

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03615

研究課題名(和文)ゲノム初期化に伴う点突然変異と活性酸素

研究課題名(英文) Reprogramming associated point mutations and ROS

研究代表者

荒木 良子 (ARAKI, RYOKO)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・グループリーダー(定常)

研究者番号：40392211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：再生医療において大きな期待が寄せられているiPS細胞だがその一方でゲノムに多数の変異の存在が示され、解決すべき課題となっている。本研究の目的は、それら変異の発生メカニズムの解明、更には変異の少ないiPS細胞の樹立である。研究の結果、ゲノム初期化はその極初期過程が放射線耐性であることを見出した。更に、この過程ではCyclinD1タンパク質の過剰発現のため、DNA損傷チェックポイント機能不全が起きてしまうこと、そしてこの時期にまさに変異蓄積が起きていることを明らかにした。また、変異低減化に関してはヒト臍帯血由来赤芽球を用いることで、変異頻度が従来の1/5から1/10になること発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム初期化のメカニズムの理解、更にiPS細胞を用いた再生医療研究への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：Thus far, presence of a significant number of mutations has been reported in iPS cell genomes. In this study, we aimed to understand the mechanism which causes these numerous mutations and develop a method to generate iPS cells with few mutations. In this study, we demonstrated that the initial stage of genome reprogramming is radio resistance. Further analyses revealed a overexpression of CyclinD1 and a deficiency of cell cycle check point function occur in a transient manner during the initial stage of genome reprogramming. Importantly, it was showed that the point mutations in iPS cell genomes accumulate just in the initial stage. In addition, we here also discovered that iPS cells established from human cord blood-derived erythroblasts had a mutation frequency of 1/5 to 1/10 of the frequency observed in previous iPS cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：ゲノム初期化 変異 iPS細胞 全ゲノムシーケンシング

1. 研究開始当初の背景

我々を含む複数のグループは、iPS細胞のゲノム内に数百から1,000箇所(遺伝子のコード領域にも数-10箇所程度)に及ぶ点突然変異の存在を報告した。それより以前 copy number variation など、他の変異も同様に iPS細胞ゲノムに生じていることも明らかになっていった。エピゲノムの再編成であるゲノム初期化によって作出されただけの iPS細胞で、なぜこのようにゲノム上に変異が、それも多量に見つかるのか、受け入れ難い現象であり、用いた親体細胞集団の一部の細胞に既に存在していたものが検出できなかっただけであるという仮説(この仮説を否定するには存在しないことを証明する必要がある。)が提唱されるなど論争が続いていた。

2. 研究の目的

変異の少ない iPS細胞の樹立を目的とした。そのために、iPS細胞化に伴って生じる変異が存在するか否かを明らかにすること、そして、変異発生のメカニズムを理解することが必須であった。これらは、iPS細胞の臨床応用に貢献するとともに、ゲノム初期化などを含むエピゲノム再編成の分子機構の理解に寄与する。

3. 研究の方法

iPS細胞樹立には、これまで報告されている手法を用いた。マウス胎児線維芽細胞(MEF)-レトロウイルスベクター発現系、MEF-プラスミドベクターによる一過性発現系、ヒト皮膚線維芽細胞(HDF)-レトロウイルスベクター発現系、ヒトBJ細胞 センダイウイルスベクター発現系、ヒト臍帯血-episomal vector 発現系の5種類である。ヒト初代培養細胞は市販されているものを使用した。更に、ゲノム初期化という観点からの普遍性を示すために、核移植ES(ntES)細胞も樹立し、解析に用いた。全ゲノムシーケンシングは、イルミナ社 HiSeqXを用い、得られたシーケンスデータからの変異(SNV)抽出には CLC Genomics Workbenchを用いた。

4. 研究成果

1) iPS細胞化に伴い生じる point mutation の解析

用いた親細胞ゲノムの全ゲノム配列をリファレンスとしたゲノムインフォーマティクスを用いた直接比較により iPS細胞ゲノム内の変異が同定される。しかしながら、WGSデータを取得するために必要な細胞数、~100万細胞、から調製したゲノムをまとめてシーケンシングする現在の解析方法では、用いた体細胞集団の一部の細胞にのみ存在する変異は検出されず、一方で一細胞から出発して細胞株となる iPS細胞に検出される変異がゲノム初期化に伴って起きたものか、それともこのような本来親細胞集団の一部の細胞にのみ存在していた変異なのかを見分けることは現在のシーケンシング法では不可能である。そこで我々は、ゲノム初期化時に生じる point mutation と、初期化以前(体細胞が in vivo あるいは in vitro で分裂中)に既に存在した point mutation と見分けるために、variant allele frequency (VAF)に注目し、iPS細胞クローン内の変異不均一性の有無を検証した。その結果、多数の VAF25%の変異がクローン内に存在することを突き止めた。VAF50%の mutation (mutation/wild) は、全ての細胞の片方のアリルに存在することを意味するが、その発生時期については初期化以前かその後か区別できない。そのため、半数以下の細胞の片アリルにしか存在しない mutation、すなわち、親体細胞から幹細胞へ変化(転換)した時点ではクローン内に存在しない変異に着目した。

実際には、3株のマウス iPSと1株の ntES細胞株(iPS細胞とは異なるゲノム初期化法によって樹立された多能性幹細胞)について、全ゲノム解析にて得られた点突然変異候補のクローン内VAFを ultra deep sequencingにより決定した。その結果、25%以下の mutation が多数存在することが示された。更に、クローン内の不均一性をより正確に観察するためにクローンに含まれる一つ一つ細胞からサブラインを複数樹立し、これらをまたWGSすることで、サブラインに共通の mutation とそれぞれのサブラインに特有の変異を網羅的に同定することにより、サブライン間の兄弟関係と変異蓄積の履歴を明らかにすることに成功した。これらの結果から、変異蓄積はゲノム初期化の極初期のステージに集中して起きてい

ることが明らかになった。

2) DNA 損傷チェックポイントの解析

iPS 細胞樹立 (ゲノム初期化) 時の DNA 損傷応答を解析した。

X線による DNA 損傷に対する応答を、X線照射日別の iPS 細胞コロニー形成能、細胞周期、チェックポイントに関わる分子のウェスタンブロットング、により解析した。

その結果、初期化因子導入後 3 日目に X線照射した線維芽細胞では、iPS 樹立効率が下がらず、この時期に放射線感受性が低下していること (放射線耐性) が明らかになった。またこの時期は、G1 停止が起きにくいことも確認された。ウェスタンブロットング解析により、p53 タンパク質による抑制制御が及ばないほど、細胞周期を進行させる

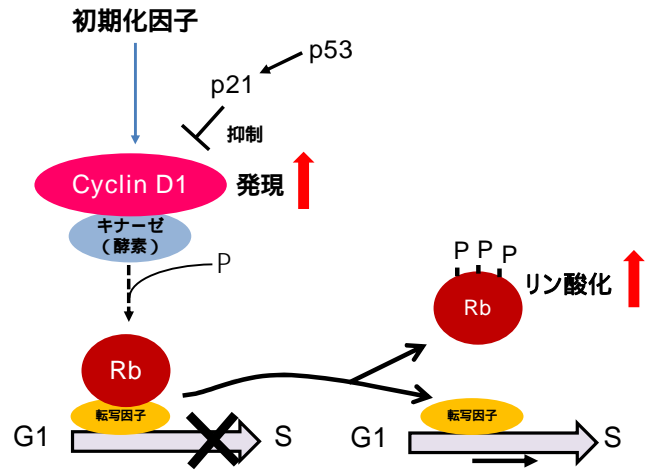


Fig. 1 ゲノム初期化の極初期の細胞周期
初期化因子にCyclin 1が発現亢進しRbがリン酸化することによりG1からS期への進行が起こる。DNA損傷によりp53から細胞周期停止のシグナルは流れるが、細胞周期を停止するに至らない。

CyclinD1 タンパク質が過剰に発現しており、この CyclinD1 が Rb をリン酸化して不活性化することにより、細胞周期の停止が不十分になることが明らかになり、このメカニズムが iPS 化初期に見られる放射線耐性、更にこの時期の変異の一過性の蓄積の原因であると考えられた (Fig.1)。

3) ゲノム初期化における DNA 酸化損傷の検出

point mutations の置換パターンが、トランスバージョン優位であることを見出した。そこでトランスバージョンを誘導することが知られているグアニンの酸化状態を知るために、iPS 細胞化の極初期段階の細胞に対し 8-oxo-dG の免疫染色を行ったところ有意な増加を認めた (Fig.2)。

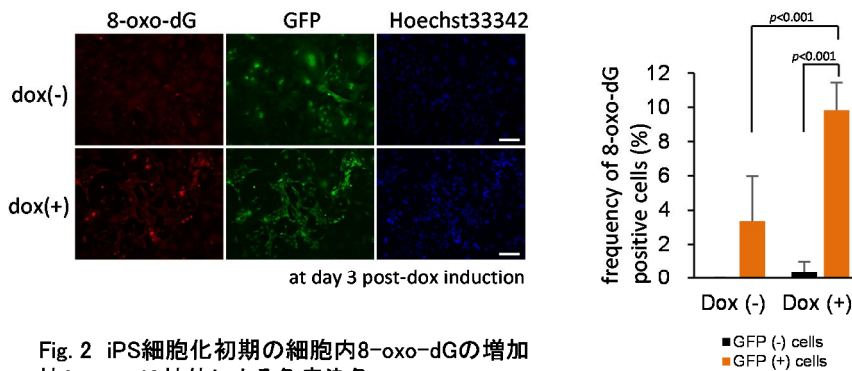


Fig. 2 iPS細胞化初期の細胞内8-oxo-dGの増加
抗8-oxo-dG抗体による免疫染色。

GFP(+) cell: Oct4, Sox2, Klf4, c-Mycの誘導システムが導入されたMEF。

GFP(-) cell: 上記導入されていないMEF。

Dox (+) : Oct4, Sox2, Klf4, c-Mycの発現を誘導。

GFP(+)MEFおよびGFP(-)MEFのmixed cultureにおいてDoxを添加すると、GFP(+のみ)に8-oxo-dGの増加が認められた。

4) point mutations 低減化

後の iPS 細胞の樹立を考慮し、低侵襲的に入手可能な細胞の中で ROS 産生能の低い細胞を探索し、その結果、ヒト臍帯血から増殖させた赤芽球を選択した。赤芽球を親体細胞に用いて、Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc、Lin28 を挿入したエピゾーマルベクターを導入後、iPS 細胞を樹立し、それらの未分化性・多能性を確認した。次に、樹立した iPS 細胞の全ゲノムシーケンシングを行ったところ、驚くべきことに点突然変異の数が従来 iPS 細胞に報告されていた数の 5 分の 1 から 10 分の 1 と減少していることが明らかになった (Fig. 3)。更に、同様の変異数の劇的な減少は、iPS 細胞樹立を試みたドナー 4 名から得

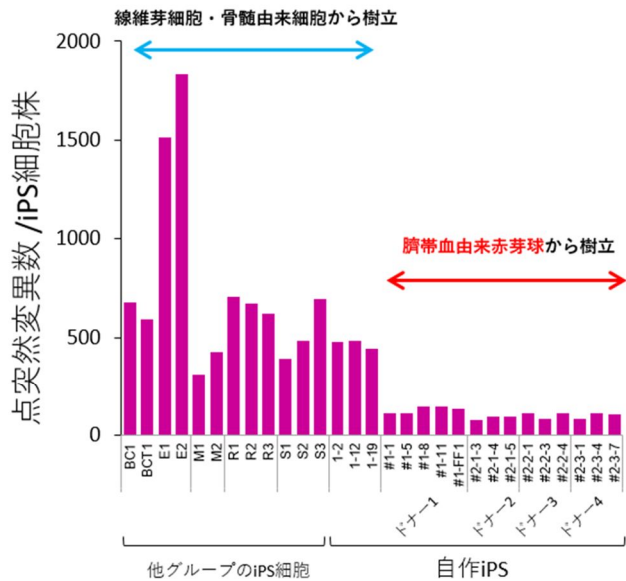


Fig.3 ヒトiPS細胞における点突然変異の数
報告された他のグループのiPS細胞に関しては、全ゲノムシーケンスデータを公共データベースから取得し、自作iPS細胞と同じインフォマティクス解析を行った。

られた計 14 株すべての iPS 細胞で確認された。また、遺伝子領域でアミノ酸の置換を起こす点突然変異が全く検出されない細胞株が全体の半数、7 株に及んだ。更に、INDEL においても点突然変異と同様の減少傾向が見られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshihara Masahito, Araki Ryoko, Kasama Yasuji, Sunayama Misato, Abe Masumi, Nishida Kohji, Kawaji Hideya, Hayashizaki Yoshihide, Murakawa Yasuhiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Hotspots of De Novo Point Mutations in Induced Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 308 ~ 315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2017.09.060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Araki Ryoko, Hoki Yuko, Suga Tomo, Obara Chizuka, Sunayama Misato, Imadome Kaori, Fujita Mayumi, Kamimura Satoshi, Nakamura Miki, Wakayama Sayaka, Nagy Andras, Wakayama Teruhiko, Abe Masumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Genetic aberrations in iPSCs are introduced by a transient G1/S cell cycle checkpoint deficiency	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-13830-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菅 智, 砂山 美里, 藤森 (法喜) ゆう子, 小原 千寿香, 今留 香織, 藤田 真由美, 中村 美樹, 安倍 真澄, 荒木 良子
2. 発表標題 iPS細胞におけるゲノム変異 -INDEL解析-
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会, 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荒木 良子
2. 発表標題 iPS細胞における点突然変異
3. 学会等名 Kofu Stem Cell Conference 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 砂山 美里, 藤森 ゆう子, 菅 智, 小原 千寿香, 今留 香織, 荒木 良子, 安倍 真澄
2. 発表標題 ゲノム初期化多能性幹細胞コロニーに観られる点突然変異不均一性のin-depth解析
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤森 ゆう子, 砂山 美里, 小原 千寿香, 今留 香織, 菅 智, 藤田 真由美, 安倍 真澄, 荒木 良子
2. 発表標題 iPS細胞ゲノム内点突然変異の頻度は変えられるか?
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上村 悟氏, 菅 智, 砂山 美里, 藤森(法喜)ゆう子, 小原 千寿香, 今留 香織, 藤田 真由美, 中村 美樹, 安倍 真澄, 荒木 良子
2. 発表標題 Reprogrammed cellゲノムにおけるINDEL変異解析
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 誘導多能性幹細胞を製造する方法、誘導多能性幹細胞樹立過程における点変異を抑制する方法、及び誘導多能性幹細胞	発明者 荒木良子、小原千寿香、藤森ゆう子、安倍真澄	権利者 量子科学技術研究開発機構
産業財産権の種類、番号 特許、Q20099JP	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究協力者	今留 香織 (IMADOME KAORI)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・技術員 (82502)	
研究協力者	中村 美樹 (NAKAMURA MIKI)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・技術員 (82502)	
連携研究者	法喜 ゆう子 (HOKI YUKO) (50415402)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・研究員 (82502)	
連携研究者	小原 千寿香 (OBARA CHIZUKA) (90415977)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・研究員 (82502)	
連携研究者	藤田 真由美 (FUJITA MAYUMI) (80580331)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・主任研究員 (82502)	
連携研究者	砂山 美里 (SUNAYAMA MISATO) (20625115)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・技術員 (82502)	
連携研究者	安倍 真澄 (ABE MASUMI) (00291104)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・部長 (82502)	
連携研究者	上村 悟氏 (KAMIMURA SATOSHI) (90769522)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・博士研究員 (82502)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	松本 謙一郎 (MATSUMOTO KENICHIRO) (10297046)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・グループリーダー (82502)	
連携研究者	中西 郁夫 (NAKANISHI IKUO) (70356137)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・上席研究員 (82502)	