

令和 6 年 5 月 8 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19404

研究課題名(和文) 両X染色体活性化に伴う女性腫瘍の悪性の分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of development of malignant female cancers associated with X-chromosome reactivation

研究代表者

北川 雅敏 (Kitagawa, Masatoshi)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：50294971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：メス体細胞では片側のX染色体が不活性化しておりXaXiであるが、ES細胞やiPS細胞ではXaXaで、ヒト乳がん細胞でもある程度の頻度でXaXaが見られる。我々はメスのES細胞はオスに比べ相同組換え(HR)能が低いことを見出した。しかしながら両X染色体の活性化によるHR抑制分子機構は不明である。本研究ではその責任遺伝子をRNA-Seq解析により探索し、候補遺伝子BRCC3を見出した。BRCC3をメスES(XaXa)でノックダウンするとHRが回復することが判明し、両X染色体の活性化で発現亢進し相同組換えの抑制に働く遺伝子はBRCC3であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、両X染色体が活性化状態にあるメスのES細胞(XaXa)はオス(XY)に比べて相同組換え(HR)修復能が低いことを見出した。我々はin silico解析よりXsit低発現のヒト乳がん(XaXaの可能性が高い)では予後不良であることに気がつき、「女性腫瘍で両X染色体の活性化が起こるとHR修復が抑制され、DNA障害が修復され難くなり、悪性度の亢進を来す可能性がある」と仮説を立てた。本研究により両X染色体活性化に伴う相同組換えの低下の原因がBRCA1複合体抑制遺伝子のBRCC3の過剰発現であることが判明した。本研究により女性腫瘍進展の分子機構の理解と克服に貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In female somatic cells, one side of the X chromosome is inactivated (XaXi), but in ES cells and iPS cells it is XaXa. XaXa is also seen with some frequency in human breast cancer cells. We found that female ES cells have lower homologous recombination (HR) ability than males. However, the molecular mechanism of HR suppression by activation of both X chromosomes is unknown. In this study, we searched for the responsible gene by RNA-Seq analysis and found a candidate gene, BRCC3. It was found that knocking down BRCC3 with female ES (XaXa) restored HR, suggesting that BRCC3 is the gene whose expression is upregulated by activation of both X chromosomes and acts to suppress homologous recombination.

研究分野：分子生物学

キーワード：X染色体 相同組換え修復 乳がん

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2本あるX染色体の活性化状態は細胞によって異なる。メス体細胞ではX染色体に存在する長鎖ノンコーディングRNA *Xist* の発現により、*Xist* がX染色体を取り巻いてヒストンメチル化を介してエピジェネティックに不活性化し、*Xist* が発現している側のX染色体は不活性化して(XaXi)いる。一方で、ES細胞やiPS細胞などの未分化な細胞では両X染色体が活性化(XaXa)している。ヒト乳がん細胞においてもある程度の頻度でXaXaが見らると報告されている。我々はメスのES細胞はオスのES細胞に比べてジーンターゲットング効率が低いことを経験的に気づいていた。しかしながら流通しているオスとメスのES細胞のバックグラウンドの違いなど、不明な点が多く、実験的な証明が必要であった。同じマウスペアから同一バックグラウンドのオス/メスのES細胞を複数樹立した。カンプトテシンによるDNA傷害をHR修復で修復する能力を評価するclonogenic assayで検証した。また、Nanog-GFPターゲットングベクターを用いたノックイン実験(HR-assay)でもメスのES細胞は相同組換え効率が有意に低いことが証明された。女性腫瘍においては発がん過程でのリプログラミングにより両X染色体の活性化(XaXa)が起こった場合、相同組換え修復が抑制されてゲノム変異が修復され難くなり、悪性度が亢進される可能性が高いと考えている。しかしながら両X染色体の活性化(XaXa)が起こった場合になぜHRが抑制されるのか分子メカニズムは不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、まず真に両X染色体活性化によりHR能が低下するかを分子生物学的に証明する。さらに両X染色体の活性化で発現亢進して相同組換えの抑制に働く遺伝子(*XHIG*: X-linked HR inhibitory gene)の候補を探索し、候補遺伝子の機能解析を行うことでX染色体性の相同組換え制御機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### X染色体状態によるHR能への影響の解析

我々はX染色体不活性化を誘導するDox-inducible *Xist* を導入したES細胞XX<sup>TX</sup>の樹立に成功した。Dox処理で*Xist*が誘導され片側X染色体を不活性化(XaX<sup>TX</sup>i)するとHR活性が回復することが判明し、X染色体にHR抑制遺伝子があることが示唆された。この細胞にHR能を測定するレポーターDRGFPあるいは非相同末端結合(NHEJ)を測定するEJ5GFPを導入し、I-SceIをトランスフェクションし、X染色体の活性化状態によるHRおよびNHEJへの影響をGFT陽性細胞を測定することにより評価した。

#### X染色体性相同組換え抑制遺伝子(*XHIG*)の探索

我々は同一バックグラウンドのメスXX及びオスXY ES細胞の樹立にすでに成功している。これらの細胞を3クローンずつ用いてRNA-Seq解析を行ない、両X染色体活性化状態で発現亢進した遺伝子を探索した。

#### *XHIG*の機能解析

*XHIG*候補遺伝子の機能解析については、Nanog-GFP HR assayを用いて、メスES(XaXa)で*XHIG*候補遺伝子をノックダウンするとHR能が回復するかで判定した。

### 4. 研究成果

#### X染色体状態によるHR能への影響の解析

Dox処理で片側X染色体を不活性化する細胞(XaX<sup>TX</sup>i)にHR能を測定するレポーターDRGFPを導入して、I-SceIをトランスフェクションしDNAの二重鎖切断を誘導し、X染色体の活性化状態によるHR能を評価した。その結果片側X染色体を不活性化の誘導により有意にHR能が上昇することが判明した。一方で非相同末端結合(NHEJ)を測定するEJ5GFPを用いた解析では片側X染色体を不活性化の影響は見られなかった。以上より片側X染色体を不活性化はHR能の回復に寄与することが証明された。

#### X染色体性相同組換え抑制遺伝子の探索

樹立した同一バックグラウンドのメスXX及びオスXY ES細胞を用いてRNA-Seqにより発現遺伝子の網羅的解析を行った。その結果、メス(XaXa)で発現亢進している遺伝子は1353あった。そのうちDNA修復に関連している遺伝子は10で、そのうちX染色体上の遺伝子は6あり、RT-qPCRでメスでの高発現を確認した。その中で相同組換え修復関連タンパク質BRCA1複合体の阻害分子として報告のある*BRCC3*遺伝子に注目することにした。

#### *BRCC3*の機能解析

*BRCC3*の機能解析については、メスES(XaXa)で*BRCC3*をノックダウンし、Nanog-GFP HR assay

を用いて HR 能を解析したところ、*BRCC3* をロックダウンにより HR 能が回復ことがわかった。このことは、メス ES において両 X 染色体が活性化により *BRCC3* が過剰発現していることが相同組換え能の低下の 1 因であることを強く示唆していると考えられる。

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 0件）

1. 著者名 Tamura, Y., *Ohhata, T., Niida, H., Sakai, S., Uchida C., Masumoto, K., Kotou, F., Wuts, A., *Kitagawa, M.	4. 巻 22
2. 論文標題 Homologous recombination is reduced in female embryonic stem cells by two active X chromosomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO Reports	6. 最初と最後の頁 e52190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.202052190	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 田村友香、大畑樹也、丹伊田浩行、酒井聡、内田千晴、増本一真、加藤文度、Anton Wuts、北川雅敏
2. 発表標題 メスES細胞では両X染色体の活性化により相同組換え効率が減少している
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masatoshi Kitagawa, Yuka Tamura, Satoshi Sakai, Hiroyuki Niida, Tatsuya Ohhata
2. 発表標題 Xist-dependent activation status of two X chromosomes is associated with homologous recombination efficiency in female ES cells
3. 学会等名 28th Annual Meeting of the RNA Society (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tatsuya Ohhata, Yuka Tamura, Anton Wutz, Masatoshi Kitagawa
2. 発表標題 Homologous recombination is reduced in female embryonic stem cells by two active X chromosomes
3. 学会等名 EMBO workshop X-chromosome inactivation: new insights on its 60th anniversary (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tatsuya Ohhata
2. 発表標題 Homologous recombination is reduced in female embryonic stem cells by two active X chromosomes
3. 学会等名 日本遺伝学会第95回大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

浜松医科大学医学部分子生物学講座 <a href="https://www.hama-med.ac.jp/education/fac-med/dept/mol-biol/index.html">https://www.hama-med.ac.jp/education/fac-med/dept/mol-biol/index.html</a>
---

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
研究分担者	丹伊田 浩行  (Niida Hiroyuki)  (20336671)	浜松医科大学・医学部・准教授   (13802)	
研究分担者	大畑 樹也  (Ohhata Tatsuya)  (80616459)	浜松医科大学・医学部・助教   (13802)	
研究分担者	酒井 聡  (Sakai Satoshi)  (50566081)	浜松医科大学・医学部・助教   (13802)	

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			
スイス	Inst. Mol. Health Sci., ETH			