

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2017

課題番号：24790387

研究課題名(和文)ASPL-TFE3標的分子の同定による胞巣状軟部肉腫分子病態の解析

研究課題名(英文)The role of direct targets of ASPL-TFE3 in the pathology 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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、ASPL-TFE3キメラ遺伝子の標的遺伝子を同定し、その肉腫発生における生物学的役割を検討した。その結果、ASPL-TFE3標的遺伝子としてp21とシグナル伝達関連因子を同定した。ASPL-TFE3はp21を介して細胞老化ならびに細胞老化関連分泌現象(SASP)関連因子の発現を誘導した。また、シグナル伝達関連因子を介して、シグナル伝達系の異常と細胞運動性の亢進を惹起した。以上より、ASPL-TFE3は標的遺伝子を介して細胞老化やシグナル伝達系の異常を誘導し、肉腫の発生および病態に寄与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of target genes of ASPL-TFE3 chimeric oncogene in the tumorigenesis and pathogenesis of alveolar soft part sarcoma. We identified p21 and a signaling molecule as direct transcriptional targets of ASPL-TFE3. Our results showed that ASPL-TFE3 induced cellular senescence and the expression of pro-inflammatory cytokines associated with the SASP by upregulating p21 expression. Furthermore, we found that ASPL-TFE3 lead to the inappropriate activation of signal transduction pathway and the promotion of cell motility by upregulating signaling molecule. These results suggest that ASPL-TFE3 contribute to pathogenesis and progression of alveolar soft part sarcoma by inducing aberrant expression of transcriptional targets implicated in cellular senescence and signal transduction mechanisms.

研究分野：実験病理学

キーワード：軟部腫瘍 病態解析 融合遺伝子

### 1. 研究開始当初の背景

胞巣状軟部肉腫は、発症頻度が肉腫全体の0.5~1.0%程度と非常にまれで、予後不良の軟部肉腫である。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 キメラ遺伝子の形成が認められる。本キメラ遺伝子は、胞巣状軟部肉腫のほぼ全例で検出されることから、鑑別診断にも応用されている。胞巣状軟部肉腫の病態については、これまでに多くの免疫組織化学的、電顕的解析に関する報告があるが、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。

腫瘍特異的なキメラ遺伝子は、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いる。実際、一部の軟部肉腫では、キメラ遺伝子が組織由来に関係なく腫瘍の phenotype を決定することが報告されている (Cancer Res 65, 4633-4644, 2005)。一方、胞巣状軟部肉腫の発症メカニズムにおける ASPL-TFE3 の分子生物学的役割については未だ不明な点が多い。しかしながら、胞巣状軟部肉腫と同様に ASPL-TFE3 キメラ遺伝子の存在が報告されている小児腎癌では、胞巣状軟部肉腫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いる。ゆえに、本キメラ遺伝子の解析は、肉腫の発生および病態を理解する上で有用な手段であると考えられる。

ASPL-TFE3 キメラ遺伝子産物は DNA 結合領域を有しており、転写因子として働くことが予想されている。しかし、その生物学的機能に関する知見は少なく、数編の報告があるのみである。そこで研究代表者は、*in vitro* における ASPL-TFE3 の分子生物学的解析を行ってきた。その結果、ASPL-TFE3 は核に局在し、転写因子として標的遺伝子の発現に影響を及ぼすことが示唆された。さらに、国外の他グループより ASPL-TFE3 が MET プロモーターに直接結合し、MET の発現を上昇させ、腫瘍細胞の増殖を促進することが報告され (Cancer Res 67, 919-29, 2007)、ASPL-TFE3 の標的遺伝子が腫瘍の発生・進展に関与することが示された。

以上より、ASPL-TFE3 の標的遺伝子は腫瘍の分子病態や発生において重要な役割を果たすと考えられた。そこで研究代表者は、DNA マイクロアレイによる標的遺伝子候補の検索を行った。その結果、MAPK シグナル系、AKT/mTOR シグナル系、JAK/STAT シグナル系に関わる複数のシグナル伝達関連因子、細胞周期関連因子、サイトカイン関連因子などの多くの標的遺伝子候補を検出した。しかしながら、DNA マイクロアレイ解析はキメラ遺伝子の下流に位置する全ての遺伝子の発現変化を反映するため、ASPL-TFE3 が直接作用する標的遺伝子を同定できない。さらに、mRNA レベルの情報だけでは機能的な解釈には不十分であり、実際の機能単位であるタンパク質レベルでの解析が不可欠である。ゆえに、本

研究課題では ASPL-TFE3 の直接の標的遺伝子を同定し、その生物学的影響を実際の機能単位であるタンパク質レベルで検討することとした。

### 2. 研究の目的

本研究課題では ASPL-TFE3 の標的遺伝子の同定と、そのタンパク質レベルでの機能活性および生物学的意義を解析することで、ASPL-TFE3 による腫瘍発生メカニズムの分子機序を解明することを目的とした。

具体的には、以下を明らかにすることを目指した。

(1) ASPL-TFE3 が直接作用する標的遺伝子を同定する。

(2) ASPL-TFE3 が標的遺伝子の関連因子ならびに下流シグナル活性に及ぼす影響を明らかにする。

(3) 腫瘍細胞における ASPL-TFE3 標的遺伝子の分子生物学的影響を明らかにし、悪性度や転移との相関を考察する。

### 3. 研究の方法

まず DNA マイクロアレイ解析で同定した標的遺伝子候補をもとに、ASPL-TFE3 が直接作用する標的遺伝子を同定した。また、ASPL-TFE3 が標的遺伝子の下流シグナル活性や関連因子の発現に及ぼす影響を検討した。そして、内因性 ASPL-TFE3 発現細胞株を用いた *in vitro* 解析で標的遺伝子の生物学的影響を検討し、腫瘍の悪性度や転移との相関を考察した。

#### (1) ASPL-TFE3 の標的遺伝子の同定

ASPL-TFE3 と相互作用するプロモーター領域を有する遺伝子を同定するため、クロマチン免疫沈降アッセイを行った。テロラサイクリン誘導 ASPL-TFE3 安定発現細胞株 293/TR-AT を用いて、抗 FLAG タグ抗体で免疫沈降を行い、DNA マイクロアレイ解析で同定した候補遺伝子のプロモーター領域に対するプライマーで DNA を増幅し、検出した。

同定した標的遺伝子については、さらにプロモーター領域を含むルシフェラーゼレポータープラスミドを作製または入手し、ASPL-TFE3 発現プラスミド (作製済み) と共に HeLa または 293 細胞株へ導入し、ルシフェラーゼアッセイにより転写活性化の有無を検討した。

#### (2) 標的遺伝子の関連因子発現および下流シグナル活性に及ぼす影響の解析

ASPL-TFE3 の一過性過剰発現細胞ならびにテロラサイクリン誘導 ASPL-TFE3 安定発現細胞株である 293/TR-AT 細胞、UE7T/TR-AT 細胞を用い、ASPL-TFE3 存在時と非存在時での標的遺伝子のタンパク質発現量をウエスタンブロット法で、mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で解析した。さらに、標的遺伝子の下流シグナルの活性や関連因子の発現量の変化を抗体アレイおよびウエスタンブロット

法で検討した。

### (3) 標的遺伝子の生物学的影響の解析

293/TR-AT 細胞および UE7T/TR-AT 細胞を用い、ASPL-TFE3 発現誘導前後における細胞老化誘導の有無を senescence associated- $\beta$ -Galactosidase (SA- $\beta$ -gal) 染色で解析した。さらに、ASPL-TFE3 発現誘導前後における老化関連分泌現象 (SASP) 関連遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法で解析した。

内因性 ASPL-TFE3 発現細胞株 FU-UR1 (福岡大学 石黒晶子博士より供与) に、標的遺伝子に対する合成 siRNA またはコントロール siRNA を導入した。そして、72 時間後に細胞増殖能を Cell counting kit-8 (Dojindo) で、細胞遊走能をトランスウェルアッセイで、細胞浸潤能を BioCoat Matrigel Invasion Chamber (Corning) を用いた細胞浸潤アッセイで検討した。

## 4. 研究成果

### (1) ASPL-TFE3 の標的遺伝子の同定

DNA マイクロアレイ解析により同定した標的遺伝子候補のうち、クロマチン免疫沈降法で ASPL-TFE3 が直接プロモーター領域に結合する遺伝子として 4 遺伝子を同定した。さらにこの 4 遺伝子についてルシフェラーゼアッセイならびにウエスタンブロット解析を行い、ASPL-TFE3 により、転写が活性化され、タンパク質発現量の顕著な増加が認められた遺伝子として、①細胞周期関連因子 p21、②シグナル伝達関連因子を同定し、この 2 遺伝子を ASPL-TFE3 の標的遺伝子であると判断した。

### (2) 標的遺伝子の関連因子発現および下流シグナル活性に及ぼす影響の解析

#### ① p21 に関する解析

293/TR-AT 細胞株および UE7T/TR-AT 細胞株では、ASPL-TFE3 発現誘導前後で p53、p16、p27 などの細胞周期関連因子の発現に変化は認められなかったが、p21 発現レベルの上昇と Rb のリン酸化レベルの低下が認められた。

#### ② シグナル伝達関連因子に関する解析

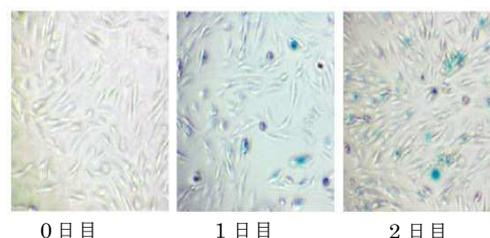
293/TR-AT 細胞株では ASPL-TFE3 発現誘導により、MAPK シグナル伝達系ならびに PI3K/AKT シグナル伝達系に含まれる複数のシグナル伝達因子のリン酸化レベルが上昇しており、これらシグナル伝達経路の活性化が誘導されることが示唆された。

### (3) 標的遺伝子の生物学的影響の解析

#### ① p21 に関する解析

UE7T/TR-AT 細胞にテトラサイクリンを加えて ASPL-TFE3 発現を誘導し、SA- $\beta$ -gal 陽性細胞率の変化を解析したところ、培養 0 日目には 2% であった陽性率が、1 日目には 20%、2 日目には 32% と顕著に増加した (図 1)。

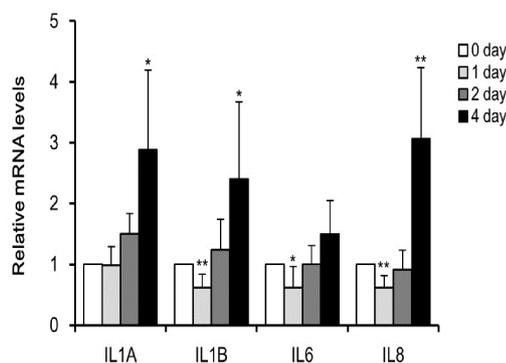
(図 1)



一方、UE7T/TR-AT 細胞に p21 siRNA を導入すると ASPL-TFE3 発現誘導時の SA- $\beta$ -gal 陽性細胞率の増加は抑制された。

また、UE7T/TR-AT 細胞にテトラサイクリンを加えて培養後、代表的な SASP 関連サイトカインである IL1A、IL1B、IL6、IL8 の発現量をリアルタイム PCR 法で解析したところ、培養 4 日目では 0 日目と比べ IL1A、IL1B および IL8 の発現量が有意に増加した (図 2)。

(図 2)



### ② シグナル伝達関連因子に関する研究

FU-UR1 細胞株にシグナル伝達関連因子の siRNA を導入すると、AKT のリン酸化レベルが低下した。また、PI3K/AKT 系に含まれる複数のシグナル伝達関連因子のリン酸化レベルが低下した。

FU-UR1 細胞にシグナル伝達関連因子の siRNA 導入前後における細胞増殖能、細胞遊走能、細胞浸潤能をそれぞれ解析したところ、シグナル伝達関連因子の発現抑制により、細胞増殖能に変化は認められなかったが、細胞遊走能および浸潤能は低下した。

本研究の結果により、以下が示された。

1) ASPL-TFE3 の新規標的遺伝子として細胞周期関連因子 p21 とシグナル伝達関連因子を同定した。2) ASPL-TFE3 は p21 発現上昇を介して、細胞老化を誘導した。また、ASPL-TFE3 により細胞老化が誘導された細胞では、腫瘍形成の促進や増殖促進などの効果をもつ SASP 関連サイトカインの発現が上昇していた。3) ASPL-TFE3 はシグナル伝達関連因子を介して、PI3K/AKT 系の活性化を促進していた。また、シグナル伝達関連因子の発現を抑制すると、細胞遊走能・浸潤能が低下するなど、

細胞運動性が抑えられた。

以上より、ASPL-TFE3 は標的遺伝子を介して細胞老化および SASP 関連因子の発現、細胞内シグナル伝達機構の異常ならびに細胞運動性の亢進を導いており、腫瘍の発症・進展に関わる分子メカニズムの一つであると考えられる。今後、ASPL-TFE3 による腫瘍発症・進展のメカニズム解明を進め、ASPL-TFE3 関連腫瘍の新しい治療標的分子やバイオマーカーの開発につなげていきたい。

#### 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 3 件)

1. Yamaga K, Fujita A, Osaki M, Kuwamoto S, Ishiguro N, Yamamoto T, Nagashima H. Detailed analysis of a superficial CD34-positive fibroblastic tumor: A case report and review of the literature. *Oncol Lett*, 3, 3395-3400, 2017. DOI: 10.3892/ol.2017.6636、査読あり

2. Ishiguro N, Yoshida H. ASPL-TFE3 oncoprotein regulates cell cycle progression and induces cellular senescence by upregulating p21. *Neoplasia*, 18, 626-635, 2016. DOI: 10.1016/j.neo.2016.08.001、査読あり

3. Kaneda T, Matsushita M, Iwasaki T, Ishiguro N, Koide T, Hayashi K, Kitamura Y. Multiple Skin Cancers in a Renal Transplant Recipient: A Patient Report with Analyses of Human Papillomavirus and Human Polyomavirus Infection. *Yonago Acta Med*, 58, 145-50, 2015. 査読あり

[学会発表] (計 0 件)

[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

#### 6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

吉田 春彦 (YOSHIDA, Haruhiko)