

氏 名	光 野 芳 樹
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3191 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Expression of Claudin7 is tightly associated with epithelial structures in synovial sarcomas and regulated by an Ets family transcription factor, ELF3. (クローデイン 7 の発現は、滑膜肉腫における上皮様構造に密接に関与しており、Ets 転写因子群の一つである ELF3 により制御されている)
論文調査委員	(主 査) 教 授 鈴 木 茂 彦 教 授 別 所 和 久 教 授 宮 地 良 樹

論 文 内 容 の 要 旨

滑膜肉腫は、15～40 歳に好発する下肢関節近傍発生例の多い悪性腫瘍であり、その頻度は軟部肉腫全体の 5～10%とされている。その病理学的特徴として、紡錘形細胞のみで構成される単相性線維型滑膜肉腫 (monophasic fibrous type)、紡錘形細胞により構成される組織の中に上皮様構造をもち、所謂癌肉腫の形態を呈する二相性滑膜肉腫 (biphasic type) の二つに大分される。後者における上皮様構造の意義および形成機構については現在に至るまで詳細は不明である。この課題を解明するために、上皮構造形成の礎となる細胞間接着に必要な諸因子のなかで、最も頂端側に位置する密着結合 (tight junction) 形成分子のひとつであるクローデイン (Claudin, CLDN) 分子に着目し、その解析を行なった。

まず手術切除腫瘍組織 17 例 (単相性 8 例と二相性 9 例) を用いた解析を行った。全例で滑膜肉腫に特異的な融合遺伝子である SYT-SSX1 あるいは SYT-SSX2 が検出された。まず 21 種類の CLDN 遺伝子群の発現を RT-PCR 法により比較検討したところ、二相性腫瘍に特異的に発現しており、上皮様構造形成と関連性をもつ可能性のある CLDN として CLDN4, CLDN7 及び CLDN10 が同定された。更に二相性滑膜肉腫組織を用いた免疫組織化学染色により、上記 3 種類の CLDN が上皮様細胞で発現していることを確認した。これらの中で上皮様細胞に対する特異性が最も高かった CLDN7 について、更に詳細な解析を行った。ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて転写調節領域の同定を試みた。転写開始地点を中心とした約 1600 塩基の領域において各種断片を作成し、それぞれの転写活性を CLDN7 陽性細胞である大腸癌細胞株 SW480 を用いて比較検討した。その結果、-150 地点にある Ets 転写因子群の結合部位周辺に強いプロモーター活性を認めた。そこで二相性滑膜肉腫において発現していることが知られている Ets の一つである ELF3 遺伝子に注目した。滑膜肉腫 6 株を含む 14 種類の培養細胞株及び滑膜肉腫組織 17 例において、ELF3 と CLDN7 の発現の間には正の相関関係が認められた。ルシフェラーゼレポーターアッセイにおいて ELF3 遺伝子を同時に導入すると CLDN7 プロモーター活性が亢進すること、ゲルシフトアッセイ及びクロマチン免疫沈降法により、ELF3 が -150 地点の Ets 結合部位に結合すること、更に ELF3 陽性かつ CLDN7 陽性の細胞において siRNA により ELF3 をノックダウンすると内因性 CLDN7 遺伝子の発現が阻害されたことより、ELF3 は CLDN7 遺伝子の転写を正に制御している因子の一つであることが判明した。以上の結果より、滑膜肉腫における上皮様組織の形成には、ELF3 による CLDN7 の発現誘導が必要であることが明らかになった。しかしながら ELF3 の強制発現による内因性 CLDN7 の発現誘導が不十分であること、また二相性滑膜肉腫組織の免疫組織化学染色において、ELF3 陽性かつ CLDN7 陽性の細胞及び ELF3 陰性かつ CLDN7 陰性の細胞に加えて、ELF3 が陽性であるが CLDN7 は陰性である細胞が存在することより、ELF3 は CLDN7 の発現誘導に必要なではあるが十分な因子ではなく、更なる正の補因子の必要性あるいはなんらかの負の転写制御因子の関与が推察された。

論文審査の結果の要旨

成人発生軟部肉腫の一つである滑膜肉腫の一部は、二相性滑膜肉腫とよばれ、腫瘍組織内に紡錘形細胞により構成される部分と上皮様構造を呈する部分の両者が存在する、所謂癌肉腫の形態を呈するが、上皮様構造の意義及び形成機構は全く不明である。そこで、タイトジャンクション形成分子の一つであるクローデイン（Claudin、CLDN）分子に着目し、その解析を行なった。まず滑膜肉腫腫瘍組織 17 例における 21 種類の CLDN 遺伝子の発現を RT-PCR 法により比較検討し、上皮様構造形成と関連性を持つ可能性のある CLDN として CLDN4、7 及び 10 を固定した。これらの中で特異性の最も高かった CLDN7 について、ルシフェラーゼアッセイにより転写調節領域を解析し、転写活性に必須である特定の ETS 転写遺伝子群結合部位を同定した。二相性滑膜肉腫で発現している ETS の一つである ELF3 遺伝子を共発現させると転写活性は更に亢進し、クロマチン免疫沈降法及びゲルシフトアッセイにより ELF3 が同定した ETS 部位に結合することを証明した。更に ELF3 強制発現により内因性 CLDN7 遺伝子の発現が誘導されること及び siRNA による ELF3 抑制により内因性 CLDN7 遺伝子の発現が阻害されることから、ELF3 は CLDN7 遺伝子の転写を正に制御している因子の一つであることが判明した。以上の結果より、滑膜肉腫における上皮様構造形成には、転写因子 ELF3 による CLDN7 の発現誘導が必要であることが明らかになった。以上の内容は二相性滑膜肉腫における上皮様構造形成の分子機構の解明に寄与するところが多い。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 20 年 1 月 15 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。