

| | |
|------------------|---|
| Title | Lack of matrix metalloproteinase(MMP)-1 and-3 expression in Ewing sarcoma may be due to loss of accessibility of the MMP regulatory element to the specific fusion protein in vivo. |
| Sub Title | Ewing肉腫特異的EWS-FLI-1によるmatrix metalloproteinase(MMP)の転写活性化と調節領域への結合能 |
| Author | 矢部, 寛樹 |
| Publisher | 慶應医学会 |
| Publication year | 2003 |
| Jtitle | 慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.80, No.1 (2003. 3) ,p.5- |
| JaLC DOI | |
| Abstract | |
| Notes | 号外 |
| Genre | Journal Article |
| URL | https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20030303-0005 |

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Lack of matrix metalloproteinase (MMP) -1 and -3 expression in Ewing sarcoma may be due to loss of accessibility of the MMP regulatory element to the specific fusion protein in vivo.

(Ewing肉腫特異的EWS-FLI-1によるmatrix metalloproteinase (MMP) の転写活性化と調節領域への結合能)

矢部 寛樹

内容の要旨

Ewing肉腫は青少年期に骨および軟部に発生し周囲への浸潤と遠隔転移を示す悪性度の高い腫瘍である。本腫瘍は特異的な融合遺伝子 (EWS-FLI-1, EWS-ERG, EWS-ETV1およびEWS-E1AF) をもち、その下流側の遺伝子はすべてetsファミリーに属している。ERGおよびE1AFをはじめとするets関連蛋白は腫瘍の浸潤、転移の過程で重要な役割を演じるMMP1, MMP3などのMMP遺伝子のプロモーターを転写活性化するとされている。そして、特にMMP-3がEWS-FLI-1の標的遺伝子の候補としてあげられている。そこで本研究では、Ewing肉腫特異的融合蛋白がMMP遺伝子を転写活性化し、浸潤、転移に影響を及ぼしているという仮説を立てた。まず最初に、Ewing肉腫細胞株8株においてMMPの発現を検討した。その結果、MMP-1およびMMP-3の発現は予想に反してすべての細胞株で認められなかった。一方、MMP-9の発現は8細胞株中4株にみられ、MMP-2およびMT1-MMPはほとんどすべての細胞株で発現していた。MMP-1, MMP-3の発現がみられないことはEwing肉腫腫瘍検体においても同様であった。Ewing肉腫特異的融合蛋白はCATアッセイによる転写解析の結果、MMP-1およびMMP-3遺伝子のプロモーターを転写活性化することが示され、またゲルシフトアッセイによりMMP-1遺伝子の転写調節領域の認識配列に結合することが示された。しかしながらin vivo formaldehyde cross-linking法を用いた解析では、融合蛋白はEwing肉腫細胞内においてMMP遺伝子の転写調節領域の認識配列に結合していないことが明らかとなった。これらの結果から、Ewing肉腫において予想されたMMP-1およびMMP-3の発現がみられなかったことは、in vivoにおいてEwing肉腫特異的融合蛋白がMMP遺伝子の転写調節領域内のets認識配列に結合できないことによると考えた。本研究において、腫瘍細胞特異的融合蛋白の転写調節領域への結合はin vivo (腫瘍細胞そのもの) における転写調節領域のエピジェネティクスに影響されている可能性が示された。

論文審査の要旨

Ewing肉腫は高浸潤、高悪性を示す骨軟部腫瘍であり、本腫瘍にみられる特異的融合遺伝子のターゲット遺伝子候補として腫瘍の浸潤、転移の過程で重要なMMP-1, MMP-3などのMMP遺伝子が考えられている。本研究では、Ewing肉腫特異的融合蛋白がMMP-1およびMMP-3の転写を活性化し、その発現に関与し、浸潤、転移に影響を及ぼしているという仮説を立てた。Ewing肉腫細胞株では予想されたMMP-1およびMMP-3の発現は全く認められず、主としてMMP-2およびMT1-MMPの発現がみられ、一部にMMP-9の発現を認めた。腫瘍検体においてもほぼ同様の発現様式であった。CATアッセイによる転写解析により特異的融合蛋白がMMP-1およびMMP-3遺伝子のプロモーターを転写活性化するにもかかわらず、本腫瘍でMMP-1, MMP-3の発現がみられないメカニズムを解明するためにin vivo formaldehyde cross-linking法を用いた解析を行った。この結果、融合蛋白はin vivo (Ewing肉腫細胞内) においてMMP遺伝子の転写調節領域のets認識配列に結合していないことが明らかとなり、本腫瘍におけるMMP-1, MMP-3の発現は転写調節領域のエピジェネティクスに影響されている可能性が示された。

審査においては、過去に報告されたcis転写因子のターゲット遺伝子同定の手法と、その発現をみる必要性について質問された。これに対し、サブトラクション法、プロモーターアッセイなどが用いられていたこと、Ewing肉腫細胞の様に腫瘍発生に重要な特異的転写因子をもつ場合はターゲット遺伝子の発現を検討する必要性があると回答された。次に、本研究の結果から本腫瘍において、どの種類のMMPが浸潤、転移に重要であるかと質問され、基底膜浸潤に関わるMMP-2, MMP-9およびMT1-MMPが重要と考えられると回答された。さらに、浸潤能、転移能を論じるにはMMP蛋白の発現、酵素活性などを調べる必要があると指摘された。次に、in vivo formaldehyde cross-linking法およびslot blot analysisにおいて、プロットを定量的にとらえているかとの質問に対し、今回はFLI-1抗体での免疫沈降でMMP-1, MMP-3のプロモーターDNAが濃縮されていないことから、定性的に結果をとらえていると回答された。また、in vivoで融合蛋白が転写調節領域に結合していない理由として、DNAメチル化、クロマチン高次構造変化等、転写調節領域のエピジェネティクスに原因を求めるとすれば、それを証明する実験の必要性を指摘された。

以上のように、本研究は今後さらに検討すべき課題を残しているが、Ewing肉腫において特異的融合蛋白のターゲット遺伝子として発現が予想されたMMP-1, MMP-3が実際の腫瘍で発現していないメカニズムを解明した点で有意義な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 整形外科学 戸山 芳昭
病理学 岡田 保典 病理学 坂元 亨宇
先端医科学 河上 裕 産婦人科学 野澤 志朗
学力確認担当者：
審査委員長：岡田 保典

試問日：平成14年11月18日