

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19476

研究課題名(和文)体細胞モザイク作製によるstem cell competition解析系の確立

研究課題名(英文)Establishment of stem cell competition analysis system utilizing somatic cell mosaicism

研究代表者

藤原 智子(石川智子)(FUJIWARA, Tomoko)

大阪大学・放射線科学基盤機構附属ラジオアイソトープ総合センター・特任研究員(常勤)

研究者番号：70402922

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文): 突然変異誘発は、多様なDNA損傷ストレスに共通の最終生物影響であり、発がんの有力要因である。発がんに必要なDriver 変異が生じていても、発がんが抑制されていることがある。抑制要因の1つとして組織幹細胞間の競合が提唱されており、本研究ではそれに関与する遺伝子の検出系確立を目標とした。本系確立に必要ながん抑制遺伝子(Bap1)、細胞分化制御シグナル遺伝子(Notch1a)、細胞接着遺伝子(Fat1a)変異体をCRISPRにより作製することができた。また、同一個体内でモザイク状に遺伝子変異を導入することが可能なBACコンストラクトを作製し、Creによる変異導入が可能であることが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんは我が国を含む先進国において常に死因の上位を占める疾患で、stem cell competitionはその発症の成否に関与する重要な現象である。本研究では、これに関与する遺伝子の検出系確立のために必要な遺伝子変異体をメダカにおいて作製し、さらにこれら遺伝子の正常、異常アリルを同一個体内でモザイク状に発現させることを可能にするBAC vectorを作製することができた。今後、本系の完成により当該分野のみならず広く生物・医学分野で極めて大きな役割を果たすと考えられる。

研究成果の概要(英文): Mutagenesis is a terminal biological effect of various DNA damage stresses and a critical factor of carcinogenesis. It has been reported that carcinogenesis can be suppressed even if the Driver mutation required for carcinogenesis occurs. Stem cells competition has been proposed as one of the factors of tumor suppression. We have tried to establish the detection system for genes involved in Stem cells competition. We established three mutants required for this system, tumor suppressor gene (Bap1), regulation factor for cell differentiation signal (Notch1a), cell adhesion factor (Fat1a), by CRISPR. We have also constructed a BAC vector which enable to introduce deletion mutation of the target gene in mosaic expression pattern, and have confirmed that the vector can generate proper deletion mutation in vitro.

研究分野：ゲノム生物学、放射線生物学

キーワード：stem cell competition 細胞間相互作用 ゲノム編集技術 メダカ 損傷応答 発がん

## 1. 研究開始当初の背景

突然変異誘発は、放射線や化学変異原など多様な環境ストレス (DNA 損傷ストレス) に共通の最終生物影響である。突然変異誘発が「発がん」の有力要因である事は明らかであるが、必ずしも必要充分条件ではない。たとえ発がんに必要な Driver 変異が生じていても、発がんに至らないケースが多く知られており、何らかの要因により「発がん」が抑制されていると考えられている。その抑制要因の1つとして、組織幹細胞間の競合 (Stem Cell Competition) による「発がん」抑制が提唱されている。ポストゲノム時代に入り、多くのヒトがん細胞のゲノム塩基配列データが蓄積されてきた。これら膨大なデータの解析から、がん細胞には数多くの突然変異が蓄積しているが、そのほとんどは発がん自身とは無関係な Passenger 変異であり、多段階発がん仮説で提唱されている Driver 変異はごくわずかである事が再確認された (Alexsandrov LB et al. 2013, Nature)。しかも組織幹細胞の分裂回数が Driver 変異蓄積には重要である事が示唆されている (Tomasetti & Vogelstein, 2015, Science)。更に、がん細胞に加え、ヒト正常組織のゲノム解析も多く報告されるようになってきた。特に興味深いのは、ある程度年齢を重ねたヒト正常組織においても、がん細胞と同程度の突然変異が蓄積しており、しかもその中には多くの Driver 変異も含まれているという報告である (Martincorena & Campbell, 2015, Science)。この報告は、たとえ Driver 変異が組織幹細胞に生じても、まわりの細胞との competition により発がんが抑制されている事を示唆している。本研究では、この「まわりの細胞との competition」に働いている遺伝子検出系の確立を目標とした。

## 2. 研究の目的

Driver 遺伝子変異が導入された個体は、当然ながら、放射線・紫外線や化学変異原などの環境ストレス負荷による発がんが潜在的に高くなる。更に、この変異体に Stem Cell Competition に関与する遺伝子変異を導入すれば、発がん頻度がより上昇、あるいは発がんまでの潜伏期間の短縮が予想される。この時、後者の変異をモザイク状に導入できれば、後者の発がんへの寄与をより明確に示す事が可能になる。以上の想定の下に、本研究では、1) いくつかの Driver 遺伝子変異個体および Stem Cell Competition に関与する可能性の高い遺伝子変異個体を作製する、2) Stem Cell Competition 関与遺伝子について、正常アレルと変異アレルがモザイク化できる手法の開発により、正常アレルと変異アレルの表現型の違いを同一個体内で観察できる系を樹立する、更に、3) 初期課程観察の為に Stem Cell マーキング系を開発する、以上3つの系の確立を目指した。これらの組み合わせにより、Driver 遺伝子変異と Stem Cell Competition 関与遺伝子変異の発がんへの寄与の詳細な解析が可能になると考えた。本研究では、受精卵へのマイクロインジェクションによる遺伝子導入、ゲノム編集が容易で遺伝学、分子遺伝学がフルに利用できる小型魚メダカを実験モデル生物とした。

## 3. 研究の方法

1) Driver 遺伝子としては、がん抑制遺伝子 *p53*, *BAP1* を、Stem Cell Competition に関与する可能性の高い遺伝子としては、細胞分化制御シグナル遺伝子 (*Notch1*) 及び細胞接着遺伝子 (*Fat1*) を標的として選んだ。メダカ変異体の作製には、TILLING 法及びゲノム編集技術 CRISPR を用いた。TILLING 法は化学変異原による random mutagenesis を利用して目的遺伝子に変異が導入されている個体をスクリーニングし作製する方法である。*p53* 変異体は当研究室において前者ですでに作製されており、他の *BAP1*, *Fat1*, *Notch1* に関しては後者で作製した。

2) モザイク作製法としては、ゲノム編集 (CRISPR) コンストラクトを組織特異的に発現誘導しモザイク状に遺伝子ロックアウトする方法、及び遺伝子変異個体にゲノム上の当該遺伝子領域全体を含む BAC を導入し、モザイク状に遺伝子変異を相補する方法の2つが考えられた。本研究では後者を採用している。遺伝子変異相補の為に正常アレル遺伝子導入は PiggyBac (PB) トランスポゾンを利用した BAC クローンにより行った (PB-BAC)。PB は、高等動物で高頻度に導入コンストラクトを正確な構造のままゲノム内に挿入できるトランスポゾンであり、挿入に必須の末端配列を Recombineering 法により BAC に導入した。cDNA の導入は、選択するプロモーターの選択が困難であり、どの様なプロモーターを用いても結果的には ectopic 発現になってしまう。その点 BAC クローンは、発現制御領域全体を含むため、より自然な遺伝子発現が期待できる。

3) 発がん過程をモザイク個体において追跡するには、組織幹細胞のマーキングが有効である。そこで、組織幹細胞マーカーとして *Lgr6* 遺伝子に注目し、*Lgr6* 遺伝子のプロモーター領域 (*Lgr6p*) を BAC クローンから切り出し、*Lgr6p-Venus* 系及び *Lgr6p-Cre* 系を作製した。

## 4. 研究成果

1) 変異体の作製: *Fat1*, *Bap1*, *Notch1* の変異体を CRISPR 法で作製した。*Notch1* はメダカに2つのオーソログがあるため各々に対して変異導入を行った。*Fat1a*, *Bap1*, *Notch1a*, *Notch1b* のそれぞれ exon2, exon4, exon15, exon3 に gRNA を設計し、合成 RNA と Cas9 タンパクをメダ

力受精卵にマイクロインジェクションし、変異体の樹立を行った。*Fat1a*, *Bap1*, *Notch1a* に関して図1に示すような変異体が得られた。

*Fat1a* 変異体ではヘテロ変異体同士の掛け合わせの結果ホモ変異体は得られた。*Fat1a* の欠失は viable かつ fertile であったがメスのみしか得られなかった。この性差が *Fat1a* 変異によるものかどうかについては更に検討が必要である。一方、*Bap1* 変異体は、マウスでは胚性致死となる。メダカにおいてはマウスで胚性致死を示す遺伝子変異体が得られる例が多くみられるため、成魚まで成長可能なホモ変異個体が得られることを期待したが、*Bap1* ホモ変異体は胚発生が異常なものが多く正常孵化したものでも3週間ほどで死滅してしまい、マウス同様、致死性の表現型であることが判明した。BAP1 変異マウスではヘテロ変異でもアスベスト暴露による中皮腫の発生率が有意に高いという報告がある。メダカでも表現型に何らかの影響があることが期待されたので、生存曲線作製により寿命を観察した(図2)。その結果、ヘテロ変異体では主な死因は特定できていないが有意に生存率が低くなっていることが明らかになった(P=0.018、一般化 Wilcoxon 検定)。このことから、*Bap1* に関してはヘテロ変異でも高発がんの表現型が期待できた。がん抑制遺伝子としては、*p53* はホモ変異で、*Bap1* に関してはヘテロ変異で本実験系に使用できることが明らかになった。

2) 遺伝子変異モザイク個体の作製: PB-BAC 相補コンストラクトによるモザイク作製には、当研究室ですでに確立されている PB-BAC コンストラクトを用いた。コンストラクトを図3に示している。本コンストラクトでは、相補する当該遺伝子全体を含む領域を loxP ではさみ、Cre の発現により当該遺伝子領域全体を切り出して削除することが可能になっている。更に遺伝子が切り出された細胞ではアクチンプロモーター下に配置している DsRed に替わり GFP が発現する。切り出しが確認できるよう工夫されている。ヒートショックプロモーター制御下の Cre 遺伝子(HS-Cre)を有している個体に本コンストラクトを導入する事により、ヒートショックによる Cre 発現を介して、loxP で挟まれた当該遺伝子を欠損できる構成である。本系が上手く機能するかどうかを、まず培養細胞レベルでチェックした。本 PB-BAC コンストラクトと CMV プロモーター下に Cre を配置したプラスミドを Co-transfection したところ DsRed が発現する細胞と、Cre による切り出しが起き GFP を発現するようになった細胞が確認できた(図4)。そこで、

本 BAC クローンと HS-Cre を持つ個体に IR-Lego(顕微鏡下赤外線レーザー照射装置:本装置により細胞レベルでヒートショックを与え遺伝子発現を誘導することができる)あるいは温浴による遺伝子の再ノックアウトを試みた。しかしながら赤外線レーザー照射、温浴による再ノックアウト(蛍光検鏡で DsRed GFP への蛍光の変化)を検出することはできなかった。そこで、個体レベルで本系が機能するのかどうかを確認するために、市販の Cre リコンビナントタンパクを受精卵に顕微注入したところ、遺伝子の再ノックアウトが起こり GFP 陽性細胞を検出することができた。以上の結果から、個体レベルでは HS-Cre の発現量が不足しており、検出するのに十分な数の細胞で再ノックアウトが起きていないことが考えられた。今後個体レベルでのより効率的な Cre 発現系の工夫が必要である事が明らかになった。

3) 組織幹細胞マーキング系統を樹立にはBACからのゲノム領域の retrieving法を使用した。本方法は当研究室で既に確立されており、この方法を用いて *Lgr6* プロモーター領域を切り出し Cre-induction コンストラクトを作製した。Cre-induction 系の作製に先立ち、メダカの *Lgr6* の組織特異的発現を確認するために *Lgr6* プロモーターの下流に Venus を繋いだ BAC コンストラクトを作製しメダカ受精卵に導入した。その結果、全身で強く Venus の発現が見られた。本研

```

Bap1
WT (726 aa)
TTCCCTTCAAGTGGATTGAAGAGCGCCGATCCAGGAAAGTCAACACTTTGGTGAGC
F L F K W I E E R R S R R K V N T L V D
GAGACTTCGGTCATCGATGAGGAAATGTAATGACATGTTTTTGGCTCATCAGtaatc
E T S V I D E E I V N D M F F A H Q L I

+1 (R57+16 mut)
TTCCCTTCAAGTGGATTGAAGAGCGCCGATCCAGGAAAGTCAACACTTTGGTGAGC
F L F K W I E E R R F Q E E S Q H F G G
CGAGACTTCGGTCATCGATGAGGAAATGTAATGACATGTTTTTGGCTCATCAGtaatc
R D F G H R *

-23 (F50+15 mut)
TTCCCTC-----TCCAGGAAAGTCAACACTTTGGTGAGC
F L F-----Q E E S Q H F G G R
GAGACTTCGGTCATCGATGAGGAAATGTAATGACATGTTTTTGGCTCATCAGtaatc
D F G H R *

-8 (R57+13 mut)
TTCCCTTCAAGTGGATTGAAGAGCGCCG-----GAAAGTCAACACTTTGGTGAGC
F L F K W I E E R R E S Q H F G G R
CGAGACTTCGGTCATCGATGAGGAAATGTAATGACATGTTTTTGGCTCATCAGtaatc
D F G H R *

Fat1
WT (4653 aa)
TTCACGTACTCATTTCGGAGTGTGAAGGTTAGAGACCTACTGTTGGAGCCAGA
F T D S F P S V I E V K E D L P V G A R
ATTGTCCACTTAAGCCACAGACTCTGATGATGGATTCAATGGCAATAGTGTATGT
I V H L S A T D S D S G F N G K L V Y V

-5 (V724+17 mut)
TTCACGTACTCATTTCGGAGTGTGAAGGTTAGAGACCTACTGTTGGAGCCAGA
F T D S F P S V I E G G P T C W S Q N
ATTGTCCACTTAAGCCACAGACTCTGATGATGGATTCAATGGCAATAGTGTATGT
C P L K R H R L *

-7 (I722+13 mut)
TTCACGTACTCATTTCGGAGTGTGAAGGTTAGAGACCTACTGTTGGAGCCAGA
F T D S F P S V L R R F Y L L E P E
ATTGTCCACTTAAGCCACAGACTCTGATGATGGATTCAATGGCAATAGTGTATGT
L S T *

Notch1a
WT (2476 aa)
AAACCCCTGCTCAACCCGGGACTTGCATGACGATGTCGGGATACAAAGTGAACATGT
N P C L N Q S T C I D D V A E Y K C N C
TTGCTGCTTACACCGGTGAAAACCTGGAAACCTGCTGGCCCTCGAGTTCOCGTCC
C C L T P V K T A K P C W P P A V P V
TGTAAAATGGTGGTGTGCAAGAGGCTGAAGACTACAGAGCTTTCTTTCGATCTGC
V K H V V C A R R L K T T R A F L A S A
CCTGAAGATGGCAAGCCCAACATGTGAATTTGACATCAACGAATGTGAAAAGTCGG
L K D G K A K H V K L T S T N V *

```

図1. CRISPR/Cas9システムを用いて作製した変異体下線が標的配列、塗りつぶしがPAM配列。

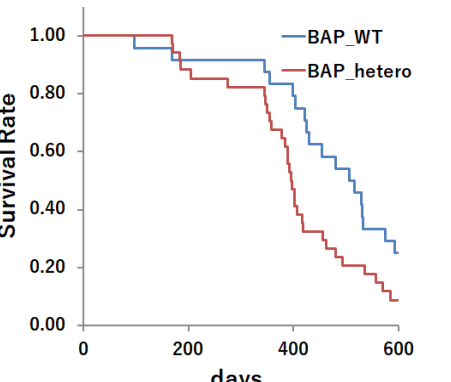


図2. *Bap1* 変異体の生存曲線

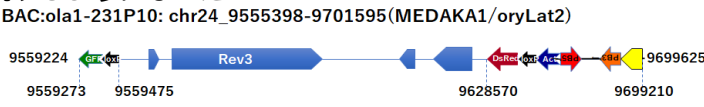


図3. PB-BACコンストラクト

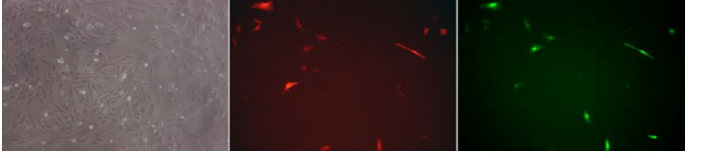


図4. 細胞レベルでのCreによるBACからの遺伝子の切り出し

究目的により適したマーキング法を検討中である。

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Fujikawa Y, Ishikawa-Fujiwara T, Kuo T, Shinkai N, Shoji T, Kawasaki T, Kamei Y, Sakuraba Y, Sato A, Kinoshita M, Gondo Y, Yuba S, Tsujimura T, Sese J, Todo T | 4. 巻<br>25            |
| 2. 論文標題<br>Involvement of Rev1 in alkylating agent-induced loss of heterozygosity in <i>Oryzias latipes</i> .  | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Genes to Cells   | 6. 最初と最後の頁<br>124-138 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/gtc.12746  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Terai Yuma, Sato Ryuma, Yumiba Takahiro, Harada Ryuhei, Shimizu Kohei, Toga Tatsuya, Ishikawa-Fujiwara Tomoko, Todo Takeshi, Iwai Shigenori, Shigeta Yasuteru, Yamamoto Junpei | 4. 巻<br>46                |
| 2. 論文標題<br>Coulomb and CH- interactions in (6-4) photolyase-DNA complex dominate DNA binding and repair abilities  | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Nucleic Acids Research   | 6. 最初と最後の頁<br>6761 ~ 6772 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1093/nar/gky364   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Tomoko (Ishikawa) Fujiwara, Yoshihiro Fujikawa, Andres Canela, Tatsuma Shoji, Fei Sun, Jun Sese, Takeshi Todo |
| 2. 発表標題<br>Genome analysis of Rev3I deficient medaka mutant  |
| 3. 学会等名<br>日本放射線影響学会第63回大会   |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Yoshihiro Fujikawa, Takeshi Todo             |
| 2. 発表標題<br>Characteristic feature of genomic instability in rev1 and rev3 mutants |
| 3. 学会等名<br>16th International Congress of Radiation Research (国際学会)               |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Yoshihiro Fujikawa, Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Ayuko Sato, Tetsushi Sakuma, Tsutomu Shimura, Takashi Yamamoto, Seiji Kodama, Tohru Tsujimura, Takeshi Todo |
| 2. 発表標題<br>A unique phenotype of medaka rev3l mutant   |
| 3. 学会等名<br>16th International Congress of Radiation Research (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Tomoko Fujiwara, Yoshihiro Fujikawa, Takeshi Todo                                       |
| 2. 発表標題<br>Involvement of Trans Lesion Synthesis DNA polymerase on maintenance of Genome stability |
| 3. 学会等名<br>日本放射線影響学会第62回大会 (招待講演)  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Yoshihiro Fujikawa, Tomoko Fujiwara, Ayuko Sato, Tsutomu Shimura, Seiji Kodama, Tohru Tsujimura, Takeshi Todo |
| 2. 発表標題<br>Characteristic feature of genomic instability in rev1 and rev3 mutants  |
| 3. 学会等名<br>日本放射線影響学会第62回大会   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>藤川 芳宏、藤原 智子、佐藤 鮎子、志村 勉、児玉 靖司、辻村 亨、藤堂 剛      |
| 2. 発表標題<br>消化管腫瘍を高頻度に発がんするメダカ rev3L 変異体を用いた発がんメカニズムの解析 |
| 3. 学会等名<br>第6回アジア環境変異原学会日本環境変異原学会第48回大会合同大会            |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|                              |
|------------------------------|
| 1. 発表者名<br>藤原 智子、藤川 芳宏、藤堂 剛  |
| 2. 発表標題<br>メダカBAP1 遺伝子変異体の作製 |
| 3. 学会等名<br>日本放射線影響学会第61回大会   |
| 4. 発表年<br>2018年              |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>藤川 芳宏、藤原 智子、佐藤 鮎子、佐久間 哲史、山本 卓、児玉 靖司、辻村 亨、藤堂 剛 |
| 2. 発表標題<br>年齢・組織依存の高発がんモデル：メダカ rev3l 変異体                 |
| 3. 学会等名<br>日本放射線影響学会第61回大会                               |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>藤川 芳宏、藤原 智子、佐藤 鮎子、佐久間 哲史、山本 卓、児玉 靖司、辻村 亨、藤堂 剛 |
| 2. 発表標題<br>メダカrev3l変異体における染色体不安定性の消化管腫瘍への関与              |
| 3. 学会等名<br>日本環境変異原学会第47回大会                               |
| 4. 発表年<br>2018年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|