

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591786

研究課題名(和文) ポリコーム蛋白の機能とターゲット遺伝子解明による関節リウマチ分子標的治療法開発

研究課題名(英文)

Functional analysis of polycomb proteins and target molecules in rheumatoid arthritis pathogenesis

研究代表者

小宮 節郎 (KOMIYA SETSURO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30178371

研究成果の概要(和文)：

関節リウマチ滑膜細胞、骨肉腫細胞株・骨肉腫患者生検組織で *EZH2*、*BMI-1* の発現上昇を認めた。また Histone H3 trimethyl 化の上昇を認めた。予想に反して *BMI-1* と *EZH2* をノックダウンしても *in vitro*, *in vivo* において骨肉腫の増大に変化は認められなかったが、*EZH2*、*BMI-1* などのポリコーム蛋白質は関節リウマチや骨肉腫の鑑別、腫瘍マーカーとして有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Expression of *EZH2* in synovial cells of rheumatoid arthritis and osteosarcoma cells was increased. *BMI-1* was also up-regulated in synovial cells of rheumatoid arthritis and osteosarcoma cells. Expression of *EZH2* and *BMI-1* was up-regulated in osteosarcoma patient's biopsy specimens. Immunohistochemical examinations showed that *EZH2* and *BMI-1* were up-regulated in osteosarcoma cells and that trimethylation of histone H3K27 was increased. Unexpectedly, knock down of *EZH2* and *BMI-1* prevented osteosarcoma growth neither *in vitro* nor *in vivo*. Our findings suggest that *EZH2* and *BMI-1* may be a antigen of rheumatoid arthritis or osteosarcoma, but are not useful molecular targets of treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度			
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010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、関節リウマチ、骨軟部腫瘍学

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：ポリコーム蛋白、*EZH2*、*BMI-1*、関節リウマチ、骨肉腫

## 1. 研究開始当初の背景

ポリコーム蛋白はエピジェネティックを制御する重要な因子である。エピジェネティック機構の異常は、ゲノム DNA の配列異常を

伴わないで、ヒストンのメチル化、アセチル化などを介した遺伝子発現の異常をもたらす。特にがん関連遺伝子の発現異常を生じてがんの発生・進展に重要な役割を果たしてい

ることが報告されている。ポリコーム蛋白である EZH2 はヒストンメチル化酵素と呼ばれ、Histone H3-K27 のメチル化に関与する。また同じポリコーム蛋白である BMI-1 は INK4/ARF の発現を抑制することで p53 経路、Rb 経路を不活性化し、癌化を促進していることが報告されている。しかしポリコーム遺伝子の発現や機能と関節リウマチや骨軟部腫瘍の病態に着目した研究は未だ行われていない。

## 2. 研究の目的

ヒトの関節リウマチや骨軟部腫瘍におけるポリコーム蛋白質の発現変化と機能について研究を行い、関節リウマチや骨軟部腫瘍の新規診断法の開発や新規治療法開発を目指す。

## 3. 研究の方法

人工膝関節手術施行時に採取したヒト関節リウマチ患者と変形性関節症患者の滑膜組織より RNA を抽出してポリコーム遺伝子の発現を定量的 PCR で比較した。ヒト骨肉腫細胞株、正常骨芽細胞および骨肉腫患者生検組織を用いて定量的 PCR 法、免疫染色法によりポリコーム蛋白の発現と、ヒストンのメチル化について比較検討した。また shRNA, siRNA を用いて BMI-1, EZH2 をノックダウンして骨肉腫細胞の増殖・細胞死への関与を検討した。

## 4. 研究成果

関節リウマチ滑膜組織では変形性関節症の滑膜組織と比較してポリコーム蛋白である BMI-1, EZH2 の発現が上昇していた。さらにヒト骨肉腫培養細胞・骨肉腫患者生検組織ともに正常骨芽細胞・正常骨組織と比較してポリコーム蛋白の発現が上昇していた。特に BMI-1 と EZH2 の発現上昇が定量的 RT-PCR, 免疫染色にて観察された。さらにトリメチル化ヒストンの上昇も免疫染色にて細胞株・患者組織にて観察された。これらの結果より RA 滑膜組織やヒト骨肉腫組織の異常増殖にポリコーム蛋白が関与している可能性が示唆された。予想に反して BMI-1 と EZH2 をノックダウンしても in vitro, in vivo において骨肉腫の増大に変化は認められなかった。

【考察】関節リウマチ患者滑膜細胞、骨肉腫細胞株、臨床検体において EZH2, BMI-1 の発現上昇を認めた。骨肉腫において Histone H3-K27 の trimethyl 化による転写抑制により遺伝子の不活性化が起こっている可能性が示唆された。既に報告されている他の悪性腫瘍とは違い、BMI-1, EZH2 をノックダウンしても腫瘍形成抑制作用は認められなかったが、EZH2, BMI-1 などのポリコーム蛋白質は関節リウマチや骨肉腫の鑑別、腫瘍マーカーとして有用である可能性が示唆された。

## 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 12 件)

1. Suppression of osteosarcoma cell invasion by chemotherapy is mediated by urokinase plasminogen activator activity via up-regulation of EGR1.

Matsunoshita Y, Ijiri K, Ishidou Y, Nagano S, Yamamoto T, Nagao H, Komiya S, Setoguchi T.

PLoS One. 6(1):e16234, 2011 (査読:有)

2. Upregulation of Notch pathway molecules in oral squamous cell carcinoma.

Hijioka H, Setoguchi T, Miyawaki A, Gao H, Ishida T, Komiya S, Nakamura N.

Int J Oncol. 36(4):817-22, 2010 (査読:有)

3. Kawabata H, Setoguchi T, Yone K, Souda M, Yoshida H, Kawahara K, Maruyama I, Komiya S.

High mobility group box 1 is upregulated after spinal cord injury and is associated with neuronal cell apoptosis.

Spine 35(11):1109-15, 2010 (査読:有)

4. Mazabraud's syndrome with solitary myxoma and monostotic fibrous dysplasia.

Arishima Y, Setoguchi T, Abematsu M, Tominaga H, Fukunaga E, Komiya S.

J Orthop Sci. 15(1):144-7, 2010 (査読:有)

5. The knock-down of overexpressed EZH2 and BMI-1 does not prevent osteosarcoma growth.

Sasaki H, Setoguchi T, Matsunoshita Y, Gao H, Hirotsu M, Komiya S.

Oncol Rep. 23(3):677-84, 2010 (査読:有)

6. Smoothed as a new therapeutic target for human osteosarcoma.

Hirotsu M, Setoguchi T, Sasaki H, Matsunoshita Y, Gao H, Nagao H, Kunigou O, Komiya S.

Mol Cancer 9:5, 2010 (査読:有)

7. Tumour formation by single fibroblast growth factor receptor 3-positive rhabdomyosarcoma-initiating cells.

Hirotsu M, Setoguchi T, Matsunoshita Y, Sasaki H, Nagao H, Gao H, Sugimura K, Komiya S.

Br J Cancer 101(12):2030-7, 2009

8. Stress deprivation from the patellar tendon induces apoptosis of fibroblasts in vivo with activation of mitogen-activated protein kinases.

Kawabata H, Katsura T, Kondo E, Kitamura N, Miyatake S, Tanabe Y, Setoguchi T, Komiya S, Yasuda K.

J Biomech. Nov 13;42(15):2611-5, 2009 (査読 : 有)

9. Retinal astrocyte differentiation mediated by leukemia inhibitory factor in cooperation with bone morphogenetic protein 2.

Fukushima M, Setoguchi T, Komiya S, Tanihara H, Taga T.

Int J Dev Neurosci. 27(7):685-90, 2009 (査読 : 有)

10. Inhibition of Notch pathway prevents osteosarcoma growth by cell cycle regulation.

Tanaka M, Setoguchi T, Hirotsu M, Gao H, Sasaki H, Matsunoshita Y, Komiya S.

Br J Cancer 100(12):1957-65, 2009 (査読 : 有)

11. Stem cell factor prevents neuronal cell apoptosis after acute spinal cord injury.

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

Spine 34(4):323-7, 2009 (査読 : 有)

12. 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 33(18):1943-50, 2008 (査読 : 有)

[学会発表] (計 21 件)

1. Role of GLI2 in the growth of human osteosarcoma.

Setoguchi T, Komiya S.

56th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, Long Beach, CA, USA Jan 13, 2011

2. Functional analysis of EGR1 and its

up-regulation using anti-tumour agents. Matsunoshita Y, Setoguchi T, Kunigou O, Hirotsu M, Komiya S.

55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, New Orleans, USA March 6-9, 2010

3. Functional analysis of EGR1 and its up-regulation using anti-tumour agents.

Matsunoshita Y, Setoguchi T, Sasaki H, Kunigou O, Hirotsu H, Nagano S, Komiya S.

The 20th Japanese-Korean Combined Orthopaedic Symposium, Kagoshima, Japan. June 3-4, 2010

4. Knock down of overexpressed smoothed prevent osteosarcoma growth and invasion.

Sasaki H, Setoguchi T, Hirotsu H, Matsunoshita Y, Kunigou O, Komiya S.

The 20th Japanese-Korean Combined Orthopaedic Symposium, Kagoshima, Japan. June 3-4, 2010

5. Functional analysis of over-expressed GOLPH3 in osteosarcoma and rhabdomyosarcoma.

Kunigou O, Setoguchi T, Matsunoshita Y, Sasaki H, Komiya S.

The 20th Japanese-Korean Combined Orthopaedic Symposium, Kagoshima, Japan. June 3-4, 2010

6. 骨肉腫における SMO の機能制御による転移能抑制効果とそのメカニズムの解析

佐々木裕美, 瀬戸口啓夫, 廣津匡隆, 松野下幸弘, 救仁郷修, 永尾宗子, 小宮節郎  
第 43 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会, 東京都. 7 月 15 日~16 日, 2010

7. 骨肉腫における HEY1 発現上昇と HEY1 の機能解析

松野下幸弘, 瀬戸口啓夫, 佐々木裕美, 永尾宗子, 救仁郷修, 小宮節郎  
第 43 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会, 東京都. 7 月 15 日~16 日, 2010

8. 骨肉腫における GOLPH3 遺伝子の高発現とその機能解析

救仁郷修, 瀬戸口啓夫, 松野下幸弘, 佐々木裕美, 永尾宗子, 小宮節郎  
第 43 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会, 東京都. 7 月 15 日~16 日, 2010

9. ヒト骨肉腫における GLI2 の強発現と GLI2 をターゲットにした骨肉腫治療の可能性

永尾宗子, 瀬戸口啓夫, 廣津匡隆, 佐々木裕美, 松野下幸弘, 救仁郷修, 小宮節郎  
第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会, 京都市. 10 月 14 日~15 日, 2010

10. 骨肉腫における SMO の機能抑制による増殖能・浸潤能抑制効果とそのメカニズムの解析

廣津匡隆, 瀬戸口啓夫, 佐々木裕美, 松野下幸弘, 永尾宗子, 救仁郷修, 小宮節郎  
第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会, 京都市. 10 月 14 日~15 日, 2010

11. Functional analysis of EGR1 and its up-regulation using anti-tumour agents. Matsunoshita Y, Setoguchi T, Sasaki H, Kunigou O, Hirotsu M, Nagano S, Komiya S.

7th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies, Kyoto, Japan  
October 16-20, 2010

12. Inhibition of Hedgehog pathway prevents rhabdomyosarcoma growth.

Kawabata N, Setoguchi T, Komiya S.  
第 32 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸市. 12 月 7 日~10 日, 2010

13. Functional analysis of EGR1 and its up-regulation using anti-tumor agents. Matsunoshita Y, Setoguchi T, Kunigou O, Hirotsu M, Komiya S.

The 19th Korean-Japanese Combined Orthopaedic Symposium, Gwangju, Korea.  
June 3-4, 2009

14. SMO の機能制御による骨肉腫増殖抑制効果と SMO inhibitor の臨床応用の可能性  
廣津匡隆, 瀬戸口啓夫, 松野下幸弘, 佐々木裕美, 小宮節郎

第 42 回日本整形外科学会基礎骨・軟部腫瘍学術集会, 横浜市. 7 月 16 日~17 日, 2009

15. ヒト骨肉種における GLI2 の強発現と GLI2 をターゲットにした骨肉腫治療

廣津匡隆, 瀬戸口啓夫, 松野下幸弘, 小宮節郎  
第 42 回日本整形外科学会基礎骨・軟部腫瘍学術集会, 横浜市. 7 月 16 日~17 日, 2009

16. Inhibition of Notch pathway prevents osteosarcoma growth in vitro and in vivo by cell cycle regulation.

Setoguchi T, Tanaka M, Hirotsu H, Sasaki H, Komiya S.  
The joint 15th Congress of the European

Cancer Organization and 34th Congress of the European Society for Medical Oncology, Berlin, Germany. September 20-24, 2009

17. Inhibition of Notch pathway prevents osteosarcoma growth in vitro and in vivo by cell cycle regulation.

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

The 18th Japanese-Korean Combined Orthopaedic Symposium. Nagasaki, Japan.  
July 31-August 2, 2008

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

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

ASBMR 30th Annual Meeting  
Montréal, Québec, Canada  
September 12-16, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小宮 節郎 (KOMIYA SETSURO)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授  
研究者番号: 30178371

(2) 研究分担者

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

(3) 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

(3) 研究協力者

永尾 宗子 (NAGAO HIROKO)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・大学院生  
研究者番号: なし

(4) 研究協力者

佐々木 裕美 (SASAKI HIROMI)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・大学院生  
研究者番号: なし

(5) 研究協力者

松野下 幸弘 (MATSUNOSHITA YUKIHIRO)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・大学院生  
研究者番号: なし

(6) 研究協力者

救仁郷 修 (KUNIGOU OSAMU)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・大学院生

研究者番号：なし