

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790352

研究課題名（和文） 胞巣状軟部肉腫の病態における腫瘍特異的キメラ遺伝子の役割

研究課題名（英文） Role of the specific chimeric oncogene in the pathology of alveolar soft part sarcoma

研究代表者

石黒 尚子（ISHIGURO NAKO）

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：50346350

研究成果の概要（和文）：

胞巣状軟部肉腫では特異的キメラ遺伝子 ASPL-TFE3 が存在しており、腫瘍発生および病態への関与が指摘されている。本研究課題では、腫瘍特異的転写因子として機能する ASPL-TFE3 の標的遺伝子群を DNA マイクロアレイ解析により検索した。その結果、ASPL-TFE3 標的遺伝子候補群として ASPL-TFE3 により発現が 2 倍以上増加する遺伝子 736 個、1/2 以下に減少する遺伝子 169 個を単離した。ASPL-TFE3 標的遺伝子候補群には代謝関連遺伝子、細胞増殖関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子、細胞内シグナル伝達関連遺伝子などが含まれていた。以上より、ASPL-TFE3 は細胞増殖関連遺伝子、シグナル伝達関連因子といった標的遺伝子の発現異常を引き起こすことにより胞巣状軟部肉腫の発生および病態に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Alveolar soft part sarcoma contains specific chimeric oncogene ASPL-TFE3, which has been thought to play a crucial role in the onset and progression of alveolar soft part sarcoma. In this study, the candidate genes whose expression is regulated by ASPL-TFE3 were investigated by using DNA microarray analysis. In response to ASPL-TFE3 expression, we found that 739 genes were up-regulated at least 2-fold higher than in untreated cells, and 169 genes were down-regulated at least 0.5-fold lower than in untreated cells. Transcriptional targets of ASPL-TFE3 include metabolic genes, cell proliferation genes, apoptotic genes and signal transduction genes. These results suggest that ASPL-TFE3 contribute to oncogenesis and pathology of alveolar soft part sarcoma by inducing the aberrant expression of transcriptional target genes implicated in cell proliferation and signal transduction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：軟部腫瘍、胞巣状軟部肉腫、キメラ遺伝子、ASPL-TFE3

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%程度と稀で、予後不良の軟部肉腫である。細胞遺伝学的には、ほぼ全症例で特異的染色体転座

der(17)t(X;17)(p11;q25)を有しており、その結果、ASPL-TFE3 キメラ遺伝子が形成される。本キメラ遺伝子は、胞巣状軟部肉腫症例の90%以上で検出されることから鑑別診断へも応用されている。胞巣状軟部肉腫の病態については未だ不明な点が多く、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非常に乏しい。

腫瘍特異的キメラ遺伝子は、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、腫瘍特異的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 65:4633-44, 2005)。一方、胞巣状軟部肉腫の発症機構における ASPL-TFE3 の分子生物学的影響はほとんど解明されていない。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おり、本キメラ遺伝子が胞巣状軟部肉腫の病態に深く関わっていることが推察される。

研究代表者はこれまで胞巣状軟部肉腫の病態における ASPL-TFE3 キメラ遺伝子の役割に注目し、解析を実施してきた。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を明らかにした。さらに最近、国外の他グループから、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との報告があり (Cancer Res 67:919-29, 2007)、ASPL-TFE3 の標的遺伝子が胞巣状軟部肉腫の発生に重要であることが示唆された。

腫瘍特異的転写制御機構は、腫瘍発生および病態と密接に関連すると考えられている。故に、ASPL-TFE3 の標的遺伝子群が胞巣状軟部肉腫の生物学的態度および組織形態に与

える影響は大きいと予想されたことから本研究課題を計画した。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、ASPL-TFE3 キメラ遺伝子の標的遺伝子を同定し、本キメラ遺伝子が肉腫の発生ならびに生物学的態度に与える影響を明らかにすることである。

具体的には、以下を明らかにすることを目指した。

(1) ASPL-TFE3 発現により増加または減少の認められる遺伝子を網羅的に単離し、標的遺伝子候補群を同定する。

(2) 同定した標的遺伝子群を細胞増殖関連因子、細胞骨格因子、シグナル伝達因子などに分類し、ASPL-TFE3 が胞巣状軟部肉腫の生物学的態度ならびに組織形態に与える影響を考察する。

(3) 胞巣状軟部肉腫の臨床症例における ASPL-TFE3 標的遺伝子群の発現を確認する。

3. 研究の方法

全長 ASPL-TFE3 cDNA を培養細胞株に導入し、ASPL-TFE3 の導入前後で発現に増加または減少のみられる遺伝子群を、DNA マイクロアレイで網羅的に同定した。その後、同定された標的遺伝子群候補を、細胞増殖関連因子、細胞骨格因子、シグナル伝達因子などに分類し、マイクロアレイの結果を考察した。さらに、マイクロアレイで得られた発現情報を実証するため、リアルタイム PCR による mRNA 発現量の解析ならびに臨床症例における蛋白質発現解析を行った。

具体的には以下の方法で研究を進めた。

(1) ASPL-TFE3 cDNA 発現プラスミドの作製
研究室に保存されている全長 ASPL-TFE3 cDNA (type 1) を、テトラサイクリン発現誘導系ベクター pcDNA4-T0 (Invitrogen 社) に組み込み、pcDNA4/ASPL-TFE3 プラスミドを作製した。

(2) ASPL-TFE3 安定的発現細胞株の樹立
胎児腎細胞株 293 ならびに間葉系幹細胞株 UE7T-13 に対し、pcDNA6-TR プラスミド (Invitrogen 社) ならびに pcDNA4/ASPL-TFE3 プラスミドを FuGENE HD 試薬 (Roche 社) を用い、メーカー推奨の使用法にしたがってトランスフェクトした。その後、培養用培地内に blasticidin S ならびに zeocin を加え、

選択培養を行った。1ヶ月～1ヶ月半程度の選択培養後、シングルコロニーを単離した。

その後、単離したコロニーに対してテトラサイクリン添加前後のASPL-TFE3発現をウエスタンブロット法で解析し、テトラサイクリン添加時のみASPL-TFE3発現が誘導されたコロニーをASPL-TFE3安定発現細胞株とした。作製したASPL-TFE3安定発現細胞株はそれぞれ293/TR-ATならびにUE7T/TR-ATと名付けた。

(3) DNAマイクロアレイ解析

①プローブの標識

293/TR-AT細胞ならびにUE7T/TR-AT細胞についてテトラサイクリン添加0時間後および24時間後の細胞からQiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen社)を用いてtotal RNAを抽出した。抽出したRNAはその後、Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent社)を用いてプローブ標識を行なった。

②スキャニング

標識したプローブを4×44Kフォーマットヒトマイクロアレイ (Agilent社)にハイブリダイズさせ、スキャナコントロールソフトウェア (Agilent社)を用いてアレイデータのスキャニングを行った。

③データの正規化およびpathway解析

DNAマイクロアレイシグナルの正規化および検定および検定はGeneSpring GX解析ソフトウェア (Agilent社)を用いて行った。Pathway解析にはインターネット上の解析ソフトウェア (KEGG: <http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>)を用いた。

(4) Real-time PCR

Real-time PCR解析はUniversal Probe Libraryシステム (Roche社)を用い、ABI 7900HT (Applied biosystems社)により行った。検出時のPCRプログラムは、95°Cで20秒の反応後、95°Cで1秒、60°Cで20秒を45サイクル行った。内因性コントロールとしてβ-actinを使用した。

(5) 免疫組織化学染色

胞巣状軟部肉腫症例のパラフィン包埋切片を対象に、ASPL-TFE3標的遺伝子候補の発現をヒストファイン シンプルステイン MAX-PO キット (Nichirei社)を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) ASPL-TFE3発現誘導細胞株の樹立に成功した。

293細胞ならびにUE7T細胞におけるASPL-TFE3発現誘導細胞株クローンの単離に

成功した。これらクローンはテトラサイクリン添加によりASPL-TFE3発現の誘導が可能であることがウエスタンブロット法で証明された。今回樹立に成功したASPL-TFE3安定発現細胞株は本研究課題のみならず細胞増殖能の解析、細胞遊走能の解析など幅広い分子生物学的解析への応用が期待され、非常に有用な研究資源である。

(2) DNAマイクロアレイによりASPL-TFE3標的遺伝子候補群を同定した。

293/TR-AT細胞株ならびにUE7T/TR-AT細胞株において、ASPL-TFE3の発現誘導により両細胞株に共通して発現が2倍以上に増加する遺伝子736個、1/2以下に減少する遺伝子169個を同定し、ASPL-TFE3の標的遺伝子候補群と判断した。

これらASPL-TFE3標的遺伝子候補群についてpathway解析を行い、その機能を考察した。その結果、ASPL-TFE3標的遺伝子候補群には代謝関連遺伝子、細胞増殖関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子、サイトカイン受容体、細胞内シグナル伝達関連遺伝子、転写因子などが含まれることが明らかとなった。

(3) リアルタイムPCRならびにウエスタンブロット解析によりDNAマイクロアレイ解析の確認を行った。

DNAマイクロアレイ解析により同定されたASPL-TFE3標的遺伝子候補より腫瘍発生に特に重要であると考えられる細胞増殖関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子、シグナル伝達関連遺伝子、転写因子を選別し、リアルタイムPCR法による発現解析を行ったところ、細胞周期調節因子、シグナル伝達関連遺伝子 (MAPK経路、JAK-STAT経路、AKT/mTOR経路)の幾つかで発現変化が認められることが確認された。

また、ウエスタンブロット法によりASPL-TFE3発現細胞では、MAPK経路ならびにAKT/mTOR経路の活性化が明らかとなった。

(4) 胞巣状軟部肉腫症例におけるASPL-TFE3標的遺伝子候補の高発現を確認した。

胞巣状軟部肉腫症例における免疫組織化学的解析の結果、ASPL-TFE3の標的候補因子の1つである細胞周期調節因子Xの過剰発現を確認した。

以上の研究成果より、ASPL-TFE3の標的遺伝子候補を網羅的に同定することに成功した。これら標的遺伝子群には胞巣状軟部肉腫の腫瘍発生に寄与する遺伝子が多く含まれていると予想され、胞巣状軟部肉腫の病態解明に果たす役割は大きい。さらに、ASPL-TFE3標的遺伝子には胞巣状軟部肉腫の治療に有

用な標的因子が含まれていると考えられる。したがって、本研究の成果は、胞巣状軟部肉腫の治療への応用という点においても有益である。また、胞巣状軟部肉腫症例における標的遺伝子の過剰発現が確認され、胞巣状軟部肉腫の病態とキメラ遺伝子の密接な関連が示された。

今後、本研究で同定された標的遺伝子候補群の生物学的意義を解析することにより、胞巣状軟部肉腫の腫瘍発生機構ならびに生物学的特徴の解明が期待される。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計6件)

① 石黒尚子、吉田春彦

胞巣状軟部肉腫における細胞周期関連因子発現の検討
第44回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会、2011年7月14日、国立京都国際会館

② 石黒尚子、北村幸郷、吉田春彦

胞巣状軟部肉腫特異的キメラ遺伝子の細胞増殖への影響
第100回日本病理学会総会、2011年4月30日、パシフィコ横浜

③ 石黒尚子、吉田春彦

胞巣状軟部肉腫におけるASPL-TFE3の細胞増殖への影響
第43回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会、2010年7月16日、京王プラザホテル

④ 石黒尚子、北村幸郷、吉田春彦

胞巣状軟部肉腫における細胞周期関連因子発現の解析
第99回日本病理学会総会、2010年4月27日、京王プラザホテル

⑤ 石黒尚子、北村幸郷、吉田春彦

ASPL-TFE3キメラ遺伝子の分子機能の検討
第42回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会、2009年7月16日、パシフィコ横浜

⑥ 石黒尚子、北村幸郷、吉田春彦

ASPL-TFE3キメラ遺伝子の分子機能の検討
第98回日本病理学会総会、2009年5月3日、国立京都国際会館

[図書] (計1件)

① 石黒尚子、他、文光堂、腫瘍病理鑑別診断

アトラス 軟部腫瘍、2011年、267
(132-137)

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