HamaMed-Repository
浜松医科大学学術機関リポジトリ
浜松医科大学
Hamamatsu University School of Medicine

Homologous recombination is reduced in female embryonic stem cells by two active X chromosomes

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2021-10-20 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 田村, 友香 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00003907

博士（医学）　田村　友香
論文題目
Homologous recombination is reduced in female embryonic stem cells by two active X chromosomes
（相同組換えはメス胚性幹細胞において 2 本の活性化 X 染色体により減少している）

論文の内容の要旨
［はじめに］
DNA 二本鎖切断（DSB）修復機構を利用したジーンターゲッティング法において、メスマウス胚性幹細胞（ES 細胞）では、オスよりも組換え体の出現効率が低いことを経験的に認知していたが、その実証や原因解明はなされていなかった。また、メス ES 細胞と同様に、一部の初期女性乳がん細胞では、X 染色体の再活性化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った。そこで本研究では、メス ES 細胞では、X 染色体不活性化を開始する *Xist* RNA の未発現により、両 X 染色体が活性状態であることに着目し、マウス ES 細胞における相同組換え（HR）修復および非相同末端結合（NHEJ）の効率の雌雄差を検証した。さらに、DSB 修復における活性化 X 染色体の寄与の分析、HR 効率の減少をきたす原因遺伝子の探索を行い、HR 効率を負に調節することが知られている X 染色体連鎖遺伝子 *Brcc3* を対象に解析した。そして、*BRCC3* と *XIST* の発現量が乳がんに与える影響についても検討を行った。
［材料ならびに方法］
野生型メス/オスマウス ES 細胞（129^{+Ter}/SvJcl）3 クローンずつおよびドキシサイクリン添加により *Xist* 遺伝子を誘導し、強制的に一方の X 染色体を不活性化できるメスマウス ES 細胞（$X^{JF1}X^{TX}$）を独自に樹立し、解析に用いた。
DNA 修復効率は、①カンプトテシンまたはエトポシド添加後の生存率の算出（clonogenic assay）、②遺伝子ターゲッティングベクター（Nanog-2A-GFP）を利用した相同組換え体出現率の算出（Nanog HR assay）、③HR または NHEJ 効率検証レポーター（HR: DRGFP, NHEJ: EJ5GFP）を利用した HR および NHEJ 効率の算出（HR and NHEJ reporter assay）にて検証した。
原因遺伝子の探索は、次世代シークエンシングを用いた雌雄 ES 細胞の各遺伝子発現量の比較により行った。DNA 修復関連遺伝子の抽出には、遺伝子オントロジー（GO）解析を用いた。*Brcc3* の機能は、発現量変動（ノックダウン、過発現）における HR 修復効率の変化を調べ検証した。*BRCC3* および *XIST* の発現量が乳がんの予後に与える影響は、データベースを用いて解析した（カプランマイヤー法）。
以上は、浜松医科大学動物実験委員会（承認番号: 2018014/2018019/2020006/

2020007/2020077）、浜松医科大学組換え DNA 実験安全委員会（承認番号: 28-13/2-44）で承認を得ている。

［結果］

メス ES 細胞は、オスに比べ、HR 効率を反映するカンプトテシン添加後の生存率が減少した（3 クローンずつの実験で複数の濃度において $p<0.05$）。NHEJ 効率を反映するエトポシドでは、有意な雌雄差はなかった。遺伝子ターゲッティングベクター導入後に、GFP 陽性コロニーを指標とした HR 陽性率は、メス ES 細胞のほうがオスよりも低かった（3 クローンずつの実験で $p<0.01$）。メス ES 細胞に HR 効率検証レポーターを導入して検証した結果、片方の X 染色体を不活性化した際に HR 効率の増加がみられた（$n=3$, $p<0.05$）。複数の実験系で、メス ES 細胞では HR 効率が減少しており、X 染色体不活性化の誘導により、HR 効率が増加することが明らかになった。NHEJ 効率は、活性化 X 染色体数による差を認めなかった。

次世代シークエンシングから、雌雄 ES 細胞間で多くの遺伝子発現量に差があることが判明した。この中には、DNA 修復に関与する遺伝子が多数検出され、HR や NHEJ を正または負に制御する報告のある遺伝子が複数含まれていた。このうち、X 染色体連鎖遺伝子 *Brcc3* をメス ES 細胞でノックダウンすると、HR 効率が増加した（2 クローンで各 $n=3$, $p<0.01$）。オス ES 細胞で過発現させた場合には、HR 効率は変化しなかった。

乳がんにおいて、*BRCC3* 高発現群及び *XIST* 低発現群は、予後不良と相関を示す結果となった（$p=9.0e-07$, $p=7.4e-10$）。

［考察］

メス ES 細胞の HR 効率の減少は、両 X 染色体の活性化に起因し、原因遺伝子が X 染色体上にあることが支持された。原因遺伝子の候補の一つである *Brcc3* は、メス ES 細胞の HR 効率低下に寄与している。しかし、メス ES 細胞では、多数の遺伝子発現がオスと異なっており、これらにより、*Brcc3* のみでなく、適切な DNA 修復を遂行するためのバランスが破綻することで、HR 効率の減少が引き起こされると考えられた。

X 染色体の再活性化を認める乳がんなどの女性がん細胞においても、X 染色体の活性化を指標にした予後予測や、原因遺伝子を標的とした治療が可能となることが期待される。

［結論］

メス ES 細胞では、オス ES 細胞よりも HR 効率が減少している。これは、両 X 染色体が活性化していることに起因する。X 染色体連鎖遺伝子 *Brcc3* の高発現は、メス ES 細胞の HR 効率減少の一つの原因であり、女性乳がんにおいても、*BRCC3* の高発現は、予後不良の因子となる。雌雄 ES 細胞では、*Brcc3* だけでなく多数の DNA 修復関連遺伝子の発現量に差があり、各々の機能の亢進や拮抗と

いった相互作用が、HR 制御に影響を及ぼしていることが示唆される。