

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成30年度研究進捗評価用〕

平成27年度採択分
平成30年3月19日現在

組織幹細胞におけるゲノム安定性の制御

Mechanism of genome integrity maintenance in tissue stem cell

課題番号：15H05713

藤堂 剛 (TODO TAKESHI)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授



研究の概要

損傷応答機構は、多様な DNA 損傷に対抗する生体防御機構であり、ゲノム安定性維持に本質的な役割を果たしている。損傷応答機構が破綻したメダカ変異体を作製し、その体組織幹細胞及び体細胞での DNA 損傷誘発ゲノム変異スペクトラムを同定し、損傷応答機構のゲノム安定性維持メカニズム解明を行う。

研究分野：環境学・環境解析学・放射線・化学物質影響学

キーワード：ゲノム安定性、突然変異生成

1. 研究開始当初の背景

我々のゲノム DNA は、常に、外的・内的要因による DNA 損傷の脅威に曝されている。DNA 損傷は「ゲノム不安定性」を誘発し、やがて長い潜伏期間の後、発がん等重篤な疾患を引き起こす。損傷応答機構は、多様な DNA 損傷に対抗する重要な生体防御機構であり、「ゲノム安定性」維持に本質的な役割を果たしている。損傷応答研究は、生存率や特定の応答経路への作用を細胞レベルで解析するのがこれまでの常套手段であり、突然変異をそのエンドポイントとする研究は少なく、しかもほとんどの場合特定遺伝子におこる変異を検出する系が用いられ、ゲノムレベルでの変異を対象とする解析はほとんどされていなかった。次世代 DNA シークエンサー (NGS) の普及はゲノム解析を容易にし、大規模ゲノム解析によりがん細胞に起こっている多様な変異の同定から、「ゲノム不安定性」の実態が明らかにされてきた。損傷応答機構による「ゲノム安定性」維持、あるいはその破綻による「ゲノム不安定性」誘発メカニズムを突然変異をエンドポイントとして解析する研究が望まれていた。

2. 研究の目的

損傷応答機構は多様な経路により制御されている複雑な生体応答機構である。損傷が認識され反応をオンにする「損傷応答開始」ステップおよび損傷応答の総決算である「変異導入」ステップは、損傷応答の生体影響において最も重要な過程である。本申請では、両ステップの破綻による生体作用を「誘発変

異」をエンドポイントに解析し、発がん等の最終生体影響への損傷応答機構の寄与を明らかにする事を目的としている。発がん等の長い潜伏期間の後に顕われる生体影響には「組織幹細胞」が重要な役割を果たしている。そこで本申請研究では、「組織幹細胞」に誘発される「ゲノム不安定性」を直接検出する *in vitro*, *in vivo* 解析系構築を最終目標とする。

3. 研究の方法

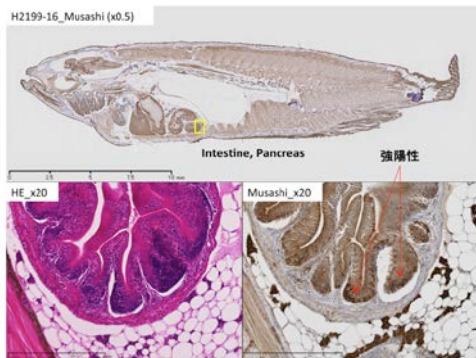
1) ゲノム解析系の確立：NGS による変異検出が本研究の基盤である。ゲノム解析手法の進展は、エキゾーム解析による点突然変異検出を可能にしたが、全ゲノムを対象にした解析には未だ多くの問題点が残されている。そこで本研究では、新たなアルゴリズム開発によるゲノム解析系の確立を目指した。
2) メダカ変異体の作製及び表現型解析：申請者グループはこれまでに「損傷応答開始」ステップの重要遺伝子群の変異体を作製してきた。本申請ではゲノム編集技術により、「変異導入」課程及び DNA 修復の重要遺伝子群変異体の作製を行った。
3) 体組織及び体組織幹細胞可視化システムの作製：体組織幹細胞単離の為に組織特異的・未分化細胞マーカー遺伝子を用いた蛍光蛋白質による遺伝子導入システムの作製を行った。

4. これまでの成果

1) ゲノム解析系の確立：ヒトのゲノム上の変異同定においては、次世代シーケンサーのアライメントソフトウェアとして BWA、アラ

イメント後の変異同定ソフトウェアとして GATK を利用することが一般的となっているが、本研究の対象とするメダカのゲノム配列がヒトのゲノム配列ほど精度が高いものではないことや、GATK が計算する精度が今回要求されている精度に達していない問題点があり、新たに変異解析のソフトウェア EAGLE を開発した。EAGLE では、GATK の様に予め決められた基準ではなく、対象のメダカとシーケンスクオリティに合った閾値を決め、精度高く変異を検出することが可能となった。

2) メダカ変異体の作製及び表現型解析：ゲノム編集技術 (TALEN 及び CRISPR) を用い Tran Lesion Synthesis (TLS) DNA ポリメラーゼ遺伝子群 (*Rev1*, *Rev3*, *Rev7*, *Polh*, *Poli*, *Polk*, *Poln*, *Polq*)、DNA 光回復酵素遺伝子群 (*CPDphr*, (*6-4*)*phr*, *CryDASH*)、*XPA* 遺伝子の変異体作製を行った。変異体の表現型観察を行うとともに、これ等変異体から培養細胞株を樹立し、放射線、紫外線、化学変異原に対する感受性の決定を行った。特に興味深いのは、*rev3* 変異体の表現型で、マウスの胚性致死と異なり



メダカ個体の全身切片及び腸の拡大図
HE染色(左)とMsi1抗体染色(右)

メダカ変異体は viable となるものの、寿命が短く、しかも全個体が特定の年齢で大腸がんを発症する事が判った。病理学的解析から、腸絨毛基底部の幹細胞領域から過増殖が始まり、幹細胞・増殖がんマーカーである Msi1 を高発現している事を見いだした (上図参照)。尚、上記 1) 手法の検証として、*rev3* 変異体細胞の紫外線誘発突然変異の NGS による検出を行い、野生株細胞に比べ *rev3* 変異体細胞では誘発点突然変異が低下している事を示す事ができた。

3) 体組織及び体組織幹細胞可視化システムの作製：未分化細胞マーカー *Bmi1*, *SOX2*, *CD9* の蛍光蛋白質遺伝子導入モニターシステムの作成を行った。また *Fabp10a* 肝臓特異的可視化システムを樹立した。

5. 今後の計画

1) NGS によるゲノム解析系樹立により、2-3 塩基欠損を含む点突然変異及び染色体レベ

ルでの構造異常等「遺伝的不安定性」の全貌を詳細に解明する事が可能になった。本手法を用い、損傷応答開始および最終変異導入ステップ変異体細胞の変異スペクトラム解析を行う。

2) 大腸がんおよび肝臓の化学発がん系に、これまでに樹立している損傷応答キー遺伝子あるいは他の TLS ポリメラーゼ遺伝子変異を交配により導入し、ダブル、トリプル変異体を作製し、発がん年齢依存性や発症率への影響を観察する。1) による細胞レベルでのゲノム解析を同時並行で行い、両者の相関を検討する。

3) 大腸がんおよび肝臓の化学発がん系に幹細胞可視化システムを導入し、回収標識細胞のゲノム変異検出を行う。

4) 哺乳動物間葉系幹細胞でのゲノム変異解析を行い、メダカとの相違点・共通点からモデル生物としてのメダカの利点を検討する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Tony Kuo, Martin Frith, Jun Sese and Paul Horton. EAGLE: Explicit Alternative Genome Likelihood Evaluator. *BMC Medical Genomics* (in press)

2. Ishikawa-Fujiwara T, Shiraishi E, Fujikawa Y, Mori T, Tsujimura T, Todo T. Targeted Inactivation of DNA Photolyase Genes in Medaka Fish (*Oryzias latipes*). *Photochem Photobiol.* (2017) 93(1):315-322.

3. 藤川 芳宏、藤原 智子、佐藤 鮎子、佐久間 哲史、山本 卓、辻村 亨、藤堂 剛・メダカにおける *rev3l* 変異体の紫外線誘発突然変異と消化管腫瘍の解析・日本環境変異原学会第 46 回大会・東京・2017. 11. 6 <BioMed Central Award:ベストプレゼンテーション賞受賞>

4. 藤川 芳宏、藤原(石川) 智子、佐久間 哲史、山本 卓、藤堂剛、*Rev3L* 変異体メダカの放射線および紫外線感受性の解析、日本放射線影響学会 第 59 回大会、広島 2016 年 10 月 26 日 (26-28 日) <優秀発表賞授賞>

5. 藤原(石川) 智子、モデル生物を使った紫外線感受性解析系の確立、第 37 回日本光医学・光生物学会、宮崎、2015 年 7 月 17 日 <奨励賞受賞>

6. 藤川芳宏、藤原(石川) 智子、佐久間 哲史、山本卓、藤堂剛、TALENs によるメダカ TLS polymerase 遺伝子破壊、第 1 回放射線ワークショップ、富山、2015 年 10 月 16 日 <優秀発表賞授賞>

ホームページ

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/radbio/www/index.html>