

平成23年 3月29日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591756

研究課題名（和文）転座型融合蛋白による滑膜肉腫発症機序の解明

研究課題名（英文）Studies in targets of SYT-SSX fusion protein in synovial sarcoma.

研究代表者

大内田 守（OUCHIDA MAMURU）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80213635

研究成果の概要（和文）：

滑膜肉腫発症機序を解明するために、滑膜肉腫特異的な染色体転座により生じたSYT-SSX蛋白複合体が直接作用し発現抑制している遺伝子プロモーターの回収を行い、335個の標的候補を同定した。滑膜肉腫の原因遺伝子SYT-SSXの蛋白複合体の細胞内局在パターンの変動をマーカーとして、SYT-SSXの腫瘍発症機序を阻害する薬剤を検討し、滑膜肉腫の有効な分子標的治療剤となり得るものをスクリーニングしたが、現在までのところ効果的な治療剤は見つかっていない。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was identification of the target genes transcriptionally regulated by SYT-SSX fusion protein in synovial sarcomas. We found about 300 candidate targets by chromatin immunoprecipitation assay, DNA cloning and sequencing. We have screened the reagents which can block and inhibit the localization of SYT-SSX fusion protein in synovial sarcoma cells, to find new targeted therapy agents for synovial sarcoma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：滑膜肉腫、染色体転座、融合遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

滑膜肉腫は15～40歳の若年に好発する比較的頻度の高い肉腫の一つで、肺転移、リンパ節転移を来すこともあるため、診断治療のみならず腫瘍発症メカニズムの基盤的解明は重要な課題になっている。近年、本腫瘍に特異的な染色体転座が同定され、第18染色体上のSYT遺伝子とX染色体上のSSX遺伝子の融合型遺伝子SYT-SSXが滑膜肉腫の95%以上で検出されることが明らかになった。SYT遺伝子は遺伝子発現促進に関わる転写調節因子であり、SSX遺伝子は発現抑制に関わる転写調節因子であると考えられているが、その働きはまだ解明されていない。

## 2. 研究の目的

(1) これまでの報告ではSYT蛋白は、ヒストンアセチル化活性を持つ p300蛋白、およびクロマチンリモデリング因子hBRM、BRG1蛋白と結合することが知られている。それによると、SYTを介したヒストンアセチル化酵素はヒストンをアセチル化させることでヒストンのDNA結合能を弱めて遺伝子を転写促進へと向かわせ、ATP依存性のヘリカーゼであるクロマチンリモデリング因子はクロマチンの構造を再構成(クロマチンリモデリング)させることにより、遺伝子の転写促進へと向かわせると考えられる。

近年、申請者らはSYT-SSX蛋白質がヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)複合体の因子であるSIN3Aと相互作用することを発見した(Ito T, et al. Laboratory Investigation 2004)。HDAC複合体はヒストン蛋白の脱アセチル化を行う重要な因子であり、脱アセチル化されたヒストン蛋白はDNAと強固に結合するようになるため遺伝子は転写抑制へ向かうことになる。

我々の発見は、転座型融合蛋白SYT-SSXがヒストン脱アセチル化酵素複合体との相互作用を介して標的遺伝子の発現を抑制し、腫瘍形成に導く可能性を示唆している。そこで申請者は我々の発見を踏まえ、滑膜肉腫はSYT遺伝子とSSX遺伝子が特異的な染色体転座を生じることで、SYT蛋白と相互作用する転写促進因子(p300、hBRM、BRG1等)と転写抑制因子(HDAC複合体等)の切り換え制御が異常になり、下流の遺伝子群を発現抑制してしまうことが原因で発症するのではないかと考えた。本申請では、染色体転座により生じたSYT-SSX蛋白複合体が直接作用し発現を抑制している遺伝子プロモーターを同定し、シグナル伝達経路を明らかにすることを目的としている。

(2) 上記のSYT-SSX蛋白質とヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)複合体との相互作用の発見に基づき、我々はSYT-SSX蛋白がHDAC複合体を介して転写制御異常を引き起こし滑膜肉腫を発症するという仮説を立てた。その仮説を検証する為に、HDAC阻害剤を用いてヒストン脱アセチル化酵素を阻害すると滑膜肉腫の造腫瘍性はどうかを滑膜肉腫培養細胞(*in vitro*)および滑膜肉腫移植マウス(*in vivo*)における系で検討した。その結果、HDAC阻害剤は他の骨軟部腫瘍に対する濃度よりも約470倍も低濃度で、滑膜肉腫に腫瘍増殖抑制効果を示すこと、その生き残った腫瘍は浸潤能が低下していたことを発見した(Ito T, et al. Cancer Letters 2005)。このことは、SYT-SSX蛋白質がHDAC複合体と相互作用することで下流遺伝子群の発現異常を起こし、造腫瘍性に関わっていることを示している。

そこで本申請では、HDAC阻害剤処理をするるとSYT-SSX蛋白複合体の細胞内局在パターンが変動するか、他の薬剤でSYT-SSX蛋白複合体

の細胞内局在パターンを変動・阻害する薬剤を検討することを目的としている。このシステムにより検出される薬剤は滑膜肉腫の有効な分子標的治療となり得るものである。

### 3. 研究の方法

(1) 染色体転座型SYT-SSX融合蛋白は転写調節因子同士が融合したものであるが、プロモーター領域DNAに直接結合することはできない。他の転写因子を介して遺伝子発現を制御していると考えられている。そこで、SYT-SSX蛋白の構成因子に対する抗体を用いて、クロマチン免疫沈降を行う。まず、われわれが樹立した滑膜肉腫細胞株SYO-1細胞を1%ホルムアルデヒドでDNAと転写因子群を固定し、細胞を超音波破碎後、上清を回収する。SYTとSSXに対する抗体を反応させた後、プロテインAガロースに吸着させて結合したDNA共々沈殿させる。NaCl処理することでホルムアルデヒド固定を切断後、フェノール処理で蛋白を除去し、プロモーター領域DNAを回収する。得られたDNA断片の末端処理を行った後、ベクターへクローニングする。個々のクローンをシーケンス解析することによりDNA配列を読み取る。得られた配列情報をDNAデータベースの情報に照らし合わせて、標的遺伝子の同定を行う。

(2) SYT, SSXおよびSYT-SSX蛋白に蛍光蛋白を融合発現するプラスミドを作成する。滑膜肉腫細胞株に導入後、各蛋白の局在を確認できる系を樹立する。ヒストン脱アセチル化剤をはじめとする様々な薬剤を添加し、SYT-SSX蛋白の局在を検討する。

### 4. 研究成果

(1) SYT, SSX および SYT-SSX 蛋白に蛍光蛋白を融合発現するプラスミドを作成した。滑膜肉腫細胞株に導入後、各蛋白の局在を確認できる系を樹立した。ヒストン脱アセチル化

剤、CDK 阻害剤、NF- $\kappa$ B 阻害剤、Arsenic Pentoxide 等を含む様々な薬剤を様々な濃度で添加し、SYT, SSX および SYT-SSX 蛋白の局在を観察した。また、相互作用する可能性のある cDNA 発現ベクターを導入し、SYT-SSX 蛋白の局在を観察した。現在までのところ SYT-SSX 蛋白の局在に影響・阻害効果を与える薬剤、遺伝子は見つかっていない。

(2) 滑膜肉腫細胞をホルムアルデヒドで固定後、細胞抽出液より SYT、および、SSX に対する抗体を用いた染色体免疫沈降法 (ChIP 法) を行った。沈殿物には SYT-SSX 蛋白複合体が結合している標的遺伝子プロモーターが含まれる。そこで、DNA 断片を回収後、ライブラリーとしてベクターにクローニングし、シーケンス解析を行った。SSX の N 末に対する抗体を用いて 92 種の標的遺伝子を、SSX の C 末に対する抗体を用いて 48 種の標的遺伝子を、SSX 全長に対する抗体を用いて 112 種の標的遺伝子を、SYT に対する抗体を用いて 83 種の標的遺伝子を見いだした。さらに遺伝子を絞り込んで、エピジェネティック関連遺伝子群、蛋白合成関連遺伝子群、代謝関連遺伝子群、ミトコンドリア関連遺伝子群、膜蛋白群、細胞増殖因子群等に分類を行った。

(3) Doxycyclin 制御プロモーターの下流に SYT-SSX 遺伝子を持つ遺伝子を作成した。ヒト HEK293 細胞に導入後、Doxycyclin により安定した発現制御を受けるクローンのスクリーニングを行った。最も良いクローンを使い、Doxycyclin の存在下、非存在下で導入遺伝子の発現を確認後、RNA を回収した。現在、アレイ解析を進行中である。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

① Cai W, Sun Y, Wang W, Han C, Ouchida M,

Xia W, Zhao X, Sun B. The Effect of SYT-SSX and Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) on Cell Proliferation in Synovial Sarcoma. *Pathol Oncol Res.* 査読有、(in press) 2011 Jan 14. [Epub ahead of print]

② Numoto K, Yoshida A, Sugihara S, Kunisada T, Morimoto Y, Yoneda Y, Fujita Y, Nishida K, Ouchida M, Ozaki T. Frequent methylation of RASSF1A in synovial sarcoma and the anti-tumor effects of 5-aza-2'-deoxycytidine against synovial sarcoma cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol.* 査読有、(2010) 136:17-25

[学会発表] (計6件)

- ① Ouchida M, Kanzaki H, Ito S, Yamamoto K, Tamaru S and Shimizu K; Identification of target genes of miR-17-92 cluster by proteomic analysis. 第83回日本分子生物学会総会 2010年12月7-10日、神戸。
- ② Ouchida M, Kanzaki H, Ito S and Shimizu K; Proteomic analysis of target proteins of miR-17-92 cluster in cancer cells. 第69回日本癌学会学術総会、2010年9月22-24日、大阪。
- ③ 大内田守; 招待講演「進む癌遺伝子検査について」。財団法人福山通運渋谷長寿健康財団・脳神経センター大田記念病院主催福山市民公開講座 2009年6月6日、福山
- ④ 森本裕樹、吉田晶、大内田守、国定俊之、清水憲二、尾崎敏文; 骨肉腫患者における葉酸代謝関連遺伝子の一塩基多型の検討。第67回日本癌学会学術総会。2008年10月28-30日、名古屋。
- ⑤ 米田泰史、国定俊之、吉田晶、佐々木剛、森本裕樹、尾崎敏文、大内田守、神崎浩孝、清水憲二; The influence of various drugs and proteins on the localization of

synovial sarcoma-related proteins。第23回日本整形外科学会基礎学術集会 2008年10月23-24日、京都

⑥ 佐藤千明、吉田晶、森本裕樹、米田泰史、佐々木剛、国定俊之、大内田守、尾崎敏文; Antitumorigenic effect of the combination therapy with the histone deacetylase inhibitor, valproic acid and the methylation inhibitor, zebularine in synovial sarcoma cell。第23回日本整形外科学会基礎学術集会 2008年10月23-24日、京都

[その他]

ホームページ

[http://genet1.med.okayama-u.ac.jp/Molecular\\_Genetics/Welcome.html](http://genet1.med.okayama-u.ac.jp/Molecular_Genetics/Welcome.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大内田 守 (OUCHIDA MAMURU)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号: 80213635