

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14609

研究課題名(和文) 切断-融合-架橋サイクルによるゲノム構造変異を人工的に導入するマウス実験系の開発

研究課題名(英文) Experimental induction of structural variations in the mouse genome by breakage-fusion bridge cycle

研究代表者

國府 力 (KOKUBU, CHIKARA)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：70379238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、ゲノムシーケンシング技術の進歩により、さまざまながん組織において、染色体の切断-融合-架橋(Breakage-Fusion Bridge, BFB)サイクルに起因すると推定されるきわめて複雑なゲノム構造変異が検出されるようになり、がんの進行過程における意義が注目されている。そこで本研究では、培養マウスES細胞を用いて、人為的にBFB変異を導入できるベクター実験系の開発を行った。また、このベクターを用いて、BFB変異の導入後も細胞が生存し得るようなゲノム領域をゲノムワイドにスクリーニングする実験を行ったところ、ゲノム構造上、興味深い特徴が見出された。

研究成果の概要(英文)：Recent advances in genome sequencing technologies revealed that complicated structural variations, which are assumed to be driven by chromosomal breakage-fusion bridge (BFB) cycle, occur in a variety of cancer genomes, although their carcinogenic implication has not been fully elucidated. In this study, we developed an experimental vector system to introduce BFB mutations in cultured mouse embryonic stem cells. By using this vector system, we also performed a genome-wide screening for regions that can undergo BFB mutations without losing their host cell viability. Interestingly, such regions showed characteristic features of genomic organization.

研究分野：遺伝学

キーワード：がんゲノム ゲノム工学 マウスES細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、大規模ゲノム解析の技法がめざましい進歩を遂げた結果、ヒトのさまざまながん組織のゲノム配列がつぎつぎと網羅的に解析されるようになり、従来の逐一的な解析手法では知り得なかった特徴的なゲノム変異が見つかるようになった。なかでも、英国 Sanger 研究所の Stephens らは、慢性リンパ性白血病患者の腫瘍細胞の全ゲノムシーケンス解析を行った結果、1本、あるいは、せいぜい2~3本程度の少数の染色体の限局された領域において、数十から数千箇所の崩壊と再構成が集中して起こったと考えられるきわめて複雑なゲノム構造変異が発生している現象を発見し、2011年に発表した (Stephens P. J. et al, *Cell* 2011)。

クロモソリプシス (Chromothripsis、染色体破砕) と名付けられたこの現象は、その後、さまざまながん組織・細胞のゲノムで相次いで検出され、がんゲノム分野におけるホット・トピックのひとつとなっている。しかしながら、このような複雑なゲノム構造変異が、なぜ、どのようにして起こるのか。いまのところ、その発生機序についてはさまざまな研究・学説が林立しているのが現状であり、病理学的意義や疾患予後との関連を含め不明な点が多い。

最近、クロモソリプシスの全部とは言えないものの、少なくともある種のクロモソリプシス型構造変異の発生機序を説明する有力なモデルとして、古典的な細胞遺伝学の概念である「切断-融合-架橋 (Breakage-Fusion Bridge, BFB) サイクル」が提唱されるようになったことは注目に値すると思われる (たとえば、Li Y. et al, *Nature* 2014 など)。BFB サイクルの概念は、細胞遺伝学の草創期にトウモロコシ染色体を用いてトランスポゾンを発見するなど、数々の先駆的な観察研究を行った Barbra McClintock 博士によって、1941年に初めて提唱された (McClintock B. *Genetics* 1941)。すなわち、分裂増殖期にある細胞の核染色体に何らかの原因で切断 (breakage) が発生し、それがそのまま分裂前期 (prophase) に入ると姉妹染色分体を複製したとき、2本の姉妹染色分体の断端同士が融合 (fusion) して異常な二動原体染色体 (Dicentric chromosome) を形成する場合がある。分裂後期 (anaphase) に入ると、この二動原体染色体は両極からの引っ張りによって架橋 (bridge) を形成し、やがて架橋のいずれかの部分で分断が起こり、2つの娘細胞にそれぞれ分配される。娘細胞に継承された染色体は引き続き断裂末端を有するため、次の細胞周期に入ると、姉妹染色分体の複製を経て再び断端融合を起こし、新たな二動原体染色体を形成する。このようにして、上記の切断-融合-架橋のサイクルを繰り返す結果、一定の長さを持つゲノム断片が反転を繰り返しながらタンデムに重複する複雑な構造変異が出来上がる。

以上の BFB サイクルのメカニズムは、クロモソリプシスの変異様式、すなわち、変異の構造自体は複雑であるけれども、それがなぜか1本ないし少数の染色体部位に限局して現れる、という特徴をうまく説明している。したがって、クロモソリプシスと呼ばれるゲノム構造変異の範疇の中に、少なくとも BFB サイクルに起因するものが含まれていることは間違いないものと思われる (Notta F. et al, *Nature* 2016)。

このように、McClintock 博士が提唱した BFB サイクル・モデルは、80年の時を越えて大規模シーケンス時代を迎えた今日、再び脚光を浴びることとなった。ところが、がんゲノム研究における BFB モデルの多くは、これまでのところ、ヒト臨床検体のゲノム解析から事後的に推定したものに過ぎない。言い換えると、BFB サイクルによるゲノム構造変異の発生過程を前方視的に解析した研究の報告はきわめて少ないため、最新のシーケンス技術を駆使した解析結果とはいえ、いまだ記述的推論にとどまっていると言わざるを得ないのが現状であった。そこで、我々は、このような状況から一歩前進し、がんゲノムにおける BFB サイクルの意義を明らかにするためには、人為的に BFB サイクルを誘導することができる哺乳類細胞の実験系を確立することが急務であると考えた。

ところで、以前の研究課題の中で、我々は、培養マウス ES 細胞のゲノム安定化遺伝子 (Blm) の発現を一時的に抑制したうえで、特定のゲノム部位に DNA 二重鎖切断を誘導することができる実験系を開発した (Yamanishi A. et al, *Genome Research* 2013)。また、この培養マウス細胞実験系を用いて、連携研究者の瀬々潤博士 (国立研究開発法人産業技術総合研究所) らの協力のもと、全ゲノムシーケンシングによるゲノム構造変異解析のソフトウェア COSMOS の開発と、その検証実験を進めてきた (Yamagata K. et al, *Nucleic Acids Res* 2016)。したがって、培養マウス ES 細胞にゲノム構造変異を導入し、それを全ゲノムシーケンス等で解析することに関しては、すでに経験の蓄積があったといえる。

さらに、別の研究課題では、我々は培養マウス ES 細胞を用いたジーントラップ・ミュタジェネシスの実験系を開発し、レトロウイルス・ベクターによるヘテロ接合挿入変異体の集団の中から、ホモ接合挿入変異体を誘導・選択するための専用のベクターシステムを作製していた (Horie K., Kokubu C. et al, *Nature Methods* 2011)。

そこで今回、我々は、上に述べた培養マウス ES 細胞でのゲノム構造解析の経験を踏まえ、同時に、上記のレトロウイルス・ベクターを応用して新たに BFB サイクルを人為的に導入するためのシステム開発が可能であると考え、本実験計画への取り組みを開始するに至った。

2. 研究の目的

本研究は、がんの発生過程におけるクロモスリプシス型のゲノム構造変異、とくに切断-融合-架橋 (Breakage-Fusion Bridge, BFB) サイクルのメカニズムの関与とその病理学的意義を明らかにするために、哺乳類細胞に人為的に BFB サイクルを誘導し、その影響を前方視的に観察・解析できるような新規の実験系の開発を行うことを目的とする。

また、通常、BFB によって二動原体染色体 (Dicentric chromosome) を生じた細胞の大半は、ゲノム恒常性を維持できずに細胞死に至ると考えられている。それにもかかわらず、ある種のがん組織においては、生存細胞のゲノムに BFB サイクルの関与が推測されるような複雑なゲノム構造変異が検出される。このことは、哺乳類細胞のゲノムの中に、BFB が発生したとしても、比較的高い確率で細胞死を回避できるような特殊なゲノム領域が存在し、そのようなゲノム領域が、がんゲノムにおけるクロモスリプシス型構造変異の好発部位となっている可能性を示唆していると考えられた。

それでは、このような BFB 好発部位は、ゲノム中にどれくらいあるのだろうか。この疑問に答えるために、我々は、ゲノム上のさまざまな領域において人為的に BFB サイクルを誘導し、BFB 好発部位のゲノムワイド・スクリーニング実験を行うことを計画した。そして、そのようなゲノム領域に共通する性質や特徴を見出すことにより、BFB サイクルにもとづくゲノム構造変異の発生機序とゲノム構造学やゲノム進化学における意義を明らかにすることも、本研究の目的のひとつである。

3. 研究の方法

本研究のキーテクノロジーは独自に考案した BFB サイクル導入のためのレトロウイルス・ベクターシステムにある。今回のシステム設計に当たっては、以前の研究課題で作製したジーントラップ・ミュタジェネシス用のレトロウイルス・ベクター (Horie K., Kokubu C. et al, *Nature Methods* 2011) を元に、新たに BFB 誘導レトロウイルス・ベクターの構築を行った (ベクター構築の詳細は、現在準備中の論文にて発表する予定である)。

次に、今回開発した BFB サイクル誘導システムの有効性を検証するために、培養マウス ES 細胞の集団に対して上記のレトロウイルス・ベクターを感染させ、BFB サイクルの人為的誘導を行った後、培養プレート上に播種して薬剤選択によるコロニー形成に供し、薬剤耐性を獲得した ES 細胞クローンのみをコロニー・ピッキング法により単離した。

単離された個々の ES 細胞クローンにおいて、BFB サイクル変異の導入が成立していることは、まず DNA レベル、及び RNA レベルで確認した。DNA レベルでは、BFB 変異の接合部を検出するゲノム領域を特別に工夫され

た PCR プライマー (詳細は論文で発表予定) で増幅し、Sanger シークエンスによって検証した。また、RNA レベルでは、ベクターが設計通りに機能していることを RACE (Rapid Amplification of cDNA end) 法によって確認した。

つづいて、本ベクターシステムの作用によってマウス ES 細胞に形成されたゲノム構造変異の全貌を明らかにするために、適切な ES 細胞クローンを選び、全ゲノムシークエンス法によるゲノム構造変異解析を行った。具体的には、マウス ES 細胞から抽出したゲノム DNA を断片化して、インサート長 500 塩基対を目標値とするライブラリー調整を行い、イルミナ社 HiSeq2500 を用いたペアエンド全ゲノムシークエンシングを平均カバレッジ 30x で実施した。また、コントロールサンプルとして、BFB 誘導ベクターによる変異誘導前の親細胞株から抽出したゲノム DNA、ならびに、ガンマ線照射によるランダム構造変異誘導 ES 細胞株から抽出したゲノム DNA を用いた。シークエンスのアウトプットは、連携研究者らが開発したゲノム構造変異解析ソフトウェア COSMOS を用いて解析した (Yamagata K. et al, *Nucleic Acids Res* 2016)。なお、以上の全ゲノムシークエンス解析を実施するにあたっては、ウェット/ドライの両面で、新学術領域・学術研究支援基盤形成「先進ゲノム支援」の支援を受けた。

以上の実験により、本システムが有効に機能することを確認したうえで、次に、BFB 導入レトロウイルス・ベクターを用いた BFB 好発部位のゲノムワイド・スクリーニング実験を行った。BFB サイクルが誘導された ES 細胞クローンを 数百クローン単離し、それぞれのクローンにおけるレトロウイルス・ベクターの挿入部位を、スプリンカレット型リンカー結合 PCR 法によって同定した。

さらに、BFB 好発部位のスクリーニングをゲノムワイドに拡大するため、BFB 導入レトロウイルス・ベクターを感染させた細胞集団からゲノム DNA を一括抽出し、イルミナ社 MiSeq を用いたアンプリコン・シークエンスにより、レトロウイルス・ベクターの挿入部位の網羅的同定を行った。

なお、全ゲノムシークエンスによる解析と平行して、本システムによって培養マウス ES 細胞に誘導されたゲノム構造変異の状況を巨視的に解析するため、代表的な ES 細胞クローンに対しては、細胞遺伝学的な G-band 染色体解析も併せて実施した。

4. 研究成果

新たに構築した BFB 誘導レトロウイルス・ベクターがシステムの設計通りに機能し、培養マウス ES 細胞に BFB 変異の人為的導入が可能であることは、以下の実験により確認された。

まず、レトロウイルス感染後の薬剤選択によって単離された培養マウス ES 細胞クロー

ンから、それぞれゲノム DNA を抽出し、BFB 接合部特異的プライマーによる PCR でスクリーニングしたところ、PCR 陽性の ES 細胞クローンを多数回収することができた。次に、これらの PCR 陽性クローンに対して、PCR アンプリコンを用いた Sanger シークエンスを行い、当初の設計通りに BFB 接合部が形成されていることが確認された。

また、BFB 誘導レトロウイルス・ベクターが当初の設計通りに機能していることを、単離 ES 細胞クローンから RNA を抽出し、RACE 法によって確認しすることができた。同時に、一部の ES 細胞クローンの中には、Revertant 細胞が出現し、サブクローンとして存在している場合があることが示唆された。

次に、BFB 誘導後の単離 ES 細胞クローンの中から適切なものを選び、HiSeq2500 (イルミナ社) によるペアエンド全ゲノムシークエンス解析を行った。その結果、マウス染色体上の BFB 誘導レトロウイルス・ベクター挿入部位において、該当する染色体領域断片が tail-to-tail に反転して接合している状況が確認された。さらに、随伴する構造変異について、現在、詳細な解析を進めているところである。

BFB 好発部位のゲノムワイド・スクリーニング実験は、まず、レトロウイルス・ベクター挿入部位を個々の単離 ES 細胞クローンにおいて逐一同定していくことにより実施した。その結果、ベクター挿入部位の分布にゲノム構造上興味深いと思われるいくつかの特徴が認められた。そこで、さらにサンプル数を増やすため、BFB 誘導後の培養マウス ES 細胞集団から一括して採取したゲノム DNA に対して、次世代シークエンサーによるレトロウイルス・ベクター挿入部位の網羅的同定を行った。現在、その結果を解析中である。

くわえて、代表的な単離 ES 細胞クローンについては、細胞遺伝学的な視点から、G-band 染色体解析を行った。その結果、G-band 法の解像度の範囲内で明らかな構造変異が検出できるクローンと検出できないクローンとに分かれた。この中で、とくに、全ゲノムシークエンス解析を同時に行った ES 細胞クローンに注目して、現在、両解析結果の照合を進めている。

今後の課題として、BFB 誘導後の培養マウス ES 細胞に表現型の変化がもたらされたかどうかを *in vivo* で評価するため、現在、免疫不全マウスを用いたテラトーマ形成実験の準備を進めている。以上の実験結果が得られ次第、これまでの実験データと合わせて、専門誌への論文投稿を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

國府 力、切断-融合-架橋サイクルによるゲノム構造変異を人工的に導入するマウス実験系の開発、新学術領域「先進ゲノム支援」拡大班会議、2018 年 1 月 11-12 日、マロウドインターナショナルホテル 成田。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/mr-envi/www/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國府 力 (KOKUBU, Chikara)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：70379238

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

瀬々 潤 (SESE, Jun)
国立研究開発法人産業技術総合研究所、創薬基盤研究部門、主任研究員
研究者番号：40361539

(4) 研究協力者

田中 幸代 (TANAKA, Sachiyo)
大阪大学・医学系研究科・特任研究員