

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670643

研究課題名(和文) 滑膜肉腫特異的融合遺伝子産物によるエピジェネティック制御破綻の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying the epigenetic dysregulation by synovial sarcoma specific fusion oncoprotein

研究代表者

加藤 友久 (KATO, TOMOHISA)

京都大学・再生医科学研究所・講師

研究者番号：50301247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：我々のこれまでの FZD10 遺伝子の発現調節を指標にした研究から、SS18-SSX は FZD10 遺伝子の上流プロモーター領域に直接的に作用し、同領域のクロマチン修飾の状態を変化させることにより SS 特異的な発現の亢進をきたしていることが明らかとなった。特に、FZD10 遺伝子の発現とヒストンのアセチル化が連動していることを見出していた。そこで、ヒストンのアセチル化に関与する HAT について SS18-SSX と相互作用因子について検討した。その結果、2つの HAT (SSIH1 及び SSIH2 と命名) が SS18-SSX と相互作用し得ることを見出した。

研究成果の概要(英文)：We have been trying to unravel the molecular mechanism underlying the transcriptional dysregulation of FZD10 gene in synovial sarcomas (SSs) and have found that histone acetylation of the promoter region of FZD10 strongly correlates with up-regulation of FZD10 in SS. So, we next aimed to identify the histone acetyltransferase (HAT) responsible for this. By adopting pull-down assay followed by Western blotting, we succeeded to identify two HATs (designated as SSIH1 and 2) as the interactors of SS18-SSX. Furthermore, by using dominant-negative (DN) forms of SSIH1 and SSIH2, we have demonstrated that ectopic expression of SSIH(DN) in SS cells abrogated the expression of FZD10. This result indicates SSIH1 and SSIH2 are functionally involved in up-regulation of FZD10 in SSs. However, ChIP assay revealed that only SSIH1 occupies the FZD10 promoter region in vivo. Collectively, We have identified SSIH1 as the HAT responsible for the FZD10 dysregulation in SSs.

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 源細胞 エピジェネティクス 遺伝子発現制御 クロマチン修飾 タンパク質間相互作用 がんの起

## 1. 研究開始当初の背景

約 30 種類存在する軟部肉腫の約半数で、それぞれの腫瘍に特異的な融合遺伝子が検出されており、RT-PCR あるいは FISH による遺伝子診断は、診断確定の上で重要な補助診断法となっていた。更にその産物である融合タンパクの機能解析も進められており、その中で、滑膜肉腫(synovial sarcoma; SS)における SYT-SSX 融合タンパクは以下の点でユニークであることが知られていた。

(1) 陽性率及び特異性が極めて高い。

SS と病理診断された腫瘍のほぼ全例で検出され、かつ SS 以外の腫瘍では検出されないことより、SS の発生機構に密接に関連していると考えられる。

(2) 融合タンパクの機能がクロマチン修飾に関連している。

融合遺伝子の元となる 2 つの遺伝子産物である SS18 と SSX が持つドメイン構造から、クロマチン修飾に関連していると想定されており、事実、SYT-SSX が転写因子 ATF2 との結合を介し標的遺伝子に結合し、また、TLE1 との結合を介してクロマチン修飾因子である PRC2 や HDAC1 をリクルートすることにより、標的遺伝子の発現を負に制御していることが報告された (Su *et al.*, 2012, *Cancer Cell*)。

しかしながら、SYT-SSX が如何にして遺伝子発現を正に制御するかは未だ不明のままである。申請者らはこれまでに網羅的遺伝子発現解析の結果から、SYT-SSX によって発現が正に制御されている遺伝子の候補として、Wnt 受容体の一つである *Frizzled homologue 10 (FZD10)* を同定している (Nagayama *et al.*, 2002, *Cancer Res*)。そこでこの *FZD10* 遺伝子の発現レベルを手がかりに、SYT-SSX によって遺伝子発現が亢進する分子メカニズムを明らかにし、SS における SS18-SSX の機能の全容を明らかにすることを立案し、本研究を申請するに至った。

## 2. 研究の目的

染色体相互転座により形成される融合遺伝子の産物は、腫瘍特異的であることから、治療の標的としての可能性が注目されているが、そのためにはその機能を理解することが必要である。本申請課題では軟部肉腫の一つである SS に特異的な SS18-SSX 融合タンパクに関して、相互作用する因子の同定を通じて腫瘍細胞における機能を明らかにし、

分子標的治療の開発の糸口とすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では SS 特異的融合遺伝子産物である SS18-SSX の相互作用因子をプロテオミクス的手法により網羅的に単離することを通して、SS18-SSX の分子機能、特にエピジェネティック制御に対する影響を解明することを目的とする。先ず組み換え体 SS18-SSX タンパクを用いて pull-down 法によって SS18-SSX 相互作用因子群を精製する。次に 2 次元電気泳動で分離された各ペプチドを質量分析によって同定する。得られた SS18-SSX の相互作用因子の候補タンパク質について実際の滑膜肉腫細胞内で相互作用するが正常細胞内では相互作用しない因子を選別する。こうして得られた因子の内、滑膜肉腫細胞でのクロマチン修飾能を介した *FZD10* 遺伝子の発現制御を指標にした機能解析を行う。

(1) Pull-down 法による組み換え体 SS18-SSX タンパクに相互作用する因子の精製

申請者は既に下記の研究材料について調製済みであった。

組み換え体 GST-SYTSSX 及び GST タンパク

*SYTSSX2 variant 1* の cDNA を大腸菌内タンパク質発現用ベクターに組み込み、大量培養の系で IPTG による誘導によって組換え体タンパク質を発現させる。菌体から細胞抽出液を調製したのち、グルタチオンセファロースビーズを使って組み換え体タンパク質を精製する。申請者は、既にこの組み換え体タンパク質の最終標本を調製していた。

Pull-down 法による共沈因子の精製

滑膜肉腫細胞株より調製した核抽出液と上記組み換え体タンパク質を混合してインキュベーションしたのちにグルタチオンビーズで複合体を沈降し SS18-SSX 相互作用因子群の標本とする。

(2) Pull-down 法によって精製された GST-SYTSSX の相互作用因子の同定

上記 1. で調製した SS18-SSX 共沈因子群を質量分析 (MS) により、網羅的な同定を試みる。また、我々のこれまでの研究結果から SS18-SSX と機能的に関連が考察されたヒストンアセチル

基転移酵素 (HAT) については、主要な HAT に対する抗体を用いてウエスタンブロット法により検討をする。

(3) FZD10 の発現を指標にした、遺伝子発現を正に制御する因子の同定

同定できた因子のうち、核内因子を次の流れで解析していく。

強制発現系における相互作用の確認  
同定できた相互作用候補因子の cDNA をクローニングし、発現ベクターに挿入し、滑膜肉腫細胞株に SS18-SSX と共に強制発現させた後、免疫共沈法によって相互作用を確認する。

内在性タンパクのレベルでの相互作用の検討

当該候補因子に対する (免疫沈降に供することができる) 抗体が存在すれば、強制発現系ではなく内在性タンパクのレベルでの相互作用について検討する。また、SS18-SSX を含む複合体の滑膜肉腫細胞株中での分子動態を密度平衡超遠心法で検討し、同定できた因子が実際の細胞中で複合体を形成しているかを検討する。

RNA 干渉法による候補因子抑制の FZD10 の発現に対する影響解析

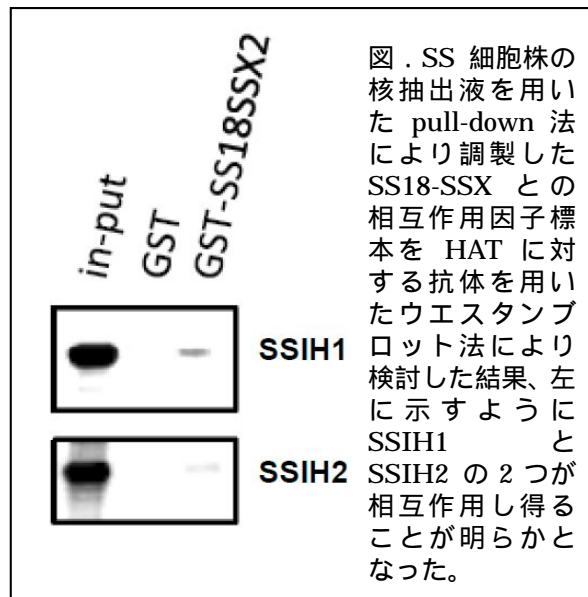
当該候補因子の遺伝子に対する siRNA を滑膜肉腫細胞株に導入し、当該因子を抑制した場合の FZD10 の発現に対する影響を検討する。

クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法による検討

当該候補因子に対する ChIP を行うことにより、その因子が FZD10 遺伝子の制御領域に結合しているかを検討する。

#### 4. 研究成果

我々のこれまでの FZD10 遺伝子の発現調節を指標にした研究から、SS18-SSX は FZD10 遺伝子の上流プロモーター領域に直接的に作用し、同領域のクロマチン修飾の状態を変化させることにより SS 特異的な発現の亢進をきたしていることが明らかとなった。特に、FZD10 遺伝子の発現とヒストンのアセチル化が連動していることを見出していた (Tamaki *et al.*, 論文投稿準備中)。そこで、ヒストンのアセチル化に關与する HAT について SS18-SSX と相互作用するものがないかについて検討した。その結果、図に示すように 2 つの HAT が SS18-SSX と相互



作用し得ることを見出した。これらを SS18-SSX interacting HAT (SSIH1 ならびに SSIH2) と名付けた。

SSIH1 及び SSIH2 は共にそれぞれの細胞内在性のタンパク質が SS18-SSX と相互作用することを免疫共沈実験で確認した。

SSIH1、SSIH2 それぞれの dominant-negative (DN) 型の変異体を作製して SS 細胞株に強制発現させると、SSIH1(DN)、SSIH2(DN) とともに FZD10 遺伝子の発現を顕著に抑制した。一方で、SSIH1 および SSIH2 の FZD10 遺伝子プロモーター領域に対する結合を ChIP 法によって検討したところ、SSIH1 のみがプロモーター領域に結合していることが明らかとなった。

以上のことより、SS18-SSX は相互作用によって SSIH1 を FZD10 遺伝子のプロモーター領域にリクルートすることによって FZD10 遺伝子の発現を亢進することが明らかになった。また、最近、正常細胞ではクロマチンリモデリング因子の一つである BAF 複合体 (mammalian SWI/SNF 複合体とも呼ばれる) には SS18 分子が元来の構成成分として存在し、相互転座によって融合遺伝子が生じると、融合遺伝子産物の SS18-SSX がそれに置き換わることによって SS 特異的な BAF 複合体へと変化することが示された (Kadoch *et al.*, 2013, *Cell*) が、我々は、この SS18-SSX と BAF 複合体の相互作用は SSIH1 との相互作用に依存することを示唆する結果を得ており、SS18-SSX - SSIH1 - BAF という巨大複合体が SS における遺伝子発現の異常に關与していることが考えられる。

我々は HAT 以外の SS18-SSX 相互作用因子を同定すべく、MS によって網羅的な解析

も行っており、転写因子を幾つか同定している。これらを含めて SS における融合遺伝子産物による遺伝子発現プログラムの破綻の側面から SS 発症の分子基盤が明らかになるものと考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

- (1) Takahashi R, Nagayama S, Furu M, Kajita Y, Jin Y, Kato T, Imoto S, Sakai Y, Toguchida J. AFAP1L1, a novel associating partner with vinculin, modulates cellular morphology and motility, and promotes the progression of colorectal cancers. *Cancer Med*; Apr 10, 2014, 査読有  
doi: 10.1002/cam4.237.

[学会発表](計 3 件)

- (1) 加藤友久、玉置さくら、早川和男、福田誠、岡本健、戸口田淳也：滑膜肉腫原因遺伝子産物 SS18-SSX の相互作用因子の同定によるエピジェネティクス制御破綻の分子基盤の解明；第 72 回日本癌学会学術総会、平成 25 年 10 月 4 日、パシフィコ横浜。
- (2) 玉置さくら、加藤友久、早川和男、福田誠、高原直子、岡本健、戸口田淳也：細胞背景は滑膜肉腫特異的融合タンパク SYT-SSX のエピジェネティック制御において重要な因子である；第 72 回日本癌学会学術総会、平成 25 年 10 月 4 日、パシフィコ横浜。
- (3) Sakura Tamaki, Makoto Fukuta, Kazuo Hayakawa, Tomohisa Kato, Junya Toguchida: SS18-SSX is a cell-context-dependent epigenetic regulator: implication for cell-of-origin of synovial sarcomas; 18<sup>th</sup> Annual Meeting of the Connective Tissue Oncology Society, October 31, 2013, New York, NY.

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 友久 (KATO TOMOHISA)  
京都大学・再生医科学研究所・講師  
研究者番号：50301247

(2)研究分担者

戸口田 淳也 (TOGUCHIDA JUNYA)  
京都大学・再生医科学研究所・教授  
研究者番号：40273502

(3)連携研究者

なし