

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390303

研究課題名(和文) Hedgehogシグナルネットワークを標的とした癌治療法開発

研究課題名(英文) Development of cancer therapy targeting Hedgehog signaling network

## 研究代表者

片野 光男 (KATANO, Mitsuo)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10145203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌：悪性度が高く、標準治療のない神経内分泌腫瘍の1つであるLarge cell neuroendocrine carcinoma(LCNEC)にTrkB/BDNFシグナル系が高活性化し、治療標的となり得ることを見出した。乳癌：CD24分子がHhシグナル系のligandであるShhを制御し乳癌悪性形質誘導を制御する可能性を見出した。胆嚢癌：Hhシグナル系の再活性化を確認し新たな治療標的としての可能性を見出した。膵癌：低酸素環境からの再酸素化による悪性形質誘導にHhシグナル系が関与していることを明らかにした。大腸癌：Gli3活性化経路が大腸癌の新たな治療標的経路となることを見出した。

研究成果の概要(英文)：1)Lung cancer:In Large cell neuroendocrine carcinoma(LCNEC) which is one of neuroendocrine tumors, has high potential of malignancy and there is no standard chemotherapy, TrkB/BDNF signaling is highly activated and can be a therapeutic target. 2)breast cancer:we showed that CD24 molecule regulates Shh that is a ligand of Hh signaling pathway and induces malignant phenotype in breast cancer.3)gallbladder cancer:we confirmed that Hh signaling is activated and it can be a therapeutic target.4)pancreatic cancer:Hh signaling contributes to the reoxygenation-related malignant phenotype induction.5)colon cancer:we revealed that Gli3 pathway can be a new therapeutic target for colon cancer.

研究分野：分子生物学

キーワード：Hedgehogシグナル 悪性形質誘導 Gli1 TrkB/BDNFシグナル CD24分子 低酸素環境 増殖能 浸潤能

### 1. 研究開始当初の背景

2003年に、各種固形腫瘍（膵癌、肺癌、前立腺癌、胃癌、大腸癌など）における Hedgehog (Hh) シグナル系の再活性化が報告され (Pasca di Magliano M and Hebrock M: Nat Rev Cancer 3:903-911, 2003)、国レベルで Hh シグナル阻害剤開発競争が進行中である (Mas C and Ruiz I Altaba A: Biochem Pharmacol, 2010)。2009年に入って有効性を支持する臨床試験の成果が報告され始めた (Von Hoff et al. N Engl J Med, 2009)。一方、大腸癌では期待された効果が得られなかったとの情報も得ている

(Personal communication)。我々は、最近、大腸癌においては Hh シグナル転写因子の一部が Hh シグナル非依存性に活性化していることや、癌腫により Hh シグナル系が他のシグナル系とネットワークを形成していることを見出している。この他のシグナル系とのネットワークは、他の研究者達によっても指摘され始めており (Stecca B et al. EMBO J, 2009; Nalan-Stevaux O et al. Genes Dev, 2009)、本研究 (Hh シグナルネットワーク解析) は Hh シグナル系を標的とした治療法を次のステップへ進展させる上で極めて重要である。

### 2. 研究の目的

我々は、乳癌における Hh シグナル系の再活性化を報告以来 (Kubo, Katano et al. Cancer Res, 2004)、各種固形癌における Hh シグナル系の生物学的機能を解析してきた (Nakashima, Cancer Res, 2006, Akiyoshi, GUT, 2006)。その結果、発癌および癌の進展の過程において Hh シグナル系が他のシグナル系と複雑なネットワーク (Hh シグナルネットワーク) を形成していることが明らかとなってきた。したがって、Hh シグナル系を標的とする治療法を確立するには、各種癌組織における Hh シグナルネットワークを可能な限り解析する必要性がでてきた。したがって、本研究の主目的は、「様々な固形癌組織における Hh シグナルネットワークを解析し、Hh シグナルネットワークを考慮した治療法開発を目指す」ことである。

### 3. 研究の方法

(1) Hh シグナルネットワークの癌細胞レベルでの解析：各種癌細胞における、Hh シグナルネットワークを DNA マイクロアレイおよび各種シグナル阻害剤を組み合わせる網羅的に解析し、細胞レベルでの Hh シグナルネットワークマップを作成する。Hh シグナルネットワークマップに基づいて、シグナル阻害剤、低分子 RNA 干渉および遺伝子導入を組み合わせ、各種 Hh シグナルネットワークの癌悪性化（増殖、コロニー形成、浸潤、抗癌剤抵抗性）に及ぼす機能を解析し、治療標的となる可能性の高いネットワーク、あるいは新規性の高いネットワーク

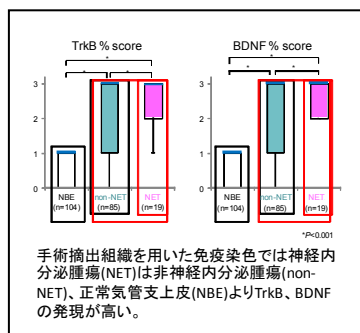
を選別する。

(2) Hh シグナルネットワークの癌組織レベルでの解析：治療標的 Hh シグナルネットワークを手術時摘出癌組織標本を用いて、半定量的蛍光免疫組織染色法、マイクロディスプレイ法、RT-PCR、western blot、in situ hybridization 法を組み合わせ、癌組織レベルで治療標的となりうる Hh シグナルネットワークを抽出し、治療用 Hh シグナルネットワークマップを作製する。

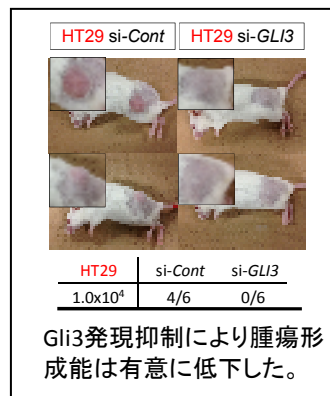
(3) Hh シグナルネットワークを標的とした治療実験：免疫不全マウス移植系を用いて、前年度に選別した Hh シグナルネットワークのうち、効果および新規性の高いシグナルネットワークから、順次、ネットワーク阻害 (シグナル阻害剤、低分子 RNA 干渉、遺伝子導入) による治療効果を検証する。

### 4. 研究成果

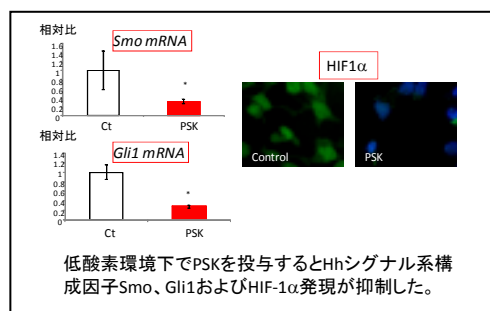
(1) 肺癌：Hh シグナル系の再活性化を確認した。新たに、悪性度が高く、標準治療のない神経内分泌腫瘍の 1 つである Large cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC) に治療標的となり得る TrkB/BDNF シグナル系の高活性化を見出した (業績 8, 9)。TrkB/BDNF シグナル系が Hh シグナル系とのネットワーク形成を示唆するデータを得つつある。



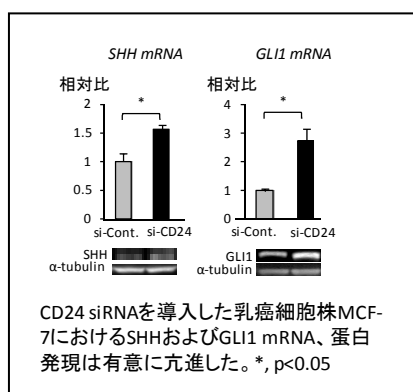
(2) 大腸癌：以前、大腸癌における Hh シグナル系活性化 (Gli1 を標的とした場合) は Wnt シグナル系とネットワークを形成していることを報告した。今回、大腸癌においては、Wnt シグナルとネットワークを形成しない Gli3 活性化経路が存在し、大腸癌の新たな治療標的経路となることを明らかにした (業績 7)。



(3) 膵癌：低酸素環境耐性の膵癌細胞株を2株樹立し、低酸素環境からの再酸素化における悪性形質誘導にHhシグナル系が関与していることを明らかにした(業績3)。さらに、カワラタケの抽出物で癌に対する免疫賦活剤として臨床使用されているPSKがHhシグナル系およびHIF-1 $\alpha$ シグナル系を抑制することで膵癌の悪性形質誘導を抑制している可能性を報告した(業績6)。



(4) 乳癌：CD24分子がHhシグナル系のligandであるShhを制御し、乳癌悪性形質誘導を抑制する可能性を見出した(論文投稿中)。



(5) 胆嚢癌：Hhシグナル系の再活性化を確認し、新たな治療標的としての可能性を見出した(業績2)。



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

① Onishi H, Katano M, The Hedgehog signaling pathway as a new therapeutic target in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 査読有, 20(9), 2014, 2335-2342.

doi: 10.3748/wjg.v20.i9.2335.

② Matsushita S, Onishi H, Nakano K, Nagamatsu I, Imaizumi A, Hattori M, Oda Y, Tanaka M, Katano M, The Hedgehog signaling pathway is a potential therapeutic target for gallbladder cancer. *Cancer Sci* 査読有, 105(3), 2014, 272-280.

doi: 10.1111/cas.12354.

③ Morifuji Y, Onishi H, Iwasaki H, Imaizumi A, Nakano K, Tanaka M, Katano M, Reoxygenation from chronic hypoxia promotes metastatic processes in pancreatic cancer through the Hedgehog signaling. *Cancer Sci* 査読有, 105(3), 2014, 324-333.

doi: 10.1111/cas.12348.

④ Onishi H, Morisaki T, Kiyota A, Koya N, Tanaka H, Umebayashi M, Katano M, The Hedgehog inhibitor suppresses the function of monocyte-derived dendritic cells from patients with advanced cancer under hypoxia. *Biochemical and Biophys Res Commun* 査読有, 436(1), 2013, 53-59.

doi: 10.1016/j.bbrc.2013.05.057.

⑤ Onishi H, Morisaki T, Kiyota A, Koya N, Tanaka H, Umebayashi M, Katano M, The Hedgehog inhibitor cyclopamine impairs the benefits of immunotherapy with activated T and NK lymphocytes derived from patients with advanced cancer. *Cancer Immunol Immunother* 査読有, 62(6), 2013, 1029-1039.

doi: 10.1007/s00262-013-1419-5.

⑥ Onishi H, Morisaki T, Nakao F, Odate S, Morisaki T, Katano M, Protein-bound polysaccharide decreases invasiveness and proliferation in pancreatic cancer by inhibition of hedgehog signaling and HIF-1 $\alpha$  pathways under hypoxia. *Cancer Lett* 査読有, 335(2), 2013, 289-298.

doi: 10.1016/j.canlet.2013.02.041.

⑦ Iwasaki H, Nakano K, Shinkai K, Kunisawa Y, Hirahashi M, Oda Y, Onishi H, Katano M, Hedgehog Gli3 activator signal augments tumorigenicity of colorectal cancer via up-regulation of adherence-related genes. *Cancer Sci* 査読有, 104(3), 2013, 328-336.

doi: 10.1111/cas.12073.

⑧ Odate S, Nakamura K, Onishi H, Kojima M, Uchiyama A, Nakano K, Kato M, Tanaka M, Katano M, TrkB/BDNF signaling pathway is a potential

therapeutic target for pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma. Lung Cancer 査読有, 79(3), 2013, 205-214.

doi: 10.1016/j.lungcan.2012.12.004.

- ⑨ Odate S, Onishi H, Nakamura K, Kojima M, Uchiyama A, Kato M, Katano M. Tropomyosine related kinase B inhibitor has potential for tumor regression and relapse prevention in pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma. Anticancer Research 査読有, 33(9), 2013, 3699-3703. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24023298>

[学会発表] (計 22 件)

- ① 大西 秀哉, 片野 光男. 低酸素環境における膵癌悪性化に対する治療法開発、2014年12月5日、第27回日本バイオセラピー学会学術集会総会、ナレッジキャピタルコングレコンベンションセンター (大阪府・大阪市)
- ② 巢山 久実, 大西 秀哉, 今泉 晃, 新海 健太郎, 久保 真, 田中 雅夫, 片野 光男. 乳癌細胞においてHh経路は、CD24-/low分画乳癌細胞の有効な治療標的となる、2014年12月4日、第27回日本バイオセラピー学会学術集会総会、ナレッジキャピタルコングレコンベンションセンター (大阪府・大阪市)
- ③ 大西 秀哉, 中島 洋, 亀田 千津, 山崎 章生, 片野 光男. 癌組織の生物学的特性を考慮した新規治療法の開発:Hedgehogシグナル系制御療法、2014年7月16日、第69回日本消化器外科学会総会、ホテルハマツ (福島県・郡山市)
- ④ 松下章次郎, 大西 秀哉, 新海 健太郎, 巢山 久実, 永松 伊織, 森藤 良浩, 岩崎 寛智, 中野 賢二, 田中 雅夫, 片野 光男. Hedgehog経路は胆嚢癌の治療標的となり得る、2014年4月5日、第114回日本外科学会定期学術集会、国立京都国際会館 (京都府・京都市)
- ⑤ 大西 秀哉, 森崎 隆史, 中尾 文彦, 尾立 西市, 森崎 隆, 片野 光男. 低酸素環境を考慮したPSKを用いた膵癌に対する治療法開発、2014年4月4日、第114回日本外科学会定期学術集会、国立京都国際会館 (京都府・京都市)
- ⑥ 巢山 久実, 大西 秀哉, 甲斐 昌也, 田中 晴生, 久保 真, 新海 健太郎, 永松 伊織, 松下 章次郎, 森藤 良浩, 今泉 晃, 田中 雅夫, 片野 光男. Hh経路制御による乳癌幹細胞制御療法の開発:CD24分子発現とHh経路活性化の連関解析、2014年4月4日、第114回日本外科学会定期学術集会、国立京都国際会館 (京都府・京都市)
- ⑦ 森藤 良浩, 大西 秀哉, 岩崎 寛智, 今泉 晃, 中野 賢二, 田中 雅夫, 片野 光男. ヘッジホッグシグナルは、膵癌の浸潤、転移に対する治療標的となりうる、2014年4月4日、第114回日本外科学会定期学術集会、国立京都国際会館 (京都府・京都市)
- ⑧ 大西 秀哉, 森崎 隆, 清田 章文, 梅林 雅代, 古屋 雄大, 田中 裕人, 片野 光男. Hedgehogシグナル阻害剤は活性化リンパ球療法の効果を減弱する、2013年12月5日、第26回日本バイオセラピー学会学術集会総会、いわて県民情報交流センター (岩手県・盛岡市)
- ⑨ 松下章次郎, 大西 秀哉, 新海 健太郎, 巢山 久実, 永松 伊織, 森藤 良浩, 岩崎 寛智, 中野 賢二, 田中 雅夫, 片野 光男. Hedgehog経路は胆嚢癌の治療標的となり得る、2013年12月5日、第26回日本バイオセラピー学会学術集会総会、いわて県民情報交流センター (岩手県・盛岡市)
- ⑩ 森藤 良浩, 大西 秀哉, 岩崎 寛智, 今泉 晃, 中野 賢二, 田中 雅夫, 片野 光男. 慢性低酸素環境からの再酸素化 (reoxygenation) により、ヘッジホッグシグナルを介して膵癌細胞の悪性度が増強する、2013年12月5日、第26回日本バイオセラピー学会学術集会総会、いわて県民情報交流センター (岩手県・盛岡市)
- ⑪ 巢山 久実, 大西 秀哉, 甲斐 昌也, 田中 晴生, 久保 真, 永松 伊織, 今泉 晃, 田中 雅夫, 片野 光男. 乳癌細胞におけるCD24分子発現とHh経路活性化の連関の解析、2013年12月5日、第26回日本バイオセラピー学会学術集会総会、いわて県民情報交流センター (岩手県・盛岡市)
- ⑫ 大西 秀哉, 中島 洋, 山崎 章生, 片野 光男. 膵癌組織の生物学的特性を基盤とする治療法の開発:Hedgehogシグナル系制御療法、2013年4月11日、第113回日本外科学会定期学術集会、福岡サンパレス (福岡県・福岡市)
- ⑬ 森藤 良浩, 大西 秀哉, 新海 健太郎, 巢山 久実, 永松 伊織, 松下 章次郎, 岩崎 寛智, 尾立 西市, 久保 真, 中村 勝也, 今泉 晃, 中野 賢二, 田中 雅夫, 片野 光男. 膵癌転移巣での悪性度亢進に果たすHedgehogシグナル経路の役割、2013年4月11日、第113回日本外科学会定期学術集会、福岡サンパレス (福岡県・福岡市)
- ⑭ 松下章次郎, 大西 秀哉, 巢山 久実, 新海 健太郎, 森藤 良浩, 永松 伊織, 岩崎 寛智, 尾立 西市, 中野 賢二, 田中 雅夫, 片野 光男. 膵癌のTransforming growth factor- $\beta$ 1による浸潤能亢進に関与するPI3K-Akt経路:抑

- 制経路としての可能性、2013年4月11日、第113回日本外科学会定期学術集会、福岡サンパレス（福岡県・福岡市）
- ⑮ 巢山 久実、大西 秀哉、甲斐 昌也、田中 晴生、新海 健太郎、松下 章次郎、永松 伊織、森藤 良浩、尾立 西市、岩崎 寛智、今泉 晃、田中 雅夫、片野 光男. 乳癌細胞におけるCD24分子を介したHedgehog経路制御の可能性、2013年4月11日、第113回日本外科学会定期学術集会、福岡サンパレス（福岡県・福岡市）
- ⑯ 岩崎 寛智、中野 賢二、新海 健太郎、巢山 久実、森藤 良浩、松下 章次郎、永松 伊織、尾立 西市、平橋 美奈子、小田 義直、大西 秀哉、片野 光男. 大腸癌腫瘍形成能におけるHedgehog-Gli3シグナルの役割、2013年4月11日、第113回日本外科学会定期学術集会、福岡サンパレス（福岡県・福岡市）
- ⑰ 尾立 西市、中村 勝也、巢山 久実、新海 健太郎、松下 章次郎、森藤 良浩、永松 伊織、岩崎 寛智、大西 秀哉、内山 明彦、中野 賢二、加藤 雅人、田中 雅夫、片野 光男. TrkB/BDNFシグナル経路の肺大細胞神経内分泌癌治療標的としての可能性、2013年4月11日、第113回日本外科学会定期学術集会、福岡サンパレス（福岡県・福岡市）
- ⑱ 大西 秀哉、森崎 隆史、中尾 文彦、尾立 西市、森崎 隆、片野 光男. PSKは低酸素環境における膀胱癌増殖能・浸潤能をHIF-1 $\alpha$ およびHedgehog経路の抑制により制御する、第5回福岡県医学会総会、2013年2月3日、福岡県医師会館（福岡県・福岡市）
- ⑲ 森藤 良浩、大西 秀哉、新海 健太郎、巢山 久実、永松 伊織、松下 章次郎、岩崎 寛智、尾立 西市、久保 真、中村 勝也、今泉 晃、中野 賢二、田中 雅夫、片野 光男. reoxygenationによる膀胱癌悪性化にHedgehog経路が関与する、2012年12月14日、第25回日本バイオセラピー学会学術集会総会、倉敷市芸文館（岡山県・倉敷市）
- ⑳ 巢山 久実、大西 秀哉、甲斐 昌也、田中 晴生、新海 健太郎、松下 章次郎、森藤 良浩、永松 伊織、尾立 西市、岩崎 寛智、今泉 晃、田中 雅夫、片野 光男. CD24-乳癌細胞は、Hedgehog経路を介して浸潤能、腫瘍形成能に関与する、2012年12月13日、第25回日本バイオセラピー学会学術集会総会、倉敷市芸文館（岡山県・倉敷市）
- ㉑ 大西 秀哉、森崎 隆史、中尾 文彦、森藤 良浩、岩崎 寛智、片野 光男. PSKは低酸素環境において、HIF-1 $\alpha$ およびHedgehog pathwayの抑制により膀胱癌悪性化を制御する、2012年12

月13日、第25回日本バイオセラピー学会学術集会総会、倉敷市芸文館（岡山県・倉敷市）

- ㉒ 尾立 西市、中村 勝也、新海 健太郎、巢山 久実、松下 章次郎、森藤 良浩、永松 伊織、岩崎 寛智、大西 秀哉、内山 明彦、加藤 雅人、田中 雅夫、片野 光男. 神経栄養因子受容体TrkBは肺大細胞神経内分泌癌の治療標的となり得る、2012年12月13日、第25回日本バイオセラピー学会学術集会総会、倉敷市芸文館（岡山県・倉敷市）

〔その他〕

ホームページ等

九州大学大学院医学研究院 先端医療医学部門 腫瘍制御学分野

<http://www.tumor.med.kyushu-u.ac.jp/>

## 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

大西 秀哉 (ONISHI, Hideya)

九州大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：30553276

中野 賢二 (NAKANO, Kenji)

九州大学・先端融合医療レドックスナビ

研究拠点・教授

研究者番号：00315061

田中 雅夫 (TANAKA, Masao)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：30163570

小田 義直 (ODA, Yoshinao)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：70291515

野村 政壽 (NOMURA, Masatoshi)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：30315080

中村 勝也 (NAKAMURA, Katsuya)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：60585743