

滑膜肉腫でみられる融合タンパク質の機能解析

太田 力

常葉大学保健医療学部理学療法学科

要 旨

滑膜肉腫は、18番染色体上に存在する SYT 遺伝子 (SS18 遺伝子) 領域と X 染色体上に複数存在する SSX 遺伝子領域の間で起きた染色体転座によって生じる SYT-SSX 融合遺伝子が原因であることが知られている。これまでの解析から、SYT 遺伝子と融合していることが報告されている SSX 遺伝子は、SSX1, SSX2, SSX4 の 3 遺伝子であり、それぞれパラログと考えられている。我々は染色体転座前の SYT タンパク質は転写活性能を持つが、染色体転座後の SYT-SSX1 融合タンパク質は転写活性化能が減弱化していることを見出し、染色体転座による SYT タンパク質の転写活性化能の低下が滑膜肉腫発症の原因である可能性を発見した。しかし、これまで、3 種類の SYT-SSX1, SYT-SSX2, SYT-SSX4 融合タンパク質の機能的な違いについては詳細な解析がなされていない。そこで、本研究では、これら複数の融合タンパク質の転写活性化能を測定することで、SYT-SSX 融合タンパク質の機能的な差異の解析を行った。その結果、SYT に融合した SSX1 タンパク質および SSX2 タンパク質の転写抑制能は高いが、SSX4 タンパク質の転写抑制能は低いことが判明した。

キーワード：滑膜肉腫，染色体転座，転写因子，スプライシングバリエント

はじめに

滑膜肉腫 (synovial sarcoma) は青年期 (10-40 才) に発生する組織由来不明の腫瘍で、5 年生存率は 30%~50% と報告されており、高悪性度軟部肉腫に分類される¹。滑膜肉腫の頻度は報告によって異なるが、軟部組織腫瘍全体の 5~10% を占めるといわれている。その好発部位は四肢の関節近傍、特に膝関節周辺であり、以前は切断治療が多く行われていたが、最近では患肢温存手術が主流となっている。次いで発症頻度の高い部位としては、

頭頸部、体幹部が知られている。さらに、心臓、腎臓、前立腺、肝臓、縦隔、後腹膜、消化管、末梢神経など様々な部位に発生することが報告されている。また、近年、肺と胸膜に発生することも報告されている^{2,3}。滑膜肉腫は、X 染色体の長腕領域 (p11.2) と 18 番染色体の短腕領域 (q11.2) の間で引き起こされる染色体転座 t(X; 18)(p11.2; q11.2) が原因で発症することが知られている⁴ (図-1)。

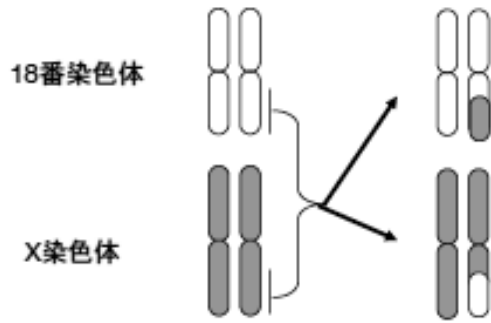


図1. 滑膜肉腫の原因となる染色体転座

滑膜肉腫ではX染色体の長腕領域 (p11.2) と18番染色体の短腕領域 (q11.2) の間で引き起こされる染色体転座が90%以上に認められる。

滑膜肉腫で検出される染色体転座領域のX染色体の長腕領域(p11.2)にはSSX(synovial sarcoma X chromosome breakpoint) 遺伝子が存在する。一方、18番染色体の短腕領域 (q11.2) にはSYT (synovial sarcoma translocation, chromosome 18; 最近ではSS18と表記されることが多い) 遺伝子が存在する。染色体転座はSSX遺伝子のイントロン領域とSYT遺伝子のイントロン領域の間で起きており、2つの染色体で、それぞれ2つの遺伝子が部分的に入れ替わった遺伝子配置となっている。

SYTタンパク質は細胞内の核に存在し、転写活性化能をもつことが示されている⁵。さらに、SYTタンパク質のドメイン解析から、中央領域からC末端にかけて現れる3種類のアミノ酸が4つ並ぶGPGYリッチドメインと名付けられた配列 [グリシン (G)・プロリン (P)・グリシン (G)・チロシン (Y)] に、転写活性化能があることが示されている (図2)⁵。また、SYTタンパク質は全ての細胞で発現がみられる ubiquitous expression protein の一つであることも知られており、滑膜肉腫細胞でも、染色体転座が起きて

いない18番染色体からはSYT遺伝子が発現している。さらに、X染色体の一部が染色体転座している18番染色体上 (図1右上) からは、新たに生じたSYT-SSX融合遺伝子が発現している。従って、滑膜肉腫細胞では、SYTタンパク質とSYT-SSX融合タンパク質の2種類が同時に発現していることになる (図2)。

一方、SSXタンパク質も細胞内の核に存在するが、SYTタンパク質とは異なり、転写抑制活性をもつことが示されている⁶。SSXタンパク質のドメイン解析から、中央領域からC末端には、転写抑制因子として知られるKruppelタンパク質に存在する転写抑制ドメインと類似するKRABドメイン (Kruppel Associated Boxドメイン) が見つかっている (図2)⁶。また、SSXタンパク質は、精巣や卵細胞のような生殖細胞では発現が高いが、他の細胞では非常に発現が低いことが知られている。滑膜肉腫でも18染色体の一部が染色体転座しているX染色体上 (図1右下) からは、SSX-SYT融合遺伝子の発現は検出されない (なお、女性の場合は転座が起きていないX染色体からのSSX遺伝子の発現も検出されない)。

これらのことから、18染色体とX染色体による染色体転座が原因で引き起こされる滑膜肉腫では、正常細胞には存在しないSYT-SSX融合タンパク質のみが産生されていることがわかってきた。2001年に日本人研究者によって、SYT-SSX1融合遺伝子を過剰発現させたマウスに悪性腫瘍が生じることが報告された⁷。この研究から、滑膜肉腫は染色体転座によって新たに生じたSYT-SSX1融合遺伝子が腫瘍発症の原因であることが示唆された。

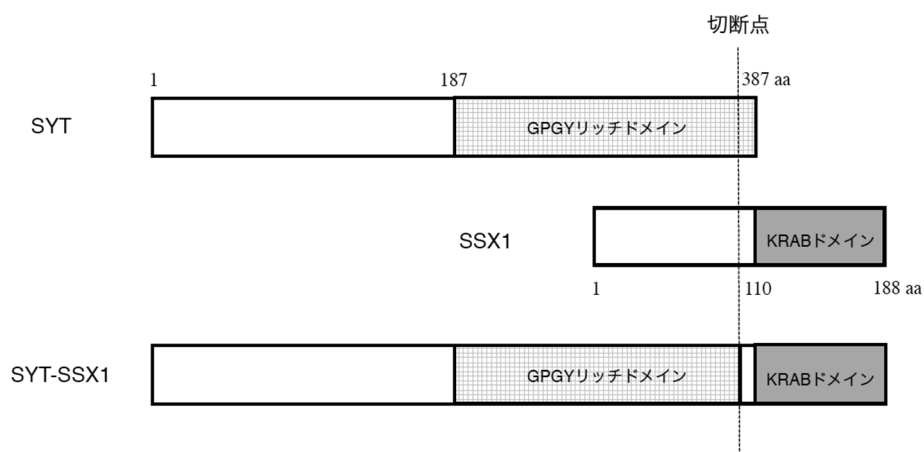


図2. SYT タンパク質, SSX1 タンパク質, SYT-SSX1 融合タンパク質の構造

SYT タンパク質には、中央部から C 末端にグリシン (G) - プロリン (P) - グリシン (G) - チロシン (Y) の 4 つのアミノ酸が繰り返す GPGY リッチドメインに転写活性化能があることが示されている。SSX1 タンパク質には、中央部から C 末端に Kruppel タンパク質に存在する転写抑制ドメインと類似する KRAB ドメイン (KRuppel Associated Box ドメイン) がみついている。染色体転座によって生じた SYT-SSX1 融合タンパク質は、転写活性化に関与する GPGY リッチドメインと転写抑制化に関与する KRAB ドメインの 2 つのドメインを持つことになる。

ヒトゲノムの塩基配列解読から、SSX 遺伝子は全部で 8 種類 (SSX1, SSX2, SSX3, SSX4, SSX5, SSX6, SSX7, SSX9) あり、全ての遺伝子が 18 番染色体に同じ方向で位置していることがわかっている。この 8 種類の中で滑膜肉腫の患者で見ついている転座遺伝子は SSX1, SSX2, および SSX4 の 3 種類であるが^{8,9}、融合している SSX1 遺伝子と SSX2 遺伝子の頻度が高いため (SSX4 遺伝子の報告は 1 例のみ)、多くの研究者は 2 つの融合遺伝子 SYT-SSX1, および、SYT-SSX2 の解析を進めている。我々も、まず SYT タンパク質と SYT-SSX1 融合タンパク質の転写活性化能を調べることにした^{10,11}。SYT タンパク質には DNA 結合ドメインがないため、SYT タンパク質、あるいは、SYT-SSX 融合タンパク質の N 末端に転写因子 Gal4¹² の DNA 結合ドメインを連結した Gal4-SYT タンパク質と Gal4-SYT-SSX1 融合タンパク質を作成し、Gal4 タンパク質の

DNA 結合配列をプロモーターに付加したルシフェラーゼ (lux) 遺伝子をレポーターとして転写活性化能の解析を行なった。その結果、転座前の SYT タンパク質は転写活性化能を持つが、転座後の SYT-SSX1 融合タンパク質は転写活性化能が減弱化していることを見出した^{10,11}。この研究から、我々は正常細胞では SYT タンパク質によって発現が亢進しているがん抑制遺伝子が、SYT-SSX1 融合タンパク質によって発現量が低下することで腫瘍が発症するという仮説を立てている¹¹。

最近、SYT, SSX2 および SSX4 の 3 つの遺伝子はスプライシングの違いによって 2 種類の mRNA (スプライシングバリエント) が発現していることが示され、同一の滑膜肉腫細胞から複数の SYT-SSX 融合遺伝子が発現していることが報告された (図 4)¹³。そこで、本研究では、スプライシングの違いによって生じる複数の SYT-SSX 融合タンパク質の転写活性化能について解析を行った。

解析方法

1. 酵素測定用の細胞株の培養：

ヒト胎児の腎由来の細胞株である HEK293 (Human Embryonic Kidney cells 293) は、ATCC (American Type Culture Collection) から購入した。HEK293 は、DMEM low glucose (Invitrogen) に、10% ウシ胎児血清 [FBS; Fetal Bovine Serum (Invitrogen)], 1% Penicillin-Streptomycin (MP Biomedicals) を添加した培地を用い、5% 二酸化炭素 (CO₂), 37°C の恒温槽で培養した。

2. 酵素測定用の融合遺伝子の構築：

2段階 PCR 法を用いて SYT-SSX1 転座の滑膜肉腫細胞において発現している 2 種類の遺伝子 (SYTv1-SSX1, SYTv2-SSX1), SYT-SSX2 転座の滑膜肉腫細胞において発現している 4 種類の遺伝子 (SYTv1-SSX2v1, SYTv1-SSX2v2, SYTv2-SSX2v1, SYTv2-SSX2v2), SYT-SSX4 転座の滑膜肉腫細胞において発現している 4 種類の遺伝子 (SYTv1-SSX4v1, SYTv1-SSX4v2, SYTv2-SSX4v1, SYTv2-SSX4v2) を作成した。さらに、SSX1 遺伝子の C 末端の 32 個のアミノ酸領域を欠損させた SYTv1-SSX1 Δ C 融合遺伝子を作成した。次に、これら 11 種類の融合遺伝子を Gal4 遺伝子の DNA 結合ドメイン (Gal4-DBD; Gal4 DNA Binding Domain) を含む遺伝子発現ベクター pCI-neo (Promega) に挿入した。

3. 融合タンパク質の酵素測定：

Lipofectamine 3000 を用いて、100 ng の pG5luc DNA (Promega; Gal4 タンパク質結合配列を蛍光タンパク質であるルシフェラーゼ遺伝子のプロモーター上流に挿入した DNA), 5 ng の pRL/TK, 100 ng の pCI-neo-Gal4 (control DNA), Gal4-SYTv1, Gal4-SYTv1-SSX1, Gal4-SYTv1-SSX2v1, Gal4-

SYTv1-SSX2v2, Gal4-SYTv1-SSX4v1, Gal4-SYTv1-SSX4v2, Gal4-SYTv2, Gal4-SYTv2-SSX1, Gal4-SYTv2-SSX2v1, Gal4-SYTv2-SSX2v2, Gal4-SYTv2-SSX4v1, Gal4-SYTv2-SSX4v2, あるいは、SYTv1-SSX1 Δ C 遺伝子を、24 穴シャーレに約 30% コンフルエント状態に増殖した HEK293 細胞に導入した。37°C で 48 時間培養後、細胞を回収し、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega 社) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

解析結果

1. 滑膜肉腫細胞内で発現する 10 種類の融合タンパク質の転写抑制効果の測定：

SYT, SSX2 および SSX4 遺伝子はスプライシングの違いによって各遺伝子に二種類の mRNA が発現していることが示され、各 2 種類のスプライシングバリエーションは v1 と v2 と命名されている [mRNA として最初に塩基配列が報告されている遺伝子名が v1 (variant 1), 次に mRNA として塩基配列が報告されている遺伝子名が v2 (variant 2)]. この命名法に従うと、染色体転座 t(X; 18) (p11.2; q11.2) が原因で発症する滑膜肉腫では、以下の名前の SYT-SSX 融合タンパク質が発現していることになる。すなわち、SYT-SSX1 転座の滑膜肉腫細胞においては、2 種類の融合タンパク質 (SYTv1-SSX1, SYTv2-SSX1) が発現し、SYT-SSX2 転座の滑膜肉腫細胞においては、4 種類の融合タンパク質 (SYTv1-SSX2v1, SYTv1-SSX2v2, SYTv2-SSX2v1, SYTv2-SSX2v2) が発現し、また、SYT-SSX4 転座の滑膜肉腫細胞においては、4 種類の融合タンパク質 (SYTv1-SSX4v1, SYTv1-SSX4v2, SYTv2-SSX4v1, SYTv2-SSX4v2) が発現している。つまり、これまでに見出された滑膜肉腫細胞では、少なくとも 10 種類の SYT-SSX 融合タンパク質が発現していることになる。しかし、これまで私

を含め多くの研究者によって解析された SYT-SSX 融合タンパク質は、SYTv1-SSX1 融合タンパク質と SYTv1-SSX2v1 融合タンパク質の僅か 2 種類のみである。そこで、本研究では、上記 2 種類の SYT-SSX 融合タンパク質に加え、残りの 8 種類の SYT-SSX 融合タンパク質の機能を比較検討することにした。

これまで SYT-SSX 融合タンパク質の機能として解析されたものは 2 つある。一つは、SYT-SSX 融合タンパク質を過剰発現するマウスを作成し、マウス個体に腫瘍が形成されるか(がん化能の有無)を調べることである⁷。もう一つは、試験管内で SYT-SSX 融合タンパク質による転写活性化能を調べることである^{10,11}。そこで、本研究では、上記機能解析の後者である「試験管内で SYT-SSX 融合タンパク質による転写活性化能」を調べることにした。

2 段階 PCR 法を用いて 10 種類の SYT-SSX 融合遺伝子を作成した。これら融合遺伝子を Gal4 タンパク質の DNA 結合ドメイン (Gal4-DBD; Gal4 DNA Binding Domain) を含む遺伝子発現ベクター (pCI-neo DNA) に挿入し、転写活性測定可能な SYT-SSX 融合遺伝子を作成した。これら遺伝子の中から、まず、SYT-SSX1 転座の滑膜肉腫細胞において発現している 2 種類の SYT タンパク質と 2 種類の SYT-SSX1 融合タンパク質に関して、転写活性化能を解析した。方法は、転座前の SYT 遺伝子の 2 つのバリエーションから生じる SYTv1 遺伝子、および、SYTv2 遺伝子、さらに、滑膜肉腫で 2 つのバリエーションから生じる SYTv1-SSX1 融合遺伝子、および、SYTv2-SSX1 融合遺伝子の合計 4 種類を各々 293 細胞に導入し、レポーター遺伝子から作られるルシフェラーゼ (lux) タンパク質の発光強度の測定値からの転写活性化能を算出した (図 5)。

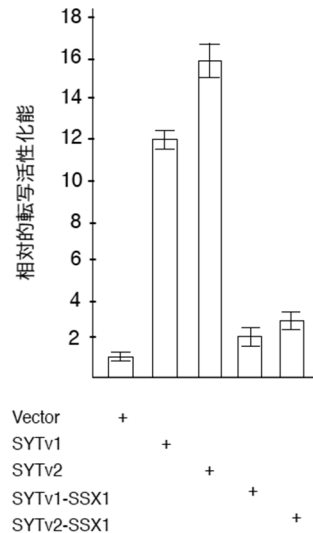


図 4. SYT バリエーションタンパク質の転写活性
HEK293 細胞株に、100 ng の pG5luc DNA, 5 ng の pRL/TK, 100 ng の pCI-neo-Gal4 (vector ; control DNA), Gal4-SYTv1, Gal4-SYTv2, Gal4-SYTv1-SSX1, あるいは、Gal4-SYTv2-SSX1 を導入した。37°C で 48 時間培養後、細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。活性は、pCI-neo-Gal4 の活性を 1.0 とした相対転写活性を示す。なお、実験は 3 回行った。

SYTv1 タンパク質は、コントロールベクターの活性を 1.0 とすると約 12 倍転写活性を高めた。同様に、SYTv2 タンパク質は約 16 倍転写活性を高めることがわかった (図 4)。この結果から、転座前の SYT タンパク質のバリエーション SYTv2 タンパク質は、もう一方のバリエーションである SYTv1 タンパク質に比べて転写活性化能が 1.3 倍程高いことがわかった。また、これら SYT タンパク質に SSX1 タンパク質が融合した場合の転写活性化能は、それぞれ SYTv1-SSX1 融合タンパク質が 2.1 倍 (SYTv1 の約 18%; 図 4,5 参照), SYTv2-SSX1 融合タンパク質が 2.7 倍 (SYTv2 の約 17%; 図 4,5 参照) となり、SSX1 タンパク質の融合により SYTv1 タンパク質および SYTv2 タンパク質がもつ転写活性化能が低下することがわかった。また、SSX1 タンパク質による転写抑制効果は、

SYT タンパク質のバリエーションの違いによってその抑制効果に有意な差がないことも判明した。

次に、SSX2 タンパク質、および、SSX4 タンパク質の転写抑制化能に関して、バリエーション間で差異があるのか2つの SYT(SYTv1, SYTv2) タンパク質に融合させた SSX2 と SSX4 においてそれぞれ解析を行った。図4は転座前の SYT タンパク質の転写活性化能を100%として、SSX タンパク質が融合した場合に転写活性化能がどのくらいになったかを相対%で示したものである。SYTv1 タンパク質に SSX2 タンパク質が融合した場合の

転写活性化能は、それぞれ SYTv1-SSX2v1 融合タンパク質が16% (84%の転写活性抑制効果)、SYTv1-SSX2v2 融合タンパク質が19% (81%の転写活性抑制効果)、SYTv2 タンパク質に SSX2 タンパク質が融合した場合の転写活性化能は、それぞれ SYTv2-SSX2v1 融合タンパク質が15% (85%の転写活性抑制効果)、SYTv2-SSX2v2 融合タンパク質が20% (80%の転写活性抑制効果) となり、SSX2 タンパク質の融合により SYT タンパク質がもつ転写活性化能は、SSX1 タンパク質が融合した場合とほぼ同程度低下することがわかった (図5)。

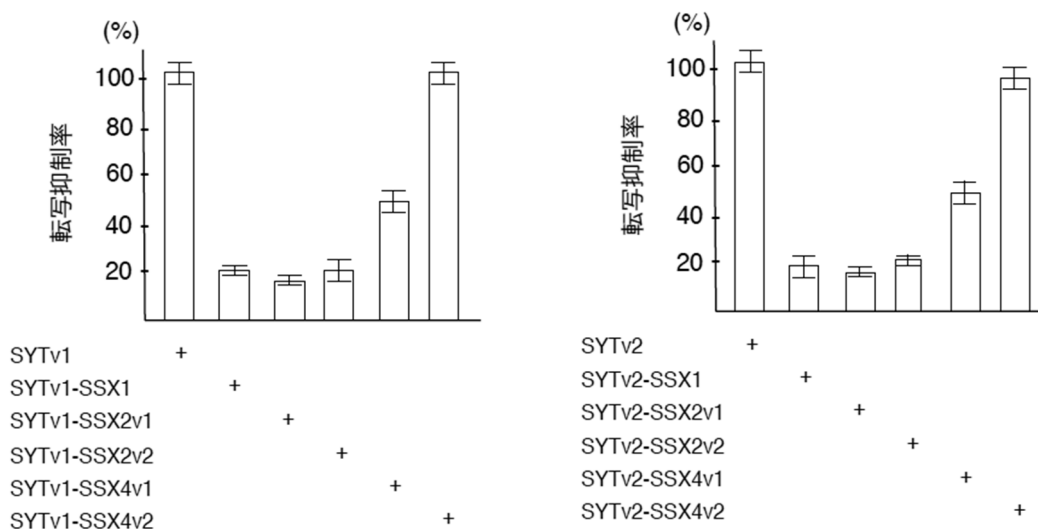


図5. 融合した SSX タンパク質による転写抑制

A : HEK293 細胞株に、100 ng の pG5luc DNA, 5 ng の pRL/TK, 100 ng の Gal4-SYTv1 (control DNA), Gal4-SYTv1-SSX1, Gal4-SYTv1-SSX2v1, Gal4-SYTv1-SSX2v2, Gal4-SYTv1-SSX4v1, あるいは、Gal4-SYTv1-SSX4v2 を導入した。37°C で 48 時間培養後、細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。活性は、Gal4-SYTv1 の活性を 100% とした相対転写活性を示す。なお、実験は 3 回行った。

B : HEK293 細胞株に、100 ng の pG5luc DNA, 5 ng の pRL/TK, 100 ng の Gal4-SYTv2 (control DNA), Gal4-SYTv2-SSX1, Gal4-SYTv2-SSX2v1, Gal4-SYTv2-SSX2v2, Gal4-SYTv2-SSX4v1, あるいは、Gal4-SYTv2-SSX4v2 を導入した。37°C で 48 時間培養後、細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。活性は、Gal4-SYTv2 の活性を 100% とした相対転写活性を示す。なお、実験は 3 回行った。

一方, SYTv1 タンパク質に SSX4 タンパク質が融合した場合の転写活性化能は, それぞれ SYTv1-SSX4v1 融合タンパク質が 48% (52% の転写活性抑制効果), SYTv1-SSX4v2 融合タンパク質が 98% (2% の転写活性抑制効果), SYTv2 タンパク質に SSX4 タンパク質が融合した場合の転写活性化能は, SYTv2-SSX4v1 融合タンパク質が 50% (50% の転写活性抑制効果), SYTv2-SSX2v2 融合タンパク質が 97% (3% の転写活性抑制効果) となった (図 5). SYT タンパク質がもつ転写活性化能は, SSX4v1 タンパク質の融合により半分程度減少するが, SSX1 タンパク質や SSX2 タンパク質が融合した場合と比べると転写抑制活性は高くないことがわかった (図 5). また, SYT タンパク質がもつ転写活性化能は, SSX4v2 タンパク質の融合ではほとんど影響を受けないことも判明した (図 5).

2. SSX1 タンパク質と SSX2 タンパク質の KRAB 共通ドメインの転写抑制活性の測定:

図 5 から, SSX4v2 タンパク質の転写抑制効果がほとんど検出されないことから, SSX4v2 タンパク質には, SSX1, SSX2v1, SSX2v2, および, SSX4v1 の各タンパク質の持つ転写抑制効果を示すドメインが欠落している可能性が示唆された. そこで, 滑膜肉腫で発現している融合タンパク質の 5 種類の SSX タンパク質のアミノ酸配列を比較してみた. 図 3B は, 5 種類の SSX タンパク質のアミノ酸配列の融合タンパク質領域のアミノ酸を一文字表記で並べたものである. 興味深いことに, 転写抑制活性が検出された SSX1, SSX2v1, SSX2v2, および, SSX4v1 の全てのタンパク質には相同性が非常に高い領域が存在することが判明した. 一方, 転写抑制効果がほとんど検出されない SSX4v2 タンパク質には, この領域と相同性は見られないことが

わかった. そこで, SSX1 タンパク質にみられる相同性が高い領域 (SSX1 Δ C) のみを SYTv1 遺伝子に融合させた SYTv1-SSX1 Δ C 融合遺伝子を作成し, 転写活性化能を測定した. その結果, SYTv1-SSX1 Δ C 融合タンパク質は SYTv1 タンパク質の転写活性の 30% の活性があること (70% 抑制すること) がわかった (図 6). この結果から, SSX1 タンパク質にみられる相同性が高い領域に (図 3B), SYT タンパク質の転写を抑制する活性があることが判明した. さらに, この領域が欠落していることで, SSX4v2 タンパク質には SYT タンパク質の転写を抑制する活性が低下していることが予想された.

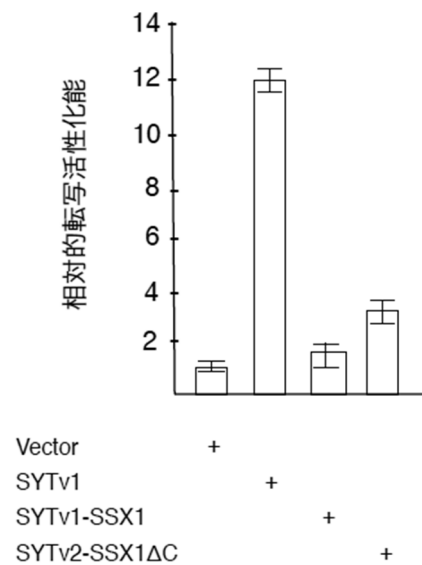


図 6. SSX1 タンパク質と SSX2 タンパク質の KRAB 共通ドメインの転写抑制活性

HEK293 細胞株に, 100 ng の pG5luc DNA, 5 ng の pRL/TK, 100 ng の pCI-neo-Gal4 (vector ; control DNA), Gal4-SYTv1, Gal4-SYTv2, Gal4-SYTv1-SSX1, あるいは, Gal4-SYTv2-SSX1 を導入した. 37°C で 48 時間培養後, 細胞を回収し, ルシフェラーゼ活性を測定した. 活性は, pCI-neo-Gal4 の活性を 1.0 とした相対転写活性を示す. なお, 実験は 3 回行った.

考察

今回の融合タンパク質の転写活性化能の解析から、滑膜肉腫で検出される染色体転座の18番染色体上にある SYT 遺伝子の2種のスプライシングバリエントによる差異は少なく、滑膜肉腫の発生には影響がほとんどないことが予想された。また、染色体転座のX染色体上に位置する SSX 遺伝子に関しては、SSX1 遺伝子、および、SSX2 遺伝子の2種類のスプライシングバリエントは全て転写抑制効果が高いことが判明した。一方、SSX4 遺伝子の2種類のスプライシングバリエントでは、一つは転写抑制効果が SSX1 遺伝子や SSX2 遺伝子の40%程と低いこと、他は転写抑制効果がほとんど検出されないことが判明した。これらの解析結果は、滑膜肉腫で SYT 遺伝子と融合している遺伝子の大半が SSX1 遺伝子、あるいは SSX2 遺伝子であることと相関する（これまでに SSX4 遺伝子が融合した滑膜肉腫の報告は1例のみである）。また、今回の解析は、以前我々の立てた「正常細胞では転座前の SYT タンパク質によって発現が亢進しているがん抑制遺伝子が、転座後の SYT-SSX1 融合タンパク質によって発現量が低下することで腫瘍が発症する」という仮説¹¹を支持するものであった。

最近、SYT タンパク質はクロマチンリモデリング因子の一つである BAF タンパク質複合体のサブユニットであることが報告された¹⁴。BAF タンパク質複合体は、細胞核内のクロマチンの構造変換を行い、転写をはじめ DNA 複製や DNA 修復など核内の DNA に作用する生体反応を制御することが知られている¹⁴。興味深いことに、滑膜肉腫で発現する SYT-SSX 融合タンパク質は BAF タンパク質複合体のサブユニットとして機能することが出来ず（SSX タンパク質が融合することで SYT タンパク質の構造が変化し、BAF タンパク質複合体に組み込まれることが出来なくなり）、BAF タンパク質複合体の

クロマチンリモデリング活性が低下し、複数の遺伝子の発現量が低下することが判明した^{14,15}。今後は、今回得られた SYT-SSX 融合タンパク質の機能と BAF タンパク質複合体の機能低下との関連を調べていきたいと考えている。

謝辞

SYT-SSX 融合遺伝子の作成は、国立がん研究センター研究所で行われたものである。特に、飯島久美子博士、および、疾病ゲノムセンターのスタッフの皆様に感謝する。

引用文献

- 1) Synovial sarcoma. In: Weiss SW, Goldblum JR, eds. *Soft Tissue Tumors*. 5th ed. St Louis: Mosby: 1161-1182, 2008.
- 2) Keel SB, Bacha E, et al: Primary pulmonary sarcoma: a clinicopathologic study of 26 cases. *Mod Pathol*(12): 1124-1131. 1999.
- 3) Zeren H, Moran CA, et al: Primary pulmonary sarcomas with features of monophasic synovial sarcoma: a clinicopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of 25 cases. *Hum Pathol*(26): 474-480, 1995.
- 4) Sandberg AA, Bridge JA: Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors. *Synovial sarcoma*. *Cancer Genet Cytogenet*(133): 1-23, 2002.
- 5) Crew, AJ, Clark J, et al: Fusion of SYT to two genes, SSX1 and SSX2, encoding proteins with homology to the Kuppel-associated box in human synovial sarcoma. *EMBO J*(14): 2333-2340, 1995.
- 6) Lim FL, Soulez M, et al: A KRAB-related domain and a novel

- transcription repression domain in protein encoded by SSX genes that are disrupted in human sarcomas. *Oncogene*(17): 2013–2018, 1998.
- 7) Nagai M, Tanaka S, et al: Analysis of transforming activity of human synovial sarcoma-associated chimeric protein SYT-SSX1 bound to chromatin remodeling factor hBRMyhSNF2a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(98): 3843-3848, 2001.
- 8) dos Santos NR, de Bruijn DR, Kater-Baats E, Otte AP, van Kessel AG. Delineation of the protein domains responsible for SYT, SSX, and SYT-SSX nuclear localization. *Exp Cell Res*(256):192-202, 2000.
- 9) Brodin B, Haslam K, et al: Cloning and characterization of spliced fusion transcript variants of synovial sarcoma: SYT/SSX4, SYT/SSX4v, and SYT/SSX2v. Possible regulatory role of the fusion gene product in wild type SYT expression. *Gene*(268): 173-182, 2001.
- 10) Ishida M, Tanaka S, et al: Transcriptional coactivator activity of SYT is negatively regulated by BRM and Brg1. *Genes Cells*(9): 419–428, 2004.
- 11) Ishida M, Miyamoto M, et al: The SYT-SSX Fusion Protein Down-Regulates the Cell Proliferation Regulator COM1 in t(x;18) Synovial Sarcoma. *Mol Cell Biol*(27): 1348-1355, 2007.
- 12) Giniger E, Varnum SM et al: Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell*(40): 767-774, 1985.
- 13) Gene Cards (THE HUMAN GENE DATABASE) <https://www.genecards.org/>
- 14) Cigall K, Crabtree GR: Reversible Disruption of mSWI/SNF (BAF) Complexes by the SS18-SSX Oncogenic Fusion in Synovial Sarcoma. *Cell*(153): 71-85, 2013.
- 15) Ito J, NAsano N, et al: The diagnostic utility of reduced immunohistochemical expression of SMARCB1 in synovial sarcomas: a validation study. *Hum Pathol*(47): 32-37, 2016.