

氏名	黒田 大雅
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5122号
学位授与の日付	平成27年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合学研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	口腔扁平上皮癌におけるヘッジホッグシグナル阻害剤の影響に関する研究
論文審査委員	長塚 仁 教授      久保田 聡 教授      佐々木 朗 教授

### 学位論文内容の要旨

#### 【緒言】

ソニックヘッジホッグ (SHH) は胎生期の器官形成の発生において重要な役割を果たすことが知られている。SHH はヘッジホッグファミリーメンバーの1つであり、胎生期の器官の形成過程にモルフォゲンとして働く分子量 45kDa の分泌タンパク質である。近年、膵臓癌・胃癌・食道癌・大腸癌・肺癌・肝臓癌・乳癌など種々の悪性腫瘍で SHH シグナル経路は活性化が腫瘍増殖に深く関与していることが報告され、SHH シグナルは新たな標的分子として注目されている。一方で口腔扁平上皮癌の癌微小環境における SHH の発現と、その役割には未だ不明な点が多いのが現状である。SHH が、その受容体 Patched1 に結合すると、Smoothened への抑制が解除され、Gli1, Gli2 が核内移行し種々の因子の転写が開始される。本研究では、口腔扁平上皮癌微小環境における SHH シグナルの役割について、Smoothened 選択的阻害剤 cyclopamine を用いて、in vivo ならびに in vitro で明らかにしたので報告する。

#### 【材料と方法】

- 1) ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 SAS, HSC-2, HSC-3 ならびに HSC-4 細胞を用い、それら細胞株における SHH 関連シグナル分子の発現を、ウエスタンブロット法を用い検討した。
- 2) cyclopamine が口腔癌細胞の増殖能及び運動能に与える影響は、細胞数のカウント及び wound healing assay を行い検討した。
- 3) cyclopamine が in vivo における腫瘍増大に与える影響は、6週齢雄 BALB/c 系 nu/nu ノードマウスの背部皮下に SAS 細胞を  $2 \times 10^6$  個で移植後 7日目より cyclopamine を 50mg/kg で連日腹腔内投与し、腫瘍体積を経時的に計測した。投与 2週間後にマウスを屠殺し、腫瘍塊を取り出し組織切片を作製した。切片は、H-E 染色ならび SHH, Patched-1, Gli1, Gli2, CD31 の免疫組織学的染色を行い評価した。
- 4) cyclopamine が血管新生に与える in vivo における検討は、上記マウス皮下腫瘍モデル摘出物の新生血管長及びその面積を Lumina Vision を用いて測定した。血管内皮細胞の管腔形成能に与える影響は rat aorta ring assay, ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) における細胞増殖能、運動能及び遊走能は、細胞カウント、wound healing assay, migration assayを用いて

検討した。

#### 【結果】

- 1) SAS, HSC-2, HSC-3 および HSC-4 細胞において SHH の発現が認められた。SAS 細胞, HSC-2 細胞においては, Patched-1, Gli1, Gli2 が高発現していた。
- 2) SAS 細胞, HSC-2 細胞に cyclopamine (5, 10, 20  $\mu$ M) を添加すると, 濃度依存的に細胞増殖能が有意に抑制された。また, SAS 細胞へ cyclopamine を添加すると, SAS 細胞の運動能は有意に抑制された。
- 3) cyclopamine 投与群は有意にマウス皮下腫瘍体積ならびに腫瘍重量が抑制された。摘出材料の免疫組織学的染色において CD31 陽性の血管数は cyclopamine 投与群が対照群と比較し有意に減少していた。また cyclopamine 投与群は, 対照群と比較し SHH, Patched-1, Gli1, Gli2 の染色強度が弱かった。
- 4) rat aorta ring assay を用い SHH の管腔形成能を検討したところ, 新生血管の進展距離, 管腔形成能が有意に促進され, その促進効果は cyclopamine によって有意に阻害された。cyclopamine (5, 10, 20  $\mu$ M) を血清存在下で HUVEC に添加すると, 対照群と比較して増殖能, 運動能および遊走能は濃度依存的に有意に抑制された。また, HUVEC に SAS 細胞の培養上清を添加すると, 増殖能は有意に促進され, その増殖促進効果は cyclopamine 濃度依存的に抑制された。

#### 【考察】

口腔癌細胞から産生される SHH は, 受容体 Patched-1 ならびにそのシグナル分子 Gli1, Gli2 を高発現する癌細胞に対しオートクラインに作用し腫瘍増殖を促進することがわかった。in vivo におけるマウス皮下腫瘍モデルで, cyclopamine 投与群で腫瘍新生血管が有意に抑制していることから, 腫瘍自身の産生する SHH が血管新生に関与する可能性が推察された。そこでこの現象を証明するため rat aorta ring assay を行うと, SHH シグナルの血管新生作用が明らかとなり, SAS 細胞培養上清により HUVEC の増殖促進効果が cyclopamine 添加で抑制されることから, 腫瘍自身の産生する SHH が血管内皮細胞に対してもパラクラインに作用し, 血管新生を介して癌細胞の増殖を促進する可能性が示唆された。さらに, 血清存在下での HUVEC の増殖能・運動能・遊走能が cyclopamine 添加で抑制されることから, 癌微小環境下で種々の増殖因子により血管内皮細胞自身の産生する SHH がオートクライン的に作用し, 血管新生能が亢進していることが示唆された。

#### 【まとめ】

口腔癌微小環境における SHH シグナルは, 腫瘍細胞ならびに腫瘍血管新生の標的分子となる可能性が明らかとなり, Smoothened 選択的阻害剤は, 口腔癌の新たな分子標的治療薬となる可能性が期待される。

## 論文審査結果の要旨

### 【緒言】

ソニックヘッジホッグ (SHH) は胎生期の器官形成の発生において重要な役割を果たすことが知られている。SHH はヘッジホッグ (HH) ファミリーメンバーの1つであり、胎生期の器官の形成過程にモルフォゲンとして働く分子量 45kDa の分泌タンパク質である。近年、膵臓癌・胃癌・食道癌・大腸癌・肺癌・肝臓癌・乳癌など種々の悪性腫瘍で SHH シグナル経路の活性化が腫瘍増殖に深く関与していることが報告され、SHH シグナルは癌治療における新たな標的分子として注目されている。一方で、口腔扁平上皮癌における SHH の発現と癌治療における役割に関しては未だ不明な点が多い。本研究では、口腔扁平上皮癌における SHH シグナルの細胞増殖、遊走および血管新生への関与を明らかにすることを目的として、HH シグナル選択的阻害剤を用い検討を行った。

### 【材料と方法】

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (SAS, HSC-2, HSC-3 ならびに HSC-4 細胞)ならびにヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を用いた。細胞株におけるタンパク質発現は、ウエスタンブロット法を、細胞増殖能は細胞数、運動能は wound healing assay, 遊走能は Boyden chamber assay を行い検討した。*In vivo*においては、6週齢雄 BALB/c 系 nu/nu ノードマウスの背部皮下に SAS 細胞を ( $2 \times 10^6$  個)で移植後 7日目よりヘッジホッグシグナル阻害剤 Cyclopamine を 50mg/kg で連日腹腔内投与し、腫瘍体積の計測ならびに免疫組織学的染色を行い評価した。血管内皮細胞の管腔形成能に与える影響はラット大動脈 ring assay を用いて検討した。

### 【結果】

SAS, HSC-2, HSC-3 および HSC-4 細胞において SHH タンパク質の発現が認められた。SAS 細胞, HSC-2 細胞においては、HSC-3 細胞, HSC-4 細胞と比較して Patched, GLI1, GLI2 タンパク質が高発現していた。SAS 細胞に Cyclopamine を添加すると、濃度依存的に細胞増殖能, 運動能, 遊走能が有意に抑制された。マウス皮下移植腫瘍においては、Cyclopamine 投与群では対照群と比較し有意に腫瘍体積ならびに腫瘍重量の減少を示した。免疫組織学的染色では腫瘍細胞における、SHH, Patched, GLI1, GLI2 の染色強度の低下および CD31 陽性の血管内皮細胞数の減少を認めた。ラット大動脈 ring assay では、大動脈に SHH を添加すると管腔形成能が有意に促進され、その促進効果は Cyclopamine によって有意に阻害された。Cyclopamine は血清存在下での HUVEC の増殖能, 運動能および遊走能を濃度依存的に有意に抑制し、また HUVEC に SAS 細胞培養上清を添加すると、細胞増殖能は有意に促進され、その増殖促進効果は Cyclopamine の濃度依存的に抑制された。

### 【考察】

以上の結果より口腔扁平上皮癌における SHH シグナルは、腫瘍細胞に作用し腫瘍増殖を促進するのみならず、血管新生を介して腫瘍増殖を促進する可能性が示唆された。

本論文は、SHHシグナルが口腔癌において血管新生ならびに癌細胞の増殖を促進することを示唆し、それを標的とした治療法開発につながる重要な知見を含んでいる。よって論文審査担当者は一致して、本論文に博士(歯学)の学位論文としての価値を認める。