

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

黒田 大雅

A study of the effect of hedgehog signaling inhibitor on the
oral squamous cell carcinoma

Hiromasa KURODA

(平成26年12月15日 受付)

緒 言

近年、組織の修復、再生過程において発生期の情報伝達系が再賦活されることが明らかとなり、発生と発癌における類似性が注目されている[1]。ソニックヘッジホッグ (SHH) はヘッジホッグファミリーメンバーの1つであり、1978年WieschausとVolhard[2]によりショウジョウバエの胚発生時の分節パターンのコントロールする遺伝子として、1993年に Echelardら[3]によって胎生期の器官形成に関わる重要なシグナルとして同定されたモルフォゲンである。SHHは分泌細胞内で前駆体蛋白がプロセシングや修飾を受けた後に細胞外へ分泌され[4]、その受容体である12回膜貫通型蛋白Patchedに結合すると、7回膜貫通型蛋白Smoothenedの抑制が解除され下流へのシグナルが伝達される[5, 6]。Smoothened下流のジンク・フィンガー転写因子(GLI1及びGLI2)が、ヘッジホッグシグナルにより核内移行し、標的遺伝子の転写を促進する[7]。これらの標的遺伝子にはPatched, GLIなども含まれ、ヘッジホックシグナル活性化の指標とされている[8]。

ヘッジホッグシグナルの活性化と悪性腫瘍の関係については、1987年Kinzlerら[9]がヒト神経膠芽腫でGLI遺伝子の発現が増大していることを報告したことに始まっている。1996年にはHahn[10]らによりPatched1の遺伝子変異が皮膚の基底細胞癌の高リスク群であるGorlin症候群の患者に多く認められ、発癌との関連が示唆された。また基底細胞癌ではPatchedの変異だけではなくSmoothenedの活性変異型が存在し、Smoothened以下のシグナル伝達が恒常的に活性化されていることも報告されている[11]。一方でSmoothened遺伝子変異によらない癌細胞の増殖促進が、2003年にWatkinsら[12]により小細胞肺癌で報告され、SHHの発現亢進によるヘッジホッグシグナルの活性化とこれに依存した癌細胞の増殖促進効果が明らかになった。

その後、膵臓癌・胃癌・食道癌・肺癌・肝臓癌などの種々の消化器系悪性腫瘍で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ている[13-15]。またKogaら[16]は乳癌切除症例の検討から、ヘッジホッグシグナルの遺伝子変異はごく少数で、SHHの過剰な発現が癌細胞におけるヘッジホッグシグナル活性化の原因であることが明らかにしており、Kuboら[8]

はヘッジホッグシグナル選択的阻害剤を用いた検討により乳癌細胞の増殖抑制効果を報告している。さらにSHH過剰発現によるシグナル伝達の活性化は、腫瘍細胞が自己分泌するSHHのautocrine作用によることが明らかにされた[17]。癌細胞におけるSHHの過剰発現の機構については、炎症性サイトカインによるNF κ -Bシグナルやエストロゲンレセプターを介したシグナルによりSHHの発現が増強されることが膵臓癌、乳癌報告されている[16, 18]。これらの報告からSHHシグナル経路の阻害は新たな分子標的として注目されており、ヘッジホッグシグナル抑制による治療法開発が期待されている。現在、ヘッジホッグシグナル阻害剤としてユリ科植物から抽出されたアルカロイドであるSmoothenedの選択的阻害剤であるCyclopamineやSHH中和抗体が報告されている[21]。

口腔扁平上皮癌においてはソニックヘッジホッグの発現増強を主とするヘッジホッグシグナルの活性化と、SHHシグナル依存性の腫瘍増殖が存在し、ヘッジホッグシグナルの阻害による口腔癌細胞の増殖抑制効果が報告されている[22]。しかしながら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。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*で検討を行ったので報告する。

材料ならびに方法

1. 細胞培養

本研究にはヒト口腔扁平上皮癌細胞株SAS, HSC-2, HSC-3, およびHSC-4細胞（RIKENより供与、茨城），正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(normal human umbilical vein endothelial cells, 以下HUVEC ; Lonza, Basel, Switzerland)を使用した。癌細胞の培養には、56 °Cで30分間熱処理を行うことで非動化した10 % ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum, 以下FBS : JRH Bioscience, Lenexa, KS, USA) および1 % ペニシリン・ストレプトマイシン液 (Gibco, New York, USA) を含むDulbecco's Modified Eagle MediumとHam F-12

Mediumの等量混合培地（以下DMEM/F12 : Invitrogen Corp., Grand Island, New York, USA) を用い, 5 % CO₂, 37 °Cで培養した。HUVECの培養には endothelial cell basal medium-2 (以下 EBM-2 ; Lonza)を使用し, 5 % CO₂, 37 °Cで培養した。細胞に作用させるCyclopamineの濃度は, 培養細胞を用いた諸家の報告を参考にし決定した[23]。Cyclopamine (LC Laboratories, Missouri, USA) をDimethyl sulfoxide (以下 DMSO ; Sigma, Saint Louis, USA) に12μMで溶解し本研究に用いた。

2. ウエスタンプロット法

口腔扁平上皮癌細胞株におけるSHH関連シグナル発現の検討をウエスタンプロット法を用い検討した。SAS, HSC-2, HSC-3, およびHSC-4細胞を10%FBS 含有DMEM/F12にて3日間サブコンフルエントになるまで培養を行った。その後, 細胞溶解液 [50mM Tris (pH7.2), 150mM NaCl, 1%NP-40, 0.5% deoxycholate, 1mM sodium vanadate, 20mM leupeptin, 1mM phenylmethyl sulfonylfluoride, 1% aprotinin] で細胞を可溶化し蛋白を回収した。蛋白濃度はProtein Assay System® (Thermo, Rockford, USA)を用

いて定量を行なった。15μgの蛋白質を含む各サンプルを Sample buffer (Bio-Rad)と β -メルカプトエタノールと混合して95°C, 5分間の加熱によって還元した後に、泳動用緩衝液（0.25M Tris, 1.92M Glycine, 1% SDS)を用いて10%ポリアクリルアミドゲルにて100Vの定電圧下にて約90分間泳動することで蛋白を分画した。分画した蛋白は転写用緩衝液（0.25M Tris, 1.92M Glycine, 20% methanol)中100Vの定電圧下にて90分間ポリフッ化ビニリデン膜（以下PVDF膜：Immobilon-P ; Millipore, Bedford, USA) へ転写した。そのPVDF膜は1%BSA溶液に60分浸して、ブロッキング操作を行なった。その後、1次抗体として抗ヒトSHHウサギモノクローナル抗体(Abcam, Cambridge, USA), 抗ヒトPatchedウサギポリクローナル抗体(Proteintech, Chicago, USA), 抗ヒトGLI1ウサギポリクローナル抗体(Rockland, Pennsylvania, USA), 抗ヒトGLI2ウサギポリクローナル抗体(Abnova, Uppsala, Sweden), 抗ヒト β -actinウサギポリクローナル抗体 (Cell Signaling Technology, Beverly, USA) をCan get signal ®Solution1 (TOYOB0, 大阪) に1:1000で希釈し4°Cでovernightにて反応させた。2次

抗体はHRP標識ポリクローナル抗体 (Amersham Pharmacia Biotec, Buckinghamshire, UK)をCan get signal® Solution2 (TOYOBO)に1:1000で希釈し、90分間反応させた後、ECLシステム (Amersham Pharmacia Biotec)を用いてX線フィルムに化学発光させた。

3. 細胞増殖能の検討

Cyclopamineが口腔扁平上皮癌細胞及び血管内皮細胞の細胞増殖に与える影響を検討するため、3cmシャーレにSAS、およびHSC-2細胞を 5×10^4 個でそれぞれ播種し、10%FBS含有DMEM/F12で24時間培養後、口腔扁平上皮癌細胞株ならびにHUVECに Cyclopamine (5, 10, 20 μ M)を添加し、24, 48, 72時間後の細胞数を全自动セルカウンターTC10TM (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) を用いて計測し、増殖曲線を作成した。

4. 動物腫瘍移植モデルの作製

動物腫瘍移植モデルは、癌細胞浮遊液をヌードマウスの背部皮下に移植する動物実験モデルを用いた。まずサブコンフルエントな状態になるまでSAS細胞を培養し、移植を行う24時間前に培地の交換を行った。0.25%トリプシン

-0.01%EDTA液で細胞を分散し、DMEM/F12で 2.0×10^6 個/mlになるように調整し、癌細胞浮遊液を作製した。6週齢雄BALB/C系nu/nuヌードマウス（日本クレア、東京）をエスカイン吸入麻酔薬（マイラン製薬、Pennsylvania, USA）により吸入麻酔を行い、30ゲージ注射針を用いてヌードマウスの背部皮下に癌細胞浮遊液を $50\mu\text{l}$ (2×10^6 個) ずつ移植した。CyclopamineをDMSO (Sigma)で溶解し、癌細胞移植7日後より50mg/kgの濃度で連日腹腔内投与を行い、腫瘍体積を経時的に計測した。Cyclopamine投与14日後にマウスを屠殺し、皮下の腫瘍を摘出後、10%中性緩衝ホルマリンで24時間浸漬し、冷エタノール系列で脱水し、パラフィン包埋を行った。厚さ $4\mu\text{m}$ で切片を作製し、組織学的に検討した。動物実験は岡山大学動物実験管理委員会の指針に従い行った。

5. 免疫組織学的検討

マウス背部皮下移植腫瘍の血管新生および、ヘッジホッギナルにおける検討は、免疫組織学的染色を行った。組織切片を脱パラフィン後、0.3%過酸化水素を含むメタノールによる内因性ペルオキシダーゼ阻止を行った。抗

原性の再賦活化法としては0.01Mクエン酸緩衝液 (pH6.0) 中でマイクロウェーブ処理を行った。1次抗体には抗マウスCD31ウサギポリクローナル抗体 (Abcam, Cambridge, USA)を1:50, 抗ヒトSHHウサギモノクローナル抗体 (Abcam) を 1:100, 抗ヒトPatched ウサギポリクローナル抗体 (Proteintech)1:100, 抗ヒトGLI1ウサギポリクローナル抗体(Rockland) 1:500, 抗ヒトGLI2ウサギポリクローナル抗体(Abnova) 1:500にそれぞれ希釈し, 2次抗体にはABCkit (Vector Lab, Burlingame, USA) を用いた。発色は0.01%3,3'-ジアミノベンチジン(DAB)含有0.05M Tris-HCl緩衝液 (pH7.6) で行い, 発色後光学顕微鏡 (OLYMPUS IX81 東京)で検鏡した。

6. 細胞運動能の検討

細胞運動能の検討はWound healing assayで評価を行った。6cmシャーレ上でSAS細胞は10%FBS含有DMEM/F12, HUVEC細胞はEGM-2 Single Quotsを含むEndothelial cell growth medium-2 (EGM-2 ; Cambrex BioScience, Verviers, Belgium) 培地で培養した。細胞がサブコンフルエントに達した後, 培地交換を行い24時間培養後, シャーレ上をプラスチックチップで引っ掻き,

模擬的な創傷を作製し創傷面積を測定した。作製直後の創傷面積を画像解析ソフトImage J (Version1.43r, NIH, Bethesda, USA) を用いて計算し評価した。

7. 細胞遊走能の検討

24wellマトリゲルインベージョンチャンバー (BD Falcon, New Jersey, USA) のノンコートインサートを使用した。ポアサイズ8 μ mのメンブレン上層にHUVECを 3×10^4 個ずつ播種し、下層にSAS 細胞培養上清を加え、24時間後の遊走細胞数を測定し細胞遊走能の検討をおこなった。なお、SAS細胞培養上清は、10cmディッシュでコンフレントに達したSAS細胞を、10%FBS含有DMEM/F12を4mlで24時間培養後に回収したものを使用した。メンブレン下層の細胞はディフ・クイック（国際試薬株式会社、兵庫、日本）で固定・染色した。

8. ラット大動脈 ring assay

SHHが血管新生に与える影響の検討はMatsubaraら[24]のRat aorta ring assay法に準じて行った。6週齢雄Wister ラット（日本クレア、東京）の胸部

大動脈を無菌的に摘出後、血管内皮細胞が表面になるように血管を裏返しにした後、長さ約1 mmの大動脈片に切り分けた。ゲル・マトリックス液は、ブタ腱由来酸可溶性Type I collagen (3 mg/ml; Cellmatrix Type-IA, 新田ゼラチン, 大阪), 10 x Eagle's MEM (Gibco, New York, USA), 再構成緩衝液 (0.08 M NaOH and 200 mM HEPES) をそれぞれ、8 : 1 : 1の比率で4°Cにて混和することにより作製した。12穴プレートの中心に大動脈片を置き、0.3 mlのゲル・マトリックス液によって包埋した。37°Cにて20分間静置することによってゲル・マトリックス液をゲル化させ、1 % ITS (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) を含有する0.8 ml RPMI 1640培地 (Gibco) を添加した。その後Recombinant SHH (R&D, Minneapolis, USA)を2μg/mlの濃度で添加し、cyclopamine, SHH+cyclopamineで加えて5日間、5 %CO₂, 37°Cの条件で培養した。培地の交換は培養開始から1日後と3日後に行った。培養開始から5日後に位相差顕微鏡 (OLYMPUS IX81) を使用して大動脈片の外辺部からの微小血管の成長を観察した。デジタル写真を撮影し、微小血管の長

さと面積を、 NIHイメージソフトウェア (NIH ; Bethesda, USA) を使用し
測定した。

9. 統計分析

有意差検討にはStudent's t-検定を用いて行い、 危険率5 % 未満を有意差あ
りと判定した。

結 果

1. 口腔扁平上皮癌細胞株におけるSHH関連シグナル発現の検討

SAS, HSC-2, HSC-3, およびHSC-4細胞におけるSHH関連シグナルの発
現をウエスタンプロット法を用いて検討した（図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、 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。

2. Cyclopamineがヒト口腔扁平上皮癌細胞の細胞増殖能に与える影響

SAS細胞, HSC-2細胞を用いてCyclopamineがこれら細胞の増殖能に与える影響を検討した。SAS細胞にCyclopamineを添加すると、有意に細胞増殖抑制効果を認め、その効果は5, 10, 20 μ M Cyclopamine添加で濃度依存的であった（図2-A）。一方HSC-2細胞に20 μ M Cyclopamineを添加すると有意な細胞増殖抑制効果を認めた（図2-B）。

3. Cyclopamineがヒト口腔扁平上皮癌細胞の細胞運動能に与える影響

SAS細胞におけるCyclopamineが細胞運動能に与える影響をWound healing assayを行い比較した写真を示す（図3-A）。20 μ M Cyclopamine添加群では対照群と比較して24時間後の遊走細胞面積の有意な減少を認め（図3-B），ヘッジホッグシグナルが口腔扁平上皮癌の運動能に関わることが明らかとなった。

4. CyclopamineがSAS皮下腫瘍移植モデルの腫瘍増大に与える影響

SAS細胞を6週齢雄のヌードマウスの背部皮下にSAS細胞を 2×10^6 個移植し、対照群とCyclopamine投与14日目の背部皮下腫瘍写真を示す（図4-A）。

Cyclopamine 投与 14 日目における腫瘍体積は、 Cyclopamine 投与群 ($3552 \pm 1542 \text{ mm}^3$)においては、対照群 ($8456 \pm 2224 \text{ mm}^3$)と比較して有意に抑制された(図4-B)。屠殺後に切除した腫瘍の重量は、 Cyclopamine投与群 $0.33 \pm 0.15 \text{ g}$ に対し対照群は、 $1.07 \pm 0.33 \text{ g}$ であり、 Cyclopamine投与群は対照群と比較して有意に腫瘍重量が抑制されていることが分かった(図4-C)。

5. Cyclopamineがマウス背部皮下移植腫瘍の血管新生に与える影響

Cyclopamine 投与 14 日目腫瘍摘出時の肉眼所見を(図5-A)に示す。 Cyclopamine投与群の血管長 ($5.1 \pm 1.3 \text{ mm}$)は、対照群の血管長 ($8.8 \pm 1.1 \text{ mm}$)と比較して有意に低下し(図5-B)，血管面積においても Cyclopamine投与群 ($167 \pm 20 \text{ mm}^2$)は、対照群 ($236 \pm 23 \text{ mm}^2$)と比較し、有意に抑制された(図5-C)。次に、 Cyclopamine投与群ならびに対照群における腫瘍組織内の血管新生の評価については血管内皮細胞マーカーであるCD31を用いた免疫組織化学染色をおこなった(図6-A)。微小血管数はCyclopamine投与群 (41 ± 6 個)は、対照群 (135 ± 14 個)と比較して有意な減少を認めた(図6-B)。

6. Cyclopamineがマウス背部皮下移植腫瘍組織のSHH, Patched, GLI1, GLI2の発現に与える影響

腫瘍組織内におけるSHHとその関連シグナルの発現を免疫組織化学的に検討した。対照群におけるSHHの発現は腫瘍細胞の細胞質に強い発現を認め(図7-A)、Cyclopamine投与群は対照群と比較してSHHの染色強度は低かった(図7-B)。対照群におけるPatchedは腫瘍細胞の細胞質に強い発現を認め(図7-C)、Cyclopamine投与群は対照群と比較して染色強度は弱かった(図7-D)。対照群におけるGLI1(図7-E)およびGLI2(図7-G)は、腫瘍細胞の核内に高い染色性を示し、Cyclopamine投与群の腫瘍細胞の核内の染色強度は、対照群と比較してGLI1(図7-F)、GLI2(図7-H)ともに低かった。

7. Cyclopamineが血管内皮細胞の管腔形成能に与える影響

SHHが血管新生能を有するか否かを確認するためにラット大動脈ring assay法を用いて、SHHが反転させた大動脈片の外辺部から進展する微小血管の成長に与える影響を検討した。2 μg/mlのリコンビナントSHHで大動脈片を刺激すると、対照群と比較して微小血管の進展した距離、管腔形成能が促進さ

れ、その促進効果はCyclopamineによって有意に阻害された（図8-A, B）。

Cyclopamineを単独で大動脈片に添加すると微小血管の進展距離、管腔形成能は対照群と比較して有意な変化を認めなかった（図8-A, B）。

8. Cyclopamineが血管内皮細胞の細胞増殖能に与える影響

96wellプレートに播種したHUVECに50μlのSAS細胞の培養上清(SAS CM)を加え、24時間後にCyclopamineを添加しその24時間後にMTT assayをおこないマイクロプレートリーダーにて吸光度(OD 490)を測定した。SAS CMをHUVECに添加すると有意に細胞増殖能が亢進し、SAS CM存在下でCyclopamineを添加すると、Cyclopamine濃度依存的にHUVECの増殖が有意に抑制されることが分かった（図9-A）。Cyclopamine (5, 10, 20μM)を血清存在下でHUVECに添加し、経時的に細胞数をカウントした。血清存在下で増殖するHUVECはCyclopamine濃度依存的に有意に細胞増殖能が抑制された（図9-B）。

9. Cyclopamineが血管内皮細胞の運動能に与える影響

血清存在下で HUVEC の Wound healing assay を行うと， $20\mu\text{M}$ Cyclopamine存在下で対照群と比較して細胞運動能の有意な抑制を認めた(図 10-A,B)。

10. Cyclopamineが血管内皮細胞の遊走能に与える影響

チャンバーアンダーライフチャレンジ下層にSAS細胞培養上清を添加し，上層にCyclopamine存在，非存在下で培養後，インサートの裏面をディフ・クイック染色しHUVECの下層へ遊走した細胞をカウントした(図11-A, B)。1視野 0.05mm^2 当たり，対照群は 99.3 ± 5.4 個，Cyclopamine $5\mu\text{M}$ 投与群は 64.6 ± 10.37 個，Cyclopamine $10\mu\text{M}$ 投与群は 33 ± 3.5 個，Cyclopamine $20\mu\text{M}$ 投与群は 25.33 ± 1.89 個であった。血管内皮細胞における運動能と同様に，遊走能においてもCyclopamine投与群が対照群と比較し，濃度依存的に有意な抑制を認めた。

考 察

SHHは胎生期の形態発生に重要な役割を果たすモルフォゲンとして同定され[3]、その後、膠芽腫や皮膚癌においてPatchedやSmoothenedの遺伝子変異が認められ、シグナル伝達経路の異常がその腫瘍発生に関与することが報告されたが、近年膵臓癌・胃癌・食道癌・肺癌・肝臓癌など種々の癌細胞において遺伝子変異によらない、SHHの過剰発現によるリガンド依存性のHHシグナルの活性化の重要性が指摘されている[13-15]。この増殖機構は主に腫瘍細胞におけるSHHの過剰発現と腫瘍細胞から分泌されるSHHがautocrineに作用することによる腫瘍細胞自身の増殖促進効果である。口腔癌におけるSHHならびにそのシグナル分子の発現に関してはこれまで免疫組織染色にて口腔癌細胞におけるSHH、Patched、GLI1、GLI2の発現が報告されている[22]。本研究においても口腔扁平上皮癌細胞株、SAS、HSC-2、HSC-3、およびHSC-4細胞においてSHHの発現が確認され、とりわけSAS細胞、HSC-2細胞におけるPatched、GLI2の蛋白発現の亢進がウエスタン blotで認められることから、これらの細胞はSHH依存的な腫瘍増殖機構が存在することが考えられ

る。Patched, GLI2発現はヘッジホッグシグナルにより、上昇することから、SHH経路がSAS細胞で恒常に活性化されていることが推察される。Yanらの報告[22]と同様に、腫瘍細胞におけるGLI1の発現は弱く、GLI2の発現が強いことが、SAS細胞皮下腫瘍移植モデルの免疫組織学的染色にて明らかとなり、口腔癌の増大にGLI2の活性化が大きく関与していることが示唆される。しかしながら、大腸癌の一部ではSHHの過剰発現によるGLIの発現亢進が癌細胞におけるWNTシグナルの転写活性を抑制し腫瘍増殖を抑制していることが報告されており[32]、SHH過剰発現と腫瘍増殖が必ずしも比例しないことが示唆される。しかしながら、本研究における *in vitro*系において、Cyclopamineが、濃度依存的にSAS細胞、HSC-2細胞の増殖を抑制した現象は、GLI2シグナルの低下が口腔癌細胞の腫瘍増殖に関与している可能性が考えられる。SAS細胞皮下移植モデルにおける腫瘍摘出標本の免疫組織染色では、Cyclopamine投与群において癌細胞におけるSHHの発現の低下、Patchedの細胞質での発現の低下ならびにGLI1, GLI2の核内での染色性が低下しており、Smoothedの阻害によりGLI1, GLI2の核内移行が抑制され下流のシグナル

伝達が阻害されたことにより腫瘍増殖が抑制された可能性が大きい。すなわち、Smoothenedを選択的に阻害すると、下流のGLI2の発現が抑制され、CyclinD1, Ki67の発現が低下、細胞周期をG1期で停止することにより腫瘍細胞にCaspase3を介したアポトーシスを誘導するメカニズムが存在することが示唆される[25]。食道癌においてSHHシグナルを阻害すると、抗アポトーシス作用を持つPI3K-AKT生存シグナル活性が抑制されることが報告されている[34]。一方で、口腔癌切除標本におけるGLI2の高発現群では低発現群に比べ術後5年生存率が有意に低下し、GLI2発現が口腔癌の予後と相関することが明らかにされている[22]。これらのことから、口腔癌におけるヘッジホッグシグナルは、癌細胞の増殖、生存に大きく関与することが示唆される。

癌細胞の増殖には血管新生が必須とされており、1980年Folkmanらの報告[26]を皮切りにFGF (fibroblast growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor)などの種々の血管新生因子の報告がなされてきた。SHHの血管新生因子としての関与は、1998年のPepicelliら[27]によるSHHヌル変異体マウスは、肺の血管分岐が生じないことや、SHHの過剰発現が背部神経管に

おける神経外胚葉の血管形成に関与していること[28], またPolaら[29]のマウス下肢虚血モデルを使った実験でSHHを下肢に投与することにより血管新生を誘導することから, 発生期や血管病におけるSHHの関与が示唆される。口腔癌における腫瘍血管新生の重要性は, これまで種々報告されているが[30, 31], 口腔癌の腫瘍増殖におけるSHHの血管新生における役割についてはほとんど分かっていないのが現状であった。口腔扁平上皮癌マウス背部皮下移植モデルにおいて, Cyclopamine投与群は腫瘍へ流入する血管の長さ, 面積が对照群に比べて有意に減少していたことから, ヘッジホッグシグナルの腫瘍血管新生への関与が示唆された。SAS細胞マウス皮下移植モデルの免疫組織学的染色において, 腫瘍細胞でのSHHの発現亢進が認められた部位と同じ部位で血管内皮細胞のマーカーであるCD31陽性細胞の増加が確認され, 血管内皮細胞の核にGLI2の高発現を認めている(図7-G)。すなわち, 腫瘍細胞から分泌されるSHHがparacrine的に血管内皮細胞に作用し, 血管内皮細胞自身のSHHシグナルの活性化の存在が示唆される。腫瘍血管新生としてのVEGFやその他の炎症性サイトカインは主に血管内皮細胞に直接的に作用し血管新生を促す

のに対し[30, 31], SHHは線維芽細胞[33]や血管内皮前駆細胞[35]に作用し, VEGFの発現を誘導し間接的に血管新生を促進することが報告されている。しかししながら, われわれがおこなったラット大動脈 ring assayではSHHにより既存血管からの管腔形成が誘導され, その促進効果はCyclopamineにより抑制された。しかし, SHHがラット大動脈内皮における線維芽細胞に作用し, 線維芽細胞から血管新生因子が産生され, 血管内皮細胞の管腔形成が促進された可能性も否定できない。そこで, HUVECを用いた in vitro培養系で, HUVECをSAS細胞培養上清で刺激すると, HUVECの増殖能が有意に亢進し, Cyclopamine添加によりその増殖ならびに遊走能が抑制された。これは癌細胞から分泌されたSHHを含むサイトカインにより, SHHシグナルが活性化され, 血管内皮細胞の増殖ならびに遊走能が促進された可能性が示唆される。さらに, 血清存在下でのHUVECの増殖能・運動能が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る。HUVECにSHHを添加しcDNA micro arrayをおこなうと, 対照群

と比較しVEGF, IGF-1などの血管新生因子の遺伝子発現が上昇することがわ
かり、今後SHHの血管内皮細胞におけるpathway解析、個々の遺伝子解析が
必要と考える。

以上よりヘッジホッギナルは血管内皮細胞の増殖能・運動能・遊走能を
直接的に制御していることが推察される。口腔癌細胞から產生されるSHHは、
腫瘍細胞にオートクライインに作用し腫瘍増殖を促進するのみならず、血管内
皮細胞に対してパラクライインに作用することにより、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。

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。

謝　辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う貴重な機会を与えて頂き、御懇切なる御指導と御高闘を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・口腔顎顔面外科学分野、佐々木朗教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究の遂行に際し、御指導いただきました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔顎顔面外科学分野栗尾奈愛博士ならびに志茂　剛博士に感謝いたします。

また、様々な面で多くの貴重な御援助と御助言を頂きました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・口腔顎顔面外科学分野および岡山大学病院・口腔外科（病態系）の諸先生方に深く御礼申し上げます。

参考文献

1. Amakye D., Jagani Z., Dorsch M. : Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Med.*, **11**, 1410-22, 2013.
2. Nusslein-Volhard C., Wieschaus E. : Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, **287**, 795-801, 1980.
3. Echelard Y., Epstein D. J., St-Jacques B., Shen L., Mohler J., McMahon J. A., McMahon A. P. : Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*, **75**, 1417-30, 1993.
4. Burke R., Nellen D., Bellotto M., Hafen E., Senti K. A., Dickson B. J., Basler K. : Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell*, **99**, 803-15, 1999.
5. Stone D. M., Hynes M., Armanini M., Swanson T. A., Gu Q., Johnson R. L., Scott M. P., Pennica D., Goddard A., Phillips H., Noll M., Hooper J. E., de Sauvage F., Rosenthal A. : The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature*, **384**, 129-34, 1996.
6. Taipale J., Cooper M. K., Maiti T., Beachy P. A. : Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened. *Nature*, **418**, 892-7, 2002.
7. Ruiz I Altaba A., Mas C., Stecca B. : The GLI code: An information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends in cell biology*

biology., **17**, 438-47, 2007.

8. Kubo M., Nakamura M., Tasaki A., Yamanaka N., Nakashima H., Nomura M., Kuroki S., Katano M. : Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer. *Cancer research.*, **64**, 6071-4, 2004.
9. Kinzler K. W., Bigner S. H., Bigner D. D., Trent J. M., Law M. L., O'Brien S. J., Wong A. J., Vogelstein B. : Identification of an amplified, highly expressed gene in a human GLIoma. *Science.*, **236**, 70-3, 1987.
10. Hahn H., Wicking C., Zaphiropoulos P. G., Gailani M. R., Shanley S., Chidambaram A., Vorechovsky I., Holmberg E., Unden A. B., Gillies S., Negus K., Smyth I., Pressman C., Leffell D. J., Gerrard B., Goldstein A. M., Dean M., Toftgard R., Chenevix-Trench G., Wainwright B., Bale A. E. : Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell.*, **85**, 841-51, 1996.
11. Lam C. W., Xie J., To K. F., Ng H. K., Lee K. C., Yuen N. W., Lim P. L., Chan L. Y., Tong S. F., McCormick F. : A frequent activated smoothened mutation in sporadic basal cell carcinomas. *Oncogene.*, **18**, 833-6, 1999.
12. Watkins D. N., Berman D. M., Burkholder S. G., Wang B., Beachy P. A., Baylin S. B. : Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature.*, **422**, 313-7, 2003.
13. Thayer S. P., Di MaGLiano M. P., Heiser P. W., Nielsen C. M., Roberts D. J., Lauwers G. Y., Qi Y. P., Gysin S., Fernández-del Castillo C.,

- Yajnik V., Antoniu B., McMahon M., Warshaw A. L., Hebrok M. : Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature.*, **425**, 851-6, 2003.
14. Berman D. M., Karhadkar S. S., Maitra A., Montes De Oca R., Gerstenblith M. R., Briggs K., Parker A. R., Shimada Y., Eshleman J. R., Watkins D. N., Beachy P. A. : Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature.*, **425**, 846-51, 2003.
15. Yanai K., Nagai S., Wada J., Yamanaka N., Nakamura M., Torata N., Noshiro H., Tsuneyoshi M., Tanaka M., Katano M. : Hedgehog signaling pathway is a possible therapeutic target for gastric cancer. *Journal of surgical oncology.*, **95**, 55-62, 2007.
16. Koga K., Nakamura M., Nakashima H., Akiyoshi T., Kubo M., Sato N., Kuroki S., Nomura M., Tanaka M., Katano M. : Novel link between estrogen receptor alpha and hedgehog pathway in breast cancer. *Anticancer research*, **28**, 731-40, 2008.
17. Palma V., Lim D. A., Dahmane N., Sánchez P., Brionne T. C., Herzberg C. D., Gitton Y., Carleton A., Alvarez-Buylla A., Ruiz i Altaba A. : Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development (Cambridge, England)*, **132**, 335-44, 2005.
18. Nakashima H., Nakamura M., Yamaguchi H., Yamanaka N., Akiyoshi T., Koga K., Yamaguchi K., Tsuneyoshi M., Tanaka M., Katano M. : Nuclear factor-kappaB contributes to hedgehog signaling pathway activation through sonic hedgehog induction in pancreatic cancer.

Cancer research., **66**, 7041-9, 2006.

19. Katano M. : Hedgehog signaling pathway as a therapeutic target in breast cancer. *Cancer letters.*, **227**, 99-104, 2005.
20. Frank-Kamenetsky M., Zhang X. M., Bottega S., Guicherit O., Wichterle H., Dudek H., Bumcrot D., Wang F. Y., Jones S., Shulok J., Rubin L. L., Porter J. A. : Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of Smoothened agonists and antagonists. *Journal of biology.*, **1**, 10, 2002.
21. Chen J. K., Taipale J., Young K. E., Maiti T., Beachy P. A. : Small molecule modulation of Smoothened activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **99**, 14071-6, 2002.
22. Yan M., Wang L., Zuo H., Zhang Z., Chen W., Mao L., Zhang P. : HH/GLI signalling as a new therapeutic target for patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology.*, **47**, 504-9, 2011.
23. Nishimaki H., Kasai K., Kozaki Ki., Takeo T., Ikeda H., Saga S., Nitta M., Itoh G. : A role of activated Sonic hedgehog signaling for the cellular proliferation of oral squamous cell carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun.*, **314**, 313-20, 2004.
24. Matsubara K., Mori M., Mizushina Y. : Petasiphenol which inhibits DNA polymerase lambda activity is an inhibitor of in vitro angiogenesis. *Oncol. Rep.*, **11**, 447-451, 2004.
25. Jiang S., Chen X. L., Ding Y., Chen Z. W., Zhu L. J., Feng H., Wang Q. M., Zhen M. C., Wang Q. : [Mechanism of combined use of cyclopamine

- and hydroxycamptothecin in inducing the apoptosis of human oral squamous cell carcinoma cell line]. *Journal of Southern Medical University.*, **30**, 1034-6, 2010.
26. Folkman J., Haudenschild C. : Angiogenesis in vitro. *Nature.*, **288**, 551-6, 1980.
 27. Pepicelli C. V., Lewis P. M., McMahon A. P. : Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung. *Current biology.*, **8**, 1083-6, 1998.
 28. Rowitch D. H., S-Jacques B., Lee S. M., Flax J. D., Snyder E. Y., McMahon A. P. : Sonic hedgehog regulates proliferation and inhibits differentiation of CNS precursor cells. *The Journal of neuroscience.*, **19**, 8954-65, 1999.
 29. Pola R., Ling L. E., Aprahamian T. R., Barban E., Bosch-Marce M., Curry C., Corbley M., Kearney M., Isner J. M., Losordo D. W. : Postnatal recapitulation of embryonic hedgehog pathway in response to skeletal muscle ischemia. *Circulation.*, **108**, 479-85, 2003.
 30. Tae K., El-Naggar A. K., Yoo E., Feng L., Lee J. J., Hong W. K., Hittelman W. N., Shin D. M. : Expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in head and neck tumorigenesis. *Clinical cancer research.*, **6**, 2821-8, 2000.
 31. Michi Y., Morita I., Amagasa T., Murota S.: Human oral squamous cell carcinoma cell lines promote angiogenesis via expression of vascular endothelial growth factor and upregulation of KDR/flk-1 expression in endothelial cells. *Oral oncology.*, **36**, 81-8, 2000.

32. Akiyoshi T., Nakamura M., Koga K., Nakashima H., Yao T., Tsuneyoshi M., Tanaka M., Katano M. : GLI1, downregulated in colorectal cancers, inhibits proliferation of colon cancer cells involving Wnt signalling activation. *Gut.*, **55**, 991-9, 2006.
33. Pola R., Ling L. E., Silver M., Corbley M. J., Kearney M., Blake Pepinsky R., Shapiro R., Taylor F. R., Baker D. P., Asahara T., Isner J. M. : The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nature medicine.*, **7**, 706-11, 2001.
34. Dormoy V., Danilin S., Lindner V., Thomas L., Rothhut S., Coquard C., Helwig J. J., Jacqmin D., Lang H., Massfelder T. : The sonic hedgehog signaling pathway is reactivated in human renal cell carcinoma and plays orchestral role in tumor growth. *Mol Cancer.*, **8**, 3, 2009.
35. Yamazaki M., Nakamura K., Mizukami Y., Ii M., Sasajima J., Sugiyama Y., Nishikawa T., Nakano Y., Yanagawa N., Sato K., Maemoto A., Tanno S., Okumura T., Karasaki H., Kono T., Fujiya M., Ashida T., Chung D. C., Kohgo Y. : Sonic hedgehog derived from human pancreatic cancer cells augments angiogenic function of endothelial progenitor cells. *Cancer Sci.*, **99**, 1131-38, 2008.
36. Kanda S., Mitsuyasu T., Nakao Y., Kawano S., Goto Y., Matsubara R., Nakamura S. : Anti-apoptotic role of the sonic hedgehog signaling pathway in the proliferation of ameloblastoma. *Int J Oncol.*, **43**, 695-702, 2013.
37. Yauch R. L., Gould S. E., Scales S. J., Tang T., Tian H., Ahn C. P.,

Marshall D., Fu L., Januario T., Kallop D., Nannini-Pepe M., Kotkow K., Marsters J. C., Rubin L. L., de Sauvage F. J. : A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature.*, **455**, x406-10, 2008.

脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 腫瘍制御学講座
口腔顎顔面外科学分野
(主任: 佐々木朗教授)
本論文の一部は、以下の学会において発表した。

第 67 回日本口腔科学会総会 (2013 年 5 月, 宇都宮)
第 55 回歯科基礎医学会学術大会 (2013 年 9 月, 岡山)
第 32 回日本口腔腫瘍学会総会 (2014 年 1 月, 北海道)