

Involvement of sonic hedgehog signaling pathway in the cell proliferation and apoptosis of ameloblastoma

神田, 詩織
九州大学大学院歯学府

<https://doi.org/10.15017/26336>

出版情報 : 九州大学, 2012, 博士 (歯学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :



エナメル上皮腫の細胞増殖およびアポトーシスにおける
sonic hedgehog シグナル経路の関与について

**Involvement of sonic hedgehog signaling pathway
in the cell proliferation and apoptosis of ameloblastoma**

2013 年

九州大学大学院歯学府口腔顎顔面病態学講座

顎顔面腫瘍制御学分野

神田 詩織

指導教員

九州大学大学院歯学府口腔顎顔面病態学講座

顎顔面腫瘍制御学分野

中村 誠司 教授

本研究の一部は下記の学術雑誌に投稿中である。

Possible involvement of sonic hedgehog signaling pathway in proliferation of ameloblastoma

Shiori Kanda, Takeshi Mitsuyasu, Yu Nakao, Shintaro Kawano, Yuichi Goto, Ryota Matsubara, Seiji Nakamura

submitted to **Oral Oncology**

2012年 第66回日本口腔科学会にて

「エナメル上皮腫の細胞増殖における SHH signaling 分子の関与」として本研究の一部を発表し、学会賞優秀発表賞を受賞した。

2012年 第57回日本口腔外科学会にて

「エナメル上皮腫の細胞増殖における SHH シグナル関連分子の関与」として本研究の一部を発表し、優秀ポスター賞を受賞した。

略語一覽

ANOVA: analysis of variance
BAX: Bcl-2-associated X
BCL2: B-cell lymphoma-2
BMP: bone morphogenetic protein
BPE: Bovine Pituitary Extract
BrdU: 5-bromo-2-deoxyuridine
cDNA: complementary DNA
DEPC: diethyl pyrocarbonate
FBS: fetal bovine serum
FGF: fibroblast growth factor
GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GLI: glioma associated oncogene homologue
HPV-16: human papilloma virus-16
IGF: insulin-like growth factor
IgG: immunoglobulin G
PBS: phosphate-buffered saline
PCR: polymerase chain reaction
PDGF: plate-derived growth factor
MAPK: mitogen-activated protein kinase
mRNA: messenger RNA
PTCH: patched
RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SHH: sonic hedgehog
SMO: smoothened
TNF: tumor necrosis factor
TUNEL: TdT-mediated dUTPnick end labeling
VEGF: vascular endothelial growth factor
WST: water soluble tetrazolium

目 次

要 旨	5
緒 言	8
材料および方法	11
結 果	21
研究 1	
エナメル上皮腫における SHH シグナル分子の発現と細胞増殖に 関する検討	
1-1. エナメル上皮腫切除材料における SHH シグナル分子の発現	21
1-2. AM-1 細胞における SHH シグナル分子の発現	23
1-3. SHH シグナル経路の阻害が AM-1 細胞の 細胞増殖に与える影響	26
研究 2	
AM-1 における SHH シグナル経路を介したアポトーシスに関する検討	
2-1. SHH シグナル経路の阻害が AM-1 細胞の アポトーシスに与える影響	30

2-2. SHH シグナル経路の阻害が AM-1 細胞の

アポトーシス関連分子に与える影響	32
考 察	34
謝 辞	39
参考文献	40

要 旨

エナメル上皮腫は顎骨に発生する頻度の高い良性腫瘍であり、歯胚と類似した組織像を示す歯原性腫瘍である。その成長は緩慢であるが、局所的に浸潤し、摘出手術ではしばしば再発するため、顎骨切除といった根治的な治療が選択され患者の QOL を著しく低下させることがある。このエナメル上皮腫の増殖のメカニズムに関しては不明な点が多く、これまで様々な増殖因子に関して研究が行われている。その中の 1 つである sonic hedgehog (SHH) シグナル経路は、リガンドである SHH が膜受容体の patched (PTCH) に結合することで、その下流にある転写因子の GLI 群が活性化され、転写の促進が起こる経路である。SHH は歯の発生を含む器官形成において非常に重要な役割を果たすことが知られている。さらに近年、様々な腫瘍においても SHH シグナル経路の活性化がその増殖に関与していることが報告されており、新たな治療法の標的分子としても注目されている。

そこで本研究では、エナメル上皮腫が歯原性腫瘍であることに着目し、SHH シグナル経路が細胞増殖機構に関与しているかどうかを明らかにするための検討を行った。

以下に本研究で得られた結果をまとめた。

1. エナメル上皮腫における SHH シグナル分子の発現と細胞増殖に関する検討

エナメル上皮腫切除材料とヒトエナメル上皮腫細胞株 (AM-1) を用いて、SHH シグナル経路を構成するリガンドの SHH、膜受容体の PTCH、転写因子の GLI1、GLI2 および GLI3 の発現を免疫化学的に局在について検討した。全

でのエナメル上皮腫切除材料と AM-1 において SHH は腫瘍細胞の細胞膜と細胞質に発現し、PTCH は腫瘍細胞の細胞膜に発現を認めた。GLI1、GLI2 および GLI3 は腫瘍細胞の細胞質と核に発現を認めたが、核により強く発現していた。また、AM-1 細胞を用いて SHH シグナル分子の mRNA の発現を検討したところ、SHH、PTCH、GLI1、GLI2 および GLI3 の発現を認めた。

次にエナメル上皮腫における増殖に関する検討を AM-1 細胞を用いて行った。AM-1 細胞に SHH 中和抗体または SHH シグナル分子の 1 つである smoothed (SMO) の阻害材である cyclopamine を添加し、細胞の増殖率および増殖活性の変化を検討した。その結果、SHH 中和抗体添加群と cyclopamine 添加群ともに対照群と比較して細胞増殖は有意に抑制されており、さらに増殖活性も有意に低下していた。また、AM-1 細胞に SHH 中和抗体を添加し GLI 群の局在を観察したところ、GLI1 および GLI2 は SHH 中和抗体添加群において核内への移行の阻害が認められ、GLI3 では両群ともほぼ核内に発現を認めた。

2.AM-1 細胞における SHH シグナル経路を介したアポトーシスに関する検討

AM-1 細胞を用いて、SHH 中和抗体により SHH シグナル経路を阻害した際のアポトーシスに関して検討を行った。アポトーシス細胞を検出する annexin V および TUNEL 染色を行ったところ、SHH 中和抗体添加群は対照群と比較して有意に陽性細胞率が高かった。また、抗アポトーシス分子である BCL-2 とアポトーシス促進分子である BAX の発現を検討したところ、有意差は認められなかったものの、SHH 中和抗体添加群では BCL2 の発現が減弱しており、BAX の発現は増強していた。

本研究により、エナメル上皮腫において SHH シグナル分子の発現を認め、特に GLI 群の核内での発現により SHH シグナル経路の活性化が示された。また SHH シグナル経路を阻害すると細胞増殖が抑制され、さらにアポトーシスの誘導を認めたことから、SHH シグナル経路は細胞増殖を制御する一方でアポトーシスに関与していることが示唆された。

緒 言

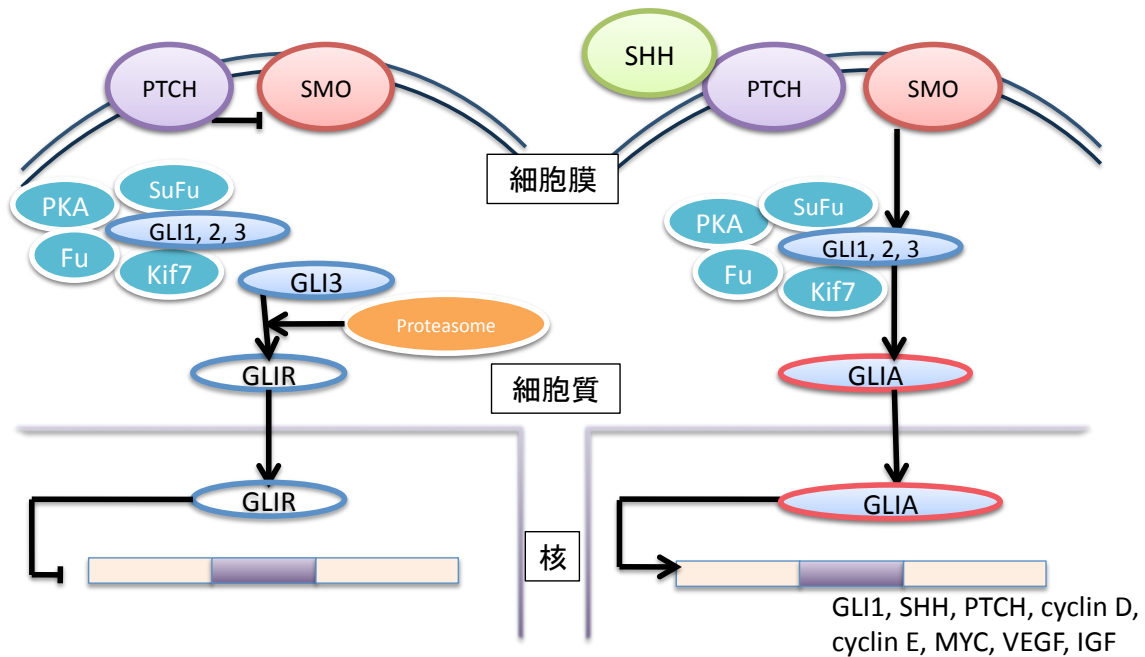
エナメル上皮腫は顎骨に発生する代表的な良性腫瘍であり、歯胚と類似した特異的な組織像を示す歯原性腫瘍である。エナメル上皮腫の成長は緩慢であるが、局所的に浸潤し、摘出手術ではしばしば再発をおこすため、顎骨切除といった根治的な治療が選択され患者の QOL の低下を招くことも少なくない。しかし、エナメル上皮腫の増殖、浸潤に関しては未だ不明な点が多い。

現在までに、エナメル上皮腫の増殖や分化には多様な因子の関与が報告されている。Kumamoto らは、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF)、インスリン様成長因子 (insulin-like growth factor: IGF) および血小板由来増殖因子 (plate-derived growth factor: PDGF) などに関してエナメル上皮腫切除材料を用いて免疫化学的に発現を検討し、増殖への関与の可能性を報告している (1, 2)。また、当科にて HPV-16 の遺伝子導入を行った不死化ヒトエナメル上皮腫細胞株 (AM-1) が樹立されてから研究の幅が広がり、Sandra らは成長因子である Midkine が、Hendarmin らは腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor: TNF) が、mitogen-activated protein kinase (MAPK) および AKT 経路を介しエナメル上皮腫の増殖と関与していると報告している (3, 4)。さらに、エナメル上皮腫が歯原性上皮由来の腫瘍であることに着目し、歯胚の形成時に関わる重要な因子である sonic hedgehog (SHH)、線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor: FGF)、骨形成因子 (bone morphogenetic protein: BMP) および WNT が増殖に関与していることも報告されている (5-13)。これらの因子の中でも SHH は、歯の発生の始まりである口腔上皮の肥厚から歯胚の形成までの一連の流れにおいて上皮-間葉相互作用の中で発現

し、上皮細胞の増殖や歯胚の形成に重要な役割を果たしている (12-14)。同様に肺、腎臓、四肢、毛髪などの器官の形成にも関与していることが知られており (15-17)、さらに近年では、胃癌、食道癌、大腸癌、肺癌、肝臓癌、乳癌、基底細胞癌、角化嚢胞性歯原性腫瘍など様々な腫瘍で SHH シグナル経路の活性化が腫瘍の増殖に深く関与していることが報告されている (7, 18-25)。

SHH シグナル経路の主な構成分子は、リガンドである SHH、SHH の受容体である 12 回膜貫通型タンパク質の patched (PTCH)、PTCH によって抑制される 7 回膜貫通型タンパク質の smoothed (SMO)、そしてその下流の転写因子である glioma associated oncogene homologue (GLI 群: GLI1、GLI2 および GLI3) である。この経路はリガンドである SHH がいない状態では、PTCH が SMO を抑制しており、経路の活性化は起こらない。そのため下流にある GLI1 と GLI2 は核内への移行が阻害されているが、GLI3 のみ protein kinase A や casein kinase 1 などによりプロセッシングされ抑制型 GLI (GLIR) として核内へ移行し、GLI1 や GLI2 の転写を抑制する (26-28)。一方、SHH は細胞内でパルミチン酸やコレステロールにより N 末端や C 末端に脂肪修飾を受けたのち細胞外へ分泌され、おおよそ細胞数個分に拡散する。分泌された SHH が受容体である PTCH へ結合すると PTCH と複合体を形成していた SMO の活性が亢進し、GLI 群は活性型 GLI (GLIA) として核内へ移行し標的遺伝子群の発現を活性化する (17, 24, 25)。GLIA の標的遺伝子としては、SHH シグナル分子自身 (SHH、PTCH、GLI 群)、細胞増殖を制御している分子 (cyclin D、cyclin E、MYC) および血管新生分子 (PDGF、VEGF) などが同定されている (22)。よって、この SHH シグナル経路は活性化され標的遺伝子の転写が促進されると、細胞の増殖が促進する経路であり、ゆえに腫瘍の増殖との関連

が示唆されている。



また、器官形成において SHH はモルフォゲンとして作用しているため、濃度勾配を形成することで増殖の促進のみではなく、必要な部分においてはアポトーシスが促進されており、この作用により形態形成が成り立つ (14, 29)。さらに、近年では器官形成と同様に腫瘍においても SHH シグナル経路とアポトーシスの関連が報告されている (23, 31, 32)。しかし今までにエナメル上皮腫において増殖とアポトーシスとの関連が示唆されているが (31-34)、SHH シグナル経路と関連づけた検討はされていない。

そこで本研究では、エナメル上皮腫の細胞増殖およびアポトーシスにおける SHH シグナル経路の関与を明らかにするために、まずエナメル上皮腫切除材料と AM-1 細胞を用いて、SHH シグナル分子の発現を検討した。次に、SHH シグナル経路を阻害することにより、AM-1 細胞の増殖およびアポトーシスに与える影響について検討した。

材料および方法

1. 対象患者

対象は、2002年4月から2010年3月に九州大学病院顎口腔外科を受診し、病理組織学的にエナメル上皮腫と診断された29例（男性：22例、女性：7例、平均年齢：37.8±19.4歳）であった（表1）。これらの切除材料を採取し、直ちに4%パラホルムアルデヒドに24～48時間固定後、パラフィン包埋を行った。ミクロトーム（Leica Microsystems, Japan）にて5μmの切片を作製し、免疫組織化学的染色に用いた。

表1 エナメル上皮腫患者29例の内訳

	症例数	(%)
性別		
男性	22	75.9
女性	7	24.1
発生部位		
下顎臼歯部	28	96.6
下顎前歯部	1	3.4
病理組織		
follicular	17	58.6
plexiform	12	41.4

2. 細胞培養

本研究では、エナメル上皮腫細胞株（AM-1）とヒト正常皮膚角化細胞株

HaCat を用いた。AM-1 細胞の培地には Keratinocyte-SFM (GIBCO, USA) にウシ胎児下垂体抽出物 (Bovine Pituitary Extract: BPE, GIBCO, USA)、100 units/ml ペニシリン/ストレプトマイシン (GIBCO, USA) および 20 units/ml ファンギゾン (GIBCO, USA) を添加したものを、37°C、5%CO₂ 存在下で細胞培養を行った。HaCat 細胞の培地には、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) /F-12 (Sigma-Aldrich, USA) に 10%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS, Sigma-Aldrich, USA)、100unit/ml のペニシリン/ストレプトマイシンを添加したものを、37°C、5% CO₂ 存在下で細胞培養を行った。

3. 免疫組織化学的染色法

作製したパラフィン切片をキシレンに 20 分間、さらに、100%、95%、85%、75%エタノールに各 5 分間浸漬させ、脱パラフィン処理および水和処理を行い、Target Retrieval Solution (Dako, Denmark) を用いて、抗原の賦活化処理 (121°C、5 分) を行った。切片をリン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline: PBS) にて洗浄後、内因性ペルオキシダーゼ除去のため、1.0%過酸化水素水を室温で 30 分反応させ、その後、抗体の非特異的吸着を防ぐために 10%ヤギ正常血清 (ヒストファインブロッキング試薬 II, Nichirei Bioscience, Japan) を室温で 30 分反応させ、一次抗体を 4°C で 18 時間反応させた。使用した一次抗体を表 2 に示す。二次抗体にはペルオキシダーゼ標識 IgG ポリクローナル抗体 (Nichirei Bioscience, Japan) を用い、室温で 1 時間反応させた。PBS にて 15 分間洗浄後、3, 3'-diaminobenzidine · 4HCl (DAB substrate kit: Nichirei Bioscience, Japan) にて可視化し、さらに、ヘマトキシリン (Mayer's

Hematoxylin Solution: Wako, Japan) を用いて対比染色を行った。その後 75%、85%、95%、100%エタノールに各 5 分間浸漬させ、脱水処理を行い、Malinol mounting medium (Muto Pure Chemicals, Japan) を用いて封入した。陰性対照として一次抗体の代わりに PBS を用いた。観察には光学生物顕微鏡 (BX50, Olympus, Japan, 対物レンズ ×10) を用いた。

表 2 免疫組織化学染色、免疫細胞化学染色、および Western blotting に使用した一次抗体

抗体	用途	希釈倍率
monoclonal rabbit anti-human SHH antibody (abcam, UK)	IHC, ICC	1:100
	WB	1:1000
polyclonal rabbit anti-human PTCH antibody (santa cruz, USA)	IHC, ICC	1:100
	WB	1:1000
polyclonal rabbit anti-human GLI1 antibody (abcam, USA)	IHC, ICC	1:80
	WB	1:1000
polyclonal rabbit anti-human GLI2 antibody (abcam, USA)	IHC, ICC	1:200
	WB	1:2000
polyclonal rabbit anti-human GLI3 antibody (Novus Biological, USA)	IHC, ICC	1:100
	WB	1:1000
polyclonal rabbit anti-human BCL2 antibody (Ana Spec, USA)	ICC	1:500
polyclonal rabbit anti-human BAX antibody (R&D systems, USA)	ICC	1:200
monoclonal mouse anti-human β -actin antibody (Sigma-aldrich, USA)	WB	1:2000

4. 免疫細胞化学的染色

AM-1 細胞をカルチャースライド (BD falcon, USA) 上で培養し、75%メタ

ノールで 20 分間固定を行った。次に、PBS にて 2 回洗浄後、抗体の非特異的吸着を防ぐために 10%ヤギ正常血清を室温で 30 分間反応させ、一次抗体を室温で 1 時間反応させた。使用した一次抗体を（表 3）に示す。PBS にて 5 分間で 3 回洗浄後、二次抗体として蛍光標識 IgG ポリクローナル抗体（Alexa Fluor®488, Molecular Probes, USA, 希釈倍率 1:400）を用い、室温で 1 時間反応させた。PBS にて 5 分間で 3 回洗浄し、1 μ g/ml の hoechst 33342 (Molecular Probes, USA) にて 5 分間核染色を行った。その後、PBS にて 5 分間で 3 回洗浄し、水溶性封入剤 (VECTASHIELD Mounting Medium, Vector Laboratories, USA) で封入し、蛍光顕微鏡 (BZ-8000, KEYENCE, Japan, 対物レンズ \times 20) にて観察を行った。

5. RNA の抽出および相補的 DNA (complementary DNA: cDNA) の合成

AM-1 細胞の total RNA の抽出には、Pure Link™ RNA Mini Kit (Invitrogen, USA) を用い、抽出後に吸光度計 (NANO DROP 1000, Thermo Scientific, USA) にて total RNA の濃度を測定した。

cDNA の合成には、DEPC 処理水に約 2.0 μ g の total RNA、25 unit/ml の recombinant RNase inhibitor (Nacalai Tesque, Japan) を 1.0 μ l、100 mM Tris-HCL (pH 8.8)、500 mM KCL および 0.8% Nonidet P40 を含む 10 \times Taq DNA Polymerase Buffer を 2.0 μ l、25 mM MgCl₂ (以上、Bio Basic, Canada) を 4.0 μ l、2.0 mM デオキシリボヌクレオチド三リン酸 (deoxyribonucleotide triphosphates, dNTP) mix (Toyobo, Japan) を 2.0 μ l、50 mM Random Hexamers を 1.0 μ l、50 unit/ml MuLV Reverse Transcriptase (以上、Roche Diagnostics, Swiss) を 1.0 μ l 加えて、合計 20.0 μ l とし、42°C で 15 分間イン

キュベートした。その後、99℃で5分間加温して酵素を失活させ、5℃で5分間冷却し、これを messenger RNA (mRNA) の発現解析に用いた。

6. reverse transcriptase (RT) -polymerase chain reaction (PCR) による mRNA の発現解析

RT-PCR は滅菌水に template DNA を 100 ng、10×Taq DNA Polymerase Buffer を 1.25 μ l、25 mM MgCl₂ を 1.0 μ l、5 unit/ml Taq DNA polymerase を 0.1 μ l、2.0 mM dNTPmix を 0.5 μ l、20 pM センスおよびアンチセンスプライマーをそれぞれ 0.5 μ l 加えて全反応量を 13.5 μ l とした。反応条件は、熱変性は 94℃で1サイクル目が3分間、2サイクル目以降は30秒間で行い、アニーリングは 60℃で30秒間、伸長反応は 72℃で15秒間とした。なお、得られた PCR 産物を 2.0%アガロースゲル (Invitrogen, USA) 上で電気泳動を行い、臭化エチジウム溶液 (Nacalai Tesque, Japan) を用いて染色し、紫外線により可視化した。

表 3 PCR のプライマーと反応条件

mRNA	PCR 産物の サイズ (bp)		プライマーの塩基配列	アニーリ ング温度 (°C)
<i>shh</i>	284	forward	5'-GATGACTCAGAGGTGTAAGGACAA-3'	65
		reverse	5'-CCACCGAGTTCTCTGCTTTCA-3'	
<i>ptch</i>	157	forward	5'-GGATCATTGTGATGGTCCTG-3'	61
		reverse	5'-GTCAGAAAGGCCAAAGCAAC-3'	
<i>gli1</i>	170	forward	5'-CACCACATCAACAGCGAGCA-3'	64
		reverse	5'-TTCCGGCACCCCTTCAAACG-3'	
<i>gli2</i>	105	forward	5'-AGCAGCAGCAACTGTCTGAGTGA-3'	64
		reverse	5'-GACCTTGCTGCGCTTGTGAA-3'	
<i>gli3</i>	141	forward	5'-TCCAACACAGAGGCCTATTCCAG-3'	64
		reverse	5'-CTCTTGTTGTGCATCGGGTCA-3'	
<i>bcl-2</i>	164	forward	5'-TACAACATCACAGAGGAAGTAGACTG-3'	60
		reverse	5'-GAGGGGGTGTCTTCAATCAC-3'	
<i>bax</i>	102	forward	5'-TTTCATCCAGGATCGAGCA-3'	60
		reverse	5'-AGACACTCGCTCAGCTTCTTG-3'	
<i>GAPDH</i>	140	forward	5'-ATCAGCAATGCCTCCTGCA-3'	60
		reverse	5'-ATGGCATGGACTGTGGTCAT-3'	

7. 細胞増殖解析

SHH シグナル経路が AM-1 細胞の増殖に与える影響を検討するため、以下の方法により細胞増殖解析を行った。

7-1. water soluble tetrazolium (WST) -8 assay

96 穴プレートに 3.0×10^3 /穴の AM-1 細胞を播種し、37°C、5%CO₂ 存在下で 24 時間培養後に 1 ng/ml SHH 中和抗体 (StemRD, USA) または SMO の阻害剤である 1 μM cyclopamine (Enzo Life Science, USA) を添加し、9 日間培養した。なお、培養液は 2 日毎に交換した。AM-1 細胞は SHH 中和抗体または

cyclopamine 添加時、3 日後、6 日後、9 日後の生細胞数を WST-8 Cell Counting Kit (Dojin, Japan) を用いて計測した。各穴に水溶性テトラゾリウム塩を 10 μ l ずつ添加し、37°C、5%CO₂ 存在下で 2 時間、呈色反応を行った。その後、WST-8 が細胞内脱水素酵素により還元されて生じた水溶性ホルマザン色素をマイクロプレートリーダー (MULTI SKAN FC, Thermo Scientific, USA) にて測定した (測定波長: 450nm、参考波長: 620nm)。

7-2. 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) incorporation assay

カルチャースライドに 3.0×10^4 穴の AM-1 細胞を播種し、37°C、5%CO₂ 存在下で 24 時間培養後に 1 ng/ml SHH 中和抗体または 1 μ M cyclopamine を添加した。中和抗体または cyclopamine を添加してから 48 時間後に、10 mM の BrdU 標識試薬 (BrdU labeling & detection kit 1, Roche Diagnostics, Swiss) を 100 μ l 添加し、37°C、5%CO₂ 存在下に 45 分間静置した。その後、75%メタノールにて 20 分間固定を行い、PBS で 2 回洗浄した。一次抗体としてマウス抗 BrdU モノクローナル抗体 (Roche Diagnostics, Swiss, 希釈倍率 1:10) を室温で 30 分間、さらに、フルオレセイン標識抗マウス IgG 抗体 (Roche Diagnostics, Swiss, 希釈倍率 1:10) を室温で 30 分間反応させ、PBS にて 3 回洗浄後、1 μ g/ml の hoechst 33342 にて 5 分間核染色を行った。その後、PBS にて 5 分間で 3 回洗浄し、水溶性封入剤 (VECTASHIELD Mounting Medium) で封入し、蛍光顕微鏡 (対物レンズ $\times 20$) にて観察を行った。また、BrdU 陽性細胞数を計測し、それらを全細胞数で除したものを BrdU 陽性細胞率として算出した。

8. アポトーシス解析

SHH シグナル経路の阻害が AM-1 細胞のアポトーシスに与える影響を検討するため、以下の方法によりアポトーシス解析を行った。

8-1. annexin V によるアポトーシス解析

カルチャースライドに 3.0×10^4 穴の AM-1 細胞を播種し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 存在下で 24 時間培養後に 1 ng/ml SHH 中和抗体を添加した。添加 48 時間後に、PBS で 2 回洗浄し、binding buffer (0.1 M HEPES , 1.4 M NaCl , 25 mM CaCl_2) にて 10 倍希釈したフルオレセインイソチオシアネート標識 annexin V (MBL, Japan) を 15 分間反応させた。さらに、hoechst 33342 にて核染色を行い、その後、PBS にて 5 分間で 3 回洗浄し、水溶性封入剤 (VECTASHIELD Mounting Medium) で封入し、蛍光顕微鏡 (対物レンズ $\times 20$) にて観察を行った。また、annexin V 陽性細胞数を計測し、それらを全細胞数で除したものを annexin V 陽性細胞率として算出した。

8-2. TUNEL (TdT-mediated dUTPnick end labeling) 法によるアポトーシス解析

カルチャースライドに 3.0×10^4 穴の AM-1 細胞を播種し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 存在下で 24 時間培養後に 1 ng/ml SHH 中和抗体を添加した。添加 48 時間後に、 4% パラホルムアルデヒドで 1 時間固定を行い、PBS で洗浄した。さらに、浸透化溶液 ($0.1\% \text{ sodium citrate}$) を加え、氷上で 2 分間反応させ、PBS で 2 回洗浄した。その後、TUNEL 反応液 (In Situ Cell death Detection Kit, TMR red, Roche Diagnostics, Swiss) を 37°C 、で 60 分間反応させた。さらに、hoechst 33342 にて核染色を行い、その後、PBS にて 5 分間で 3 回洗浄し、水溶性封入剤 (VECTASHIELD Mounting Medium) で封入し、蛍光顕微鏡 (対物レンズ

×20) にて観察を行った。また、TUNEL 陽性細胞数を計測し、それらを全細胞数で除したものを TUNEL 陽性細胞率として算出した。

8-3. アポトーシス関連分子によるアポトーシス解析

SHH シグナル経路阻害時の抗アポトーシス分子である BCL2 およびアポトーシス促進分子である BAX の発現を検討した。

カルチャースライドに 3.0×10^4 穴の AM-1 細胞を播種し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 存在下で 24 時間培養後に 1 ng/ml SHH 中和抗体を添加した。添加 48 時間後に、上記と同様に免疫細胞化学染色を行った。使用した一次抗体を表 2 に示す。

さらに、Real-time PCR は Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix (Stratagene, USA) を用いて行った。滅菌水に Master Mix を $10 \mu\text{l}$ 、template DNA を 10 ng 、 20 pM センスおよびアンチセンスプライマーをそれぞれ $0.5 \mu\text{l}$ 加え、全反応量を $20.0 \mu\text{l}$ とした。反応条件は、熱変性は 95°C で 1 サイクル目が 5 分間、2 サイクル目以降は 30 秒間で行い、アニーリングは 30 秒間、伸長反応は 72°C で 15 秒間とし、全 45 サイクルの増幅を行った。これらの mRNA 発現量を定量化するため、ハウスキーピング遺伝子である *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* を用いて補正し、 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法により相対的発現量を算出した。各プライマー配列、PCR 産物のフラグメントサイズ、アニーリング温度を表 3 に示す。

9. 統計学的解析

統計処理には Mann-Whitney *U*-test、repeated measures analysis of variance (repeated measures ANOVA) を用いた。なお、統計解析ソフトとして JMP software version 8 (SAS Institute, USA) を使用し、 $p < 0.05$ の場

合を統計学的に有意差ありとした。

結 果

研究 1

エナメル上皮腫における SHH シグナル分子の発現と細胞増殖に関する検討

1-1. エナメル上皮腫切除材料における SHH シグナル分子の発現

正常歯肉とエナメル上皮腫切除材料を用いて、SHH シグナル分子である SHH、PTCH、GLI1、GLI2、GLI3 の発現を免疫組織化学的染色法にて検討した。正常歯肉において、SHH および PTCH は上皮細胞の細胞質と細胞膜に発現しており（図 1A, D）、GLI1、GLI2 および GLI3 は上皮細胞の核に発現していた（図 1G, J, M）。正常歯肉において SHH、PTCH、GLI1 および GLI3 は、有棘層よりも基底層に強く発現していた。GLI2 は基底層よりも有棘層に強く発現していた。全てのエナメル上皮腫切除材料において、SHH は腫瘍細胞の細胞膜と細胞質に発現を認めた（図 1B, C）。PTCH は腫瘍細胞の細胞膜に発現を認めた（図 1E, F）。GLI1、GLI2 および GLI3 は腫瘍細胞の細胞質と核に発現を認めたが、核により強く発現していた（図 1H, I, K, L, N, O）。エナメル上皮腫において、SHH、PTCH、GLI1、GLI2 および GLI3 は、ほぼ全ての腫瘍細胞に発現していたが、内側の多角細胞と比較して外側の円柱または立方細胞により強く発現していた。

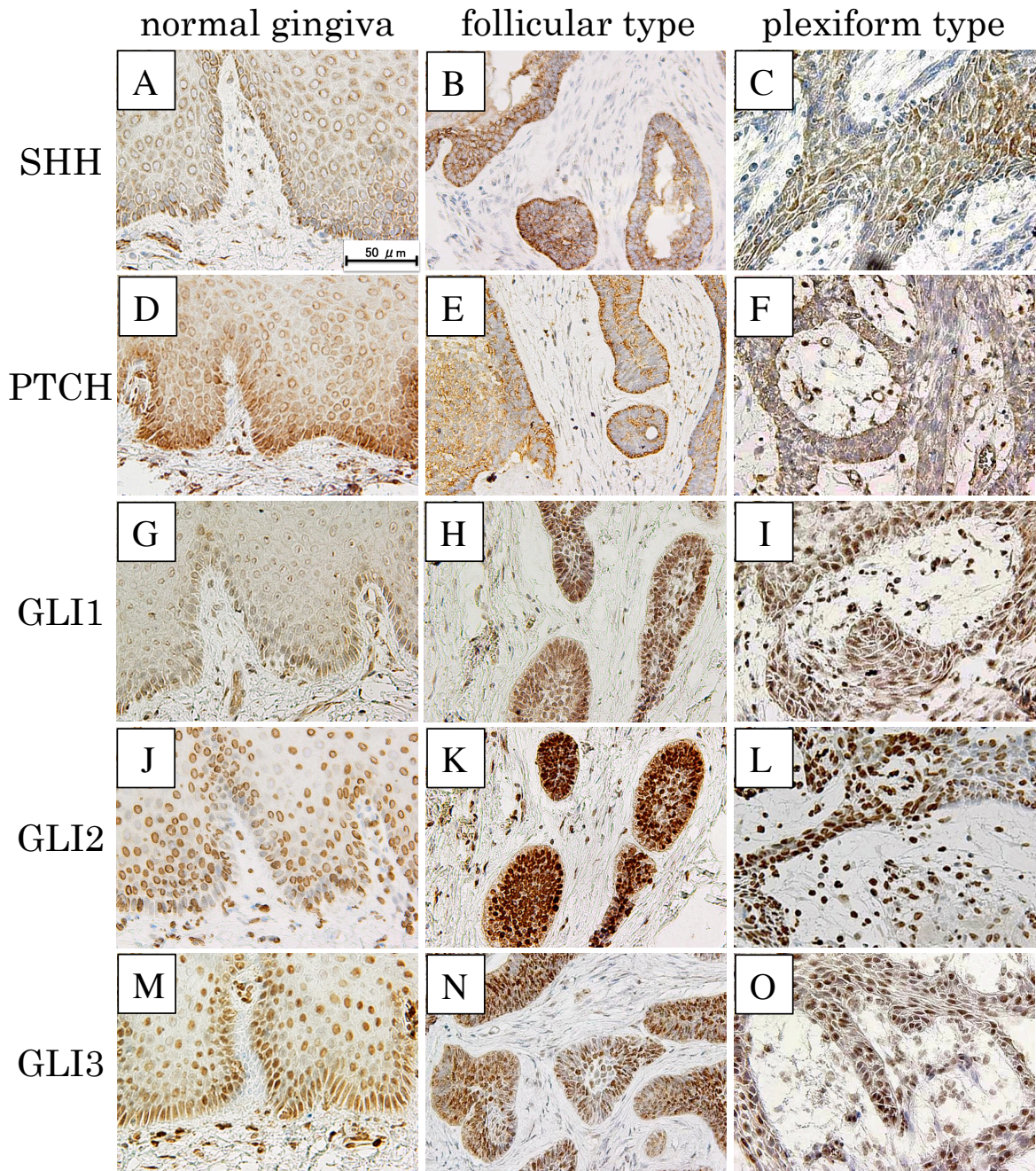


図 1 エナメル上皮腫切除材料における SHH、PTCH、GLI1、GLI2 および GLI3 の発現

SHH は、腫瘍細胞の細胞膜と細胞質に発現を認めた (図 1B, C)。PTCH は腫瘍細胞の細胞膜に発現を認めた (図 1D, E)。GLI1、GLI2、GLI3 は腫瘍細胞の細胞質と核に発現を認めたが、核により強く発現していた (図 1H, I, K, L, N)。SHH、PTCH、GLI1、GLI2 および GLI3 は内側の高く細胞と比較すると外側の円柱または立方細胞により強く発現している。(scale bar: 50 μ m)

1-2. AM-1 細胞における SHH シグナル分子の発現

AM-1 細胞を用いて、SHH、PTCH、GLI1、GLI2、GLI3 の発現を免疫細胞化学的染色法にて検討した。AM-1 細胞において、SHH は腫瘍細胞の細胞膜と細胞質に発現を認めた (図 2C)。PTCH は腫瘍細胞の細胞膜に発現を認めた (図 2F)。GLI1、GLI2、GLI3 は腫瘍細胞の細胞質わずかに発現を認めたが、ほぼ核に発現していた (図 2I, L, O)。

次いで、AM-1 細胞を用いて *shh*、*ptch*、*gli1*、*gli2*、*gli3* の発現を RT-PCR にて検討した。RT-PCR では *shh*、*ptch*、*gli1*、*gli2*、*gli3* の発現を認めた (図 3)。

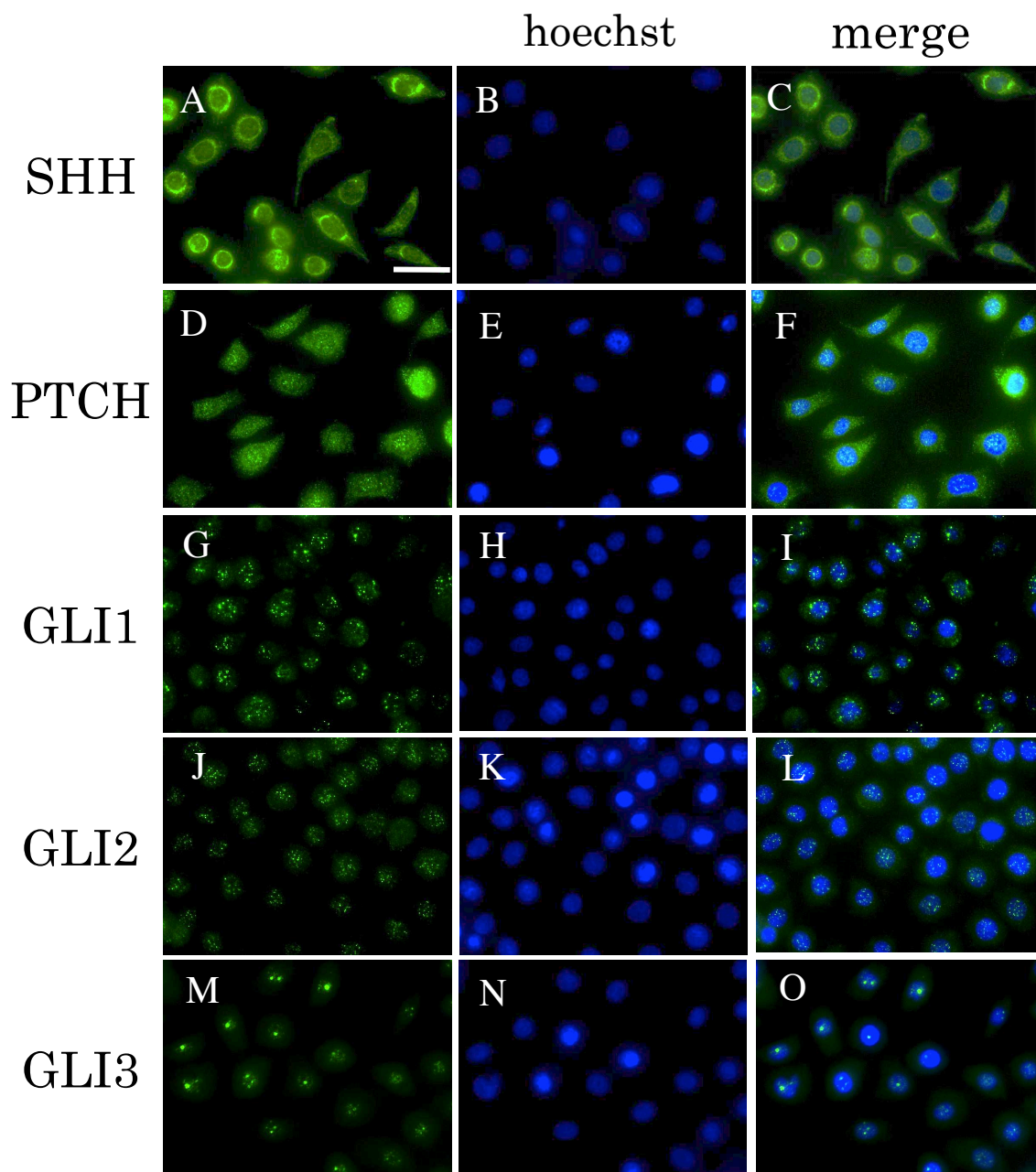


図 2 AM-1 細胞における SHH、PTCH、GLI1、GLI2 および GLI3 の発現

AM-1 細胞において、SHH は、腫瘍細胞の細胞膜と細胞質に発現を認めた (図 2C)。PTCH は腫瘍細胞の細胞膜に発現を認めた (図 2F)。GLI1、GLI2、GLI3 は腫瘍細胞の細胞質にわずかに発現を認めたが、ほぼ核に発現していた (図 2I, L, O)。(scale bar: 20 μ m)

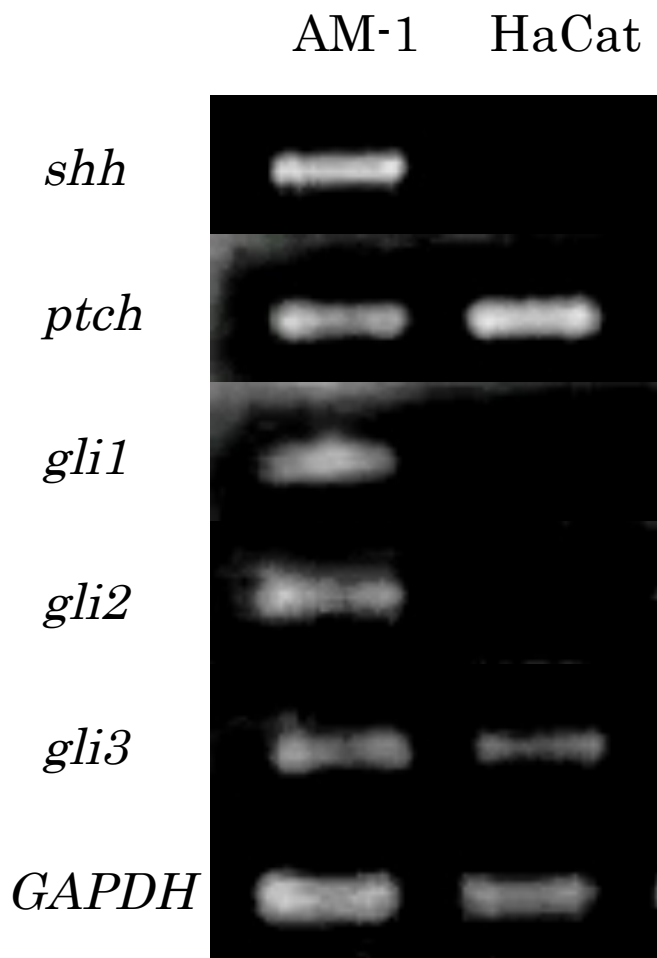


図 3 AM-1 細胞における *shh*、*ptch*、*gli1*、*gli2*、*gli3* の発現

RT-PCR では、*shh*、*ptch*、*gli1*、*gli2*、および *gli3* の発現を認めた (図 3)。

1-3. SHH シグナル経路の阻害が AM-1 細胞の細胞増殖に与える影響

まず、SHH 中和抗体または cyclopamine を添加することで SHH シグナル経路を阻害し、それらが AM-1 の細胞増殖率に与える影響について検討した。

WST-8 assay において、SHH 中和抗体添加群および cyclopamine 添加群両者ともに対照群と比べ細胞増殖が有意に抑制されていた (図 4A, B; repeated measures ANOVA, $*p<0.05$)。また、SHH 中和抗体添加群および cyclopamine 添加群両者ともに 9 日目の細胞集団内では死細胞を多く認めた。BrdU incorporation assay では、SHH 中和抗体添加群および cyclopamine 添加群両者ともに BrdU 陽性細胞率は対照群と比較して有意に低下していた (図 5A, B; Mann-Whitney *U*-test, $*p<0.05$)。

また、SHH 中和抗体を添加による SHH シグナル経路を阻害することが GLI 群の発現に与える影響について観察した。GLI1 および GLI2 は、対照群ではほぼ核内に発現していたが (図 6A-c, B-i)、SHH 中和抗体添加群では対照群と比較して細胞質で強く発現しており、核内への移行の阻害が観察された (図 6A-f, B-l)。GLI3 は、両群においてほぼ核内に発現を認めた (図 6C-o, C-r)。

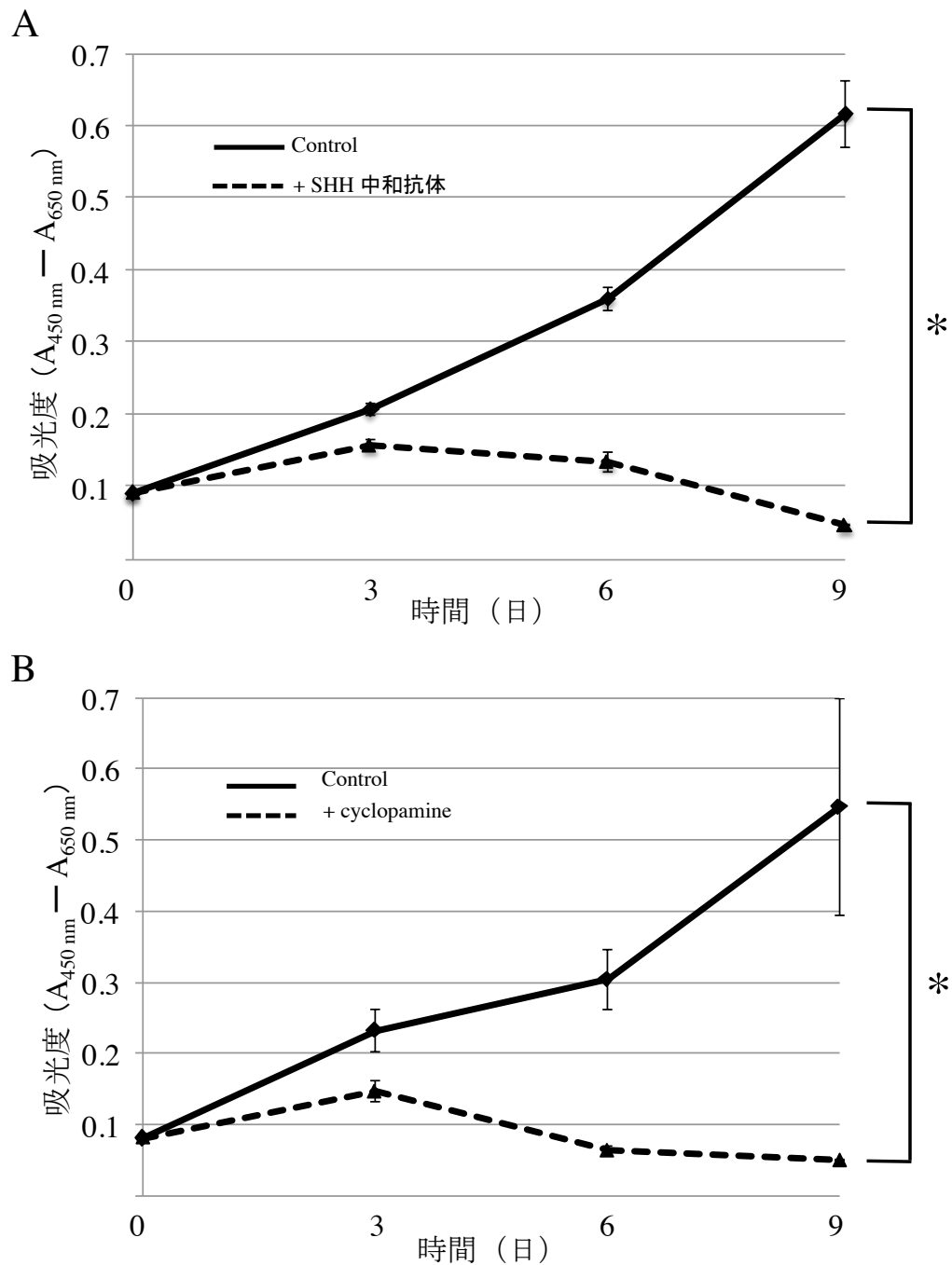


図 4 SHH シグナル経路の障害が AM-1 細胞の細胞増殖率に与える影響

WST-8 assay において、SHH 中和抗体添加群および cyclopamine 添加群両者ともに対照群と比べ、細胞増殖が有意に抑制されていた (図 4A, B; repeated measures ANOVA, * $p < 0.05$)。

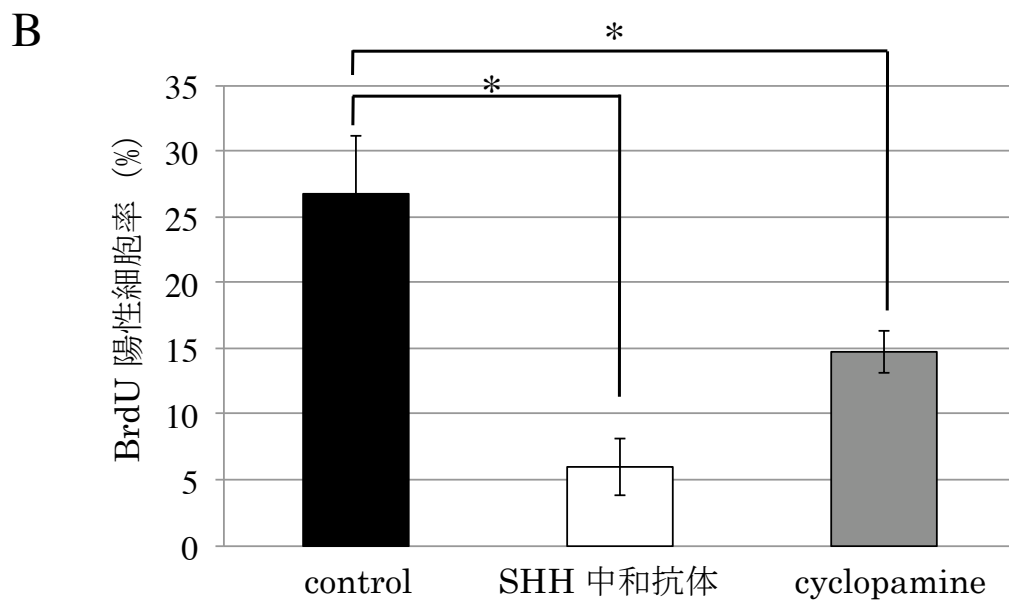
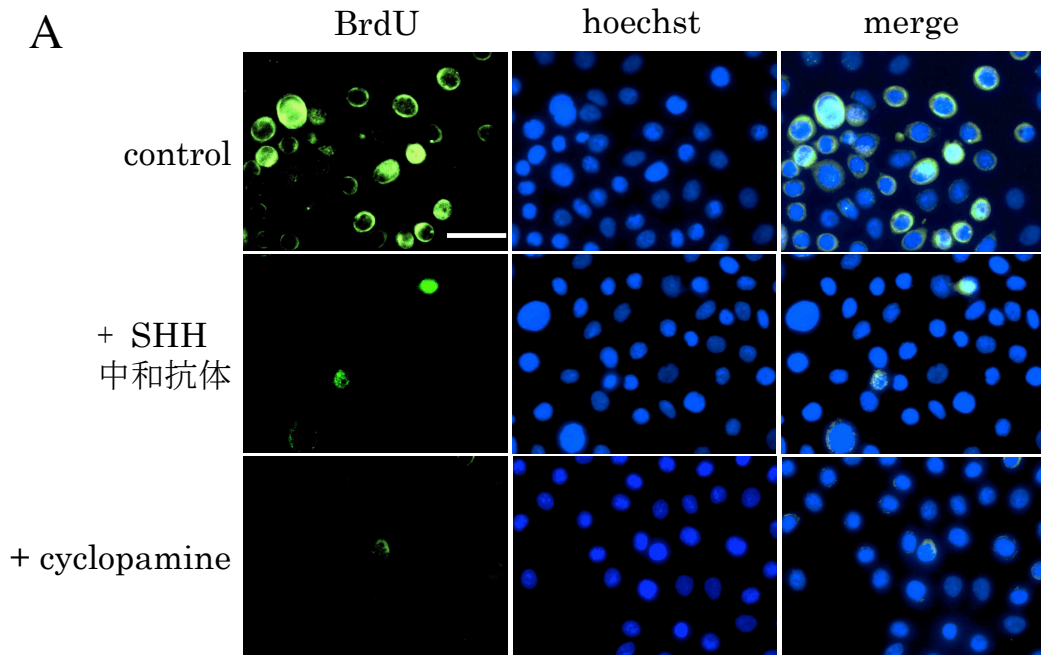


図 5 SHH シグナル経路の阻害が AM-1 細胞の増殖活性に与える影響

BrdU incorporation assay では、SHH 中和抗体添加群および cyclopamine 添加群両者ともに BrdU 陽性細胞率は対照群と比較して有意に低下していた (図 5B; Mann-Whitney U -test, $*p < 0.05$)。 (scale bar: 20 μ m)

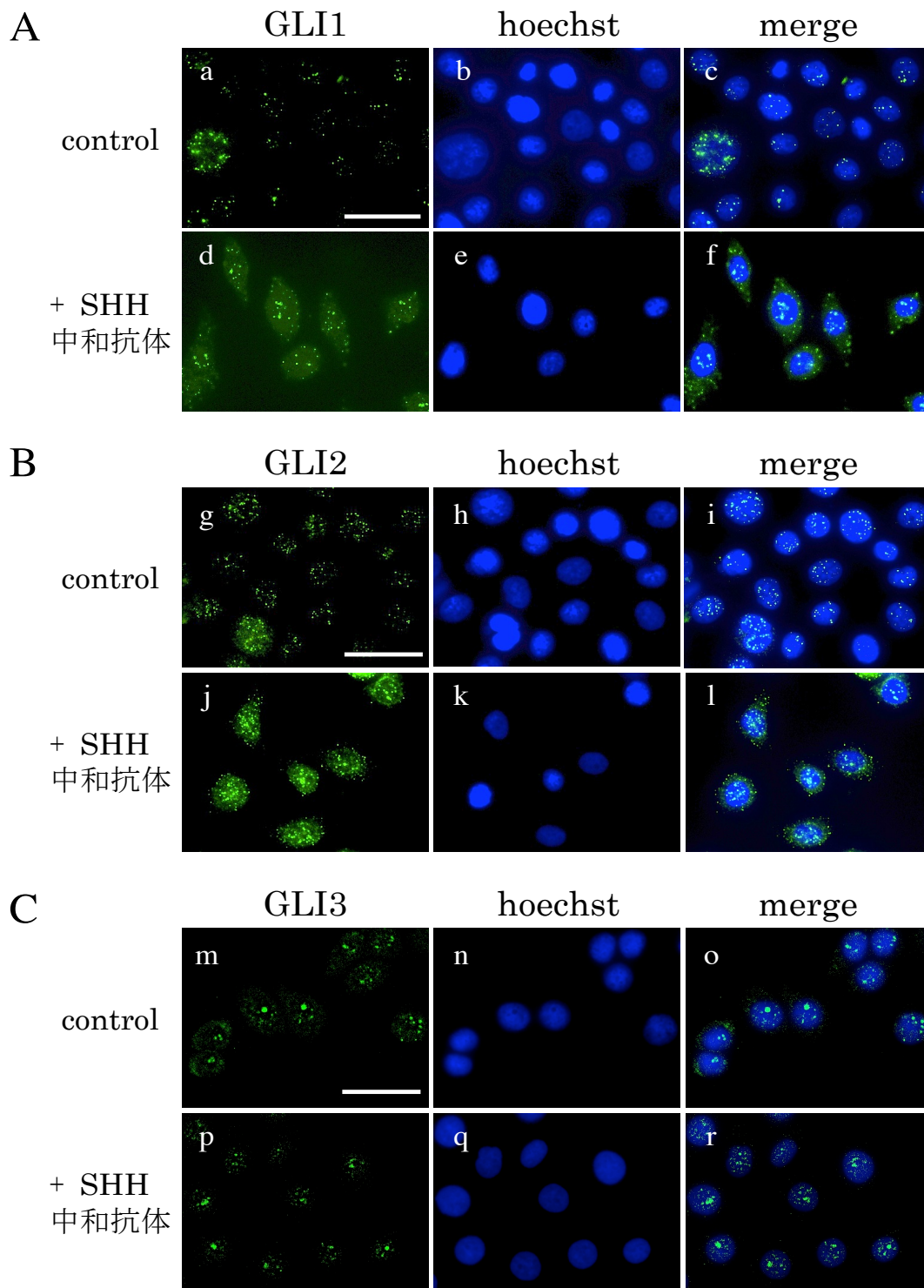


図 6 SHH シグナル経路の阻害が GLI 群の発現に与える影響

GLI1 および GLI2 は、対照群ではほぼ核内に発現していたが (図 6A-c, B-i)、SHH 中和抗体添加群では対照群と比較して細胞質で強く発現しており、核内への移行の阻害が観察された (図 6A-f, B-l)。GLI3 は、両群においてほぼ核内に発現を認めた。(図 6C-o, C-r)。(scale bar: 20 μ m)

研究 2

AM-1 における SHH シグナル経路を介したアポトーシスに関する検討

2-1. SHH シグナル経路の阻害が AM-1 細胞のアポトーシスに与える影響

SHH シグナル経路の阻害が AM-1 細胞のアポトーシスの誘導に与える影響を検討するために、annexin V と TUNEL 法により検討した。SHH 中和抗体添加群は対照群と比較して、annexin V 陽性細胞率および TUNEL 陽性細胞率ともに有意に高かった (図 7B, 8B; Mann-Whitney U -test, $*p<0.01$)。

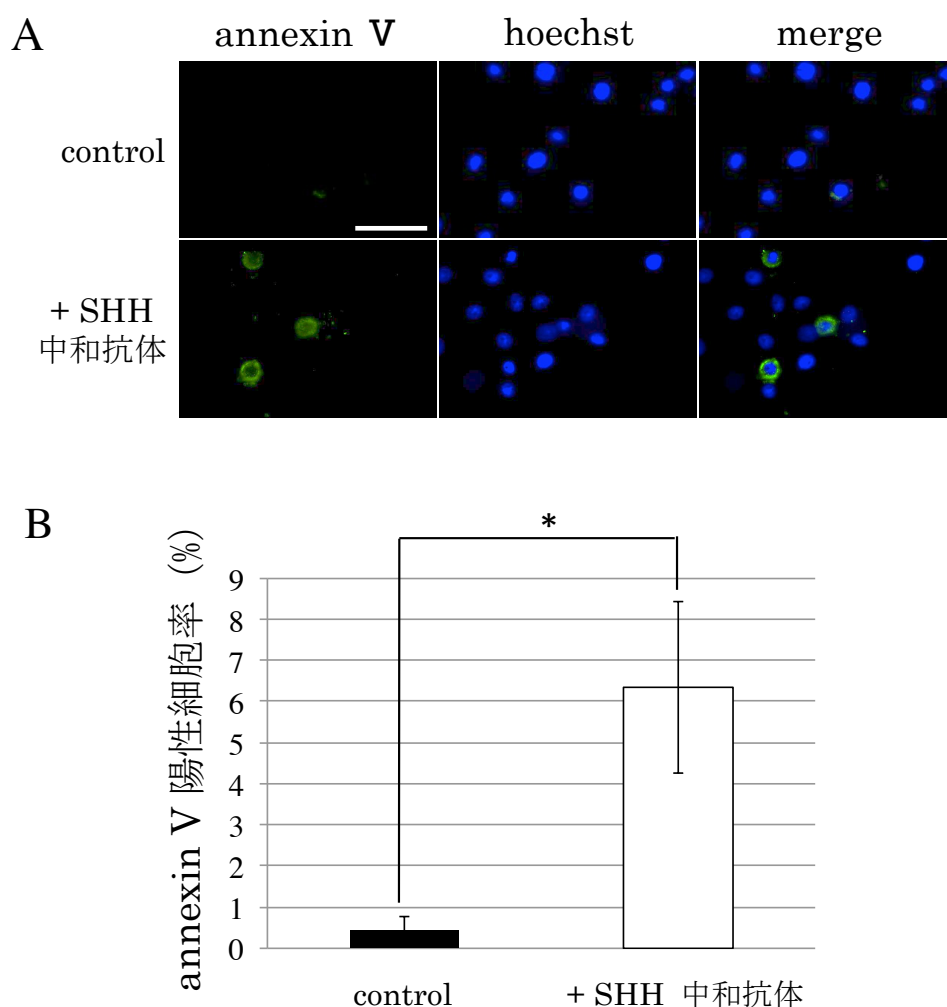


図 7 SHH 中和抗体添加時の annexin V による検討

SHH 中和抗体添加群は対照群と比較して、annexin V 陽性細胞率は有意に高かった (図 7B; Mann-Whitney U -test, $*p<0.01$)。 (scale bar: 20 μ m)

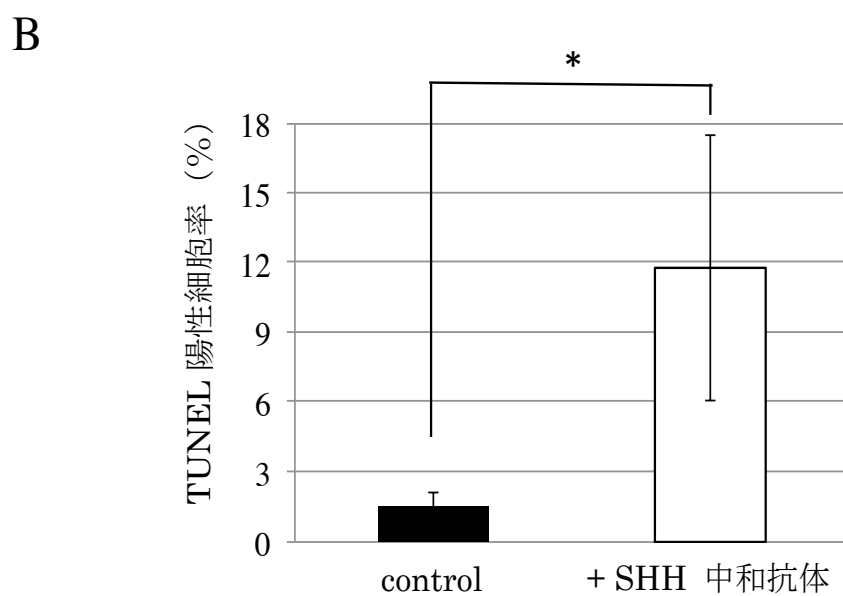
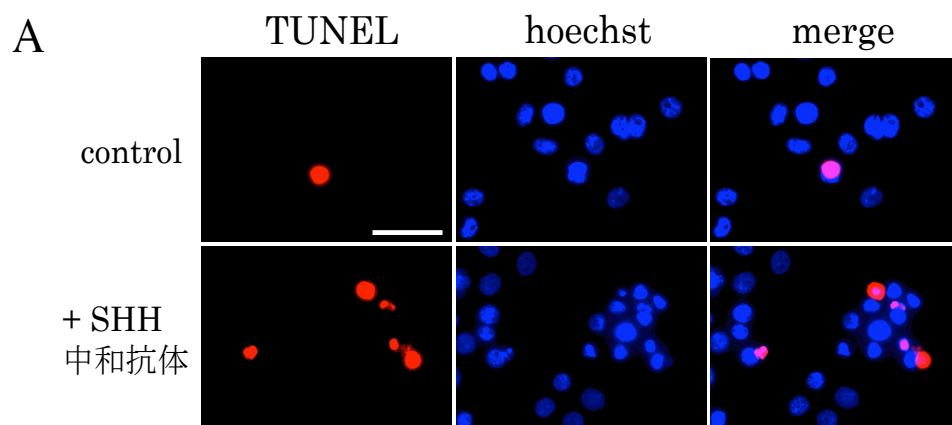


図 8 SHH 中和抗体添加時の TUNEL 法による検討

SHH 中和抗体添加群は対照群と比較して、TUNEL 陽性細胞率は有意に高かった (図 8B; Mann-Whitney U -test, $*p<0.01$)。 (scale bar: 20 μ m)

2-2. SHH シグナル経路の阻害が AM-1 細胞のアポトーシス関連分子に与える影響

AM-1 細胞において SHH シグナル経路の阻害が抗アポトーシス分子である BCL2 とアポトーシス促進遺伝子である BAX の発現に与える影響について検討した。免疫細胞化学的検討を行ったところ、SHH 中和抗体添加群は対照群と比較して、Bcl-2 の発現は減弱を認め (図 9A)、また BAX の発現は増強していた (図 9B)。次いで、real-time PCR により検討を行った結果、*bcl-2* の発現量は減少を認め、*bax* の発現量は増加していた (図 10A、10B)。

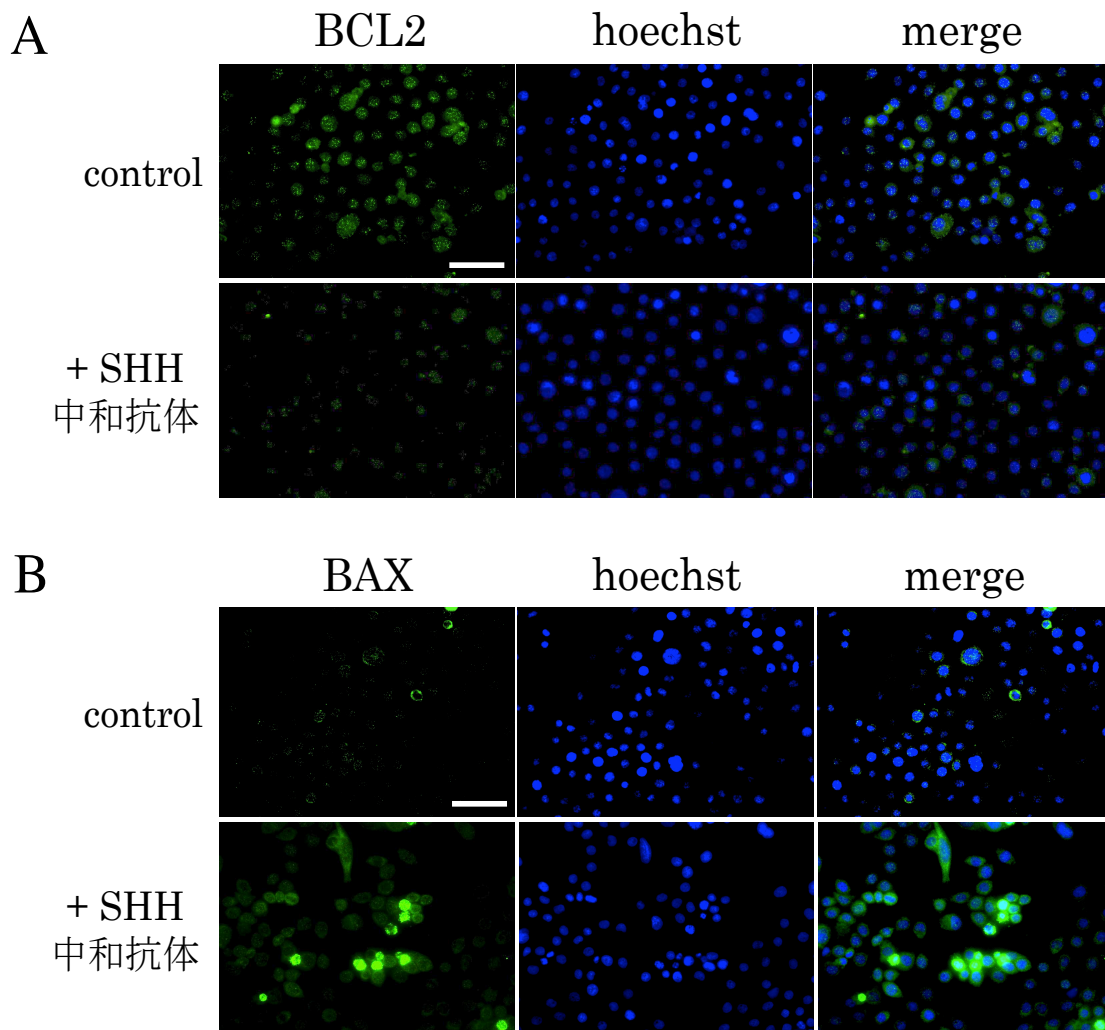
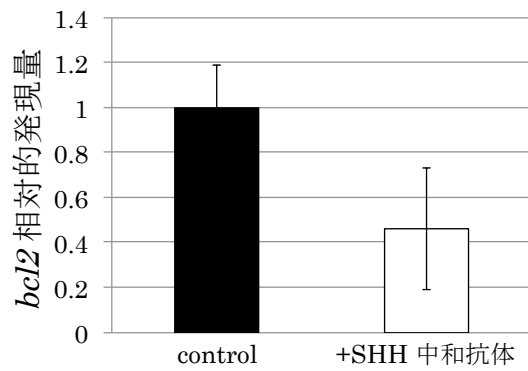


図 9 SHH シグナル経路の阻害が BCL2 および BAX に与える影響

免疫細胞化学的検討を行ったところ、SHH 中和抗体添加群は対照群と比較して、BCL2 の発現は減弱を認め (図 9A)、また BAX の発現は増強していた (図 9B)。(scale bar: 40 μ m)

A



B

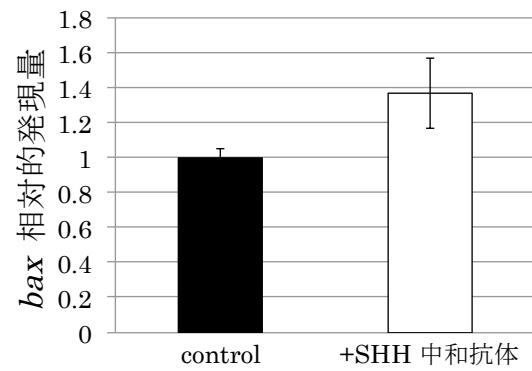


図 10 SHH シグナル経路の阻害時の *bcl-2* および *bax* の発現量の検討

real-time PCR により検討を行った結果、*bcl-2* の発現量は減少を認め、*bax* の発現量は増加していた (図 10A、10B)。

考 察

エナメル上皮腫は良性腫瘍に分類されながらも局所的に浸潤し再発傾向を示すことから、症例や施設によっては顎骨切除といった悪性腫瘍に準じた治療が選択され、顔貌の変形、咬合の異常などの障害をきたして患者の QOL が著しく低下することもある。そのため、エナメル上皮腫の増殖のメカニズムを解明し、標的遺伝子に対する治療法の開発が望まれている。この標的遺伝子の 1 つとなりうる分子として近年腫瘍の増殖に深く関与しているとされる SHH シグナル経路がある。SHH シグナル経路は、歯の発生を含む胎生期の器官形成において重要な因子として同定された (5, 12-17)。その後、SHH シグナル分子の 1 つである PTCH または SMO の変異で基底細胞癌、髄芽腫が発生することが明らかになった (35, 36)。近年では、様々な癌でリガンド依存性に SHH シグナル経路が活性化し、癌の増殖やアポトーシスの抑制に関与していることが明らかにされつつある (22, 24, 25)。そこで本研究では、エナメル上皮腫が歯原性上皮由来の腫瘍であること、そして歯の発生の際の歯胚の形成に SHH シグナル経路が関与していることから、エナメル上皮腫の増殖およびアポトーシスにおける SHH シグナル経路の関与について検討を行った。

SHH シグナル分子の発現に関しては、今までに Kumamoto らや Zhang らがエナメル上皮腫を含む歯原性腫瘍での SHH、PTCH および GLI1 の発現を検討している (6, 8)。エナメル上皮腫において全症例で SHH、PTCH、GLI1 の発現を認め、腫瘍外側にある立方細胞は腫瘍中心部の多角細胞と比較して強く発現していたと報告しており、本研究においても同様の結果を得た。また、SHH シグナル経路では、リガンドである SHH が受容体の PTCH に結合することで

PTCH の SMO への抑制がはずれ、SMO が活性化することで、さらにその下流にある転写因子である GLI 群は GLIA となり核内へ移行し転写が促進する。よって、SHH シグナル経路の活性化には SHH の PTCH への結合もしくは SHH シグナル分子の変異が必要であり、GLIA となる GLI1 および GLI2 の核内の発現を認めることは SHH シグナル経路が活性化されている証拠となる (36, 37)。本研究において、GLI1、GLI2 は核内で強く発現しており、エナメル上皮腫における SHH シグナル経路の活性化が示された。

この SHH シグナル経路と腫瘍との関連は、まず 1987 年に髄芽腫における PTCH の変異によるものが報告され、次いで 1996 年に基底細胞癌や角化嚢胞性歯原性腫瘍に対する高危険群である Gorlin 症候群の原因遺伝子変異として PTCH の変異が同定された (38)。その後、2003 年に肺小細胞癌で遺伝子変異によらない SHH 発現増強を原因とする SHH シグナル経路の活性化と、これに依存した癌細胞の増殖が報告され、これに続き食道癌、胃癌、膵癌、乳癌といった多種の癌で SHH の過剰発現とオートクラインによる癌細胞の増殖が明らかとなってきている (20, 21, 30, 39)。そこで本研究では、SHH 中和抗体および SHH シグナル分子の 1 つである SMO の阻害剤である cyclopamine を添加し、SHH シグナル経路を異なった部位で阻害した時の増殖への影響を検討した。その結果、SHH 中和抗体添加群および cyclopamine 添加群ともに対照群と比較して AM-1 細胞の増殖率が有意に抑制されており、さらに BrdU による検討において両群は対照群と比較して増殖活性が有意に低下していた。このことから SHH シグナル経路がエナメル上皮腫の細胞増殖に関与していることが示唆された。さらに、cyclopamine 添加時だけでなく、中和抗体によりリガンドである SHH を阻害した場合にも AM-1 細胞の増殖が抑制されることから、

上記で述べたような PTCH や SMO の変異が原因ではなく、SHH シグナル経路と関連が示唆されている多くの腫瘍と同様に、リガンド依存性のオートクラインによる SHH シグナル経路の活性化による増殖と推察できる。また、転写因子である GLI 群はヒトでは GLI1、GLI2 および GLI3 が同定されており、GLI1 および GLI2 は activator としての役割を果たしているが、GLI1 はより強力な activator であることが知られている (18, 37)。本研究において SHH 中和抗体添加群における GLI 群の発現を対照群と比較したところ GLI1 および GLI2 は、対照群においてはほとんど核内に発現しているが、一方 SHH 中和抗体添加群は細胞質に多く発現を認めた。この結果は、上述してきたことと矛盾せず、SHH 経路が阻害されていることを示唆している。

さらに、SHH はモルフォゲンとして作用する際に、細胞増殖を促進する一方で、アポトーシスを制御することで形態形成を行うことが知られている。また癌においても SHH シグナル経路を阻害するとアポトーシスが誘導されるとの報告がある (23, 30, 40)。これまでにエナメル上皮腫においては、BCL2、BAX、FAS、caspase-3 などのアポトーシス関連分子に関して発現を認めているが、SHH シグナル経路と関連づけた検討はされていない (32-34)。そこでエナメル上皮腫における SHH シグナル経路とアポトーシスの関連を検討した。研究 2 において SHH 中和抗体または cyclopamine を用いて、SHH シグナル経路を阻害すると増殖が抑制されるのみならず 0 日目と 9 日目を比較すると 9 日目では生細胞数は減少し、核が凝集した死細胞を多く認め、アポトーシスの誘導が推測された。SHH シグナル経路を阻害することでアポトーシスが誘導された AM-1 細胞は有意に多く、また、抗アポトーシス分子である BCL2 の発現の減弱とアポトーシス促進分子である BAX の発現の増強を認めた。以上のこ

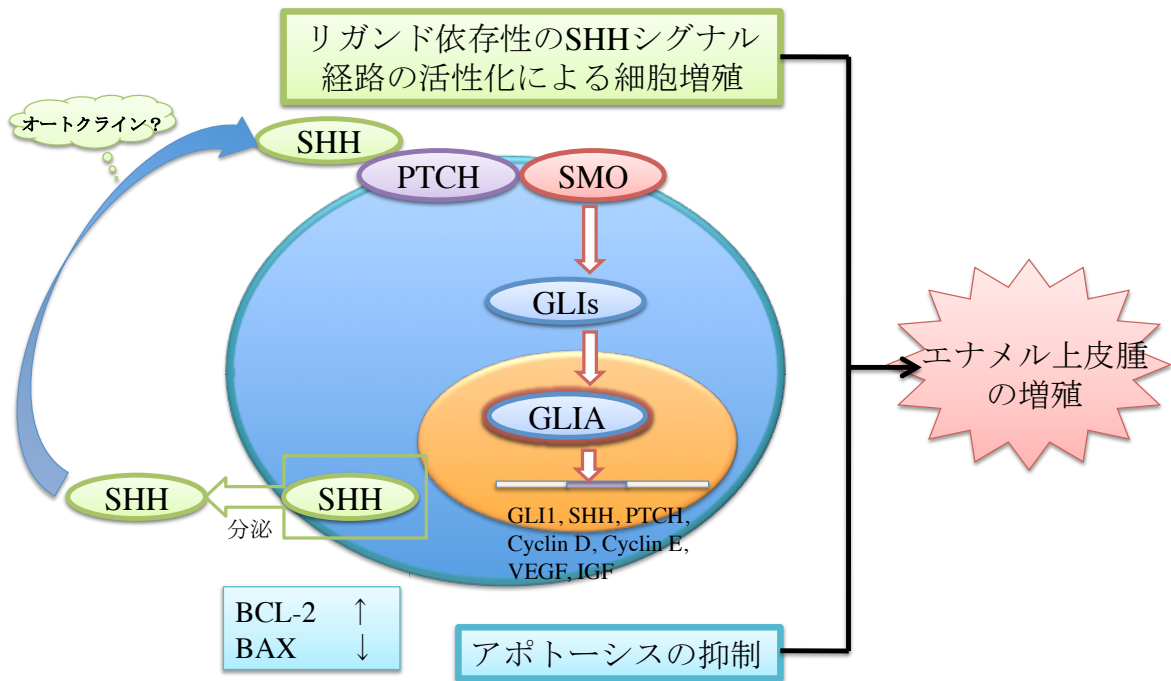
とより、エナメル上皮腫において SHH シグナル経路がアポトーシスを介して増殖に関連していることが示された。

エナメル上皮腫における増殖に関するわれわれの今までの研究で、AM-1 細胞が FGF およびその受容体である FGFR を発現していることがわかっている（未発表）。FGF は SHH と同様に器官形成時にモルフォゲンとして作用し、歯の発生においては、口腔上皮の肥厚が始まるときに最初に間葉細胞から分泌され上皮細胞に作用し、SHH の発現を促進するとともに、細胞増殖に関与していることが知られている（5, 12, 13, 40）。よって、研究 1 によりエナメル上皮腫が SHH のオートクラインによる SHH シグナル経路の活性化が示唆されたが、さらに FGF による SHH シグナル経路の促進も考えられ、今後さらに検討する必要がある。

SHH シグナル経路とアポトーシスに関しては、乳癌、大腸癌、神経膠芽腫などの多くの腫瘍において抗アポトーシス作用を持つ PI3K-AKT 経路が、腎細胞癌や食道癌において SHH シグナル経路の阻害により活性が抑制されることが報告されている（41, 42）。エナメル上皮腫においても同様に SHH シグナル経路の活性化による PI3K-AKT 経路およびアポトーシスへの影響が考えられ、今後検索が必要である。

以上のことから、SHH シグナル経路がエナメル上皮腫における増殖に関与する一方で、アポトーシスの制御にも関与していることが本研究では示唆された。しかし、他の腫瘍と同様にエナメル上皮腫においても腫瘍形成には多様な因子が関与していることも明らかである。今後は本研究で得られた結果をもとに特に FGF または PI3K-AKT 経路を含めた他の因子との関連も検索し腫瘍形成のメカニズムを解明することが必要である。さらにはより効果的な治療法の

開発への足がかりと出来れば、患者の QOL の改善につながるであろう。



謝 辞

稿を終えるにあたり、このような研究の機会を与えて頂きましたとともに終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座顎顔面腫瘍制御学分野中村誠司教授に深甚なる謝意を表します。さらに、直接御指導、御校閲を頂きました九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座顎顔面腫瘍制御学分野光安岳志助教ならびに九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座顎顔面腫瘍制御学分野川野真太郎助教に謹んで感謝の意を表します。研究を進めるにあたって、懇切なる御指導を頂きました九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座顎顔面腫瘍制御学分野中尾祐先生に謹んで感謝の意を表します。また、常に研究の協力ならびに励ましの言葉を頂きました九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座顎顔面腫瘍制御学分野の教室員の皆様に深く感謝いたします。

参考文献

1. Kumamoto H, Ohki K, Ooya K. Association between vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and tumor angiogenesis in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med.* 2002 Jan; 31 (1): 28-34.
2. Kumamoto H, Ooya K. Immunohistochemical detection of insulin-like growth factors, platelet-derived growth factor, and their receptors in ameloblastic tumors. *J Oral Pathol Med.* 2007 Apr; 36 (4): 198-206.
3. Sandra F, Harada H, Nakamura N, Ohishi M. Midkine induced growth of ameloblastoma through MAPK and Akt pathways. *Oral Oncol.* 2004 Mar; 40 (3): 274-80.
4. Hendarmin L, Sandra F, Nakao Y, Ohishi M, Nakamura N. TNFalpha played a role in induction of Akt and MAPK signals in ameloblastoma. *Oral Oncol.* 2005 Apr; 41 (4): 375-82.
5. Zhang YD, Chen Z, Song YQ, Liu C, Chen YP. Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells. *Cell Res.* 2005 May; 15 (5): 301-16.
6. Kumamoto H, Ohki K, Ooya K. Expression of Sonic hedgehog (SHH) signaling molecules in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med.* 2004 Mar; 33 (3): 185-90.
7. Vered M, Peleg O, Taicher S, Buchner A. The immunoprofile of odontogenic keratocyst (keratocystic odontogenic tumor) that includes expression of PTCH, SMO, GLI-1 and bcl-2 is similar to ameloblastoma

- but different from odontogenic cysts. *J Oral Pathol Med.* 2009 Aug; 38 (7): 597-604.
8. Zhang L, Chen XM, Sun ZJ, Bian Z, Fan MW, Chen Z. Epithelial expression of SHH signaling pathway in odontogenic tumors. *Oral Oncol.* 2006 Apr; 42 (4): 398-408.
 9. Myoken Y, Myoken Y, Okamoto T, Sato JD, Takada K. Immunohistochemical localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and FGF-2 in cultured human ameloblastoma epithelial cells and ameloblastoma tissues. *J Oral Pathol Med.* 1995 Oct; 24 (9): 387-92.
 10. Kumamoto H, Ooya K. Expression of bone morphogenetic proteins and their associated molecules in ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors. *Oral Dis.* 2006 Mar; 12 (2): 163-70.
 11. Siar CH, Nagatsuka H, Han PP, Buery RR, Tsujigiwa H, Nakano K, Ng KH, Kawakami T. Differential expression of canonical and non-canonical Wnt ligands in ameloblastoma. *J Oral Pathol Med.* 2012 Apr; 41 (4): 332-9.
 12. Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev.* 1997 Oct; 67 (2): 111-23.
 13. Tummers M, Thesleff I. The importance of signal pathway modulation in all aspects of tooth development. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 2009 Jun 15; 312B (4): 309-19.

14. Cobourne MT, Hardcastle Z, Sharpe PT. Sonic hedgehog regulates epithelial proliferation and cell survival in the developing tooth germ. *J Dent Res.* 2001 Nov; 80 (11): 1974-9.
15. Ingham PW, Placzek M. Orchestrating ontogenesis: variations on a theme by sonic hedgehog. *Nat Rev Genet.* 2006 Nov; 7 (11): 841-50.
16. Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 2001 Dec 1; 15 (23): 3059-87.
17. McMahon AP. More surprises in the Hedgehog signaling pathway. *Cell.* 2000 Jan 21; 100 (2): 185-8.
18. 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. *J Surg Oncol.* 2007 Jan 1; 95 (1): 55-62.
19. Yanai K, Nakamura M, Akiyoshi T, Nagai S, Wada J, Koga K, Noshiro H, Nagai E, Tsuneyoshi M, Tanaka M, Katano M. Crosstalk of hedgehog and Wnt pathways in gastric cancer. *Cancer Lett.* 2008 May 8; 263 (1): 145-56.
20. Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN, Beachy PA. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature.* 2003 Oct 23; 425 (6960): 846-51.

21. Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature*. 2003 Mar 20; 422 (6929): 313-7.
22. Pasca di Magliano M, Hebrok M. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer*. 2003 Dec; 3 (12): 903-11.
23. Thomas ZI, Gibson W, Sexton JZ, Aird KM, Ingram SM, Aldrich A, Lyerly HK, Devi GR, Williams KP. Targeting GLI1 expression in human inflammatory breast cancer cells enhances apoptosis and attenuates migration. *Br J Cancer*. 2011 May 10; 104 (10): 1575-86.
24. Rubin LL, de Sauvage FJ. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2006 Dec; 5 (12): 1026-33.
25. Ruiz i Altaba A, Sánchez P, Dahmane N. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nat Rev Cancer*. 2002 May; 2 (5): 361-72.
26. Hu MC, Mo R, Bhella S, Wilson CW, Chuang PT, Hui CC, Rosenblum ND. GLI3-dependent transcriptional repression of Gli1, Gli2 and kidney patterning genes disrupts renal morphogenesis. *Development*. 2006 Feb; 133 (3): 569-78.
27. Ruiz i Altaba A, Mas C, Stecca B. The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends Cell Biol*. 2007 Sep; 17 (9): 438-47.

28. Litingtung Y, Dahn RD, Li Y, Fallon JF, Chiang C. Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature*. 2002 Aug 29; 418 (6901): 979-83.
29. Xia YP, Dai RL, Li YN, Mao L, Xue YM, He QW, Huang M, Huang Y, Mei YW, Hu B. The protective effect of sonic hedgehog is mediated by the phosphoinositide [corrected] 3-kinase/AKT/Bcl-2 pathway in cultured rat astrocytes under oxidative stress. *Neuroscience*. 2012 May 3; 209: 1-11.
30. Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernández-del Castillo C, Yajnik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL, Hebrok M. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature*. 2003 Oct 23; 425 (6960): 851-6.
31. Kumamoto H. Detection of apoptosis-related factors and apoptotic cells in ameloblastomas: analysis by immunohistochemistry and an in situ DNA nick end-labelling method. *J Oral Pathol Med* 1997; 26: 4} 9-2S
32. Kumamoto H, Ohki K. Immunohistochemical analysis of bcl-2 family proteins in benign and malignant ameloblastomas. *J Oral Pathol Med*. 1999 Sep; 28 (8): 343-9.
33. Kumamoto H, Kimi K, Ooya K. Immunohistochemical analysis of apoptosis-related factors (Fas, Fas ligand, caspase-3 and single-stranded DNA) in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med*. 2001 Nov; 30 (10): 596-602.
34. Mitsuyasu T, Harada H, Higuchi Y, Kimura K, Nakamura N, Katsuki T, Kubota E, Toyoshima K, Ohishi M. Immunohistochemical demonstration

- of bcl-2 protein in ameloblastoma. *J Oral Pathol Med*. 1997 Sep; 26 (8): 345-8.
35. Oro AE, Higgins KM, Hu Z, Bonifas JM, Epstein EH Jr, Scott MP. Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog. *Science*. 1997 May 2; 276 (5313): 817-21.
36. Karlstrom RO, Tyurina OV, Kawakami A, Nishioka N, Talbot WS, Sasaki H, Schier AF. Genetic analysis of zebrafish gli1 and gli2 reveals divergent requirements for gli genes in vertebrate development. *Development*. 2003 Apr; 130 (8): 1549-64.
37. 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 Res*. 2004 Sep 1; 64 (17): 6071-4.
38. Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, Trent JM, Law ML, O'Brien SJ, Wong AJ, Vogelstein B. Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science*. 1987 Apr 3; 236 (4797): 70-3.
39. 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. *J Surg Oncol*. 2007 Jan 1; 95 (1): 55-62.
40. Mao L, Xia YP, Zhou YN, Dai RL, Yang X, Wang YJ, Duan SJ, Qiao X, Mei YW, Hu B. Activation of sonic hedgehog signaling pathway in olfactory neuroblastoma. *Oncology*. 2009; 77 (3-4): 231-43.

41. Klein OD, Minowada G, Peterkova R, Kangas A, Yu BD, Lesot H, Peterka M, Jernvall J, Martin GR. Sprouty genes control diastema tooth development via bidirectional antagonism of epithelial-mesenchymal FGF signaling. *Dev Cell*. 2006 Aug; 11 (2): 181-90.
42. Dormoy V, Danilin S, Lindner V, Thomas L, Rothhut S, Coquard C, Helwig JJ, Jacquemin 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*. 2009 Dec 16; 8: 123.