

論 文 要 旨

TGF- β signalling and PEG10 are mutually exclusive and inhibitory in chondrosarcoma cells

軟骨肉腫細胞において TGF- β シグナルと PEG10 は
互いに排他的で抑制的である

篠原 直弘

【序論及び目的】

軟骨肉腫とその良性カウンターパートの内軟骨腫は、組織学的所見はしばしば酷似するため鑑別が困難で、鑑別分子マーカーの同定が期待される。一方で TGF- β は、がん化初期ではがん細胞の増殖を抑制し、がん化後期過程では転移・浸潤能を亢進することがよく知られている。しかし、TGF- β ファミリー系が、骨または軟骨肉腫のような間葉起源の腫瘍においてそのような二重の役割を果たすかどうかは不明である。本研究の目的は、軟骨肉腫における TGF- β ファミリー・シグナル構成分子の発現や役割、ならびに各種のがん細胞において発現が報告され、TGF- β を阻害すると報告される PEG10 の軟骨肉腫における PEG10 の発現・機能解析を行い、軟骨肉腫におけるバイオマーカーや治療標的を同定することにある。

【材料及び方法】

- ① Enchondroma/chondrosarcoma tissue cohort : 鹿児島大学で 2006~2015 年に切除あるいは生検術を行った化学療法/放射線療法行われていない内軟骨腫 7 例 (男性 3 例、女性 4 例)、Grade1 軟骨肉腫 11 例 (男性 3 例、女性 8 例)、Grade2 軟骨肉腫 7 例 (男性 3 人、女性 4 人) を対象とした
- ② RT-qPCR : 軟骨肉腫と内軟骨腫の臨床組織サンプル、ヒト軟骨肉腫細胞株 SW1353・Hs 819.T、ヒト正常軟骨細胞株 C28/I2 において遺伝子発現を検索した。
- ③ Microarray analysis. : ヒト軟骨肉腫細胞株 SW1353 と Hs 819.T を内軟骨腫または low grade 軟骨肉腫の近似モデルとし、ヒト正常軟骨細胞株 C28/I2 と比較してマイクロアレイ解析を行った。
- ④ siRNA-mediated knockdown : knockdown には siRNA を使用した
- ⑤ Immunoblotting. : 各種細胞株より M-PER lysis buffer にて蛋白抽出、発現をウエスタン・ブロットで確認した
- ⑥ Luciferase assay : 9xCAGA、BRE luciferase reporter plasmid を使用した。

【結 果】

一般に腫瘍細胞の悪性度と分化度は反比例するので、軟骨肉腫と内軟骨腫の臨床組織サンプルを用いて軟骨細胞分化マーカーの発現を定量的 RT-PCR(RT-qPCR)で検討したところ *SOX9* は grade I 軟骨肉腫において内軟骨腫より有意に発現低下しており、*COL2A1* は grade I より grade II 軟骨肉腫で減少していた。そこで、軟骨細胞分化マーカーの発現誘導シグナル関連分子が鑑別因子となり得ないか検討した。骨形成タンパク (BMP) を含む transforming growth factor (TGF)- β ファミリー・シグナルは軟骨細胞分化に密接に関わっているので、それぞれのシグナル下流メディエーターである SMAD1/5 と SMAD3 のリン酸化(活性化)レベルを免疫組織化学染色(IHC)で調べた。リン酸化(p)SMAD3 は内軟骨腫より grade I、さらに grade I より grade II の軟骨肉腫で発現が増強し、pSMAD1/5 も grade I より grade II で増えており、*SOX9*/*COL2A1* 発現量と逆相関を呈した。そこで TGF- β /BMP シグナルのリガンド、受容体、そして SMADs 自体の発現を RT-qPCR で調べたが、これらが内軟骨腫サンプルで少なくとも発現減少している訳ではなかった。そこで内軟骨腫においては TGF- β /BMP-SMADs 経路を抑制する何らかの分子が増えていると予想した。内軟骨腫の細胞株は存在しないので、無刺激状態のヒト軟骨肉腫細胞株 SW1353 と Hs 819.T を内軟骨腫または low grade 軟骨肉腫の近似モデルとし、軟骨肉腫で pSMAD3 が増えていたのでこれに TGF- β 1 刺激した状態を high grade 軟骨肉腫モデルとして、ヒト正常軟骨細胞株 C28/I2 と比較してマイクロアレイ解析を行った。SW1353/Hs 819.T で発現が高く TGF- β 1 刺激で減少する遺伝子を検索したところ、paternally expressed gene 10 (*PEG10*) が同定された。PEG10 蛋白の発現を IHC で観ると、内軟骨腫サンプルで強く、grade I 軟骨肉腫で有意に減少し、grade II でさらに減弱し、すなわち SMADs 活性と PEG10 発現は逆相関した。細胞株において、TGF- β 1 は *in vitro* で PEG10 発現を抑制した。逆に、TGF- β および BMP シグナルのルシフェラーゼ・レポーター・アッセイでは、PEG10 は両者を抑制し、PEG10 ノックダウンは内因性の pSMAD3 および pSMAD1/5 のレベルを増加させる事がウェスタン・ブロットで確認できた。以上の結果から、PEG10 と pSMADs の逆相関の組み合わせは、内軟骨腫と軟骨肉腫の鑑別因子となる可能性が示唆された。

【結論及び考察】

以上の結果から、PEG10 と pSMADs の逆相関の組み合わせは、内軟骨腫と軟骨肉腫の鑑別因子となる可能性が示唆された。

本研究では PEG10 および p-SMAD の発現が、内軟骨腫および軟骨肉腫の間で相互に排他的であることを示唆した PEG10 は TGF- β シグナル伝達によってダウンレギュレーションされ、PEG10 は TGF- β / BMP-SMAD 経路に影響することが確認された。 p-SMAD3 (または p-SMAD2) /と PEG10 の比率は、軟骨腫瘍の悪性化の決定因子であることが示唆された。 また *SOX9* も、内軟骨腫と比較して、グレード 1 の軟骨肉腫において顕著に減弱していた。以上の結果から、PEG10 と pSMADs の逆相関の組み合わせと *SOX9* 発現確認は、軟骨肉腫と軟骨腫の二次診断に有用である可能性が示唆された。