, Fukuzawa M: The use of tissue expanders to prevent the side effect of preoperative radiotherapy in pediatric malignant pelvic tumors. 44th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, London, UK, 2012
7. 大植 孝治, 奈良 啓吾, 山中 宏晃, 野村 元成, 上原 秀一郎, 福澤 正洋: 小児悪性固形腫瘍に対する新たな治療標的分子の検討. 第 112 回日本外科学会 2012.4.12-14 幕張
8. Que T, Fukuzawa M, Okita H, Horie H, Saito M, Nozaki M, Chin M, Nakadate N, Hinotsu S, Koshinaga T, Kaneko Y, Tanaka Y: Bilateral Wilms' tumors treated according to the Japan Wilms Tumor Study Group protocol. 45th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, Hong Kong, China, 2013
9. Nomura M, Uehara S, Que T, Usui N: Novel strategy for neuroblastoma with the combination of 13-cis-retinoic acid and inactivated Sendai virus particle. 14th Congress of the European Paediatric Surgeons' Association, Leipzig, Germany,

2013

10. 上原 秀一郎, 中畠 賢吾, 川津 美代子, 大植 孝治, 臼井 規朗: 無血清培養から抽出した胞巣型横紋筋肉腫幹細胞の生物学的特徴 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会 2013.11.29-12.1 福岡
11. 上原 秀一郎, 川津 美代子, 野村 元成, 奈良 啓吾, 上野 豪久, 曹 英樹, 大植 孝治, 臼井 規朗: 無血清培養より抽出した胞巣型横紋筋肉腫幹細胞様細胞の生物学的特徴. 第 113 回日本外科学会, 2013.4.11-13 福岡
12. 大植 孝治, 上原 秀一郎, 野村 元成, 上野 豪久, 奈良 啓吾, 曹 英樹, 臼井 規朗, 山中 宏晃, 福澤 正洋: 横紋筋肉腫細胞の浸潤能における Hedgehog シグナル系の関与. 第 50 回日本小児外科学会 2013.5.30-6.1 東京
13. 上原 秀一郎, 太田 秀明, 山本 佳史, 橋井 佳子, 大植 孝治, 福澤 正洋: 頬部横紋筋肉腫に対する集学的治療後 4 年で発生した耳下腺悪性腫瘍の 1 例. 第 55 回日本小児血液・がん学会 2013.11.29-12.1 福岡

〔図書〕(計 3 件)

1. 大植 孝治, スタンダード小児外科手術(田口智章、岩中 督監修) 腫瘍生検、58-61、縦隔腫瘍の手術、111-113、メジカルビュー社、2013
2. 大植 孝治, 系統小児外科学第3版(福澤正洋、中村哲郎、窪田昭男編), 病理組織検査法、72-74、分子標的治療、327-330、再生医療、331-336、腎芽腫、712-718、肝腫瘍、719-729、横紋筋肉腫、730-736、腓腫瘍、743-746、悪性リンパ腫、754-756、永井書店、2013
3. 大植 孝治, 小児外科診療ハンドブック(福澤正洋監修) 超音波検査、58-6、腫瘍生検、133-137, 肝芽腫、438-445、腎芽腫、

446-452、横紋筋肉腫、543-462、精巣腫瘍、476-481、医薬ジャーナル社、2014

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大植 孝治 (OUE, takaharu)

大阪大学・医学部・講師

研究者番号：5 0 3 1 4 3 1 5

(2) 研究分担者

福澤 正洋 (FUKUZAWA, Masahiro)

大阪大学・医学部・名誉教授

研究者番号：6 0 1 6 5 2 7 2

上原 秀一郎 (UEHARA, Shuichiro)

大阪大学・医学部・助教

研究者番号：0 0 4 4 8 0 6 0