

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17972

研究課題名（和文）網羅的エピジェネティクス解析によるグリオーマの悪性化機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the gliomagenesis by comprehensive epigenetic analysis

研究代表者

三月田 祐平（Sangatsuda, Yuhei）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00848640

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：PBAT法を用いた全ゲノムのDNAメチル化解析を中心にH3F3A遺伝子G34変異グリオーマのエピゲノム解析を行った。G34変異群ではゲノム全体でのCpG低メチル化およびCpGアイランド（CGI）の高メチル化を示すことや、テロメア近傍でのCGI高メチル化現象が相対的に減弱していることを同定した。独立成分分析によりG34変異グリオーマ特異的なメチル化シグナルを抽出し、同変異をもつ骨腫瘍においても共有されていることを確認した。ChIP-seqによりこのシグナルがG34変異ヒストンH3.3の局在と関連性をもち、細胞株で同変異をノックアウトすることでこのシグナルが一部可逆性をもつことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られたデータは本邦最初のグリオーマの全ゲノムのメチル化データであり、G34変異グリオーマについて世界最初のものとなった。これらのデータセットはJapanese Genotype-phenotype Archiveへデータ登録しており、後発研究に利用可能である。今回得られた知見はH3F3A遺伝子G34変異によって生じた変異ヒストンの局在の特徴やDNAメチル化に及ぼす影響を解明する一助となり、将来的に同変異をターゲットとした治療法の開発につながる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：Epigenetic analysis of H3F3A gene G34 mutant glioma was carried out, focusing on whole-genome DNA methylation analysis using PBAT method. We identified that the G34 mutant group exhibited genome-wide CpG hypomethylation and CpG island (CGI) hypermethylation, and that CGI hypermethylation near telomeres was relatively attenuated. G34-mutated glioma-specific methylation signals were detected by independent component analysis and they are shared in bone tumors with the same mutation. ChIP-seq suggested that this signal was associated with the localization of the G34-mutated histone H3.3, and that this signal was partially reversible by knocking out the mutation in cell lines.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：グリオーマ DNAメチル化 エピゲノム H3F3A ヒストン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

H3F3A 遺伝子変異は小児～若年成人グリオーマの代表的なドライバー遺伝子変異であり、K27M と G34R/V の 2 種類が知られている。我々はこのうち G34 変異例群が多彩な臨床病理学像を呈することを過去に報告した (Yoshimoto K, Sangatsuda Y. Brain Tumor Pathol. 2017;34(3):103-112)。同タイプの遺伝子変異をもちながら異なる表現型を呈する背景にエピジェネティクス機構の関与があるのではないかとこの着想から本研究の立案に至った。DNA メチル化は代表的なエピジェネティクスであり、メチル化プロファイルはグリオーマの分子生物学的な性格を反映したサブクラス分類を可能としている。汎用されているメチル化アレイを用いた解析は簡便・低コストな手法であり、膨大なサンプル数を用いたプロファイリングには有用であるものの、検出可能な領域はゲノム全体の数%程度にすぎず、エピゲノムの本質であるクロマチン構造や修飾に応じた DNA メチル化状態を評価することは不可能であった。今回、九州大学医化学分野研究室が開発した PBAT 法により次世代シーケンサーを用いたメチル化解析のコストが大幅に安価となったことで、稀少なヒトの臨床検体を対象とした高品質なメチローム解析データの取得が可能となったことも本研究の構想の一助となった。

2. 研究の目的

次世代シーケンサーを用いた一塩基単位のメチル化解析を行うことで、世界的にも稀少な G34 変異グリオーマ群の全ゲノム的なメチロームデータを取得し、この群に特異的なメチル化シグナルをもつゲノム領域の特徴を明らかにする。また同じ遺伝子変異を持つ他組織腫瘍や細胞株でこのメチル化シグナルに関する検証を行い、G34 変異が癌化におよぼす影響の一端を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体のメチロームデータの取得

九州大学脳神経外科脳腫瘍研究室で所有するグリオーマ凍結標本 (H3F3A 遺伝子野生型 4 例、K27M 変異型 7 例、G34R 変異型 3 例) から DNA を抽出し、PBAT 法を用いて作成したライブラリを次世代シーケンサーで配列決定した。得られた配列データをコンピュータ上でヒトのゲノム配列にマッピングし、データを集計して各サンプルのメチル化率を算出した。

(2) グリオーマのサブタイプ間のメチル化パターンの比較と G34 変異特異的な領域の抽出

得られたメチロームデータとデータベースから取得したグリオーマのメチル化データを遺伝子変異サブタイプ毎に集計し、群間比較を行った。一般的なメチル化解析ツールの他、独立成分分析を用いた手法により G34 変異特異的なメチル化シグナルの抽出を行った。

(3) G34 変異特異的なメチル化シグナルの検証

特異的なメチル化領域を示すゲノム領域について近傍の遺伝子に基づいてアノテーション付けを行った。また、グリオーマの細胞株や凍結標本検体を用いて RNA-seq、ChIP-seq を行い、特異的なメチル化シグナル領域と遺伝子発現およびヒストン修飾状態との関連を検証した。

(4) 骨腫瘍における G34 変異特異的メチル化シグナルの検証

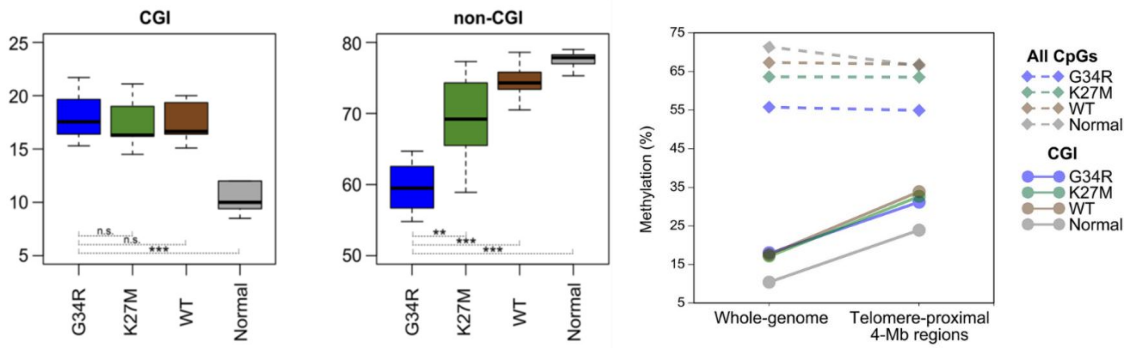
骨肉腫のメチル化データを取得し同様に G34 変異群に特異的なシグナルを抽出し、グリオーマにおける変異特異的シグナルとの相関について調べた。

(5) 細胞株におけるメチル化シグナルの可逆性の検証

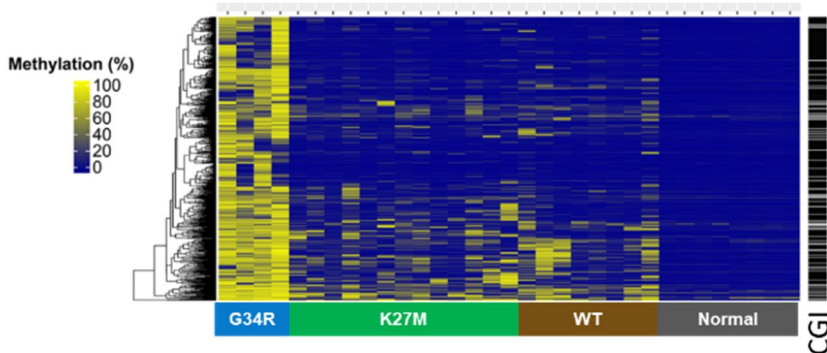
G34 変異グリオーマ細胞株で G34 変異遺伝子を破壊し、上記で同定されたメチル化シグナルの変化を評価した。

4. 研究成果

(1) G34R 変異グリオーマは、他のグリオーマ群と比較してグローバルな低メチル化を呈する一方、CpG アイランド (CGI) 領域では 3 つのグリオーマ群で同等であり正常サンプルよりも高メチル化を呈した。テロメア近傍の CGI では全サンプルでメチル化上昇がみられたが、G34 変異群ではこの現象が減弱していた。これらの結果は過去のメチル化アレイデータ解析で得られた知見を補填するものであった (下図)。

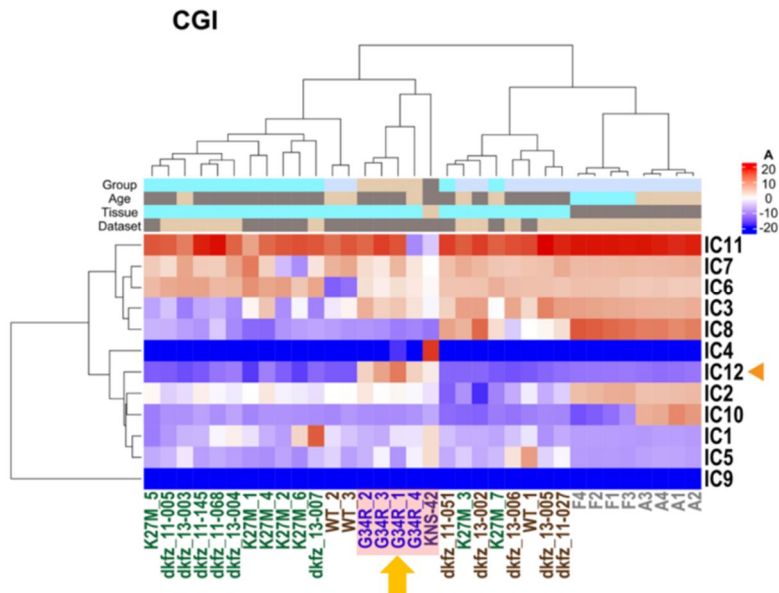


(2) G34R 変異グリオーマに特異的なメチル化を示す領域を抽出してゲノム上の位置関係を調べると、この領域は CGI 領域に高頻度に分布しており、近傍の位置する遺伝子として OLIG1 や OLIG2 そしてヒストン遺伝子を含んでおり、ゲノム構造や神経分化に関わる遺伝子群に関連していた(下図)。

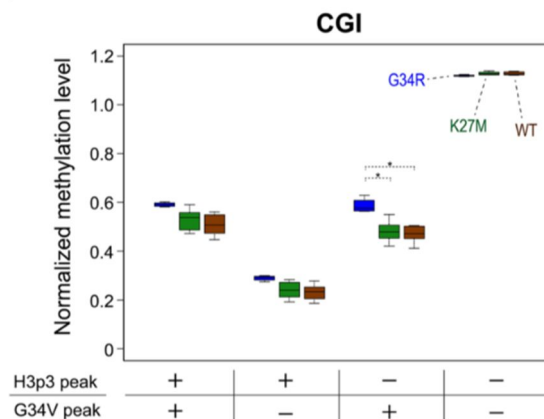
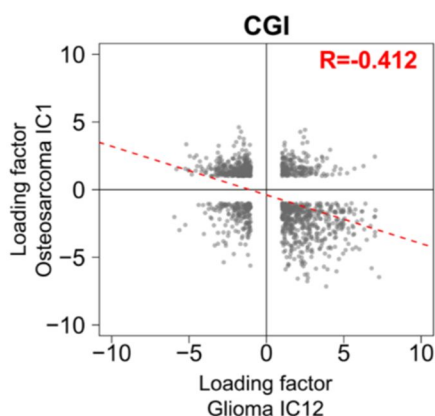


DMR	GO term	P-value
Hyper-DMRs	nucleosome assembly	1.4e-09
	cell fate determination	1.3e-08
	roof of mouth development	1.3e-07
	sympathetic nervous system development	1.9e-07
	aorta morphogenesis	6.5e-07
	outflow tract morphogenesis	1.3e-06
	protein heterotetramerization	1.3e-06
	negative regulation of neuron differentiation	2.0e-06
	olfactory bulb development	2.1e-06
	DNA replication-dependent nucleosome assembly	4.6e-06
	embryonic limb morphogenesis	6.0e-06
	anterior/posterior pattern specification	6.4e-06
	Hypo-DMRs	cornification
regulation of insulin secretion		4.5e-06

次に CGI 領域のメチル化データを用いて G34 変異特異的なメチル化シグナルを抽出する試みとして独立成分分析 (ICA) を応用した解析を行った。G34 変異群は単一のクラスターを形成し、このサブグループ特異的なシグナルを捉えたパターンとして一つの独立成分 (IC12) が同定された。この独立成分に大きく寄与する領域の近傍遺伝子として上記と同様の遺伝子群が特定され、これが G34 変異特異的なメチル化シグナルを表している成分と考えられた(下図)。

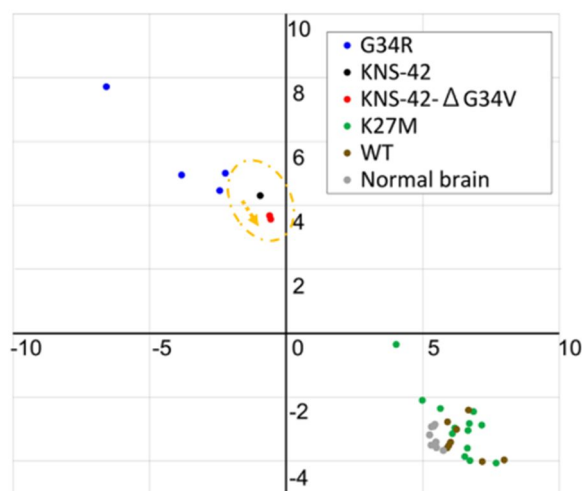


骨肉腫のメチル化アレイデータを入手して同様の分析を行うと同じように G34 変異群に特異的なメチル化シグナルを形成する独立成分が同定された。グリオーマと骨肉腫それぞれの G34 変異特異的メチル化シグナルを構成する領域の寄与度を比較すると、両群間で有意な類似性を示し、この特異的シグナルは腫瘍の起源組織に依らないことが示唆された（下図左）。G34V 変異をもつグリオーマ細胞株で抗 H3.3 抗体、抗 H3.3 G34V 抗体を用いた ChIP-seq を行うと、H3.3 ピーク領域ではゲノム全体と比べて低メチル化率を示し、このうち G34V ピークと重複する領域ではやや高いメチル化率を示した。これらのピーク領域のメチル化率は臨床サンプルでも同様の傾向を示したが、G34 変異群では G34V ピーク領域のメチル化率上昇がより顕著であった（下図右）。



CRISPR/Cas9 を用いてこの細胞株の G34V アレルを破壊すると、G34V ピークと重複する CGI 領域のメチル化率の低下がみられ、ICA で同定された G34 変異特異的シグナルの減弱がみられた（右図）。

つまり、ヒストンバリエント H3.3 は低メチル化領域に分布する傾向があり、G34 変異体は高メチル化領域を起こしやすいヌクレオソームに組み込まれやすいか、あるいは安定して保持されやすく、それらの領域に G34 変異体が結合するとメチル化率の上昇がより顕著となること、また逆にそれら領域の G34 変異体の結合が消失するとメチル化レベルが減弱し、更に G34 変異特異的メチル化シグナル全体が減弱することが示唆された。



以上の結果から、G34 変異グリオーマは骨腫瘍にも共通するサブグループ特異的なメチロームシグナルを有し、そして G34 変異ヒストンの結合がこのシグナル形成の一端を担う可能性が示された。

これらの知見は H3F3A 遺伝子変異によって生じた同変異ヒストンの局在の特徴やこれが DNA メチル化に及ぼす影響を解明する一助となりうる。得られたデータは本邦最初のグリオーマの WGBS データセットとして Japanese Genotype-phenotype Archive へデータ登録 (JGAS00000000197)を行った。稀少サンプルからのメチル化解析技術をさらに発展させ、将来的に liquid biopsy などのより低侵襲な診断技術の開発を目指したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuhei Sangatsuda, Fumihito Miura, Hiromitsu Araki, Masahiro Mizoguchi, Nobuhiro Hata, Daisuke Kuga, Ryusuke Hatae, Yojiro Akagi, Takeo Amemiya, Yutaka Fujioka, Yasuhito Arai, Akihiko Yoshida, Tatsuhiro Shibata, Koji Yoshimoto, Koji Iihara & Takashi Ito	4. 巻 10
2. 論文標題 Base-resolution methylomes of gliomas bearing histone H3.3 mutations reveal a G34 mutant-specific signature shared with bone tumors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-73116-x	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuhei Sangatsuda, Fumihito Miura, Hiromitsu Araki, Masahiro Mizoguchi, Nobuhiro Hata, Daisuke Kuga, Ryusuke Hatae, Yojiro Akagi, Takeo Amemiya, Yutaka Fujioka, Yasuhito Arai, Akihiko Yoshida, Tatsuhiro Shibata, Koji Yoshimoto, Koji Iihara & Takashi Ito
2. 発表標題 Base-resolution methylomes of gliomas bearing histone H3.3 mutations reveal a G34 mutant-specific signature shared with bone tumors
3. 学会等名 The 19th International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology（国際学会）
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------