

令和元年6月18日現在

機関番号：27101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K14430

研究課題名(和文) 高感度変異検出法の開発を目指した多能性幹細胞ゲノム維持機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of genome maintenance mechanism in pluripotent stem cells: toward highly sensitive mutation detection methods

研究代表者

日高 京子 (HIDAKA, KYOKO)

北九州市立大学・基盤教育センター・教授

研究者番号：00216681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：多能性幹細胞(ヒトiPS細胞など)のゲノムは、突然変異率が低く非常に安定している。ゲノムがどのように安定に維持されているかを知ることが重要であり、一方で、突然変異を容易に検出することのできるシステムの開発は有用であると考えられる。本研究では、ミスマッチ修復(MMR)タンパク質に焦点を当て、(1)ヒト培養細胞におけるDNA修復および細胞死誘導の関連を明らかにしたとともに、(2)ゲノム編集技術によりMMRを欠損したヒトiPS細胞を樹立し、これがミューテーターとなっていることを確認した。我々の新しい知見は、多能性幹細胞のゲノム維持機構の解明と高感度変異検出法の確立につながると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞などの多能性幹細胞は再生医療の細胞ソースとして期待されているが、わずかでも変異が生じるとがん化につながるため、その遺伝情報(ゲノム)をできるだけ安定に保つことが重要である。一方、ゲノムが安定であればあるほどその変異を検出することが難しくなる。本研究では、DNA修復タンパク質の遺伝子をゲノム編集により操作することにより、通常よりも変異が起こる率が高くなるような株(ミューテーター株)を作成することができた。このような株を利用することで、iPS細胞のより安全な培養法の開発につながると期待できる。

研究成果の概要(英文)：The genome of pluripotent stem cells (such as human iPS cells) has a low mutation rate and is very stable. It is important to know how the genome is stably maintained, on the other hand, the development of a system that can easily detect mutations is useful. This study focuses on mismatch repair (MMR) proteins. First, we clarified the relationship between DNA repair and cell death induction by MMR proteins in human cultured cells. Next, we established human iPS cells with MMR deficiency by genome editing technology and confirmed that this became a mutator with elevated spontaneous mutation rates. Our new findings may lead to the elucidation of the genome maintenance mechanism of pluripotent stem cells and the establishment of a highly sensitive mutation detection method.

研究分野：分子生物学

キーワード：iPS細胞 DNA修復 ミスマッチ修復 ミューテーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多能性幹細胞は DNA 修復、アポトーシス誘導、分化誘導といった複数のメカニズムにより細胞集団としてのゲノムを高度に維持していると考えられる (図 1)。多能性幹細胞は高い増殖能・分化能のほかに細胞周期や代謝という点において体細胞とは異なる固有の性質を有するが、そのゲノム維持機構の全容の解明は十分に進んでいるとは言いがたい。多能性幹細胞の長期培養はしばしば染色体異常やコピー数の変化を伴い、塩基置換は移植後のがん化にもつながるため (Weissbein 2014, PMID:24446481) 多能性幹細胞のゲノム維持機構を解明していくのは重要な課題であるといえる。一方で、近年、次世代シーケンシングが急速に発達し、頻度の低い変異であってもこれを検出することが可能となってきたが、もともと高度に維持されている多能性幹細胞に生じる変異を検出するには、コストも時間もかかり、高感度に変異を検出する方法の開発は多能性幹細胞を利用する上で有用な基盤技術となるであろうと考えられる。

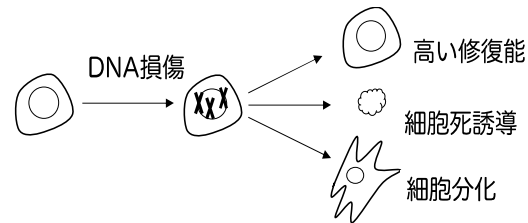


図1 多能性幹細胞のゲノム安定性維持機構には複数のメカニズムが働く

ミスマッチ修復 ( mismatch repair, MMR ) は DNA 複製の際に生じたエラーであるミスマッチ ( 塩基誤対合 ) を修復する DNA 修復機構のひとつである。興味深いことに、MMR 関連タンパク質は DNA 修復のみならず、細胞のアポトーシス誘導においても重要な役割を果たしており、これらの遺伝子を欠損すると、ミスマッチが修復できず、アルキル化剤などの薬剤に耐性となり、結果として突然変異率の高い「ミュテーター」の状態となる。そこで、MMR 関連遺伝子を詳細に解析することは、多能性幹細胞のゲノム維持機構の解明の一助となり、ミュテーター株の作出は、高感度な変異検出法の開発につながると考えられた。

一般に、分子経路や遺伝子の機能解析には、その遺伝子を何らかの方法によって喪失 (あるいは獲得) させるという手段が一般に取られている。本研究申請時において、培養細胞では RNA 干渉を利用したノックダウンによる解析が主流であった。実際に、研究協力者はこの手法を用いてミスマッチ修復のアポトーシス誘導にかかる因子を解析し、成果を出している (Komori 2009, PMID:19137017)。しかし、近年のゲノム編集技術の進歩により、受精卵を含むさまざまな生物種でのゲノム編集が可能となった。ゲノム編集が比較的難しいとされてきたヒト多能性幹細胞においても、CRISPR/Cas9 による部位特異的 DNA 切断とそれに続く非相同末端結合による遺伝子ノックアウトのみならず、短いオリゴ DNA を鋳型として用いた相同組換え修復によるノックインなどの報告が相次ぎ (Paquet 2016, PMID:27120160)、ゲノム編集技術は驚くほど急速に普及し、一般的なものとなってきた。

### 2. 研究の目的

本研究は、多能性幹細胞のゲノム安定性維持機構として MMR 関連因子の DNA 修復と細胞死誘導における関与に着目し、鍵となる経路・因子を同定し利用し、高感度変異検出系の開発につなげることを目的としている。そのため、以下の 2 点に目的を絞って検討を行った。

- (1) ヒト培養細胞における細胞死誘導と DNA 修復との関連解析。マウスでは、MMR 関連因子による DNA 修復と細胞死誘導が分離可能な現象として報告されていたので (Lin 2004, PMID:14744764)、これがヒトにも当てはまる現象であるか、ヒト培養細胞である HeLa 細胞を用いて検証する。
- (2) ヒト iPS 細胞における MMR 関連遺伝子ノックアウトとその解析。ヒト iPS 細胞にゲノム編集を用いて MMR 関連遺伝子の変異株の作製とその解析を行い、多能性幹細胞のゲノム維持機構における MMR タンパク質の役割を調べると同時に、高感度変異検出のためのミュテーターと利用できるかどうかを検討する。

### 3. 研究の方法

(1) HeLa 細胞における MSH2 変異タンパク質の発現系による解析。マウスでは MMR タンパク質の一つである MSH2 (MutS homolog 2) の 674 番目 glycine (G674) に生ずる点変異により、修復は損なわれるが、アポトーシス誘導は損なわれないという報告がなされている。そこで、MSH2 欠損 HeLa 細胞に、上記の点変異をもった MSH2 遺伝子をエピゾーマルベクターにて導入し、パートナーである MSH6 との相互作用のほか、*in vitro* ミスマッチ結合能解析、アポトーシス誘導能解析、突然変異頻度測定など、多方面からの詳細な解析を行った。

(2) HeLa 細胞における CRISPR/Cas9 を用いた MSH2 点変異のノックイン。本研究開始時において、培養細胞のゲノム編集の効率は必ずしもまだ高いものではなく、薬剤耐性遺伝子を変異とともに導入し、後にその薬剤耐性遺伝子を Cre-Lox システムにより除去するという方法が一般的であったが、本研究では、合成オリゴ DNA を相同組換え修復の鋳型として用い、薬剤耐性遺伝子の組み込みなしで、変異クローンを得ることを試みた。この際に、アレル特異

的 PCR によるスクリーニングを行い、効率良く変異クローンを検出する系を構築した。

(3) ヒト iPS 細胞における CRISPR/Cas9 を用いた MSH2 遺伝子ノックアウト。ヒト iPS 細胞においてゲノム編集されたクローンを得るには、フィーダーなしでの培養系の構築が不可欠である。いくつかの培地や培養法を検討し、安定して継代を行える系を見つけたのち、(2) により有効であることが確認できた CRISPR/Cas9 ベクターを用い、MSH2 遺伝子ノックアウトを試みた。

(4) ヒト iPS 細胞における MSH2 変異株の自然突然変異頻度測定。自然突然変異頻度はヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) 遺伝子座を利用し、6-チオグアニン耐性になった細胞の頻度により測定した (Kruta 2014, PMID:24836366)。

#### 4. 研究成果

(1) ヒト細胞においては MMR タンパク質による細胞死誘導と DNA 修復は分離不可能であった。

変異タンパク質発現による解析。マウスにおいて Msh2 遺伝子 G674A (または G674R, G674D) 変異はミスマッチ修復能は失うがアポトーシスは誘導できるという報告されていたが、MSH2 欠損 HeLa 細胞にこれらのタンパク質を発現させる系を構築し解析したところ、変異 MSH2 発現株はアルキル化剤処理によるアポトーシス誘導が欠損株同様損なわれていることがわかった。

変異ノックインによる解析。HeLa 細胞にて CRISPR/Cas9 により MSH2 変異のノックインを行ったところ、1 割程度の効率で成功し、薬剤耐性遺伝子を一旦導入することなしにゲノム編集を行うことができた。ノックイン変異株を調べたところ、の発現系で得られた結果と同様、ミスマッチ修復による変異抑制能とともに、アポトーシス誘導能が損なわれていることが明らかとなった (図 2)。

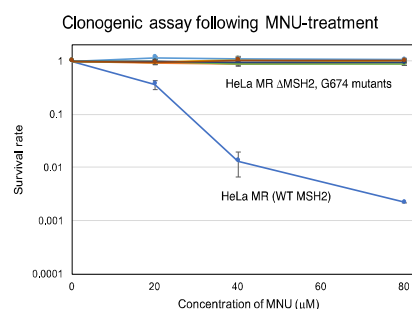


図2 HeLa MSH2<sup>G674</sup> ノックイン株はアルキル化剤による細胞死が抑制

(2) ヒト iPS 細胞における MMR タンパク質欠損株は自然突然変異頻度が上昇したミューテーターとなっていた。

ヒト iPS 細胞のゲノム編集による MMR タンパク質ノックアウト。ヒト iPS 細胞について CRISPR/Cas9 によるノックアウトにより MSH2 タンパク質欠損細胞株を得た。変異株は MSH2 タンパク質を狙いどおり欠損していること、アルキル化剤などの薬剤に対する耐性が確認できた。

ヒト iPS 細胞における MMR タンパク質欠損株の突然変異頻度解析。MSH2 変異株の自然突然変異頻度を HPRT 遺伝子座で調べたところ、自然突然頻度が上昇していることが確認できた (図 3)。

	No of screened colonies	Frequency of 6-TG resistance
Exp 1		
Wild	$3.5 \times 10^6$	N.D. ( $>2.8 \times 10^7$ )
Mutant	$2.1 \times 10^6$	$4.7 \times 10^6$
Exp 2		
Wild	$4.5 \times 10^6$	N.D. ( $>2.2 \times 10^7$ )
Mutant	$3.0 \times 10^6$	$3.3 \times 10^6$

図3 ヒトiPS細胞MSH2変異株は自然突然変異が上昇したミューテーターである

(4) 考察および今後の展望。

ヒト細胞においてミスマッチ修復とアポトーシス誘導の分岐点と期待される変異について解析し、新たな知見を得ることができた。予想に反してヒト細胞ではマウスで観察された結果と若干異なり、ミスマッチ修復とアポトーシス誘導が切り離せないものであることが示唆された。これは修復できない傷をいつまでも修復し続けようとする「futile repair model」を示唆するものであり、これを支持する報告もなされている (Gupta 2018, PMID:29378956)。マウスではなく、がん細胞でもなく、正常核型を持つヒト多能性幹細胞で DNA 修復経路・アポトーシス誘導経路を含めたゲノム維持機構を解明していく価値は十分にあると思われる。

ヒト iPS 細胞における変異株樹立やその解析は培養コストや手間がかかることなど一定の困難はあるが、少しずつ前に進めることができた。今回の、自然突然変異率が上昇したミューテーターとなる株を作出することができた。今後の細胞解析を通して、多能性幹細胞のゲノム維持における MMR 関連因子の役割の解明および、高感度な変異検出法の確立につなげたい。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

1. Hayashida G, Shioi S, Hidaka K, Fujikane R, Hidaka M, Tsurimoto T, Tsuzuki T, Oda S, Nakatsu Y. Differential genomic destabilisation in human cells with pathogenic MSH2 mutations introduced by genome editing. *Exp Cell Res*. 査読有 377:24-35 (2019)

〔学会発表〕(計 16 件)

1. 林田元気, 日高京子, 藤兼亮輔, 日高真純, 續輝久, 釣本敏樹, 中津可道 「アルキル化 DNA 損傷により誘導されるミスマッチ修復因子依存的な PCNA の修飾」, 第 41 回日本分子生物学会年会(横浜市・パシフィコ横浜), 2018 年 11 月 30 日
2. 日高京子, 林田元気, 日高真純, 大野みずき, 續輝久, 中津可道 「高感度変異検出をめざした多能性幹細胞におけるミュテーター株の作製」, 第 41 回日本分子生物学会年会(横浜市・パシフィコ横浜), 2018 年 11 月 28 日
3. 織田信弥, 林田元気, 日高京子, 藤兼亮輔, 日高真純, 續輝久, 中津可道 「ゲノム編集を用いて有害な MSH2 変異を導入したヒト細胞におけるリピート配列の特異的な不安定化」, 第 41 回日本分子生物学会年会(横浜市・パシフィコ横浜), 2018 年 11 月 28 日
4. 織田信弥, 林田元気, 日高京子, 藤兼亮輔, 日高真純, 續輝久, 中津可道 「CRISPR/Cas9 システムを用いてリンチ症候群 MSH2 変異を導入したヒト細胞におけるゲノム不安定性の特異的な態様」, 第 77 回日本癌学会学術総会(大阪市・大阪国際会議場), 2018 年 9 月 28 日
5. 林田元気, 中津可道, 日高京子, 藤兼亮輔, 日高真純, 織田信弥, 釣本敏樹, 續輝久 「リンチ症候群患者に見出された変異型 MSH2 を持つヒト細胞株の樹立とその解析」, 第 40 回日本分子生物学会年会(横浜市・パシフィコ横浜), 2017 年 12 月 7 日
6. 林田元気, 中津可道, 日高京子, 藤兼亮輔, 日高真純, 織田信弥, 續輝久 「リンチ症候群患者に見出される MSH2 ATPase ドメイン変異体は、ヒト細胞において顕著な不安定性を示す」, 第 76 回日本癌学会学術総会(横浜市・パシフィコ横浜), 2017 年 9 月 28 日
7. 宋穎霞, 日高京子, 中津可道, 織田信弥, 林田元気, 藤兼亮輔, 日高真純, 續輝久 「CRISPR/Cas9 を用いた DNA ポリメラーゼ  $\delta R506H$  突然変異の MSH2 欠損 HeLa 細胞への導入」, 第 39 回日本分子生物学会年会(横浜市・パシフィコ横浜), 2016 年 12 月 2 日
8. 林田元気, 中津可道, 日高京子, 藤兼亮輔, 日高真純, 釣本敏樹, 續輝久 「ヒト細胞由来ミスマッチ修復遺伝子変異体の作製とその解析」, 第 39 回日本分子生物学会年会(横浜市・パシフィコ横浜), 2016 年 12 月 2 日
9. Genki Hayashida, Yoshimichi Nakatsu, Kyoko Hidaka, Ryosuke Fujikane, Masumi Hidaka, Toshiki Tsurimoto, Teruhisa Tsuzuki 「Development of assay systems to characterize the variants of mismatch repair factor MSH2 found in Lynch syndrome」, The 10th International 3R( DNA Replication, Recombination, and Repair )Symposium(松江市・ホテル一畑), 2016 年 11 月 14 日
10. 林田元気, 中津可道, 日高京子, 藤兼亮輔, 日高真純, 續輝久 「ヒト細胞を用いたミスマッチ修復因子 MSH2 の変異体の解析」, 第 75 回日本癌学会学術総会(横浜市・パシフィコ横浜), 2016 年 10 月 8 日
11. 林田元気, 中津可道, 日高京子, 藤兼亮輔, 日高真純, 釣本敏樹, 續輝久 「CRISPR/Cas9 を用いたヒト細胞のミスマッチ修復因子への変異導入」, 第 88 回日本遺伝学会(三島市・日本大学), 2016 年 9 月 9 日
12. 林田元気, 中津可道, 日高京子, 藤兼亮輔, 日高真純, 釣本敏樹, 續輝久 「ミスマッチ修復因子 MSH2 の発現系の確立と変異体の解析」, 第 38 回日本分子生物学会年会(神戸市・神戸ポートアイランド), 2015 年 12 月 3 日
13. 鷹野典子, 大野みずき, 佐々木史子, 中別府雄作, 日高京子, 中津可道, 續輝久 「MUTYH 欠損マウスを用いた酸化ストレス誘発消化管がんと体細胞突然変異の解析」, 日本環境変異原学会第 44 回大会(福岡市・九州大学馬出キャンパス), 2015 年 11 月 28 日
14. 李贊, 大野みずき, 鷹野典子, 佐々木史子, 日高京子, 中津可道, 續輝久 「Trp53 欠損マウスにおける酸化ストレス誘発消化管がんの解析」, 日本環境変異原学会第 44 回大会(福岡市・九州大学馬出キャンパス), 2015 年 11 月 28 日
15. 大野みずき, 鷹野典子, 佐々木史子, 日高京子, 中津可道, 續輝久 「ミスマッチ修復欠損マウスにおける生殖細胞ゲノム変異の解析」, 日本環境変異原学会第 44 回大会(福岡市・九州大学馬出キャンパス), 2015 年 11 月 27 日
16. 日高京子, 中津可道, 日高真純, 續輝久 「心臓発生に影響する遺伝毒性物質スクリーニングをめざした多能性幹細胞分化系の開発」, 日本環境変異原学会第 44 回大会(福岡市・九州大学馬出キャンパス), 2015 年 11 月 27 日

6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

研究協力者氏名：中津 可道  
ローマ字氏名：(NAKATSU, yoshimichi)

研究協力者氏名：日高 真純  
ローマ字氏名：(HIDAKA, masumi)

研究協力者氏名：林田 元気  
ローマ字氏名：(HAYASHIDA, genki)

研究協力者氏名：大野 みずき  
ローマ字氏名：(OHNO, mizuki)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。