

Overexpression of carbonyl reductase 1 inhibits malignant behaviors

and epithelial mesenchymal transition by suppressing

TGF- β signaling in uterine leiomyosarcoma cells

Carbonyl reductase 1 の過剰発現は子宮平滑筋肉腫細胞における
悪性度や上皮間葉転換を TGF- β シグナルを介して抑制する

梶邑 匠彌

山口大学大学院医学系研究科

産科婦人科学講座

令和元年 5 月

目次

【要旨】	3
【研究の背景と目的】	4
【方法】	5
【結果】	10
【考察】	17
【結語】	20
【謝辞】	20
【参考文献】	20

【要旨】

目的； Carbonyl reductase 1 (CBR1)と癌の進展との関連については、これまでにいくつかの報告があり、本研究室においても CBR1 の過剰発現が子宮頸癌において癌の悪性度や上皮間葉転換 (EMT)を抑制することを報告してきた。子宮平滑筋肉腫 (uLMS)は極めて悪性度の高い間葉系腫瘍であるが、uLMS の悪性度に対する CBR1 の影響については未だ報告がない。そこで本研究では uLMS において CBR1 が悪性度や EMT を抑制するかを検討した。

方法； uLMS 細胞株 (SKN)と子宮肉腫細胞株 (MES-SA)において、 CBR1 過剰発現株を樹立し、細胞の機能の解析及び EMT 関連分子の発現解析を行った。また、uLMS における TGF- β と EMT との関連を調べるため、SKN 親株にリコンビナント TGF- β や TGF- β 受容体阻害剤を添加し、EMT 関連分子の発現を調べた。

結果； CBR1 の過剰発現によって、上皮マーカー (E-cadherin、cytokeratin)の発現増加、及び間葉マーカー (fibronectin、N-cadherin) の発現減少が生じ、細胞増殖能、遊走能、及び浸潤能が抑制された。この結果は CBR1 の過剰発現によって uLMS の悪性度や EMT が抑制されたことを示している。また CBR1 の過剰発現は TGF- β の産生や、Smad のリン酸化を含む TGF- β 経路の下流のシグナルを抑制した。さらに uLMS において TGF- β 添加によって EMT が促進され、一方で TGF- β シグナルの阻害剤によって EMT は抑制された。これらの結果は CBR1 による EMT の抑制に TGF- β シグナルが関わることを示唆している。

結論； CBR1 の過剰発現によって uLMS の悪性度や EMT が抑制された。また CBR1 による EMT の抑制効果は TGF- β シグナルを介していることが示された。

1, 【研究の背景と目的】

子宮平滑筋肉腫 (uLMS)は、子宮筋層の平滑筋に由来する間葉系の悪性腫瘍である。子宮肉腫の中では最も一般的な組織型である (1)。uLMS の発症頻度は、子宮悪性腫瘍のうち約 1%を占めるに過ぎないが、その悪性度は非常に高く、全ての子宮腫瘍における死亡例の約 70%を占める (2)。uLMS の標準治療は子宮全摘などの外科手術であるが、子宮全摘を行った症例でも術後再発のリスクは 50-71%と極めて高い (3-9)。また、5 年無病再発率も 30%を下回ることが報告されており (10-12)、予後も極めて不良である。従って、より効果的な uLMS に対する治療あるいは予防戦略の構築が極めて重要である。

Carbonyl reductase 1 (CBR1)は主に単量体として細胞質内に存在するカルボニル化合物を基質とする NADPH 依存性の還元酵素である (13,14)。CBR1 は肝臓、腎臓、乳腺、卵巣、血管内皮細胞といった様々な器官に分布しており、脂肪酸代謝が主な機能であると考えられている (15)。興味深いことに、CBR1 は癌細胞の悪性度の制御にも関与することがわかっている。例えば、卵巣癌、子宮頸癌、及び子宮体癌において、CBR1 の発現を抑制させると細胞増殖能や腫瘍形成能が促進し、同時に E-cadherin の発現減少、Matrix metalloproteinase (MMP)の活性化をもたらすことが、*in vivo* 及び、*in vitro* の双方で示されている (16-21)。また、卵巣癌、子宮頸癌、及び子宮体癌の症例において、CBR1 発現が低いものほどリンパ節転移の頻度が高く、予後不良であることが報告されている (17,18,20)。一方で、卵巣癌、子宮頸癌、及び子宮体癌細胞株で CBR1 を過剰発現させると、細胞増殖能、腫瘍形成能が抑制されることも報告されている (17-20,22)。さらに、CBR1 の過剰発現は、E-cadherin の発現を促進し、N-cadherin の発現を抑制する。これらの知見は CBR1 発現の増加によって、上皮間葉転換 (EMT)が阻害されることを示唆する (17,18)。

EMT は上皮系組織由来の腫瘍の悪性度の促進に深く関わる現象である(23,24)。EMT の過程において、E-cadherin の発現低下に伴い細胞間接着が緩み、浸潤及び転移が促進される (23-26)。これまで EMT は、主に上皮系組織由来の悪性腫瘍で研究されてきたが、最近、

EMT が間葉系組織由来の悪性腫瘍における悪性形質にも関与していることが明らかになっている (26)。実際に、ある特定の肉腫において EMT に類似した現象が生じていることがいくつかの研究で報告されており、肉腫の種類によっては、EMT が生じうる可能性が考えられる (27-32)。すなわち間葉由来の腫瘍においても、EMT によって間葉系の性質をより強め、悪性度をより促進し、これが臨床的な腫瘍の悪性度と関連している可能性がある (27,30,32,33)。従って、上皮系腫瘍と同様に、uLMS においても、悪性度における EMT の関与を調べることが重要と考えられる。

transforming growth factor (TGF) - β は細胞増殖能や、腫瘍形成能に関わる増殖因子であるが、多くの上皮系及び間葉系腫瘍において EMT と密接に関与していることが明らかになっている (34,35)。我々は、これまで、CBR1 を過剰発現した子宮頸癌細胞株において、CBR1 がどのようなシグナルに関与するかを検討した (21)。CBR1 を発現抑制した子宮頸癌細胞株について、マイクロアレイにより網羅的な遺伝子発現を解析し、パスウェイ解析を行ったところ、活性化されたシグナルパスウェイに TGF- β シグナルが含まれていた。これは TGF- β シグナルが CBR1 によって制御されていることを示唆している。また異種移植モデルを用いた実験においても、CBR1 発現抑制によって EMT が促進されることで移植した子宮頸癌細胞の腫瘍径が増大することも明らかにしている (21)。これらの結果は子宮頸部扁平上皮癌において、CBR1 は TGF- β シグナルの阻害を介して EMT を抑制することで、悪性度を低下させることを示している (21)。しかし、uLMS において CBR1 が同様の作用機序を示すかは明らかではない。そこで本研究では uLMS において CBR1 が TGF- β シグナルを介して悪性度や EMT を制御するかどうかを検討することとした。

2, 【方法】

2.1 細胞培養

ヒト子宮平滑筋肉腫細胞株 SKN、及びヒト子宮肉腫細胞株 MES-SA を用いた。SKN は Health Science Research Resources Bank (HSRRB、大阪、日本)から、また MES-SA は American

type culture collection (ATCC、ヴァージニア、アメリカ)からそれぞれ購入した。SKN は Ham's F12 (Sigma-Aldrich、東京、日本)、MES-SA は McCoy's 5A (ATCC)の各培養液中で培養した。それぞれの培養液には 10%の非動化した牛胎児血清 (FBS)を添加した。6-well の培養プレートに各細胞を 5×10^4 細胞/well で播種し、その後 5% CO₂ インキュベーターで 37°C下で 5 日間培養した。細胞回収はトリプシン処理によって行い、回収細胞数の測定は cell-counter(Vi-CELL XR; Beckman Coulter、東京、日本)を用いた (36)。

TGF- β 添加実験については、上記の各培養液に ヒトリコンビナント TGF- β 1 (Sigma-Aldrich、東京、日本)を、100 pg/ml あるいは 500 pg/ml の濃度になるように添加し、各細胞を 24 時間培養した。TGF- β シグナルの阻害実験については、TGF- β 1 型受容体選択的阻害剤である SB431542 (WAKO、東京、日本)を 10 mM となるように dimethylsulfoxide (DMSO)に溶解し、これを最終濃度 10 μ M となるように各培養液に添加した。各細胞を 5×10^4 細胞/well になるように 6-well プレートに播種し、24 時間培養した後、培養液を、SB431542 を添加した培養液に交換し、そこから 48 時間培養した。

2.2 遺伝子導入

CBR1 の機能を検証するため、CBR1 を過剰発現した細胞株を樹立した。ヒト CBR1 cDNA (コード配列)、green fluorescent protein (GFP)、および抗ネオマイシン遺伝子を挿入した発現ベクター (pEF1a-IRES-AcGFP vector) ; (Clontech、Mountain view、CA、USA)を SKN および MES-SA にリポフェクション法によって導入した (37,38)。導入細胞を Ham's F12 あるいは McCoy's 5A の各培養液中で 24 時間培養した後、培養液に 300 μ g/ml のネオマイシンを添加して、1 ヶ月間の薬剤選別培養を行った。樹立した細胞における CBR1 の高発現は Western blot 法で確認した。空 vector を導入したクローンをコントロール細胞株 (Mock)として用いた。また遺伝子導入試薬の添加が細胞増殖や CBR1 の発現に影響を与えないことも事前実験において確認した。

2.3 細胞遊走および浸潤能の評価

細胞の遊走能や浸潤能は Biocoat Matrigel Invasion Chamber (Corning Life Science Inc、MA、USA)を用いて、同キットの取扱説明書に準じて実験を行った (17)。このキットは 12- well マイクロプレートに、膜の付加されたチャンバーを留置し、膜の表側から裏側へ移動した細胞数を測定するものである。5×10⁴ 細胞/well の細胞を FBS 非添加の培養液でチャンバーの膜上に播種した。チャンバーは 10% FBS を添加した培養液を入れたマイクロプレートの各 well に浸漬した。20 時間後に、チャンバー底の膜の上面を綿棒で拭い、上面に付着した細胞を完全に拭った。次に膜全体を Diff-Quick (Sysmex、神戸、日本)に浸し細胞を染色した。膜の下面に付着した染色された細胞を、200 倍の倍率の顕微鏡下で無作為に抽出した 5 視野で観察し細胞数を数え、平均値を算出した。遊走能はチャンバー膜を移動した細胞数で評価した。浸潤能はコラーゲン処理したチャンバー膜を移動した細胞数を、非処理のチャンバー膜を移動した細胞数で除した値で評価した。それぞれの実験は 3 回行い、平均値は 3 回の独立した実験より算出した。MES-SA については、細胞がチャンバー膜を移動しなかったため、MES-SA における CBR1 過剰発現の遊走、浸潤に対する影響についてはこの実験では評価できなかった。

2.4 Wound healing assay

各細胞を 6 -well プレートに十分な量播種し、1000 µl のチップで well の中央を搔爬し、溝を形成した。24 時間の培養を行い、溝の両側の細胞がどれだけ移動したかを測定した (36)。実験は 3 回行い、それぞれの独立した実験から平均値を算出した。

2.5 Real-time RT-PCR 法

E-cadherin (CDH1)、*Snail (SNAIL)*、*Slug (SNAI2)*、*TGF-β1 (TGFB1)*、及び *TGF-β2 (TGFB2)* の mRNA 発現を real-time RT-PCR 法で解析した。RNeasy (QIAGEN、東京、日本)を用いて RNA を各細胞より抽出し、Revertra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO、大阪、日本)を用いて、相補的 DNA (cDNA)を合成した。Real-time PCR は TB Green Primer Ex Taq II DNA Polymerase (TAKARA、東京、日本) を用いて同キットの取扱説明書に準じて行った。PCR

に用いたプライマーの配列は以下の通りである。 *SNAI1* (5'-ctccctgtcagatgaggacagt-3' and 5'-tccttgttcagatatttcag-3'), *SNAI2* (5'-cctgtcataccacaaccagag-3' and 5'-cttcactactaatggggcttc-3'), *CDH1* (5'-cggaatgcagttgaggatc -3' and 5'-aggatggtgaagcgatggc -3'), *TGFBI* (5'-tggacaccaactattgcttcag-3' and 5'-gtccaggctccaaatgtagg-3'), *TGFBI2* (5'-ttgatggcacctccacatatac-3' and 5'-agtgagcgtaggcagcaatta-3'), and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) (5'-tgcaccaccaactgcttagc-3' and 5'-ggcatggactgtggtcatgag -3')。また、内部標準として *GAPDH* を用いた。反応条件は、95°Cで5秒、60°Cで20秒の45サイクルで行った。各実験とも3回行い、独立したそれぞれの実験から発現の平均値を算出した。

2.6 Western blot 法

培養細胞を RIPA 緩衝液 (WAKO) に浸漬し、ゆっくりと溶解した。4°C 条件下で 15000rpm、10 分間の遠心分離を行い、沈殿した不溶物を除いた上清を回収した。これに SDS サンプル緩衝液 (New England Biolabs、東京、日本) を加え、100°C で 5 分煮沸したのち、氷冷した。10 µg のタンパク質を含む溶液を 10 % の SDS-polyacrylamid gel で電気泳動した。泳動後のゲル上のタンパク質を Polyvinylidene difluoride 膜 (New England Biolabs) にセミドライ式の転写装置を用いて転写した。pH 7.5 に調節した Tris 緩衝液に界面活性剤 (Tween 20) を最終濃度 0.1 % となるように加えた溶液 (TBST) で 5 % の低脂肪乳を溶解した溶液を作成し、これを用いて転写膜を常温で 1 時間ブロッキングした。その後、ブロッキング溶液に各一次抗体を 1:1000 の割合で希釈し 4°C で 16 時間インキュベートした。ついで、転写膜を、二次抗体を 1:2000 の割合で希釈したブロッキング溶液に溶解した溶液中で 1 時間常温でインキュベートした。最後に ECL-Western blotting detection reagents (GE Healthcare、Little Chalfont、Buckinghamshire、UK) で 5 分間インキュベートし、Hyperfilm-ECL (GE Healthcare) を現像用に使用した。一次抗体には、以下の抗体を使用した。抗 CBR1 抗体; goat anti-human CBR1 polyclonal antibody (ab4148) (Abcam、東京、日本)、抗 E-cadherin 抗体; rabbit anti-human E-cadherin antibody (EP700Y)(Abcam)、抗 cytokeratin 抗体; mouse anti-human cytokeratin monoclonal antibody (ab668)(Abcam)、抗 α-SMA 抗体; rabbit anti-human α-SMA monoclonal

antibody (1184-1)(Abcam)、抗 fibronectin 抗体; rabbit anti-human fibronectin polyclonal antibody (ab23750)(Abcam)、抗 N-cadherin 抗体; rabbit anti-human N-cadherin polyclonal antibody (ab76057)(Abcam)、抗 vimentin 抗体; rabbit anti-human vimentin polyclonal antibody (EPR3776)(Abcam)、抗 Snail 抗体; rabbit anti-human snail monoclonal antibody (#3879)(CST、東京、日本)、抗 smad 2 抗体; rabbit anti-human smad 2 monoclonal antibody (#3122) (CST)、抗 smad 3 抗体; rabbit anti-human smad 3 monoclonal antibody (#9523)(CST)、抗リン酸化 smad 2 抗体; rabbit anti-human phospho-smad 2 monoclonal antibody (#3132)(CST)、抗リン酸化 smad 3 抗体; rabbit anti-human phospho-smad 3 monoclonal antibody (#3104S)(CST)、抗 b-tubulin 抗体; mouse anti-human b-tubulin monoclonal antibody (T4026)(Sigma-Aldrich)。

2.7 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

細胞を FBS 無添加の培養液中で 48 時間培養した後、培養上清を抽出し、上清中の TGF- β 1 の濃度を、Quantikine ELISA Human TGF- β 1 immunoassay kit (R&D System、MN、USA)を用いて測定した。吸光度は 450 nm で測定した。

2.8 Gelatin zymography

培養液中へ分泌された MMP 濃度を gelatin zymography で評価した。実験は以前に報告された方法に基づいて行った (17)。細胞を 6-well プレートに 1.0×10^5 細胞/well で播種し、24 時間培養した後、FBS を含まない培養液へ交換し、さらに 24 時間培養した。回収した培養液 20 μ l に 10 μ l の SDS サンプル緩衝液 (New England Biolabs)を 10 μ l 加え、よく混和し、0.9 mg/ml のゼラチンを含む 10% SDS-polyacrylamid gel で泳動した。標準 MMP マーカー; pro MMP-9 (92kDa); pro MMP-2 (72kDa); MMP-2 (62kDa) (Funakoshi、東京、日本) をコントロールとして用いた。泳動後のゲルを界面活性剤 (2.5 % Triton X)で洗浄し、活性緩衝液中に 37°Cで 72 時間浸漬した。活性化された MMP をクマシーブルー染色し、定量化した。バンドの定量化には Image J ソフトを用いた。MES-SA でも zymography を行なったが、バンドを抽出することができなかった。MES-SA は細胞の性質として、MMP を分泌していな

い可能性があり、これが原因と考えられた。

2.9 統計解析

2 群間の比較には T-検定を用いた。両群間の有意差の比較には Tukey 検定による ANOVA 解析を行った。p-value が 0.05 未満の場合を有意と定義した。統計解析は SPSS 5.0 J for windows ソフトウェアパッケージ (SAS Institute、NC、USA)を用いて行った。

3, 【結果】

3.1 CBR1 過剰発現株の樹立

uLMS において CBR1 が悪性度に応じたような影響を与えるかを評価するために、SKN と MES-SA の 2 種類の細胞株で CBR1 の過剰発現株を樹立した。樹立した各細胞株について、Western blot 法で、Mock 株 (コントロール) や親株に比較して CBR1 過剰発現株では CBR1 タンパクの発現が増加していることを確認した (図 1A)。また親株や Mock 株が紡錘形の繊維芽細胞様の形態を示したのに対し、CBR1 過剰発現株では敷石状の上皮細胞様の形態を示した (図 1B)。

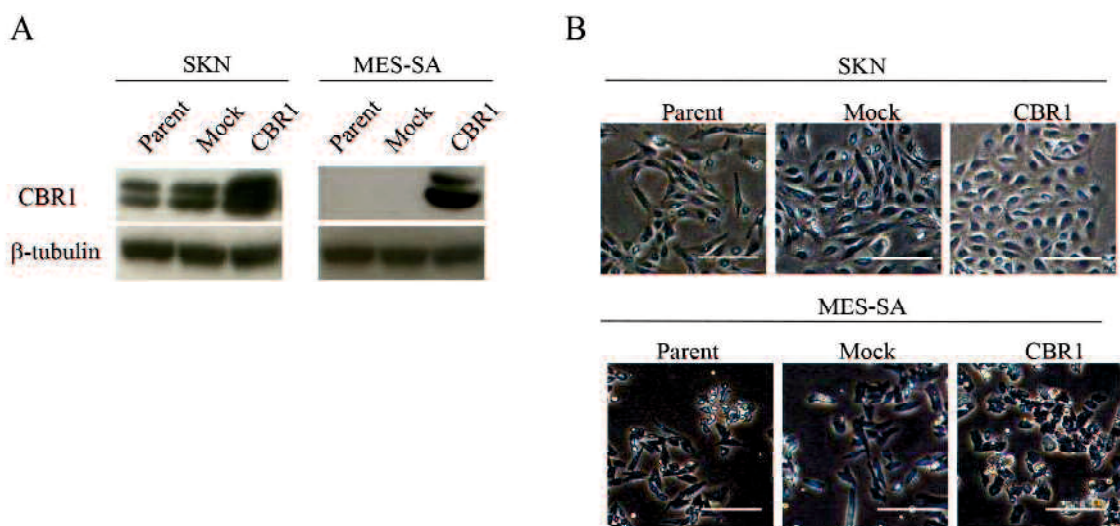


図 1. Carbonyl reductase 1(CBR1)過剰発現株の樹立

子宮平滑筋肉腫細胞株 SKN および子宮肉腫細胞株 MES-SA に CBR1 の cDNA を導入し、これを CBR1 過剰発現株とした。また空 vector を導入したものを Mock 株とした。

(A) CBR1 発現を Western blot 法で解析した。内部標準として β -tubulin を用いた。

(B) SKN および MES-SA の親株、Mock 株、CBR1 過剰発現株の細胞形態。スケールバー: 200 μm 。

3.2 CBR1 過剰発現が細胞増殖能、細胞遊走能に及ぼす影響

4 日間の培養後、SKN および MES-SA の双方で、CBR1 過剰発現株は、Mock 株に比較して細胞増殖が有意に低かった (図 2)。wound healing assay では、どちらの細胞も CBR1 過剰発現株で Mock 株に比べ移動速度が有意に遅かった (図 3A)。遊走実験において、遊走した細胞の数は、CBR1 過剰発現株の方が Mock 株に比較して有意に少なかった (図 3B)。

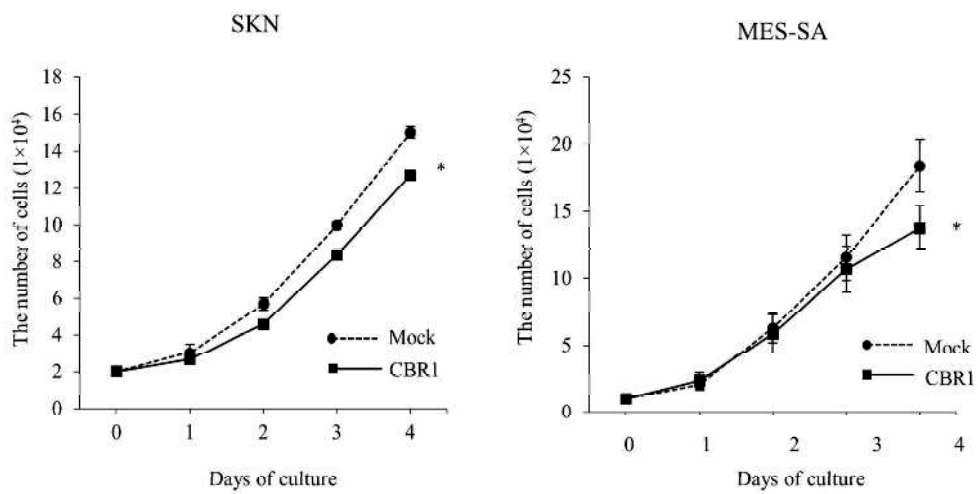


図 2. SKN および MES-SA における CBR1 過剰発現の細胞増殖能に及ぼす影響

Mock 株および CBR1 過剰発現株の細胞数は 24 時間毎に測定した。値は 3 回の独立した実験の平均値 \pm SEM。
*; $p < 0.05$ vs Mock 株。

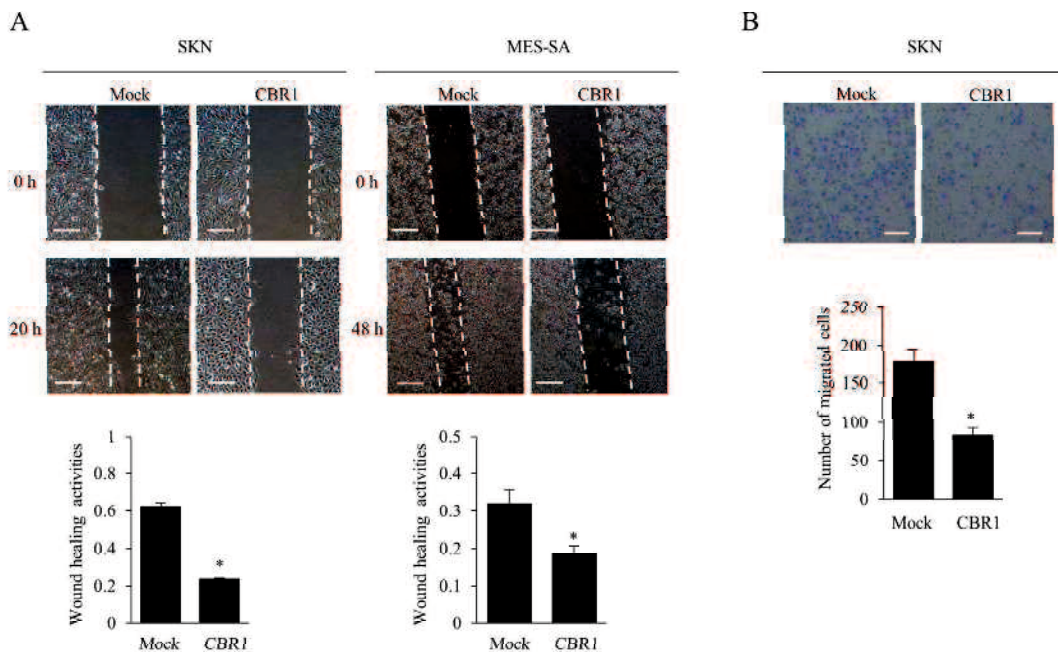


図 3. CBR1 過剰発現が細胞の遊走能に及ぼす影響

(A) SKN 及び MES-SA における wound healing assay。(上段) 搔爬 0 及び 20 時間後の細胞像。写真中の直線が細胞の移動端を示す。スケールバー: 200 μm (下段) 遊走度の比較; グラフは実験終了時のスリットの幅を実験開始時のスリットの幅で除し移動率を示した。移動率は 3 回の独立した実験の平均値 \pm SEM。*; $p < 0.05$ vs Mock 株。

(B) SKN における migration assay。(上段) 膜を移動した細胞の染色像。(スケールバー: 200 μm) (下段) 遊走細胞数の比較; グラフは無作為に選んだ 5 視野における移動細胞の個数の平均値を示した。3 回の独立した実験の平均値 \pm SEM。*; $p < 0.05$ vs Mock 株。

3.3 CBR1 過剰発現が MMP 分泌、及び浸潤能に及ぼす影響

SKN は、MMP-2 および pro-MMP-9 を分泌していることが gelatin zymography で確認できた。抽出された pro-MMP2、MMP2 および pro-MMP 9 の活性は、CBR1 過剰発現株の方が Mock 株に比べ有意に低かった (図 4A)。また CBR1 過剰発現株の方が Mock 株に比べ有意に浸潤能が低かった (図 4B)。

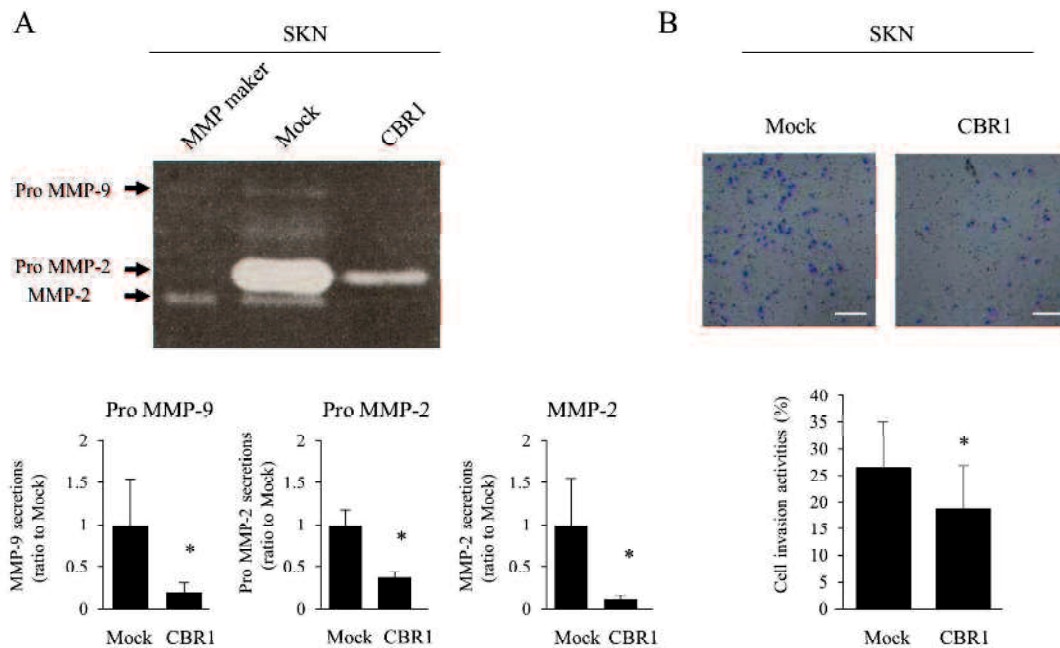


図 4. SKN における CBR1 の過剰発現が Matrix metalloproteinase (MMP)分泌能、及び浸潤能に及ぼす影響

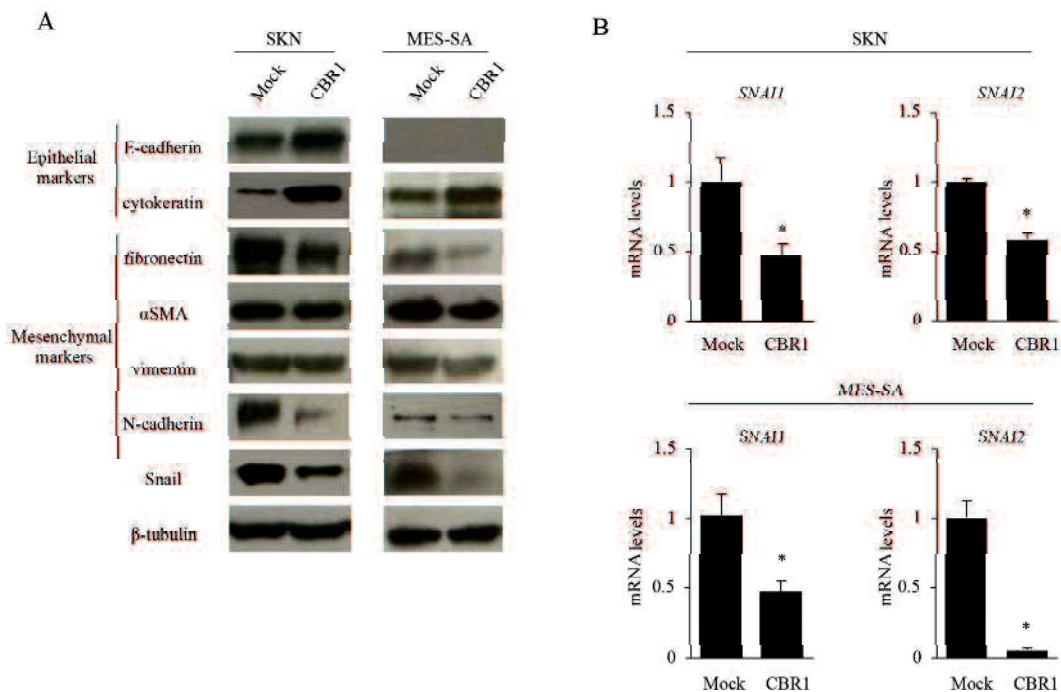
(A) gelatin zymography で MMP 分泌能を評価した。(上段) Gelatin zymography の結果。(下段) 相対的 MMP 分泌量; グラフはバンド輝度を image J ソフトウェアで処理し数値化した値を示した。値は Mock 株に対する割合。3 回の独立した実験の平均値 \pm SEM。*; $p < 0.05$ vs Mock 株。

(B) invasion assay で浸潤能を評価した。(上段) 膜を通過した細胞の染色像。スケールバー: 200 μm (下段) 浸潤率; グラフはコラーゲン処理チャンバーの膜を移動した細胞数をコントロール(非コラーゲン処理)チャンバーを移動した細胞数で除して算出した値を示した。無作為に選んだ 5 視野における移動細胞の個数の平均値。視野倍率は 200 倍。3 回の独立した実験の平均値 \pm SEM。*; $p < 0.05$ vs Mock 株。

3.4 CBR1 の過剰発現が上皮間葉転換マーカーに及ぼす影響

SKN では上皮マーカーである E-cadherin と cytokeratin が、Mock 株に比べ、CBR1 過剰発現株でより強く発現していた (図 5A)。MES-SA では、cytokeratin が Mock 群に比べ、CBR1 過剰発現群でより強く発現していた (図 5A)。MES-SA では親株において E-cadherin の発現が見られないが、CBR1 過剰発現株においても E-cadherin の発現は認められなかった。SKN では、間葉マーカーである fibronectin や N-cadherin の発現が Mock 株に比べ、CBR1 過剰発現株で低くなっていた。 α SMA や vimentin の発現は両細胞株間で差を認めなかった (図 5A)。MES-SA では fibronectin、N-cadherin、及び α SMA の発現が Mock 株に比べ、CBR1 過剰発現株で低くなっていた (図 5A)。Snail (SNAIL) と Slug (SNAI2) は E-cadherin の発現を抑制する転写因子である(30)。SKN 及び MES-SA の両細胞において、Snail タンパク(図 5A)と *Snail* の mRNA (図 5B)発現は、Mock 株に比べ、CBR1 過剰発現株で有意に低くなっていた。これらの結果から、CBR1 過剰発現株において、EMT が抑制されていることが示された。

図 5. CBR1 過剰発現の EMT 関連マーカーの発現に及ぼす影響



(A) 上皮マーカー (E-cadherin、cytokeratin)、間葉マーカー (fibronectin、N-cadherin、vimentin、 α -SMA)、及び転写因子 Snail の発現を western blot 法で評価した。 β -tubulin を内部標準として用いた。

(B) EMT 関連転写因子である *Snail* (SNAIL) 及び *Slug* (SNAI2) の mRNA の発現を real-time PCR で評価した。

GAPDH を内部標準として用いた。各分子とも *GAPDH* の mRNA 発現量に対する相対量で示した。3回の独立した実験の平均値±SEM。*; $p < 0.05$ vs Mock 株。

3.5 CBR1 過剰発現群における TGF- β の産生と TGF- β シグナル

CBR1 の過剰発現が TGF- β の産生に影響を及ぼすかを検討した。両細胞において、*TGFB1* と *TGFB2* の mRNA 発現は、Mock 株に比べ CBR1 過剰発現株で有意に低値を示した (図 6A)。培養液中に分泌された TGF- β 濃度についても、Mock 株と比較して、CBR1 過剰発現株で有意に低かった (図 6B)。これらの結果より、CBR1 過剰発現株では、TGF- β の産生が抑制されていることが示された。さらに我々は、CBR1 過剰発現が TGF- β /Smad シグナルを抑制するかという点についても検討した。Western blot 法でリン酸化 Smad2 とリン酸化 Smad3 の発現を評価したところ、SKN、MES-SA 双方において、Mock 株に比べ、CBR1 過剰発現株で有意に発現が減少していた (図 6C)。このことより、CBR1 過剰発現株では TGF- β シグナルが抑制されていることが示唆された。

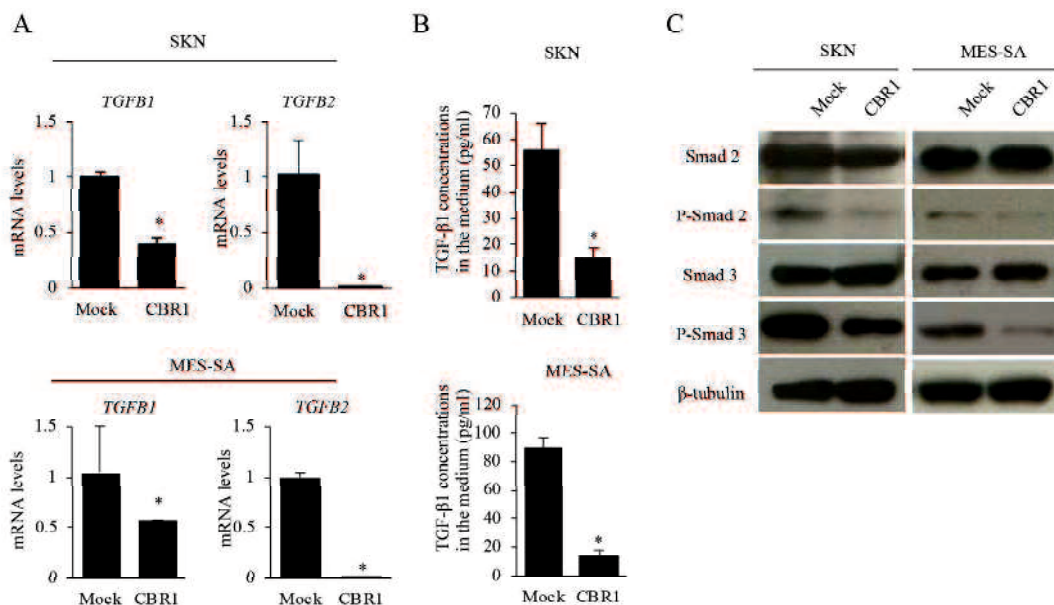


図 6. SKN、MES-SA における TGF- β 産生及び TGF- β シグナルに対する CBR1 過剰発現の影響

(A) *TGFB1* 及び *TGFB2* の発現を real-time PCR で評価した。*GAPDH* を内部標準として用いた。各分子とも *GAPDH* の mRNA 発現量に対する相対量で示した。3回の独立した実験の平均値±SEM。*; $p < 0.05$ vs Mock 株。
 (B) 培養液中 TGF- β の濃度を ELISA で評価した。3回の独立した実験の平均値±SEM。*; $p < 0.05$ vs Mock 株。
 (C) Smad 2、Smad 3、リン酸化 Smad 2、及びリン酸化 Smad 3 の発現を Western blot 法で評価した。 β -tubulin を内部標準として用いた。

3.6 TGF- β シグナルと上皮間葉転換 (EMT)

TGF- β シグナルが uLMS において EMT の促進に関与するかを検討するため、SKN の親株において TGF- β 受容体阻害剤 (SB431542) 添加の影響を調べた。リン酸化 Smad 2 およびリン酸化 Smad 3 の発現は、SB431542 添加によって減少した (図 7A)。E-cadherin のタンパク、および mRNA 発現は、SB43152 投与によって増加し、一方で Snail (SNAI1) のタンパク、および mRNA の発現は減少した (図 7A,7B)。さらに SB431542 の投与によって、細胞増殖能が有意に減少した (図 7C)。しかしながら、SB431542 の添加は細胞形態には影響を与えなかった (データ未掲載)。これらの結果は、TGF- β シグナルは EMT の促進に関与していることを示唆している。さらに uLMS において TGF- β 添加によって実際に EMT が誘導されるかを検討した。SKN の親株と CBR1 過剰発現株に TGF- β 1 を添加した。親株において、TGF- β 1 添加によりリン酸化 Smad 2 およびリン酸化 Smad 3 の発現が増加した (図 7D)。また E-cadherin のタンパクおよび mRNA の発現は TGF- β 1 添加によって減少し、一方、Snail (SNAI1) のタンパクおよび mRNA の発現は増加した (図 7D,7E)。TGF- β 1 添加による細胞増殖能 (図 7F) 及び細胞形態への影響 (データ未掲載) は、認められなかった。これらの結果は、TGF- β シグナルは uLMS における EMT の誘導に一部関与していることを示している。一方 CBR1 過剰発現細胞株における TGF- β 1 添加の結果は、親株における結果と同様であった (Supplemental Fig.1)。このことは、CBR1 の過剰発現は、外部からの添加により活性化された TGF- β シグナルには影響を与えなかったということを示している。これは、(1) TGF- β シグナルと EMT に対する CBR 1 の抑制効果を、外的に添加された TGF- β シグナルが凌駕したという可能性、あるいは(2) CBR1 は TGF- β の産生を抑制しているが、その下流の TGF- β シグナルの抑制には関与しないという可能性の双方が推定される。

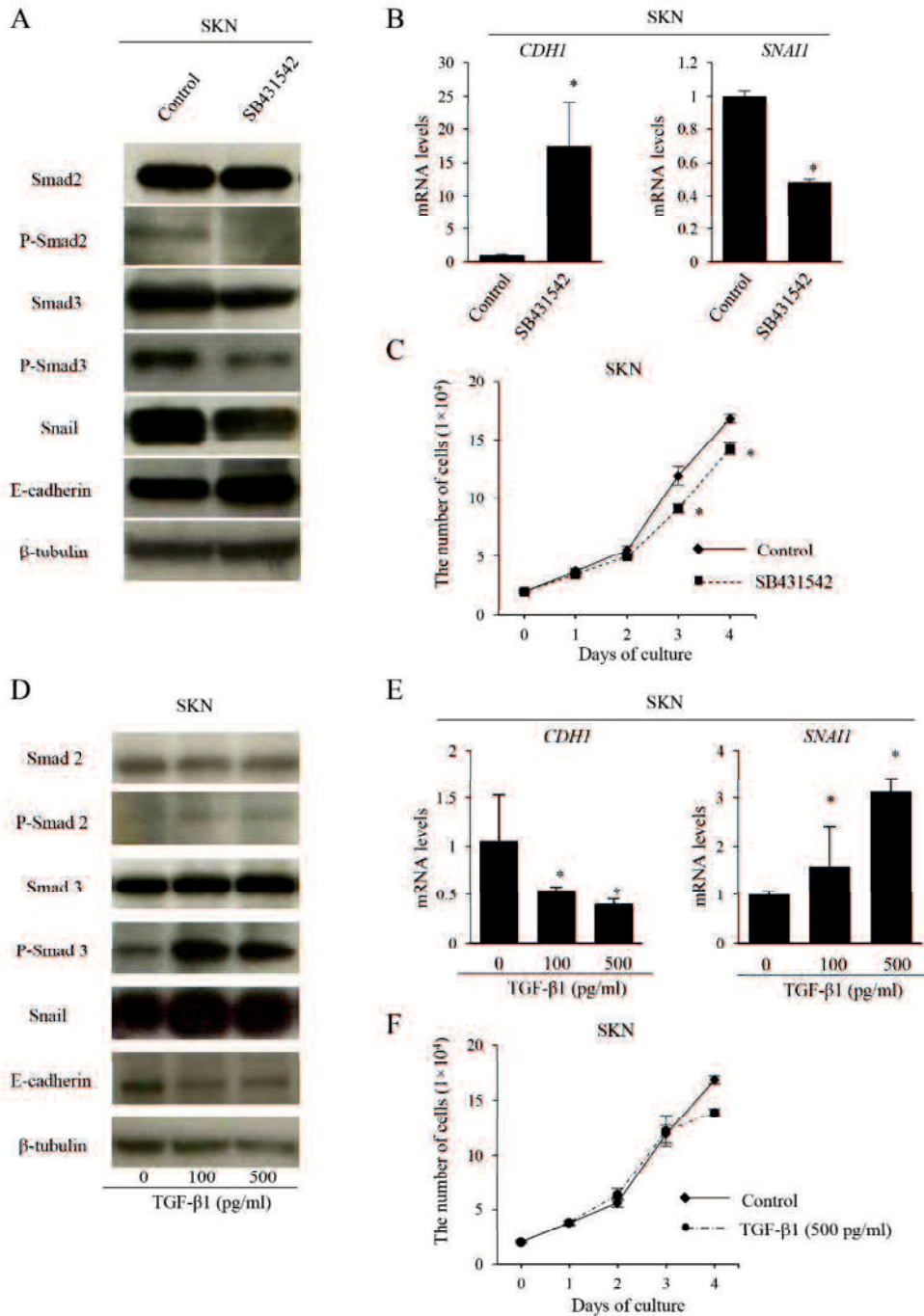
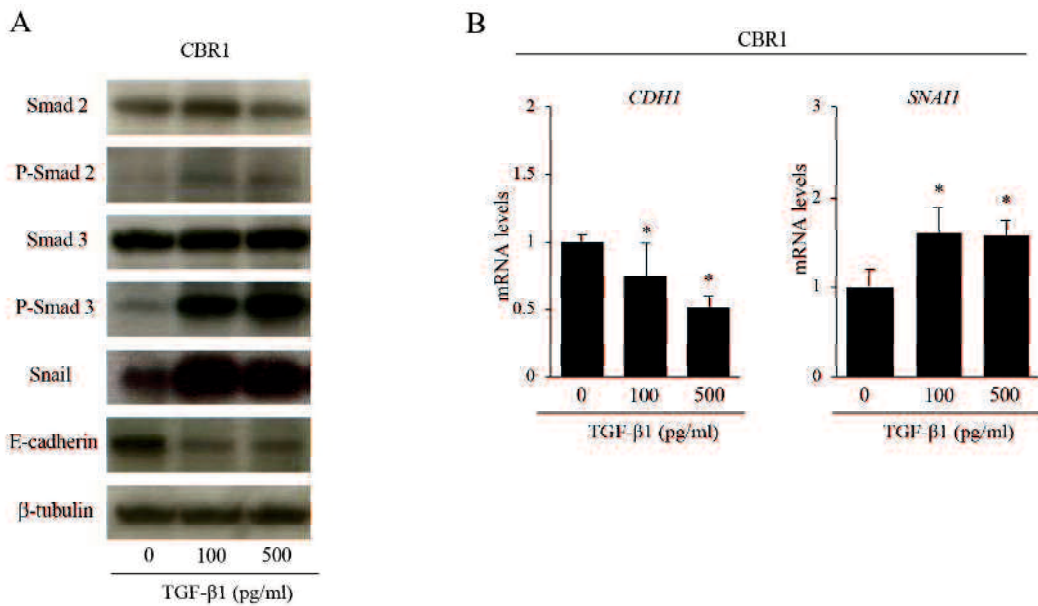


図 7. EMT における TGF-β 及び TGF-β シグナルの役割

(A,B) SB431542(TGF-β 1 型受容体選択的阻害剤)を SKN 親株に添加した。

(D,E) SKN 親株にヒトリコンビナント TGF-β1 (0、100、500 pg/ml)を 24 時間添加した。Smad 2、Smad 3、リン酸化 Smad 2 (P-smad 2)、リン酸化 Smad 3 (P-smad 3)、Snail、及び E-cadherin の発現を Western blot 法で評価した。β-tubulin を内部標準として用いた。E-cadherin (CDHI)及び Snail (SNAIL)の mRNA の発現を real-time PCR で評価した。各分子とも GAPDH の mRNA 発現量に対する相対量で示した。

(C,F) SKN 親株に SB431542 あるいは TGF-β1 (500 pg/ml)を 4 日間添加した。細胞数は 24 時間毎に測定した。値は 3 回の独立した実験の平均値±SEM。 *; p<0.05 vs control 群 (B,C)、p<0.05 vs 0 pg/ml (E)。



Supplemental Figure 1. CBR1 過剰発現細胞における TGF-β の EMT に及ぼす影響

CBR1 過剰発現株に TGF-β1 (0、100、500 pg/ml)を添加した。

(A) Smad 2、Smad 3、リン酸化 Smad 2(P-smad 2)、リン酸化 Smad 3(P-smad 3)、Snail、及び E-cadherin の発現を Western blot 法で評価した。β-tubulin を内部標準として用いた。

(B) E-cadherin (*CDHI*)及び Snail (*SNAIL*)の mRNA の発現を real-time PCR で評価した。各分子とも *GAPDH* の mRNA 発現量に対する相対量で示した。3回の独立した実験の平均値±SEM。*; p<0.05 vs 0 pg/ml。

4, 【考察】

本研究では、CBR1 の過剰発現によって uLMS で細胞増殖能、遊走能、浸潤能が抑制され、同時に、上皮マーカー (E-cadherin、N-cadherin) の発現増加と、間葉マーカー (N-cadherin、Fibronectin) の発現減少が伴うことを示した。この結果は CBR1 の発現増加が、uLMS において EMT を阻害することで悪性度を抑制することを示唆している。我々は子宮頸部扁平上皮癌細胞や子宮内膜癌細胞では、CBR1 の発現増加による EMT の阻害によって、遊走能、浸潤能が抑制されることを以前より報告して来た (17,18)。本研究は、子宮の上皮系腫瘍と同様に、間葉系の悪性腫瘍細胞である uLMS においても細胞の悪性度を CBR1 が制御することを示唆しており、我々が知りうる限りでは uLMS における CBR1 の抗腫瘍効果について述べた最初の研究である。

CBR1 が uLMS においてどのように EMT を抑制するかについての詳細な機序について

は、未だに解明されていない。我々は、これまでに子宮頸癌細胞株を用いてマイクロアレイのデータに基づいた Pathway 解析を行い、CBR1 発現抑制によって、TGF- β シグナルが活性化されていることを明らかにした (21)。TGF- β は、様々な機能をもつサイトカインであり、多くの腫瘍において EMT を誘導することが明らかになっている (24,34,39-44)。しかしながら、TGF- β が肉腫でどのように作用するかは未だよくわかっていない。Qi らは滑膜肉腫において TGF- β /Smad/Snail シグナルは EMT と密接な関連を持ち、このシグナルを介して細胞増殖や遊走、浸潤が促進されることを報告している (35,45)。また、Dwivedi らは子宮癌肉腫において、TGF- β が Smad2、Smad3 のリン酸化によって細胞遊走能を促進させることを報告している (46)。これらの報告は、上皮性腫瘍と同じく、肉腫の種類によっては TGF- β シグナルが EMT を促進することを示唆している。本研究においても TGF- β の添加によって EMT が促進されること、TGF- β シグナルを阻害すると EMT が抑制されること、また CBR1 の過剰発現によって TGF- β の産生や TGF- β シグナルが抑制されることが示された。これらの結果は CBR1 が、TGF- β の産生及び TGF- β シグナルの抑制を介して EMT を抑制していることを示唆している。uLMS において、TGF- β シグナルを介して CBR1 が EMT を抑制するという報告もこれが最初のものである。

本研究では、SB431542 (TGF- β 1 型受容体 選択的阻害剤)によって TGF- β シグナルを阻害した際、細胞増殖能の抑制は認めしたが、外因性の TGF- β を添加しても細胞増殖に変化はなかった。これについては TGF- β は多機能な機能を持つことから、TGF- β の添加実験ではいくつかの細胞内伝達経路が活性化されるためかもしれない (47)。一方で、TGF- β 受容体阻害実験では、TGF- β シグナルそのものを阻害するため、TGF- β 添加実験よりも TGF- β シグナルへの影響が、より端的に表されている可能性はある。また、TGF- β 添加、及び TGF- β シグナル阻害実験のいずれにおいても細胞形態の変化は生じなかった。この明確な理由は不明であるが、暴露期間が短く、形態変化が生じなかったこと、あるいは uLMS において形態変化を起こすには TGF- β シグナルの活性化のみでは不十分であった可能性が考えられる。CBR1 は TGF- β シグナルだけでなく、その他のいくつかの pathway に対しても関連があるため (21)、CBR1 は複数の pathway を介して細胞増殖や細胞形態を制御しているのか

もしれない。

上皮系悪性腫瘍における EMT の役割は広く知られているが、間葉系悪性腫瘍においては、その役割はほとんど知られていない。肉腫は間葉系組織に由来するので、EMT が生じるまでもなく、もともと間葉系の性質を持っている。しかしながら、種類によっては間葉系悪性腫瘍であっても腫瘍の悪性度に EMT が関与しているという報告も散見される (28,30-33,48)。Yang らは平滑筋肉腫において、EMT を抑制し、E-cadherin の発現を増加させると、細胞増殖能や浸潤能が抑制されたことを報告している (48)。この知見は本研究の結果と合致している。EMT によって間葉系の性質がより増強され、間葉系腫瘍細胞の増殖能や浸潤能といった悪性度を亢進することで (27,30,49-53)、間葉系悪性腫瘍の予後を著しく不良にさせているかもしれない。従って、EMT を制御することが、肉腫の悪性度を制御する鍵となる可能性がある。興味深いことに、EMT と反対の過程である間葉上皮転換 (MET) という現象が肉腫において観察され、この現象が腫瘍の悪性度の改善に関与するという報告がある (27,49,54,55)。本研究の結果は、この知見と同様に、CBR1 は uLMS において MET を誘導する作用を示している可能性がある。

CBR1 による TGF- β の発現を抑制する機序は明らかではないが、Miura らは卵巣癌細胞株において、CBR1 が c-jun の発現を抑制することを報告している (22)。c-jun は AP-1 と結合し、この複合体が TGF- β を介して EMT を引き起こしアポトーシスを抑制する (56)。従って、CBR1 が c-jun の発現を抑制させ TGF- β の発現のみならず、その後のシグナルを抑制している可能性が考えられる。この点についてはさらなる研究が必要である。

本研究では、子宮平滑筋肉腫に由来する細胞株として、1 種類の細胞株 (SKN) を用いて研究を行ったが、これは入手可能な子宮平滑筋肉腫細胞株がこの SKN のみであったためである。子宮肉腫細胞株 (MES-SA) でも SKN の場合と類似した結果を得ているが、複数の子宮平滑筋肉腫細胞株を使用できなかった点は本研究の制約の一つと考えられる。

5, 【結語】

本研究では、uLMS 細胞において、CBR1 の発現を増加させると TGF- β シグナルの抑制を介し、細胞の悪性度や EMT が抑制されることを明らかにした。uLMS は極めて悪性度の高い間葉系腫瘍であり、現時点では手術以外の有効な治療法が存在しない。本研究によって、uLMS の治療において CBR1 を高発現させることが有力で新たな治療法となり得ることが示唆された。子宮平滑筋肉腫をより上皮様に変化させるという治療戦略によって、子宮平滑筋肉腫の悪性度を弱め、予後を改善させる可能性がある。

6, 【謝辞】

本研究は日本学術振興会の科学研究費補助金 23592425、23791845、26462525、15K10719、及び 16H07009 によって資金提供されている。

本論文は *Oncology Letters* の論文の和訳であり、学位論文として投稿することを許可されている。

7, 【参考文献】

- [1] Zang Y, Gu L, Zhang Y, Wang Y, Xue F. Identification of key genes and pathways in uterine leiomyosarcoma through bioinformatics analysis. *Oncol Lett.* 2018;15:9361-9368.
- [2] Ricci S, Stone RL, Fader AN. Uterine leiomyosarcoma: Epidemiology, contemporary treatment strategies and the impact of uterine morcellation. *Gynecol Oncol.* 2017;145:208-216.
- [3] George S, Barysaukas C, Serrano C, Oduyebo T, Rauh-Hain JA, Del Carmen MG, Demetri GD, Muto MG. Retrospective cohort study evaluating the impact of intraperitoneal morcellation on outcomes of localized uterine leiomyosarcoma. *Cancer.* 2014;120:3154-3158.
- [4] Raine-Bennett T, Tucker LY, Zaritsky E, Littell RD, Palen T, Neugebauer R, Axtell A, Schultze PM, Kronbach DW, Embry-Schubert J, Sundang A, Bischoff K, Compton-Phillips AL, Lentz SE. Occult Uterine

Sarcoma and Leiomyosarcoma: Incidence of and Survival Associated With Morcellation. *Obstet Gynecol.* 2016;127:29-39.

[5] Einstein MH, Barakat RR, Chi DS, Sonoda Y, Alektiar KM, Hensley ML, Abu-Rustum NR. Management of uterine malignancy found incidentally after supracervical hysterectomy or uterine morcellation for presumed benign disease. *Int J Gynecol Cancer.* 2008;18:1065-1070.

[6] Oduyebo T, Rauh-Hain AJ, Meserve EE, Seidman MA, Hinchcliff E, George S, Quade B, Nucci MR, Del Carmen MG, Muto MG. The value of re-exploration in patients with inadvertently morcellated uterine sarcoma. *Gynecol Oncol.* 2014;132:360-365.

[7] Parker WH, Fu YS, Berek JS. Uterine sarcoma in patients operated on for presumed leiomyoma and rapidly growing leiomyoma. *Obstet Gynecol.* 1994;83:414-418.

[8] Harris JA, Swenson CW, Uppal S, Kamdar N, Mahnert N, As-Sanie S, Morgan DM. Practice patterns and postoperative complications before and after US Food and Drug Administration safety communication on power morcellation. *Am J Obstet Gynecol.* 2016;214:e1-98.e13.

[9] Ducie JA, Leitao MM Jr. The role of adjuvant therapy in uterine leiomyosarcoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2016;16:45-55.

[10] Amant F, Lorusso D, Mustea A, Duffaud F, Pautier P. Management Strategies in Advanced Uterine Leiomyosarcoma: Focus on Trabectedin. *Sarcoma.* 2015;2015:1-14.

[11] Kapp D. S., Shin J. Y., Chan J. K. Prognostic factors and survival in 1396 patients with uterine leiomyosarcomas: emphasis on impact of lymphadenectomy and oophorectomy. *Cancer.* 2008;112:820–830.

[12] Zivanovic O, Leitao MM, Iasonos A, Jacks LM, Zhou Q, Abu-Rustum NR, Soslow RA, Juretzka MM, Chi DS, Barakat RR, Brennan MF, Hensley ML. Stage-specific outcomes of patients with uterine leiomyosarcoma: a comparison of the international Federation of gynecology and obstetrics and american joint committee on cancer staging systems. *J Clin Oncol.* 2009;27:2066-2072.

[13] Penning TM, Drury JE, Human aldo-keto reductases: Function, gene regulation, and single nucleotide polymorphisms, *Arch Biochem Biophys.* 2007;464:241-250.

[14] Mindnich RD, Penning TM, Aldo-keto reductase (AKR) superfamily: genomics and annotation, *Hum. Genomics.* 2009;3:362-370.

- [15] Wermuth B, Bohren KM, Heinemann G, von Wartburg JP, Gabbay KH. Human carbonyl reductase. Nucleotide sequence analysis of a cDNA and amino acid sequence of the encoded protein. *J Biol Chem.* 1988;263:16185-16188.
- [16] Ismail E, Al-Mulla F, Tsuchida S, Suto K, Motley P, Harrison PR, Birnie GD. Carbonyl reductase: a novel metastasis-modulating function. *Cancer Res.* 2000;60:1173-1176.
- [17] Murakami A1, Fukushima C, Yoshidomi K, Sueoka K, Nawata S, Yokoyama Y, Tsuchida S, Ismail E, Al-Mulla F, Sugino N. Suppression of carbonyl reductase expression enhances malignant behaviour in uterine cervical squamous cell carcinoma: carbonyl reductase predicts prognosis and lymph node metastasis. *Cancer Lett.* 2011;311:77-84.
- [18] Murakami A, Yakabe K, Yoshidomi K, Sueoka K, Nawata S, Yokoyama Y, Tsuchida S, Al-Mulla F, Sugino N. Decreased carbonyl reductase 1 expression promotes malignant behaviours by induction of epithelial mesenchymal transition and its clinical significance. *Cancer Lett.* 2012;323:69-76.
- [19] Osawa Y, Yokoyama Y, Shigeto T, Futagami M, Mizunuma H. Decreased expression of carbonyl reductase 1 promotes ovarian cancer growth and proliferation. *Int J Oncol.* 2015;46:1252-1258.
- [20] Umemoto M, Yokoyama Y, Sato S, Tsuchida S, Al-Mulla F, Saito Y. Carbonyl reductase as a significant predictor of survival and lymph node metastasis in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer.* 2001;85:1032-1036.
- [21] Nishimoto Y, Murakami A, Sato S, Kajimura T, Nakashima K, Yakabe K, Sueoka K, Sugino N. Decreased carbonyl reductase 1 expression promotes tumor growth via epithelial mesenchymal transition in uterine cervical squamous cell carcinomas. *Reprod Med Biol.* 2018;17:173-181.
- [22] Miura R, Yokoyama Y, Shigeto T, Futagami M, Mizunuma H. Inhibitory effect of carbonyl reductase 1 on ovarian cancer growth via tumor necrosis factor receptor signaling. *Int J Oncol.* 2015;47:2173-180.
- [23] Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009;139:871-890.
- [24] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15:178-196.
- [25] Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition

from adenoma to carcinoma. *Nature*. 1998; 392:190-193.

[26] Banyard J, Bielenberg DR. The role of EMT and MET in cancer dissemination. *Connect Tissue Res*. 2015;56:403-413.

[27] Kahlert UD, Joseph JV, Kruyt FAE. EMT- and MET-related processes in nonepithelial tumors: importance for disease progression, prognosis, and therapeutic opportunities. *Mol Oncol*. 2017;11:860-877.

[28] Song C, Liu W, Li J. USP17 is upregulated in osteosarcoma and promotes cell proliferation, metastasis, and epithelial-mesenchymal transition through stabilizing SMAD4. *Tumour Biol*. 2017;39:1-10

[29] Zeng SX, Cai QC, Guo CH, Zhi LQ, Dai X, Zhang DF, Ma W. High expression of TRIM29 (ATDC) contributes to poor prognosis and tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in osteosarcoma. *Oncol Rep*. 2017;38:1645-1654

[30] Sannino G, Marchetto A, Kirchner T, Grünewald TGP. Epithelial-to-Mesenchymal and Mesenchymal-to-Epithelial Transition in Mesenchymal Tumors: A Paradox in Sarcomas? *Cancer Res*. 2017;77:4556-4561

[31] Kong G, Jiang Y, Sun X, Cao Z, Zhang G, Zhao Z, Zhao Y, Yu Q, Cheng G. Irisin reverses the IL-6 induced epithelial-mesenchymal transition in osteosarcoma cell migration and invasion through the STAT3/Snail signaling pathway. *Oncol Rep*. 2017;38:2647-2656

[32] Peng C, Zhao H, Song Y, Chen W, Wang X, Liu X, Zhang C, Zhao J, Li J, Cheng G, Wu D, Gao C, Wang X. SHCBP1 promotes synovial sarcoma cell metastasis via targeting TGF- β 1/Smad signaling pathway and is associated with poor prognosis. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017;36:1-12

[33] Tang J, Shen L, Yang Q, Zhang C. Overexpression of metadherin mediates metastasis of osteosarcoma by regulating epithelial-mesenchymal transition. *Cell Prolif*. 2014 ;47:427-434

[34] Zavadil J, Böttinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*. 2005;24:5764-5774.

[35] Qi Y, Wang N, He Y, Zhang J, Zou H, Zhang W, Gu W, Huang Y, Lian X, Hu J, Zhao J, Cui X, Pang L, Li F. Transforming growth factor- β 1 signaling promotes epithelial-mesenchymal transition-like phenomena, cell motility, and cell invasion in synovial sarcoma cells. *PLoS One*. 2017;12:e0182680.

[36] Yoshidomi K, Murakami A, Yakabe K, Sueoka K, Nawata S, Sugino N. Heat shock protein 70 is

involved in malignant behaviors and chemosensitivities to cisplatin in cervical squamous cell carcinoma cells. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014;40:1188-1196.

[37] Murakami A, Nakagawa T, Kaneko M, Nawata S, Takeda O, Kato H, Sugino N. Suppression of SCC antigen promotes cancer cell invasion and migration through the decrease in E-cadherin expression. *Int J Oncol.* 2006;29:1231-1235.

[38] Nakagawa T, Murakami A, Torii M, Nawata S, Takeda O, Sugino N. E-cadherin increases squamous cell carcinoma antigen expression through phosphatidylinositol-3 kinase-Akt pathway in squamous cell carcinoma cell lines. *Oncol Rep.* 2007;18:175-179.

[39] Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 2009;19:156-172.

[40] Deckers M, van Dinther M, Buijs J, Que I, Löwik C, van der Pluijm G, ten Dijke P. The tumor suppressor Smad4 is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer Res.* 2006;66:2202-2209.

[41] Morizane R, Fujii S, Monkawa T, Hiratsuka K, Yamaguchi S, Homma K, Itoh H. miR-34c attenuates epithelial-mesenchymal transition and kidney fibrosis with ureteral obstruction. *Sci Rep.* 2014;4:4578.

[42] Valcourt U, Kowanz M, Niimi H, Heldin CH, Moustakas A. TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Mol Biol Cell.* 2005;16:1987-2002.

[43] Ghahhari NM, Babashah S. Interplay between microRNAs and WNT/ β -catenin signalling pathway regulates epithelial-mesenchymal transition in cancer. *Eur J Cancer.* 2015;51:1638-1649.

[44] Liu QQ, Chen K, Ye Q, Jiang XH, Sun YW. Oridonin inhibits pancreatic cancer cell migration and epithelial-mesenchymal transition by suppressing Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Cancer Cell Int.* 2016;16:57.

[45] Qi Y, Wang CC, He YL, Zou H, Liu CX, Pang LJ, Hu JM, Jiang JF, Zhang WJ, Li F. The correlation between morphology and the expression of TGF- β signaling pathway proteins and epithelial-mesenchymal transition-related proteins in synovial sarcomas. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6:2787-2799.

[46] Dwivedi SK, McMeekin SD, Slaughter K, Bhattacharya R. Role of TGF- β signaling in uterine

carcinosarcoma. *Oncotarget*. 2015;6:14646-14655.

[47] Horbelt D, Denkis A, Knaus P. A portrait of Transforming Growth Factor β superfamily signalling: Background matters. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44:469-474.

[48] Yang J, Eddy JA, Pan Y, Hategan A, Tabus I, Wang Y, Cogdell D, Price ND, Pollock RE, Lazar AJ, Hunt KK, Trent JC, Zhang W. Integrated proteomics and genomics analysis reveals a novel mesenchymal to epithelial reverting transition in leiomyosarcoma through regulation of slug. *Mol Cell Proteomics*. 2010;11:2405-2413

[49] Li Y, Shao G, Zhang M, Zhu F, Zhao B, He C, Zhang Z. miR-124 represses the mesenchymal features and suppresses metastasis in Ewing sarcoma. *Oncotarget*. 2017;8:10274-10286

[50] Zhang M, Wang D, Zhu T, Yin R. RASSF4 Overexpression Inhibits the Proliferation, Invasion, EMT, and Wnt Signaling Pathway in Osteosarcoma Cells. *Oncol Res*. 2017;25:83-91

[51] Zhang D, Jiang F, Wang X, Li G. Downregulation of Ubiquitin-Specific Protease 22 Inhibits Proliferation, Invasion, and Epithelial-Mesenchymal Transition in Osteosarcoma Cells. *Oncol Res*. 2017;25:743-751

[52] Guo X, Zhang J, Pang J, He S, Li G, Chong Y, Li C, Jiao Z, Zhang S, Shao M. MicroRNA-503 represses epithelial-mesenchymal transition and inhibits metastasis of osteosarcoma by targeting c-myb. *Tumour Biol*. 2016;37:9181-9187.

[53] Zhang D, Wang S, Chen J, Liu H, Lu J, Jiang H, Huang A, Chen Y. Fibulin-4 promotes osteosarcoma invasion and metastasis by inducing epithelial to mesenchymal transition via the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Int J Oncol*. 2017;50:1513-1530

[54] Somarelli JA, Shetler S, Jolly MK, Wang X, Bartholf Dewitt S, Hish AJ, Gilja S, Eward WC, Ware KE, Levine H, Armstrong AJ, Garcia-Blanco MA. Mesenchymal-Epithelial Transition in Sarcomas Is Controlled by the Combinatorial Expression of MicroRNA 200s and GRHL2. *Mol Cell Biol*. 2016;36:2503-2513

[55] Yang J, Du X, Wang G, Sun Y, Chen K, Zhu X, Lazar AJ, Hunt KK, Pollock RE, Zhang W. Mesenchymal to epithelial transition in sarcomas. *Eur J Cancer*. 2014;50:593-601.

[56] Yi EY, Park SY, Jung SY, Jang WJ, Kim Y. Mitochondrial dysfunction induces EMT through the TGF- β /Smad/Snail signaling pathway in Hep3B hepatocellular carcinoma cells. *Int J Oncol*.

2015;47:1845-1853.