

|  |   |     |       |
|--|---|-----|-------|
| 京都大学   | 博士（ 医学 ）  | 氏 名 | 梶田洋一郎 |
| 論文題目   | The transcription factor Sp3 regulates the expression of a metastasis-related marker of sarcoma, actin filament-associated protein 1-like 1 (AFAP1L1)<br>(転写因子 Sp3 は肉腫転移関連マーカーAFAP1L1 の発現を制御する) |     |       |
| <p>(論文内容の要旨)</p> <p><b>【背景と目的】</b><br/>肉腫は脂肪織、筋肉、線維組織、血管、骨、臓器など全身の多様な組織から発生する。拡大摘出術が治療の第一選択であるが、一旦遠隔転移が生じると治療困難となる場合が多い。臨床腫瘍サンプルを用いた遺伝子発現解析により、AFAP1L1 が軟部組織肉腫の新規転移関連遺伝子であることが報告された。本研究の目的はAFAP1L1 の発現を制御する因子を明らかにし、肉腫進展機序の解明や治療に寄与することである。</p> <p><b>【方法】</b><br/>解析には肉腫細胞株を用いた。mRNA の発現はPCR と定量PCR、タンパクの発現はウェスタンブロットで確認した。プロモーター活性はルシフェラーゼアッセイで評価し、プロモーター領域と Sp1、Sp3 の結合はElectrophoretic mobility shift assay (EMSA)、クロマチン免疫沈降 (ChIP) で確認した。DNA-Sp 結合阻害剤、Sp に対する siRNA を用いて Sp と AFAP1L1 の関連性を検証した。siRNA 抵抗性 Sp3 を産生する U2OS 細胞はレンチウイルスを用いて作成した。細胞浸潤能はマトリゲルを用いて評価した。</p> <p><b>【結果】</b><br/>①肉腫細胞株での AFAP1L1 の発現パターンを PCR、定量PCR、ウェスタンブロットで確認したところ、強く発現 (U2OS、MG63)、ごく微量に発現 (SYO-1、Saos2)、発現なし (HT1080) に分類された。②U2OS 細胞を用いて AFAP1L1 遺伝子の転写開始部位から 2250 塩基 (-2250 bp) 上流までのプロモーター活性を調べた所、-224 bp と -71 bp の間で著明に低下した。その領域には二つの Sp1 結合モチーフ (SBS1、2) と二つの Ets ファミリー結合モチーフ (EBS1、2) が存在し、またそれらはヒト、マウス、ウサギの種間で高度に保存されている領域に含有されていた。SBS1、SBS2、EBS1、EBS2 に変異を導入したところ、SBS1 の変異で 75% のプロモーター活性の低下を認めた。Sp1 と Sp3 の過剰発現は共に濃度依存性に AFAP1L1 近位プロモーター活性を増加させた。③SBS1 を含む AFAP1L1 プロモーター領域と Sp1、Sp3 の結合を EMSA と ChIP で検証した。EMSA では、U2OS、MG63、SYO-1 において Sp1 と Sp3 が共に SBS1 に結合していることが判明した。しかし ChIP では、AFAP1L1 陽性細胞で AFAP1L1 近位プロモーター領域に結合しているのは Sp3 であること、また Sp3 と AFAP1L1 プロモーターとの結合レベルと AFAP1L1 mRNA の発現量が相関することが示された。④AFAP1L1 陽性細胞を Sp-DNA 結合阻害剤であるミスラマイシンで処理したところ、濃度依存性に Sp3 と AFAP1L1 近位プロモーター領域の結合レベルが低下し、AFAP1L1 mRNA の発現量も減少した。⑤AFAP1L1 陽性細胞に Sp3 siRNA を処理すると AFAP1L1 の発現が低下したが、Sp1、Sp4 siRNA 処理ではほとんど変化を認めなかった。siRNA に対する耐性をもつ Sp3 を導入した U2OS 細胞では、Sp3 siRNA 処理による AFAP1L1 の発現低下はコントロールの細胞に比べて抑制された。⑥Sp3 siRNA 処理により U2OS 細胞のマトリゲル浸潤能は低下した。</p> <p><b>【結論】</b><br/>Sp3 は肉腫転移関連因子である AFAP1L1 の発現を制御する主要な転写因子であり、肉腫の新たな治療標的となる可能性がある</p> |   |     |       |

(論文審査の結果の要旨)

軟部組織肉腫は多様な組織から発生する。骨肉腫と異なり抗癌剤が奏効しないことが多く、特に紡錘形細胞肉腫は遠隔転移が生じると治療困難となる。臨床サンプルを用いた遺伝子発現解析により、AFAP1L1 が紡錘形細胞肉腫の新規転移関連遺伝子であることが報告された。AFAP1L1 遺伝子の発現制御を明らかにし、肉腫進展の解明に寄与することが本研究の主旨である。

AFAP1L1 遺伝子の転写開始部位から 2250 塩基 (-2250 bp) 上流までのプロモーター活性を段階的に測定、また種間で保存されている領域を検索することにより、AFAP1L1 のプロモーター活性に重要と思われる部位の絞り込みを行った。Sp1 結合モチーフ (SBS, -86 to -76 bp) に変異を入れるとプロモーター活性は 75% 低下し、Sp1 と Sp3 の過剰発現は濃度依存性にプロモーター活性を上昇させた。Electrophoretic mobility shift assay とクロマチン免疫沈降、Sp-DNA 結合阻害剤であるミスラマイシンを用いて、細胞内では Sp3 が SBS に結合していること、および Sp3 と AFAP1L1 プロモーターとの結合レベルと AFAP1L1 mRNA の発現レベルが相関していることを示した。Sp3 を siRNA でノックダウンすると AFAP1L1 mRNA の発現が抑制され、細胞の浸潤能が低下した。以上により Sp3 は AFAP1L1 の発現を制御する主因子であること、Sp3 は軟部組織肉腫の新たな治療標的となる可能性が示された。

以上の研究は軟部組織肉腫進展機序の解明に貢献し、Sp3 を標的とする新たな治療薬の開発に繋がる可能性がある。したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成 25 年 5 月 1 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降