

Cyclopamine이 갑상선암 세포주의 증식에 미치는 영향

충북대학교 의과대학 외과학교실, ¹소아청소년학교실, ²을지대학교 의과대학 외과학교실, ³캘리포니아 의과대학 외과학교실

박성수 · 박진우 · 최재운 · 장이찬 · 우성일¹ · 최영진² · Orlo H. Clark³

Cyclopamine Inhibits Cancer Cell Proliferation in Thyroid Cancer Cell Lines

Sung Su Park, M.D., Jin-Woo Park, M.D., Jae-Woon Choi, M.D., Lee-Chan Jang, M.D., Sung-II Woo¹, M.D., Young-Jin Choi², M.D. and Orlo H. Clark³, M.D.

Purpose: The Hedgehog (HH) signaling pathway is important in development. Recently, ectopic activation of this pathway has been implicated in several forms of solid cancer including basal cell carcinoma, pancreatic cancer, colon cancer, and prostate cancer. There are three HH proteins involved in the pathway: Sonic HH, Indiana HH, and Desert HH. Cyclopamine disrupts Sonic HH signaling by inhibition of the seven-transmembrane receptor Smoothened (SMO). Whereas cyclopamine is cytotoxic to several human cancer cells, its effect on thyroid cancer cells is unknown. We therefore investigated the effect of cyclopamine on cell proliferation in human thyroid cancer cell lines.

Methods: We used five thyroid cancer cell lines: TPC-1 (papillary), FTC-133, FTC-236, FTC-238 (follicular), and XTC-1 (Hurthle cell). The MTT assay and cell cycle analysis were used to evaluate anti-proliferative effects. Tomatidine, a structural analogue of cyclopamine, was used as a control agent. Statistical significance was tested by ANOVA.

Results: After 4 days of treatment, the percent inhibition of growth with a concentration of 5, 10, and 20 M cyclopamine in the cell lines were 23.6±4.9%, 66.4±4.7% and 69.3±1.3% in TPC-1 7.5±2.8%, 10.7±3.2% and 49.6±6.4% in FTC-133, 19.2±9.5%, 50.4±4.8% and 60.4±2.0% in FTC-236 22.8±4.2%, 53.4±5.5% and 63.7±4.8% in FTC-238 7.6±5.8%, 16.6±2.2%, 24.0±4.3% in XTC-1. Treatment with tomatidine at the same concentrations did not significantly

affect cell growth. Exposure to cyclopamine, however, did not affect the cell cycle significantly.

Conclusion: Cyclopamine inhibits cancer cell proliferation in a dose dependent manner in thyroid cancer cell lines. The Hh signaling pathway might be a useful therapeutic target for thyroid cancer. (Korean J Endocrine Surg 2007;7: 69-74)

Key Words: Hedgehog, Cyclopamine, Thyroid cancer, Anti-proliferation

중심 단어: Hedgehog, Cyclopamine, 갑상선암, 증식억제

Departments of Surgery and ¹Pediatrics, Chungbuk National University, Cheongju, ²Department of Surgery, Eulji University School of Medicine, Daejeon, Korea, ³Department of Surgery, University of California, San Francisco, UCSF/Mount Zion Medical Center, San Francisco, USA

서론

최근 갑상선암의 발병이 증가하여, 우리나라 여성에서 가장 흔한 암의 하나가 되었다. 갑상선암의 발생은 여러 가지 가설이 있으나 아직 명확히 밝혀지지 않고 있다. 종양 줄기 세포란 새로운 종양 발생 모델로써, 발생 단계의 줄기 세포에서 발현되는 특성을 지닌 세포가 종양의 유지와 성장에 관여한다는 것이다.(1) Hedgehog (Hh) 신호 전달계는 정상 발생에서 중요한 역할을 담당하고 있는데, 척추동물에서는 Sonic HH (SHH), Indiana HH (IHH), Desert HH (DHH) 등 3가지 유형의 HH 단백질이 존재한다.(2) 이들 중 SHH 단백질의 신호 전달계에 발생하는 돌연변이가 기저세포암과 속질모세포종에서 발견되어 주목을 받았는데,(3) 이후 돌연변이가 없는 SHH 단백질의 과발현 역시 종양의 발생과 밀접한 연관이 있음이 인체 여러 암 특히 식도암, 위암, 대장암, 췌장암, 폐암, 전립선암 등에서 밝혀지면서 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.(4-9) 그러나 갑상선암과 SHH의 연관에 관한 연구는 거의 없다.

HH 단백질은 모두 같은 수용체인 Patched1 (PTCH1)에 결합하는데, 결합되지 않은 상태에서 PTCH1은 종양 유전자인

책임저자 : 박진우, 충북 청주시 흥덕구 개신동 62번지

☎ 361-711, 충북대학교 의과대학 외과학교실

Tel: 043-269-6033, Fax: 043-266-6037

E-mail: webjwpark@chungbuk.ac.kr

게재승인일 : 2007년 5월 30일

이 논문은 2006학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

Smoothened (SMO)의 활성을 억제한다. HH 단백질이 PTCH1 수용체에 결합되면, SMO에 의한 신호전달이 활성화되어 최종적으로 GLI 단백질이 활성화되는데, GLI 단백질의 기질적인 활성은 암 발생과 밀접하게 관련되어 있다.(10) 이런 이유로 HH 신호 전달계는 새로운 항암치료제 개발의 중요한 대상으로 떠오르고 있다. SMO의 활성을 억제하는 치료 약물의 개발 역시 이런 노력의 일환으로 진행되고 있는데, 실험실에서는 이미 Cyclopamine이 개발되어 사용되고 있다.

본 연구는 HH 신호 전달계가 분화 갑상선암의 잠재적 치료 대상이 될 수 있는지를 알아보는 기초 연구로써, SMO 억제제인 Cyclopamine을 이용하여 HH 신호 전달의 차단이 갑상선암 세포주의 생존과 증식에 미치는 영향을 알아보았다.

방 법

1) 재료

세포주 배양에 필요한 Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM):F12 media, l-glutamine, 1x Trypsin/EDTA solution, 1x PBS는 Cellgro Mediatech (Newark, DE)로부터, penicillin-streptomycin, fetal calf serum (FCS), fungizone은 Irvine Scientific (Santa Ana, CA)로부터 구입하였다. Cyclopamine과 Tomatidine은 Biomol Research Lab Inc. (Plymouth Meeting, PA)로부터 구입하였으며, 각각 에탄올에 녹여 10 mM 농도로 만든 뒤, 배양액으로 희석하여 사용하였다. 최고 농도에서 사용된 에탄올의 농도가 0.1% (v/v) 미만이며, 이 농도의 에탄올에서는 세포 증식이나 생존에 유의한 차이를 나타내지 않았다(data not shown). 세포 주기 분석을 위한 propidium iodide (PI), RNase는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)로부터 구입하였다.

2) 세포주와 배양조건

갑상선 유두암 세포주는 UCSF/Mount Zion Medical Center의 Orlo H. Clark으로부터 분양받았는데, TPC-1은 Nabuo Satoh (일본)로부터, 갑상선 여포암 세포주인 FTC-133, FTC-236, FTC-238은 Peter Goretzki (독일)로부터 분양받은 것이었고,(11) XTC-1 세포주(Hurthle 세포)는 직접 확립한 것이었다.(12)

세포주의 유지 배양액은 DMEM-12를 기본으로 10% FCS, penicillin (10,000 U/ml), streptomycin (10,000 U/ml), fungizone (250 mg/ml)이 포함되도록 만들어 사용하였다. 세포주는 가슴 배양기에서 37 (C, 5% CO₂, 95% O₂의 환경을 유지하여 배양하였다. 실험 시작 24시간 전부터 혈청농도를 1% FCS로 낮춘 배양액으로 바꾸어 유지하였다.

3) 세포 증식 억제 검사(MTT colorimetric assay)

세포 증식 억제 검사는 96-well plate를 이용하여, 각 조건

당 6 well을 사용하여 이루어졌다. 갑상선암 세포주에 따라 well 당 세포수가 $3-5 \times 10^3$ 되도록 분주하고, 배양액 또는 몇 가지 농도의 Cyclopamine과 Tomatidine을 포함하는 배양액으로 2일 또는 4일간 처치한 다음, Colorimetric MTT (dimethyl-thiazol-diphenyltetrazolium bromide) proliferation assays를 시행하였다. MTT (400 mg/ml)를 각 well에 첨가하고, 3시간 동안 배양기에 둔 뒤, 0.04 N HCl/iso-propanol/3% SDS를 추가하여 1시간 동안 상온에 방치하였다. ELISA microplate reader (Molecular Devices)를 이용하여 595 nm/620 nm (1-reference)에서 흡광도를 측정하였다.

세포증식은 다음의 식을 이용하여 산출하였다:

$$\% \text{ Growth} = \frac{\text{Å (control cells)} - \text{Å (treated cells)}}{\text{Å (control cells)}} \times 100$$

4) 세포 주기 분석(Cell cycle analysis)

6 well plate에서 갑상선암 세포를 각각 1×10^6 개씩 분주하고, 처음 24시간 동안 혈청이 포함 된 배양액으로 배양하고, 실험 시작 전 24시간 동안 혈청농도를 1% FCS로 낮춘 배양액을 사용하였다. Cyclopamine을 각각 0, 5, 10 uM 농도가 되게 하여 24시간 동안 투여한 뒤, 1x Trypsin/EDTA 용액을 이용하여, 세포를 수확하였다. 5×10^5 세포를 200 μ l 1xPBS로 재 부유한 뒤, 차가운 70% ethanol 2 ml로 -20°C에서 30분간 고정하였다. 고정한 세포를 다시 원침하여 상층액을 버리고, 0.8 ml의 1xPBS로 재부유한 뒤, 1 mg/ml RNase와 400 μ g/ml PI를 각각 0.1 ml씩 넣고 충분히 혼합하고 빛을 피하여 37°C에서 30분간 방치한 후 유세포 분석을 시행하였다.

유세포분석은 시료가 준비 되는대로 바로 시행하였으며, Becton Dickinson사의 FACScan을 이용하였다. 데이터 분석은 CELLQuest software를 이용하여, 분석할 세포를 선택하여(gating), 10,000 events (cells) 이상을 이용하였고, 세포주기의 분석은 Modfit software (Verity Software House, Inc.)를 이용하였다.

5) 통계적 방법

세포증식억제 검사 결과의 대조군과 치료군 간 비교는 ANOVA를 이용하였으며, $P < 0.05$ 을 유의하다고 판정하였다. 통계 검사는 윈도우즈 용 SPSS 10.0을 사용하여 시행하였다.

결 과

1) 세포 증식 억제 효과

갑상선암세포주에서 Cyclopamine은 농도와 치료 기간에 비례하여 갑상선암세포의 성장을 억제하였다. 대조군으로 사용한 tomatidine은 같은 농도와 치료 기간 동안에 세포 성장에 큰 영향을 미치지 않았다. Cyclopamine 농도 5, 10, 20 uM

에서 4일간 치료하였을 때, 대조군에 비교한 세포 증식 억제율의 비율은 TPC-1 세포주에서 $23.6 \pm 4.9\%$, $66.4 \pm 4.7\%$, $69.3 \pm 1.3\%$ FTC-133 세포주에서 $7.5 \pm 2.8\%$, $10.7 \pm 3.2\%$, $49.6 \pm 6.4\%$ FTC-236 세포주에서 $19.2 \pm 9.5\%$, $50.4 \pm 4.8\%$, $60.4 \pm 2.0\%$ FTC-238 세포주에서 $22.8 \pm 4.2\%$, $53.4 \pm 5.5\%$, $63.7 \pm 4.8\%$ XTC-

1 세포주에서 $7.6 \pm 5.8\%$, $16.6 \pm 2.2\%$, $24.0 \pm 4.3\%$ 였다(Fig. 1).

실제로 약물 처리를 시작할 때와 비교하여 세포수의 현저한 감소를 보인 경우는, TPC-1의 경우 치료 후 4일째 10 uM 농도 이상에서였으며, FTC-133의 경우에는 치료 후 4일째 20 uM 농도 이상에서였다. XTC-1의 경우에는 세포 증식의

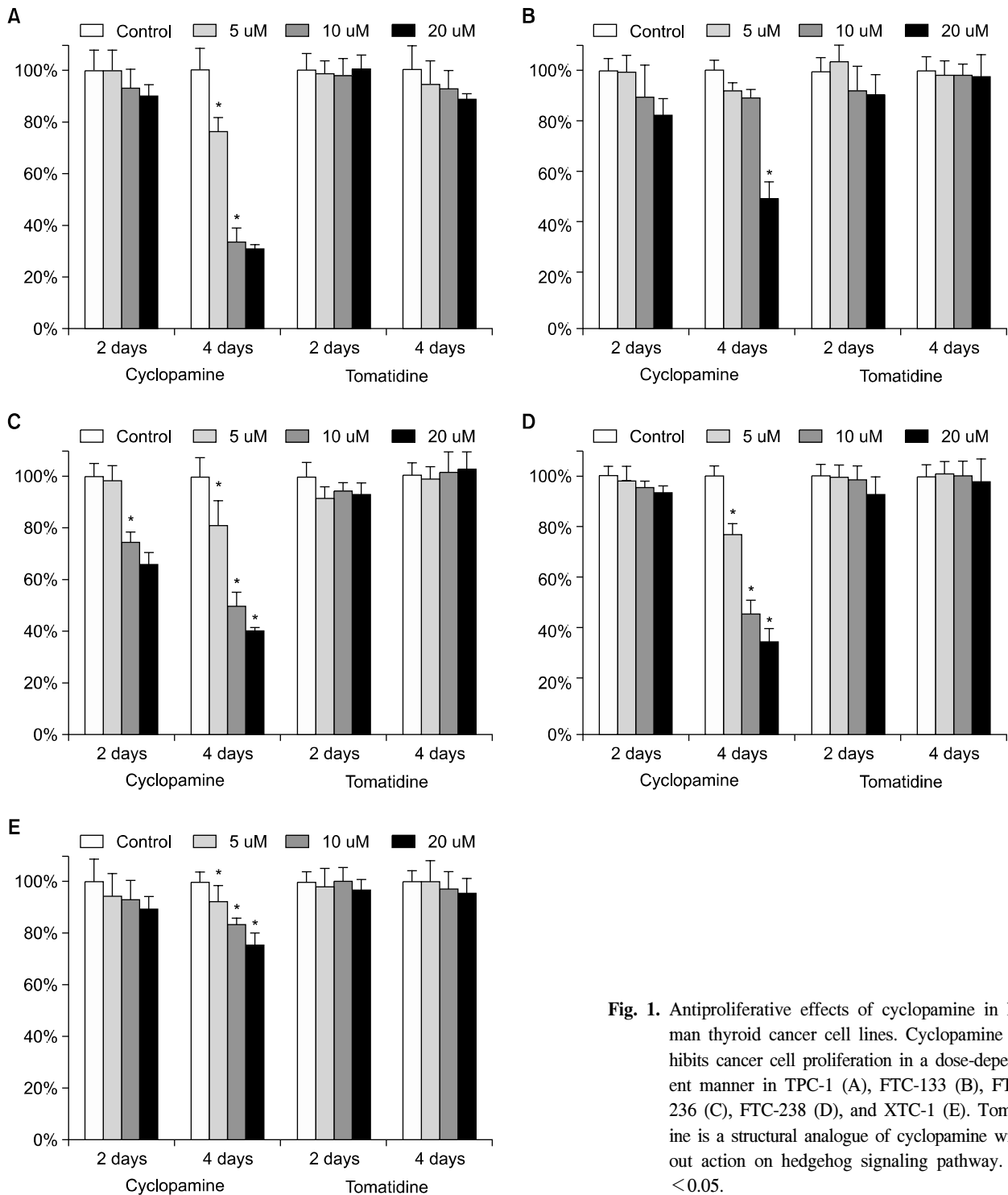


Fig. 1. Antiproliferative effects of cyclopamine in human thyroid cancer cell lines. Cyclopamine inhibits cancer cell proliferation in a dose-dependent manner in TPC-1 (A), FTC-133 (B), FTC-236 (C), FTC-238 (D), and XTC-1 (E). Tomatidine is a structural analogue of cyclopamine without action on hedgehog signaling pathway. *P < 0.05.

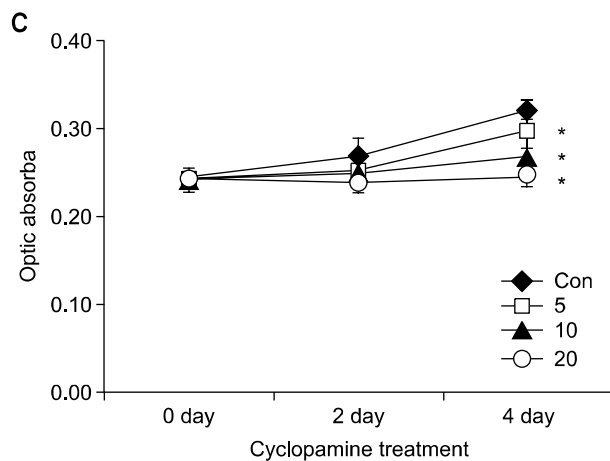
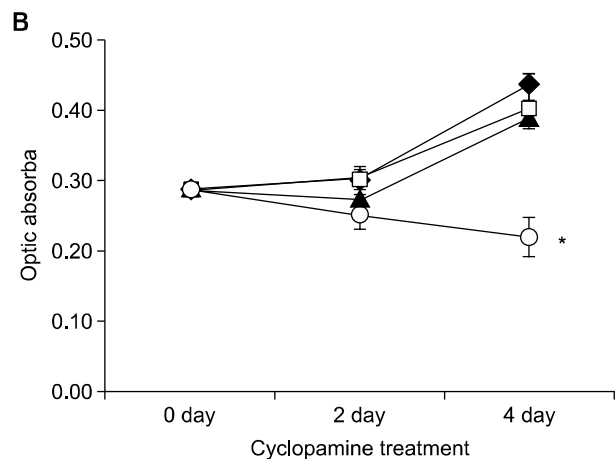
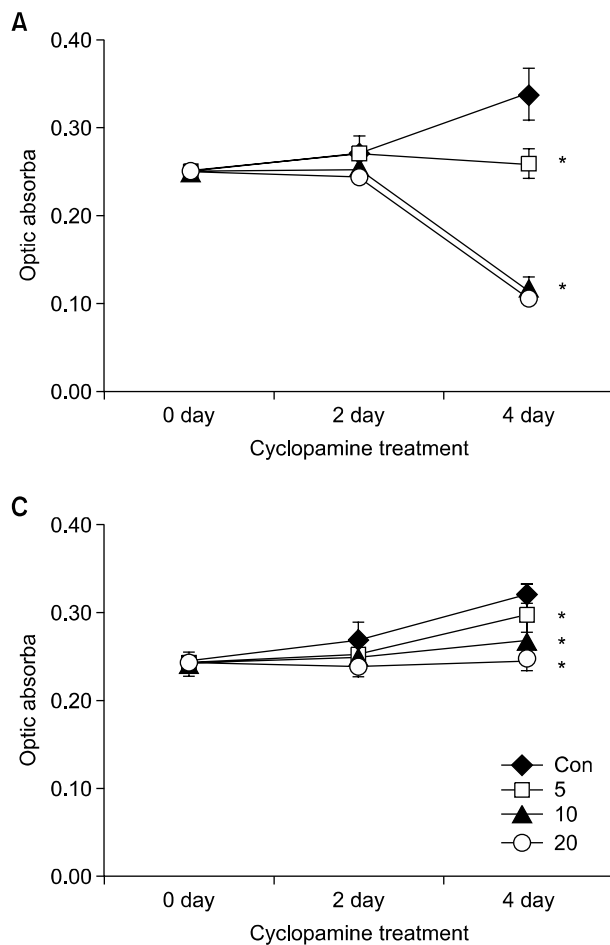


Fig. 2. Cytotoxic vs. cytostatic effect of cyclopamine in human thyroid cancer cell lines. Cyclopamine reduces cancer cell mass at relatively high concentrations in TPC-1 (A) and FTC-133 (B), whereas it dose not in XTC-1 (C). *P<0.05.

둔화를 보여주었을 뿐, 실질적인 세포수 감소는 관찰할 수 없었다(Fig. 2).

2) 세포 주기의 변화

비교적 cyclopamine 치료에 대한 반응성이 좋은 TPC-1 세포주를 대상으로 세포 주기 G₀/G₁, S, G₂/M 에서의 세포 분율을 측정 한 결과, 대조군에서는 각각 63.7±4.5%, 31.2±1.6%, 5.1±2.9%이었고, cyclopamine 5 uM 치료군에서는 각각 67.6±4.3%, 29.4±3.2%, 3.0±1.8%, cyclopamine 10 uM 치료군에서는 각각 60.9±11.4%, 35.7±10.0%, 3.5±2.9%였다 (Fig. 3). 대조군과 치료군간에 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다. 세포사멸을 의미하는 sub-G₀/G₁ 세포 분율은 대조군과, cyclopamine 5 uM, 10 uM 치료군에서 각각 20.0±17.1%, 29.2±20.3%, 38.4±26.6%로, 점차 증가하는 소견을 보였지만, 통계적 유의성은 없었다.

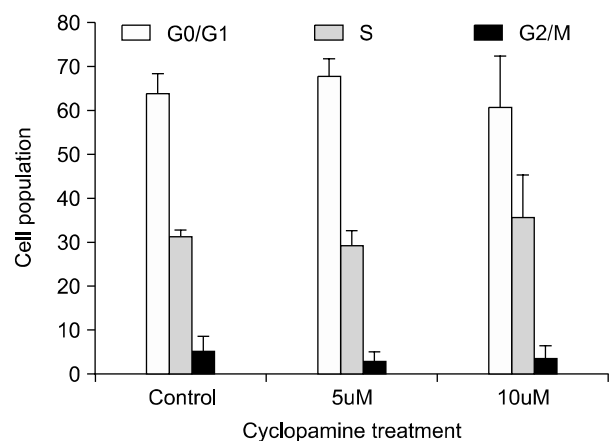


Fig. 3. Changes in cell cycle after cyclopamine treatment in TPC-1 cell line. Cyclopamine dose not significantly affect cell cycle.

고 찰

본 연구의 결과 HH 신호 전달을 차단하는 Cyclopamine이 농도에 비례하여 갑상선암세포주의 세포증식을 억제함을

알 수 있었다. 세포증식 억제 효과는 세포주에 따라 큰 차이를 보였는데, TPC-1, FTC-236, FTC-238에서는 비교적 치료 효과가 현저하였지만, FTC-133에서는 높은 농도에서만 효과가 관찰되었으며, XTC-1은 비교적 치료에 저항적이었다.

세포 주기 분석의 결과 뚜렷한 G₀/G₁ 세포주기 정지는 관찰할 수 없었으며, 치료 농도에 비례하여 sub-G₀/G₁ 세포 분율이 증가함을 관찰하였다.

Sonic hedgehog (SHH) 단백질은 초파리의 형태 발생에 관여하는 Hedgehog (HH) 단백질의 표유류에서의 상동 물질로, 뇌, 척수, 근골격, 폐, 위장관 조혈세포 등 여러 종류의 배아 조직 발생에 중요한 역할을 한다.(3,13-15) SHH 단백질의 세포 내 신호 전달은 Patched1 (PTCH1)와 Smoothened (SMO), 두 종류의 단백질과의 상호 작용으로 시작된다. PTCH1은 SHH 수용체로 작용하지만, 그 자체로 세포 내 신호 전달을 유도하지 못한다. SHH 단백질이 없는 환경에서 PTCH1은 Smo의 활성을 억제하고 있는 데, 일단 SHH 단백질이 PTCH1과 결합하면, SMO에 대한 억제가 풀리면서 세포 내 신호 전달이 진행된다.(10)

동물 모델에서와 같이 SHH 신호 전달계의 이상은 인체 종양의 발생과 밀접한 연관성을 보이는 데, 대개 두 가지 경로로 발생한다고 추정하고 있다. 즉 신호 전달 경로의 한 곳에 돌연변이가 발생하거나(ligand-independent), HH 자체가 과발현되어(ligand-dependent) 발생할 수 있다. 전자의 경우 Gorlin 증후군이 대표적인 예로 HH 신호전달의 억제자인 PTCH1의 돌연변이로 발생하는데, 환자는 많은 수의 기저 세포암을 나타내며, 드문 뇌종양인 속질모세포종이나 횡문 근육종에 이환될 위험이 높아진다. 이런 돌연변이는 속발성 기저세포암 환자의 대부분에서도 관찰되며, 일부에서는 SMO의 돌연변이가 관찰되는데, PTCH1의 억제에 덜 민감해 진다. 이 외에도 HH 신호 전달계의 다른 일원인 SUFU의 돌연변이가 속발성 속질모세포종에서 발견된다. 그러나 이런 유전자 변이는 다른 종류의 암에서는 거의 발견되지 않는다.(2)

최근 이러한 신호 전달계 주요 단백질의 돌연변이가 없이도 HH 신호전달의 이상이 발견될 수 있다는 증거가 축적되고 있는데, HH 단백질 자체가 과발현되는 경우로, 식도암, 위암, 대장암, 췌장암, 폐암, 전립선암 등 많은 인체 암에서 관찰할 수 있다.(4-9,16,17) 그러나 이런 이상 과발현의 기전은 잘 알려져 있지 않다. 다만 이런 암 세포의 상당수가 cyclopamine에 의해 세포 증식이 억제되는 것으로 보아 SMO 활성이 암발생에 매우 중요함을 알 수 있다. 과발현된 HH 단백질이 암세포에 어떻게 작용하는지 그 구체적인 기전 역시 아직은 분명하지 않으나, 몇 가지 가설이 있다. 먼저 autocrine 모델은 주로 시험관내 실험의 결과를 바탕으로 제안되는 것으로, 종양 세포가 만든 HH 단백질이 전체 종양 세포에 작용한다는 것이다. 반면 만들어진 HH 단백질이 종양의 일부를 이루는 줄기세포에 선택적으로 작용한다는 가설도 있다. 마지막으로, paracrine 모델은 상피 세포에서 분비된 HH가 종양 주위의 기질세포(myofibroblast, mesenchyme, stroma compartment)에 작용하고 여기에서 각종 성장인자를 분비하여 종양의 성장을 돕는다는 것이다.(1)

Cyclopamine은 붓꽃과의 익시아(corn lilies)에서 추출되는 자연물질로 SMO에 작용하여 HH 신호전달을 차단한다.(18) Cyclopamine은 SHH 단백질의 과발현을 보이는 식도암, 대장암, 난소암, 췌장암, 구강 편평세포암 세포주 등에서 세포증식을 억제하는데, 현저한 효과를 보이기까지는 2~3일 정도의 시간이 필요하였다.(4,6,19-21) 또한 이들 세포주에서 Cyclopamine 치료는 세포사멸을 유도하였고, 현저하지는 않았지만 G₀/G₁ 세포주기 정지(G1 arrest)를 유도하였으며, cyclin A, cyclin D1의 감소, p21, p27 증가를 유도하였다. 그러나 몇몇 보고는 성장 억제를 위해 투여한 Cyclopamine의 농도가 매우 높았는데, 이는 세포주의 생존과 증식이 더 이상 HH 신호 전달계에만 의존하지 않음을 의미할 수도 있고, Cyclopamine의 비특이적인 효과로 생각할 수도 있어 결과의 해석에 유의해야 한다.

갑상선암 세포주에서 cyclopamine 치료는 세포주에 따라 반응성의 차이를 보였다. 유두암세포주인 TPC-1과 소포암 세포주인 FTC-133, 236, 238의 경우에는 비교적 비슷한 세포성장 억제 패턴을 관찰할 수 있었다. 그러나 휘틀세포암 세포주인 XTC-1의 경우에는 비교적 치료에 저항적이었는데, 최고 농도인 20 μ M로 4일간 치료한 경우에도 성장 억제는 25%에 그쳤다. 비교적 치료 반응성이 좋다고 생각되는 TPC-1과 FTC-133의 경우에도 다른 보고와 비교할 때 비교적 높은 10 μ M 또는 20 μ M 농도에서, 세포수가 처음 분주한 수보다 적어지는 현상을 관찰할 수 있었고, 나머지 농도와, XTC-1 세포주에서는 둔화는 되더라도 세포증식이 계속 일어남을 관찰하였다. 세포 주기의 변화에서 통계적 유의성을 찾기는 어려웠지만, G₀/G₁ 세포주기의 비율이 Cyclopamine 5 μ M 농도의 치료에서 약간 증가하였다가, 10 μ M 농도에서는 오히려 감소하는 경향을 보였다. 그러나 세포사멸을 의미하는 sub-G₀/G₁ 세포 분율은 Cyclopamine 치료 농도가 증가함에 따라 증가하였다. 이런 사실에 근거하여 10 μ M 농도의 치료군에서는 증가된 G₀/G₁ 세포주기의 세포들이 세포사멸에 의해 소실되었거나, 높은 농도의 치료에서는 세포주기 정지 보다는 직접 세포사멸을 유도하는 경향이 더 강하게 나타날 수 있다고 추정할 수 있겠다.

본 연구를 통해 갑상선암 세포주에서도 cyclopamine의 세포증식 억제 효과를 확인할 수 있어 HH 신호 전달계는 잠재적인 새로운 치료의 대상으로써 추가의 연구가 필요할 것으로 생각한다. 궁극적으로 HH 신호 전달의 억제가 갑상선암의 새로운 치료법이 되기 위해서는, 정상 발달과, 창상 치유, 조직 재생 등에 중요한 역할을 하는 이 전달계의 차단이 가져올 수 있는 잠재적인 독성의 규명이 선행되어야 하겠지만, 이와 더불어 치료의 잠재력 역시 확인이 필요하다. 이를 위해서는 HH 신호 전달에 관여하는 여러 단백질의 발현을 관찰할 필요가 있고, 더불어 cyclopamine이 인체 여러 암 세포에서 세포 성장 뿐 만 아니라 조직학적 유형 또는 분화, 림프전 전이, 원격전이와도 연관이 있는 것으로 보고되는 바, 이에 대한 추가 연구도 필요할 것으로 생각한다.(5,21,22)

결론

HH 신호 전달을 차단하는 Cyclopamine은 농도에 비례하여 갑상선암세포주의 세포증식을 억제하였다. TPC-1, FTC-236, FTC-238 세포주에서 치료 효과 더 좋았으며, XTC-1은 비교적 치료에 저항적이었다. 세포 주기 분석의 결과 Cyclopamine치료에 의한 뚜렷한 G₀/G₁ 세포주기 정지는 관찰할 수 없었지만, 치료 농도에 비례하여 sub-G₀/G₁ 세포 분율이 증가하는 경향을 보였다.

REFERENCES

- 1) Galmozzi E, Facchetti F, La Porta CA. Cancer stem cells and therapeutic perspectives. *Curr Med Chem* 2006;13:603-7.
- 2) Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 2001;15:3059-87.
- 3) Xie J, Johnson RL, Zhang X, Bare JW, Waldman FM, Cogen PH, et al. Mutations of the PATCHED gene in several types of sporadic extracutaneous tumors. *Cancer Res* 1997;57:2369-72.
- 4) Ma X, Sheng T, Zhang Y, Zhang X, He J, Huang S, et al. Hedgehog signaling is activated in subsets of esophageal cancers. *Int J Cancer* 2006;118:139-48.
- 5) Fukaya M, Isohata N, Ohta H, Aoyagi K, Ochiya T, Saeki N, et al. Hedgehog signal activation in gastric pit cell and in diffuse-type gastric cancer. *Gastroenterology* 2006;131:14-29.
- 6) Qualtrough D, Buda A, Gaffield W, Williams AC, Paraskeva C. Hedgehog signalling in colorectal tumour cells: induction of apoptosis with cyclopamine treatment. *Int J Cancer* 2004;110:831-7.
- 7) Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, et al. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 2003;425:851-6.
- 8) 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;422:313-7.
- 9) Sanchez P, Hernandez AM, Stecca B, Kahler AJ, DeGueme AM, Barrett A, et al. Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:12561-6.
- 10) Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened. *Nature* 2002;418:892-7.
- 11) Goretzki PE, Frilling A, Simon D, Roehrer HD. Growth regulation of normal thyroids and thyroid tumors in man. *Recent Results Cancer Res* 1990;118:48-63.
- 12) Zielke A, Tezelman S, Jossart GH, Wong M, Siperstein AE, Duh QY, et al. Establishment of a highly differentiated thyroid cancer cell line of Hürthle cell origin. *Thyroid* 1998; 8:475-83.
- 13) Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, et al. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 1996;383:407-13.
- 14) Litingtung Y, Lei L, Westphal H, Chiang C. Sonic hedgehog is essential to foregut development. *Nat Genet* 1998;20:58-61.
- 15) Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, Baker DP, Williams KP, Chadwick K, et al. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol* 2001;2:172-80.
- 16) Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, et al. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* 2003;425:846-51.
- 17) Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, et al. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* 2004;431:707-12.
- 18) Chen JK, Taipale J, Cooper MK, Beachy PA. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev* 2002;16:2743-8.
- 19) Nishimaki H, Kasai K, Kozaki K, Takeo T, Ikeda H, Saga S, et al. A role of activated Sonic hedgehog signaling for the cellular proliferation of oral squamous cell carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:313-20.
- 20) Chen X, Horiuchi A, Kikuchi N, Osada R, Yoshida J, Shiozawa T, et al. Hedgehog signal pathway is activated in ovarian carcinomas, correlating with cell proliferation: it's inhibition leads to growth suppression and apoptosis. *Cancer Sci* 2007;98:68-76.
- 21) Feldmann G, Dhara S, Fendrich V, Bedja D, Beaty R, Mullendore M, et al. Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers. *Cancer Res* 2007;67:2187-96.
- 22) Yanai K, Nagai S, Wada J, Yamanaka N, Nakamura M, Torata N, et al. Hedgehog signaling pathway is a possible therapeutic target for gastric cancer. *J Surg Oncol* 2007;95:55-62.