

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。