慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	滑膜肉腫における変異SWI/SNFクロマチン制御複合体の機能解析
Sub Title	Oncogenic role of aberrant SWI/SNF chromatin remodeling complex in synovial sarcoma
Author	中山, タラントロバート(Nakayama, Robert)
Publisher	
Publication year	2020
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2019.)
JaLC DOI	
Abstract	滑膜肉腫は、思春期から若年成人に好発する代表的な悪性軟部腫瘍 (肉腫) である。原因と考えられる融合遺伝子SS18-SSXのがん化に関わる機能は未解明な点が多い。本研究では、SS18がクロマチン制御SWI/SNF複合体のサブユニットであることに注目し、SS18-SSXを有する変異SWI/SNF複合体の機能異常が滑膜肉腫のがん化に関与するという仮説のもと、滑膜肉腫細胞株のSS18-SSXをノックダウンし、変異SWI/SNF複合体の分子生物学的機能を解析した。結果、SS18-SSXを含む変異SWI/SNF複合体による滑膜肉腫に特徴的な遺伝子発現制御の異常を明らかにした。 Synovial sarcoma is one of the common malignant soft tissue sarcomas in adolescent and young adult patients. Nearly 100% of tumors contain the pathognomonic t(X;18)(p11.2;q11.2) chromosomal translocation that produces the hallmark SS18-SSX fusion protein. Given that SS18 is a dedicated subunit of SWI/SNF chromatin remodeling complexes, we hypothesized that malfunction of the aberrant SWI/SNF complexes that contain the SS18-SSX fusion should be responsible for the development of synovial sarcoma, and conducted biochemical analyses by knocking down the SS18-SSX gene in synovial sarcoma cell lines. Our study demonstrated that SS18-SSX globally hijacked BAF complexes on chromatin to activate a transcriptional signature specific to synovial sarcoma.
Notes	研究種目 : 基盤研究 (C) (一般) 研究期間 : 2017 ~ 2019 課題番号 : 17K10985 研究分野 : 医学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_17K10985seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ５ 月 ２６ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：１７Ｋ１０９８５

研究課題名（和文）滑膜肉腫における変異SWI/SNFクロマチン制御複合体の機能解析

研究課題名（英文）Oncogenic role of aberrant SWI/SNF chromatin remodeling complex in synovial sarcoma

研究代表者
中山　タラントロバート（Nakayama, Robert）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：００３６５２９８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,500,000円

研究成果の概要（和文）：滑膜肉腫は、思春期から若年成人に好発する代表的な悪性軟部腫瘍（肉腫）である。原因と考えられる融合遺伝子SS18-SSXのがん化に関わる機能は未解明な点が多い。本研究では、SS18がクロマチン制御SWI/SNF複合体のサブユニットであることに注目し、SS18-SSXを有する変異SWI/SNF複合体の機能異常が滑膜肉腫のがん化に関与するという仮説のもと、滑膜肉腫細胞株のSS18-SSXをノックダウンし、変異SWI/SNF複合体の分子生物学的機能を解析した。結果、SS18-SSXを含む変異SWI/SNF複合体による滑膜肉腫に特徴的な遺伝子発現制御の異常を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
滑膜肉腫は思春期から若年成人に発生する代表的な悪性軟部腫瘍である。進行例に対する有効な治療法がないため、疾患特異的融合遺伝子SS18-SSXによる発がん機構を標的とした新規治療の開発に期待が高まっており、SS18-SSXの機能解析をおこなった本研究の成果はそれに向けた新規知見を提供した。さらに、本研究の成果は、SWI/SNF複合体の異常によって生じる様々な疾患における病態解明のモデルを提供した、という点で、非常に重要である。

研究成果の概要（英文）：Synovial sarcoma is one of the common malignant soft tissue sarcomas in adolescent and young adult patients. Nearly 100% of tumors contain the pathognomonic t(X;18)(p11.2;q11.2) chromosomal translocation that produces the hallmark SS18-SSX fusion protein. Given that SS18 is a dedicated subunit of SWI/SNF chromatin remodeling complexes, we hypothesized that malfunction of the aberrant SWI/SNF complexes that contain the SS18-SSX fusion should be responsible for the development of synovial sarcoma, and conducted biochemical analyses by knocking down the SS18-SSX gene in synovial sarcoma cell lines. Our study demonstrated that SS18-SSX globally hijacked BAF complexes on chromatin to activate a transcriptional signature specific to synovial sarcoma.

研究分野：医学

キーワード：発がん　遺伝子　ゲノム　トランスレーショナル・リサーチ　融合遺伝子　SWI/SNF複合体　肉腫　滑膜肉腫

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

（1）滑膜肉腫について

滑膜肉腫は、思春期から若年成人に好発する代表的な悪性軟部腫瘍である。四肢関節近傍に発生し、病理学的に上皮への分化を示すことから関節の滑膜組織由来と考えられ、滑膜肉腫と呼ばれているが、その起源となる細胞は不明である。病因としては、腫瘍特異的染色体転座 t(X;18)(p11;q11)、およびそれに伴う融合遺伝子 SS18-SSX の発現をほぼ全例で認めるため、その融合遺伝子 SS18-SSX が発がんに深く関与していることが示唆されているが、その機能に関しては不明な点が多い。滑膜肉腫の治療は原則外科的切除であるが、進行例に対する治療が限られているため、SS18-SSX による発がん機構を標的とした新規治療の開発に対する期待が高まっている。

（2）SWI/SNF 複合体について

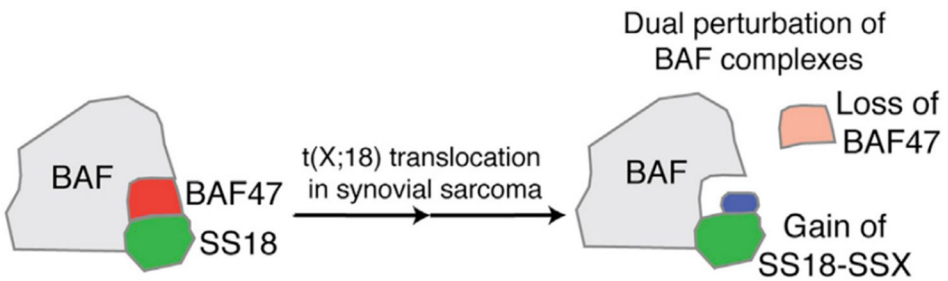
SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable)複合体は、酵母における接合型変換、およびショ糖（Sucrose）の代謝にかかわる遺伝子群として同定され、機能解析が行われたクロマチンリモデリング複合体である。酵母、ショウジョウバエに続いて哺乳類の SWI/SNF 複合体も同定されている。哺乳類 SWI/SNF 複合体は、SNF2 ヘリカーゼ様 ATPase ドメインに加え、ヒストンのアセチル化残基に結合するブロモドメインをもつ SMARCA4（BRG1）あるいは SMARCA2（BRM）を有することから、BAF 複合体 (BRG1/BRM-associated factor complexes)とも呼ばれる。

ヒト SWI/SNF（BAF）複合体は 1-1.5MDa の蛋白複合体と考えられ、そのサブユニットとしてこれまで 29 遺伝子が同定されている。様々な発生、分化段階における、各サブユニットの役割や各複合体亜型の機能的な相違については未解明な点が多く、今後の研究進展が期待されている。

ゲノムシークエンスが普及したこの数年で、様々な疾患で SWI/SNF 複合体サブユニットの変異が同定されている。重度の知的障害、成長障害、特異的顔貌、手足の低形成を主徴とする先天異常の Coffin-Siris 症候群の責任遺伝子として ARID1A/B（BAF250A/B）、SMARCA4（BRG1）、SMARCE1（BAF57）、SMARCB1（BAF47）、さらにその類縁疾患である Nicolaides-Baraitser 症候群の責任遺伝子として SMARCA2（BRM）が同定された。いずれの遺伝子も SWI/SNF 複合体の主要なサブユニットであり、これまでの報告から、両症候群の病態には SWI/SNF 複合体の機能異常が深く関与していることが明らかである。これは、SWI/SNF 複合体がヒトの発生において極めて重要な役割を担うことを示唆するのみならず、各サブユニットの変異が SWI/SNF 複合体の機能異常を介して表現型に寄与することが示唆され、生物学的にも極めて興味深い。
一方、がんの領域では、エクソームシーケンシングの結果、解析された悪性腫瘍の約 20%で SWI/SNF 複合体サブユニットの変異を認めた。これは他のクロマチンリモデリング複合体における変異の頻度と比較して圧倒的に多い。様々な SWI/SNF 複合体サブユニットの変異が報告されているが、特筆すべきは、各サブユニットの変異の頻度に癌種による偏りがあること、すなわち、がん化における各サブユニットの重みが組織によって異なることである。中には、疾患（がん）特異的に変異を認める SWI/SNF 複合体サブユニットもあり、その代表例が悪性ラブドイド腫瘍 malignant rhabdoid tumor(MRT)、異型奇形腫瘍／ラブドイド腫瘍 atypical teratoid/rhabdoid tumor(AT/RT)、類上皮肉腫における SMARCB1（BAF47）の欠損や、滑膜肉腫の融合遺伝子 SS18-SSX である。

（3）滑膜肉腫と SWI/SNF（BAF）複合体

滑膜肉腫では、SS18 の C 末端 8 アミノ酸が、SSX1、2、4 の C 末端 78 アミノ酸に置き換わることで融合遺伝子 SS18-SSX が形成されるが、その SS18-SSX の機能解析にはこれまで大きな進展がみられなかった。ところが近年、SS18 が SWI/SNF 複合体のサブユニットであることが同定され、滑膜肉腫特異的融合遺伝子 SS18-SSX も SWI/SNF（BAF）複合体に結合することが示された。さらに、融合遺伝子 SS18-SSX の結合に伴い、SWI/SNF 複合体のサブユニットの中でも、腫瘍抑制遺伝子として知られる SMARCB1（BAF47）が複合体に結合できなくなり、分解され、タンパク質発現量が著明に低下することが示された。



２．研究の目的

滑膜肉腫の疾患原因と考えられる、融合遺伝子 SS18-SSX の機能は未だ十分に解明されていない。本研究では、「滑膜肉腫特異的融合遺伝子 SS18-SSX の結合した変異 SWI/SNF 複合体の機能異常ががん化に関与する」という仮説の下、滑膜肉腫における変異 SWI/SNF（BAF）複合体の分子生物学的機能解析を行った。

３．研究の方法

本研究期間内に、SS18-SSX 発現滑膜肉腫細胞株、SMARCB1 欠損悪性ラブドイド腫瘍細胞株、類上皮肉腫細胞株を収集した。収集した細胞株を培養し、全細胞抽出物、細胞質抽出物、および核抽出物を採取した。核抽出物から、SS18、SS18-SSX、SMARCB1、その他 SWI/SNF（BAF）複合体の代表的なサブユニットの発現を解析した。さらに、主要サブユニットに対する抗体を用いた免疫沈降法により、各サブユニットの SWI/SNF（BAF）複合体への結合を確認した。

SS18-SSX 発現滑膜肉腫細胞株、SMARCB1 欠損悪性ラブドイド腫瘍細胞株、類上皮肉腫細胞株を用いて、SS18、SS18-SSX、および SMARCB1 の発現を強制的に調整して、細胞増殖アッセイ、プロテオーム解析（タンパク質発現解析、免疫沈降法、その他）を行い、比較検討した。

【レンチウィルスを用いた目的遺伝子の導入】

SS18、SS18-SSX、SMARCB1 それぞれのレンチウィルス等を用いた発現ベクター、およびノックダウン（shRNA）ベクターの作成し、強制的な発現調節の実験系を確立した。最終的には滑膜肉腫細胞株、SMARCB1 欠損悪性腫瘍細胞株、および線維芽細胞などの正常細胞において SS18、SS18-SSX、SMARCB1 の発現を強制的に調節し、主要サブユニットに対する抗体を用いた免疫沈降法により、SWI/SNF（BAF）複合体に関するプロテオーム解析を行った。

【細胞増殖アッセイ】

レンチウィルス感染後、遺伝子導入細胞の選択後、コントロールと SS18-SSX ノックダウン滑膜肉腫細胞、SMARCB1 強制発現滑膜肉腫細胞の増殖能を解析した。解析方法としては、細胞数のカウントや Cell Titer-Glo などのキットを用いた細胞生存率解析、さらにはフローサイトメトリーを用いた細胞周期解析を行った。

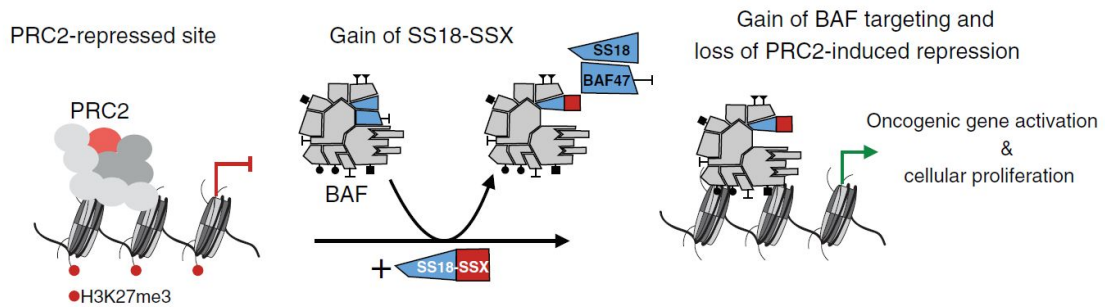
【プロテオーム解析】

SWI/SNF 複合体は分化の段階や、分化する組織に応じて、そのサブユニットの構成を変化させることで複合体としての多様性を生み出し、細胞の発達、分化の多様性に対応している。本研究では、SS18 が SS18-SSX に置き換わった滑膜肉腫特異的変異 SWI/SNF（BAF）複合体がどの様なサブユニット構成を呈しているのかを解析した。さらに、滑膜肉腫細胞株において、SS18-SSX をノックダウンした時、あるいは、SMARCB1 を強制発現させた時に、SWI/SNF（BAF）複合体のサブユニット構成はどのように変化するのか、ウェスタンブロット法の他、抗 BRG1 抗体を用いた免疫沈降法を用いて解析した。

４．研究成果

本研究では、まず SWI/SNF 複合体のサブユニットに対する抗体を用いた免疫沈降法により、疾患特異的融合遺伝子 SS18-SSX は SWI/SNF 複合体に結合することを確認した。また、最も効率よく SS18-SSX をノックダウンする shRNA を作成し、滑膜肉腫細胞株と SS18-SSX をノックダウンした滑膜肉腫細胞株との生物学的、生化学的プロファイルの比較を行った。SS18-SSX が SWI/SNF 複合体に結合することで、腫瘍抑制遺伝子として知られるサブユニット SMARCB1（BAF47）のタンパク質発現の低下、SWI/SNF 複合体への結合能の低下を確認した。

ChIP-seq 法を用いた解析では、SS18-SSX を含む変異 SWI/SNF 複合体は、PRC2 と拮抗してバイバレント領域のプロモーターを活性化することで、分化に関与する一部の転写因子を特異的に高発現していることが明らかとなった。これらから、滑膜肉腫では「融合遺伝子 SS18-SSX そのもの」と、「SS18-SSX によるがん抑制遺伝子 SMARCB1 の喪失」という 2 つの変異が SWI/SNF 複合体に起きているが、SMARCB1 の喪失は副次的なイベントであるにとどまり、滑膜肉腫のがん化には直接寄与していないのではないかと考えられた。



５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　2件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 McBride Matthew J.、Pulice John L.、Beird Hannah C.、Ingram Davis R.、D'Avino Andrew R.、Shern Jack F.、Charville Gregory W.、Hornick Jason L.、Nakayama Robert T. et al.	４．巻 33
２．論文標題 The SS18-SSX Fusion Oncoprotein Hijacks BAF Complex Targeting and Function to Drive Synovial Sarcoma	５．発行年 2018年
３．雑誌名 Cancer Cell	６．最初と最後の頁 1128～1141.e7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ccell.2018.05.002	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 該当する

１．著者名 Nakayama Robert T、Pulice John L、Valencia Alfredo M、McBride Matthew J、McKenzie Zachary M、Gillespie Mark A、Ku Wai Lim、Teng Mingxiang、Cui Kairong、Williams Robert T、Cassel Seth H、Qing He、Widmer Christian J、Demetri George D、Irizarry Rafael A、Zhao Keji、Ranish Jeffrey A、Kadoch Cigall	４．巻 49
２．論文標題 SMARCB1 is required for widespread BAF complex-mediated activation of enhancers and bivalent promoters	５．発行年 2017年
３．雑誌名 Nature Genetics	６．最初と最後の頁 1613～1623
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/ng.3958	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕　計8件（うち招待講演　0件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 中山ロバート，Cigall Kadoch，George D. Demetri，松本守雄，中村雅也
２．発表標題 SMARCB1はSWI/SNF複合体によるエンハンサー活性化に必須である
３．学会等名 第91回日本整形外科学会学術総会
４．発表年 2018年

１．発表者名 Nakayama R，Pulice J，Valencia A，Kadoch C，Matsumoto M，Nakamura M.
２．発表標題 Genome-wide mistargeting of oncogenic SWI/SNF complexes in SMARCB1-deficient cancers.
３．学会等名 第77回日本癌学会学術集会
４．発表年 2018年

１．発表者名
中山ロバート，John L.Pulice，Cigall Kadoch，松本守雄，中村雅也.

２．発表標題
腫瘍抑制遺伝子SMARCB1の導入によるSWI/SNF複合体を介したエンハンサーおよびバイバレント領域のプロモーターの活性化.

３．学会等名
第33回日本整形外科学会基礎学術集会

４．発表年
2018年

１．発表者名
McBride M，Nakayama R，Pulice J，Mashtalir N，Ingram D，Shern J，Khan J，Hornic J，Lazar A，Kadoch C

２．発表標題
SSX drives gain-of-function BAF complex chromatin affinity and genomic targeting in synovial sarcoma.

３．学会等名
American Association for Cancer Research (AACR)，Washington D.C.，USA（国際学会）

４．発表年
2017年

１．発表者名
中山ロバート，Cigall Kadoch，George D. Demetri，森岡秀夫，中村雅也，松本守雄.

２．発表標題
SMARCB1(BAF47)欠損腫瘍における発がん性SWI/SNF(BAF)複合体のプロテオーム解析

３．学会等名
第76回日本癌学会学術総会，横浜

４．発表年
2017年

１．発表者名
中山ロバート，Cigall Kadoch，George D.Demetri，中村雅也，松本守雄，森岡秀夫.

２．発表標題
SMARCB1の欠損はSW1/SNF複合体のクロマチンへの結合を不安定化させる.

３．学会等名
第50回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会，東京

４．発表年
2017年

１．発表者名 中山ロバート，Cigall Kadoch，George D.Demetri，中村雅也，松本守雄，森岡秀夫
２．発表標題 SMARCB1欠損腫瘍における発がん性SW/SNF複合体の異常な遺伝子発現制御.
３．学会等名 第90回日本整形外科学会学術総会，仙台
４．発表年 2017年

１．発表者名 中山ロバート，加藤容崇，中川瑠美，弘實透，山口さやか，浅野尚文，四十物絵理子，西原広史，中村雅也，松本守雄.
２．発表標題 慶應義塾大学病院における骨・軟部腫瘍に対する遺伝子診断の現状と今後の展望.
３．学会等名 第52回 日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
４．発表年 2019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