

Base-resolution methylomes of gliomas bearing histone H3.3 mutations reveal a G34 mutant-specific signature shared with bone tumors

三月田, 祐平

<https://hdl.handle.net/2324/4475028>

出版情報 : 九州大学, 2020, 博士 (医学), 課程博士
バージョン :

権利関係 : (c) The Author(s) 2020. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

氏 名：三月田 祐平

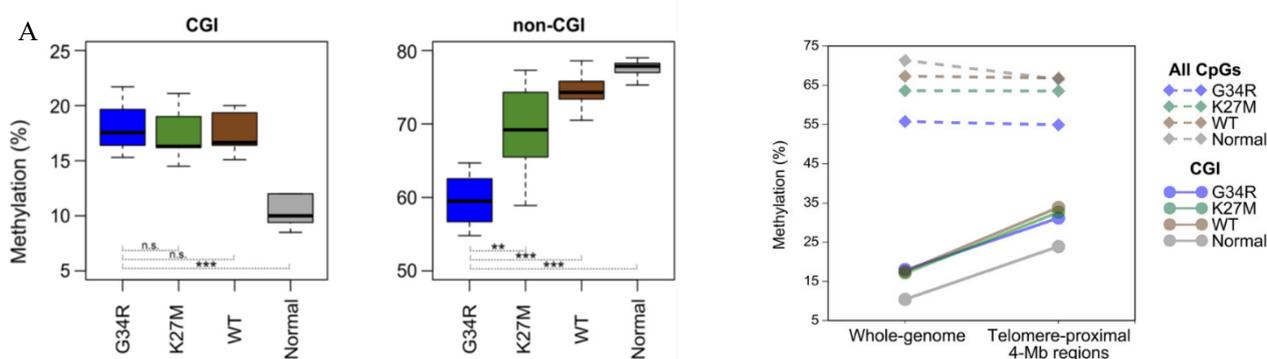
論 文 名：Base-resolution methylomes of gliomas bearing histone H3.3 mutations reveal aG34 mutant-specific signature shared with bone tumors

(一塩基解像度メチローム解析によるグリオーマと骨腫瘍で共通するヒストン H3.3 遺伝子 G34 変異の特異的メチロームシグナルの解明)

区 分：甲

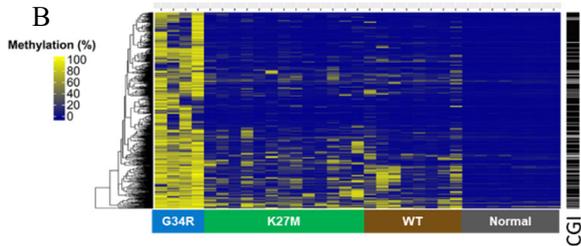
論 文 内 容 の 要 旨

ヒストンバリエント H3.3 をコードする *H3F3A* 遺伝子には腫瘍特異的な変異が存在する。K27M 変異や K36M 変異ではヒストンメチル化酵素を阻害することが知られているが、G34 変異の作用機序はよく分かっていない。我々は過去に九州大学病院での 400 例余りのグリオーマ自験例の凍結標本を解析した結果、K27M 変異例 9 例と G34R 変異例 4 例が含まれており、これらの臨床病理像をまとめた報告をしている。G34 変異例が示す多様な表現型と G34 変異オンコヒストンとの関連性について調べることを目的とし、本研究を立案した。G34R 変異グリオーマ 4 例、K27M 変異グリオーマ 7 例、野生型 *H3F3A* のグリオーマ 3 例と G34V 変異グリオーマ細胞株の KNS-42 を対象とし、医化学分野研究室で開発・改良された PBAT 法を用いて全ゲノムのバイサルファイトシーケンシング (WGBS) を実施し、データ解析を行った。結果、G34R 変異グリオーマは、他のグリオーマ群と比較してグローバルな低メチル化レベルを呈する一方、CpG アイランド (CGI) のメチル化は同等に正常サンプルよりも高メチル化を呈した。テロメア近傍の CGI では全サンプルでメチル化上昇がみられたが、G34 変異群ではこの現象が減弱していることが分かった。これらの結果は過去のメチル化アレイデータ解析で得られた知見を補填するものであった (A)。



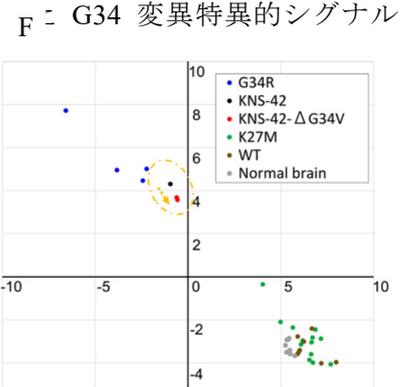
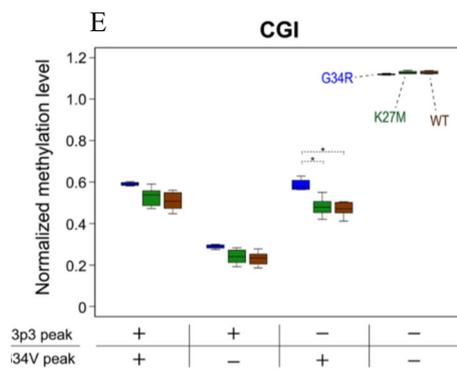
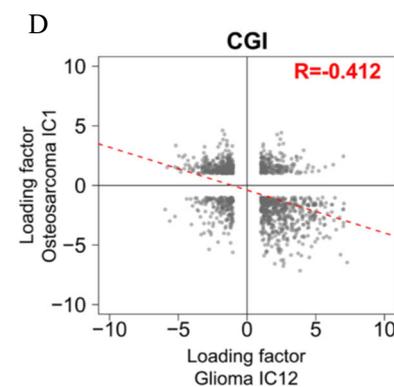
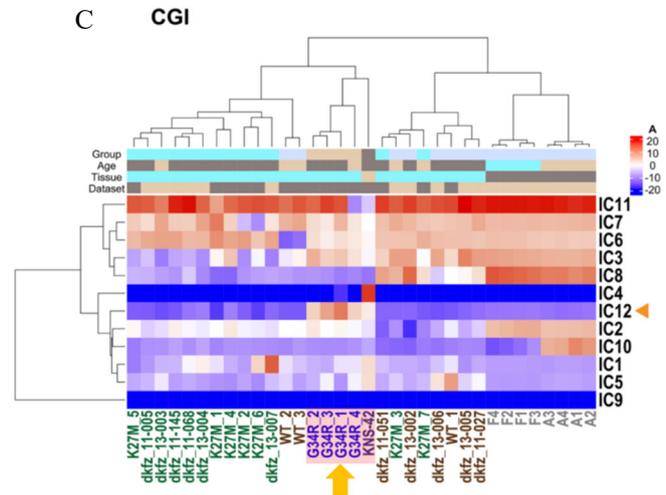
Metilene を用いて G34R 変異グリオーマ特異的なメチル化を示す領域を抽出すると、G34 変異特異的高メチル化領域が CGI に濃縮され、*OLIG1* や *OLIG2* そして *HIST1* クラスター中のカノニカルヒストン遺伝子を含んでいた (B)。そこで次に CGI 領域のメチル化データを用いて G34 変異特異的メチル化シグナルを抽出する試みとして独立成分分析 (ICA) を応用した解析を行った。ICA は観測データを複数の源信号の線形結合に分解する操作であり、各独立成分 (IC) に対する重みづけのパターンの類似性によってサンプル群をクラスタリングすることができ、サブグループ特異的な重み付けがされる IC をグループ特異的なメチル化シグナルとみなすことができる。得られた特異的シグナルは構

成要素（各領域のメチル化データ）の寄与度（LF）によって表現されるベクトルであり、絶対値の大きな LF をもつ要素は特異的メチル化シグナルへの貢献度が大きいマーカーとなり得る。ICA を用いて今回の WGBS データを解析すると G34 変異群は単一のクラスターを形成し、このサブグループ特異的なシグナルを捉えたパターンとして IC12 が同定された。この IC12 において絶対値の大きな LF をもつ領域の最近傍遺伝子として *metilene* と同様の遺伝子群が特定された（C）。



この G34 変異特異的なメチル化シグナルが G34 変異をもつ他腫瘍でも共通するかを調べるため、骨巨細胞腫でも WGBS を行ったところ同様の領域で高メチル化が観察された。同腫瘍では G34 変異なしのサンプルが入手困難であったため、骨肉腫のメチル化アレイデータ

を入手して検証を行った。独立成分分析を用いるとグリオーマと同様に G34 変異群に特異的なメチル化パターンを形成する独立成分が同定された。グリオーマと骨肉腫それぞれの G34 変異特異的メチル化パターンを示す独立成分に対する各領域の LF を比較すると、両群間で有意な類似性を示し、この特異的メチロームシグナルは腫瘍の起源組織に依らないことが示唆された（D）。KNS-42 細胞で抗 H3.3 抗体、抗 H3.3 G34V 抗体を用いて ChIP seq を行うと、H3.3 ピーク領域ではゲノム全体と比べて低メチル化率を示し、このうち G34V ピークと重複する領域ではやや高いメチル化率を示した。これらのピーク領域のメチル化率は臨床サンプルでも同様の傾向を示したが、G34 変異群では G34V ピーク領域のメチル化率上昇がより顕著であった（E）。CRISPR/Cas9 を用いて KNS-42 細胞の G34V アレルを破壊すると、G34V ピークと重複する CGI 領域のメチル化率の低下がみられ、ICA で同定さ



の減弱がみられた（F）。つまり、ヒストンバリエント H3.3 は低メチル化領域に分布する傾向があり、G34 変異体は高メチル化領域を起こしやすいヌクレオソームに組み込まれやすいか、あるいは安定して保持されやすく、それらの領域に G34 変異体が結合するとメチル化率の上昇がより顕著となること、また逆にそれら領域の G34 変異体の結合が消失するとメチル化レベルが減弱し、更に G34 変異特異的メチル化シグナル全体が減弱することが示唆された。以上の結果から、G34 変異グリオーマは骨腫瘍でも共通のサブグループ特異的なメチロームシグナルを有し、そして G34 変異ヒストンの結合がこのシグナル形成の一端を担う可能性が示された。