

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：32644
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2022
課題番号：20K16312
研究課題名(和文) 滑膜肉腫原因融合蛋白SS18-SSXによるDNA修復異常の解明

研究課題名(英文) Role of SS18-SSX fusion oncoprotein in DNA repair

研究代表者

山崎 寛之 (YAMASAKI, Hiroyuki)

東海大学・医学部・奨励研究員

研究者番号：90837816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：滑膜肉腫は染色体転座t(X;18)(p11.2;q11.2)によって生じる悪性腫瘍である。染色体転座によって生じるSS18-SSXを線維芽細胞に発現させると、腫瘍化することから、この染色体転座が滑膜肉腫の発症に重要であることが示唆されている。本研究は滑膜肉腫における相同組換え修復不全およびPARP阻害剤高感受性の原因を解明することを目的とした。様々ながん細胞株にSS18-SSXを発現させた細胞および滑膜肉腫細胞株を用いた解析の結果、RIF1による複製ストレスの抑制が滑膜肉腫の生存に必要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

滑膜肉腫は悪性の軟部腫瘍であり、5年生存率は50-60%である。予後不良因子は、腫瘍径5cm以上、高悪性度である。転移がある場合、5年生存率は半減する。予後向上のためには再発や転移を抑制することが重要であり、術前術後の化学療法の充実が待たれる。我々の研究成果は悪性の軟部腫瘍である滑膜肉腫に対する化学療法の改良にも貢献するという社会的意義を有している。また、滑膜肉腫原因融合タンパク質SS18-SSXによるDNA修復およびDNA複製異常の解明という学術的意義も持ちうる。

研究成果の概要(英文)：Synovial sarcoma is an aggressive tumor of adolescent and young adults characterized by the chromosomal translocation t(X;18)(p11.2;q11.2). This chromosomal translocation produces a chimeric oncoprotein SS18-SSX. SS18 is involved in epigenetic remodeling, transcription, and DNA replication, as a subunit of BAF complex, which is disrupted by the SS18-SSX chimeric protein. In this study, we sought to elucidate the mechanisms by which DNA repair is impaired in synovial sarcoma and synovial sarcoma cell lines are sensitized to DNA damaging agents. Using synovial sarcoma cell lines and several cancer cell lines stably expressing SS18-SSX, we found that RNF168 and RIF1 are essential for the survival of synovial sarcoma.

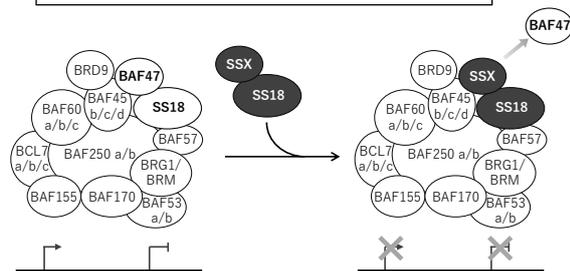
研究分野：がん

キーワード：DNA修復 滑膜肉腫

1. 研究開始当初の背景

滑膜肉腫は全軟部腫瘍の10%を占め、肺や脳などへの転移が見られる悪性の軟部腫瘍である。滑膜肉腫は染色体転座 $t(X; 18)(p11.2; q11.2)$ によって生じる SS18-SSX (SS18 [synovial sarcoma translocation, chromosome 18] と SSX [synovial sarcoma X chromosome breakpoint] の融合遺伝子) の存在を特徴とする。SS18 は転写や DNA 複製を補助する BAF 複合体の構成因子である。SS18-SSX が存在すると BAF 複合体が正常に機能しなくなり、転写異常が起きる (図1)。滑膜肉腫には DNA 損傷剤を用いた AI 療法と呼ばれる化学療法が行われるが、DNA 損傷剤が効くメカニズム、特に DNA 修復異常の有無は不明であった。我々はこれまでに、滑膜肉腫細胞では相同組換え修復に異常があり、PARP 阻害剤に対して高感受性を呈することを報告していた (Yamasaki H et al., 2016)。しかし、未だに滑膜肉腫原因融合タンパク質である SS18-SSX と滑膜肉腫における相同組換え修復不全および PARP 阻害剤高感受性の関連は不明であった。

図1. SS18-SSX による BAF complex の異常



2. 研究の目的

本研究では、滑膜肉腫原因融合タンパク質である SS18-SSX と相同組換え修復不全の関連性を明らかにし、滑膜肉腫における相同組換え修復不全および PARP 阻害剤高感受性を引き起こすメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) SS18-SSX を過剰発現させたがん細胞株における相同組換え修復活性および PARP 阻害剤感受性の解析

複数のがん細胞株に SS18-SSX を安定的に過剰発現させ、滑膜肉腫の状態を模倣した細胞および滑膜肉腫細胞において SS18-SSX の欠損させた細胞を用いて相同組換え修復の活性を調べた。相同組換え修復の指標となる RAD51 の DNA 損傷部位への集積を細胞免疫染色によって、さらに PARP 阻害剤に対する感受性を colony formation assay によって調べた。これによって、SS18-SSX と滑膜肉腫における相同組換え修復不全の関連性を明らかにできる。

(2) 滑膜肉腫細胞株における相同組換え修復不全メカニズムの解明

また、(1) で用いた SS18-SSX の過剰発現がん細胞株および滑膜肉腫細胞における SS18-SSX の欠損させた細胞を用いて、DNA 損傷応答に関わる因子のタンパク質量をウェスタンブロットで測定する。この際に、発現量に変化が見られたものが (1) で生じた SS18-SSX による相同組換え修復不全を引き起こす要因となっていると考えられる。そのため、発現量に変化が見られた因子について過剰発現もしくは発現抑制を行うことで、滑膜肉腫細胞株の相同組換え修復不全が回復するかを RAD51 の DNA 損傷部位への集積を指標に調べた。

4. 研究成果

(1) SS18-SSX を過剰発現させたがん細胞株における相同組換え修復活性および PARP 阻害剤感受性の解析

滑膜肉腫細胞株において SS18-SSX を欠損させた細胞は細胞周期が G1 期で止まってしまったため、相同組換え修復を調べられなかった。また、様々ながん細胞株に SS18-SSX を過剰発現させた細胞株において RAD51 の DNA 損傷部位への集積に異常が見られるか調べたところ、OVCAR8 細胞に SS18-SSX を過剰発現させた細胞において RAD51 の DNA 損傷部位への集積が減少していた。そこで、この細胞に対して PARP 阻害剤に対する感受性を colony formation assay によって調べたが、SS18-SSX の過剰発現は PARP 阻害剤の高感受性を呈するようにはならなかった。このことから、SS18-SSX と相同組換え修復不全との関連をはっきりとは明らかにできなかった。しかし、がん細胞株に SS18-SSX を過剰発現させた細胞では、SS18-SSX のタンパク質は G1 期においてタンパク質量が増えており、S/G2 期に減っていた。一方で、滑膜肉腫細胞株では SS18-SSX のタンパク質量は細胞周期によらず、常に一定であった。これらの観察から、SS18-SSX を過剰発現させたがん細胞株では滑膜肉腫の状態を完全には模倣できておらず、今回の実験系で結論を出すには不十分であると考えられた。そのため、SS18-SSX が細胞周期によらずに発現する条件を探

索する必要がある。滑膜肉腫は発症由来が不明な腫瘍であることを鑑みると、この条件の探索が滑膜肉腫の発症メカニズムの解明につながる可能性があると考えられる。

(2) 滑膜肉腫細胞株における相同組換え修復不全メカニズムの解明

SS18-SSXの過剰発現がん細胞株および滑膜肉腫細胞におけるSS18-SSXを欠損させた細胞を用いて、DNA損傷応答に関わる因子のタンパク質量をウェスタンブロットで測定を行った。その結果、SS18-SSX過剰発現によってRNF168の発現が増加していることが分かった。また、滑膜肉腫細胞においても高発現していた。そこで、RNF168をshRNAによって発現抑制し、相同組換え修復が回復するか調べようとしたが、滑膜肉腫細胞でRNF168の発現抑制を行うと細胞が生存できなかった。さらに、RNF168の下流で働く53BP1とRIF1の発現をsiRNAによって抑制したところ、RIF1の発現抑制のみ細胞死が起こった。これらの結果から、滑膜肉腫細胞ではRNF168およびRIF1の発現が生存に必要であることが分かった。RIF1は複製を負に制御することから、滑膜肉腫において複製ストレスの抑制が生存に必要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kato Chikara, Suzuki Yuuri, Parida Isabella Supardi, Kato Shunji, Yamasaki Hiroyuki, Takekoshi Susumu, Nakagawa Kiyotaka	4. 巻 71
2. 論文標題 Possible Glutathione Peroxidase 4-Independent Reduction of Phosphatidylcholine Hydroperoxide: Its Relevance to Ferroptosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oleo Science	6. 最初と最後の頁 1689 ~ 1694
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5650/jos.ess22281	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yagasaki Hidehiko, Takekoshi Susumu, Kitatani Kanae, Kato Chikara, Yamasaki Hiroyuki, Shioyama Kie, Tsuboi Takaaki, Matsuzaki Tomohiko, Inagaki Yutaka, Masuda Ryota, Iwazaki Masayuki	4. 巻 56
2. 論文標題 Protective effect of ebselen on bleomycin-induced lung fibrosis: analysis of the molecular mechanism of lung fibrosis mediated by oxidized diacylglycerol	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 473 ~ 482
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10715762.2022.2092477	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎寛之、谷口俊恭
2. 発表標題 脱ユビキチン化酵素USP28によるDNA二本鎖切断修復経路選択
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------