

平成21年 5月 7日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18790245

研究課題名 (和文) 胞巣状軟部肉腫病態の検討：ASPL-TFE3 キメラ遺伝子の役割

研究課題名 (英文) Role of the fusion gene, 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

研究成果の概要：胞巣状軟部肉腫で特異的に認められるキメラ遺伝子 ASPL-TFE3 が転写因子であることを証明し、肉腫特異的遺伝子発現制御への関与を示した。また、胞巣状軟部肉腫症例における ASPL-TFE3 転写標的遺伝子の高発現を確認し、胞巣状軟部肉腫の分子生物学的態度にキメラ遺伝子が深く関わることを示唆した。本研究より、胞巣状軟部肉腫の病態における ASPL-TFE3 の重要性が明示され、今後の更なるキメラ遺伝子機能解析の必要性が推察された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	800,000	0	800,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	300,000	3,400,000

研究分野：分子病理学

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、キメラ遺伝子、病態解析

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、この染色体転座の結果、キメラ遺伝子 ASPL-TFE3 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。

これまで胞巣状軟部肉腫に関する多くの

免疫組織化学的、電顕的解析が行われてきたが、組織由来が不明なことに加え、分子生物学的所見も乏しいなど、未だその病態は不明な点が多い。一方、一部の軟部肉腫では腫瘍特異的キメラ遺伝子が腫瘍の発生および phenotype と密接に関連することが報告されており、胞巣状軟部肉腫においても、キメラ遺伝子の機能解析はその病態を理解する有効な手段であると予測された。実際、胞巣状軟部肉腫と同様、ASPL-TFE3 キメラ遺伝子の存在が報告されている小児の renal

adenocarcinoma では、胞巣状軟部肉腫と類似した組織形態および生物学的態度を示し、本キメラ遺伝子と腫瘍病態との関連性が推察された。

また、ASPL-TFE3 キメラ遺伝子は診断における有用性が証明されていたものの、その分子機能に関する報告は少なく、肉腫における役割も不明であった。しかしながら、胞巣状軟部肉腫症例で TFE3 の核における強発現が証明されており、ASPL-TFE3 は転写因子として腫瘍特異的転写因子制御に寄与すると考えられた。そこで、ASPL-TFE3 キメラ遺伝子産物の生物学的機能に注目し、胞巣状軟部肉腫の病態を解析することを計画した。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、胞巣状軟部肉腫特異的キメラ遺伝子 ASPL-TFE3 の分子機能を解析し、本キメラ遺伝子が肉腫の組織形態および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) 培養細胞におけるキメラ遺伝子産物の局在を明らかにする。
- (2) ASPL-TFE3 導入による細胞の形態変化を明らかにする。
- (3) ASPL-TFE3 の存在により肉腫が獲得する分子学的特徴を明らかにする。

以上の解析から胞巣状軟部肉腫の生物学的態度および分子学的特徴を考察し、その病態に対する知見を深めることが研究全体の構想である。

3. 研究の方法

胞巣状軟部肉腫症例より RT-PCR 法にて全長 ASPL-TFE3 キメラ遺伝子 cDNA をクローニングした。クローニングした ASPL-TFE3 は、培養細胞株にトランスフェクトし、様々な分子生物学的、生化学的解析を行い、分子機能を検討した。具体的には、以下の手順で研究

を進めた。

(1) 胞巣状軟部肉腫症例から RT-PCR 法で全長 ASPL-TFE3 キメラ遺伝子のクローニングを試みた。

①胞巣状軟部肉腫症例のパラフィン包埋材料および凍結材料を収集し、RT-PCR 法で ASPL-TFE3 キメラ遺伝子発現の有無を検討した。

②キメラ遺伝子の存在が確認された胞巣状軟部肉腫症例の凍結材料より RNA を抽出し、サーマルサイクラーを用いて RT-PCR 法で ASPL-TFE3 cDNA を増幅した。また、この際使用した PCR 用プライマーにはタグ蛋白質である Flag に相当する配列 (DYKDDDDK) を挿入し、ASPL-TFE3 の検出が容易となるよう工夫した。

得られた cDNA 断片は、ABI ジェネティックアナライザを用いてシーケンス解析を行い、遺伝子配列を確認した。

(2) ASPL-TFE3 cDNA を哺乳類発現ベクターに挿入し、培養細胞株に FUGENE HD 試薬 (ロッシュ) を用いてトランスフェクトした。その後、ASPL-TFE3 をトランスフェクト細胞に対し、抗 Flag 抗体 (シグマ) によるウエスタンブロット解析を行い、ASPL-TFE3 の発現量を確認した。

(3) 全長 ASPL-TFE3 を GFP (Green Fluorescence Protein) 融合蛋白質発現ベクター pEGFP (クロンテック) に挿入した。そして、ヒト培養細胞株 HeLa にトランスフェクトし、共焦点レーザー顕微鏡 (ライカ、TCS SP2) で細胞内局在を検討した。

(4) ASPL-TFE3 の転写活性をルシフェラーゼアッセイで解析した。

① TFE3 標的配列である IRS2 プロモーター領域をヒトゲノミック DNA (BioChain) より PCR 法でクローニングした。そして、ホタルルシフェラーゼ発現ベクター pGV-B2 (東洋ビーネット) に組み込み、レポーターコンストラクトを作製した。

② HT1080 細胞株を用い、ASPL-TFE3 導入時と非導入時のレポーターコンストラクトの転写活性をルシフェラーゼアッセイで解析した。また、活性値は β -Galactosidase アッセイにより補正した。

(5) ASPL-TFE3 導入及び非導入 HT1080 培養細胞株から、蛋白質を抽出した。そして、TFE3 標的因子群および細胞周期関連因子を中心にウエスタンブロット法で発現量の変化を検討した。

(6) 免疫組織化学染色およびウエスタンブロット法で、胞巣状軟部肉腫臨床症例における ASPL-TFE3 標的遺伝子群の発現を解析した。そして、ASPL-TFE3 キメラ遺伝子の存在により胞巣状軟部肉腫が獲得する分子学的特徴を検討した。

4. 研究成果

(1) ASPL-TFE3 キメラ遺伝子を発現する胞巣状軟部肉腫症例を得た。

当施設及び研究協力施設より胞巣状軟部肉腫症例のパラフィン包埋材料および凍結材料を 2 例収集した。この 2 症例について RT-PCR 法によるキメラ遺伝子発現の検討を行い、ASPL-TFE3 キメラ遺伝子 (type1) を発現する胞巣状軟部肉腫症例 1 例を得た。

(2) 全長 ASPL-TFE3 キメラ遺伝子 cDNA のクローニングに成功した。

①RT-PCR 法により ASPL-TFE3 cDNA 断片を得た。

ASPL-TFE3 の存在が認められた胞巣状軟部肉腫症例の凍結材料より RNA を抽出し、RT-PCR 法で ASPL-TFE3 cDNA 断片を増幅した。

②シーケンス解析により単離した cDNA 断片が ASPL-TFE3 であることを確認した。

Gene Bank データベース上の ASPL (AF324220) および TFE3 (NM_006521) 配

列を参考にして全長 ASPL-TFE3 配列を推定した。①で得られた cDNA 断片のシーケンス解析を行った結果、変異のない cDNA 断片が得られており、全長 ASPL-TFE3 のクローニングに成功した。

(3) ASPL-TFE3 キメラ遺伝子産物の核への局在を証明した。

GFP と ASPL-TFE3 の融合蛋白質の局在を検討した結果、ASPL-TFE3 が培養細胞株の核に特異的に局在することが証明された。

ASPL-TFE3 では、転写因子 TFE3 の DNA 結合ドメインが保持されていることから、核に局在したキメラ遺伝子産物は転写因子として機能すると推測された。

(4) ASPL-TFE3 キメラ遺伝子産物が転写活性を有することを明らかにした。

ASPL-TFE3 の転写活性をルシフェラーゼアッセイにより解析した結果、ASPL-TFE3 存在下では IRS2 プロモーターの転写活性が ~10 倍程度上昇した。(図 1) このことから、ASPL-TFE3 は転写因子として転写活性化を有することが証明された。

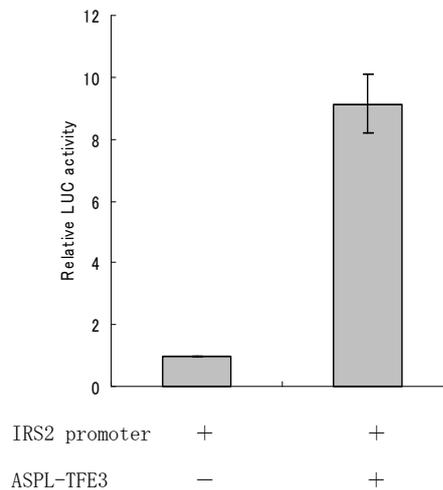


図 1、ASPL-TFE3 を介した IRS2 プロモーター活性化

5) ASPL-TFE3 転写標的因子を同定した。

ASPL-TFE3導入および非導入培養細胞において、これまで報告されているTFE3転写標的因子群および細胞周期関連因子を中心に、発現量の変化する因子を探索した。その結果、ASPL-TFE3導入によりcyclinE発現量が増加することが判明し、転写標的因子であると推測された。一方、同時に解析を行ったp21、p53、p27などの発現量に変化は認められなかった。

(6) 胞巣状軟部肉腫症例における

ASPL-TFE3標的因子の高発現を確認した。

胞巣状軟部肉腫症例において、ASPL-TFE3標的因子であるcyclinEが高発現することを確認した。これより、ASPL-TFE3標的因子が実際の胞巣状軟部肉腫症例で高発現することを証明した。

以上の成果より、ASPL-TFE3キメラ遺伝子は当初の予想通り、転写因子として胞巣状軟部肉腫特異的転写制御に関与することが示唆された。腫瘍特異的転写制御機構は腫瘍の発生および病態に重要であることから、本研究の意義は大きいと予想される。また、胞巣状軟部肉腫の患者症例におけるASPL-TFE3標的因子の高発現が確認され、胞巣状軟部肉腫の生物学的態度および病態とキメラ遺伝子の密接な関係が示された。この所見より、胞巣状軟部肉腫の病態におけるキメラ遺伝子の重要性が明示され、更なるASPL-TFE3機能解析の必要性が推察された。

さらに、ASPL-TFE3の生物学的機能に関する知見は非常に乏しいことから、本研究で得られたキメラ遺伝子産物の分子機能所見は、今後の関連研究の発展に大きく貢献すると考えられる。

今後は、ASPL-TFE3の転写因子としての機能解析を進めると共に、ASPL-TFE3の転写標的因子の大規模な探索を行い、胞巣状軟部肉腫の病態解明を進めていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

①石黒尚子、胞巣状軟部肉腫病態の病理組織学および分子生物学的解析、第41回日本整形外科学会骨軟部学術集会、2008年7月18日、アクトシティ浜松

②石黒尚子、胞巣状軟部肉腫病態の解析、第97回日本病理学会総会、2008年5月17日、石川県立音楽堂他

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