

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462343

研究課題名(和文)軟骨肉腫分化誘導療法に向けたTGF- $\beta$ シグナルの標的遺伝子検索と機能解析研究課題名(英文)Target gene screening of TGF- $\beta$  signaling and functional analysis for differentiation-inducing therapy of chondrosarcoma

研究代表者

横内 雅博(Yokouchi, Masahiro)

鹿児島大学・医歯学域医学系・講師

研究者番号：80359976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨肉腫と良性の内軟骨腫は病理組織像がよく似ているので、その鑑別診断が整形外科腫瘍医のジレンマである。鑑別分子マーカーの同定が喫緊の課題であり、悪性度と反比例する分化度に関連する可能性もある。我々は軟骨分化に重要な役割を果たすTGF- $\beta$ シグナルに着目し、下流伝達因子SMAD2/3の活性を免疫組織染色で検討し、軟骨肉腫グレード2、1、内軟骨腫の順でTGF- $\beta$ シグナル量が多い事がわかった。そしてTGF- $\beta$ シグナルの下流でPEG10遺伝子が発現低下する事、TGF- $\beta$ シグナルと逆に内軟骨腫、グレード1、2、3の順で発現が高い事を発見した。両者の反比例関係は軟骨肉腫鑑別に役立つ事が期待される。

研究成果の概要(英文)：It is one of the major dilemma for orthopaedic oncologists that, because histology of low grade chondrosarcoma and its benign counterpart enchondroma resembles, there are difficulties in distinguishing these two tumors. Our aim of this study was to discover molecular markers specific for each type of tumor. Moreover, we intended to understand underlying mechanism in lowered differentiation status of chondrosarcoma, to develop differentiation-initiating therapy. We focused on TGF- $\beta$  signaling, because it is a crucial pathway in chondrocyte differentiation. By immunohistochemistry for phosphorylated SMAD2/3, the TGF- $\beta$  signaling intracellular mediators, we found malignant grading-dependent increase of TGF- $\beta$  signaling. We searched for genes which expression was altered by TGF- $\beta$  in chondrosarcoma to find PEG10 to be down-regulated by the pathway. The combined expression analysis of p-SMAD2/3 and PEG10 may help distinguishing and diagnosing these chondrogenic tumors.

研究分野：整形外科学

キーワード：軟骨肉腫 内軟骨腫 TGF- $\beta$  分化度

## 1. 研究開始当初の背景

がんの grade を規定する因子に分化度がある。生物発生・成長過程において、細胞分化と細胞増殖・運動は相反するイベントであり、がん種や肉腫一般的にも分化度と悪性度は反比例する。骨発生腫瘍で骨肉腫について頻度が高い軟骨肉腫においても、その grade と軟骨分化マーカーが反比例する報告は散見され、実際我々はヒト正常軟骨細胞株に比べて、ヒト軟骨肉腫細胞株の分化能が低い事を確認していたが、そのメカニズムは全く不明である。このメカニズムを解明し、人為的に分化度を上げる事が出来れば、それはすなわち悪性度を下げる治療となり、患者の予後を大きく改善すると考えられる。

一方、low grade 軟骨肉腫と良性の内軟骨腫は病理組織像がよく似て鑑別診断が難しい。しかしそれぞれの治療法や予後は、前者は局所浸潤と増大を繰り返し化学療法や放射線治療が無効で広範切除術が唯一の治療選択肢であるのに対し、後者は症状がなれば経過観察、痛みなどがあれば局所搔爬にとどまるので、誤診が与える患者への不利益はいずれの場合でも甚大である事が、整形外科腫瘍医のジレンマである。その理由の一つは、鑑別分子マーカーが存在しない事であり、その同定が喫緊の課題である。

## 2. 研究の目的

軟骨細胞分化は、そのマスター転写因子 SOX9 の発現に始まり、順次 COL2A1 や COL10A1 など、軟骨特異的な基質蛋白遺伝子を発現しながら成熟していく。我々はこれらに重要な役割を果たす事がわかっている TGF- $\beta$  ファミリー・シグナルに着目し、そのメンバーである TGF- $\beta$  と BMP のシグナルと標的遺伝子について調べた。

### (1) 軟骨肉腫における TGF- $\beta$ シグナルと BMP シグナルの status

正常軟骨細胞において BMP シグナルは SOX9 発現を促進し、SOX9 は II 型コラーゲン(COL2A1)等軟骨基質の誘導に不可欠である。軟骨肉腫における低分化度は、TGF- $\beta$  シグナルが誘導する何らかの機構による BMP シグナル活性低下に起因していると仮定し、まず軟骨肉腫における TGF- $\beta$  シグナルと BMP シグナルの活性化状態を調べた。すなわち、病理組織における TGF- $\beta$ /BMP シグナル下流 SMAD のリン酸化(活性化)レベルの評価、また *in vitro* ではヒト正常軟骨細胞株とヒト軟骨肉腫細胞株の軟骨細胞分化系を用いて、SMAD リン酸化状態と、それぞれのシグナル・レポーターを用いたルシフェラーゼ・アッセイで詳細に正常軟骨細胞と軟骨肉腫細胞のシグナル強度の比較を行った。

### (2) TGF- $\beta$ シグナルが軟骨肉腫細胞分化度を抑制するか

TGF- $\beta$  シグナルが軟骨肉腫分化度に抑制的であれば、これをブロックすれば軟骨肉腫の

低い分化度はレスキューされるはずである。軟骨肉腫細胞株に TGF- $\beta$  シグナル抑制剤を添加して分化マーカーを解析し確認する。逆に TGF- $\beta$  添加にて軟骨肉腫細胞株の分化レベルがさらに低くなりうるのか明らかにした。

### (3) ヒト軟骨肉腫細胞株における TGF- $\beta$ 誘導性分化阻害因子の検索

まず SOX9 の発現レベルを調べ、軟骨肉腫でこれが低ければこの上流にある BMP シグナル伝達系をチェックした。すなわち BMP シグナル構成因子 (BMP リガンド、レセプター、SMAD1/5/8、SMAD4) や既知の BMP シグナル抑制因子群の発現レベルを調べ、変化があった場合はそれらが TGF- $\beta$  誘導性が確認した。

SOX9 発現に遜色がないのに分化しないのであれば、SOX9 機能抑制因子群(TWIST1 等)の発現誘導と TGF- $\beta$  誘導性を調べた。

また内因性 BMP シグナルそのものが、例えば BMP の直接標的であり分化抑制因子として知られる ID ファミリーの誘導を介して、むしろ軟骨肉腫の未分化維持に貢献する可能性もあるので、BMP シグナル抑制剤を添加してこれを検証した。

## 3. 研究の方法

### (1) TGF- $\beta$ シグナルは軟骨肉腫組織及び細胞株で亢進しているか Grade 毎の比較検討

最も臨床に直結する重要な情報は臨床病理組織から得られる。最初に臨床病理組織における TGF- $\beta$  ファミリー・シグナル活性状態を免疫組織染色で解析した。変形性股関節症の大腿骨頭非荷重部正常軟骨組織標本を正常分化コントロールに置き、良性の内軟骨腫、軟骨肉腫 grade 1、2、3 の病理組織切片を用いた免疫染色を行う。サンプル数は、grade 3 を除いて  $n > 5$  という当座の目標を達成した。TGF- $\beta$  シグナルの評価は下流の SMAD2/3 のリン酸化で、また TGF- $\beta$  ファミリーの一群を形成し軟骨細胞分化に促進的かつ TGF- $\beta$  シグナルによって影響を受けうる BMP シグナルの活性化は、SMAD1/5/8 のリン酸化の免疫染色で判定した。分化度は軟骨細胞分化マスター因子 SOX9、軟骨基質マーカー・II 型コラーゲン、そして成熟した肥大軟骨基質マーカー・X 型コラーゲンの免疫染色を行い評価した。

軟骨肉腫培養細胞株を用いて *in vitro* における cell-autonomous な TGF- $\beta$  ファミリー・シグナル活性化状態を解析した。ヒト初代間葉系幹細胞 (MSC) から pellet culture(+TGF- $\beta$ +dexamethasone+insulin) で誘導する軟骨細胞分化系と正常軟骨細胞株 C28/I2 の ITS 添加分化誘導系を正常分化コントロールとし、軟骨肉腫細胞株[Hs819.T(由来 Grade 不明), SW1353(Grade 2 由来), OUMS27(Grade 3 由来)]の ITS 誘導(monolayer 及び micromass culture)分化系と比較した。

SOX9, COL2A1, COL11A2, アグリカン, COL10A1 等軟骨細胞分化マーカーと、TGF- $\beta$  シグナル直接標的遺伝子(PAI-1, SMAD7)と BMP シグナル直接標的遺伝子(ID1, ID2, SMAD6)の mRNA 発現を定量的 RT-PCR で解析し比較検討した。リン酸化 SMAD2/3 及び SMAD1/5/8 のウエスタンブロットでシグナル活性化を評価した。TGF- $\beta$  シグナル・レポーター(9xCAGA)及び BMP シグナル・レポーター(BRE)を用いたルシフェラーゼ・アッセイ系でシグナル活性化状態を解析した。

#### (2) TGF- $\beta$ の軟骨肉腫細胞分化度への影響と、誘導される分化度抑制に関わる BMP/SOX9 シグナル調節因子の検索

上記培養軟骨細胞株に TGF- $\beta$  シグナル抑制剤 SB431542 を作用させると分化を獲得するか評価した。この際、悪性度パラメータとして細胞増殖(MTT assay)、細胞運動(wound healing assay)も検討し、逆に減弱するか評価した。

既知の BMP シグナル制御因子[Dan, Chordin, Gremlin, Cerberus, Noggin, Smad6, Smad7, Smurf1, Smurf2, Ski, SnoN(SKIL)等]の発現を細胞分化系でプロファイリングし、培養軟骨肉腫細胞において発現が高いものについて、*in vitro* で TGF- $\beta$  添加で誘導されるか、逆に SB431542 で発現抑制されるか確認した。その結果抽出された因子の病理組織免疫染色にて grade と発現が相関するか解析した。

TGF- $\beta$  シグナルの下流で発現変動する標的遺伝子の検索。  
SW1353 と Hs819.T 細胞に TGF- $\beta$ 1 を添加してマイクロアレイ解析を行った。

#### 4 . 研究成果

内軟骨腫、grade 1,2,3 で免疫組織染色を行ったところ、SMAD2/3 のリン酸化が悪性度が増すにつれて増強し、内軟骨腫と grade 1 軟骨肉腫、そして軟骨肉腫の grade 間にも優位な差を認めた。

TGF- $\beta$  シグナルの下流で発現変動する標的遺伝子として、発現が著明に低下する遺伝子 PEG10 を同定した。PEG10 は正常軟骨細胞株 C28/I2 に比較し、軟骨肉腫細胞株 SW1353、Hs819.T で高発現しており、BMP-6 刺激でさらに亢進、TGF- $\beta$ 1 添加で低下した。PEG10 蛋白は内軟骨腫と軟骨肉腫で陽性であったが、その陽性細胞率は悪性度に逆相関した。PEG10 siRNA は軟骨肉腫の分化度・運動能・増殖能には影響しなかった。一方で BMP-6 は軟骨肉腫細胞株で MMP-1,-3,-13 の発現を増強したが、siPEG10 はこれをさらに増強して浸潤能を亢進した。BMP-6 による MMP-1,-3 上昇は p38 MAPK 阻害剤で抑制され、PEG10 siRNA が BMP 誘導の p38 リン酸化を促進したことから、PEG10 の軟骨肉腫浸潤抑制は、p38 MAPK シグナル経路を介すると示唆され

た。BMP シグナルは軟骨肉腫細胞株で PEG10 と MMPs の発現、細胞浸潤を促進したが、PEG10 は同時に p38 経路を介する MMPs 産生増加を抑え、BMP による細胞浸潤亢進に対してフィードバック機構を担った。High grade 軟骨肉腫では、強い TGF- $\beta$  シグナルが PEG10 発現を抑制し、浸潤に有利となる可能性が示唆された。

PEG10 と TGF $\beta$  シグナル status の逆相関をセットで評価する事で、軟骨腫瘍の鑑別診断に有効である事、PEG10 発現を回復させる方向性は悪性度を低下させる治療につながる可能性が示唆された研究となった。

一定の結果をえられたものの、PEG10 の下流でどんな分子イベントが動いているのかが未だ不明であり、目下さらに研究を深化させている。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

1. BMP signaling upregulates neutral sphingomyelinase 2 to suppress chondrocyte maturation via the Akt signaling pathway as a negative feedback mechanism.

Kakoi H, Maeda S, Shinohara N, Matsuyama K, Imamura K, Kawamura I, Nagano S, Setoguchi T, Yokouchi M, Ishidou Y, Komiya S.

*J Biol Chem* 289: 8135-8150, 2014

査読あり

2. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Enhancer Binding Protein 3 is Essential for the Expression of Asparagine-linked Glycosylation 2 in the Regulation of Osteoblast and Chondrocyte Differentiation. Imamura K, Maeda S, Kawamura I, Matsuyama K, Shinohara N, Yahiro Y, Nagano S, Setoguchi T, Yokouchi M, Ishidou Y, Komiya S.

*J Biol Chem* 289: 9865-9879, 2014

査読あり

[学会発表](計11件)

1. 第38回日本分子生物学会年会【兵庫県神戸市】12月1日～4日, 2015年 (京都大学ウイルス研究所)  
BMP誘導性インプリンティング遺伝子 PEG10は軟骨肉腫細胞においてBMPにより活性化されたp38 MAPK経路とMMPs発現抑制を介して浸潤能を制御する

- 篠原直弘<sup>1,2</sup>、前田真吾<sup>1</sup>、松山金寛<sup>1,2</sup>、八尋雄平<sup>1,2</sup>、今村勝行<sup>1,2</sup>、横内雅博<sup>2</sup>、永野聡<sup>2</sup>、石堂康弘<sup>1</sup>、小宮節郎<sup>1,2</sup>
- <sup>1</sup>鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 医療関節材料開発講座  
<sup>2</sup>鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 運動機能修復学講座 整形外科
2. 第30回日本整形外科学会基礎学術集会【富山県富山市】10月22日～23日、2015年(富山大学整形外科)  
 BMP誘導性のPEG10は軟骨肉腫細胞浸潤能増強を抑制する  
 ○篠原直弘<sup>1,2</sup>、前田真吾<sup>1</sup>、松山金寛<sup>1,2</sup>、八尋雄平<sup>1,2</sup>、横内雅博<sup>2</sup>、石堂康弘<sup>1</sup>、小宮節郎<sup>1,2</sup>  
 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科  
<sup>1</sup>医療関節材料開発講座  
<sup>2</sup>運動機能修復学講座 整形外科
3. 第33回日本骨代謝学会学術総会【東京都新宿区】7月23日～25日、2015年(松本歯科大学 総合歯科医学研究所)  
 BMPにより増強される軟骨肉腫細胞の浸潤能を発現誘導されたPEG10は制御する  
 ○篠原直弘<sup>1,2</sup>、前田真吾<sup>1</sup>、八尋雄平<sup>1,2</sup>、今村勝行<sup>2</sup>、横内雅博<sup>2</sup>、河村一郎<sup>1,2</sup>、石堂康弘<sup>1</sup>、小宮節郎<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 医療関節材料開発講座  
<sup>2</sup>鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 運動機能修復学講座 整形外科
4. Orthopaedic Research Society: Annual Meeting 2015【Las Vegas, U.S.A.】March 28-31, 2015  
 Bone Morphogenetic Protein (BMP) Signaling Induces the Imprinted Paternally Expressed Gene 10 (*PEG10*) to Regulate Expression of Matrix Metalloproteinase (MMP)-1 and -13 in Chondrosarcoma Cells  
 ○<sup>1,2</sup>Shinohara, N; <sup>1</sup>Maeda, S; <sup>1,2</sup>Matsuyama, K; <sup>1,2</sup>Yahiro, Y; <sup>2</sup>Imamura, K; <sup>2</sup>Kawamura, I; <sup>2</sup>Setoguchi, T; <sup>1,2</sup>Nagano, S; <sup>2</sup>Yokouchi, M; <sup>1</sup>Ishidou, Y; <sup>1,2</sup>Komiya, S  
<sup>1</sup> Department of Medical Joint Materials, Kagoshima University, Kagoshima, JAPAN  
<sup>2</sup> Department of Orthopaedic Surgery, Kagoshima University, Kagoshima, JAPAN
5. Myc Target 1 (*MYCT1*) Gene is a Novel Target of TGF-β Signaling to Promote Differentiation of Chondrosarcoma Cells  
 ○<sup>1,2</sup>Yahiro, Y; <sup>1</sup>Maeda, S; <sup>1,2</sup>Shinohara, N; <sup>1,2</sup>Matsuyama, K; <sup>2</sup>Kawamura, I; <sup>2</sup>Setoguchi, T; <sup>1,2</sup>Nagano, S; <sup>2</sup>Yokouchi, M; <sup>1</sup>Ishidou, Y; <sup>1,2</sup>Komiya, S  
<sup>1</sup> Department of Medical Joint Materials, Kagoshima University, Kagoshima, JAPAN  
<sup>2</sup>Department of Orthopaedic Surgery, Kagoshima University, Kagoshima, JAPAN
6. 第28回日本軟骨代謝学会【東京都文京区】3月6日～7日、2015年(東京医科歯科大学運動器外科学)  
 BMP-induced *PEG10* is highly expressed in chondrosarcoma cells to suppress BMP signaling-mediated expression of matrix metalloproteinase (MMP)-1/13 and cell invasion.  
 ○Naohiro Shinohara<sup>1,2</sup>, Shingo Maeda<sup>1</sup>, Katsuyuki Imamura<sup>2</sup>, Kanehiro Matsuyama<sup>1,2</sup>, Masahiro Yokouchi<sup>2</sup>, Satoshi Nagano<sup>2</sup>, Takao Setoguchi<sup>3</sup>, Yasuhiro Ishidou<sup>1</sup>, Setsuro Komiya<sup>1,2,3</sup>  
<sup>1</sup>Department of Medical Joint Materials, <sup>2</sup>Department of Orthopaedic Surgery, <sup>3</sup>Near-Future Locomotion Organ Medicine Creation Course, Kagoshima University, Kagoshima, Japan
7. Joint International Symposium on TGF-β Family and Cancer: Signal Network in Tumor Microenvironment【Tsukuba, Japan】January 12-13, 2015  
 BMP-induced PEG10 regulates level of metalloproteinases and invasion of chondrosarcoma cells  
 ○Shingo Maeda, Naohiro Shinohara, Masahiro Yokouchi, Satoshi Nagano, Yasuhiro Ishidou, Setsuro Komiya  
<sup>2</sup>Department of Orthopaedic Surgery, Kagoshima University, Kagoshima, JAPAN
8. 第37回日本分子生物学会年会【神奈川県横浜市】11月25日～27日、2014年(理化学研究所総合生命医科学研究センター)  
 軟骨肉腫細胞株で高発現するインプリンティング遺伝子PEG10はTGF-βファミリー・シグナルとMMP発現を制御する  
 鹿児島大学整形外科  
 ○篠原直弘、今村勝行、松山金寛、横内雅博、小宮節郎  
 医療関節材料開発講座  
 前田真吾、石堂康弘
9. 第29回日本整形外科学会基礎学術集会【鹿児島県鹿児島市】10月9日～10日、2014年(鹿児島大学医学部整形外科)  
 哺乳類特異的遺伝子PEG10はTGF-βファミリー・シグナルを制御し軟骨細胞と軟骨肉腫細胞の分化度に影響する  
 鹿児島大学整形外科  
 ○篠原直弘、今村勝行、松山金寛、横内雅博、小宮節郎  
 医療関節材料開発講座  
 前田真吾、石堂康弘
10. 第73回日本癌学会【神奈川県横浜市】9月25日～27日、2014年(がん研究会 がん研究所)  
 An imprinting gene, paternally expressed gene 10, is overexpressed in chondrosarcoma cells to regulate TGF-β

family signaling and status of the chondrogenic differentiation  
Department of Orthopaedic Surgery,  
Kagoshima University

○Naohiro Shinohara, Masahiro Yokouchi,  
Takao Setoguchi, Satoshi Nagano, Seturo Komiya

Department of Medical Joint Materials

Shingo Maeda

11. 第32回日本骨代謝学会,【大阪府大阪市】,7月24日~26日、2014年(島根大学医学部内科学第一)

父性インプリンティング遺伝子PEG10のTGF-βファミリー・シグナル調節と軟骨細胞・軟骨肉腫細胞の分化度に対する役割

鹿児島大学整形外科

○篠原直弘, 今村勝行, 松山金寛, 横内雅博, 小宮節郎

医療関節材料開発講座

前田真吾, 石堂康弘

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.orthop-kagoshima-u.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

横内 雅博

(Yokouchi Masahiro)

鹿児島大学・医歯学域医学系・講師

研究者番号：80359976

(2)研究分担者

前田 真吾

(Maeda Shingo)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・特任准教授

研究者番号：60353463

小宮 節郎

(Komiya Setsuro)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：30178371

石堂 康弘

(Ishidou Yasuhiro)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・特任准教授

研究者番号：10300740

(3)連携研究者

なし