

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462307

研究課題名(和文) TGF- β と c-Myc の接点 Myct1 ～ その軟骨細胞分化・成熟における役割～

研究課題名(英文) Myct1 as a contact point of TGF-beta and c-Myc; analysis of the function

研究代表者

石堂 康弘 (Ishidou, Yasuhiro)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任准教授

研究者番号：10300740

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)：TGF- β シグナルは軟骨細胞分化を制御するが、その標的遺伝子はよくわかっていない。我々はTGF- β 1がヒト軟骨細胞株においてc-Myc依存的にMyct1を強く誘導する事を見出した。しかしMyct1のノックダウンでは軟骨細胞分化に変化が起きなかった。そこでTGF- β 1により発現が低下するPEG10について解析したところ、PEG10はTGF- β 1により発現が下がる一方で、強制発現するとTGF- β シグナルを抑制する事がわかり、新たなTGF- β シグナル阻害因子として考えられた。実際、PEG10ノックダウンは軟骨細胞分化を促進し、そのnegative feedback機構が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：During endochondral ossification process, TGF- β signaling promotes chondrocyte differentiation while inhibits hypertrophic chondrocyte maturation, which underlying mechanisms are not clear. We found that TGF- β 1 strongly induced expression of Myct1 gene in human chondrocyte cell line. siRNA-mediated knockdown of c-Myc diminished TGF- β 1-induced Myct1 expression, suggesting that c-Myc is indispensable for the expression. However, silencing of Myct1 did not affect TGF- β 1-mediated chondrocyte differentiation. Then, we next focused on PEG10 gene which was suppressed by TGF- β 1. Induction of PEG10 inhibited TGF- β signaling, suggesting PEG10 to be a novel inhibitory factor for TGF- β pathway.

研究分野：股関節外科

キーワード：TGF- β 軟骨細胞分化 Myct1

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は transforming growth factor- β (TGF- β)ファミリー・シグナルの軟骨細胞の分化・成熟における機能を研究してきた。内軟骨性骨化過程において、TGF- β シグナルの分化前半と後半の相反する役割のうち、後半の軟骨細胞肥大・成熟過程において、TGF- β シグナルが TGF- β /BMP ファミリーの共通抑制因子である SnoN を誘導し、肥大軟骨細胞分化を negative feedback 的に抑制する事を示し (*J Biol Chem*, 2012: 基盤研究 C (一般), H23~H25, 課題番号 23592221)、さらに BMP シグナルが Runx2 依存的に誘導する Smpd3 が、セラミド・シグナルを介してやはり軟骨細胞分化成熟を抑制する事を明らかにしている (*J Biol Chem*, 2004: 基盤研究 C (一般), H25~H27, 課題番号 25462376)。しかし、いずれの分子も役割は限定的であり、他にも TGF- β 誘導性の軟骨細胞分化調節因子(機構)が存在するはずである。その観点から我々はヒト正常軟骨細胞株 C28/I2 を TGF- β 1 で刺激し、4 8 時間後の分化進行期に誘導される遺伝子をマイクロアレイ解析で検索し、最も誘導倍率が高い(12.5 倍)遺伝子として Myc target 1 (gene symbol: Myct1)を同定した。

(2) Myct1 は c-Myc の直接標的遺伝子として誘導され、アポトーシス、トランスフォーメーション、細胞増殖、分化等の c-Myc の様々な作用をカバーする事が分かっていた(Yin X *et al.*, *J Biol Chem*, 2002; Rogulski KR *et al.*, *PNAS*, 2005)。しかし c-Myc 以外の誘導経路は、我々が同定した TGF- β による誘導も含めて、全く不明であった。c-Myc を *in vivo* で軟骨に過剰発現すると、軟骨細胞成熟を抑制するが、肢芽特異的に c-Myc をノックアウト(KO)したマウス胎仔の骨もやはり肥大軟骨細胞分化が遅延するので、c-Myc の軟骨細胞分化・成熟における役割は controversial であった。c-Myc は一方で、iPS 細胞誘導に必要なリプログラミング因子の一つであり、Klf4 と Sox9 と組み合わせれば線維芽細胞から直接軟骨細胞を誘導出来る(induced chondrogenic cells [iChon]; Outani H, *et al.*, *PLoS One*, 2013)。c-Myc の軟骨細胞分化やリプログラミングにおける働きの中で、その下流責任遺伝子として Myct1 が存在・機能するかは不明であった。

2. 研究の目的

(1) 軟骨細胞において Myct1 が TGF- β によって誘導される経路、すなわち Smad 直接標的なのか、c-Myc 等の *de novo* protein を介するのかを明らかにする。

(2) 軟骨細胞分化・成熟における役割を c-Myc と比較しながら検討する。

(3) Myct1 のリプログラミング機能の有無を

検証し、軟骨細胞における存在意義に光を当てる。

3. 研究の方法

(1) 軟骨細胞株(C28/I2, ATDC5)、軟骨肉腫細胞株(SW1353, Hs 819.T)において、TGF- β 1 刺激で Myct1 遺伝子の発現上昇を、mRNA、蛋白レベルで、それぞれ定量的 RT-PCR 法(RT-qPCR)、ウエスタン・プロット法を用いて検討した。

(2) c-Myc の siRNA によるノックダウン実験による Myct1 の発現変化を、RT-qPCR とウエスタン・プロットで確認した。

(3) Myct1 の siRNA によるノックダウン実験により、軟骨細胞分化への影響を、軟骨細胞分化マーカーの RT-qPCR、及びアルシアン・ブルー染色で確認した。

(4) Myct1 の軟骨細胞分化への直接影響が薄いという実験結果を得た為、やはり TGF- β 1 シグナルと c-Myc の両者の制御、ただし発現抑制を受ける PEG10 を先行マイクロアレイ結果から抽出し、その軟骨細胞分化系における発現解析を行った。

(5) TGF- β ファミリーの一つで、同様に軟骨細胞分化に重要な機能を有する bone morphogenetic protein (BMP)シグナルによる PEG10 の発現制御を、RT-qPCR とウエスタン・プロットで確認した。

(6) PEG10 の TGF- β シグナルと BMP シグナルの古典的 Smad 経路への feedback 機能の可能性について、それぞれのシグナル・レポーター・ルシフェラーゼ・アッセイ系を用いて検討した。

(7) PEG10 の siRNA によるノックダウン実験による軟骨細胞分化への影響を、軟骨細胞分化マーカーの RT-qPCR、及びアルシアン・ブルー染色で確認した。

4. 研究成果

(1) 軟骨細胞株、軟骨肉腫細胞株において、TGF- β 1(1ng/ml)刺激で Myct1 遺伝子の発現は、mRNA と蛋白の両レベルで明らかに増強した。

(2) c-Myc の siRNA 導入により、Myct1 の発現は、確かに減少し、Myct1 遺伝子は軟骨細胞系において、TGF- β と c-Myc の両者共にその発現誘導に重要であることが分かった。

(3) しかし Myct1 の siRNA 導入によるノックダウンでは、十分にノックダウンされているにも関わらず、軟骨細胞分化への影響が、全く確認されなかった。この事は、Myct1 が分化そのものではなく、別の細胞表現型、例えば cell growth や運動能に効いている可能性も考えられたが、少なくとも、軟骨細胞分化と共に発現は増えるので、分化マーカーとしての意義はあると考えられた。しかし本研究はあくまで分化に主目的を置いているので、別の TGF- β 1 シグナルと c-Myc の標的遺伝子の存在の可能性を探る事とした。

(4) TGF- β シグナルと c-Myc の両者による発

現制御を受ける可能性のある遺伝子を、先行マイクロアレイ結果から検索したところ、paternally expressed gene 10 (PEG10)を TGF- β 1 刺激で発現下がる遺伝子として同定出来たが、この PEG10 は、c-Myc の標的遺伝子として示唆されている事が分かった(Li CM, *et al*, *Cancer Res*, 66, 665-672, 2006)。

(5) ただし、PEG10 の発現制御に関して TGF- β シグナルと c-Myc は逆方向に働くので、TGF- β シグナル・ファミリーの一つで、同様に軟骨細胞分化に重要な機能を有する bone morphogenetic protein (BMP)シグナルによる PEG10 の発現制御を検討してみたところ、面白いことに BMP-2 や BMP-6 添加は、PEG10 発現を著明に促進した。すなわち BMP シグナルと c-Myc による共通の標的遺伝子と考えられた。

(6) PEG10 の機能として、TGF- β ファミリーのレセプターに結合しうる事、その時シグナルを抑制しうる事が報告されていたので、TGF- β シグナルと BMP シグナルの古典的 Smad 経路への feedback 機能の可能性について、それぞれのシグナル・レポーター・ルシフェラーゼ・アッセイ系を用いて検討した。その結果、PEG10 発現ベクターは TGF- β と BMP シグナルの両者を抑制し、逆に PEG10 の siRNA ノックダウンはそれぞれの Smad の活性(リン酸化)を増強させた。すなわち、PEG10 による TGF- β ファミリー・シグナルへの negative feedback 機構の存在が明らかとなった。

(7) PEG10 の siRNA 導入により、軟骨細胞分化は軽度促進した。したがって、PEG10 は少なくとも軟骨細胞分化を促進する TGF- β ファミリー・シグナルによる発現制御を受け一方で、feedback としてシグナルを抑制し、軟骨細胞分化を負に制御する事が示唆された。

以上の結果を踏まえて、現在論文投稿中である。

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 5 件)

(1) Inhibition of casein kinase 2 prevents growth of human osteosarcoma. Takahashi K, Setoguchi T, Tsuru A, Saitoh Y, Nagano S, Ishidou Y, Maeda S, Furukawa T, Komiya S. *Oncol Rep*. 2017 Feb;37(2):1141-1147. doi: 10.3892/or.2016.5310. 査読 有

(2) Combination of Hedgehog inhibitors and standard anticancer agents synergistically prevent osteosarcoma growth. Saitoh Y, Setoguchi T, Nagata M, Tsuru A, Nakamura S, Nagano S, Ishidou Y, Nagao-Kitamoto H, Yokouchi M, Maeda S, Tanimoto A, Furukawa T, Komiya S.

Int J Oncol. 2016 Jan;48(1):235-42. doi: 10.3892/ijo.2015.3236. 査読 有

(3) Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1 promotes osteosarcoma metastasis via matrix metalloproteinase 9 expression. Tsuru A, Setoguchi T, Matsunoshita Y, Nagao-Kitamoto H, Nagano S, Yokouchi M, Maeda S, Ishidou Y, Yamamoto T, Komiya S. *Br J Cancer*. 2015 Mar 31;112(7):1232-40. doi: 10.1038/bjc.2015.84. 査読 有

(4) Ribosomal protein S3 regulates GLI2-mediated osteosarcoma invasion. Nagao-Kitamoto H, Setoguchi T, Kitamoto S, Nakamura S, Tsuru A, Nagata M, Nagano S, Ishidou Y, Yokouchi M, Kitajima S, Yoshioka T, Maeda S, Yonezawa S, Komiya S. *Cancer Lett*. 2015 Jan 28;356(2 Pt B):855-61. doi: 10.1016/j.canlet.2014.10.042. 査読 有

(5) GLI2 is a novel therapeutic target for metastasis of osteosarcoma. Nagao-Kitamoto H, Nagata M, Nagano S, Kitamoto S, Ishidou Y, Yamamoto T, Nakamura S, Tsuru A, Abematsu M, Fujimoto Y, Yokouchi M, Kitajima S, Yoshioka T, Maeda S, Yonezawa S, Komiya S, Setoguchi T. *Int J Cancer*. 2015 Mar 15;136(6):1276-84. doi: 10.1002/ijc.29107. 査読 有

〔学会発表〕(計 16 件)

(1) 第 132 回西日本整形・災害外科学会学術集会

【かごしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市)】2016 年 11 月 19 日～20 日
軟骨肉腫において PEG10 は TGF と BMP シグナルにより発現制御され腫瘍進展に影響する
篠原直弘 前田真吾 松山金寛 八尋雄平
今村勝行 河村一郎 永野聡 瀬戸口啓夫
石堂康弘 小宮節郎
鹿児島大学 医歯学総合研究科 医療関節材料開発講座, 整形外科, 近未来運動器医療創生学講座

(2) 第 75 回日本癌学会

【パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)】2016 年 10 月 6 日～8 日

TGF- β signaling and PEG10 exhibit mutually opposite expression pattern and roles in cell invasion of chondrosarcoma
Naohiro Shinohara^{1,2}, Shingo Maeda¹, Satoshi Nagano², Takao Setoguchi², Yasuhiro Ishidou¹, Seturo Komiya^{1,2}

¹Department of medical joint materials, Kagoshima university, Japan

²Department of orthopaedic surgery, Kagoshima university, Japan

(3) 第 34 回日本骨代謝学会

【大阪国際会議場(大阪府大阪市)】2016 年

7月20日～23日

TGF- β シグナルと PEG10 の内軟骨腫と軟骨肉腫の診断鑑別マーカーとしての可能性と機能解析

篠原直弘^{1,2}, 前田真吾¹, 松山金寛^{1,2}, 八尋雄平^{1,2}, 今村勝之², 河村一郎², 瀬戸口啓夫², 永野聡², 横内雅博², 石堂康弘¹, 小宮節郎^{1,2}

¹ 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,

² 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学

(4) Orthopaedic Research Society: Annual Meeting 2016【Orlando, U.S.A.】March 5-8, 2016
Expression of Paternally Expressed Gene 10 (PEG10) is Negatively Associated with Malignancy Grading of Human Chondrosarcoma; the Role of PEG10 to Prevent Bone Morphogenetic Protein (BMP)-p38 MAPK Signaling-mediated Induction of Matrix Metalloproteinase (MMP)-1 to Suppress the Invasive Activity

^{1,2} Naohiro Shinohara, ¹ Shingo Maeda, ^{1,2} Kanehiro Matsuyama, ^{1,2} Yuhei Yahiro, ² Katsuyuki Imamura, ^{1,2} Ichiro Kawamura, ² Takao Setoguchi, ^{1,2} Satoshi Nagano, ¹ Yasuhiro Ishidou, ^{1,2} Seturo Komiya

¹ Department of Medical Joint Materials, Kagoshima University, Kagoshima, JAPAN

² Department of Orthopaedic Surgery, Kagoshima University, Kagoshima, JAPAN.

(5) 第29回日本軟骨代謝学会

【広仁会館(広島県広島市)】2016年2月19日～20日

PEG10はBMP-p38 MAPK経路を介する軟骨肉腫細胞の浸潤を制御する

篠原直弘^{1,2}, 前田真吾¹, 松山金寛^{1,2}, 八尋雄平^{1,2}, 今村勝行^{1,2}, 横内雅博², 永野聡², 石堂康弘¹, 小宮節郎^{1,2}

¹ 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

² 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科整形外科学

(6) 第38回日本分子生物学会年会

【神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)】

2015年12月1日～4日

BMPシグナル標的遺伝子Atoh8による骨芽細胞分化抑制

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^{1,2}, 前田真吾¹, 松山金寛^{1,2}, 八尋雄平^{1,2}, 今村勝行^{1,2}, 横内雅博², 永野聡², 石堂康弘¹, 小宮節郎^{1,2}

¹ 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

² 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学

能修復学講座 整形外科学

(7) 第30回日本整形外科学会基礎学術集会
【富山国際会議場(富山県富山市)】2015年10月22日～23日

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^{1,2}, 前田真吾¹, 松山金寛^{1,2}, 八尋雄平^{1,2}, 横内雅博², 石堂康弘¹, 小宮節郎^{1,2}

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

¹ 医療関節材料開発講座

² 運動機能修復学講座 整形外科学

(8) 第33回日本骨代謝学会学術総会

【京王プラザホテル(東京都新宿区)】2015年7月23日～25日

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^{1,2}, 前田真吾¹, 八尋雄平^{1,2}, 今村勝行², 横内雅博², 河村一郎^{1,2}, 石堂康弘¹, 小宮節郎^{1,2}

¹ 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,

² 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 整形外科学

(9) 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

^{1,2}Shinohara, N; ¹Maeda, S; ^{1,2}Matsuyama, K; ^{1,2}Yahiro, Y; ²Imamura, K; ²Kawamura, I; ²Setoguchi, T; ^{1,2}Nagano, S; ²Yokouchi, M; ¹Ishidou, Y; ^{1,2}Komiya, S

¹ Department of Medical Joint Materials, Kagoshima University, Kagoshima, JAPAN

² Department of Orthopaedic Surgery, Kagoshima University, Kagoshima, JAPAN

(10) 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, Seturo Komiya

(11) 第37回日本分子生物学会年会

【パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)】2014年11月25日～27日

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

(12)第29回日本整形外科学会基礎学術集会
【城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)】2014
年10月9日~10日
軟骨細胞の分化成熟を制御する分子機構の
同定と解析
医療関節材料開発講座
前田真吾, 石堂康弘
鹿児島大学整形外科
河村一郎, 今村勝行, 梶博則, 松山金寛, 篠
原直弘, 横内雅博, 小宮節郎

(13)第29回日本整形外科学会基礎学術集会
【城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)】2014
年10月9日~10日
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

(14) 第73回日本癌学会
【パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)】2014
年9月25日~27日
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, Setsuro Komiya
Department of Medical Joint Materials
Shingo Maeda

(15) 第32回日本骨代謝学会,
【大阪国際会議場(大阪府大阪市)】2014年
7月24日~26日
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

(16) TGF-β Meeting 2014: 'TGF-β signal
transduction in human disease', 【Leiden,
Netherlands】, May 8-10, 2014
TGF-β Family Signaling Regulates Expression of
Paternally Expressed 10 in Chondrogenesis

Department of Medical Joint Materials,
Kagoshima University
Shingo Maeda

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
[http://www2.kufm.kagoshima-u.ac.jp/fiel
d/endowed-courses-and-center/e001.html](http://www2.kufm.kagoshima-u.ac.jp/fiel
d/endowed-courses-and-center/e001.html)
<http://www.orthop-kagoshima-u.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石堂 康弘 (ISHIDOU, Yasuhiro)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任准教
授
研究者番号: 10300740

(2) 研究分担者

前田 真吾 (MAEDA, Shingo)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任准教
授
研究者番号: 60353463

(3) 研究分担者

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