

学位論文題名

Oncogene products of Ewing sarcoma regulate
the expression of hTERT

（ユーイング肉腫のがん遺伝子産物が hTERT の発現を調節する）

学位論文内容の要旨

RNA結合タンパクのEWS遺伝子とがん遺伝子のETSファミリー遺伝子とが染色体上で相互に転座・融合することから生じるEWS/ETSキメラはユーイング肉腫で特異的に起こっている遺伝子の変異である。N末がEWSでC末がETSであるその遺伝子産物は、転写因子としていくつかの遺伝子の転写を制御することが報告されている。一方、近年多くのがんでテロメラーゼ活性及び、その活性を触媒するサブユニット Telomerase reverse transcriptase (TERT)の発現が確認されているが、ユーイング肉腫では未だその報告はない。本研究中で我々は、EWS/ETSがTERTの発現及びテロメラーゼ活性に与える影響について検討した。

1) EWS/ETS がテロメラーゼを活性化する

EWS/E1AFとEWS/FLI1でがん化したマウス線維芽細胞（NIH3T3細胞）でテロメラーゼ活性を調べるためTRAP assayを行ったところ、がん化細胞株は親細胞株に比べて顕著なテロメラーゼ活性を示した。またTERTのメッセンジャーRNA（mRNA）の発現をRT-PCR法で調べたところ、やはりがん化細胞株においてTERT mRNAの量が増加していた。またこれらの結果は、2種類のユーイング肉腫の細胞株（SCCH196、NCR-EW2）においても同様であった。

2) EWS/ETS は human TERT の転写を positive に調節する

human TERTの転写調節領域を用いてluciferase assayでその転写活性化について調べたところ、EWS/E1AFとEWS/FLI1が濃度依存性に転写を活性化することが明らかとなった。この結果はhuman TERTの転写調節領域の全長（3328塩基対）においても、コア領域（181塩基対）においても同様であった。さらに、転写調節領域中のETS結合部位のmutantを用いた場合にも、EWS/E1AFとEWS/FLI1によってhuman TERTの転写は活性化されることから、EWS/ETSがETS binding siteを介さずに転写を活性化していることが明らかとなった。一方、EWS/FLI1はc-Myc promoterを活性化しユーイング肉腫においてはc-Mycが高いレベルで発現しているため、EWS/ETSキメラがc-Mycの発現レベルを上げることで2次的に

TERTの転写を上げているのではないかと推測し、2ヶ所のc-Myc binding siteのmutantを用いてluciferase assayを行った。その結果、転写調節領域中のc-Myc結合部位のmutantを用いた場合にも転写活性は失われないことから、EWS/ETSによるhuman TERTの転写の調節には転写調節領域中のETS結合部位やc-Myc結合部位等の特定の領域が必要ないことがわかった。

3) EWS/ETS は正常な ETS ファミリー転写因子よりも高い転写の活性化能力をもつ

ETS binding site を3回リピートした人工 promoter を用いて EWS/ETS キメラの転写の活性化能力を正常な ETS ファミリー転写因子と比較したところ、E1AF、FLI1 のいずれにおいても EWS/ETS キメラが正常な ETS ファミリー転写因子よりも高い転写の活性化能力を示した。

4) EWS/E1AF は CBP/p300 と相互作用し転写の活性化因子として機能する

さらに EWS/E1AF とアデノウイルス E1A を細胞に共発現させたところ、wild type と CR2 ドメインの mutant では EWS/E1AF の転写活性化能が阻害された。しかし E1A の N 末 deletion mutant では転写活性が抑制されなかったため、EWS/E1AF による TERT promoter の活性化には RB ではなく CBP/p300 が関与していることが示唆された。

5) 結論

EWS/ETS はユーイング肉腫細胞中で human TERT 遺伝子の転写を介してヒトテロメラーゼを活性化し、その際に EWS/ETS は転写因子ではなく転写の活性化因子として働くことが推測された。こうした EWS/ETS の機能がユーイング肉腫の発生・悪性化に関わると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	佐野英彦
副査	教授	向後隆男
副査	教授	田村正人
副査	助教授	進藤正信

学位論文題名

Oncogene products of Ewing sarcoma regulate the expression of hTERT

(ユーイング肉腫のがん遺伝子産物が hTERT の発現を調節する)

審査は向後、田村、進藤および佐野審査員全員が出席のもとに、まず申請者の博士課程を通した研究の概要・成果の発表と提出論文に関する口頭試問によって行われた。申請者の研究の概要と審査の内容は以下の通りである。

【目的】RNA 結合タンパクの EWS 遺伝子とがん遺伝子の ETS ファミリー遺伝子とが染色体上で相互に転座・融合することから生じる EWS/ETS キメラはユーイング肉腫で特異的に起こっている遺伝子の変異であり、その遺伝子産物は転写因子としていくつかの遺伝子の転写を制御することが報告されている。一方、近年多くのがんでテロメラーゼ活性及び、その活性を触媒するサブユニット Telomerase reverse transcriptase (TERT) の発現が確認されているが、ユーイング肉腫では未だその報告はない。本研究中で我々は、EWS/ETS が TERT の発現及びテロメラーゼ活性に与える影響について検討した。

【方法】EWS/E1AF と EWS/FLI1 でがん化したマウス線維芽細胞と 2 種類のユーイング肉腫の細胞株を用いて、TRAP assay によりテロメラーゼ活性と RT-PCR により TERT mRNA の発現を評価した。次に human TERT の転写調節領域、ETS 結合部位の人口プロモーターやアデノウイルス E1A の変異型を用いた Luciferase assay により、EWS/ETS が転写に及ぼす影響について検討した。また RNA interference によって EWS/FLI1 のノックダウンを行い、TRAP assay・RT-PCR を行った。

【結果と考察】EWS/E1AF と EWS/FLI1 でがん化した細胞は、親細胞株に比べて顕著なテロメラーゼ活性を示し、TERT mRNA の発現も増加していた。またこれらの結果は、2 種類のユーイング肉腫の細胞株においても同様であった。EWS/E1AF と EWS/FLI1 は human TERT の転写を活性化し、この転写の調節には転写調節領域中の ETS 結合部位

や、c-Myc 結合部位等の特定の領域が必要ないことがわかった。転写の活性化因子 CBP/p300 と結合するアデノウイルス E1A を細胞に導入することにより EWS/ E1AF の転写活性化能は阻害されたので、EWS/E1AF は CBP/p300 と相互作用し TERT の転写を活性化していることも明らかになった。さらに EWS/FLI のノックダウンにより約 30% まで hTERT mRNA は減少し、テロメラーゼ活性も減少した。以上の結果は、EWS/ETS がユーイング肉腫細胞中で human TERT 遺伝子の転写を介してテロメラーゼを活性化することを示しており、その際に EWS/ETS は転写因子ではなく転写の活性化因子として働くことが推測された。

各審査員から申請者に対して、本論文の内容とそれに関連する項目について質問が行われた。審査員からの質問の内容を以下に抜粋する。

- ① Daxx の局在が変化することと誘導されるアポトーシスには関連があるか
- ② アデノウイルス E1A が hTERT の転写を抑制する際に CBP/p300 が標的であるということはずでに知られていることか
- ③ EWS/ETS は hTERT の転写を特異的に活性化しているのか
- ④ 学位論文中で用いられた 2 種のユーイング肉腫細胞株の由来について
- ⑤ 細胞分裂を停止した高分化型の細胞におけるテロメラーゼとアポトーシスの関係はどのようにになっているか

これらの質問のいずれについても申請者から明快な回答が得られた。

本研究はユーイング肉腫のがん遺伝子産物である EWS/FLI1 と EWS/E1AF が hTERT の転写を介してテロメラーゼ活性化することを初めて報告した貴重な研究であり、細胞の腫瘍化のメカニズム解明に大きく寄与するものである。また RNAi を用いた研究成果は、がんの遺伝子治療に役立つ可能性もあり、生物学および医歯学の発展に貢献する研究である。よって博士（歯学）の学位授与に値すると認められた。