



Title	E74-like factor 2 regulates valosin-containing protein expression
Author(s)	張, 兵林
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49900
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【 7 】

氏 名	張 兵 林
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 2 7 1 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 21 年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科病態制御医学専攻
学 位 論 文 名	E74-like factor 2 regulates <i>valosin-containing protein</i> expression (ELF2 による VCP 遺伝子の発現制御)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 青 笹 克 之 (副査) 教 授 川 瀬 一 郎 教 授 金 倉 謙

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

Valosin-containing protein (VCP; also known as p97) belongs to the ATPases associated with various cellular activities superfamily, and is essential for a wide variety of cellular functions such as ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation, membrane fusion, cell cycle regulation, and endoplasmic reticulum-associated degradation. The regulatory mechanism of VCP transcription has not been studied in detail. Here, the significance of E74-like factor 2/new Ets-related factor (ELF2/NERF) in transcriptional regulation of VCP gene was analyzed.

[方法ならびに成績]

A 260 bp DNA sequence in the 5' -flanking region of VCP gene was highly conserved through comparison of human and mouse genome. Transcription factor binding site analysis was performed, and found that the conserved sequence contains binding sites for several transcription factors. Among them, the binding site of ELF2/NERF was present. Chromatin immunoprecipitation assay showed

binding of ELF2/NERF to the 5' -flanking region of VCP gene.

Next, the expression of ELF2/NERF was knocked-down, and its effect on VCP expression was examined. Immunoblot analysis and immunofluorescence confocal microscopy showed knockdown of ELF2/NERF decreased expression level of VCP. VCP is known to play a role in resistance against apoptosis induced by the addition of tumor necrosis factor- α . Viability of ELF2/NERF-knocked down cells was compared to that of control cells after treatment of tumor necrosis factor- α , and found that the viability of cells significantly reduced in ELF2/NERF-knocked down cells. Immunohistochemical analysis on clinical breast cancer specimens showed a correlation of nuclear ELF2/NERF expression with VCP expression and proliferative activity of tumor cells. Taken together, these findings indicate that ELF2/NERF promotes VCP transcription and that ELF2/NERF-VCP pathway might be important for cell survival and proliferation.

[総 括]

Knocked-down expression of ELF2/NERF reduced the expression level of VCP and induced susceptibility of MCF7 cells to tumor necrosis factor- α treatment. Furthermore, immunohistochemical analysis on the breast cancer specimens showed that VCP expression was strongly correlated with expression of ELF2/NERF. These indicated the important role of ELF2/NERF as a transcription factor of VCP.

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

Valosin containing protein (VCP)はマウス骨肉腫高転移細胞株で高発現する蛋白質で、NF κ B経路を介して細胞のアポトーシス耐性に寄与する。VCPを高発現することが腫瘍の独立した予後不良因子であることは、肝臓癌、大腸癌、胃癌をはじめとした様々な腫瘍の臨床検体を用いた研究で判明している。VCP,あるいはVCPの発現を制御する因子は腫瘍治療の新たなターゲットとなりうるが、VCP遺伝子の発現制御機構はこれまでほとんど研究されていない。本研究では、プロモーター領域を解析することで、VCP遺伝子の発現制御機構を明らかにすることを目的とした。

まず、ヒト、マウスのプロモーター領域を比較することで、VCP遺伝子の転写開始部位の上流に存在する260bpが種をこえて保存されていることがわかった。この領域には、Ets familyに属する転写因子ELF2/NERFの結合部位が存在していた。そこで、VCPを発現している乳癌細胞株MCF7でクロマチン免疫沈降法を行ったところ、ELF2/NERFがVCP遺伝子のプロモーター領域に結合することが明らかとなった。siRNAによりMCF7細胞でELF2/NERFの発現をノックダウンすると、VCPの発現が低下した。TNF α 添加によるアポトーシス耐性も、ELF2/NERFの発現低下とともに減弱し、ELF2/NERFの発現レベルはVCPの発現レベルのみならず、VCPの機能とも相関することが示唆された。さらに、27例の乳癌臨床検体を用いて免疫組織化学的にELF2/NERF、VCPの発現レベルを検討したところ、ELF2/NERF発現レベルとVCP発現レベルが相関することが明らかとなった。VCP、ELF2/NERFを高発現する乳癌症例では低発現する症例よりもKi-67陽性率が有意に高く、腫瘍細胞の増殖能が高いことが示唆された。以上の結果より、乳癌細胞株、乳癌臨床検体において、VCP遺伝子の発現にはELF2/NERFが重要な役割を果たすことがわかり、本論文は学位授与に値すると考えられる。