

Title	Forskolin, a Hedgehog signal inhibitor, inhibits cell proliferation and induces apoptosis in pediatric tumor cell lines
Author(s)	山中, 宏晃
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/54154">https://hdl.handle.net/11094/54154</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	やま なか ひろ あき 山 中 宏 晃
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 23673 号
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学位論文名	Forskolin, a Hedgehog signal inhibitor, inhibits cell proliferation and induces apoptosis in pediatric tumor cell lines (小児悪性固形腫瘍細胞株に対するHedgehogシグナル伝達経路阻害剤Forskolinの抗腫瘍効果の検討)
論文審査委員	(主査) 教 授 福澤 正洋 (副査) 教 授 大藪 恵一 教 授 野口眞三郎

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔 目 的 〕

Hedgehog(Hh) signaling pathwayは胎生期形態形成に重要な役割を持つといわれ、経路上の伝達因子の変異が基底細胞癌、肺癌、髄芽腫、食道癌、胃癌等の腫瘍細胞増殖を促進し、腫瘍の発生に関与すると報告されている。また小児悪性固形腫瘍分野においては横紋筋肉腫の増殖に関与する事が報告されているが、詳細は未だ不明である。今回我々は種々の小児固形腫瘍細胞株におけるHh signaling pathway上の転写因子であるGli 1 mRNAの発現と腫瘍増殖への関与を検討し、小児悪性腫瘍領域におけるHh signaling pathwayの治療標的としての可能性について検討した。

#### 〔 方法ならびに成績 〕

使用した細胞株はヒト神経芽細胞腫細胞株(NB-1, NB-19)、ヒト肝芽腫および肝癌細胞株(Huh6, Huh7, HepG2)、ヒト横紋筋肉腫細胞株(RMS-YM, RD, RH30)及び対照としてヒト結腸癌細胞株(Caco2)、ヒト胎児腎細胞株(HEK293)を用い、Hh signaling pathwayの活性化をGli 1の発現(RT及びqPCR法)により検索した。またHh signaling pathway構成因子の阻害剤で、特異的にGli 1を抑制する方向に働くForskolinを培養液に低濃度より添加し、添加後の遺伝子抑制効果を定量PCR法にて検討した。また腫瘍細胞の増殖効果をWST-1 Assayにて測定しGli1の抑制による増殖抑制効果を検討した。同様の方法でCyclopamineとForskolinの両阻害剤の細胞増殖抑制実験を行なった。またForskolin投与後の細胞死減量(アポトーシス)

も cell death detection ELISAにて検討した。

その結果、対象とした細胞株のうち、小児固形腫瘍細胞株 (Huh6, HepG2, NB19, RMS-YM, RD, RH30)では転写因子の一つであるGli1の発現を認めた。Gli1の発現は対象とした全ての細胞株で濃度依存性に減少したが、さらに伝達経路下流のc-MycのmRNAはNB19以外の細胞株では減少したがNB19では逆に増加した。次にGli1高発現小児腫瘍細胞株に対し、Forskolinを添加すると、NB19とRMS-YM, RD, RH30の増殖は時間経過後も有意に抑制された。またCyclopamineとForskolinの増殖抑制比較ではForskolinの方が抑制効果の高い事が示された。またForskolin添加によりアポトーシスの増加がHuh6, NB19, RMS-YM, RH30株において有意に認められた。

〔 総 括 〕

神経芽腫、肝芽腫、横紋筋肉腫細胞株においてHh signaling pathwayは高発現を認め、その経路構成因子を阻害することにより遺伝子発現や細胞増殖が有意に抑制され、またその細胞死が増加したことから、Hh signaling pathwayは新たな治療標的となりうる可能性が示された。

## 論文審査の結果の要旨

背景： Hedgehog (Hh) 伝達経路は胎生期形態形成に重要な役割を持つといわれ、経路上の伝達因子の変異が基底細胞癌、肺癌、髄芽腫、食道癌、胃癌等の腫瘍細胞増殖を促進し、腫瘍の発生に関与すると報告されている。また小児悪性固形腫瘍分野においては横紋筋肉腫の増殖に関与する事が報告されているが、詳細は未だ不明である。今回我々は種々の小児固形腫瘍細胞株におけるHh経路上の転写因子であるGli 1の発現と腫瘍増殖への関与を検討し、小児悪性腫瘍領域におけるHh 経路の治療標的としての可能性について考察した。

対象及び方法：ヒト神経芽細胞腫細胞株 (NB-1, NB-19)、ヒト肝芽腫および肝癌細胞株 (Huh6, Huh7, HepG2)、ヒト横紋筋肉腫細胞株 (RMS-YM, RD, RH30) 及び対照としてヒト結腸癌細胞株 (Caco2)、ヒト胎児腎細胞株 (HEK293)を用い、Hh 経路の活性化をGli 1の発現 (RT-PCR法)により検索した。また経路構成因子の阻害剤で、特異的にGli 1を抑制する方向に働くForskolinを培養液に添加し、腫瘍細胞の増殖をWST-1 Assayにて測定してGli1の抑制による増殖抑制効果を検討した。

結果：対照細胞株に対し各小児固形腫瘍細胞株では転写因子Gli 1の高発現を認めた。また特に発現の高かった小児腫瘍細胞株においてGli 1を抑制するPKAを投与することにより腫瘍細胞の増殖は濃度依存性に抑制された。

総括：神経芽腫、肝芽腫、横紋筋肉腫においてGli1は高発現し、その阻害により細胞増殖が抑制されたことから、Gli1は新たな治療標的となりうる可能性が示された。以上、博士 (医学) の学位授与に値する。