

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591725  
 研究課題名（和文） 骨軟部腫瘍における Notch シグナルと相互作用する異常機構の研究

研究課題名（英文） Inhibition of Notch pathway prevents osteosarcoma growth by cell cycle regulation

研究代表者

瀬戸口 啓夫（SETOGUCHI TAKAO）

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：40423727

研究成果の概要：

骨肉腫患者より採取した腫瘍組織を用いて検討したところ骨肉腫腫瘍組織では 10 例中 10 例で Notch2, JAG1 が発現上昇していた。ターゲット遺伝子である HEY1 は 10 例中 8 例で発現上昇していた。HEY2 も 10 例中 9 例で上昇していた。次に Notch シグナルを抑制すると骨肉腫細胞株の増殖が in vitro, in vivo において抑制されることが確認された。さらに細胞周期を正に制御するサイクリン D, E, c-Myc, SKP2 の発現が抑制され、逆に細胞周期を負に制御する p21<sup>Cip1</sup> の発現が増大していることを見出した。本研究は、Notch シグナルが骨肉腫の新たな治療的ターゲットとなりうることを示唆している。

交付額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2004年度 |           |           |           |
| 2005年度 |           |           |           |
| 2006年度 |           |           |           |
| 2007年度 | 2,700,000 | 810,000   | 3,510,000 |
| 2008年度 | 900,000   | 270,000   | 1,170,000 |
| 総計     | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：整形外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨肉腫、Notch、細胞周期

### 1. 研究開始当初の背景

Notch シグナル経路は発生段階において様々な機能を有していることが知られている。最近、ヒトの一部の悪性腫瘍において Notch pathway が活性化し、腫瘍発生・増殖に関与していることが報告されているが、ヒトの骨軟部悪性腫瘍における Notch の機能は不明である。

### 2. 研究の目的

今回我々は悪性骨軟部腫瘍における Notch pathway の分子の発現および活性化を検討

した。さらにその機能について検討し、骨肉腫の病態・新規治療法の開発のための研究を行った。

### 3. 研究の方法

定量的 RT-PCR 法により骨肉腫臨床検体・骨肉腫細胞株を用いて Notch シグナル関連遺伝子の発現について検討した。また免疫染色を行い、Notch 関連遺伝子の発現を蛋白質レベルでも検討した。Notch シグナルの特異的阻害剤である  $\gamma$ -secretase inhibitor や Notch シグナルにより活性化する転写因子である

CBF1 siRNA をもちいて骨肉腫の増殖を *in vitro* で検討した。さらにヌードマウスに骨肉腫細胞を移植した後に  $\gamma$ -secretase inhibitor を投与して *in vivo* における腫瘍形成抑制効果を検討した。またフローサイトメトリーを用いて  $\gamma$ -secretase inhibitor 投与後の細胞周期を検討した。細胞周期関連遺伝子の発現を検討した。

#### 4. 研究成果

定量的 RT-PCR 法で骨肉腫患者腫瘍組織では 10 例中 10 例で Notch2 の発現上昇を認めた (1.3-57 倍)。Notch のリガンドである JAG1 は 10 例中 10 例で発現上昇していた (3.6-309 倍)。ターゲット遺伝子である HEY1 は 10 例中 8 例で発現上昇していた (1.6-12 倍)。HEY2 も 10 例中 9 例で発現上昇していた (2.9-106 倍)。免疫染色にて Notch のリガンドやターゲット遺伝子である HES1 の発現が骨肉腫で亢進していた。次に  $\gamma$ -secretase inhibitor や CBF1 の siRNA を用いて Notch シグナルを抑制すると骨肉腫細胞株の増殖が *in vitro* において抑制されることが確認された。骨肉腫細胞 Xenograft model において  $\gamma$ -secretase inhibitor 投与により *in vivo* においても腫瘍の増殖抑制と生存期間の延長を認めた。骨肉腫細胞を  $\gamma$ -secretase inhibitor で処理すると細胞は G1 arrest していた。さらに細胞周期を正に制御するサイクリン D, E, c-Myc, SKP2 の発現が抑制され、逆に細胞周期を負に制御する p21<sup>Cip1</sup> の発現が増大していることを見出した。現在骨肉腫の増殖・転移に関与している Notch のターゲット遺伝子の詳細な検討を行っている。

#### 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 11 件)

① Inhibition of Notch pathway prevents osteosarcoma growth by cell cycle regulation

Motoyuki Tanaka<sup>1</sup>, Takao Setoguchi<sup>1</sup>, Masataka Hirotsu, Hui Gao, Hiromi Sasaki, Yukihiro Matsunoshita, Setsuro Komiya.

<sup>1</sup> These two authors contributed equally.

British Journal of Cancer 2009; 100:1957-65.  
査読あり

② Stem cell factor prevents neuronal cell apoptosis after acute spinal cord injury. Yamasaki K, Setoguchi T, Takenouchi T, Yone K, Komiya S. Spine. 2009 Feb 15;34(4):323-7. 査読あり

③ Aging-related loss of the chromatin protein HMGB2 in articular cartilage is linked to reduced cellularity and osteoarthritis. Taniguchi N, Caramés B, Ronfani L, Ulmer U, Komiya S, Bianchi ME, Lotz M. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Jan 27;106(4):1181-6. 査読あり

④ Activation of synoviolin promoter in rheumatoid synovial cells by a novel transcription complex of interleukin enhancer binding factor 3 and GA binding protein alpha. Izumi T, Fujii R, Izumi T, Nakazawa M, Yagishita N, Tsuchimochi K, Yamano Y, Sato T, Fujita H, Aratani S, Araya N, Azakami K, Hasegawa D, Kasaoka S, Tsuruta R, Yokouti M, Ijiri K, Beppu M, Maruyama I, Nishioka K, Maekawa T, Komiya S, Nakajima T. Arthritis Rheum. 2009;60(1):63-72. 査読あり

⑤ Expression of osterix inhibits bone morphogenetic protein-induced chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. Tominaga H, Maeda S, Miyoshi H, Miyazono K, Komiya S, Imamura T. J Bone Miner Metab. 2009;27(1):36-45. Epub 2008 Nov 19. 査読あり

⑥ Smurf2 induces ubiquitin-dependent degradation of Smurf1 to prevent migration of breast cancer cells. Fukunaga E, Inoue Y, Komiya S, Horiguchi K, Goto K, Saitoh M, Miyazawa K, Koinuma D, Hanyu A, Imamura T. J Biol Chem. 2008 Dec 19;283(51):35660-7 査読あり

⑦ CCAAT/enhancer-binding protein beta promotes osteoblast differentiation by enhancing Runx2 activity with ATF4. Tominaga H, Maeda S, Hayashi M, Takeda S, Akira S, Komiya S, Nakamura T, Akiyama H, Imamura T. Mol Biol Cell. 2008 ;19(12):5373-86 査読あり

⑧ Extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 is a coupling factor for hypoxia and inflammation in arthritis. Hamada T, Torikai M, Kuwazuru A, Tanaka M, Horai N, Fukuda T, Yamada S, Nagayama S, Hashiguchi K, Sunahara N, Fukuzaki K, Nagata R, Komiya S, Maruyama I, Fukuda T, Abeyama K. Arthritis Rheum. 2008;58(9):2675-85 査読あり

⑨ Differential expression of GADD45beta in normal and osteoarthritic cartilage: potential role in homeostasis of articular chondrocytes.

Ijiri K, Zerbini LF, Peng H, Otu HH, Tsuchimochi K, Otero M, Dragomir C, Walsh N, Bierbaum BE, Mattingly D, van Flandern G, Komiya S, Aigner T, Libermann TA, Goldring MB.

Arthritis Rheum. 2008;58(7):2075-87 査読あり

⑩ Expression of apoptosis signal-regulating kinase 1 in mouse spinal cord under chronic mechanical compression: possible involvement of the stress-activated mitogen-activated protein kinase pathways in spinal cord cell apoptosis.

Takenouchi T, Setoguchi T, Yone K, Komiya S.

Spine. 2008 Aug 15;33(18):1943-50. 査読あり

⑪ Stage-specific secretion of HMGB1 in cartilage regulates endochondral ossification.

Taniguchi N, Yoshida K, Ito T, Tsuda M, Mishima Y, Furumatsu T, Ronfani L, Abeyama K, Kawahara K, Komiya S, Maruyama I, Lotz M, Bianchi ME, Asahara H.

Mol Cell Biol. 2007 Aug;27(16):5650-63. 査読あり

[学会発表] (計 9 件)

① 第 41 回日本整形外科骨・軟部腫瘍学術集会 平成 20 年 10 月 23 日 (木)・24 日 (金) 京都交際会館

(シンポジウム)

Notch シグナルを標的とした骨肉腫に対する治療

瀬戸口啓夫、田中源幸、廣津匡隆、佐々木裕美、小宮節郎

② The 30st Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research

2008 年 9 月 12-16 日 モントリオール カナダ

Notch pathway is activated in osteosarcoma and inhibition of  $\gamma$ -secretase inhibit osteosarcoma growth by cell cycle regulation

Tanaka M, Setoguchi T, Hirotsu M, Sasaki H, Komiya S.

③ Annual meeting of Orthopaedic research Society 2008 年 3 月 2 日-5 日 サンフランシスコ

New investigator recognition award 受賞

Notch pathway is activated in osteosarcoma and inhibitors of  $\gamma$ -secretase prevents osteosarcoma growth by cell cycle regulation

Takao Setoguchi, Motoyuki Tanaka, Masataka Hirotsu, Hiromi Sasaki, Seturo Komiya.

④ 第 30 回日本分子生物学会年会 平成 19 年 12 月 11 日-15 日 横浜市

骨肉種における Notch の発現と機能

瀬戸口啓夫、田中源幸、廣津匡隆、佐々木裕美、小宮節郎

⑤ 第 112 回西日本整形・災害外科学会

2007 年 11 月 18 日-19 日 米子

整形外科悪性腫瘍における Notch の発現とその意義

田中源幸、瀬戸口啓夫、小宮節郎

⑥ 第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会

浜松市 平成 19 年 10 月 25 日-26 日

骨肉腫における Notch の発現とその機能

田中源幸、瀬戸口啓夫、小宮節郎

⑦ 6<sup>th</sup> Combined Meeting of the Orthopaedic Research Society ホノルル ハワイ

2007 年 10 月 20-24 日

In vivo inhibition of osteosarcoma growth by Notch pathway inhibition

Setoguchi T, Tanaka M, Hirotsu M, Sasaki H, Komiya S.

⑧ 第 66 回日本癌学会学術総会 平成 19 年 10 月 3 日-5 日 横浜市

In vivo inhibition of osteosarcoma growth by Notch pathway inhibition

Setoguchi T, Tanaka M., Komiya S.

⑨ 第 40 回日本整形外科骨・軟部腫瘍学術集会 平成 19 年 7 月 12 日 (木)・13 日 (金)

甲府市

悪性骨・軟部腫瘍における Notch の発現とそ

の意義

田中源幸、瀬戸口啓夫、小宮節郎

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

瀬戸口 啓夫 (SETOGUCHI TAKAO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：40423727

### (2) 研究分担者

有島 善也 (ARISHIMA YOSHIYA)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：90336339

小宮 節郎 (KOMIYA SETSURO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30178371

### (3) 連携研究者

なし