

学位論文題名

ヒト滑膜肉腫関連キメラ蛋白 SYT-SSX1 による
癌化機構の解析

学位論文内容の要旨

I. 緒言

ヒト滑膜肉腫は比較的若年者の四肢に発生する腫瘍で、悪性軟部腫瘍の約 5.6~10% を占める。細胞遺伝学的検索により、18 番染色体と X 染色体の相互転座 t(X;18)(p11.2;q11.2) が 90% 以上の症例に認められ、その転座切断点近傍の解析により 18 番染色体上に SYT 遺伝子が、X 染色体上に SSX 遺伝子が単離同定された。滑膜肉腫では t(X;18) の相互転座により SYT の C 末 8 アミノ酸が SSX の C 末 78 アミノ酸に置換される。この SYT-SSX キメラ遺伝子の発現が高頻度に認められることから、発癌の原因遺伝子と考えられているが、現在まで SYT-SSX キメラ遺伝子の形質転換能を直接検討した報告はない。本研究において、我々は SYT-SSX 蛋白を発現するラット線維芽細胞由来 3Y1 を作成し、その形質転換能および形質転換機構について検討した。

II. 方法と結果

ヒト滑膜肉腫と精巢の切除材料から RT-PCR 法によりそれぞれ SYT-SSX1, SSX1 および SYT の cDNA を増幅し、哺乳動物発現ベクター pCXN2 に組み込み、ラットの線維芽細胞由来 3Y1 細胞に遺伝子導入し、SYT-SSX1, SSX1 および SYT の安定発現細胞株を樹立した。

SYT-SSX1 と SSX1 および SYT の細胞増殖に対する影響を検討するため、10% FCS および 2% FCS 存在下でその増殖速度を比較した。SYT-SSX1 発現細胞は対照群と比較して有意に増殖速度が亢進していた。

SYT-SSX1, SSX1 および SYT の形質転換能の指標として、軟寒天培地でのコロニー形成の有無の観察を行った。SYT-SSX1 発現細胞株ではコロニーが多数見られ、SSX1 発現細胞株においてもごく少数の小コロニーが形成された。SYT 発現細胞株および 3Y1 細胞ではコロニー形成は認められなかった。

SYT-SSX1 の形質転換能をさらに確認するため、ヌードマウスでの造腫瘍能を検討した。SYT-SSX1, SSX1, SYT 発現細胞および 3Y1 細胞をヌードマウスの皮下に接種し、3 週間後の状態を観察した。SYT-SSX1 発現細胞では皮下に直径 2cm 大の腫瘍が形成された。SSX1 発現細胞, SYT 発現細胞, および 3Y1 細胞では腫瘍形成はみられなかった。

次に SYT-SSX1 の形質転換における機能ドメインについて検討した。SYT-SSX1 の各種欠失変異体を作成し、これらの欠失変異体を 3Y1 細胞に安定発現させ軟寒天培地でのコロニー形成能を比較した。SYT-SSX1 の N 末 181 アミノ酸を欠失した欠失変異体においてはコロニーが形成されなかったことから SYT-SSX1 の N 末 181 アミノ酸が形質転換には必須のドメインである事が示唆された。

1999 年, Thaete らによって SYT-SSX1 がクロマチンリモデリング因子 hBRM と同じ局在を示す事が報告された。われわれは、SYT-SSX1 によって形質転換した 3Y1 細胞およびヒト滑膜肉腫由来の細胞株である HS-SYII 細胞において SYT-SSX1 蛋白と hBRM との結合の有無を検討した。形質転換した 3Y1 細胞および HS-SYII 細胞の抽出液を抗 SSX 抗

体にて沈降し、抗hBRM抗体でウェスタンブロットを行ったところ、SYT-SSX1とhBRMが*in vivo*において結合する事が示された。

SYT-SSX1のhBRMに対する結合領域を検索するためにSYT-SSX1の欠失変異体とhBRMの結合能を検討した。N末181アミノ酸の欠失変異体がhBRMと結合能を失うことが示された。

SYT-SSX1のN末181アミノ酸の欠失変異体が形質転換能を失い、またhBRMとの結合能を失った事からSYT-SSX1がクロマチンリモデリング因子hBRMを介して形質転換する事が示唆された。そこでhBRMのSYT-SSX1結合領域の必要性を示すためにhBRMのSYT-SSX1との結合領域をSYT-SSX1により形質転換した3Y1細胞発現させ、軟寒天培地中でのコロニー形成を観察した。hBRMについて欠失変異体を作成しSYT-SSX1がhBRMの156から205アミノ酸部分と結合する事を確認後、このhBRMの156-205アミノ酸および1-333アミノ酸を発現するベクターをSYT-SSX1により形質転換した3Y1細胞に安定発現させ、軟寒天培地でのコロニー形成を検討したところ、コロニー形成が有意に抑制された。これは、hBRMのSYT-SSX1との結合領域がdominant negativeとしての効果を持つと考えられ、SYT-SSX1がクロマチンリモデリング因子hBRMを介して形質転換する事が示唆された。

SYT-SSX1がクロマチンリモデリング因子hBRMを介して形質転換することからSYT-SSX1は何らかの遺伝子の転写の制御を介して形質転換する事が予測された。そこで遺伝子発現制御システムであるTet-Offシステムを利用して、テトラサイクリン依存性にSYT-SSX1の発現が誘導される3Y1細胞株を樹立し、この細胞を用いて、クローンテックcDNA expression arrayにて1176個の遺伝子のmRNAの発現量の変化を検討した。SYT-SSX1遺伝子の発現により、癌抑制遺伝子であるWT1およびDCCの発現が抑制され、DCCの発現抑制は半定量的RT-PCRにて再確認された。

III. 考察

滑膜肉腫の90%以上の症例において18番染色体とX染色体の相互転座に起因するSYT-SSX遺伝子の発現が認められているが、現在までその形質転換能を直接検討した報告は無い。本研究ではSYT-SSX1を安定発現する3Y1細胞の増殖速度が有意に亢進し、軟寒天培地にコロニーを形成し、またヌードマウスの皮下および腹腔内に腫瘍を形成したことから、SYT-SSX1蛋白がラット線維芽細胞由来3Y1細胞において悪性形質転換能をもつことを証明した。またSYT-SSX1の機能ドメイン解析においてN末181アミノ酸が必須のドメインであることが証明された。野生型SYTの発現ではhBRMとの結合能が保存されているにもかかわらず、形質転換が認められないことより、C末のSSXが形質転換に必須であると考えられる。本研究において、滑膜肉腫細胞株HS-SYIIおよび、SYT-SSX1による形質転換細胞においてはじめてSYT-SSX1とhBRMの*in vivo*での結合が証明された。hBRMはクロマチン構造を変換し遺伝子の発現調節しているクロマチンリモデリング複合体のサブユニットの一つであり、ATPaseドメインを有する中心的な構成要素である。hBRMのSYT-SSX1との結合領域がSYT-SSX1による形質転換を抑制したことから、SYT-SSX1がhBRMと結合を介し癌化していることを証明した。hBRMがいろいろな遺伝子の転写調節に関わっていることを考えると、この結合により種々の遺伝子の転写が変化している可能性がある。SYT-SSX1の発現誘導により癌抑制遺伝子であるDCCの発現抑制が確認され、SYT-SSX1の標的遺伝子の1つである可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 浪 明 男
副 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 西 信 三

学 位 論 文 題 名

ヒト滑膜肉腫関連キメラ蛋白 SYT-SSX1 による 癌化機構の解析

ヒト滑膜肉腫は悪性軟部腫瘍の約 5.6~10%を占める。18 番染色体と X 染色体の相互転座が 90%以上の症例に認められ、その転座切断点近傍の解析により 18 番染色体上に SYT 遺伝子が、X 染色体上に SSX 遺伝子が単離同定された。SYT の C 末 8 アミノ酸が SSX の C 末 78 アミノ酸に置換した SYT-SSX キメラ蛋白の発現が高頻度に認められることから、SYT-SSX は発癌の原因遺伝子と考えられている。本研究において、我々は SYT-SSX 蛋白を発現するラット線維芽細胞由来 3Y1 を作成し、その形質転換能および形質転換機構について検討した。

ヒト滑膜肉腫と精巢の切除材料から RT-PCR 法によりそれぞれ SYT-SSX1, SSX1 および SYT の cDNA を増幅し、哺乳動物発現ベクター pCXN2 に組み込み、ラットの線維芽細胞由来 3Y1 細胞に遺伝子導入し、SYT-SSX1, SSX1 および SYT の安定発現細胞株を樹立した。

細胞増殖速度を検討したところ SYT-SSX1 発現細胞は有意に増殖速度が亢進していた。また、形質転換能の指標として、軟寒天培地でのコロニー形成を観察を行ったところ SYT-SSX1 発現細胞株ではコロニーが多数形成された。さらに SYT-SSX1, SSX1, SYT 発現細胞および 3Y1 細胞をヌードマウスの皮下に接種したところ 3 週間後には SYT-SSX1 発現細胞でのみ皮下に直径 2cm 大の腫瘍が形成された。

次に SYT-SSX1 の形質転換における機能ドメインについて検討した。SYT-SSX1 の各種欠失変異体を作成し、これらの欠失変異体を 3Y1 細胞に安定発現させ軟寒天培地でのコロニー形成能を比較した。SYT-SSX1 の N 末 181 アミノ酸を欠失した欠失変異体においてはコロニーが形成されなかったことから SYT-SSX1 の N 末 181 アミノ酸が形質転換には必須のドメインである事が示唆された。

1999 年、Thaete らによって SYT-SSX1 がクロマチンリモデリング因子 hBRM と同じ局在を示す事が報告されたことから、われわれは、SYT-SSX1 によって形質転換した 3Y1 細胞およびヒト滑膜肉腫由来の細胞株である HS-SYII 細胞において SYT-SSX1 蛋白と hBRM との結合の有無を免疫沈降法を用いて検討し、SYT-SSX1 と hBRM が *in vivo* において結合する事を証明した。

SYT-SSX1 の欠失変異体と hBRM の結合能を検討した。N 末 181 アミノ酸の欠失変異体が hBRM と結合能を失うことが示された。

SYT-SSX1 の N 末 181 アミノ酸の欠失変異体が形質転換能を失い、また hBRM との結合能を失った事から SYT-SSX1 がクロマチンリモデリング因子 hBRM を介して形質転換する事が示唆された。そこで hBRM の SYT-SSX1 結合領域の必要性を示すために hBRM

の SYT-SSX1 との結合領域を SYT-SSX1 により形質転換した 3Y1 細胞に安定発現させ、軟寒天培地中でのコロニー形成を観察したところ、コロニー形成が有意に抑制された。これは、hBRM の SYT-SSX1 との結合領域が dominant negative としての効果を持つと考えられ、SYT-SSX1 がクロマチンリモデリング因子 hBRM を介して形質転換する事が示唆された。

SYT-SSX1 の転写の標的遺伝子を調べるためにテトラサイクリン依存性に SYT-SSX1 の発現が誘導される 3Y1 細胞株を樹立し、この細胞を用いて、cDNA マイクロアレイにて 1176 個の遺伝子の mRNA の発現量の変化を検討した。SYT-SSX1 遺伝子の発現により、癌抑制遺伝子である WT1 および DCC の発現が抑制され、DCC の発現抑制は半定量的 RT-PCR にて再確認された。

本研究では SYT-SSX1 を安定発現する 3Y1 細胞の増殖速度が有意に亢進し、軟寒天培地にコロニーを形成し、またヌードマウスの皮下および腹腔内に腫瘍を形成したことから、SYT-SSX 蛋白がラット線維芽細胞由来 3Y1 細胞において悪性形質転換能をもつことを証明した。また SYT-SSX1 の N 末 181 アミノ酸が形質転換に必須のドメインであることが証明された。滑膜肉腫細胞株 HS-SYII および、SYT-SSX1 による形質転換細胞においてはじめて SYT-SSX1 と hBRM の *in vivo* での結合が証明された。hBRM はクロマチン構造を変換し遺伝子の発現調節しているクロマチンリモデリング複合体のサブユニットの一つであり、ATPase ドメインを有する中心的な構成要素である。hBRM の SYT-SSX1 との結合領域が SYT-SSX1 による形質転換を抑制したことから、SYT-SSX1 が hBRM と結合を介し癌化していることを証明した。SYT-SSX1 の発現誘導により癌抑制遺伝子である DCC の発現抑制が確認され、SYT-SSX1 の標的遺伝子の 1 つである可能性が示唆された。

この論文は SYT-SSX1 遺伝子が形質転換能を有することを証明したものであり、その癌化がクロマチンリモデリング因子である hBRM を介していることを明らかにしており、高く評価され、今後これらの成果は滑膜肉腫への遺伝子治療への可能性をも開くものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の単位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。