

令和元年6月24日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08673

研究課題名(和文) がんの発生の男女差を規定する単一遺伝子DDX3Xの同定

研究課題名(英文) The mutations in DDX3X affect sex-biased cancer occurrence

研究代表者

百瀬 修二 (Momose, Shuji)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70360344

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)：DDX3Xは一部のがん種において一定頻度に変異のみられる遺伝子である。われわれは以前にDDX3Xが男性限局的に変異がみられることを見出した。DDX3Xががん化に関わる可能性が指摘されるも、がん遺伝子として機能するのか、がん抑制遺伝子として機能するのかを含め不明な点が多い。本研究ではDDX3Xの機能解析とともにがん発生の性差を含めて検討を行った。

DDX3XはAKTを含めたPI3K経路に対して負の制御機能を示すことが示唆された。このことはBLの特徴であるPI3K経路の恒常的活性化に対して、DDX3Xの変異がPI3K経路の活性化をもたらすがん抑制遺伝子として機能する可能性を示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一部のがん種では男女差がみられるが、性ホルモンが関わるがん種以外では、男女差がなぜ生じるかはわかっていない。本研究では性ホルモンの関与が低いがん種での男女差の機構として、遺伝子の存在する染色体としての性染色体に注目した。

常染色体では通常、2つの相同な遺伝子2つが存在し、がん抑制遺伝子では2つの遺伝子が傷害され初めて機能が喪失する。一方性染色体では、X染色体は女性で2本あるものの男性では1本しかなく、X染色体上に存在するがん抑制遺伝子に関しては男性は女性に比べて遺伝子の機能喪失に陥る可能性が高く、こうした機構ががんの男女差を生じさせている可能性が本研究により示された。

研究成果の概要(英文)：A subset of cancer harbors mutations in DDX3X and we identified DDX3X mutations in B cell lymphoma from our previous genetic screening. Though some types of cancer present sex-bias in its incidence, its underlying mechanism of sex-bias was not elucidated except for the involvement of sex hormone-related cancers. To explore the sex-biased cancer occurrence in the aspect of gene function, we analyzed DDX3X in B cell lymphoma cell lines that harbor DDX3X mutations. Finally we elucidated that wild type DDX3X suppressed PI3K pathway and DDX3X acts as tumor suppressor gene. Also DDX3X located in X-chromosome and reported that it escapes from X chromosomal inactivation. Therefore, the occurrence of DDX3X mutations in male than in female can easily to provoke genetic inactivation as male possess only one X chromosome.

研究分野：病理学

キーワード：リンパ腫 パーキットリンパ腫 DDX3X がんの性差

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサーの登場により、多くのがんにおける遺伝子異常が明らかとなってきた。われわれも独自に Burkitt リンパ腫 (BL) における遺伝子変異探索を通じ (Momose et al, Leukemia, 2015) BL において男性特異的に変異を有する遺伝子 *DDX3X* を見出した。また他のグループからも慢性リンパ球性白血病やNK/T細胞リンパ腫において男性優位に *DDX3X* に変異が生じるとの報告が相次いでなされた。これらのリンパ腫は、BL とともに疫学的に男性に優位に生じることから *DDX3X* の遺伝子変異と腫瘍発生の性差の関連が示唆される。

X染色体上の遺伝子は、通常ライオン仮説として知られるX染色体不活性化(XCI)を受け失活するが、*DDX3X*を含めた一部の遺伝子群はXCIを回避する機構が近年明らかとなった。したがって、遺伝学的に *DDX3X*は女性ではX染色体上にありながら active な遺伝子が2つ存在し、男性では遺伝子の数と同じく1つしかないことを意味している。

さらに *DDX3X* はがん抑制遺伝子として機能するのか、がん遺伝子として機能するのかも定まっていない。以上の観点から、本研究では *DDX3X* の機能を含め、腫瘍発生機構における役割を解明するものである。

2. 研究の目的

DDX3X は前述のように、腫瘍発生機構における役割はいまだに不明である。本研究では、分子生物学・ゲノム科学、さらにはモデル動物を作製し、*DDX3X* を介した腫瘍発症機構を関与するものである。

3. 研究の方法

- 1) BL 細胞株のうち、*DDX3X* に変異のみられる細胞株と *DDX3X* が野生型の細胞株をわれわれは入手しており、変異型細胞株には野生型の *DDX3X* を導入し、さらには野生型 *DDX3X* の細胞株の *DDX3X* の発現を抑制することで BL における *DDX3X* の機能を検討した。この際、*DDX3X* の機能のアウトプットとして、BL で恒常的活性化のみられる PI3 キナーゼ経路の分子の AKT のリン酸化を指標に行った。
- 2) *DDX3X* には 90% の相同性を有する *DDX3Y* が Y 染色体上に存在し、機能的な補完性が示唆されている。そこで、この遺伝子産物が BL で発現しているかどうか調べるために *DDX3X*, *DDX3Y* に特異的な抗体を作製した。
- 3) ヒト BL での遺伝子変異解析のために BL の DNA を抽出し、*DDX3X* の遺伝子解析をサンガーシーケンシング法にて検討した。
- 4) *DDX3X* の発現制御機構として、*DDX3X* の変異の他に、*DDX3X* のプロモーター領域のメチル化等のエピジェネティックな制御があるかどうかについて、BL の細胞株を用いて解析を行った
- 5) 個体レベルでの機能解析のために、*Ddx3x* のノックアウトイン(KI)マウスを作製した。研究開始時において、公共データベースにおける *Ddx3x* の KI マウス並びにノックアウト(KO)マウスの報告はみられなかった。*Ddx3x* の遺伝子改変動物を作製するにあたり、胎生致死も予想されるため、Cre-loxP システムを用いた KI マウスの作製を試みた。KI マウス作製のために Crispr-Cas9 システムを用いた遺伝子改変を行った。

4. 研究成果

BL 細胞株での *DDX3X* の役割に関して、*DDX3X* に変異のみられる BL 細胞株に野生型 *DDX3X* を導入した結果、AKT のリン酸化の抑制とともに細胞抑制効果がみられた。さらに野生型の *DDX3X* をもつ BL 細胞株では、*DDX3X* の発現抑制によって、AKT のリン酸化 (Ser473) の抑制効果がみられた。このことは、*DDX3X* が PI3 キナーゼ経路に対して抑制機能を持っていることが示唆された。

次に、*DDX3X* と *DDX3Y* に対する特異的抗体の作成に成功し、男性由来の BL 細胞株において、*DDX3Y* の発現はみられず、男性において、*DDX3Y* が *DDX3X* の機能の補完性を担う可能性は否定的となった。

メチル化解析において、*DDX3X* の発現はメチル化による発現抑制機構が働いている可能性は低いように考えられた。

また B 細胞腫瘍の発症機構の含め個体レベルでの *Ddx3x* の機能解析のための KI マウス樹立のために、Cre-loxP システムを用いて *Ddx3x* の intron 4-5 ならびに intron 14-15 の領域への loxP 配列の導入に成功し、F1 への germ line transmission も確認された。現在種々の Cre トランスジェニックマウスと交配し、個体レベルで *Ddx3x* の解析を進めている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

1. Tokuhira M, Tabayashi T, Tanaka Y, Takahashi Y, Kimura Y, Tomikawa T, Anan-Nemoto T, Momose S, Higashi M, Okuyama A, Watanabe R, Amano K, Tamaru JI, Kizaki M. The

- aggressive clinical courses of Hodgkin lymphoma primarily diagnosed as methotrexate-induced non-specific lymphoproliferative disorder in patients with rheumatoid arthritis. J Clin Exp Hematop. 2017;56(3):165-169 (査読あり)
2. Yamashita T, Higashi M, Kawano R, et al. Anaplastic large cell lymphoma with TP63 rearrangement: A dismal prognosis. Pathol Int. 2019 Mar;69(3):155-159.3. (査読あり)
 3. Tokuhira M, Saito S, Okuyama A, et al. Clinicopathologic investigation of methotrexate-induced lymphoproliferative disorders, with a focus on regression. Leuk Lymphoma. 2018;59(5):1143-52. (査読あり)
 4. Tokuhira M, Tabayashi T, Tanaka Y, et al. The aggressive clinical courses of Hodgkin lymphoma primarily diagnosed as methotrexate-induced non-specific lymphoproliferative disorder in patients with rheumatoid arthritis. J Clin Exp Hematop. 2017;56(3):165-9. (査読あり)
 5. Yamashita T, Higashi M, Momose S, et al. Nuclear expression of Y box binding-1 is important for resistance to chemotherapy including gemcitabine in TP53-mutated bladder cancer. Int J Oncol. 2017;51(2):579-86. (査読あり)
 6. Tanaka Y, Takahashi Y, Kimura Y, Tomikawa T, Anan T, Sagawa M, Tabayashi T, Watanabe R, Tokuhira M, Momose S, Tamaru JI, Kizaki M. [Human parvovirus B19-induced hemophagocytic lymphohistiocytosis and myocarditis in an adult patient with hereditary spherocytosis]. Rinsho Ketsueki. 2018, 59(6):682-687. (査読あり)
 7. 菊地 淳, 百瀬修二, 田丸淳一. MYCのタンパク発現量を基軸とした高悪性度B細胞性リンパ腫の臨床病態の解明. 埼玉医科大学雑誌. 2017;43(2):165-7.
 8. 百瀬修二, 田丸淳一. 【変わりゆくリンパ腫の診断と治療-一般外来での初発症状から最新治療まで】リンパ腫の病理分類. 内科. 2016;117(6):1279-84.

〔学会発表〕(計3件)

1. 百瀬修二, 田丸淳一, High grade B-cell lymphoma の病理診断 - 血液病理医の立場から (シンポジウム) 第 65 回日本臨床検査医学会学術集会・2018/11
2. Rizq O, Mimura N, Oshima M, et al. Loss of Utx with Braf V600E induces mature B-cell tumorigenesis in conditional mouse model. 第 80 回日本血液学会. 2018/10
3. 百瀬修二, 田丸淳一, リンパ腫におけるゲノム異常と形態像の連関 (シンポジウム) 第 50 回日本臨床分子形態学会総会・2018/09

〔図書〕(計6件)

1. 百瀬修二, 田丸淳一. ALK 陽性大細胞型 B 細胞リンパ腫. リンパ腫アトラス第 5 版 編集; 中村栄男, 大島孝一, 竹内賢吾, 田丸淳一, 中村直哉, 吉野正. 文光堂 東京 2018;pp 172-175
2. 田丸淳一, 東守洋, 百瀬修二, 浅野温子. 古典的ホジキンリンパ腫
3. リンパ腫アトラス第 5 版 編集; 中村栄男, 大島孝一, 竹内賢吾, 田丸淳一, 中村直哉, 吉野正. 文光堂 東京 2018;pp 273-282
4. 田丸淳一, 百瀬修二. ウィルス性リンパ節炎 その他のウィルス感染症. リンパ腫アトラス第 5 版 編集; 中村栄男, 大島孝一, 竹内賢吾, 田丸淳一, 中村直哉, 吉野正. 文光堂 東京 2018;pp 370-375
5. 百瀬修二, 田丸淳一. ALK 陽性大細胞型 B 細胞リンパ腫. WHO 分類改訂第 4 版による 白血病・リンパ系腫瘍の病態学. 編集; 木崎昌弘, 田丸淳一. 中外医薬社 東京. 2019;pp 345-349
6. 高柳奈津子, 百瀬修二, 田丸淳一. 高悪性度 B 細胞性リンパ腫 WHO 分類改訂第 4 版による 白血病・リンパ系腫瘍の病態学. 編集; 木崎昌弘, 田丸淳一. 中外医薬社 東京. 2019;pp 364-374

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：田丸淳一

ローマ字氏名： Tamaru, Jun-ichi

所属研究機関名：埼玉医科大学

部局名： 医学部

職名： 教授

研究者番号(8桁): 30188429

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：