

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09372

研究課題名(和文)性差関連因子の解析による膠芽腫の発生や治療抵抗性に関わる新たな経路の同定

研究課題名(英文) Identification of driver and therapeutic resistant pathways by analysing sex-differences in glioblastoma

研究代表者

上羽 哲也 (Ueba, Tetsuya)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号：00314203

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)：膠芽腫の罹患や予後における性差の因子は不明である。性差に関連する性染色体のX染色体は、女性では2本あるうちの1本が転写的に不活性化され、遺伝子量補正に役立っている。本課題では、染色体工学技術を用いて不活化X染色体を脱落させ、膠芽腫の性差におけるこの染色体の機能を解明することを目的とした。膠芽腫初代培養細胞のX染色体trisomyの細胞において、染色体を複数箇所切断することで、X染色体の脱落を誘導し、X染色体disomyの細胞を分離した。これらの結果は、膠芽腫細胞において、染色体工学的手法によるX染色体の排除が可能であり、不活化X染色体の機能解析に有用であることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム編集により不活化X染色体の脱落を誘導することで、この染色体上に存在が想定される性差に関わる因子の同定や機能に関する解析が可能となり得た。染色体工学的手法により新たな膠芽腫の遺伝学的性質や性状の解明が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：Sex differences have been well identified in incidence and outcome of glioblastoma multiform (GBM), however, the knowledge about the major causes is very limited. X-chromosome inactivation (XCI) is the transcriptional silencing of one X-chromosome in female cells that compensate for the imbalance in gene dosages between XX females and XY males. In this study, we aimed to elucidate the function of inactivated X-chromosome in sex-difference of GBM using chromosome engineering technology. Selective X chromosome elimination was successfully achieved by multiple chromosome dissections via X-chromosome-targeted genome editing in primary cultured GBM cells with X trisomy and GBM cells with X disomy was isolated by screening. These results suggest that potential induction of chromosomal elimination by chromosomal engineering in GBM cells leads to functional analysis of inactive X chromosome.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：膠芽腫 染色体工学 X染色体不活化

1. 研究開始当初の背景

(1) 膠芽腫は、精力的な新規治療法の開発にも拘わらず、長い間、顕著な治療成績の向上が得られていない原発性脳腫瘍であり、平均余命は僅か1年数ヶ月である。膠芽腫は男性の発症率は女性に比べて約1.4-1.6倍高いことが知られている。一部のがんにおいて、発生に性差があることが知られているが、多くは性ホルモンの関与が示唆されている。しかしながら、悪性脳腫瘍では小児期や閉経後も含めた全ての年齢で男性において発生する可能性が高いことから性ホルモン以外の未知の因子がこの現象に関与していると考えられる。また、この性差に関しては、発生率に留まらず、テモゾロミドの感受性にも関与し、IDH1の変異患者の予後にも影響を与えていることが示唆されている。しかしながら、これらの臨床的な面における性差を十分に説明出来る証拠は報告されていない。

(2) X染色体は、女性で2本、男性で1本であるために、女性で片方のX染色体が不活性化され遺伝子量補正が行われる。X染色体不活性化(XCI)は主に齧歯類で研究をされてきた。近年、ヒトにおいてはその制御は齧歯類程厳格ではなく、X染色体不活性化を逸脱する遺伝子が発生時に性差を生み出す可能性が提唱された。次世代シーケンシングの技術によりXCIのマップとそれから逸脱する遺伝子が同定されている。しかしながら、このX染色体不活性化を逸脱する遺伝子の疾患における役割や機能については殆ど知られていない。これらの遺伝子は女性で男性より発現量が多くなるので生体において性差のあるイベントに重要であると考えられている。悪性神経膠腫の若年の女性患者において、X染色体不活性化に異常があることが報告されている。また、神経膠腫におけるgenome wide association study (GWAS)の結果、この腫瘍のリスクがX染色体上に存在する5つのSNPsを伴う56遺伝子と関連することが報告された。つまり、不活性化X染色体には神経膠腫の発生や病態と関連する因子が存在すると考えられる。しかしながら、性差に関与するX染色体上の分子や経路の直接的な証拠は報告されていない。

2. 研究の目的

ゲノム工学的手法を用いて膠芽腫における不活性化X染色体の機能を染色体レベルで明らかにする。それにより、女性特異的に発現量が増加するX染色体不活性化から逸脱する遺伝子の膠芽腫の性差における機能を解明する。

3. 研究の方法

(1) 4人の女性患者に由来する膠芽腫組織から分離、初代培養したがん幹細胞株を用いた。染色体標本作製し、X染色体セントロメアプローブを用いたFISH法により、X染色体数の観察と核型解析を行った。

(2) Database of Essential Genes(DEG)を用いたin silico解析により、膠芽腫と膀胱癌における必須遺伝子のうち、X染色体上に存在する5遺伝子を抽出した。これらの遺伝子特異的にindel変異を挿入可能なgRNAとCRISPER/Cas9を用いて膠芽腫幹細胞においてゲノム編集を行った。変異導入頻度はGeneArt Genomic Cleavage Detection Kit (Invitrogen)を用いたヌクレアーゼを用いた方法により、検討した。また、ゲノム編集後、2継代後の細胞でFISH解析を行い、X染色体の脱落頻度を観察した。次に、サブクローニング培養後の約400クローンにおいて、アンドロゲン受容体(AR)遺伝子内のCAG反復配列の多型を指標とするPCRによりスクリーニングを行った。X染色体を脱落した候補のクローンにおいてFISH解析を再び行った。

4. 研究成果

(1) 女性患者に由来する初代培養細胞の膠芽腫幹細胞における核型及び X 染色体の FISH 解析。4 つの膠芽腫細胞株において、染色体標本を作製し、X 染色体特異的セントロメアプローブを用いて FISH 解析を行った。染色体数は全ての細胞で 48-58 本の near-diploidy で、3 細胞で X 染色体が trisomy、1 細胞で tetrasomy であることが確認された。

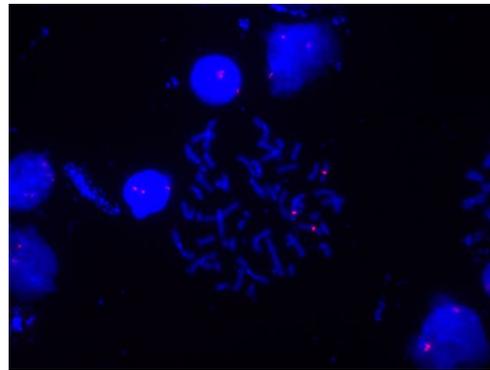


図 1 膠芽腫幹細胞株 (GBTS-1) の X 染色体セントロメアプローブ (赤) を用いた FISH 解析

(2) 膠芽腫における必須遺伝子の同定とそれらの遺伝子を標的とした indel 変異の導入。DEG(<https://tubic.org/deg/public/index.php>)を用いて膠芽腫と膀胱癌に共通の必須遺伝子を抽出した。そのうち、X 染色体上に存在する 5 遺伝子 (ALG13, DKC1, LAS1L, PGK1, UXT) を同定した。これらの遺伝子に indel 変異を挿入可能な gRNA を選択、入手後、CRISPER/Cas9 を用いて、膠芽腫幹細胞株 (GBTS-1) において変異導入を行った。それぞれ 1 遺伝子、3 遺伝子 (DKC1, LAS1L, PGK1)、5 遺伝子全てに変異導入を行い、変異導入頻度を T7 エンドヌクレアーゼ感受性アッセイにより評価をした。1 遺伝子に対する gRNA を導入した場合、39-97 % の効率で変異導入が確認された。複数の遺伝子を同時に標的にした場合、1 遺伝子当たりの gRNA 量が少なくなるために、変異導入効率も、3 遺伝子ではそれぞれ 16-33 %、5 遺伝子では 0-16 % であった。gRNA 導入後、1 週間程度では細胞増殖に変化は観察されなかった。

(3) X 染色体を脱落した膠芽腫幹細胞クローンのスクリーニング。1、3、5 遺伝子を標的としたゲノム編集後、サブクローニングを行い、各クローンについて AR 遺伝子内の反復配列を標的とした PCR により X 染色体の量的変化を検討した。1 または 3 遺伝子を標的とした場合、AR 遺伝子量が変動したクローンは得られなかったが、5 遺伝子を標的としたものから幾つかの候補クローンが得られた。そのうちの一つのクローン (Clone 59) では FISH 解析により、72.3 % の細胞で X 染色体が 2 本に減少し、disomy となっていることが確認された。

(4) indel 変異導入による X 染色体の排除効率の検討。X 染色体セントロメアプローブを用いて、3 または 5 遺伝子に対して変異導入した細胞において FISH を行い、X 染色体の脱落頻度を観察した (Table 1)。その結果、5 遺伝子に対して変異導入を行った細胞においてのみ、X 染色体が monosomy になっている細胞が存在する (3.1 %) ことが観察された。この結果は、染色体上の複数箇所における変異導入時に生じる切断が、染色体の脱落を誘導することを示唆している。

Number of X chromosomes	Parent cells	x3 gRNAs Mass	x5 gRNAs Mass	x5 gRNAs Clone 59
1	0/128 (0 %)	0/134 (0 %)	3/96 (3.1 %)	2/137 (1.4 %)

2	18/128 (14.1 %)	14/134 (10.4 %)	7/96 (7.3 %)	99/137 (72.3 %)
3	107/128 (83.6 %)	116/134 (86.6 %)	81/96 (84.4 %)	33/137 (24.1 %)
4	3/128 (2.3 %)	4/134 (3.0 %)	5/96 (5.2 %)	3/137 (2.2 %)
Total	128/128 (100 %)	134/134 (100 %)	96/96 (100 %)	137/137 (100 %)

Table 1 FISH 解析による X 染色体の数。Mass はゲノム編集から 2 継代培養後の細胞。

(5) X 染色体を脱落したクローン 59 のサブクローニング。さらに、クローン 59 をサブクローニングし高頻度に X 染色体 disomy の細胞の頻度を高めた細胞 (96 %) を分離した (図 2, 59-10)。本研究により X 染色体上の必須遺伝子を標的とする gRNA を用いたゲノム編集により染色体を一時的に切断することで染色体の脱落が誘導出来ることが確認されたので、このクローンに対して再度、ゲノム編集を行い、X 染色体 monosomy の細胞分離を試みている。クローン 59-10 は不活化 X 染色体と活性化 X 染色体を 1 本ずつ保持していることが AR 遺伝子の多型解析により判明している。今後、X 染色体 monosomy、disomy、trisomy の膠芽腫幹細胞のがん形質やトランスクリプトームの解析により、この腫瘍における不活化 X 染色体のもつ未知の機能の解明や性差を生み出す因子の同定が期待される。

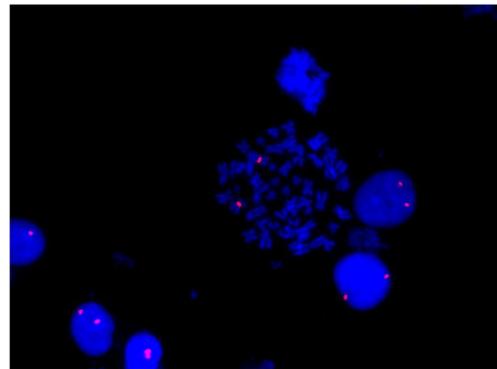


図 2 ゲノム編集により X 染色体を脱落させた GBTS-1 に由来するクローン 59-10 のセントロメアプローブ (赤) を用いた FISH 解析

< 引用文献 >

- Anna Carrano, Juan Jose Juarez, Diego Incontri, et al., Sex-Specific Differences in Glioblastoma, *Cells*, 10(7), (2021), 1783
 Quinn T Ostrom, Warren Coleman, William Huang, et al., Sex-specific gene and pathway modeling of inherited glioma risk, *Neuro Oncol*, 2019, 21(1), 71-82

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5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 Takemura Mitsuhiro, Sasaki Masanori, Kataoka-Sasaki Yuko, Kiyose Ryo, Nagahama Hiroshi, Oka Shinichi, Ukai Ryo, Yokoyama Takahiro, Kocsis Jeffery D., Ueba Tetsuya, Honmou Osamu	4. 巻 137
2. 論文標題 Repeated intravenous infusion of mesenchymal stem cells for enhanced functional recovery in a rat model of chronic cerebral ischemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 402-411
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3171/2021.8.JNS21687	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 -
1. 著者名 Morisawa Shumpei, Jobu Kohei, Ishida Tomoaki, Kawada Kei, Fukuda Hitoshi, Kawanishi Yu, Nakayama Taku, Yamamoto Shinkuro, Tamura Naohisa, Takemura Mitsuhiro, Kagimoto Nao, Ohta Tsuyoshi, Masahira Noritaka, Fukuhara Hideo, Ogura Shun-ichiro, Ueba Tetsuya, Inoue Keiji, Miyamura Mitsuhiro	4. 巻 37
2. 論文標題 Association of 5-aminolevulinic acid with intraoperative hypotension in malignant glioma surgery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Photodiagnosis and Photodynamic Therapy	6. 最初と最後の頁 102657 ~ 102657
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pdpdt.2021.102657	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 -
1. 著者名 Fukui Naoki, Yawata Toshio, Nakajo Takahito, Kawanishi Yu, Higashi Youichirou, Yamashita Tatsuyuki, Aratake Takaaki, Honke Koichi, Ueba Tetsuya	4. 巻 134
2. 論文標題 Targeting CD146 using folic acid?conjugated nanoparticles and suppression of tumor growth in a mouse glioma model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 1772-1782
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3171/2020.4.JNS193078	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 -
1. 著者名 Hamada Tomoya, Aratake Takaaki, Higashi Youichirou, Ueba Yusuke, Shimizu Takahiro, Shimizu Shogo, Yawata Toshio, Ueba Tetsuya, Nakamura Rina, Akizawa Toshifumi, Fujieda Mikiya, Saito Motoaki	4. 巻 61
2. 論文標題 Zinc-aggravated M1 microglia regulate astrocytic engulfment via P2×7 receptors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Trace Elements in Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 126518 ~ 126518
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jtemb.2020.126518	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 -

1. 著者名 Ueba Tetsuya	4. 巻 75
2. 論文標題 脳神経外科領域における開発途上の薬剤	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Brain Nerve	6. 最初と最後の頁 433-436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1416202355	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 -

1. 著者名 福井直樹、八幡俊男、上羽哲也	4. 巻 46
2. 論文標題 siRNA結合ナノパーティクルを用いた膠芽腫に対する標的遺伝子治療法の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 779-782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 川西 裕, 宇高 恵子, 八幡 俊男, 濱田 史泰, 竹村 光広, 上羽 佑亮, 中居 永一, 福田仁, 福井直樹, 上羽哲也
2. 発表標題 悪性神経膠腫に対するWT1-W10免疫療法
3. 学会等名 第80回日本脳神経外科総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川西裕, 宇高恵子, 八幡俊男, 藤田昇平, 西本祥大, 上羽佑亮, 中居永一, 福田仁, 福井直樹, 上羽哲也
2. 発表標題 悪性神経膠腫に対するWT1-W10免疫療法
3. 学会等名 第39回日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八幡俊男、藤田昇平、福井直樹、川西裕、西本祥大、上羽哲也
2. 発表標題 膠芽腫幹細胞におけるCD146の機能とその関連遺伝子の発現阻害による増殖抑制機構の検討
3. 学会等名 第39回日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八幡俊男、福井直樹、川西裕、上羽哲也
2. 発表標題 膠芽腫幹細胞が高発現するCD146の機能とその阻害による腫瘍増殖抑制機構の検討
3. 学会等名 第38回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川西 裕, 宇高恵子, 八幡俊男, 中居永一, 福田 仁, 福井直樹, 上羽哲也
2. 発表標題 悪性神経膠腫に対するWT1-W10免疫療法
3. 学会等名 第38回脳腫瘍病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川西 裕, 宇高 恵子, 八幡 俊男, 上羽 佑亮, 中居 永一, 福田 仁, 福井 直樹,
2. 発表標題 初発悪性神経膠腫に対するWT1-W10免疫療法
3. 学会等名 第79回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川西裕、宇高恵子、八幡俊男、藤田昇平、西本祥大、濱田史泰、竹村光広、中居永一、福井直樹、福田仁、上羽哲也
2. 発表標題 悪性神経膠腫に対するWT1-W10免疫療法
3. 学会等名 第81回日本脳神経外科学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤田昇平、八幡俊男、福井直樹、川西裕、西本祥大、上羽哲也
2. 発表標題 膠芽腫幹細胞におけるCD146の発現阻害による増殖抑制機構の検討
3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2022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
研究分担者	八幡 俊男 (Yawata Toshio) (40380323)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教 (16401)	

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