

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10086

研究課題名（和文）染色体工学技術を利用したゲノムライティングによる口腔がんの発生機構の解明

研究課題名（英文）Study to investigate the mechanism of oral cancer development by using genome writing and chromosome engineering technology.

研究代表者

久郷 裕之（KUGOH, Hiroyuki）

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：40225131

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）：本研究では、ヒト3番染色体上にコードされるTERT抑制遺伝子の同定および染色体工学技術を用いたゲノムレベルでのTERT抑制機構の可能性を追求した。染色体工学的手法により3p21.3領域を保持する人工染色体の構築に成功し、さらにそれらがTERT発現を抑制することを明らかにした。以上の結果から、3p21.3領域には少なくとも1つTERT抑制遺伝子が存在することを明らかにした。

さらに3p21.3領域上の候補遺伝子である遺伝子A及び遺伝子Bについては、ノックダウンと過剰発現の実験結果から、これらの遺伝子が3番染色体上のTERT抑制に関わる責任遺伝子であることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、腎がんや口腔扁平上皮がんにおける3p21.3領域のヘテロ接合性の消失(LOH)が高頻度に認められることの背景にある生物学的意義として、TERT抑制遺伝子の喪失という新たな可能性を示すことができた。また、TERT遺伝子は、細胞に不死化能を与えるテロメラーゼ活性を制御する機能を持ち、がん細胞の特異的なマーカーとして着目され、分子標的薬のターゲットとして注目されている。したがって、本研究から得られた新規のTERT抑制遺伝子に関する知見は、これまでにないアプローチからのTERT抑制経路の発見につながる可能性を持ち、TERTを標的とした抗がん剤の開発に向けた道を拓く成果と考えられる。

研究成果の概要（英文）： In this study, we identified TERT suppressor genes encoded on human chromosome 3 and addressed the possibility of a genome-level TERT suppression mechanism using chromosome engineering technology. We succeeded in constructing HACs that carry the 3p21.3 region by chromosome engineering and further demonstrated that the HACs suppress TERT expression. These results indicate that there is at least one TERT-repressed gene in the 3p21.3 region.

Furthermore, the results of knockdown and overexpression experiments of candidate genes on the 3p21.3 region, gene A and gene B, strongly suggest that these genes are responsible for TERT repression on chromosome 3.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：TERT 染色体 人工染色体上 がん

1. 研究開始当初の背景

染色体末端にはテロメアと呼ばれる特定の反復配列が存在し、染色体を保護する役割を持つ。正常体細胞ではテロメアは細胞分裂ごとに短縮し、やがて細胞老化が引き起こされると、細胞周期が停止する。一方、がん細胞では短縮したテロメアが伸長・維持され、無限増殖能を得ている。これはテロメアを伸長するテロメラーゼ活性によるものであり、テロメラーゼはがん細胞のテロメアを伸長することで細胞老化を防ぎ、不死化能の獲得に寄与している。テロメラーゼは *TERT* と *TERC* のタンパク・RNA 複合体である。また、逆転写酵素である *TERT* がテロメラーゼ活性の制御因子として機能することが知られている。

これまで研究実施者は、微小核細胞融合法 (Microcell Mediated Chromosome Transfer: MMCT) を用いた正常ヒト 3 番染色体の腎がん細胞株 RCC23 および口腔扁平上皮がん細胞 (OSCC) 株 HSC3 への導入により *TERT* の発現が抑制されることを見出し、3 番染色体上に RCC、OSCC における新規 *TERT* 抑制遺伝子の存在を示した。また、OSCC では 17 番染色体短腕や 8 番染色体短腕、3 番染色体短腕の LOH (Loss of heterozygosity) が報告されている。17 番染色体短腕、8 番染色体短腕には、それぞれがん抑制遺伝子 *p53*、*CSMD1* がコードされている。しかし 3 番染色体短腕の LOH はしばしば認められる一方で、3 番染色体短腕に *TERT* 抑制遺伝子が存在するかどうかについては明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

研究実施者が独自に同定したヒト 3 番染色体上の複数のテロメラーゼ制御候補遺伝子の遺伝子単体から染色体ゲノムレベルにおける多角的な機能解析を通して、*TERT* 制御機構のミッシングリンクの解明から新たな口腔がん発生機構の理解を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト 3 番染色体上の新規 *TERT* 抑制遺伝子の同定

TERT 発現の抑制が認められたヒト 3 番染色体導入株 HSC3 細胞 (HSC3#3) において、候補遺伝子に対する siRNA を用いた遺伝子ノックダウン実験と、親株である HSC 細胞へプラスミドベクターを用いて候補遺伝子の cDNA を導入し強制発現実験により *TERT* 発現への影響を解析した。

(2) 新規 *TERT* 制御遺伝子による抗がん効果の検討

実験(1)より決定した *TERT* 制御遺伝子を HSC3 細胞へ導入し安定発現株を樹立後に、細胞形態変化の確認および細胞老化誘導の解析を細胞老化マーカーである α -ガラクトシダーゼの染色により行った。

(3) 人工染色体上へ巨大合成遺伝子の搭載 (*TERT* 制御候補遺伝子群)

3p21.3 染色体領域にコードされている候補 *TERT* 制御候補遺伝子の BAC をインテグレースによる部位特異的組換えによって、人工染色体上へ搭載を行った。

(4) 天然 3p21.3 染色体領域の人工染色体への搭載と染色体ゲノムレベル機能解析

3p21.3 領域を人工染色体へ搭載するために、人工テロメアおよびヒト 3p21.3 領域近傍相同領域を含むターゲティングベクターを構築し、ヒト 3 番染色体を保持するニワトリ B 細胞由来 DT40 細胞に導入させ相同組み換えにより改変 3 番染色体を作製した。次に、ゲノム編集により 3p21.3 領域付近に loxP 配列を挿入し、Cre 発現による人工染色体上の loxP サイトとの組み替えを生じさせ、neo 耐性構築による選択により 3p21.3 領域の人工染色体への搭載を行った (3p21.3-HAC)。さらに、上述で作製した天然型領域を搭載させた人工染色体 3p21.3-HAC を HSC3 細胞へ微小核細胞融合法により導入した。人工染色体導入クローン (HSC3 3p21.3-HAC) の単離後、*TERT* 発現動態や細胞増殖抑制能等を含むがん形質について解析を行った。

4. 研究成果

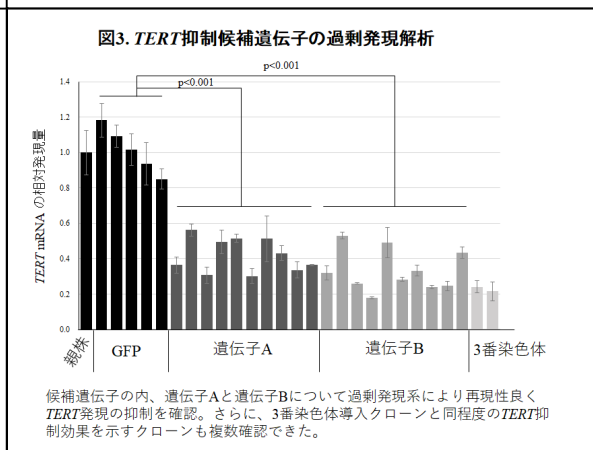
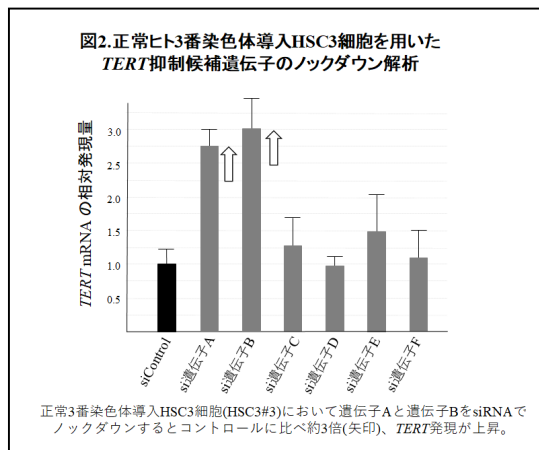
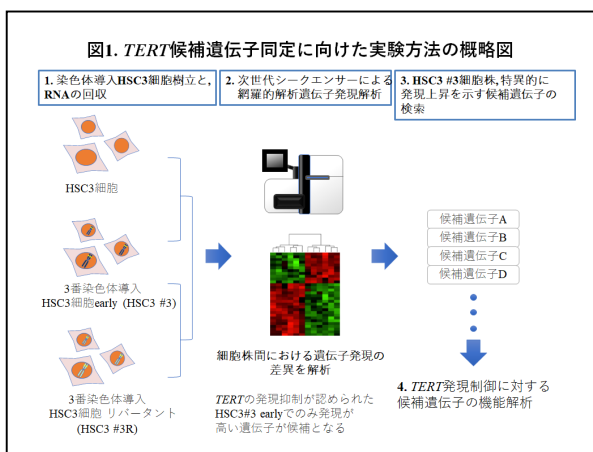
(1) ヒト 3 番染色体上の新規 *TERT* 抑制遺伝子の同定

ヒト 3 番染色体全長を腎がん細胞に導入すると *TERT* 発現は抑制されるが、3p21.3 領域を除去した 3 番染色体を導入したところ、*TERT* の発現が抑制されなくなった。したがって、*TERT* 抑制遺伝子がヒト 3 番染色体上の 3p21.3 領域に存在することが示唆された。また、HSC3 にヒト 3 番染色体を導入し (HSC3#3) *TERT* の発現解析を行ったところ、初期培養株において *TERT* の発現低下が確認された。さらに、HSC3#3 を長期培養すると、*TERT* が再活性化した HSC3#3R が得られた。そこで *TERT* 抑制遺伝子を同定する目的で、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析を行い、HSC3#3 細胞株特異的に発現上昇を示す遺伝子の検索を行った (図 1)。HSC3 親株、

HSC3#3R で発現が低下し、HSC3#3 で発現が上昇している遺伝子を解析すると、3 番染色体上の遺伝子が 40 個得られた。そのうち、3p21.3 領域の遺伝子が 9 個含まれていた。

続けて、siRNA による *TERT* 抑制遺伝子の同定を行ったところ、特に遺伝子 A 及び遺伝子 B において *TERT* 発現量が上昇した (図 2)。次に、遺伝子 A 及び遺伝子の cDNA をコードしたプラスミドベクターを用いた安定発現株を樹立し、強制発現系による *TERT* 抑制効果について検討を行った。その結果、遺伝子 A 及び遺伝子 B の両方において樹立した 10 クローン全てにおいて、親株およびコントロールである *GFP* 発現クローンと比較して *TERT* 発現抑制が認められた。さらに、ヒト 3 番染色体導入クローンと同等レベルまで *TERT* の発現抑制が認められるクローンも含まれていた (図 3)。

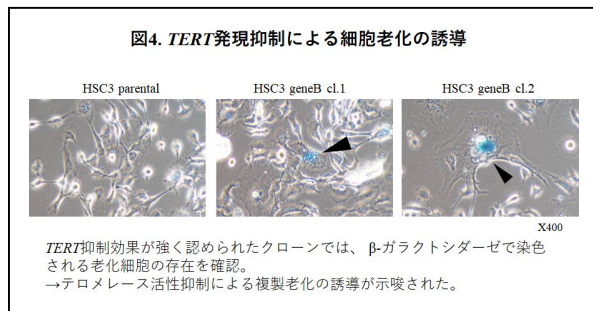
以上の結果から、遺伝子 A 及び遺伝子 B が *TERT* 抑制責任遺伝子であることが強く示唆された。



(2) 新規 *TERT* 制御遺伝子による抗がん効果の検討

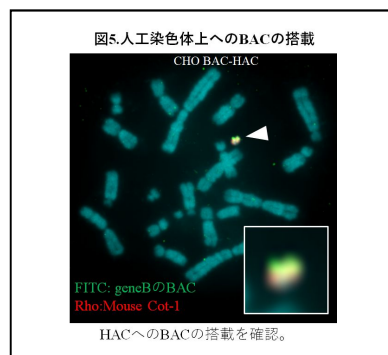
TERT 発現が特に顕著に認められた遺伝子 B の 2 つのクローンについて、細胞老化誘導の有無を β -ガラクトシダーゼ染色法により解析を行った。その結果、 β -ガラクトシダーゼで染色される細胞老化の存在が確認された (図 4)。

この結果から、解析したクローンにおいて、*TERT* 発現低下に起因したテロメラーゼ活性抑制による複製老化の誘導が示唆された。



(3) 人工染色体上へ巨大合成遺伝子の搭載 (*TERT* 制御候補遺伝子群)

遺伝子 B については人工染色体上への BAC の搭載を FISH 解析により確認した (図 5)。一方、遺伝子 A については得られたクローンの解析を行っている。



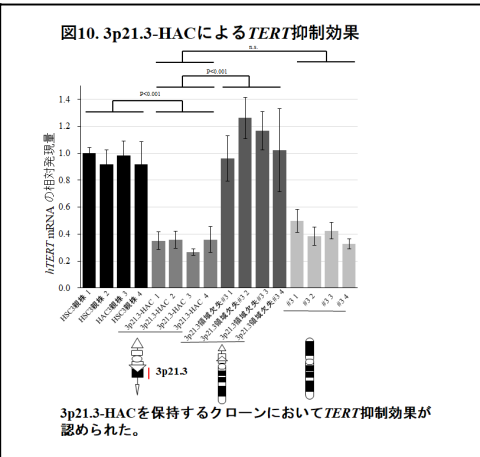
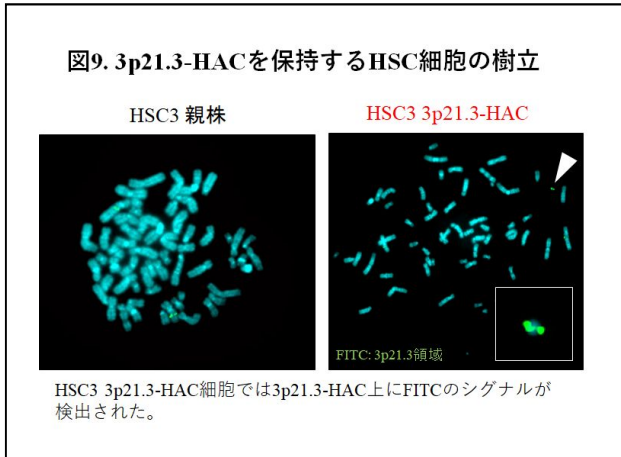
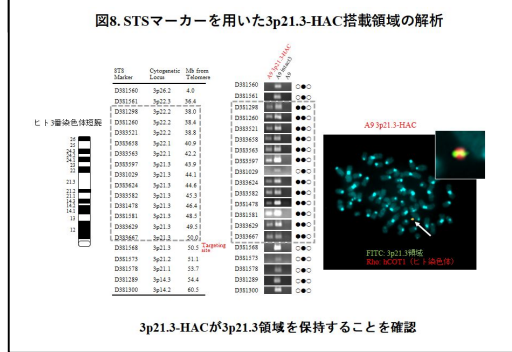
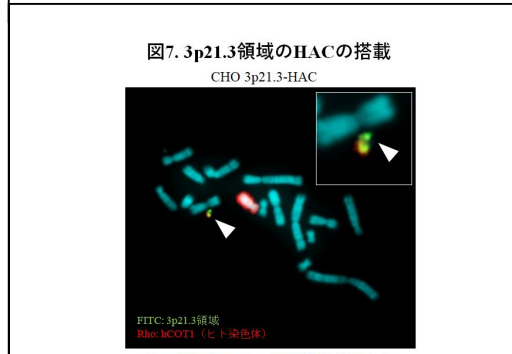
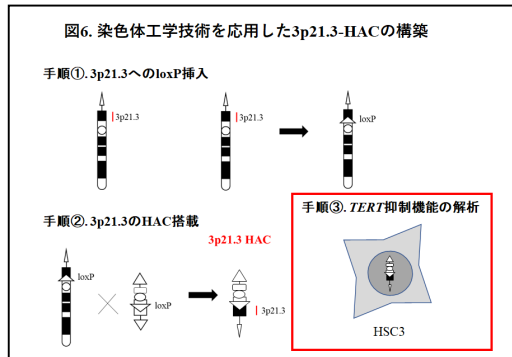
(4) 天然 3p21.3 染色体領域の人工染色体への搭載 (3p21.3-HAC) と染色体ゲノムレベル機能解析

染色体工学技術を用いて、ヒト人工染色体 (HAC) 上へ 3p21.3 領域の搭載を行った (図 6)。まず、3p21.3 領域を HAC に搭載するために、CRISPR/Cas9 を利用し、hChr.3delP22 (3p21.3 領域より短腕側が削除されたヒト 3 番染色体断片) を保持する CHO 細胞の 3p21.3 領域に対して loxP サイトを挿入した。次に、MMCT 法により loxP サイトが挿入された hChr.3delP22 を、HAC を保持する CHO hprt^{-/-} 細胞へ移入を行った。

続いて、組換え酵素 Cre を導入し発現させることにより、Cre/loxP を利用した相互転座による 3p21.3 領域の HAC への搭載を実施した。3p21.3 領域がヒト 3 番染色体から HAC に転座されているか確認するため FISH による解析を行った。その結果、Cre 導入後の CHO hprt^{-/-} 3p21.3-HAC 細胞では digoxigenin で標識した HAC 上に biotin で標識した 3p21.3 領域における FITC のシグナルが検出された(図 7)。また、副産物として 3p21.3 領域を欠失したヒト 3 番染色体 (hChr.3del13p21.3) を獲得し、FISH により biotin で標識した 3p21.3 領域の FITC シグナルが検出されないことを確認した。

最後に、3p21.3-HAC がヒト 3 番染色体の目的のゲノム領域を保持しているかを解析するため、ゲノム抽出を実施し、ヒト 3 番染色体における 20 個の STS マーカーを使用した PCR を行った。その結果、3p21.3-HAC は 3p21.3 領域の D3S3677 から 3p22.2 領域の D3S1298 までが搭載されていることが示された(図 8)。以上の結果から、Cre/loxP システムの利用により 3p21.3 領域を HAC に搭載することに成功した。

次に、3p21.3-HAC が HSC3 細胞において *TERT* 抑制効果を示すかどうか解析するため、まず 3p21.3-HAC 及び hChr.3del13p21.3 をそれぞれ A9 細胞から HSC3 細胞に導入し、FISH を実施した。HSC3 細胞では biotin で標識された 3p21.3 領域を示す FITC のシグナルが 2 つ検出された。HSC3 3p21.3-HAC 細胞では HSC3 細胞由来の FITC シグナルに加え 3p21.3-HAC 上に FITC のシグナルが検出された(図 9)。HSC3 細胞、HSC3 3p21.3-HAC 細胞、HSC3 hChr.3del13p21.3 (3p21.3 領域よりテロメア側が削除されたヒト 3 番染色体) 細胞、HSC3#3 細胞から RNA を抽出し合成した cDNA を用いて qRT-PCR を実施した。その結果、親株と比較して、HSC3 3p21.3-HAC 細胞において *TERT* が 6 割程度抑制された(図 10)。これは、正常 3 番染色体を保持する HSC3#3 細胞と同程度の抑制効果であった。一方、HSC3 hChr.3del13p21.3 細胞では *TERT* 発現量は抑制されなかった。以上より、HSC3 細胞において、3p21.3 領域を保持する HAC は *TERT* の発現を有意に抑制することが示された。



本研究では、ヒト 3 番染色体上にコードされる *TERT* 抑制遺伝子の同定および染色体工学技術を用いたゲノムレベルでの 3p21.3 領域の *TERT* 抑制機構の可能性を追求した。染色体工学的手法により 3p21.3 領域を保持する HAC の構築に成功し (3p21.3-HAC)、さらに 3p21.3-HAC を HSC3 細胞に導入することにより、*TERT* 発現が親株と比較して有意に抑制されることを確認した。一方、hChr.3del13p21.3 を導入した HSC3 細胞では *TERT* 発現量は抑制されなかった。以上の結果から、3p21.3 領域には少なくとも 1 つ *TERT* 抑制遺伝子が存在し、OSCC における 3p21.3 領域の LOH には *TERT* 抑制遺伝子の喪失という意義を持つことが考えられた。さらに 3p21.3 領域上の候補遺伝子である遺伝子 A 及び遺伝子 B については、ロックダウンと過剰発現の実験系により、これ

らの遺伝子が3番染色体上の *TERT* 抑制に関わる責任遺伝子であることが強く示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Shimizu R, Ohira T, Yagyu T, Yumioka T, Yamaguchi N, Iwamoto H, Morizane S, Hikita K, Honda M, Takenaka A, Kugoh H.	4. 巻 23(3):92.
2. 論文標題 Activation of PPAR in bladder cancer via introduction of the long arm of human chromosome 9.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2022.13212.	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 -
1. 著者名 Ohira T, Nakagawa S, Takeshita J, Aburatani H, Kugoh H.	4. 巻 15;11(1):18405.
2. 論文標題 PITX1 inhibits the growth and proliferation of melanoma cells through regulation of SOX family genes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-97791-6.	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 -
1. 著者名 Yagyu T, Ohira T, Shimizu R, Morimoto M, Murakami Y, Hanaki T, Kihara K, Matsunaga T, Yamamoto M, Tokuyasu N, Sakamoto T, Fujiwara Y, Kugoh H.	4. 巻 28;11(1):15355.
2. 論文標題 Human chromosome 3p21.3 carries TERT transcriptional regulators in pancreatic cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-94711-6.	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 -
1. 著者名 Inaoka D, Sunamura N, Ohira T, Nakayama Y, Kugoh H.	4. 巻 42
2. 論文標題 A novel Xist RNA-mediated chromosome inactivation model using a mouse artificial chromosome.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biotechnology Letters	6. 最初と最後の頁 697-705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10529-020-02826-z.	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 -

1. 著者名 Ohira T, Miyauchi K, Uno N, Shimizu N, Kazuki Y, Oshimura M, Kugoh H.	4. 巻 18
2. 論文標題 An efficient protein production system via gene amplification on a human artificial chromosome and the chromosome transfer to CHO cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-53116-2.	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 -

1. 著者名 Ohira T, Kojima H, Kuroda Y, Aoki S, Inaoka D, Osaki M, Wanibuchi H, Okada F, Oshimura M, Kugoh H.	4. 巻 12
2. 論文標題 PITX1 protein interacts with ZCCHC10 to regulate hTERT mRNA transcription.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plos one	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0217605.	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 柳生 拓輝、大平 崇人、清水 龍太郎、藤原 義之、久郷 裕之
2. 発表標題 染色体工学技術を応用した膀胱がんにおけるテロメラーゼ抑制領域3p21.3の同定
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 吉村 佳帆、大平 崇人、久郷 裕之
2. 発表標題 3p21.3-p22.2領域搭載ヒト人工染色体は口腔がんにおいてhTERTの発現を抑制する
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 T. Yagyu, T. Ohira, H. Kugoh, Y. Fujiwara.
2. 発表標題 Identification of a telomerase repressor region on 3p21.3 by chromosome engineering.
3. 学会等名 第30回 日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 T. Ohira, H. Kugoh.
2. 発表標題 PITX1 is a novel suppressor of SOX10 and inhibit melanoma growth.
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 T. Ohira, K. Miyauchi, N. UNO, N. Shimizu, K. Kazuki, M. Oshimura, H. Kugoh.
2. 発表標題 An efficient protein production system via gene amplification on a human artificial chromosome and the chromosome transfer to CHO cells.
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

鳥取大学 医学部 生命科学科 染色体医工学分野 HP http://saiboukougaku.jimdo.com/ ホームページ1 https://saiboukougaku.jimdofree.com/ ホームページ2 https://www.med.tottori-u.ac.jp/chromosome/

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
研究協力者	大平 崇人 (OHIRA Takahito) (60757665)	鳥取大学・医学部・助教 (15101)	

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