

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10972

研究課題名(和文)軟骨肉腫鑑別分子マーカーとしての尿素輸送体UT-Bの発現・機能解析

研究課題名(英文)Analysis of expression and function of urea transporter UT-B in chondrosarcoma

研究代表者

佐々木 裕美 (Sasaki, Hiromi)

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・助教

研究者番号：60773380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨肉腫と内軟骨腫の鑑別は治療方針決定に重要であるが、病理組織像が酷似することが問題であり鑑別分子マーカーの同定が必要である。我々は軟骨細胞分化に重要なTGF- β /BMPシグナルとその下流遺伝子が鑑別マーカーになる可能性を研究した。マイクロアレイで同定されたTGF- β /BMPシグナルの下流遺伝子であるSLC14A1やPEG10の発現について軟骨肉腫細胞株、臨床検体を用いて検討を行い、これらの遺伝子の発現が悪性度に関与することが明らかとなり、軟骨系腫瘍の鑑別因子としての可能性が示唆された。またこれらの発現を阻害することで軟骨肉腫における悪性度を低減させる分子治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟骨肉腫は、化学療法や放射線治療に抵抗性であり有用な治療は手術療法のみである。臨床では肺転移をきたす悪性度の高い軟骨肉腫も存在し、進行期軟骨肉腫に対しては有効な治療がないのが現状である。また、軟骨肉腫、特にgrade1軟骨肉腫は病理学的に良性である内軟骨腫との鑑別が困難であることが問題である。今回の研究でTGF- β /BMPシグナルとその下流因子であるSLC14A1やPEG10の発現が軟骨肉腫の悪性度に関与し、さらにPEG10については細胞増殖や運動、浸潤能とも関与していることが明らかとなった。今後、PEG10は軟骨肉腫における鑑別マーカーだけでなく分子治療標的となりうる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Histological distinction between enchondroma and chondrosarcoma is difficult because of a lack of definitive biomarkers.

We examined TGF- β signaling and downstream genes including Solute Carrier Family 14 Member 1 (SLC14A1) and Paternally expressed gene 10 (PEG10) identified by microarray analysis are useful biomarkers in differentiation with chondrosarcoma and enchondroma. Highly active TGF- β signaling and BMP signaling and concurrent downregulation of SCL14A1 and PEG10 in human chondrosarcoma samples were found in human chondrosarcoma samples. PEG10 expression was suppressed by TGF- β signaling, and PEG10 interfered with the TGF- β and BMP-SMAD pathways in chondrosarcoma cells. Our results indicate that expression of PEG10 is an index to distinguish between enchondroma and chondrosarcoma, and the possibility of molecular target for suppressing the aggressive phenotypes of chondrosarcoma cells.

研究分野：骨腫瘍

キーワード：軟骨肉腫 TGF- SLC14A1 PEG10

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

軟骨肉腫は、悪性骨腫瘍として2番目に頻度が高く(10~20%、年間発生20万人に一人)、病理学的に3つのgradeに分類される。軟骨性性質として豊富な細胞外基質が物理的バリアを構築し、かつ血流に乏しいため薬剤デリバリーが困難で、しかも腫瘍としては成長速度が遅いため、放射線治療や化学療法がほとんど無効である。しかしgrade1以外は遠隔転移をきたす場合もあり適切に切除しても10年生存率はgrade2、3それぞれ60%、30%程度と予後不良である。その良性カウンターパートである内軟骨腫は、経過観察または局所搔把が選択される。シビアな問題は、治療法と予後に大きな違いがあるにも関わらずこれらgrade1軟骨肉腫と内軟骨腫の病理学的鑑別はしばしば困難であるという点である。現時点で鑑別診断に有効な分子マーカーが同定されていないことが大きな要因で、その同定が急務である。

2. 研究の目的

本研究では、*SLC14A1* 遺伝子とコード蛋白尿素輸送体B (UT-B)の内軟骨腫と軟骨肉腫における発現について、TGF- β シグナルと比較しながら解析し、鑑別診断分子マーカーとしての意義を評価する。さらにその軟骨肉腫の悪性表現型と抗がん剤抵抗性における役割を解明し、治療標的としての可能性を検討する。

3. 研究の方法

- (1)内軟骨腫と軟骨肉腫の臨床検体における *SLC14A1*/UT-B の発現解析と臨床像との関連検討
- (2)軟骨肉腫細胞株の増殖、運動、浸潤、抗がん剤抵抗性における *SLC14A1*/UT-B の機能解析

4. 研究成果

- (1)内軟骨腫と軟骨肉腫の臨床検体における *SLC14A1*/UT-B の発現解析

軟骨肉腫臨床組織サンプルに対して、尿素輸送体UT-B(コード遺伝子:*SLC14A1*)の免疫組織化学染色の条件検討を行なった。これまでに、軟骨肉腫細胞株SW1353において、TGF- β 1を添加してhigh-gradeをmimicした場合に*SLC14A1*の発現が著明に減少すること、また実際に臨床組織サンプルにおいて*SLC14A1*の発現が良性の内軟骨腫に比較してgrade1, grade2軟骨肉腫では強く抑制されていることを確認している。一般に悪性腫瘍の悪性度と分化度は反比例するので、*SLC14A1*の軟骨細胞分化マーカーへの影響をSW1353細胞とsiRNAで観察した。その結果、siRNAによる*SLC14A1*のノックダウンは十分に得られたが、4日目までは明らかな分化度の変化はなかった。ところが、8日目においては軟骨細胞分化マスター転写因子SOX9の弱い、しかし有意な増加を認め、軟骨特異的遺伝子COL2A1は著明に2.5倍ほどの増加を呈し、分化後期マーカーCOL10A1は有意差はなかったが、増加する傾向を示した。この結果は*SLC14A1*が分化度の低い軟骨肉腫で発現抑制されている事から考えると、逆の結果であり、したがって*SLC14A1*が軟骨肉腫で発現抑制される意義は、分化度とは別のメカニズムにあると考えられた。すなわち、本来のトランスポーターとして悪性を阻止している可能性、また浸潤に重要なMMP-13の発現にかかわる報告が一つある(Sato T, et al, Ann Rheum Dis, 2011)事から浸潤能に関わる可能性、などに研究の重心を移す必要が考えられた。

- (2)軟骨肉腫細胞株の増殖、運動、浸潤、抗がん剤抵抗性における *SLC14A1*/UT-B の機能解析

軟骨肉腫細胞株SW1353において*SLC14A1*(UT-B)をsiRNAノックダウンすると、WST assayで評価する細胞増殖が著明に抑制された。*SLC14A1*の発現は、内軟骨腫に比べて軟骨肉腫で減少する事を確認しているが、したがってcell growthから観る悪性度については、*SLC14A1*は負に働いていると考えられた。一方で、TGF- β 1刺激によって*SLC14A1*が発現減少することと、この時cell growthも抑制される事も確認しているので、このよく知られたTGF- β の細胞増殖抑制効

果は、実は SLC14A1 発現を抑制することによる経路もあり得る、という新たな知見につながる可能性が出てきた。尿素自体の細胞増殖への影響を WST assay で調べると、0.05, 0.5, 5mM ではほぼ差がなく軽微な抑制が観られ、5mM でさらに軽度の抑制効果を観たが、500mM にすると停止し、toxic と考えられた。細胞遊走能については、scratch assay を行なったが、SLC14A1 siRNA によって抑制がかかった。しかし、尿素添加によっては 0.05, 0.5mM では不変で、5mM で促進、50mM で逆転して不変、500mM で明らかな抑制となった。従って、5mM では尿素は細胞運動に促進的に働くことが示唆され、SLC14A1 ノックダウンで抑制がかかるということから、UT-B を介する尿素輸送が、軟骨肉腫細胞の運動を促進している可能性がある。しかし、これも仮説と逆の結果となった。

一方で、TGF- β 1 刺激下で SLC14A1 と発現が連動する PEG10 の、軟骨肉腫悪性度への影響についても同時に解析を進めた。内軟骨腫と軟骨肉腫の臨床サンプルにおいて、悪性度とともに PEG10 の発現が減少することが免疫染色と mRNA(定量的 RT-PCR)発現解析で確認され、PEG10 の発現と TGF- β /BMP 活性は逆相関していた。

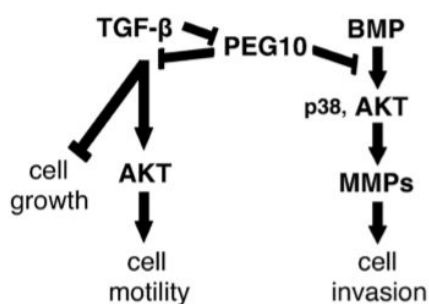
軟骨肉腫細胞株において、TGF- β 刺激で PEG10 の発現の減弱が確認され、正常軟骨細胞株や軟骨肉腫細胞株におけるレポーターアッセイで、PEG10 は TGF- β と SMAD 経路を抑制した。

PEG10 の腫瘍の増殖能・運動能・浸潤能への作用を検討した。軟骨肉腫細胞株は、TGF- β 1 刺激で増殖抑制されるが、PEG10 はこの TGF- β の作用を阻害し増殖を促進した。運動能に関しては、PEG10 は TGF- β 1 の AKT 経路を介した促進作用を抑制した。一方浸潤能においては、MMP-1、-3、-13 の発現が重要であるが、PEG10 は BMP-6 による p38MAPK および AKT のリン酸化を介したこれらの発現を抑制し、結果的に細胞浸潤を抑制した (Fig.1)

これらの結果より、PEG10 および軟骨マーカーと TGF- β /BMP 活性の逆相関が明らかとなり、軟骨腫瘍の鑑別因子としての可能性が示唆された。

また、PEG10 は AKT および p38 経路を介した TGF- β /BMP シグナル伝達を阻害することで、細胞の運動と浸潤を抑制したことから、軟骨肉腫の悪性度を低減させる分子治療標的となりうる可能性が示唆された。

【 Fig.1 】



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yahiro Yuhei, Maeda Shingo, Shinohara Naohiro, Jokoji Go, Sakuma Daisuke, Setoguchi Takao, Ishidou Yasuhiro, Nagano Satoshi, Komiya Setsuro, Taniguchi Noboru	4. 巻 37
2. 論文標題 PEG10 counteracts signaling pathways of TGF- and BMP to regulate growth, motility and invasion of SW1353 chondrosarcoma cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 441
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00774-018-0946-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	前田 真吾 (Maeda shingo) (60353463)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任准教授 (17701)	
研究分担者	永野 聡 (Nagano Satoshi) (50373139)	鹿児島大学・医歯学域医学系・講師 (17701)	
研究分担者	小宮 節郎 (Komiya Setsuro) (30178371)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	