

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09623

研究課題名(和文) 胞巣状軟部肉腫発症メカニズムの包括的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of the mechanisms underlying tumorigenesis of alveolar soft part sarcoma

研究代表者

石黒 尚子 (ISHIGURO, Naoko)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：50346350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ASPL-TFE3融合遺伝子は転写制御因子として機能し、下流遺伝子の発現異常を導くことで胞巣状軟部肉腫の発症ならびに進展に寄与することが知られている。本研究では、ASPL-TFE3が腫瘍発症に導く分子メカニズムを解明するため、ChIP-seq法による下流遺伝子の網羅的解析を行った。その結果、ASPL-TFE3の下流標的遺伝子候補として代謝関連因子、血管新生因子、シグナル伝達関連因子、増殖因子を同定した。さらに、これらの下流因子の一部は腫瘍細胞の増殖能、遊走能、浸潤能などを促進することを示す結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ASPL-TFE3融合遺伝子は胞巣状軟部肉腫の発症・進展において重要な役割を果たすことから、本融合遺伝子の機能解析は胞巣状軟部肉腫の分子病態を理解する上で重要な手がかりになると考えられる。また一般に、転写制御因子としてはたらく融合遺伝子は、下流の転写標的遺伝子群の発現異常を引き起こすことで腫瘍の発症に寄与しており、その標的遺伝子の同定は新たな分子標的治療法の開発に展開する分子基盤の確立につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：The ASPL-TFE3 fusion oncogene, functioning as an aberrant transcription factor, contributes to the development and progression of alveolar soft part sarcoma by inducing inappropriate upregulation of target genes. To elucidate the underlying molecular mechanisms of tumorigenesis, we comprehensively investigated the transcriptional target of ASPL-TFE3 using ChIP-seq analysis. We identified metabolic factors, angiogenesis factors, signal transduction factors, and growth factors as candidate downstream targets of ASPL-TFE3. Moreover, our results suggest that upregulation of these target genes resulted in promotion of proliferation, migration and invasion of tumor cells.

研究分野：腫瘍生物学、整形外科

キーワード：胞巣状軟部肉腫 ASPL-TFE3 融合遺伝子 腫瘍特異的転写制御

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

胞巣状軟部肉腫 (Alveolar soft part sarcoma: ASPS) は、発症頻度が肉腫全体の 0.5~1% 程度の非常に稀な軟部腫瘍である。その発育は非常にゆっくりしているが、早い段階から転移が発生することも多く、予後は不良である。治療は外科的切除術が中心で、放射線療法や化学療法に耐性を示すことから、新しい分子標的治療薬の開発が期待される。細胞遺伝学的には、特異的染色体転座  $der(17)t(X;17)(p11;q25)$  による ASPL-TFE3 融合遺伝子の形成が認められる。本融合遺伝子は、ASPS のほぼ全症例で検出されることから、鑑別診断にも応用されている。一方、その希少性から ASPS の病態については不明な点も多く、組織由来が不明なことに加えて分子生物学的知見も乏しい。

腫瘍特異的融合遺伝子は、リンパ腫や軟部肉腫を含む種々の悪性腫瘍で腫瘍発生への関与が指摘されており、その機能解析が発がんメカニズムの解明に有用であることが報告されている (Taylor et al., Nature Rev. Cancer, 2011)。ASPS 発症における ASPL-TFE3 融合遺伝子産物の分子生物学的役割の詳細は明らかになっていないが、転写因子である TFE3 の DNA 結合領域と転写活性化領域を有していることから、腫瘍特異的な転写制御因子としてはたらくと考えられている。実際、研究代表者は、ASPL-TFE3 が細胞周期抑制因子である p21 の発現を調節することで、腫瘍細胞の細胞周期に影響を与えることを見出した (Ishiguro et al., Neoplasia, 2016)。さらに他グループからは、ASPL-TFE3 が増殖因子や転移促進因子等の発現を亢進させることで腫瘍の進展に寄与することが報告されている (Tsuda et al., Cancer Res., 2007, Tanaka et al., Cancer Res., 2016)。また、ASPS 同様に ASPL-TFE3 融合遺伝子の存在が報告されている小児腎癌は、ASPS と非常に類似した組織像および腫瘍態度を取ることが指摘されており、本融合遺伝子と腫瘍病態との密接な関連が推察される。以上より、ASPL-TFE3 の機能解析は ASPS の分子病態を理解する上で大きな手がかりになると考えられる。

### 2. 研究の目的

一般に、転写制御因子としてはたらく融合遺伝子は、下流の標的遺伝子群の発現異常を引き起こすことで腫瘍の発症に寄与している。したがって、その下流標的遺伝子の同定は、融合遺伝子に関わる腫瘍発生メカニズムの解明に不可欠であるとともに、治療標的候補因子の探索という観点からも重要である。

本研究の目的は、ASPL-TFE3 の下流遺伝子群を網羅的に同定することで本融合遺伝子が腫瘍発生に導く分子メカニズムを包括的に明らかにするとともに、新たな分子標的治療法の開発に展開する分子基盤を確立することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) ASPL-TFE3 標的遺伝子の網羅的解析

ASPL-TFE3 標的遺伝子の網羅的解析法として、クロマチン沈降シーケンス (ChIP-seq) 解析を実施した。研究代表者が樹立した ASPL-TFE3 安定発現細胞株 293/TR-AT (FLAG タグ付) から断片化したクロマチンを抽出し、抗 FLAG タグ抗体を用いた免疫沈降で ASPL-TFE3 が結合する DNA 断片を回収した。そして、回収した DNA 断片を次世代シーケンサーで読み取りゲノム上にマッピングした。このデータについて、Gene Ontology エンリッチメント (GO) 解析ならびに KEGG データベースを活用したパスウェイ解析を行った。その後、上記の ChIP-seq 解析結果と、既存の DNA マイクロアレイ解析、抗体マイクロアレイ解析のデータを統合して、ASPL-TFE3 標的遺伝子が mRNA・タンパク質レベルで何倍変化し、さらに下流因子の発現をどの程度変化させるか検討した。

#### (2) ASPL-TFE3 標的遺伝子の生物学的影響の検討

下流標的遺伝子について、293/TR-AT 細胞を用いて ASPL-TFE3 存在時と非存在時でのタンパク質発現の変化をウエスタンブロット法で解析した。さらに、内因性 ASPL-TFE3 発現細胞株 FU-UR1 を用いて、標的遺伝子に対する合成 siRNA を導入し、細胞増殖能を MTT アッセイで、遊走能および浸潤能を Matrigel invasion アッセイで検討した。

#### (3) 分子標的治療候補の探索

抗腫瘍効果のある新規阻害剤を同定するため、FU-UR1 細胞に ASPL-TFE3 標的遺伝子やその関連因子に対する市販の阻害剤を添加した。そして、細胞増殖抑制効果と細胞障害の有無を MTT アッセイおよび細胞障害アッセイで検討した。

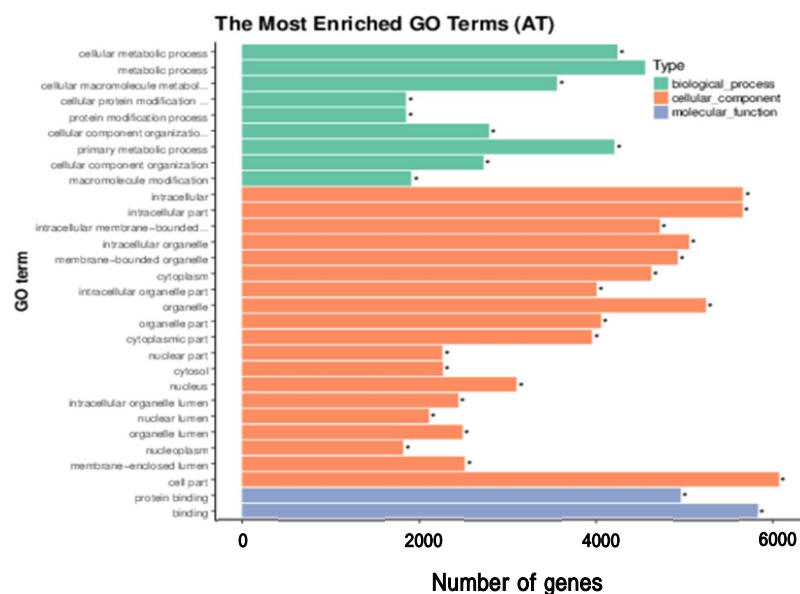
#### 4. 研究成果

##### (1) ChIP-seq による ASPL-TFE3 転写制御機構の包括的説明

293/TR-AT 細胞を用いて抗 FLAG 抗体による免疫沈降を行い、得られた DNA 断片を次世代シーケンサーで読み取ってヒトゲノム上にマッピングした。その結果、ASPL-TFE3 結合部位として 11719 個のピークを検出した。得られた ChIP-seq データについて GO 解析を行ったところ、GO の biological process では「metabolic process」や「cellular metabolic process」などが上位に位置していた(図 1)。また KEGG によるパスウェイ解析を行ったところ、「ribosome」、「pathway in cancer」、「Endocytosis」などが上位に位置していた。

次に、ChIP-seq 解析の結果と、過去に実施した DNA マイクロアレイ解析および抗体マイクロアレイ解析のデータを統合し、ASPL-TFE3 に関わる腫瘍特異的転写制御機構の全体像について検討を行った。その結果、ASPL-TFE3 は代謝関連因子に加え、増殖因子や血管新生因子、シグナル伝達関連因子など腫瘍の発症や進展を促進すると推察される多くの下流遺伝子群の発現を調節している可能性が示唆された。

図 1: ChIP-seq データの GO 解析結果



##### (2) ASPL-TFE3 標的遺伝子の生物学的影響

(1)で実施した網羅的解析結果ならびに関連文献をもとに、腫瘍細胞の動態への関与が予測される標的遺伝子の絞り込みを行い、幾つかの増殖因子、血管新生因子、シグナル伝達関連因子を抽出した。これらの標的遺伝子群に関して、まず 293/TR-AT 細胞を用いて ASPL-TFE3 発現誘導前後でタンパク質の発現レベルに変化が認められることを確認した。次に、上記解析で発現変化が認められた遺伝子について、さらに FU-UR1 細胞を用いた siRNA の導入実験を実施した。その結果、一部の増殖因子ならびにシグナル伝達関連因子のノックダウンにより、FU-UR1 細胞の増殖能、遊走能、浸潤能が抑制されることが明らかになった。

##### (3) 分子標的治療候補の探索

FU-UR1 細胞を用いて ASPL-TFE3 標的遺伝子ならびにその下流因子に対する種々の市販阻害剤を添加し、抗腫瘍効果の有無を検討した。その結果、PI3K/AKT シグナル関連因子、MAPK シグナル関連因子、増殖因子に対する阻害剤の一部が FU-UR1 細胞に対して増殖抑制効果を示すことが確認された。

以上より、ASPL-TFE3 は下流標的遺伝子を介して、代謝異常や細胞内シグナル伝達機構の異常を導いており、ASPS の発症・進展に関わる分子メカニズムの一つであると考えられた。今後は ASPL-TFE3 の機能解析をさらに進め、ASPS 病態への理解を深めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 長谷川匡、小田義直、阿江啓介、石黒尚子、石田剛 他	4. 発行年 2021年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 325
3. 書名 悪性軟部腫瘍 改訂・改題第2版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------