

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	布 留 守 敏
論文題目	Identification of AFAP1L1 as a prognostic marker for spindle cell sarcomas. (紡錘形細胞肉腫における予後マーカーとしての AFAP1L1 の同定)		
(論文内容の要旨)			
非上皮性組織より発生した悪性腫瘍である肉腫は、その細胞形態によって小円形細胞肉腫と紡錘形細胞肉腫に分類される。小円形細胞肉腫は、N/C 比が高いために H/E 染色で青く染まる腫瘍であり、ユーイング肉腫や多形型を除く横紋筋肉腫などが相当し、染色体相互転座による腫瘍特異的融合遺伝子を有するものが多い。初期には化学療法や放射線療法が奏功し、外科的切除を含めた集学的治療が行われている。一方、紡錘形細胞肉腫には悪性線維性組織球腫や多形型脂肪肉腫、滑膜肉腫、平滑筋肉腫、悪性末梢神経鞘腫瘍など極めて多種の肉腫が含まれ、多くは特定の遺伝子変異がなく、病理所見も多様であり、診断に難渋する場合が多い。化学療法や放射線治療への反応性に乏しく、外科的切除が治療の主体であり、従って遠隔転移の発生が、予後と強く関連するが、転移発生と関連する分子マーカーは同定されていない。そこで本研究では、紡錘形細胞肉腫における転移発生と関連する遺伝子を同定し、予後診断因子としての意義を解析することを目指した。まず紡錘形細胞肉腫 65 例の臨床検体より RNA を抽出し、23,040 遺伝子で構成されるカスタムメイド cDNA マイクロアレイを使用して、間葉系幹細胞における発現を基準とした網羅的遺伝子発現解析を行った。経過観察中に転移が発生した 27 例（転移群）と発生しなかった 38 例(非転移群)の両群間で、発現量が異なる遺伝子を探索した結果、actin filament-associated protein 1-like 1(AFAP1L1)を同定した。AFAP1L1 遺伝子の発現は転移群で高く、臨床及び病理学的な解析因子を加えた単変量及び多変量解析により、AFAP1L1 の発現は、病理組織学的悪性度と独立して予後と関連する因子であることが判明した。その意義を検証するために、新たな 41 例の紡錘形細胞肉腫検体を用いて、定量的 PCR を行い、AFAP1L1 の発現量と転移発生との関連を解析し、やはり高発現群に転移発生例が多いことを確認した。次に蛋白レベルでの発現との関連を解析するために特異的抗体を作成し、紡錘形細胞肉腫 36 例の切除標本の免疫組織化学染色を行った。AFAP1L1 蛋白は主として細胞質に局在していた。染色陽性群と陰性群で転移発生率を比較したところ、陽性群での発生率が有意に高く、蛋白レベルでも転移発生と関連が確認された。以上の結果から、AFAP1L1 が紡錘形細胞肉腫の予後因子として意義あるものであることが判明した。AFAP1L1 は AFAP-110(AFAP1)と AFAP1L2 とともに、AFAP ファミリー を構成する蛋白であるが、その機能は未知である。類似蛋白である AFAP-110 は、アクチンフィラメントのアダプター蛋白でアクチン細胞骨格の再配列に関与することが報告されており、乳がんや前立腺癌で過剰発現しており、細胞接着を制御して腫瘍増殖に寄与していることが示唆されている。そこで、培養肉腫細胞株を用いて AFAP1L1 の機能解析を行った。AFAP1L1 発現陽性肉腫細胞株において、RNA 干渉を用いて AFAP1L1 遺伝子の発現を抑制すると、in vitro の増殖能は変化しなかったが、マトリゲル浸潤能が低下した。次に AFAP1L1 を発現していない不死化間葉系幹細胞株にレンチウイルスベクターを用いて AFAP1L1 遺伝子を導入すると、マトリゲル浸潤能と足場非依存性増殖能が亢進し、MMP-9 の分泌が誘導された。更に in vivo での影響をみるために、AFAP1L1 導入細胞を免疫不全マウスに接種すると、腫瘍速度は亢進しており、より大きな腫瘍となることが確認された。以上より、AFAP1L1 は、細胞の浸潤能を亢進し、かつ in vivo での腫瘍増殖を促進することで、紡錘形細胞肉腫の転移形成に関与していると想定され、予後判定因子として意義あるものと考えられる。			

(論文審査の結果の要旨)
紡錘形細胞肉腫の多くは特定の遺伝子変異をもたず、病理所見も多様であり診断に難渋する。化学療法や放射線治療への反応性に乏しく外科的切除が治療の主体であり、遠隔転移の発生が予後と強く関連するが、転移発生と関連する分子マーカーは同定されていない。そこで申請者は転移発生と関連する遺伝子を同定し、その意義を解析することを目指した。65 例の紡錘形細胞肉腫の臨床検体を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、転移群と非転移群の間で発現量が異なる遺伝子を探索した結果、actin filament-associated protein 1-like 1(AFAP1L1)を同定した。その発現は転移群で高く、多変量解析により、病理組織学的悪性度等の他の因子と独立して予後と関連する因子であることが判明した。免疫組織化学染色では、AFAP1L1 蛋白は主として細胞質に局在し、染色陽性群は陰性群と比較して転移発生率が有意に高く、蛋白レベルでも転移発生との関連が確認された。in vitro で AFAP1L1 遺伝子発現を抑制すると浸潤能が低下し、一方で AFAP1L1 遺伝子を導入すると浸潤能と足場非依存性増殖能が亢進し MMP-9 の分泌が誘導された。AFAP1L1 導入細胞は in vivo での造腫瘍能も亢進していた。これらの結果より AFAP1L1 は、細胞の浸潤能を亢進し、かつ in vivo での腫瘍増殖を促進することで、紡錘形細胞肉腫の転移形成に関与していると想定され、予後判定因子として意義あるものと考えられた。
以上の研究は紡錘形細胞肉腫の予後因子の解明に貢献し、予後判定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 23 年 8 月 2 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