

論 文 要 旨

Role of GLI2 in the growth of human osteosarcoma

GLI2 は骨肉腫の増殖能に関与している

永 尾 宗 子

【序論および目的】 (適宜、項目をたてて、必ず2頁で記載する)

Hedgehog シグナルは、胎生期の形態形成において重要な役割を果たす細胞情報伝達経路で、ハエなどの無脊椎動物から高等な脊椎動物まで広く保存されている。近年、Hedgehog シグナルの異常が器官形成不全だけでなく、様々な腫瘍の悪性形質とも関連があることが報告されている。また、Hedgehog シグナルは他の癌種において治療標的として注目を集めているだけでなく、骨肉腫の特性に深く関わっている Wnt pathway や p53 との関連報告があることから、骨肉腫の治療ターゲットとしても期待できる。しかし、骨肉腫における Hedgehog シグナルの研究報告は少なく、その機能や役割についての詳細は不明である。

当研究室では、これまでに Hedgehog シグナル構成因子である SMO の発現を抑制すると *in vitro*、*in vivo* において骨肉腫増殖能を抑制し得ることを明らかとしてきた。そこで、本研究では当該シグナル下流の転写因子である GLI2 に着目し、骨肉腫における GLI2 の機能解析及び GLI2 を標的とした骨肉腫治療の可能性について検討を行っている。

【材料および方法】

骨肉腫臨床検体及び細胞株における Hedgehog シグナル関連因子 (PTCH1, SMO, GLI1, GLI2 など) の発現解析には、リアルタイム PCR 法を用いた。その際、骨肉腫臨床検体のコントロールには正常骨を、細胞株のコントロールには正常骨芽細胞株を使用した。また、GLI-luc レポーターを用いたルシフェラーゼアッセイにより、骨肉腫細胞株における Hedgehog シグナルの活性化を評価した。

そして、骨肉腫細胞株における GLI2 の機能解析を行うため、GLI が高発現していた骨肉腫細胞株に対して、GLI 阻害剤である GANT61 の処理を行い、腫瘍増殖抑制効果を MTT assay により評価した。さらに、GLI2 RNAi 処理により、GLI2 の発現を抑制した後 MTT assay やコロニーフォーメーションアッセイを行い、腫瘍増殖抑制効果や足場非依存性増殖抑制効果の検討を行った。そして、GLI2 発現抑制による腫瘍増殖抑制効果のメカニズムを明らかにするため、細胞周期との関連性を検討した。まず、GLI2 の発現を抑制した骨肉腫細胞株においてリアルタイム PCR やウェスタンブロット法を行い、細胞周期関連遺伝子及びタンパク質 (cyclin D1, SKP2, pRB, p21 など) の発現変動の解析を行った。さらに、フローサイトメトリーを用いた細胞周期の解析も行った。

上述の loss-of-function の実験に加え、gain-of-function の実験には恒常活性型 GLI2 (GLI2-deltaN) を強制発現させた間葉系幹細胞株を使用し、細胞増殖促進効果や細胞周期解析を行った。

次に、*in vivo* においても検討を行った。GLI2 shRNA あるいはコントロール shRNA をトランスフェクションした骨肉腫細胞株を、それぞれヌードマウスの皮下に移植し経過を観察した。皮下にできた腫瘍の大きさは毎週測定し、カプラン・マイヤー法によりそれぞれのマウスの生存曲線を算出した。

【結果】

リアルタイム PCR 法の解析から、正常骨と比較して骨肉腫臨床検体では、PTCH1,SMO,GLI2 の発現が有意に上昇していることが分かった。さらに、2 種類の骨肉腫細胞株においてルシフェラーゼアッセイを行った結果、Hedgehog シグナルが活性化していることを確認した。そこで、骨肉腫細胞株を GLI 阻害剤 (GANT61) で処理すると、有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた。さらに、RNAi を用いて GLI2 の発現を抑制した骨肉腫細胞株では、腫瘍増殖能や足場非依存性増殖能が抑制されることを確認した。

次に、GLI2 の発現を抑制した骨肉腫細胞株では、細胞周期の正の制御因子である cyclinD1、SKP2、pRb の発現が低下しており、負の制御因子である p21 の発現が上昇していることが明らかとなった。また、フローサイトメトリーを用いた細胞周期解析から、GLI2 の発現抑制により骨肉腫細胞株は、G1 arrest を起こしていることを確認した。

一方、GLI2-deltaN を強制発現させた間葉系幹細胞株では、増殖能が有意に促進し細胞周期は正に制御されていることが分かった。

さらに、GLI2 shRNA を遺伝子導入した骨肉腫細胞株を移植したマウス群では、コントロール群と比較して腫瘍増殖速度の有意な低下と生存期間の延長を認め、*in vivo* においても GLI2 発現抑制による骨肉腫増殖抑制効果を確認した。

【結論及び考察】

骨肉腫は、原発性骨悪性腫瘍のなかで最も罹患者数が多く、極めて悪性な腫瘍である。最近では、化学療法や手術法の向上に伴い 5 年生存率は改善してきたものの、再発や転移を生じた場合予後が非常に悪いいため、これら癌悪性形質の抑制を視野に入れた新規治療法の開発が望まれている。

本研究では骨肉腫における GLI2 の機能解析を行い、その結果、①GLI2 は骨肉腫で高発現している、②GLI2 の機能や発現を抑制すると、*in vitro* 及び *in vivo* において骨肉腫増殖能が有意に抑制される、③骨肉腫増殖のメカニズムの一因として、GLI2 が骨肉腫細胞の細胞周期に関与している、ことを明らかとした。これらの結果は、GLI2 が骨肉腫の新規治療標的分子となり得ることを示唆している。よって今後は、骨肉腫の転移能における GLI2 の機能についても詳細な解析を進め、骨肉腫の転移抑制治療の標的としての有用性の評価も必要であると考えている。さらに、上述のような基礎的な研究と並行して、より迅速に臨床へ応用するため既存の臨床薬剤を用いて Hedgehog シグナルを標的とした治療薬のスクリーニング、及びその作用機序についても研究を進める予定である。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 199 号	学位申請者	永尾 宗子
審査委員	主査	夏越 祥次	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	河野 嘉文	副査 古川 龍彦
	副査	小賤 健一郎	副査 岸田 昭世

Role of GLI2 in the growth of human osteosarcoma

(GLI2 はヒト骨肉腫の増殖能に関与している)

Hedgehog シグナルは細胞の分化、増殖及び成長など脊椎動物の発生過程において重要なシグナルであることが知られている。Hedgehog シグナルの伝達機構としては以下のことが分かっている。リガンドである Hedgehog (SHH, IHH, DHH) と Patched-1 (PTCH1) レセプターとの結合により、PTCH1 の Smoothed (SMO) に対する抑制的な効果がなくなり、活性化した SMO により転写因子 glioma-associated oncogene homolog (GLI) に至るシグナル経路が活性化し標的遺伝子が転写される。近年、Hedgehog シグナルが、悪性腫瘍とも関連があることが報告されており、申請者らは以前 SMO が骨肉腫の増殖能に関与していることを明らかとしている。そこで本研究で申請者らは、Hedgehog シグナル下流の転写因子である GLI2 に着目し、骨肉腫における GLI2 の機能解析を行った。はじめに、ヒト骨肉腫細胞株及び臨床検体における Hedgehog シグナル関連因子の発現及び GLI の転写活性を real-time RT-PCR 法やルシフェラーゼアッセイにより評価した。そして、GLI2 阻害剤や GLI2 RNAi を用いた増殖抑制効果を MTT assay やコロニーフォーメーションアッセイにより評価した。さらに、GLI2 制御による骨肉腫増殖抑制効果のメカニズム解析のために細胞周期の解析を行った。そして、GLI2 の loss-of-function の実験系に加え、恒常活性型 GLI2 を用いた gain-of-function の実験も行った。また、*in vivo* における腫瘍増殖抑制効果の検討も行った。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) 骨肉腫の臨床検体の組織では PTCH1、SMO、GLI2 mRNA の発現が有意に上昇していた。また、骨肉腫細胞株 (143B 細胞、Saos-2 細胞) を rSHH で刺激すると GLI の転写活性が認められた。
- 2) 骨肉腫細胞株 (143B 細胞、Saos-2 細胞、HOS 細胞) を GLI 阻害剤 (GANT61) で処理すると、有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた。さらに、RNAi を用いて GLI2 の発現を抑制した骨肉腫細胞株では、腫瘍増殖能や足場非依存性増殖能が抑制された。
- 3) GLI2 の発現を抑制した骨肉腫細胞株 (143B 細胞) は、G1 arrest を起こしていることが明らかとなった。さらに、細胞周期の正の制御因子 (cyclinD1、SKP2、リン酸化 Rb) の発現の低下と、負の制御因子 (p21) の発現の上昇が認められた。
- 4) 恒常活性型 GLI2 を強制発現させた間葉系幹細胞 (YKNK-12 細胞) では、細胞の増殖能が有意に亢進し細胞周期は正に制御されていた。
- 5) ノードマウスに GLI2 shRNA を遺伝子導入した骨肉腫細胞株を移植した実験系では、対照群と比較して有意な腫瘍成長の抑制と生存期間の延長が認められた。

申請者らは骨肉腫における GLI2 の機能解析を行った結果、骨肉腫で高発現していた GLI2 の発現を抑制すると骨肉腫の腫瘍増殖能力が抑制されること、GLI2 は骨肉腫の細胞周期を制御していることを明らかにした。これらの結果は、GLI2 が骨肉腫の新規治療標的分子となり得ることを示唆しており、今後、GLI2 が骨肉腫の転移抑制標的分子の有用性について、評価を進める必要がある。

本研究は、骨肉腫細胞増殖の分子機構の解明だけでなく、骨肉腫新規治療法の開発のための基礎的情報を提供したと言える。よって、本論文は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 199 号		学位申請者	永尾 宗子
審査委員	主査	夏越 祥次	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	河野 嘉文	副査	古川 龍彦
	副査	小賤 健一郎	副査	岸田 昭世
<p>主査および副査の5名は、平成24年6月25日、学位申請者 永尾 宗子 君に面接し、学位申請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。</p> <p>質問1) MTT assay で、seed した細胞数は？ (回答) 143B 細胞は 5×10^2 cells/100 μl/well であり、Saos-2 細胞、HOS 細胞、NHOst 細胞、YKNK-12 細胞は 1×10^3 cells/100 μl/well の条件で播種している。</p> <p>質問2) NHOst 細胞において増殖能が見られるが (Fig.2) GLI との関連は？ (回答) 免疫染色を行った結果、NHOst 細胞で GLI2 の発現は認められなかった。</p> <p>質問3) 軟寒天培地で NHOst 細胞はコロニーを形成するのか？ (回答) NHOst 細胞に対してコロニーフォーメーションアッセイは行なわなかったが、正常骨芽細胞なので足場非依存性増殖能が低くコロニーは形成しないと考えられる。</p> <p>質問4) 143B 細胞や Saos-2 細胞で Hedgehog pathway 以外の、増殖に関与するシグナルカスケードはみているか？ (回答) Notch pathway を抑制するとこれらの骨肉腫細胞株の増殖が抑制することを確認している。</p> <p>質問5) Fig.4c で Rb タンパク質のリン酸化の変化を見ているが、Rb タンパク質自体の発現量に変化はあるか？ (回答) Rb タンパク質の発現量に変化は見られなかった。</p> <p>質問6) GLI2 の発現を抑制した 143B 細胞で、細胞周期関連遺伝子やタンパク質の発現の変化を見ているが、p53 の発現の解析は行っているのか？ (回答) 今回の実験では検討を行っていないが、今後検討していきたい。</p> <p>質問7) 143B 細胞や Saos-2 細胞の p53 の遺伝子型は知られているのか？ (回答) 143B 細胞では p53 の変異、Saos-2 細胞では p53 の欠損が報告されている。</p> <p>質問8) YKNK-12 細胞における Hedgehog pathway 関連因子の発現は？ (回答) Real-time RT-PCR 法や Western blotting 法の解析では、Hedgehog pathway 関連因子 (PTCH1、SMO、GLI2) の発現は認められなかった。</p> <p>質問9) GANT61 の <i>in vivo</i> 実験は行っていないのか？ (回答) 骨肉腫細胞株を移植したヌードマウスに対して GANT61 の投与 (50 mg/kg) を行ったが、有意な腫瘍増殖抑制効果は認められなかった (Supplementary Fig.1)。</p> <p>質問10) GANT61 のヒトでの臨床試験は進んでいるのか？ (回答) GANT61 の臨床試験は未だ行われていない。</p> <p>質問11) GLI ファミリーの中で、なぜ GLI2 に着目したのか？ (回答) 腫瘍細胞において、GLI3 は主にリプレッサーとして働くことが知られているため、GLI1 と GLI2 を標的として研究を進めてきた。しかし GLI1 RNAi 処理を行った骨肉腫細胞株で増殖能や移動能に影響が見られなかったため、GLI2 に対して解析を進めた。</p> <p>質問12) Fig.2B で、GLI レポータープラスミドをトランスフェクションした骨肉腫細胞株に rSHH リガンドで刺激して GLI の転写活性を見ているが、その意図は？ (回答) 近年、TGF-β pathway の下流でも GLI の活性が報告されているので、今回使用した骨肉腫細胞株における GLI の活性が Hedgehog pathway の下流で起こっているかを確認するために行った。また、TGF-β のリガンド刺激により GLI の活性が認められないことも確認した。</p> <p>質問13) GANT61 の GLI に対する作用機構は？ (回答) GLI に直接結合し、GLI の転写活性を抑制する。</p> <p>質問14) GLI2 の発現抑制を行った実験系で、遺伝子導入法は stable か、それとも transient なものか？ (回答) MTT assay では、transient な遺伝子導入である。コロニーフォーメーションアッセイや細胞周期の解析、<i>in vivo</i> 実験では stable に GLI2 shRNA を発現させた細胞株を用いた。</p> <p>質問15) フローサイトメトリーを用いた細胞周期の解析で、G1、S、G2/M 期の有意差を出しているがその手法は？ (回答) 設定したゲート内の population の値を用いた。n=2 を 3 回行い t 検定で算出した。</p>				

最終試験の結果の要旨

質問 1 6) 間葉系幹細胞 (YKNK-12 細胞) に GLI2 Δ N を強制発現させて、増殖能への影響を見ているが、正常骨芽細胞 (NH0st 細胞) では、同様の実験は行っていないのか？

(回答) NH0st 細胞でも評価を行いたかったが、実験上扱いにくい細胞 (プラスミドのトランスフェクション効率が悪い、コロニーフォーメーションアッセイに不向き) だったので、検討を行っていない。

質問 1 7) GLI2 を標的とした治療を考えた場合、正常な細胞に対する影響が懸念されるが、将来的な展望は？

(回答) Fig.2 で GANT61 が正常骨芽細胞 (NH0st 細胞) には増殖能に影響を与えないことを確認しているが、その他の正常細胞に対しても解析していく必要があると考える。さらに、既存の臨床医薬を用いた骨肉腫増殖抑制薬の選別も行う予定である。

質問 1 8) 細胞周期解析に用いた stable に GLI2 shRNA を発現させた 143B 細胞株は、1 株だけか？

(回答) シングルコロニーをピックアップして作製した細胞株のうちで最も GLI2 のノックダウン効率が高かった細胞株、1 株のみを使用した。今後は、複数の細胞株を用いた検討が必要であると考えられる。

質問 1 9) 一次繊毛とは何かについて説明せよ。

(回答) 非運動性繊毛で、生体内の多くの細胞では一本だけ生えている。脊椎動物ではほとんどの細胞が一次繊毛を持つことが分かっており、センサーとして働く。一次繊毛が受容する情報は、光、浸透圧、機械的刺激、発生や器官形成、維持に必要なシグナル因子などがある。マーカーは acetylated tubulin である。

質問 2 0) ルシフェラーゼアッセイのキャリブレーションはどのようにしているのか？

(回答) GLI-luc プラスミドと重トランスフェクションしたコントロールレポーター (Renilla プラスミド) の活性を、遺伝子導入効率を表す内部標準とし、試験レポーター (GLI-luc) の活性をコントロールレポーターの活性値で補正した値を縦軸にプロットした。

質問 2 1) 今回解析した SKP はどのような働きをしていると考えられるか？

(回答) 骨肉腫細胞株において GLI2 の発現を抑制すると、細胞周期内の p21 のユビキチン化と分解を促進する SKP2 の発現抑制が認められた。よって、SKP2 は骨肉腫の増殖促進に関与しているのではないかと考えられる。

質問 2 2) 今回用いた検定は全て t 検定で正規分布データに対して行う手法だが、それで問題ないと思えるか？

(回答) stable に GLI2 shRNA を発現させた細胞株を用いて行った細胞周期の解析では、ノンパラメトリックな手法を用いる必要があったと思われる。

質問 2 3) *in vivo* 実験でヌードマウスを使用しているが、なぜ 5 週齢のマウスを使用したのか？

(回答) 一般に実験に使われる週齢は、マウス、ラットともに 5-6 週齢である。4-5 週齢で購入し、1-2 週間の予備観察期間を経て実験を開始するのが一般的である。

質問 2 3) Fig.1 で用いた骨肉腫臨床検体の情報は分かっているのか？

(回答) #10; 骨内通常型骨肉腫、女性、18 歳、発現部位: 大腿骨、転移なし #11; 骨内通常型骨肉腫、男性、24 歳、発現部位: 大腿骨、転移なし #12; 血管拡張性骨肉腫、男性、21 歳、発現部位: 大腿骨、転移なし、であった。

質問 2 4) *in vitro* の実験系よりも *in vivo* の実験系において、有意な増殖抑制効果が見られているが、その理由は？

(回答) 骨肉腫の増殖メカニズムには、その微小環境因子も大きく関連しているのではないかと考えられる。よって、今後は癌微小環境に関する研究も必要であると考えられる。

質問 2 5) 臨床応用を視野に入れた場合、今回の研究結果のように細胞周期を制御することは有用なことなのか？

(回答) 骨肉腫では、細胞周期の異常活性が認められているので、細胞周期を制御することは有用であると考えられる。

質問 2 6) 骨肉腫細胞株で GLI2 の発現を抑制したときに、アポトーシスは起こっているのか？

(回答) 細胞周期解析において、sub G1 の存在を認めなかったため、アポトーシスは起こっていないと考える。

質問 2 7) GLI2 と TGF- β pathway には関連があるか？

(回答) 今回用いた骨肉腫細胞株では、TGF- β pathway の下流で GLI2 の転写活性は認められなかった。

質問 2 8) GLI2 に対する臨床薬剤ができた場合、どのような使い方をしたら最も効果的と考えられるか？

(回答) 他の Hedgehog pathway の阻害薬や従来の抗癌剤と併用して使用することで、より効果的な Hedgehog pathway の制御が可能となり、さらには各々の阻害薬の濃度を下げ副作用の低下にもつながると考えられる。

質問 2 9) 現在 Hedgehog pathway 因子は、悪性腫瘍の臨床マーカーとして使用されているか？

(回答) 現段階では、どの因子 (SHH, SMO, PTCH1, GLI) も臨床マーカーになっていない。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・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。