

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15707

研究課題名(和文)核移植ゲノム初期化で起こるゲノム変異の原因解明

研究課題名(英文)Genome mutations in nuclear transfer

研究代表者

上村 悟氏(Kamimura, Satoshi)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学研究所・主任研究員

研究者番号：90769522

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、核移植初期化過程におけるゲノム変異の原因の一端の解明を目指し研究を行った。核移植ES細胞を対象に、マイクロサテライトと呼ばれる1から数塩基程度の反復配列領域を対象に、全ゲノム解析を実施したところ、ES細胞に比べて、約6倍変異が多いことが明らかとなった。p53は、細胞にDNA損傷が生じるとDNA修復経路を活性化させ、修復が不可能な場合には細胞増殖停止やアポトーシスを誘導するなどの役割を果たす。p53 KOマウスをドナーとした核移植、およびp53阻害剤であるPifithrin- を核移植胚で処理したところ、p53を阻害すると核移植効率が上昇することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、体細胞核移植クローンの低効率、異常な表現型は主にエピジェネティクスに注目して研究が行われてきた。しかし先行研究でゲノムDNA変異も伴うことを示唆してきものの、積極的な研究が展開されていない。本研究課題は、核移植初期化におけるゲノム変異の原因の一端が明らかになる可能性がある。本研究課題で明らかになった知見を基に、核移植効率の向上やゲノム変異の少ないクローニングが期待でき、高品質のntES細胞の樹立、さらに高品質なiPS細胞を高効率に樹立する方法にも応用できる可能性があり、再生医療、産業、実験動物分野の発展に寄与できるかもしれない。

研究成果の概要(英文): A whole-genome sequences were performed on mouse embryonic stem cells (ESCs) by somatic cell nuclear transfer (ntES cells) in microsatellite region. As a result, ntES cells had about 6 times more mutations than ES cells. p53 activates the DNA repair pathway when DNA damage occurs in cells, and plays a role in inducing cell proliferation arrest and apoptosis when repair is not possible. When p53 KO mice were used as donors for nuclear transfer and when the p53 inhibitor (Pifithrin-) was treated with nuclear transferred embryos, it was found that inhibition of p53 increased the efficiency of nuclear transfer.

研究分野：発生工学

キーワード：核移植 ゲノム初期化 全ゲノムシーケンス ゲノム変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核移植クローンは体細胞を提供した動物(ドナー)と同じ遺伝情報を持つ胚および個体を作出できる唯一の発生工学技術である。除核した卵子にドナー体細胞を注入した再構築胚を発生させることで作出する。マウス核移植の効率は胚盤胞発生率が約30%で、個体発生率が1-3%程度であり、初期化(リプログラミング)効率は低い。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDACi)である Trichostatin A の使用、X染色体不活化(XCI)異常を Xist 遺伝子のノックアウト(KO)あるいはノックダウン(KD)で是正する、遺伝子発現抑制性ヒストン修飾である H3K9me3 の除去などの方法で、マウス核移植クローン効率が改善することが報告されており、低初期化効率の主たる要因はエピジェネティクス調節の異常に起因すると考えられている(Matoba and Zhang, Cell Stem Cell, 2018)。

一方、マウス核移植クローン胚の90%以上が桑実期胚より前に異常染色体分離(ACS)を示し、8細胞期より前に発生したACSは着床後発生を著しく阻害することが報告された(Mizutani et al., Dev. Biol., 2012)。また全ゲノムシーケンスにより、マウス核移植由来ES細胞(ntES細胞)は受精卵由来ES細胞と比較してゲノム点突然変異(SNVs)および1-20塩基程度の挿入または欠損(InDels)が発生する(Araki et al., Stem Cells, 2017; Araki et al., Nat. Commun., 2020)。このように核移植初期化過程ではエピジェネティクス調節異常のみならず、ゲノム変異も伴い、これが低効率の原因の一つである可能性が高いが、その原因や詳細については明らかでない。

2. 研究の目的

(1)マウス核移植におけるマイクロサテライト領域における変異

マウス ntES 細胞において、SNVs や数十塩基の InDels などのゲノム変異が起こることは報告されてきたが、マイクロサテライトと呼ばれる単純繰り返し配列領域の異常については、配列情報解析の困難さから、正確には議論されてこなかった。そこで、マウス ntES 細胞を対象に、さらに同じドナーを使用した iPS 細胞、およびコントロールとして受精卵由来 ES 細胞について、マイクロサテライト領域の全ゲノム解析を実施した。

(2)核移植における p53 の影響について

p53 タンパク質(Trp53)は、細胞にDNA損傷が生じるとDNA修復経路を活性化させ、修復が不可能な場合には細胞増殖停止やアポトーシスを誘導するなどの役割を果たす。p53 経路を抑制するとマウス iPS 細胞樹立効率が上昇することが知られおり、p53 を抑制するとゲノム変異を伴いながら核移植胚発生率が向上する可能性がある。核移植における p53 の影響について、ノックアウト(KO)マウスをドナー細胞とした核移植および p53 阻害剤である Pifithrin- を用いた実験で、評価を行った。

3. 研究の方法

(1)マウス核移植におけるマイクロサテライト領域における変異

マイクロサテライト領域の全ゲノム解析は技術的な問題で、偽の変異候補が出やすい。そこで、マイクロサテライト領域の解析から偽陽性につながる曖昧さを排除するための解析に理想的な細胞セットとして、マウス1個体の体細胞から11株のiPS細胞および2株の核移植(nt)ES細胞を樹立し、解析を行った。ゲノム抽出およびライブラリ調整後、イルミナ社のHiSeq Xシーケンサーを用いてシーケンスを行った。CLC genomics workbench を用いて解析を実施した。

(2)核移植における p53 の影響について

p53 ノックアウト(KO)マウスをドナー細胞とした核移植

ドナー細胞として p53KO マウス(C57BL/6)をドナー細胞として利用した。遺伝子型として、+/+(野生型)、+/- (ヘテロ型)、-/- (ホモ型)を利用した。それぞれのマウスについて、尾部より末梢血を採取し、白血球(好中球・顆粒球)をドナー細胞として使用した(Kamimura et al., Biol.Reprod., 2013)。B6D2F1 雌マウスを過排卵処理し回収した卵子をサイトカラシン B 添加 Hepes-KSOM 培地中で、卵子核を除去した。ドナー細胞核はピエゾアシストマイクロピペットを用いて除核卵子に注入した。注入した卵子は塩化ストロンチウムおよび Latrunculin A 添加 KSOM 培地で15分培養した後、Latrunculin A 添加 KSOM 培地で約5時間培養した。活性化から24-120時間後の胚発生について観察を行い、評価を行った。

p53 阻害剤で処理した核移植

ドナー細胞は BDF1 由来卵丘細胞を利用した。上記と同様に核移植を実施し、核移植再構築胚は、p53 阻害剤である、Pifithrin- の濃度および処理時間の条件を振って、胚発生を観察した。胚発生は活性化から24-120時間後の胚発生について観察を行った。

4. 研究成果

(1) マウス核移植におけるマイクロサテライト領域における変異

解析の結果、マイクロサテライト領域のショートタンデムリピート (STR) と呼ばれる 2~6 塩基程度の繰り返し配列で、iPS 細胞、ntES 細胞は ES 細胞に比べて、約 6 倍変異が多いことが明らかとなった。マイクロサテライト領域の変異は、遺伝性の神経・筋疾患(トリプレットリピート病)や発がん等の疾患とも深い関係があることから、ゲノム初期化で起こるこれらの変異は、再生医療への応用に重要な知見であることが推察される。

(2) 核移植における p53 の影響について

p53 ノックアウト(KO)マウスをドナー細胞とした核移植

P53 KO マウスをドナーとして用いて核移植を行った結果、野生型(+/+)の胚盤胞期胚率は 12.5%(8/64)、ヘテロ型(+/-)で 20.3%(14/69)、ホモ型 29.8%(14/47)であった(図 1)。その結果、ホモ型で核移植効率が上昇することがわかった。それぞれの胚盤胞期胚の評価は、野生型に比べて、ホモ型で Hatched/Hatching した胚盤胞期胚が多かった。

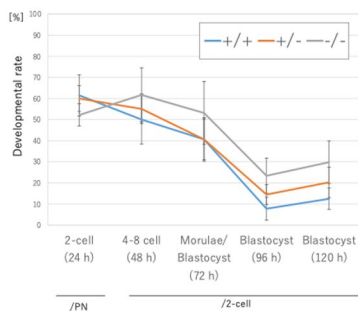


図 1. p53 KO マウスをドナーとした核移植効率

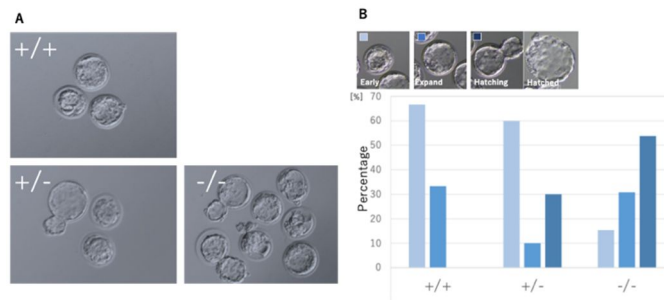


図 2. p53 KO マウスをドナーとした核移植胚盤胞期胚 (A)胚盤胞期胚像 (B) 胚盤胞期胚の評価

p53 阻害剤で処理した核移植

P53 阻害剤である Pifithrin- (10 μ M)の処理時間について、核移植胚を活性化後 8~120 時間で処理し、胚発生率について評価を行った。その結果、活性化後 24 時間の処理で胚盤胞率が最大となることが分かった(図 3A)。Hatching/Hatched 胚盤胞率は、無処理(0 μ M)に比べて、Pifithrin- で処理をすると上昇した(図 3B)。以上から 10 時間の Pifithrin- が核移植効率を上昇させることが分かった。

処理時間に続いて、処理濃度について検討を行った。処理時間を 24 時間にて、Pifithrin- の濃度を振って実験を行った(0-100 μ M)。その結果、1 μ M で 24 時間処理したときに 51.5%(34/66)の胚盤胞期率になることが分かった(図 4A)。Hatching/Hatched 胚盤胞率は、無処理(0 μ M)に比べて、濃度に関わらず 24 時間、Pifithrin- で処理をすると上昇した(図 4B)。以上より、1 μ M、活性化後 24 時間で核移植胚を処理すると核移植効率が最大となることが明らかとなった。

p53 KO マウスをドナーとした核移植および p53 阻害剤で処理した核移植の実験から、p53 が核移植効率を阻害している可能性が示唆された。p53 はゲノム安定性に寄与することから、p53 KO 由来の核移植および Pifithrin- 処理した核移植胚のゲノム変異について解析することによって、核移植におけるゲノム初期化におけるゲノム変異の全容を探っていきたい。

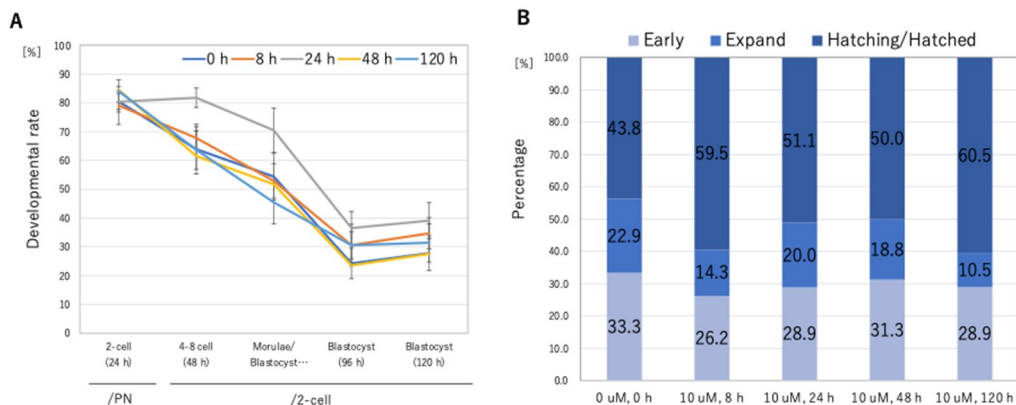


図 3. Pifithrin- α (10 μ M)で 0-120 時間処理したときの核移植効率 (A)核移植効率 (B) 胚盤胞期胚の評価

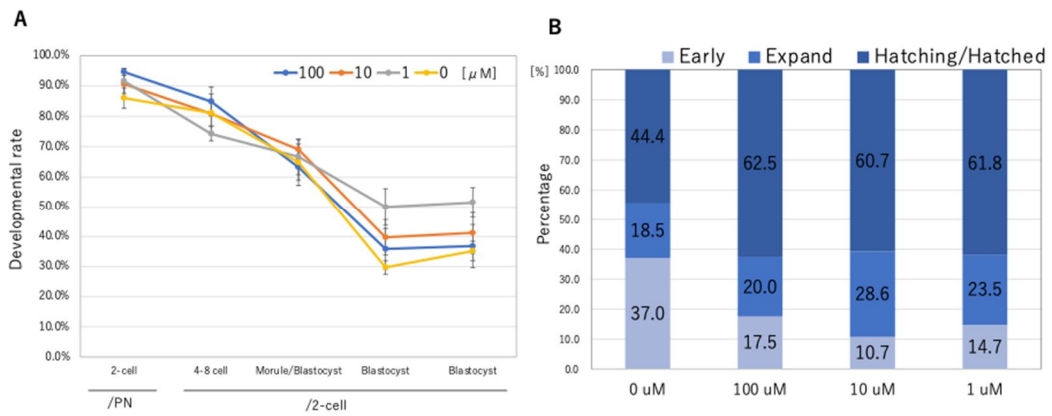


図 3. Pifithrin- α 24 時間処理し、濃度を振ったときの核移植効率 (A)核移植効率 (B) 胚盤胞期胚の評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kamimura Satoshi, Suga Tomo, Hoki Yuko, Sunayama Misato, Imadome Kaori, Fujita Mayumi, Nakamura Miki, Araki Ryoko, Abe Masumi	4. 巻 16
2. 論文標題 Insertion/deletion and microsatellite alteration profiles in induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2503 ~ 2519
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2021.08.017	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上村悟氏, 菅智, 砂山美里, 藤森ゆう子, 今留香織, 藤田真由美, 中村美樹, 荒木良子, 安倍真澄
2. 発表標題 ゲノム初期化細胞におけるマイクロサテライト不安定性
3. 学会等名 日本分子生物学会第43回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 KAMIMURA Satoshi, SUGA Tomo, HOKI Yuko, SUNAYAMA Misato, IMADOME Kaori, FUJITA Mayumi, NAKAMURA Miki, ARAKI Ryoko, ABE Masumi
2. 発表標題 Microsatellite alterations in genome reprogramming
3. 学会等名 日本分子生物学会年会第44回年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------