



Title	Targeting the Clear Cell Sarcoma Oncogenic Driver Fusion Gene EWSR1::ATF1 by HDAC Inhibition
Author(s)	前, 裕和
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/92917
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	前 裕和
論文題名 Title	Targeting the Clear Cell Sarcoma Oncogenic Driver Fusion Gene <i>EWSR1::ATF1</i> by HDAC Inhibition (HDAC阻害による淡明細胞肉腫の発がんドライバー遺伝子 <i>EWSR1::ATF1</i> の標的化)
論文内容の要旨	
〔目 的(Purpose)〕 淡明細胞肉腫（CCS）は転座関連肉腫の稀な1型である。メラニンを産生すること、染色体転座による <i>EWS::ATF1</i> という融合遺伝子が肉腫のドライバー遺伝子として発現していることが特徴である。CCSは化学療法抵抗性で有効な薬剤は少なく5年生存率は50%程度である。本研究ではドラッグリポジショニングの考えからハイスループットスクリーニングを行いCCSの新規治療候補薬を探索し、その有効性と作用メカニズムを検討する。	
〔方法(Methods)〕 淡明細胞肉腫のHewga-CCSのcell lineに対してFDA承認薬1134薬物のHigh throughput screeningを行った。そして淡明細胞肉腫に特に効果のあった薬剤を選出した。選出薬剤の作用機序の解明には、MP-CCS-SY、SU-CCS1、Hewga-CCS, kasの4種の淡明細胞肉腫細胞株を用いて増殖抑制効果はWST-1 assayおよびXenograft model、細胞周期変化はFACS、下流シグナル変化はウエスタンブロット、遺伝子発現の変化はqPCRを転写活性の変化はレポーターアッセイ、クロマチン免疫沈降、ATAC-seqを行った。	
〔成績(Results)〕 <i>in vitro</i> 、 <i>in vivo</i> ともにvorinostat投与によりCCSの増殖抑制効果を認め、G0/G1細胞周期停止およびアポトーシス誘導を認めた。また興味深いことにvorinostat投与によりCCS特異的融合遺伝子 <i>EWS::ATF1</i> の発現低下を認めた。 <i>EWSR1</i> プロモーター領域の解析では <i>EWS</i> -H3K27ac、H3K9acのアセチル化低下を認め、プロモーター活性も低下していた。しかし、ATAC-seqではプロモーター領域のクロマチン構造変化はわずかだった。プロモーター領域に付く転写因子を検索したところ、SOX10に注目した。vorinostat投与によりSOX10の発現が減少することが確認され、またSOX10のサイレンシングで <i>EWS::ATF1</i> の発現抑制を認めた。さらにBET蛋白によるプロモーター制御の可能性が考えられたためBET阻害薬を用い確認したところ、BET阻害薬投与により <i>EWS::ATF1</i> の発現抑制を認め、vorinostatとのコンビネーションでは発現抑制の増強が見られた。このコンビネーションによって <i>in vitro</i> 、 <i>in vivo</i> ともに細胞増殖抑制にも相乗効果が確認された。	
〔総 括(Conclusion)〕 我々はCCS治療のための有効な薬剤としてHDAC阻害剤vorinostatを特定した。このHDAC阻害剤は <i>EWSR1::ATF1</i> の発現を抑制し、我々の研究はこの効果のエビデンスおよび転写メカニズムを明らかにした。また、 <i>EWS::ATF1</i> の発現を調節する転写因子を初めて特定した。さらに、 <i>EWSR1::ATF1</i> の抑制を増強する組み合わせ療法も見つけた。これらの知見は融合遺伝子を標的とした治療の設計図を提供し、CCSに対する新たな治療法の可能性を示している。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 前 裕和		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査	大阪大学教授 岡田 誠司
	副 査	大阪大学教授 妻木 乾行
	副 査	大阪大学特任教授 田中 啓之

論文審査の結果の要旨

淡明細胞肉腫（CCS）は、EWSR1::ATF1という融合遺伝子を発現させる特徴がある極めて稀な悪性腫瘍であるのだが、有効な治療法が開発されていない。発表者は大規模な薬物スクリーニングを実施し、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤のポリノスタットがEWSR1::ATF1の発現を減少させ、抗増殖効果を示すことを発見した。EWSR1::ATF1の発現減少はクロマチンのアクセシビリティの変化によるものと予想されていたが、ATAC-seqでは、クロマチン構造が僅かにしか変化していないことが明らかになった。一方、ポリノスタット治療により、BET蛋白質の一つであるBRD4のレベルがEWSR1::ATF1のプロモーター領域で減少することがわかった。さらに、ポリノスタット治療は、EWSR1::ATF1の発現を直接調節しCCSの増殖に関与する転写因子SOX10を抑制することが、モチーフ解析で明らかにした。特記すべきことにポリノスタットとBET阻害薬の組み合わせ療法が抗増殖効果とEWSR1::ATF1の抑制を相乗的に強化することを示した。これらの結果は、エピジェネティック修飾剤を用いた新たな融合遺伝子抑制機構を明らかにし、融合遺伝子関連腫瘍の潜在的な治療ターゲットを提供したと考えられるので、学位の授与に値する。