

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 7 月 7 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290068

研究課題名(和文) リプログラミングに伴うゲノム不安定性の解析

研究課題名(英文) Genome instability during genome reprogramming

研究代表者

荒木 良子 (ARAKI, RYOKO)

国立研究開発法人放射線医学総合研究所・研究基盤センター・室長

研究者番号：40392211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞のゲノム異常は、免疫原性および腫瘍原性に関わる問題である。我々は、iPS細胞におけるde novo点突然変異を高効率に検出できる解析システムを構築し、全ゲノム内の変異の量、質、分布、そして、それらの発生時期の同定を行った。iPS細胞ではES細胞の10倍以上の点突然変異が検出され、また、iPS細胞の変異はtransversionが多いという特徴を明らかにした。更に、iPS細胞中のアリル頻度が25%以下の変異、つまりiPS細胞への転換の極初期に発生した可能性の極めて高い変異を相当数同定した。これらの結果は、リプログラミングにゲノム不安定性が伴う可能性を示唆していた。

研究成果の概要(英文)：A significant number of point mutations have been suggested in all iPSC genomes examined thus far, arousing serious concerns about the use of iPSCs especially on immunogenicity and tumorigenesis. Here, we have developed a genome sequencing system which allows us to exclusively identify de novo point mutations and have attempted to reveal the amount and mode of point mutations. First, we compared iPSCs with ESCs and found more than 10 times point mutations in iPSC genomes compared to those in ESC genomes. Further, the point mutations observed in iPSC genomes exhibit a unique base substitution pattern, transversion-predominant. Next, we focused on the heterogeneity in an iPSC clone to directly identify the point mutations that arose during the iPSC generation. As a result, we found a large number of SNVs (single nucleotide variations), of which allele frequency were less than 50%. Our results indicates that current iPSC generation method contains mutagenic process.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：リプログラミング iPS細胞 点突然変異

1. 研究開始当初の背景

2006年、京都大学山中教授らのグループは、体細胞に4つの転写因子を一過性に強制発現させることにより、ES細胞同様の全能性を有する多能性幹細胞を樹立することに成功した(iPS細胞)(Takahashi and Yamanaka, Cell 2006)。自分の体細胞を使い、しかもゲノムを操作することなく樹立されるiPS細胞は、再生医療の分野で懸案だった倫理的問題、拒絶反応の問題を解決する理想的なツールとして期待されている。

一方、次世代シーケンシング技術の飛躍的な能力向上に伴い、iPS細胞でもゲノムの1塩基レベルでの解析が行われると、驚くべきことに、次々とゲノムの点突然変異が報告され始めた。Goreらは、ヒトiPS細胞22株およびそれぞれの体細胞全エクソンシーケンシングの結果から、1株に平均5箇所の点突然変異が同定されることを報告した(Gore *et al.*, Nature 2011)。「これらの変異はいつ生じているのか?」が重要であるが、Jiらは、ヒトiPS細胞の全エクソンシーケンシングで、リプログラミングより以前の変異(培養前か培養中かは不明であるが、体細胞に既に存在していた変異: pre-existing)、リプログラミング中、そして樹立後の3つの時期に分ける議論を試みた。pre-existing変異が少なくとも19%、樹立後のパッセージの過程で生じる変異が少なくとも9%と考えられたため、リプログラミングのストレスが変異を誘発する可能性が十分であると報告したが、エビデンスに乏しく、広く支持されるに至らなかった(Ji *et al.*, Stem Cells 2011)。むしろ、Youngらが行った、iPS細胞の全ゲノムシーケンシング解析で、同じ体細胞から樹立した複数のiPS細胞に共通の変異が多数見つかったことから、pre-existing変異こそがメジャーな原因であると印象付けられてしまった(Young *et al.*, Cell Stem Cell 2012)。

2. 研究の目的

本研究は、エピゲノム転換とゲノム維持との関係性に切り込むことで、リプログラミング機構の理解を進めることが目的である。更に、点突然変異の原因を明らかにできれば、変異の少ないiPS細胞樹立法の確立に貢献できる。

「ゲノムリプログラミングに伴いゲノム不安定性が生じる」という仮説の検証を行うため、全ゲノム点突然変異解析法を構築し、変異がいつ起きるか、という視点で解析する(図1)。

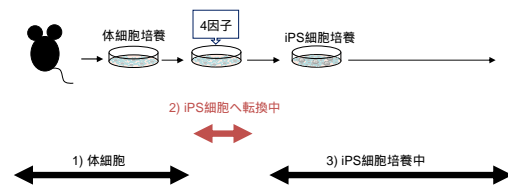


図1 点突然変異はいつ起こるのか?

3. 研究の方法

(1) イルミナ HiSeq2000 を用いた全ゲノムシーケンシングから single nucleotide variations (SNVs) を抽出し、*De novo* mutation を効率良く同定する実験系を構築し、検証を行う。

(2) iPS細胞とES細胞のSNVsの頻度、性質の比較を行う。

(3) リプログラミング中の点突然変異を同定する。そのためにiPS細胞中の変異アリル頻度を明らかにする。50%の頻度を有する変異、すなわち全ての細胞集団が有する変異は、原理的にはpre-existingと区別できないため、25%以下の頻度を持つ変異(iPS細胞化極初期の変異)の検出を試みる。

4. 研究成果

インフォマティクスにおけるSNP(1塩基多型)の影響を避けるためにreference genomeと同一系統のC57BL/6Jマウスの胚性線維芽細胞(MEF)を用いてiPS細胞を樹立した(後に用いるES細胞も同様の系統から樹立した)。同一系統内でもSNPは存在するた

め、MEF は単一個体から調製した。iPS 細胞およびそれぞれの iPS 細胞に対応する元の体細胞の全ゲノムシーケンシングを実施し、リファレンスゲノムにマッピングした後、ソフトウェアによる 35-65%のアリル頻度の SNVs を抽出した。そしてエラーを除くための厳しい基準を設定し、スクリーニングを行った。このシステムで、iPS 細胞に検出された SNVs100 箇所以上について、サンガーシーケンシングを実施し、体細胞には検出されることが確認できた。更に、26 箇所の SNVs について、体細胞ゲノムをテンプレートとしてアンプリコンを作製し、Ultra deep sequencing を実施した。その結果、全ての箇所で体細胞ゲノムには検出されなかった（統計的に有意差が出た 1 箇所は、他の方法で否定された）。また、depth の差により、SNVs 検出率の違いがないことも確認した。

この実験系を用いて、iPS 細胞と ES 細胞株の SNVs の比較を行った。iPS 細胞では、全ゲノムに換算すると、500-1000 箇所もの点突然変異が観察されたのに対し、ES 細胞ではその 10 分の 1 であった。更に興味深いことに、SNPs や ES 細胞ではトランジション変異が多いが、iPS 細胞では、トランスバージョン変異が多いという特徴を有することも明らかになった（図 2）。これらの結果は、リプログラミングに伴う point mutations の存在を強く示唆していると考えられた。

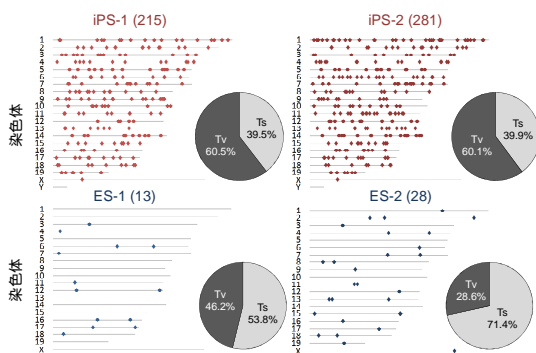


図2 検出された点突然変異染色体上の位置にプロットした。上段はiPS細胞、下段はES細胞（括弧内は検出された突然変異の総数）円グラフはトランジション (Ts)とトランスバージョン (Tv)の比率

次に、iPS 細胞における変異アリル頻度が 25%以下の SNVs の同定を試みた。全ゲノムシーケンシング結果より、改めて低頻度の SNVs を抽出し、得られた候補について、amplicon sequencing を用いて、iPS 細胞における変異アリル頻度を解析したところ、25%、12.5%の SNVs の同定に成功した(図 3)。これらを更に確かめるため、iPS 細胞からシングルセル由来のサブラインを多数樹立し、10 種類のサブラインが、どの変異を有するか、サンガー法にて確認した。その結果、25%、12.5%という変異アリル頻度の考え方は正しいことが検証され、それら変異の発生履歴も明らかにすることができた。これらの結果は、iPS 細胞においてゲノム初期化の初期過程に point mutations が発生することを示すものである。

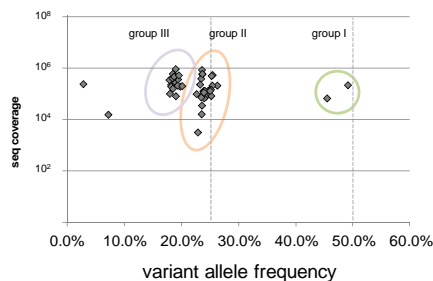


図3 低頻度点突然変異の同定 groupIは50%, IIは25%, IIIは12.5%の集団と推測された。

これらの結果は *Stem Cell Reports* (Sugiura et al, 2014) に報告した。

更に、他のゲノムリプログラミング手法である体細胞核移植 ES 細胞についても、同様の手法を用いて点突然変異が一定頻度存在すること、その塩基置換は iPS 細胞と同じくトランスバージョン優位であることを明らかにし報告した (Araki et al, Stem Cells 2017)。

これらの結果により、ゲノムリプログラミングそのものか、それに伴う細胞内環境の変化が点突然変異を誘発することを示唆していると考えられる。一方で、体細胞の種類やリプログラミング手法の違いにより変異の

頻度が異なることから、iPS 細胞における変異頻度低減化の可能性も示された。

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3件)

Araki R, Mizutani E, Hoki Y, Sunayama M, Wakayama S, Nagatomo H, Kasama Y, Nakamura M, Wakayama T, Abe M. (2017) The Number of Point Mutations in Induced Pluripotent Stem Cells and Nuclear Transfer Embryonic Stem Cells Depends on the Method and Somatic Cell Type Used for Their Generation. *Stem Cells* 35: 1189-1196.

doi: 10.1002/stem.2601.

Araki, R., Sugiura, M., Hoki, Y., Sunayama, M., Nakamura, M., Kasama, Y., and Abe, M. (2015). Induced pluripotent stem cell generation-associated point mutations. *Inflammation and Regeneration* 35, 226-232.
<http://www.jsir.gr.jp/journal/Vol135No5/3505.html>

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

doi: 10.1016/j.stemcr.2013.11.006.

〔学会発表〕(計8件)

砂山美里、安倍真澄、藤森(法喜)ゆう子、笠間康次、中村美樹、荒木良子
iPS 化における点突然変異生成タイミングの解析 第 38 回日本分子生物学会年会 2015-12 神戸ポートアイランド、神戸

Fujimori-Hoki Y, Araki R, Sunayama M, Mizutani E, Wakayama S, Nagatomo H, Kasama Y, Nakamura M, Wakayama T, Abe M. A comparison of point mutations between iPS and ntES cell with whole genome sequencing. 第 38 回日本分子生物学会年会 2015-12 神戸ポートアイランド、神戸

砂山美里、荒木良子、藤森ゆう子、笠間康次、宇田昌広、中村美樹、安倍真澄 iPS 細胞クローン内細胞にみられるポイントミューテーションの不均一性 第 37 回日本分子生物学会年会 2014-11 パシフィコ横浜 横浜

藤森ゆう子、杉浦真由美、笠間康次、砂山美里、宇田昌広、中村美樹、荒木良子、安倍真澄 iPS 樹立初期過程には多くの point mutation が生じる 第 37 回日本分子生物学会年会 2014-11 パシフィコ横浜 横浜

Araki R, Fujimori-Hoki Y, Sunayama M, Kasama Y, Uda M, Nakamura M, Abe M. Lineage conversion step in iPS cell generation involves highly mutagenic process. International Society for Stem Cell Research 12th Annual Meeting 2014.6. Vancouver.

Fujimori-Hoki Y, Sugiura M, Kasama Y, Sunayama M, Uda M, Nakamura M, Ando S, Araki R, Abe M. ES cells vs. iPS cells: lineage conversion-associated point mutations. International Society for Stem Cell Research 12th Annual Meeting 2014.6. Vancouver.

Hoki Y, Sugiura M, Kasama Y, Sunayama M, Uda M, Ando S, Araki R, Abe M. Point mutations in ES cells. International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting 2013.6. Boston.

Araki R, Sugiura M, Kasama Y, Sunayama M, Uda M, Nakamura M, Ando S, Hoki Y, Abe M. iPS cells generation-associated point mutations. International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting 2013.6. Boston.

〔図書〕(計1件)

荒木良子、杉浦真由美、笠間康次、安倍真澄、iPS 化に伴う点突然変異、日本臨床 増刊号 5 再生医療 新たな医療を求めて、73(増刊)、55 - 61、2015-08

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 良子 (ARAKI RYOKO)

放射線医学総合研究所 研究基盤センター・研究基盤技術部・室長

研究者番号：40392211

(2) 連携研究者

藤森(法喜)ゆう子 (FUJIMORI-HOKI YUKO)

放射線医学総合研究所 研究基盤センター・研究基盤技術部・研究員

研究者番号：50415402

砂山 美里 (SUNAYAMA MISATO)

放射線医学総合研究所 研究基盤センター・研究基盤技術部・技術員

研究者番号：20625115

杉浦真由美 (SUGIURA MAYUMI)
放射線医学総合研究所 研究基盤センター
ー・研究基盤技術部・主任研究員
研究者番号：60397841

宇田昌広 (UDA MASAHIRO)
放射線医学総合研究所 研究基盤センター
ー・研究基盤技術部・技術員
研究者番号：30625893