

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22559

研究課題名(和文)女性腫瘍の発症/進展を左右する性染色体性相同組換え制御機構の解明と応用

研究課題名(英文)Elucidation of homologous recombination depending on X-chromosome status which associates onset and progression of female tumors

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):哺乳動物の体細胞では、片側X染色体が不活性化(XaXi)している。一方で未分化細胞は両X染色体が活性化状態(XaXa)を呈す。本研究では(1)同一親マウスからオス、メスES細胞を樹立し、メスがオスより相同組換え修復能(HR)が低下していることを証明した。さらに(2)Dox誘導性Xistを導入したメスES細胞を用い、XaXi(Dox(+))でオスと同程度にHR活性が回復することを証明した。(3)X染色体上にあり相同組換え修復の抑制に働くBRCC3がメスで高発現し、HR抑制に関与することを証明した。(4)ヒト乳がん患者の予後に創刊していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はヒトの女性乳がんにおけるin silico解析で、両X染色体の活性化を示唆するXistが低発現の患者の予後が不良で、両X染色体の活性化により発現亢進するBRCC3の高発現の患者の予後が不良であることが示唆された。このことは乳がんなどの女性腫瘍で両X染色体が活性化している場合は、BRCC3の発現が亢進することで相同組換え修復が低下し、変異の蓄積やゲノムの不安定性が高まり、悪性亢進の可能性が高まることが予想される。本研究は女性がん細胞においては、X染色体の活性化やBRCC3の発現を指標にした新たな予後予測が可能であることを示唆しており、さらに検証を進めていく予定である。

研究成果の概要(英文):In mammalian somatic cells, the unilateral X chromosome is inactivated (XaXi). On the other hand, in undifferentiated cells, both X chromosomes are in an activated state (XaXa). In this study, (1) male and female ES cells were established from the same parent mouse, and it was proved that females have lower homologous recombination repair ability (HR) than males. (2) Using female ES cells introduced with Dox-induced Xist, it was demonstrated that XaXi (Dox (+)) restores HR activity to the same extent as males. (3) It was proved that BRCC3, which is on the X chromosome and acts to suppress homologous recombination repair, is highly expressed in females and is involved in HR suppression. (4) It was found that the publication was launched for human breast cancer and the prognosis of patients.

研究分野：分子生物学

キーワード：相同組換え X染色体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の体細胞では、X染色体不活性化を誘導する長鎖ノンコーディングRNA *Xist* の発現により片側X染色体が不活性化(XaXi)している。一方でES細胞、iPS細胞などの未分化細胞は両X染色体が活性化状態(XaXa)を呈す。また、一部の初期女性乳がん細胞でも、両X染色体の活性化(XaXa)が報告されていたが、発がんおよび悪性化との関係は不明である(Chaligné R et al, *Genome Res* 2015)。一方で、従来から用いられていたマウスES細胞を用いたジーンターゲティング法において、メスES細胞(XaXa)では、オス(XaYa)よりも相同組換え体の出現効率が低いことを経験的に認知されていた。しかしながら株間の差による可能性を排除できず、オスよりメスES細胞で相同組換え(HR)効率が低いことの実証やその原因解明はなされていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、以下の研究によりオスよりメスES細胞で相同組換え(HR)効率が低いことの実証およびその原因解明の解明を行い、さらにX染色体の活性化状態とヒト乳がんにおける予後について分析する事を目的とする。

1. 同一親マウスから複数のオス、メスES細胞を樹立し、相同組換え(HR)能を比較することにより評価する。
2. X染色体不活性化を開始する *Xist* RNA を Dox 誘導性プロモーターによる制御を可能にし、同一細胞でX染色体が活性状態を人為的に操作し、XaXa と XaXi の状態でのHR能を比較評価する。
3. 相同組換え(HR)修復および非相同末端結合(NHEJ)の効率の雌雄差を検証する。
4. メスにおけるHR能低下の原因を明らかにする為、1で樹立したメス、オスES細胞を用いて、RNA-seqによる発現遺伝子解析とその機能解析を行う。
5. 4で見出された原因遺伝子のメスES細胞のHR能における機能を解析する。
6. 4,5で見出された原因遺伝子のヒト乳がんにおける予後解析を *in silico* で行い、がんにおける両X染色体活性化の意味を考察する。

### 3. 研究の方法

1. 野生型オス/メスマウスを交配させ、複数のオス(XaYa)、メス(XaXa)ES細胞(129<sup>Ter</sup>/SvJcl)を樹立した。オス、メスES細胞3クローンずつを用い、DNA修復効率および相同組換え効率を評価した。DNA修復効率は、相同組換え修復能を示すカンプトテシン添加後の生存率、または非相同末端結合能を示すエトポシド添加後の生存率、を算出した(clonogenic assay)。さらに、遺伝子ターゲティングベクター(Nanog-2A-GFP)を利用した相同組換え体出現率(Nanog HR assay)で検証した。
2. *Xist* 遺伝子上流にDox誘導性プロモーターをノックインしたES細胞(X<sup>JF1</sup>X<sup>TX</sup>)を樹立した。Dox(+/-)により同一細胞でX染色体の活性状態を人為的に操作してXaXiおよびXaXa状態にした後、Nanog HR assayで評価した。
3. HRまたはNHEJ効率検証レポーター(HR: DRGFP, NHEJ: EJ5GFP)を、2で樹立したX<sup>JF1</sup>X<sup>TX</sup> ES細胞に導入し、HRおよびNHEJを検出し、それぞれの効率を算出した(HR and NHEJ reporter assay)。
4. 1で樹立したメス、オスES細胞3クローンずつを用いて、RNA-seqによる発現遺伝子解析を行い、メスで有意に多く発現しているX染色体上の遺伝子で、HRの抑制に機能する可能性のあるものを探索した。
5. 4で同定したBRCC3のsiRNAを合成し、1で樹立したメス、オスES細胞3クローンずつにトランスフェクトし、Nanog HR assayで

評価した。

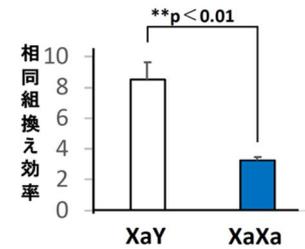
6. Web ツール (Kaplan-Meier Plotter, Nagy et al 2018) を用いた *in silico* で予後解析を行い、ヒト乳がんにおける予後を *Xist*、*BRCC3* の発現の high/low で解析した。

#### 4. 研究成果

同一親マウスから複数のオス、メス ES 細胞 (129<sup>Tet</sup>/SvJcl) の樹立に成功した。

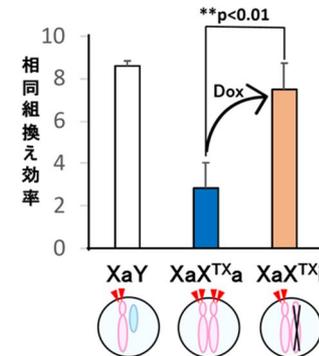
また、オス、メス ES 細胞 3 クローンずつを用いて、カンプトテシン (HR) またはエトポシド (NHEJ) 添加条件での clonogenic assay を行った結果、エトポシドでは有意な差はなかったが、カンプトテシン添加の clonogenic assay でメスがオスよりカンプトテシン感受性が高かった。この結果はメスがオスより相同組換え修復能が低下していることを示唆している。また、Nanog HR assay でもメスがオスより HR 能が低いことが判明した。以上より、メス ES 細胞はオスより相同組換え能が低いことが証明された (図 1)。

図1. メスオスESの相同組換え能



2. 樹立した  $X^{JF1}X^{TX}$  ES 細胞を用い、Dox(+/-) により X 染色体の活性状態を XaXi および XaXa 状態に人為的に操作し、Nanog HR assay で評価したところ、XaXi (Dox(+)) でオスと同程度に HR 活性が回復することが判明した (図 2)。

図2. X不活性化による相同組換え能の回復



3. HR または NHEJ 効率検証レポーター (HR: DRGFP, NHEJ: EJ5GFP) を  $X^{JF1}X^{TX}$  ES 細胞に導入し、HR および NHEJ の効率を解析したところ、片側 X 染色体の不活性化が起こった XaXi (Dox(+)) で HR 効率が上昇するが、NHEJ の効率は変化しないことが判明した。以上より両 X 染色体の活性化により相同組換え能が低下することが証明された。

4. メス、オス ES 細胞を用いた、RNA-seq による発現遺伝子解析を行ったところ、メスで 1353 遺伝子が多く発現しており、そのうち X

染色体上の遺伝子で DNA 修復に参与する可能性のある遺伝子 6 つを同定した。そのうち、*BRCC3* は BRCA 複合体と結合して相同組換え修復を抑制的に制御していることが報告されている。*BRCC3* はメスで発現亢進していることが RT-pPCR でも確認できた。

5. 4 で同定した *BRCC3* の siRNA を、メス ES 細胞にトランスフェクトすることで *BRCC3* をノックダウンし、Nanog HR assay で評価したところ、HR 能が上昇することが判明した。以上より両 X 染色体の活性化しているメス ES 細胞では *BRCC3* の発現が亢進しており、それにより HR 能が抑制されていることが示唆された。

6. Kaplan-Meier Plotter を用いて、ヒト乳がんにおける予後と *Xist*、*BRCC3* の発現との相関を解析した。その結果、両 X 染色体の活性化を示唆する *Xist* low で予後が悪いこと、*BRCC3* high で予後が悪いことが判明した。

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 1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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0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

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------