

癌精巣抗原 SSX1 を介する細胞増殖制御機構の解析

学位論文内容の要旨

I. 緒言

滑膜肉腫は若年成人の四肢、関節近傍に好発する悪性軟部腫瘍で、腫瘍細胞には特徴的な染色体相互転座 t(X;18)(p11.2;q11.2) が認められ、それによりキメラ遺伝子 SYT-SSX が形成される。SYT-SSX 遺伝子は 18 番染色体上の synovial sarcoma translocation (SYT) 遺伝子と X 染色体上の synovial sarcoma X breakpoint (SSX) 遺伝子が融合することによって形成されており、SSX 遺伝子のホモログの中では SSX1 と SSX2 が主にキメラ遺伝子の形成に関与する。近年、SYT-SSX1 遺伝子が検出される滑膜肉腫と SYT-SSX2 遺伝子が検出される滑膜肉腫では予後に差異があることが見い出され、これらの組織抽出液中では Cyclin D1 や Cyclin A の発現量に差があることが報告されている。

SSX1 は 188 アミノ酸からなる分子量約 27 kDa の蛋白で、正常組織では主として精巣に発現が認められ、胸腺に弱い発現を示す。また、一部の悪性腫瘍にも発現が認められるため癌精巣抗原の一つに属する。SSX1 の N 末端には転写抑制因子と相同性のある Krüppel-associated box like domain (KRAB like domain) が存在し、C 末端の 33 アミノ酸からなる SSX repressor domain (SSXRD) は転写抑制能を有することが、人工的な転写活性系において示されている。SSX は既知の DNA 結合配列を持たないため、何らかの蛋白と結合することでその機能を果たすと予測されていたが、最近、一過性発現系において SSX1 がヒストン H2A バリエーションと結合することが報告されている。また、SSX は RING1、BMI1 などの Polycomb 遺伝子産物と共局在することが報告されている。しかしながら、SSX の明らかな機能はいまだ不明であり、そのため SYT-SSX による癌化誘導のメカニズムにも不明な点が多い。

本研究では、SSX1 分子が、コアヒストンのみならずヒストン修飾酵素のいずれかと相互作用することで転写抑制機能の役割を果たすと仮定し、SYT、SYT-SSX1、SSX1 とヒストン H3K9 特異的メチル化酵素 SUV39H1 の結合解析を行った。その結果、SSX1 のみが SUV39H1 と共沈することが判明した。さらに、内在的に SSX1 を発現しているヒト線維肉腫細胞株において、SSX1 過剰発現系で Cyclin D1 蛋白発現量が低下した。以上より、SSX1 はヒストン修飾分子と結合し、細胞周期関連分子の発現量を調節することが示唆された。

II. 結果

1. 免疫沈降法による SSX1 と SUV39H1 との結合解析

293T 細胞に SSX1 とヒストン H3K9 特異的メチル化酵素である SUV39H1 を一過性に共発現させ、免疫沈降を行い解析した。さらに、SYT および滑膜肉腫原因キメラ遺伝子産物 SYT-SSX1 についても同様に SUV39H1 との結合の解析を行った。その結果、SUV39H1 を沈降させた場合に SSX1 の共沈が確認された。一方、SYT や SYT-SSX1 はいずれも SUV39H1 との共沈は認めなかった。

2. SSX1 発現細胞におけるヒストン H3 の K9 メチル化の解析

SSX1 は SUV39H1 と相互作用している可能性が示唆されたため、SUV39H1 のメチル化ターゲットであるヒストン H3 の 9 番リジン残基(H3K9)のメチル化およびアセチル化状態について、HeLa 細胞に SSX1 を一過性に発現させて、H3K9 のメチル化、アセチル化状態の違いを特異的に認識する抗体を使用してウェスタンブロット法にて解析を行った。その結果、SSX1 の発現細胞と対照群との間にはメチル化・アセチル化いずれにおいても明確な差は認められなかった。

3. Cyclin D1 蛋白発現量の解析

SUV39H1 はヒストン H3K9 のメチル化の他に、分化初期の細胞において Cyclin D1 の発現に関わる可能性が示唆されている。また、滑膜肉腫細胞において SYT-SSX1 を発現している細胞は SYT-SSX2 を発現している細胞に比して Cyclin D1 の発現量が亢進していることが報告されている。これらより、SSX1 の発現が Cyclin D1 の蛋白発現量に影響を与えるかどうかを検討するため、HeLa 細胞、HT1080 細胞、SYO1 細胞において SSX1 を一過性に過剰発現させて抗 Cyclin D1 抗体にて Cyclin D1 蛋白発現量を解析した。その結果、HT1080 細胞では Cyclin D1 蛋白発現量の低下が認められたが、HeLa 細胞、SYO1 細胞においては Cyclin D1 蛋白発現量に明らかな変化は認められなかった。次に、HT1080 細胞において SSX1 に対する siRNA を導入し内在的 SSX1 をノックダウンして Cyclin D1 蛋白発現量を検討したところ、Cyclin D1 発現量には明らかな差は認めなかった。

4. 細胞周期同期時の Cyclin D1 蛋白発現量の解析

さらに詳細な検討を行うため、我々は SSX1 を安定的に発現する HT1080 細胞株を樹立した (HTX-10)。Serum starvation 法によって調整した G0 期同期細胞抽出液と nocodazole 法によって調整した G1 後期同期細胞抽出液を用いて Cyclin D1 の蛋白発現量を解析した。また、HT1080 細胞に SSX1 に対する siRNA を導入した細胞においても同様の解析を行った。その結果、G0 期同期検体では SSX1 定常発現系、SSX1 ノックダウン系いずれにおいても Cyclin D1 蛋白発現量に明らかな変動は観察されなかったが、G1 後期同期細胞においては SSX1 定常発現時に対照に比べ Cyclin D1 の蛋白発現量に低下が認められた。また、SSX1 ノックダウンを行った G1 後期同期細胞においては逆に Cyclin D1 蛋白の発現量が微増した。

5. デュアルルシフェラーゼアッセイ法による SSX1 の Cyclin D1 転写活性能の解析

SSX1 が Cyclin D1 の転写を制御する可能性を検討するために、HT1080 一過性発現系にてデュアルルシフェラーゼアッセイ法を用いて SSX1 の Cyclin D1 遺伝子プロモーターに対する転写活性能を解析した。その結果、SSX1 強制発現系では対照に比べルシフェラーゼ活性が約 3 倍程度上昇することが観察された。SSX1 ノックダウン系においては有意差は認められなかった。また SYT-SSX1 および SYT についても同様の解析を施行したところ、SYT-SSX1 では対照に比べルシフェラーゼ活性が約 4 倍程度上昇した。また、SYT ではルシフェラーゼ活性の上昇は認められなかった。

6. RT-PCR 法による Cyclin D1 mRNA の発現解析

SSX1 過剰発現時の Cyclin D1 蛋白発現量と転写活性能に逆相関関係が認められたため、mRNA 発現量を HT1080 細胞一過性発現系において半定量的 RT-PCR 法を用いて解析した。その結果、対照に比べ SSX1 や SYT を一過性に発現させた群には顕著な差は認められなかった。一方、SYT-SSX1 を一過性発現させた群では対照に比べて軽度の Cyclin D1/GAPDH 比の低下が認められた。

7. SSX1 定常発現系を用いた増殖曲線解析

SSX1 の一過性発現および定常発現により Cyclin D1 の蛋白量に変化が認められたことから、我々は HTX-10 細胞 (HT1080 細胞 SSX1 定常発現株) を用いて細胞増殖性について検討した。10% 牛胎児血清存在下の培養条件にて解析を行ったが、対照細胞と比して増殖能の有意な変化は認めなかった。

III. 結語

本研究により、一過性発現系における免疫沈降にて、SSX1 は SUV39H1 と共沈することが示された。さらに、HT1080 細胞の一過性発現系および定常発現株において、SSX1 の発現は Cyclin D1 蛋白の発現量を低下させることが示された。SSX1 は細胞周期依存的に Cyclin D1 蛋白の発現量を調節する可能性が示唆され、SSX1 の導入により、Cyclin D1 の転写活性は軽度増加することが明らかとなったが、Cyclin D1 の mRNA 量は一定で低下が認められなかった。癌精巢抗原 SSX の機能を解析することは、キメラ蛋白 SYT-SSX の癌化能の解明にも繋がる可能性があり、SSX や SYT-SSX1 を介する細胞増殖制御機構を検討することは、滑膜肉腫の治療法開発にも有用であると考えられる。現在、SSX1 が Cyclin D1 の蛋白発現量を低下させる機構は不明であるが、今後 Cyclin D1 の蛋白分解機構を検討することで、SSX1 の機能を詳細に解析できると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 笠 原 正 典
副 査 教 授 瀬 谷 司
副 査 教 授 畠 山 鎮 次
副 査 教 授 田 中 一 馬

学位論文題名

癌精巢抗原 SSX1を介する細胞増殖制御機構の解析

滑膜肉腫は若年成人の四肢，関節近傍に好発する悪性軟部腫瘍で，腫瘍細胞には特徴的な染色体相互転座 $t(X;18)(p11.2;q11.2)$ が認められ，それによりキメラ遺伝子 **SYT-SSX** が形成される．**SYT-SSX** 遺伝子は 18 番染色体上の **synovial sarcoma translocation (SYT)** 遺伝子と X 染色体上の **synovial sarcoma X breakpoint (SSX)** 遺伝子が融合することによって形成されており，**SSX** 遺伝子のホモログの中では **SSX1** と **SSX2** が主にキメラ遺伝子の形成に関与する．近年，**SYT-SSX1** 遺伝子が検出される滑膜肉腫と **SYT-SSX2** 遺伝子が検出される滑膜肉腫では予後に差異があることが見い出され，これらの組織抽出液中では **Cyclin D1** や **Cyclin A** の発現量に差があることが報告されている．

SSX1 は 188 アミノ酸からなる分子量約 27 kDa の蛋白で，正常組織では主として精巣に発現が認められ，胸腺に弱い発現を示す．また，一部の悪性腫瘍にも発現が認められるため癌精巢抗原の一つに属する．**SSX1** の N 末端には転写抑制因子と相同性のある **Krüppel-associated box like domain (KRAB like domain)** が存在し，C 末端の 33 アミノ酸からなる **SSX repressor domain (SSXRD)** は転写抑制能を有することが，人工的な転写活性系において示されている．**SSX** は既知の DNA 結合配列を持たないため，何らかの蛋白と結合することでその機能を果たすと予測されていたが，最近，一過性発現系において **SSX1** がヒストン H2A バリエントと結合することが報告されている．また，**SSX** は **RING1**，**BMI1** などの **Polycomb** 遺伝子産物と共局在することが報告されている．しかしながら，**SSX** の明らかな機能はいまだ不明であり，そのため **SYT-SSX** による癌化誘導のメカニズムにも不明な点が多い．

本研究では，**SSX1** 分子が，コアヒストンのみならずヒストン修飾酵素のいずれかと相互作用することで転写抑制機能の役割を果たすと仮定し，**SYT**，**SYT-SSX1**，**SSX1** とヒストン H3K9 特異的メチル化酵素 **SUV39H1** の結合解析を行った．その結果，**SSX1** のみが **SUV39H1** と共沈することが判明した．さらに，内在的に **SSX1** を発現しているヒト線維肉腫細胞株において，**SSX1** 過剰発現系で **Cyclin D1** 蛋白発現量が低下した．以上より，**SSX1** はヒストン修飾分子と結合し，細胞周期関連分子の発現量を調節することが示唆された．

口頭発表に当たり、副査の田中教授より、*SYT-SSX1* 遺伝子一過性発現時の Cyclin D1 発現量の変化の有無、*SYT*、*SYT-SSX1* 遺伝子の癌化に及ぼす影響、*SYT-SSX1* の構造と *SSX1* の構造の相違点、ヒストンメチル化が蛋白制御に及ぼす影響、*SYT-SSX1* の局在等に関する質問があった。また副査の瀬谷教授より *SSX1* が polycomb complex を形成する可能性について、*SSX1* が癌化に関わっているとしたらそのメカニズムは何か、*SUV39* と *SYT-SSX1* などの集合体が癌化に及ぼす影響等に関する質問があった。さらに副査の畠山鎮次教授より phenotype に変化の生じた細胞が HT1080 細胞だけであったかどうかの確認、HT1080 細胞と A375M 細胞の共通点、細胞周期調整に nocodazole を用いた理由、Cyclin D1 発現の変化を他の Rb 蛋白リン酸化などの解析を用いて確認したかどうか等の質問があった。最後に主査の笠原教授より *SSX1* と結合する蛋白として *SUV39* を用いた理由等についての質問、指摘があった。これらの質問に対して申請者はおおむね適切な回答を行った。

この論文は従来まで機能が不明であった *SSX1* がヒストン修飾酵素である *SUV39H1* と結合することを明らかにし、また *SSX1* が Cyclin D1 の蛋白発現を制御することを明らかにした点で優れていると判断され、今後の *SSX1* 遺伝子産物の生理機能を明らかにする上で貴重な示唆を与えたものと考えられた。

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)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。