

論文要旨

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

(Hedgehog シグナル制御による横紋筋肉腫の腫瘍増殖抑制効果)

川畑 直也

【序論および目的】

Hedgehog は胎生期の形態形成に関与する重要な morphogen である。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 PTCH1 は細胞膜貫通型蛋白である Smoothed (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。また、成人での悪性腫瘍との関連もあり、乳癌、肺癌、前立腺癌、B cell malignant lymphoma などの悪性腫瘍の発生原因の一つとして Hedgehog pathway の異常活性化が関与していることが報告されている。最近の研究で Hedgehog の PTCH1 遺伝子の mutation が横紋筋肉腫の発生への関与が報告されている。しかしながら、ヒト横紋筋肉腫細胞における Hedgehog 関連遺伝子の詳細な機能は不明である。今回われわれは、ヒト横紋筋肉腫における Hedgehog シグナル関連遺伝子の発現と Hedgehog シグナル阻害剤による腫瘍増殖抑制効果について検討した。

【材料および方法】

ヒト横紋筋肉腫細胞株 (RD, KYM-1, RMS-YM, A204) および横紋筋肉腫患者生検組織を用いて Hedgehog 関連遺伝子 Sonic Hedgehog (SHH), Indian Hedgehog (IHH), Desert Hedgehog (DHH), PTCH1, SMO, GLI1, GLI2, ULK3 の発現を定量的 PCR で検討した。また Hedgehog 関連蛋白 (SMO, GLI2) の発現をヒト横紋筋肉腫細胞株および横紋筋肉腫患者生検組織を用いて免疫染色で検討した。さらに、SMO inhibitor である Cyclopamine や GLI inhibitor

である GANT61 を使用し、腫瘍増殖抑制効果を WST assay で、細胞分裂抑制効果を BrdU cell proliferation assay で、細胞死について cell death detection assay を用いて検討した。

【結 果】

定量的 PCR にてヒト横紋筋肉腫細胞株で SHH が 2.8-10.0 倍、IHH が 5.9-13.2 倍、DHH が 4.6-55.6 倍、PTCH1 が 4.4-128.0 倍、GLI1 が 2.0-19.8 倍、GLI2 が 2.3-9.4 倍、SMO が 1.7-4.0 倍、ULK3 が 1.5-12.1 倍と Hedgehog 関連遺伝子の発現上昇を認め、横紋筋肉腫患者生検組織では、PTCH1 が 22.0-29.5 倍、SMO が 783.3-74588.6 倍、GLI1 が 19.7-312.3 倍、GLI2 が 2.3-36.1 倍、ULK3 が 1.6-36.5 倍と Hedgehog 関連遺伝子の発現上昇を認めた。免疫組織学的にヒト横紋筋肉腫細胞株と横紋筋肉腫患者生検組織で正常筋芽細胞、正常筋組織と比較して SMO や GLI2 タンパクの発現が上昇しており、SMO は細胞質や細胞膜に存在し、GLI2 は核内に存在した。また、KYM-1, RMS-YM, RD において 20 μ M Cyclopamine 投与により有意に腫瘍細胞増殖抑制効果を認め ($p < 0.01$)、GANT61 投与において KYM-1, RMS-YM, RD では、それぞれ 15 μ M, 20 μ M, 10 μ M で腫瘍増殖抑制効果を認めた ($p < 0.01$)。cell proliferation assay において KYM-1 で 10 μ M cyclopamine, 15 μ M GANT61 で有意に細胞分裂抑制を ($p < 0.05$)、RMS-YM で 10 μ M cyclopamine, 25 μ M GANT61 で有意に細胞分裂抑制を認めた ($p < 0.05$)。cell death detection assay において KYM-1 で 15 μ M GANT61、RMS-YM で 10 μ M cyclopamine で有意に細胞死を認めた ($p < 0.05$)。これらの結果は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。

【結論及び考察】

Hedgehog シグナル関連遺伝子がヒト横紋筋肉腫で高発現していることが明らかとなった。Hedgehog シグナル阻害薬である Cyclopamine や GANT61 により横紋筋肉腫の細胞増殖を抑制し得ることを見出した。横紋筋肉腫において Hedgehog シグナル阻害薬が細胞分裂抑制と細胞死誘導による 2 つの効果でヒト横紋筋肉腫の成長を抑制すると考える。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。

論文審査の要旨

報告番号	医論第 1482 号	氏名	川畑 直也
審査委員	主査	夏越 祥次	
	副査	河野 嘉文	古川 龍彦

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

(Hedgehog シグナル制御による横紋筋肉腫の腫瘍増殖抑制効果)

Hedgehog は胎生期の形態形成に関与する重要な morphogen である。また、乳癌、肺癌、前立腺癌、B cell malignant lymphoma などの悪性腫瘍の発生原因の一つとして Hedgehog pathway の異常活性化が関与していることが報告されている。最近の研究で Hedgehog の PTCH1 遺伝子の mutation が横紋筋肉腫の発生に関与すると報告されている。しかしながら、ヒト横紋筋肉腫細胞における Hedgehog 関連遺伝子の詳細な機能は不明である。今回、申請者は、ヒト横紋筋肉腫における Hedgehog シグナル関連遺伝子の発現と Hedgehog シグナル阻害剤による腫瘍増殖抑制効果について検討し、以下の知見が明らかになった。

- ① ヒト横紋筋肉腫細胞株 (RD, KYM-1, RMS-YM, A204) および横紋筋肉腫患者生検組織を用いて Hedgehog 関連遺伝子の発現を定量的 PCR で検討し、Hedgehog 関連遺伝子の発現上昇を認めた。
- ② Hedgehog 関連蛋白 (SMO, GLI2) の発現をヒト横紋筋肉腫細胞株および横紋筋肉腫臨床検体を用いて免疫染色で検討した。正常筋芽細胞や正常筋組織と比較して SMO や GLI2 タンパクの発現が上昇しており、SMO は細胞質や細胞膜に存在し、GLI2 は核内に存在した。横紋筋肉腫では SMO や GLI2 が活性化していることを認めた。
- ③ SMO inhibitor である Cyclopamine や GLI inhibitor である GANT61 を使用し、腫瘍増殖抑制効果を WST assay で検討した。その結果 Cyclopamine や GANT61 を投与することにより有意に細胞増殖抑制効果を認めた。
- ④ 細胞分裂抑制効果を BrdU cell proliferation assay で検討した結果、Cyclopamine や GANT61 を投与することにより、有意に細胞分裂抑制効果を認めた。細胞死について cell death detection assay を用いて検討した結果、Cyclopamine や GANT61 を投与することにより有意に細胞死を認めた。これらの結果より、細胞分裂抑制と細胞死誘導による細胞増殖抑制が起こっていると考えられた。

以上より、ヒト横紋筋肉腫において Hedgehog シグナルの活性化を確認した。Hedgehog シグナル阻害剤である Cyclopamine や GANT61 により横紋筋肉腫の細胞増殖を抑制し得ることを見出した。横紋筋肉腫において Hedgehog シグナル阻害剤が細胞分裂抑制と細胞死誘導による 2 つの効果でヒト横紋筋肉腫の成長を抑制すると考える。本研究は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た点で非常に興味深い。

よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論第 1482 号	氏名	川畑 直也
審査委員	主査	夏越 祥次	
	副査	河野 嘉文	古川 龍彦

主査および副査の3名は、平成24年1月5日、学位請求者 川畑直也君に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 正常筋芽細胞 (HSKMC) はどのように入手したか。
 (回答) 自分で作成したものではなく、市販されているものを使用した。

質問2) 横紋筋肉腫細胞株の由来、組織型は何か。
 (回答) RD、RMS-YM は胎児型で KYM-1、A204 は未分化型である。

質問3) 胎児型と未分化型に何か差があるか。
 (回答) 今回は型による差は検討していませんが、明らかな違いはないように思われる。

質問4) 正常筋組織に側弯症の検体を使用しているがどのような検体か。
 (回答) 10歳代の小児側弯症の検体である。

質問5) 横紋筋肉腫臨床検体の年齢は何歳か。
 (回答) 6歳と9歳の小児である。

質問6) Hedgehog に関連する悪性腫瘍はいろいろあるが、横紋筋肉腫を選択した理由はなにか。
 (回答) 乳癌、肺癌、前立腺癌などが報告されているが、整形外科領域に関連するものとして横紋筋肉腫を選択した。

質問7) 年長児の横紋筋肉腫は年少児とは予後が異なると思われるが、今回の実験で年齢による予後の違いを説明するデータはあったか。
 (回答) 今回の実験では説明できるデータはなかった。

質問8) ULK3 とはなにか。
 (回答) GLI の転写活性因子の1つであり、自己リン酸化されるキナーゼで GLI タンパク質をリン酸化し、過剰発現された GLI 転写活性を増強する。

質問9) 各細胞株で Hedgehog カスケードの分子についての遺伝子の変異はわかっているのか。
 (回答) 各遺伝子の変異については現在のところわかっていない。

質問10) それぞれの遺伝子発現の制御の仕組みはわかっているのか。
 (回答) Hedgehog の発現を制御するシグナルは不明である。GLI、PTCH1 は Hedgehog シグナルが活性化されると GLI の下流で転写が活性化される。GLI の転写は TGF- β のシグナルの下流でも活性化することが報告されている。

質問11) GLI の下流で発現する遺伝子の発現が上昇していることは確認しているか。
 (回答) GLI の下流で発現する分子は PTCH1、GLI1、GLI2 でその転写は上がっている。

質問12) Inhibitor の実験で KYM-1、RD、RMS-YM の3種類を使用しているが A204 を使わなかった理由はあるのか。
 (回答) 特にない。

質問13) cyclopamine、GANT61 の濃度は高いが、薬剤毒性ではなく特異的にカスケードに効いていることをみているのか。

(回答) 濃度が高いと他のシグナルに作用する可能性はあるが、GANT61 の場合、今回の濃度で正常間葉系細胞に投与しても細胞増殖抑制作用はなかった。この濃度で少なくとも PTCH1 や GLI などの GLI のターゲット遺伝子の発現は抑制された。

質問 1 4) 増殖抑制効果について ERK など他のシグナルについて検討したか。

(回答) 今回は検討していない。

質問 1 5) SHH、DHH、IHH の 3 種類のサブタイプは臓器毎に特性が違うのか。

(回答) Hedgehog family は発生や分化にかかわる遺伝子として非常に重要であり、臓器によって発現が異なっている。ノックアウトマウスでの結果の違いは、発現が臓器によって違うからと考える。

質問 1 6) 横紋筋肉腫は間葉系だが、間葉系細胞を用いる場合は EMT (epithelial mesenchymal transition) のような要素が関係しているのか。

(回答) 間葉系細胞なので、形の変化はないが、Hedgehog シグナルを阻害すると、骨肉腫においては、運動機能が低下したり、浸潤能が低下する。

質問 1 7) 骨肉腫の実験で SMO と GLI2 の抑制が効果あるとされているが、今回の一連の実験で横紋筋肉腫に対し関与があると思われる部分はどこだと思うか。

(回答) 横紋筋肉腫に関しても SMO、GLI2 の関連は高いと思われる。SMO と GLI2 どちらがといわれると、治療に関しては SMO よりもさらに下流の GLI2 で抑制したほうが効果があると考えられる。

質問 1 8) 膵臓癌では hypoxia と腫瘍化・悪性化の関連が言われているが、横紋筋肉腫ではどうか。

(回答) 横紋筋肉腫と hypoxia との関連は不明である。

質問 1 9) 阻害剤使用時に起こるアポトーシスの機序についてはどうか。

(回答) 今回、横紋筋肉腫では検討していないが、骨肉腫においては G1 arrest を起こしている。横紋筋肉腫に関してもその可能性が考えられるが、今後の検討が必要である。

質問 2 0) Cyclopamine や GANT61 は臨床で使われているか。

(回答) Cyclopamine に関してはアメリカで臨床治験が行われたが、side effect が強く中止となった。GANT61 は臨床で使われていない。現在海外で cyclopamine や GANT61 よりもより安全と思われる薬剤で臨床治験が行われている。

質問 2 1) Cancer stem cell についてはどうか。

(回答) いろいろな癌で関連が言われているが、骨肉腫や横紋筋肉腫についても関連性があるのではと考えられ、今後検討が必要である。

質問 2 2) 横紋筋肉腫以外の病的に small round cell sarcoma と言われる小児の肉腫に関して Hedgehog family の研究はされているのか。

(回答) 現在のところそれに関する研究はみあたらない。

質問 2 3) 膵臓癌に関して hypoxia から normoxia になる時、Hedgehog family や SMO、GLI1、GLI2 などが転移に関係していると言われているが、今回の細胞は転移巣からのものはなかったか。

(回答) 横紋筋肉腫も転移を認めるが、今回は転移巣の組織は用いなかった。

質問 2 4) Cell line によってメッセンジャー RNA の発現に違いがあったが、その違いによって阻害剤の効果の違いがあったのか。

(回答) 今回は検討していないが、今後の検討課題と思われる。

質問 2 5) 臨床検体の免疫染色で染まり方のばらつきはなかったか。

(回答) 腫瘍部分でも染まるところと染まらないところがあり、ばらつきは認められた。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。