

〈原著論文〉

甲状腺低分化・未分化癌細胞に対するヘッジホッグ阻害薬 GANT61の抗腫瘍効果と癌幹細胞制御作用

齋藤 互¹⁾, 紅林 淳一¹⁾, 田中 克浩¹⁾, 太田 裕介¹⁾, 小池 良和¹⁾,
岸野 瑛美¹⁾, 鹿股 直樹²⁾

1) 川崎医科大学乳腺甲状腺外科学

2) 川崎医科大学病理学

抄録 甲状腺分化癌は予後良好であるが低分化・未分化癌は予後不良であり、新規治療薬の開発が急務である。多くの悪性腫瘍でヘッジホッグ (Hh) 経路の異常な活性化が起こっており、Hh 経路を標的とした治療戦略が有望視されている。Hh 経路の活性化は、腫瘍の生存・増殖・血管新生の促進ばかりでなく、癌幹細胞の制御との関与が示されている。我々は、甲状腺癌細胞を用いて Hh 経路を阻害する GANT61の抗腫瘍効果並びに癌幹細胞に与える影響を検討した。また、進行甲状腺癌の治療薬として用いられているタキサン系抗癌化学療法薬パクリタキセルとの併用効果も検討した。当教室で樹立された甲状腺低分化癌細胞株 KTC-1及び甲状腺未分化細胞株 KTC-2, KTC-3を用いて GANT61の細胞増殖, 細胞周期, アポトーシス, 癌幹細胞比率に与える影響を検討した。また, Hh 経路の effector である glioma-associated oncogene (Gli) 1, その下流にある癌幹細胞制御因子 (aldehyde dehydrogenase [ALDH], Snail, Slug) や抗アポトーシス分子 (survivin, Bcl-2) の発現に与える GANT61の効果を調べた。GANT61は, すべての甲状腺癌細胞株で細胞増殖を用量依存性に抑制した (50% 阻止濃度の平均値: KTC-1細胞は17.2 μM ; KTC-2細胞は13.6 μM ; KTC-3細胞は13.3 μM)。GANT61は, KTC-1及び KTC-2細胞の sub-G1分画を増加したが, G1-S ブロックは起こさなかった。GANT61は, 全ての細胞株において用量依存性にアポトーシス分画を増加し, survivin や Bcl-2の発現を低下させた。GANT61は, すべての細胞株で Gli1, ALDH, Slug の発現を低下し, 癌幹細胞比率を低下させた。以上の結果は, GANT61が甲状腺低分化・未分化癌細胞の survivin や Bcl-2発現低下を介してアポトーシス誘導し, 細胞増殖を抑制し, さらに, Hh シグナル標的因子 Gli1, ALDH, Slug の発現低下により癌幹細胞の自己再生能を抑制することを示唆している。さらに GANT61は, すべての甲状腺癌細胞株においてパクリタキセルの細胞増殖抑制効果を増強した。これらの基礎研究の結果は, GANT61が甲状腺低分化・未分化癌の新規治療薬として有望なことを示唆している。

doi:10.11482/KMJ-J44(2)95 (平成30年7月12日受理)

キーワード: 甲状腺癌細胞, ヘッジホッグ阻害薬, 抗腫瘍効果, 癌幹細胞, パクリタキセル

緒言

甲状腺分化癌は予後良好であるが、甲状腺低

分化癌・未分化癌は、生物学的悪性度が高く、急速に進行することが多く、予後不良である。

別刷請求先

紅林 淳一

〒701-0192 倉敷市松島577

川崎医科大学乳腺甲状腺外科学

電話: 086 (462) 1111

ファックス: 086 (462) 1199

Eメール: kure@med.kawasaki-m.ac.jp

進行・再発甲状腺分化癌や低分化・未分化癌の治療として抗癌化学療法が試みられているが、有効性は低い。また、マルチキナーゼ阻害剤(ソラフェニブ、レンバチニブ)が進行・再発甲状腺癌に応用されているが、無増悪生存期間の延長に寄与しているものの治癒や長期の生存は期待できない^{1, 2)}。従って、進行・再発甲状腺分化癌や低分化・未分化癌に対する新規治療法の開発が急務である。

固形腫瘍においても癌幹細胞 (cancer stem cell, 以下 CSC) が存在し、転移・再発や放射線療法・薬物療法に対する抵抗性の誘導に寄与することが示されている。CSCの制御が可能であれば、転移・再発の予防や治療抵抗性の克服に役立つ³⁾。また、CSCを制御できる薬剤と標準治療薬(主に non-CSCを制御)を併用することにより、“total cell kill”の達成や治療抵抗性発生の遅延による「根治」や「治療効果の延長」が期待できる。従って、CSC制御を可能とする新規薬剤の開発が望まれる。

甲状腺癌は正常甲状腺組織と比較して、ヘッジホッグ(以下 Hh)シグナル伝達因子発現の亢進が認められ、その発現は臨床病理学的悪性度と相関していることが示唆されている⁴⁻⁶⁾。Hh経路には canonical 経路の他に non-canonical 経路が存在する⁷⁾。canonical 経路の Smoothened を阻害する薬剤が、基底細胞癌の治療薬として臨床応用されているが、早期に耐性を獲得することが報告されている⁸⁾。GANT61は canonical 経路ばかりでなく non-canonical 経路も阻害するため耐性が生じにくいと考えられている^{9, 10)}。そこで我々は、甲状腺癌細胞株に対する GANT61の抗腫瘍効果並び

に CSC 制御作用を検討した。さらに、甲状腺癌の標準治療薬の一つパクリタキセルとの併用効果についても検討した。

材料と方法

甲状腺癌細胞株

甲状腺低分化乳頭癌細胞株 KTC-1, 甲状腺未分化癌細胞株 KTC-2と KTC-3は、すべて日本人の進行甲状腺癌患者の癌性胸水を用いて、当教室で樹立された^{11, 12)}。それぞれの細胞株の特徴を表1にまとめる。すべて細胞株は、RPMI1640培養液 (SIGMA Co., St. Louis, USA) に5%牛胎児血清(以下 FBS, SIGMA Co.)を添加した培地を用い37℃, 5% CO₂下で培養を行った。

細胞増殖と薬剤

KTC-1, KTC-2, KTC-3細胞に対する GANT61 (CAYMAN CHEMICAL, Ann Arbor, MI, USA) 及びパクリタキセル (Sigma Co.) の細胞増殖に与える影響を調べるために、24穴プレート (SB Medical, Tokyo, Japan) に撒き (KTC-1細胞: 1穴あたり 2×10^5 個, KTC-2細胞: 1穴あたり 1×10^6 個, KTC-3細胞: 1穴あたり 1×10^5 個), 10% FBS 含有 RPMI1640培地 (SIGMA Co.) を用い37℃, 5% CO₂下で24時間培養した。リン酸緩衝液(以下 PBS)で洗浄後、10% FBS 含有 RPMI1640培地と各濃度の GANT61とパクリタキセルを加えて培養した。パクリタキセルは4時間暴露し、その後 PBS で洗浄、新たな培地で合計72時間培養した。GANT61は72時間連続暴露した。0.05%トリプシン (SIGMA Co.), 0.02% EDTA 入り PBS で細胞を分散後

表1 甲状腺癌細胞株の特徴^{10, 11)}

細胞株	KTC-1	KTC-2	KTC-3
組織型	甲状腺低分化乳頭癌	甲状腺未分化癌	甲状腺未分化癌
増殖形態	単層	単層	単層
倍化時間(時間)	48	36	24
染色体数	46, XY	102-124 (最頻値 109)	140-151 (最頻値 146)
サイログロブリン発現	弱	微弱	微弱
遺伝子異常	BRAF (V600E) 変異		

にコールターカウンター (Coulter Electronics, Harpenden, UK) で細胞数を計測した. 再現性は少なくとも2回の実験で確認した.

2つの薬剤の併用効果を評価するために, 薬剤併用時と単独投与時の50%増殖阻止濃度 (以下 IC_{50}) を計算し, IC_{50} が併用時に50%超低下した場合, 抗腫瘍効果の増強効果があると判定した.

細胞周期解析

6穴プレート (SB Medical) に細胞を撒き, 48時間後に薬剤を加え, さらに48時間後にトリプシン /EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) 入り PBS で細胞を回収した. PBS 中に 1.0×10^6 個/ml になるように細胞数を調整し, CycleTest Plus DNA Reagent キット (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) を用いて製造会社の指示に従いヨウ化プロピジウムで DNA を染色した. FACSCalibur フローサイトメーター (Becton Dickinson) でフローサイトメトリーを行い, 得られた DNA ヒストグラムを CELLQuestバージョン1.2.2 (Becton Dickinson) を用いて分析した¹³⁾.

アポトーシス解析

6穴プレートに細胞を撒き, 48時間後に薬剤を加え, さらに48時間後にトリプシン /EDTA 入り PBS で細胞を回収した. PBS 中に 1.0×10^6 個/ml になるように細胞数を調整し, アネキシン-V-FLUOS 染色キット (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany) を用いて製造会社の指示に従い染色した. FACSCalibur フローサイトメーターによりアポトーシス分画の比率を測定した¹³⁾.

甲状腺癌幹細胞解析

甲状腺癌幹細胞は aldehyde dehydrogenase (以下 ALDH) 活性を指標とした Aldefluor アッセイと足場非依存性のコロニー形成能を指標とした Thyrosphere アッセイの2種類の方法で解析した.

Aldefluor アッセイでは, ALDEFLUOR キット (StemCell Technologies, Durham, NC, USA) を用いて ALDH 酵素活性を示す細胞集団を製造会社の指示に従い同定した. 陰性対照として, 細胞を ALDH 阻害剤 (50 mmol/l ジエチルアミノベンズアルデヒド) で処理した¹³⁾.

Thyrosphere アッセイでは, 甲状腺癌細胞 (1.5×10^5 個) を 100×35 mm ディッシュ (SB Medical) に撒き, FBS 含有 RPMI1640 培地で 37°C , 5% CO_2 下で24時間培養した. PBS で洗浄した後, 各種濃度の GANT61 で処理した. GANT61 は72時間連続暴露した. 次いで, これらの細胞を分散し, 10% MammoCultTM (STEMCELL Technologies Co., Vancouver, Canada) を補充した MammoCult 基礎培地 (STEMCELL Technologies Co.) を用い, 非接着プレート (CORNING Co., Corning, NY, USA) に播き, さらに7日間培養した. オリンパス位相差顕微鏡を用いて直径 $60 \mu\text{m}$ 以上のコロニー数を計測した¹³⁾.

ウエスタンブロット

プロテアーゼ阻害薬及びフォスファターゼ阻害薬を含んだ Pierce RIPA Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で細胞から蛋白抽出を行った. KTC-1 と KTC-3 細胞の蛋白抽出時には超音波破碎処理を行った. 総蛋白濃度は Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific) を使って測定した. 抽出蛋白は 5-20% SDS (Sodium dodecyl sulfate)-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) で分離し, Immobilon-FL (Merck Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) に転写した. Membrane は室温で1時間 blocking buffer (5% 牛血清アルブミン in 1x Tris buffer saline with 0.1% Tween 20) でブロックした後に, 一次抗体と 4°C 下で一晩静置し, その後, 室温で二次抗体を反応させた. ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Tokyo, Japan) を用いて標的蛋白を可視化した. コントロールには β -アクチン (SIGMA Co.) を使用した. 一

次抗体としては、抗 Gli1モノクローナル抗体 (Cell Signaling TECHNOLOGY Japan, Tokyo, Japan), 抗 ALDH モノクローナル抗体 (BD Transduction Laboratories, San Jose, CA, USA), 抗 Snail モノクローナル抗体 (Abcam, Tokyo, Japan), 抗 Slug モノクローナル抗体 (ABGENT, San Diego, CA, USA), 抗 survivin モノクローナル抗体 (Cell Signaling TECHNOLOGY Japan), 抗 Bcl-2モノクローナル抗体 (Cell Signaling TECHNOLOGY Japan) を用いた。二次抗体であるヤギ抗ウサギ IgG-HRP およびヤギ抗マウス IgG-HRP は Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA) から購入した。特異的なバンドを Amersham ECL Prime (GE Healthcare Japan) を用いて可視化し、Quantity One 1-D 分析ソフトウェア ver.4.5 (BIORAD, Tokyo, Japan) で解析した。

統計学的処理

全ての値は平均値 \pm SE で表した。StatView コンピュータソフトウェア (ATMS Co., Tokyo, Japan) を用いた分散分析を用いて、群間の差異を比較した。P < 0.05 を有意差ありとした。

結果

GANT61の細胞増殖抑制効果

GANT61は全ての甲状腺癌細胞株 (KTC-1, KTC-2, KTC-3) に対して用量依存性に増殖を抑制し、IC₅₀はそれぞれ $17.20 \pm 1.57 \mu\text{M}$, $13.59 \pm 0.23 \mu\text{M}$, $16.88 \pm 0.83 \mu\text{M}$ であった (図 1 A - C)。

GANT61の細胞周期, アポトーシス, アポトーシス関連因子への影響

5 ~ 20 μM GANT61は、KTC-1及び KTC-2細胞の sub-G1分画を若干増加したが、有意の G1-S ブロック (G1期分画の細胞比率の増加や S 期分画の細胞比率の低下) は起こさなかった (図 1 D, 1 E)。なお、KTC-3細胞はポリクローナルな細胞集団が認められ、細胞周期の解析は困難であった (図は非提示)。代表的な細胞周

期のヒストグラムを図 1 I, 1 J に示す。

5 ~ 20 μM GANT61は、全ての細胞株において用量依存性にアポトーシス分画を増加した (図 1F-H)。10 μM GANT61によりアポトーシス分画の細胞比率は、KTC-1細胞ではコントロールに比べ9.5倍、KTC-2細胞では3.2倍、KTC-3細胞では1.7倍に増加した。代表的なアポトーシス解析のドットプロットを図 1K, 1L に示す。

5 ~ 20 μM GANT61は、すべての細胞株において用量依存性に抗アポトーシス蛋白 survivin の発現を用量依存性に有意に低下させ、20 μM GANT61により Bcl-2の発現も KTC-2及び KTC-3細胞において有意に低下した (図 2 A, 2 B)。

GANT61の CSC 制御作用

Aldefluor アッセイにおいて GANT61は、全ての細胞株で用量依存性に ALDH 陽性細胞の比率を低下した (図 3 A - C)。10 μM GANT61により ALDH 陽性細胞の比率は、KTC-1細胞ではコントロールに比べ19.9%, KTC-2細胞では51.7%, KTC-3細胞では28.3%に減少した。代表的なアッセイ結果を図 3 G に示す。

Thyrosphere アッセイにおいても GANT61は、全ての細胞株で用量依存性にコロニー形成数を低下させた (図 3 D - F)。10 μM GANT61によりコロニー数は、KTC-1細胞ではコントロールに比べ63.5%, KTC-2細胞では56.4%, KTC-3細胞では56.6%に減少した。しかし、コロニーの大きさには明らかな変化は見られなかった (図 3 H, KTC-3細胞の実験結果, KTC-1, KTC-2細胞も同様の結果を示した)。

GANT61の Gli1, CSC 関連因子発現への影響

全ての甲状腺癌細胞株において Gli の発現が検出された。10 μM 以上の GANT61は KTC-1, KTC-2細胞の Gli1の発現を有意に低下させ、KTC-3細胞においても同様の傾向がみられた (図 4 A)。

さらに、癌幹細胞関連因子 ALDH, Snail, Slug の発現を検討した。5 ~ 20 μM GANT61に

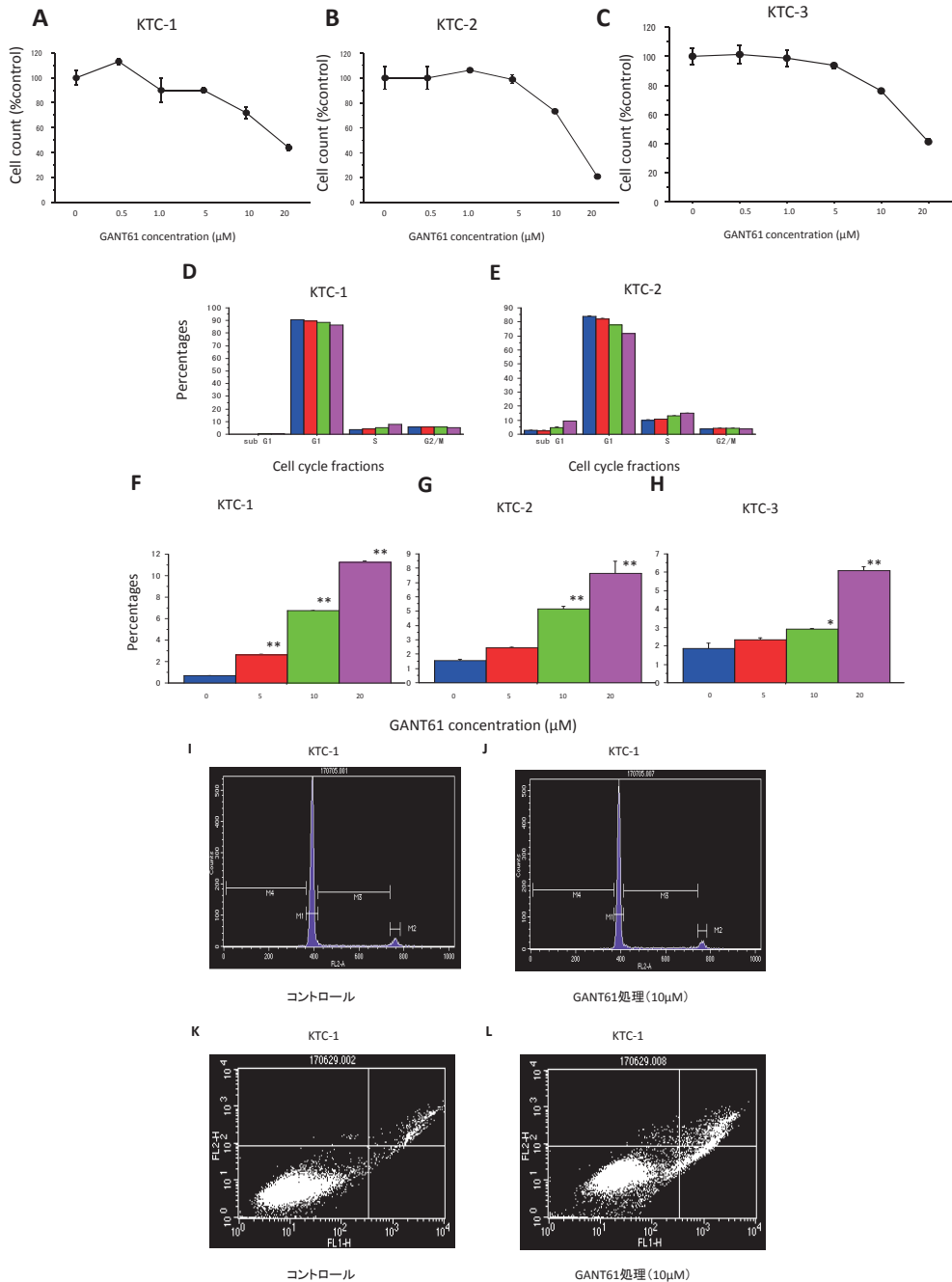


図 1

A - C: GANT61による甲状腺癌細胞の増殖抑制効果 (A: KTC-1細胞, B: KTC-2細胞, C: KTC-3細胞); ●: 平均値, バー: ± SE

D, E: GANT61が甲状腺癌細胞の細胞周期に与える影響 (D: KTC-1細胞, E: KTC-2細胞); カラム: 平均値, バー: ± SE, 青: 0 μM GANT61処理, 赤: 5 μM GANT61処理, 黄緑: 10 μM GANT61処理, 紫: 20 μM GANT61処理

F - H: GANT61が甲状腺癌細胞のアポトーシスに与える影響 (F: KTC-1細胞, G: KTC-2細胞, H: KTC-3細胞); カラム: 平均値, バー: ± SE, *: P < 0.05, **: P < 0.01, 青: 0 μM GANT61処理, 赤: 5 μM GANT61処理, 黄緑: 10 μM GANT61処理, 紫: 20 μM GANT61処理

I, J: KTC-1細胞の細胞周期ヒストグラム (I: コントロール, J: 10 μM GANT61処理)

K, L: KTC-1細胞のアポトーシス解析のドットプロット (K: コントロール, L: 10 μM GANT61処理)

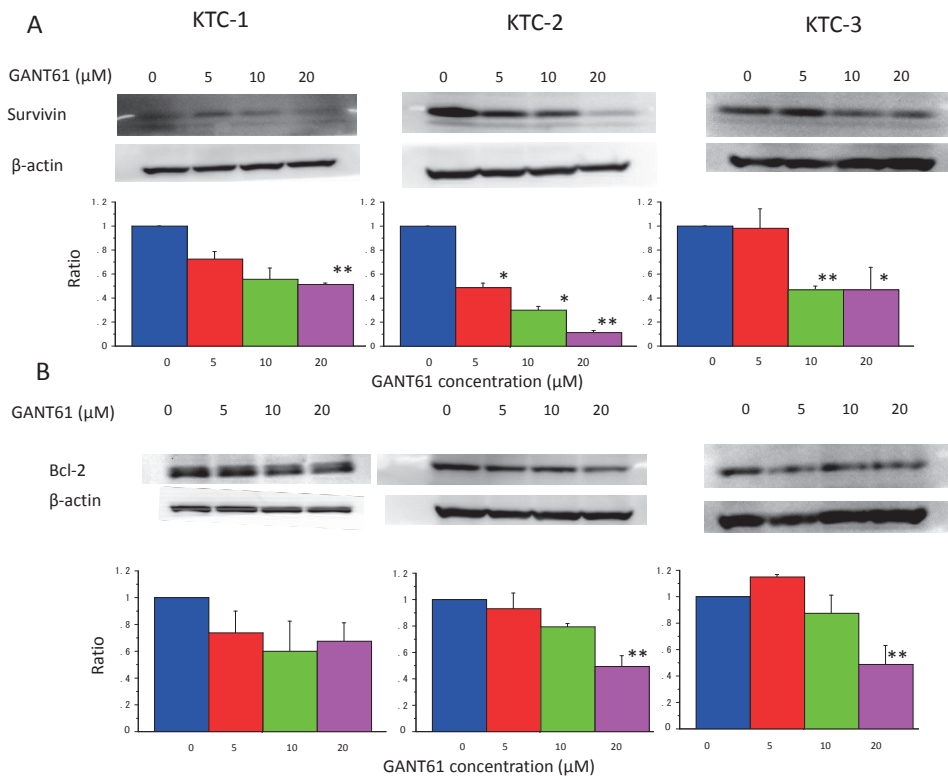


図2

A: GANT61が甲状腺癌細胞の survivin 発現に与える影響；上段は代表的なウエスタンブロット，下段は発現比のグラフ（平均値±SE），*：P<0.05，**：P<0.01，青：0 μM GANT61処理，赤：5 μM GANT61処理，黄緑：10 μM GANT61処理，紫：20 μM GANT61処理

B: GANT61が甲状腺癌細胞の Bcl-2発現に与える影響；上段は代表的なウエスタンブロット，下段は発現比のグラフ（平均値±SE），*：P<0.05，**：P<0.01，青：0 μM GANT61処理，赤：5 μM GANT61処理，黄緑：10 μM GANT61処理，紫：20 μM GANT61処理

より全ての細胞株ではほぼ用量依存性に ALDH と Slug の発現が抑制されたが，Snail の発現の低下は見られなかった（図4 B-D）。

GANT61とパクリタキセルとの併用効果

パクリタキセル単剤における KTC-1, KTC-2, KTC-3細胞の IC₅₀がそれぞれ27.95±6.92 nM, 6.38±0.05 nM, 51.25±9.77 nMであった。GANT61を10 μM 同時併用することによって IC₅₀は，各々66%，79%，87%低下し，抗腫瘍効果が増強された（図5）。

考 察

甲状腺癌は最も一般的な内分泌癌であり，

画像診断の進歩に伴って発症率が増加している¹⁴⁾。甲状腺分化癌は一般的に予後良好であるが，15-20%で再発を起こし，ヨウ素内用療法抵抗性であると治療に難渋する。一方，低分化癌・未分化癌は極めて予後不良であり，とくに未分化癌の平均生存期間は2-6ヶ月である¹⁵⁾。

Hh経路は胎生期の器官の発生に重要な役割を果たしているが，成人の正常細胞では発現はほとんど認められない。しかし，乳癌・肺癌・膵癌・前立腺癌・白血病・基底膜細胞癌などの様々な癌腫では Hh 経路の異常活性が認められている⁹⁾。甲状腺乳頭癌の手術標本を用いた Hh 経路関連因子の免疫組織化学的な検討では，

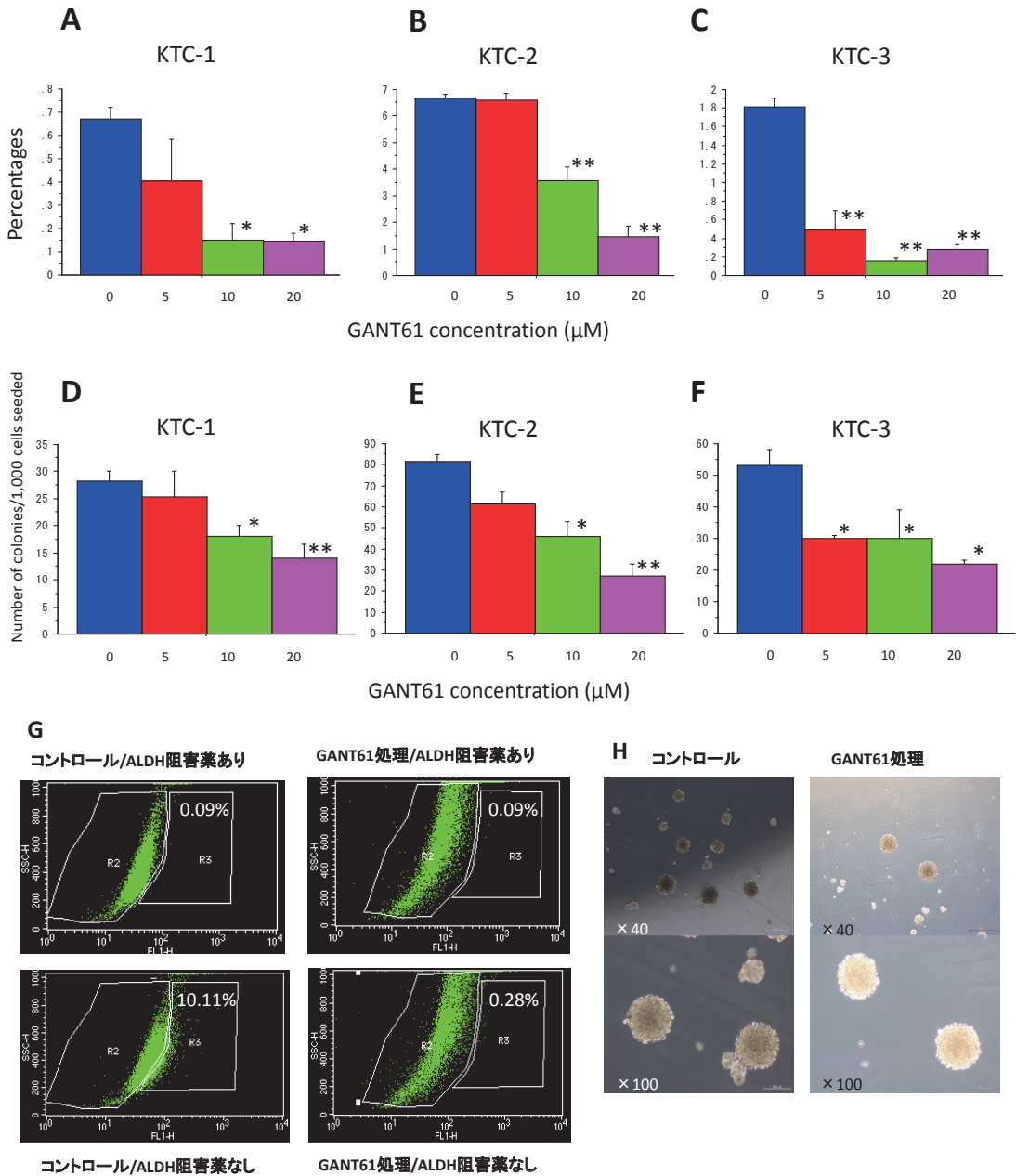


図 3

A-C: GANT61がAldefluor法による甲状腺癌幹細胞比率に与える影響 (A: KTC-1細胞, B: KTC-2細胞, C: KTC-3細胞); カラム: 平均値, バー: ± SE, *: P<0.05, **: P<0.01, 青: 0 μM GANT61処理, 赤: 5 μM GANT61処理, 黄緑: 10 μM GANT61処理, 紫: 20 μM GANT61処理

D-F: GANT61がThyrosphere法による甲状腺癌幹細胞比率に与える影響 (D: KTC-1細胞, E: KTC-2細胞, F: KTC-3細胞); カラム: 平均値, バー: ± SE, *: P<0.05, **: P<0.01, 青: 0 μM GANT61処理, 赤: 5 μM GANT61処理, 黄緑: 10 μM GANT61処理, 紫: 20 μM GANT61処理

G: 未処理 KTC-3細胞の Aldefluor アッセイのドットプロット (左上段: ALDH 阻害薬あり, 左下段: ALDH 阻害薬なし); 20 μM GANT61処理後の KTC-3細胞の Aldefluor アッセイのドットプロット (右上段: ALDH 阻害薬あり, 右下段: ALDH 阻害薬なし)

H: Thyrosphere アッセイ時の位相差顕微鏡写真 (左上段: コントロール x 40, 左下段: コントロール x 100, 右上段: GANT61処理後 x 40, 右下段: GANT61処理 x 100)

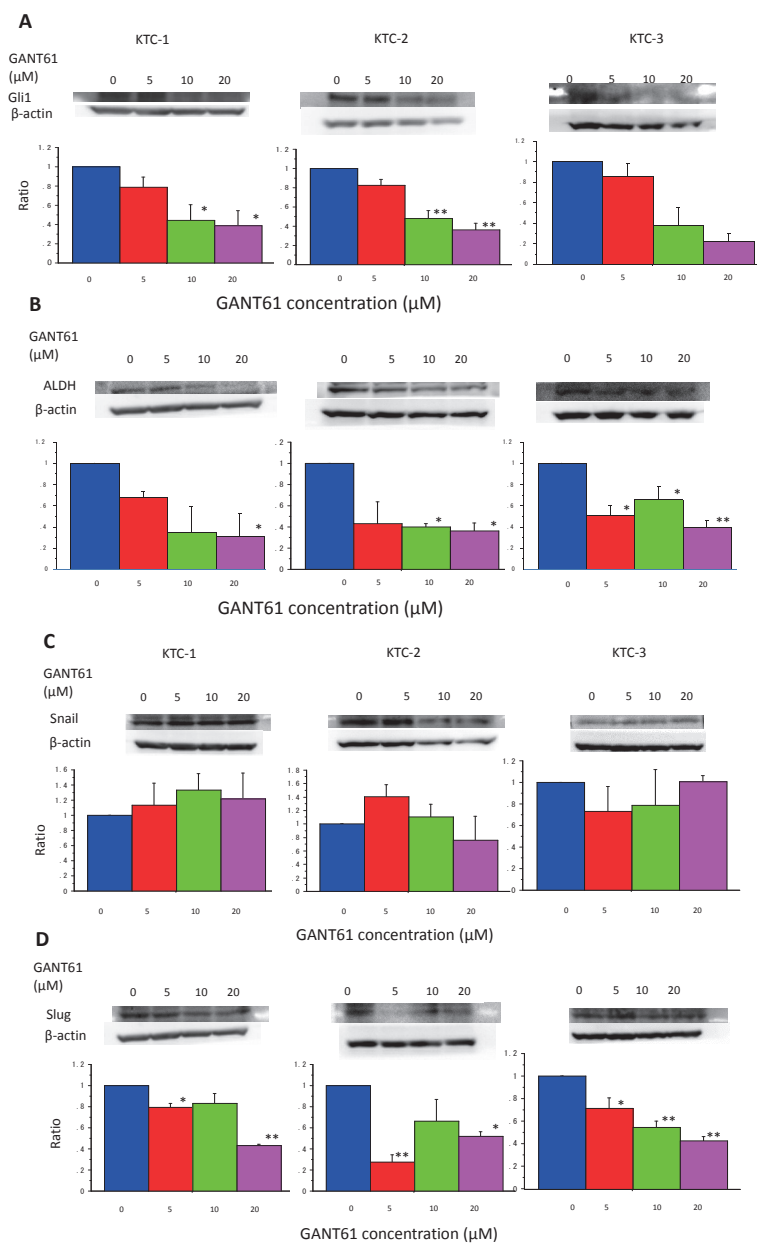


図 4

A: GANT61が甲状腺癌細胞の Gli1 発現に与える影響; 上段は代表的なウエスタンブロット, 下段は発現比のグラフ (平均値 ± SE), *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 青: $0 \mu\text{M}$ GANT61 処理, 赤: $5 \mu\text{M}$ GANT61 処理, 黄緑: $10 \mu\text{M}$ GANT61 処理, 紫: $20 \mu\text{M}$ GANT61 処理

B: GANT61が甲状腺癌細胞の ALDH 発現に与える影響; 上段は代表的なウエスタンブロット, 下段は発現比のグラフ (平均値 ± SE), *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 青: $0 \mu\text{M}$ GANT61 処理, 赤: $5 \mu\text{M}$ GANT61 処理, 黄緑: $10 \mu\text{M}$ GANT61 処理, 紫: $20 \mu\text{M}$ GANT61 処理

C: GANT61が甲状腺癌細胞の Snail 発現に与える影響; 上段は代表的なウエスタンブロット, 下段は発現比のグラフ (平均値 ± SE), 青: $0 \mu\text{M}$ GANT61 処理, 赤: $5 \mu\text{M}$ GANT61 処理, 黄緑: $10 \mu\text{M}$ GANT61 処理, 紫: $20 \mu\text{M}$ GANT61 処理

D: GANT61が甲状腺癌細胞の Slug 発現に与える影響; 上段は代表的なウエスタンブロット, 下段は発現比のグラフ (平均値 ± SE), *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 青: $0 \mu\text{M}$ GANT61 処理, 赤: $5 \mu\text{M}$ GANT61 処理, 黄緑: $10 \mu\text{M}$ GANT61 処理, 紫: $20 \mu\text{M}$ GANT61 処理

隣接する甲状腺正常組織と比較すると腫瘍細胞において有意に高発現が認められ (sonic Hh [SHH] の陽性率は, 甲状腺乳頭癌で64.1%, 正常組織で16.9%, Gli1の陽性率は, 甲状腺乳頭癌で47.9%, 正常組織で9.2%), 腫瘍径, 病期, リンパ節転移などの予後不良因子と相関していた⁴⁾. 同様に Dong W らの報告でも Hh 経路関連因子は腫瘍細胞で有意に高発現が認められ (SHH の陽性率は, 甲状腺乳頭癌で70.1%, 正常組織で18.3%, Gli1の陽性率は, 甲状腺乳頭癌で64.0%, 正常組織で14.6%), 腫瘍径, 被膜外浸潤, リンパ節転移, TNM 病期と正の相関を示していた⁵⁾. また, 未分化癌の生検標本でも免疫組織化学的に検討されており, 正常組織は染色されなかったが, 未分化癌では SHH が41%, Gli1が65%で陽性であった⁶⁾.

Hh 経路は, Hh リガンドが Patched-1 に結合することにより Smoothed の抑制がはずれ, その下流にある SUFU (Suppressor of Fused) から Gli が離れて細胞質から核内に移行し, 標的遺伝子の転写活性が起こる. この canonical 経路とは別に, Ras-Raf-MEK-ERK 経路や PI3K-AKT 経路などを介して Gli が活性化される non-canonical 経路も報告されている⁹⁾. 今回我々は canonical 経路とともに non-canonical 経路も阻害できる Gli 阻害薬の GANT61 を使用して研究を行った. GANT61 は全ての甲状腺癌細胞株 (KTC-1, KTC-2, KTC-3) に対して用量依存性に細胞増殖を抑制し, IC₅₀ はそれぞれ 15 μ M 前後であり, 細胞間で抑制効果に有意な差は見られなかった (図 1). 細胞周期についても検討したが, 低分化乳頭癌の KTC-1, 未分化癌の KTC-2 ともに G1-S ブロックは起こさなかった (図 1). Kato Y らによれば Gli の標的遺伝子に cyclin D も含まれる¹⁶⁾ としており, 実際に我々の乳癌細胞における研究^{17, 18)} では, G1-S 移行阻害を起こし細胞周期を遅延させていたが, 今回の甲状腺癌細胞株を用いた検討では影響は少なかった. 一方, アポトーシスに関しては, 全ての細胞株で用量依存性にアポトーシスを誘導した (図 1). また, 抗アポトーシ

ス蛋白である survivin は全ての細胞株で, Bcl-2 は KTC-2 と KTC-3 で発現の低下を認めた (図 2). Gli の標的遺伝子の中に Bcl-2 や survivin も含まれており¹⁶⁾, GANT61 の Gli1 標的遺伝子の転写阻害によりアポトーシスが誘導されたことが推測される.

CSC は自己複製能と多分化能を有することが特徴的であり, 通常の癌組織においては少数で, 静止的なものとされている. 通常の抗癌治療では増殖能の高い非癌幹細胞を攻撃することによって治療効果を発揮するが, CSC に対しては効果が少なく, 残存してしまう. そして残存した CSC が転移・再発の原因となると推測されている⁹⁾. そこで, GANT61 の CSC への影響を調べるために Aldefluor アッセイと Thyrosphere アッセイの二つに異なるアッセイ系を用いて検討した.

癌幹細胞は ALDH 酵素が活性化されており, ALDH 酵素の活性を測定して CSC を同定する蛍光検出法が Aldefluor アッセイである. Aldefluor アッセイは, CSC を単離するために広く用いられており, 甲状腺癌の他に肺, 肝臓, 骨, 結腸, 膵臓, 前立腺, 頭頸部, 膀胱, 脳, 子宮頸部の癌や悪性黒色腫で使用されている. 一方, Thyrosphere アッセイは, プレートの表面に細胞が接着できない条件で培養し, 非 CSC はコロニーを形成することはできないが, CSC はコロニーを形成することが可能であるため, 形成されたコロニー数を CSC 細胞数として評価する検査法である.

今回の研究結果では, GANT61 は細胞増殖を抑制するばかりでなく, CSC の比率を低下させることが明らかとなった (図 3). これは Heiden KB らの報告と同様の結果であった¹⁹⁾. 彼らは甲状腺未分化癌細胞株 KAT-18 の Gli1 や SHH 発現を small interfering RNA を用い抑制したときの Thyrosphere アッセイにおけるコロニー数の減少とともにコロニーの大きさの縮小を報告している. 今回の検討では, GANT61 による Gli1 機能の抑制では, コロニー数は減少するものの, コロニーの大きさに明らかな変化は

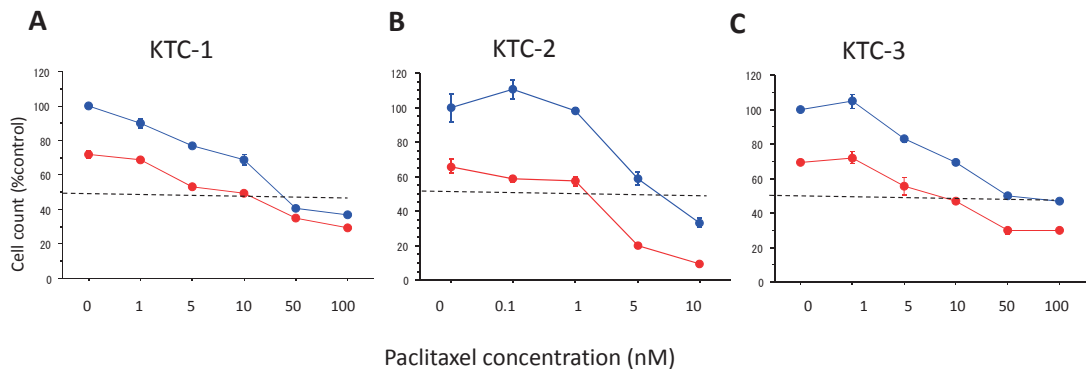


図5

GANT61がパクリタキセルによる甲状腺癌細胞の増殖抑制効果に与える影響 (A: KTC-1細胞, B: KTC-2細胞, C: KTC-3細胞); 青線: パクリタキセル単独投与, 赤線: GANT61の併用投与, ●: 平均値, バー: ±SE, 破線: 50% 抑制ライン

認めなかった (図3). コロニーの大きさの違いは, 使用した甲状腺癌細胞株が異なることが原因か, Gli1やSHH発現抑制の作用機構の違いに起因しているのかは不明である.

Gli1の標的遺伝子には, ALDH, Snail, Slugが含まれ, これらの因子を介してCSCの生存や増殖に影響を与えると報告されている¹⁶⁾. 今回の検討では, GANT61によりALDHやSlugの蛋白発現は抑制されたが, Snailの発現には有意の変化を認めなかった (図4). 前述のように, GANT61は, 甲状腺癌細胞のCSC比率を有意に, 用量依存性に低下しており, Gli1の標的遺伝子群の複合的な変化がGANT61のCSC制御に関わっていると思われる.

米国甲状腺学会ガイドラインによれば未分化癌に対して放射線照射とともにパクリタキセルを併用することが薦められており²⁰⁾, パクリタキセルは進行・再発甲状腺癌, とくに未分化癌では広く使われているが, 単独投与では十分な治療効果は得られていない. また, パクリタキセルにGANT61を併用した研究の報告はこれまでに認められない. 今回の研究結果では, パクリタキセル単剤投与と比較するとGANT61を併用することにより, 明らかな抗腫瘍効果の増強が認められた (図5).

結語

GANT61は甲状腺低分化・未分化癌細胞に対して抗腫瘍効果を示すとともにCSCの比率を低下させた. また, パクリタキセルとの併用によって抗腫瘍効果を増強した. これらの結果は, GANT61などのHh阻害薬が, 治療に難渋する甲状腺低分化・未分化癌の新規治療薬として有望なことを示唆している.

利益相反

紅林淳一は, 武田薬品工業 (株), 中外製薬 (株) より講演料等, 武田薬品工業 (株), エーザイ (株), 中外製薬 (株) より奨学寄付金等を得ており, 田中克浩はエーザイ (株) から講演料等と奨学寄付金等を得ているが, 本研究とは無関係である. その他の著者に利益相反状態はない.

謝辞

本研究は, 川崎医科大学プロジェクト研究費 (265, 27-1), 科学研究費補助金 (26461964) の援助を受けて行われた. 本研究の実験の補助を行って下さった坪井薫様, 小郷愛様に深謝します.

引用文献

- 1) Brose MS, Nutting CM, Jarzab B, *et al.*: Sorafenib in radioactive iodine-refractory, locally advanced or metastatic differentiated thyroid cancer: a randomized, double-blind, phase 3 trial. *Lancet* 384: 319-328, 2014

- 2) Schlumberger M, Tahara M, Wirth LJ, *et al.*: Lenvatinib versus placebo in radioiodine-refractory thyroid cancer. *N Engl J Med* 372: 621-630, 2015
- 3) Vicari L, Colarossi C, Giuffrida D, De Maria R, Memeo L: Cancer stem cells as a potential therapeutic target in thyroid carcinoma. *Oncol Lett* 12: 2254-2260, 2016
- 4) Bian XH, Sun H, Xue H, Zhang G, Zhang CH, Liu XL, Su J, Li SJ: Expression and clinical significance of Shh/Gli-1 in papillary thyroid carcinoma. *Tumor Biol* 35 : 10523-10528, 2014
- 5) Dong W, Cui J, Tian X, He L, Wang Z, Zhang P, Zhang H: Aberrant sonic hedgehog signaling pathway and STAT3 activation in papillary thyroid cancer. *Int J Clin Exp Med* 7: 1786-1793, 2014
- 6) Hinterseher U, Wunderlich A, Roth S, Ramaswamy A, Bartsch DK, Hauptmann S, Greene BH, Fendrich V, Hoffmann S: Expression of hedgehog signalling pathway in anaplastic thyroid cancer. *Endocrine* 45 : 439-447, 2014
- 7) Xu X, Lu Y, Li Y, Prinz RA: Sonic Hedgehog Signaling in Thyroid Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8: 284, 2017
- 8) Sharpe HJ, PauG, Dijkgraaf GJ, *et al.*: Genomic analysis of smoothed inhibitor resistance in basal cell carcinoma. *Cancer Cell* 27: 327-341, 2015
- 9) Gonnissen A, Isebaert S, Haustermans K: Targeting the Hedgehog signaling pathway in cancer: beyond Smoothed. *Oncotarget* 6: 13899-13913, 2015
- 10) Lauth M, Bergström A, Shimokawa T, Toftgård R: Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 8455-8460, 2007
- 11) Kurebayashi J, Tanaka K, Otsuki T, Moriya T, Kunisue H, Uno M, Sonoo H: All-trans-retinoic acid modulates expression levels of thyroglobulin and cytokines in a new human poorly differentiated papillary thyroid carcinoma cell line, KTC-1. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 2889-2896, 2000
- 12) Pushkarev VM, Starenki DV, Saenko VA, Namba H, Kurebayashi J, Tronko MD, Yamashita S: Molecular mechanisms of the effects of low concentrations of taxol in anaplastic thyroid cancer cells. *Endocrinology* 145: 3143-3152, 2004
- 13) Ohta Y, Koike Y, Saitoh W, Yamashita T, Tanaka K, Kanomata N, Moriya T, Kurebayashi J: Anti-cancer stem cell activity of the Src inhibitor dasatinib in thyroid cancer cells. *Kawasaki Medical Journal* 43 : 63-78, 2017
- 14) Cabanillas ME, McFadden DG, Durante C: Thyroid cancer. *Lancet* 388: 2783-2795, 2016
- 15) Xu B, Ghossein R: Genomic Landscape of poorly Differentiated and Anaplastic Thyroid Carcinoma. *Endocr Pathol* 27: 205-212, 2016
- 16) Katoh Y, Katoh M: Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr Mol Med* 9: 873-886, 2009
- 17) Kurebayashi J, Koike Y, Ohta Y, Saitoh W, Yamashita T, Kanomata N, Moriya T: Anti-cancer stem cell activity of a hedgehog inhibitor GANT61 in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Cancer Sci* 108: 918-930, 2017
- 18) Koike Y, Ohta Y, Saitoh W, Yamashita T, Kanomata N, Moriya T, Kurebayashi J: Anti-cell growth and anti-cancer stem cell activities of the non-canonical hedgehog inhibitor GANT61 in triple-negative breast cancer cells. *Breast Cancer* 24: 683-693, 2017
- 19) Heiden KB, Williamson AJ, Doscas ME, Ye J, Wang Y, Liu D, Xing M, Prinz RA, Xu X: The sonic hedgehog signaling pathway maintains the cancer stem cell self-renewal of anaplastic thyroid cancer by inducing snail expression. *J Clin Endocrinol Metab* 99: E2178-2187, 2014
- 20) Smallridge RC, Ain KB, Asa SL, *et al.*: American Thyroid Association guidelines for management of patients with anaplastic thyroid cancer. *Thyroid* 22: 1104-1139, 2012

〈Regular Article〉

Anti-cell growth and anti-cancer stem cell activity of the hedgehog inhibitor GANT61 in poorly and undifferentiated thyroid cancer cells

Wataru SAITOH¹⁾, Junichi KUREBAYASHI¹⁾, Katsuhiko TANAKA¹⁾, Yusuke OHTA¹⁾,
Yoshikazu KOIKE¹⁾, Emi KISHINO¹⁾, Naoki KANOMATA²⁾

1) Department of Breast and Thyroid Surgery, Kawasaki Medical School, 2) Department of Pathology, Kawasaki Medical School

ABSTRACT Patients with differentiated thyroid cancer have a good prognosis, but those with poorly-differentiated or undifferentiated thyroid cancer (PDTC or UDTC) do not. Thus, new therapeutics are urgently needed for PDTC and UDTC. As abnormal activation of the hedgehog (Hh) signaling pathway is observed in several malignancies, it is a promising therapeutic target. Activation of the Hh pathway is suggested to promote not only tumor survival, growth and angiogenesis, but also the growth of cancer stem cells (CSC). Therefore, we investigated the anti-cell growth and anti-CSC effects of the Hh inhibitor GANT61 in thyroid cancer cells. In addition, the combined anti-cell growth activity of GANT61 with an anti-thyroid cancer agent, paclitaxel, was evaluated. The effects of GANT61 on cell growth, cell cycle progression, apoptosis and CSC proportion using the Aldefluor and Thyrosphere assays were measured in the KTC-1 PDTC cell line, and KTC-2 and KTC-3 UDTC cell lines. All cell lines were established at our institute. We also examined the influence of GANT61 on the expression levels of the Hh effector glioma-associated oncogene (Gli) 1, its down-stream CSC-related molecules, aldehyde dehydrogenase (ALDH), Snail and Slug, and anti-apoptotic molecules, Bcl-2 and survivin. GANT61 dose-dependently inhibited the growth of all cell lines (mean 50% inhibitory concentrations: 17.2 μ M for KTC-1 cells, 13.6 μ M for KTC-2 cells and 13.3 μ M for KTC-3 cells) in association with increased apoptosis, and decreased expression of survivin and Bcl-2. Furthermore, the proportion of surviving CSC cells decreased with decreased expression of Gli1, ALDH and Slug. These results demonstrate that GANT61 induced apoptosis via decreased expression levels of survivin and Bcl-2, and inhibited cell growth in thyroid cancer cells. Moreover, GANT61 reduced the expression levels of Hh target genes, such as Gli1, ALDH and Slug, and inhibited CSC self-renewal. GANT61 also enhanced the anti-cell growth effects of paclitaxel in all three thyroid cancer cell lines. Therefore, GANT61 may be a promising antitumor therapy for patients with PDTC or UDC. *(Accepted on July 12, 2018)*

Key words : **Thyroid cancer cells, Hedgehog inhibitor, Anti-cell growth effect, Cancer stem cells, Paclitaxel**

Corresponding author
Junichi Kurebayashi
Department of Breast and Thyroid Surgery, Kawasaki
Medical School 577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192,
Japan

Phone : 81 86 462 1111
Fax : 81 86 462 1199
E-mail : kure@med.kawasaki-m.ac.jp