

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02689

研究課題名(和文) ゲノム初期化に伴う変異の抑制

研究課題名(英文) Reduction of genome reprogramming-associated mutations

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・量子生命科学研究所・上席研究員

研究者番号：40392211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、ゲノム初期化が一過性のDNA修復活性低下を伴い、多数の変異発生へ繋がることを明らかにし、その一方で変異の少ないiPS細胞が樹立可能であることを報告してきた(臍帯血赤芽球由来iPS細胞)。今回、更なるiPS細胞の変異低減化を実現する為、変異発生の機構解明を進め、同一の体細胞集団から樹立した多数のiPS細胞株の解析を通してiPS細胞に観察される変異がde novoであることを示し、更に、脱アミノ化によるC>T変異頻度の著しい上昇、DNA脱メチル化とC>T変異の密接な関係、そして特定のレトロトランスポゾンにおける変異上昇など新たなiPS細胞ゲノム特異的変異発生機構の存在を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同一のゲノムを持つ細胞を異なる形質の細胞へと分化させるエピゲノム制御は、多細胞生物の根源的機構である。エピゲノム変動はゲノム変異を起こさないと信じられてきたが、iPS細胞や核移植ES細胞などエピゲノム状態の大規模再編により創出される多能性幹細胞ゲノムに多くの変異が検出され両者の密接な関係が示唆された。この分子機構の解明はゲノム初期化機構の理解に大きく貢献するだけでなく医学利用の観点からも極めて重要である。実際、iPS細胞の臨床利用が始まっており、将来の利用拡大も強く期待されていることから、iPS細胞及びその由来細胞の全変異の把握はもとより、ゲノム安定性の分子機構解明が喫緊の課題となっている。

研究成果の概要(英文)：We showed that genome reprogramming is accompanied by a transient reduction in DNA repair activity, leading to the occurrence of numerous mutations. On the other hand, we also reported the existence of iPS cells with fewer mutations (erythroblast-derived iPSCs). In this study, we have further elucidated the mechanism of mutagenesis in order to further reduce mutations in iPS cells. By analyzing many sister iPSC lines established from the same somatic cell population, we have clearly demonstrated that almost all the mutations observed in iPS cells are de novo, and have also revealed new iPS cell-specific mutagenesis mechanisms, including a marked increase in the frequency of C>T transitions by deamination, a close relationship between DNA demethylation and C>T transitions, and an increase in the C>T mutations in a specific retrotransposon family.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：ゲノム初期化 iPS細胞 点突然変異 マイクロサテライト

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

様々な細胞への効率的な分化系の構築や未分化細胞の除去法の開発などが急速に進み、iPS 細胞の再生医療への利用が本格的になればなるほど、ゲノム安定性や造腫瘍性など残されている問題への対処が大きな課題となっている。実際、iPS 細胞の臨床利用を進める上で、ゲノム変異について議論が続いている。癌関連遺伝子内に変異を有する細胞は排除されているが、その影響が未知であるその他の遺伝子、それらの遺伝子近傍もしくは intergenic region の変異に関しては解析されていないのが現在の状況である。

我々は、iPS 細胞ゲノムには ES 細胞ゲノムの 10 倍以上の変異が存在することを明らかにした (Sugiura et al, Stem Cell Reports 2014)。その一方で、iPS 細胞の点突然変異の中で、活性化酸素が原因と考えられる変異を抑制するためには、臍帯血赤芽球を用いることが有効であること、その結果、変異がタンパク質をコードするエクソン領域には全く存在しない iPS 細胞樹立の可能性を示した (Araki et al, Nat. Commun 2020)。

### 2. 研究の目的

変異の少ない臍帯血赤芽球由来 iPS 細胞に加え、様々な iPS 細胞の全ゲノム解析等を通してその変異発生メカニズムを解明する。同一親体細胞から樹立された姉妹 iPS 細胞株からなる iPS 細胞のセットを複数構築し解析対象にすることで従来の解析でも本質的な問題となっていた偽陽性変異を可能な限り排除し、変異解析の精度を上げる。親体細胞種を問わない変異低減化 iPS 細胞樹立系の構築、更には ES 細胞と同等レベルの変異しか持たない iPS 細胞樹立法確立の可否を議論する。

### 3. 研究の方法

#### (1) iPS 細胞におけるマイクロサテライトコピー数異常の解析

マイクロサテライト (MS) と呼ばれるゲノム上の単純な繰り返し配列のコピー数異常は、神経疾患等との関連が知られているにもかかわらず、解析の技術的困難さから、iPS 細胞においてほとんど注目されてこなかった。本課題では、当研究室において樹立した臍帯血赤芽球由来 iPS 細胞およびその他の体細胞由来ヒト iPS 細胞、そしてマウス iPS 細胞における MS 領域について、イルミナ全ゲノムシーケンシング結果を元に、ゲノム初期化前後でコピー数に変動が見られるか解析する。インフォマティクスの結果は、アンプリコンシーケンシングにより実験的検証を行い、定量的な議論を行う。

#### (2) 姉妹 iPS 細胞セットを用いた変異解析

iPS 細胞に観察される変異が pre-existing かあるいは *de novo* か、直接的に証明する方法が無い場合議論が続いている。今回、1 名の健康ドナーの体細胞、即ち同じ親体細胞から異なる 2 種類の方法で樹立した iPS 細胞計 8 株、更に、1 個体のマウス胎児線維芽細胞から作出した iPS 細胞株 33 姉妹株 (核移植胚性幹細胞 2 株含む) について変異解析し、議論する。

#### (3) iPS 細胞特異的変異の検出

当研究室にて作出したヒト iPS 細胞株 (臍帯血赤芽球由来 14 株、線維芽細胞由来 8 株)、公開されている他の iPS 細胞株 (センダイウイルスベクターにより樹立された健康成人皮膚線維芽細胞由来 53 株。1 名につき 2 株以上 iPS 細胞が樹立し、WGS データが利用可能なサンプルを対象とした。) (HipSci project : <https://www.hipsci.org/#/>)、816 名分の germline mutation (Goldmann et al, 2016 Nat. Genet.) も合わせて、塩基置換のパターン、変異 signature、ゲノム上の分布について解析する。

#### (4) DNA 脱メチル化の変異原性に関する解析

マウス線維芽細胞、レトロウイルスベクターを用いて、iPS 細胞樹立時に Tet1 を高発現させることでゲノム初期化初期の脱メチル化を促進させ、CpG C>T 変異の頻度、分布を解析する。

#### (5) 臍帯血赤芽球由来 iPS 細胞の分化能の解析

臓器レベルの再生医療に欠かせない材料である神経幹細胞や血管内皮細胞への分化誘導を行い、マーカー遺伝子の発現レベルを免疫組織染色等によりその分化レベル及び効率を評価する。

#### 4. 研究成果

##### (1) iPS 細胞におけるマイクロサテライトコピー数異常の解析

ヒト臍帯血赤芽球由来 iPS 細胞 14 株における MS コピー数異常の頻度は、線維芽細胞由来 iPS 細胞の約 3 分の 1 であることを明らかにし、報告した (図 1)。さらに、異常が起こりやすい MS 領域 (ホットスポット) も同定された。また、マウス iPS 細胞には、ES 細胞より約 6 倍 MS コピー数異常が多いことを示した (Kamimura et al, Stem Cell Reports 2021)。

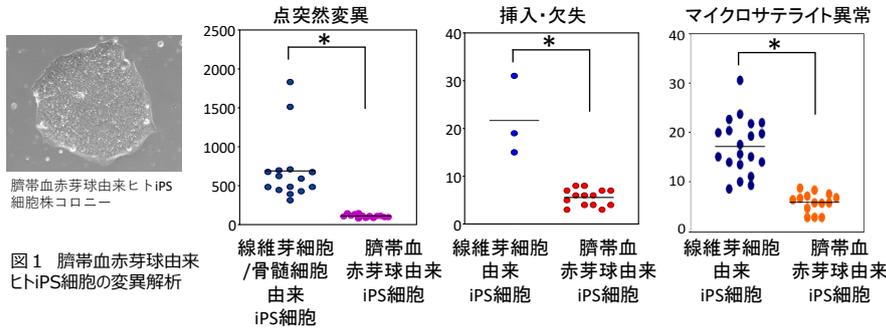


図 1 臍帯血赤芽球由来ヒト iPS 細胞株の変異解析

##### (2) 姉妹 iPS 細胞セットを用いた変異解析

1 個人由来の線維芽細胞から、異なる 2 種類の方法 (レトロウイルスベクター、あるいはエピゾーマルベクター) で山中 4 因子を導入し、iPS 細胞をそれぞれ 3 株、5 株樹立し、全ゲノムシーケンシングによる点突然変異解析を行った (図 2)。その結果、点突然変異数が樹立法に依存していることが明らかになった。

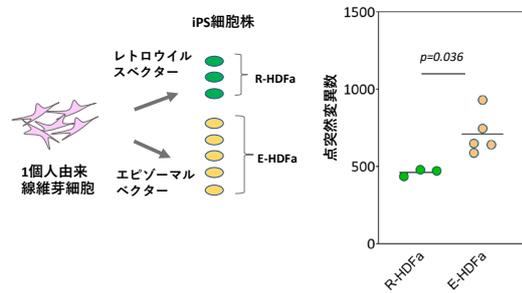


図 2. 同一個体体細胞から異なる手法で樹立した iPS 細胞の点突然変異数の解析

更に、同一マウス個体から樹立したマウス iPS 細胞 35 株 (体細胞核移植 ES 細胞 2 株含む) について解析した結果、共通の変異はほとんど検出されず、その一方で各株に数百の株特異的な変異が検出された。

これらの結果は iPS 細胞に検出される変異の多くは従来考えられていたように親体細胞の一部の細胞に既に存在していたものではなく、体細胞の iPS 化に伴って生じたものであることを示している。

##### (3) iPS 細胞特異的な変異の検出

ヒト iPS 細胞 75 株の変異解析を行った (図 3)。樹立に用いた体細胞および山中 4 因子の導入法については図内に色分けして示した。驚くべきことに、線維芽細胞由来ヒト iPS 細胞の中には、10,000 以上の点突然変異を有する株が複数存在した。更に数千か所以上変異を有する iPS 株も多数存在していることから、これら 10,000 以上の変異を有する iPS の存在は極めて稀な例では

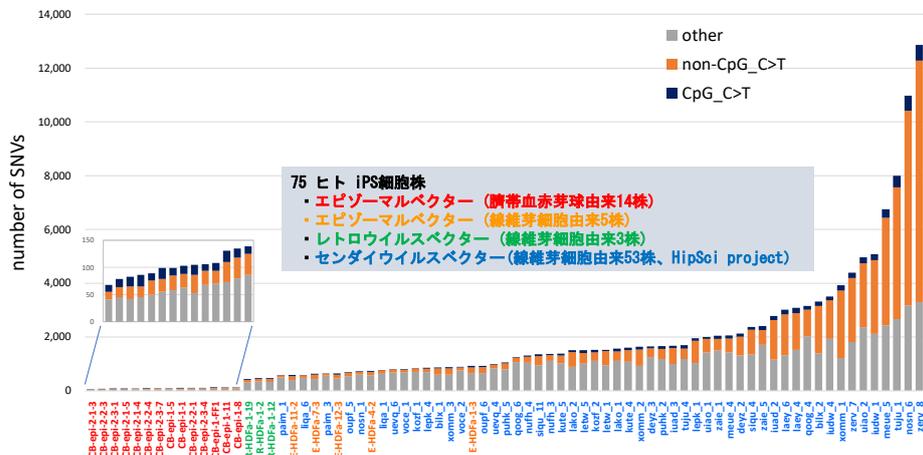


図 3. ヒト iPS 細胞株における総点突然変異数、および C>T 変異数  
X 軸は iPS 細胞株、Y 軸は iPS 細胞株あたりの点突然変異数を示す。

ないと考えられた。また、それら検出された点突然変異の詳細解析から、C>T 変異の割合が著しく高いことも明らかとなった。

CpG 配列以外 (non-CpG C>T) のシトシンでも多く起きているこのような C>T 変異の原因はシトシンの脱アミノ化によるウラシルへの変化であると信じられている。しかしながら本来ゲノムには存在しないはずのウラシルは DNA 修復系により極めて効率的に除去されるために通常変異には至らないことが知られている。今回の結果は我々が以前報告した iPS 細胞樹立時に生じる一過性の DNA 修復能の低下によると考えると辻褃が合う。

一方で極めて興味深いことに総変異数の多い iPS 細胞株ほどシトシンの脱アミノ化による変異の割合が高いのに対し、総変異数の少ない iPS 細胞株では脱アミノ化による変異の割合は下がり、CpG サイト特異的な変異の割合が急上昇していた(図4)。

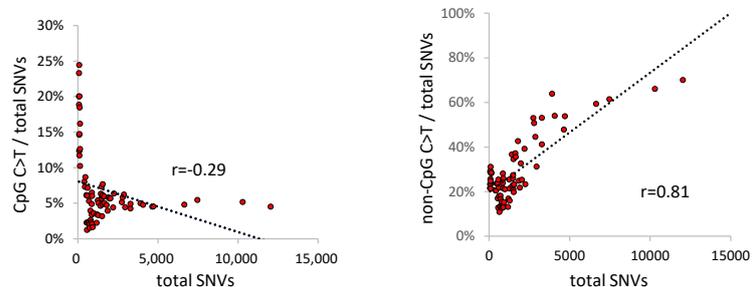


図4. CpG C>TとCpG以外のC>T変異は異なるメカニズムで生じる

これらの結果から、我々は次に、脱アミノ化以外 CpG サイト特異的な C>T を生じさせるメカニズムの探索を行った。

#### (4) DNA 脱メチル化と CpG C>T の関連についての解析

MEF を用いて iPS 細胞樹立時に Yamanaka4 因子に加え Tet 1 遺伝子 (DNA 脱メチル化を司ると考えられている酵素) を導入し、ゲノムに生じる変異を解析した。結果、Tet1 の共発現によりゲノムの CpG C>T の数が有意に上昇することが示された(図 5)。更に SINE での変異増加も確認された。今回の実験結果は Tet1 による脱メチル化が変異頻度に影響を与えていることを強く示唆していた。iPS 細胞ゲノムで観察された SINE における変異上昇は iPS 細胞内での変異発生を再現しているように見えるが、細胞内でも Tet1 が同様に変異発生に本当に関与しているかを明らかにするには更に詳しい解析が必要である。Tet1 の抑制実験も必須であるが、iPS 形成そのものまで抑制してしまうため、変異への Tet1 遺伝子抑制の効果を実験的に観察することは不可能である。

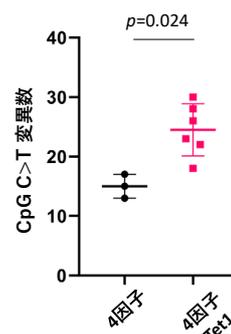


図 5. Tet1 を過剰発現させて樹立したマウス iPS 細胞の変異数  
4因子: Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc

しかしながら、一方で、活性化されたレトロトランスポゾンに変異の増加がみられることや、DNA メチル化レベルが変動し易いゲノム領域 (DMR: differentially methylated region) においても同じく変異増加がみられるなど、iPS 細胞においてメチル化と変異発生の際に正の関係が見られたことは、DNA 脱メチル化と C>T 変異発生に密接な関係があることを示唆している。

ゲノム初期化において脱メチル化は中心的な反応であり大規模に起こる。またゲノム初期化以外にも発生、分化などでも中心的な役割を果たし、同様に大規模に起きていると考えられる。これらのことから脱メチル化が変異原性を有するかという問いは生物学上極めて重要である。この観点からも我々の今回の実験結果は、より詳細に検討・確認され、議論される必要がある。

(2)-(4)の成果について、論文として報告した (Araki et al, Nat. Commun. 2024)

#### (5) 臍帯血赤芽球由来 iPS 細胞の分化能の解析

ヒト臍帯血赤芽球から樹立した iPS 細胞について、調べた 4 株全てにおいて神経幹細胞、さらに、神経細胞、グリア細胞への効率的な分化が確認された。更に、この 4iPS 株からランダムに選んだ 2 株について血管内皮細胞への分化を試みたところ、2 株のうち 1 株において、高効率 (96%) に内皮マーカー (CD31+CD144) 陽性となり、血管新生アッセイにおいても、典型的なチューブ構造を示した。我々の結果は、ヒト臍帯血赤芽球から樹立された iPS 細胞が特に神経系に分化し易く、再生医療への利用に有望であることを示していた。

(参考文献)

Sugiura M, Kasama Y, Araki R, Hoki Y, Sunayama M, Uda M, Nakamura M, Ando S, Abe M. Induced pluripotent stem cell generation-associated point mutations arise during the initial stages of the conversion of these cells. Stem Cell Reports. 2014, 2:52-63.

Araki R, Hoki Y, Suga T, Obara C, Sunayama M, Imadome K, Fujita M, Kamimura S, Nakamura M, Wakayama S, Nagy A, Wakayama T and Abe M. Genetic aberrations in iPSCs are introduced by a transient G1/S cell cycle checkpoint deficiency. *Nat Commun.* 2020, 11:197.

Goldmann JM, Wong WS, Pinelli M, Farrah T, Bodian D, Stittrich AB, Glusman G, Vissers LE, Hoischen A, Roach JC, Vockley JG, Veltman JA, Solomon BD, Gilissen C, Niederhuber JE. Parent-of-origin-specific signatures of de novo mutations. *Nat Genet.* 2016, 48:935-9.

Kamimura S, Suga T, Hoki Y, Sunayama M, Imadome K, Fujita M, Nakamura M, Araki R, Abe M. Insertion/deletion and microsatellite alteration profiles in induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports.* 2021, 16:2503-2519.

Araki R, Suga T, Hoki Y, Imadome K, Sunayama M, Kamimura S, Fujita M and Abe M. iPS cell generation-associated point mutations include a significant number of C>T substitutions as a result of different cytosine modification mechanisms. *Nat Commun.* 2024, 15:4946.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3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 -

1. 著者名 Oba Takaaki, Makino Kenichi, Kajihara Ryutarō, Yokoi Toshihiro, Araki Ryoko, Abe Masumi, Minderman Hans, Chang Alfred E, Odunsi Kunle, Ito Fumito	4. 巻 9
2. 論文標題 In situ delivery of iPSC-derived dendritic cells with local radiotherapy generates systemic antitumor immunity and potentiates PD-L1 blockade in preclinical poorly immunogenic tumor models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal for ImmunoTherapy of Cancer	6. 最初と最後の頁 e002432 ~ e002432
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/jitc-2021-002432	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

1. 著者名 Araki Ryoko, Suga Tomo, Hoki Yuko, Imadome Kaori, Sunayama Misato, Kamimura Satoshi, Fujita Mayumi, Abe Masumi	4. 巻 15
2. 論文標題 iPS cell generation-associated point mutations include a significant number of C>T substitutions as a result of different cytosine modification mechanisms.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4946
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-024-49335-5	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4件（うち招待講演 1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（法喜）ゆう子, 今留 香織, 藤田 真由美, 安倍 真澄, 荒木 良子
2. 発表標題 ゲノム初期化開始時の変異発生
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会, 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅 智, 法喜 ゆう子, 砂山 美里, 今留 香織, 上村 悟氏, 藤田 真由美, 中村 美樹, 荒木 良子, 安倍 真澄
2. 発表標題 iPS細胞に見られるde novo変異
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会 (MBSJ) 年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kamimura Satoshi, Suga Tomo, Hoki Yuko, Sunayama Misato, Imadome Kaori, Nakamura Miki, Araki Ryoko, Fujita Mayumi, Abe Masumi
2. 発表標題 Microsatellite alterations in genome reprogramming
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会 (MBSJ) 年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒木 良子, 法喜 ゆう子, 菅 智, 砂山 美里, 今留 香織, 上村 悟氏, 中村 美樹, 藤田 真由美, 安倍 真澄
2. 発表標題 ヒトiPS細胞樹立におけるゲノム変異とその機構
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会 (招待講演)
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
---------	---------