

氏 名 Sharlyn Mae Buendia Chua

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2458 号

学位授与の日付 2023 年 9 月 28 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Integrative genomics approach to primary ciliary gene
regulation in glioma

論文審査委員 主 査 前島 一博
遺伝学コース 教授
黒川 顕
遺伝学コース 教授
中村 保一
遺伝学コース 教授
川本 祥子
遺伝学コース 准教授
藤本 明洋
東京大学 大学院医学系研究科 教授

(Form 3)

Summary of Doctoral Thesis

Name in full Sharlyn Mae Buendia Chua

Title Integrative genomics approach to primary ciliary gene regulation in glioma

Diffuse gliomas are classified as low-grade gliomas (LGG), consisting of World Health Organization grade II-III astrocytomas and oligodendrogliomas, and high-grade grade IV astrocytomas, also called glioblastomas (GBM). GBM cell lines, tumor biopsies, and patient-derived glioma stem cells (GSCs) show abnormal primary cilium, completely lack it, or reduced number of ciliated cells. The primary cilium functions as a prime sensor for extracellular signals and coordinates various signaling pathways. A previous study observed that GSCs with suppressed ciliogenesis do not undergo cilium checkpoint; consequently, evading cell cycle exit, maintaining their stemness, and hindering differentiation, and proliferation. Conversely, recovery of the primary cilium leads to differentiation and prevents invasion. This demonstrates that ciliotherapy, a medical intervention that focuses on restoring ciliary function and changing its length, is a promising therapeutic option, particularly because patients with LGG have a seven-year average survival, while those with GBM have only 14.6 months median survival making it the most aggressive form of brain cancer. Nonetheless, there is limited knowledge regarding the molecular features of the primary cilium in gliomas, particularly regarding ciliary gene regulation.

This study aimed to uncover the regulation of ciliary genes in gliomas using publicly available databases to identify correlations between genomics, epigenomics, and transcriptomics. I conducted an integrative study of multiple sequencing methods from The Cancer Genome Atlas (TCGA) of LGG and GBM patient cohorts including: (1) assay for transposase-accessible chromatin with sequencing (ATAC-sequencing) to uncover the regulatory landscape of glioma

and identify transcription factors (TF) regulating ciliary genes, (2) RNA-sequencing to identify differentially expressed genes in diffuse gliomas compared to normal tissues, (3) clinical data of low-grade glioma and glioblastoma to assess the relationship between gene expression patterns and patient survival outcomes, (4) DNA methylation data to identify differentially methylated CpG sites of identified TFs, and (5) gene ontology analysis to uncover potential functional associations and biological processes association of identified TFs.

I determined that ciliary TF Regulatory Factor X (RFX) motifs are frequently present in active regulatory regions in diffuse gliomas, indicating a significant role of the RFX family in regulating active genes in glioma samples. Prior studies have identified the involvement of the RFX family in glioma, but it is only known to regulate *Cluster of Differentiation 44 (CD44)* and *Fibroblast Growth Factor 1 (FGF1)*, which are both important in malignancy. However, there is a notable gap in the knowledge regarding the role of the *RFX* family in glioma primary cilium. I observed that *RFX1*, *RFX2*, and *RFX3* showed differential expression in diffuse glioma patient tissues compared to normal brain samples, and that *RFX1* expression can serve as a prognostic biomarker for categorizing high- and low-risk groups in patients with LGG. I also revealed an association between higher *RFX1* and *RFX2* expression in IDH^{wt} patients and lower expression in IDH^{mut} patients, and further determined the hypermethylated CpG sites in *RFX1* and *RFX2* in IDH^{mut} patients, revealing a new regulatory mechanism of *RFX* expression in IDH^{mut} glioma patients. I also explored RFX1-3 downstream genes and discovered their prominent involvement in cilium assembly, formation, and ciliary components. To the best of our knowledge, this study is the first to demonstrate RFX1-3 regulation of ciliary genes in gliomas. I further identified ciliary genes possibly regulated by RFX1-3 TFs through their expression correlation and the presence of Xbox motifs in their regulatory regions. It must be noted that this study was limited to an *in silico* approach, and experimental confirmation is warranted to verify the regulation of *RFX1-3* in the identified ciliary genes.

In conclusion, my work revealed that RFX1, RFX2, and RFX3 TFs function as key

regulators of ciliary genes, whose roles are essential in the primary cilium of LGG and GBM. My study proposes that the abundance of X-box motifs indicates that irregular expression of *RFX1-3* may affect numerous regulated ciliary genes, making them promising targets for inducing cilium formation. This study may contribute to drive ciliotherapy approach in patients with diffuse glioma.

博士論文審査結果

^{Name in Full}
氏名 Sharlyn Mae Buendia Chua

^{Title}
論文題目 Integrative genomics approach to primary ciliary gene regulation in glioma

glioma は神経細胞を支えるグリア細胞から発生する脳と脊髄の腫瘍であり、そのなかでも glioblastoma は最も悪性度が高いとされている。現在、この腫瘍の決定的な治療法はなく、治療法の開発のためにも、glioma 腫瘍形成過程の更なる理解が望まれている。この腫瘍では、細胞周期の進行や分化に関与する細胞外シグナル伝達に重要である一次繊毛の異常や欠失を示すことが知られている。

Sharlyn Chua さんは低悪性度 glioma や glioblastoma でアクティブな遺伝子調節領域を同定するために、既存の ATAC-seq (assay for transposase-accessible chromatin with sequencing) のデータセットの解析をおこなった。ATAC-seq はゲノム領域のオープンクロマチンを検出する。そして低悪性度 glioma や glioblastoma のオープンクロマチン領域に存在する転写因子結合モチーフの中に転写因子 RFX1-3 の結合モチーフがあることを見出した。RFX は glioma で異常や欠失が認められる一次繊毛を調節する転写因子ファミリーとして知られている。Chua さんは次に RNA-seq データを分析したところ、正常な脳サンプルと比較して、低悪性度 glioma や glioblastoma では RFX1-2 の発現が増加し、RFX3 は減少していることが判明した。さらに低悪性度 glioma では RFX1 高発現の患者生存期間中央値は有意に短くなった。この結果は RFX1 の発現が予後バイオマーカーとなり、高リスク群と低リスク群の識別に使用できることを示している。

さらに、Chua さんは IDH (イソクエン酸デヒドロゲナーゼ) 遺伝子ファミリーの遺伝子変異にも注目し、IDH 野生型と変異型 glioma/glioblastoma における RFX1-3 の発現レベルの違いについても検討した。IDH 変異低悪性度 glioma/glioblastoma がゲノムの高メチル化表現型を示すことから、RFX1 のプロモーターおよびエンハンサー領域、RFX2 のプロモーター領域における高メチル化 CpG 部位を特定し、IDH 変異 glioma/glioblastoma における RFX 遺伝子発現制御機構に関する示唆が得られた。

最後に、Chua さんは Gene Ontology 解析から RFX1-3 の発現と相関する下流の繊毛遺伝子を提案し、低悪性度 glioma や glioblastoma の腫瘍形成進行に重要な一次繊毛を操作するためのターゲットとして RFX1-3 の重要性が示唆された。

一連の結果は、既存の ATAC-seq データを解析することにより低悪性度 glioma や

glioblastoma 進行に関与すると思われる転写因子 RFX を同定し、RFX を制御することにより細胞外シグナル伝達に重要な一次繊毛を操作する可能性を示すものであり、優れた新規成果と認められる。以上のことから Chua さんの学位提出論文は博士号授与の要件を満たすと審査員全員一致で判断した。