

185. iPS 細胞に生じる多量のゲノム変異と p53 の関係

荒木 良子

*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 生物研究推進課
遺伝子・細胞情報研究室

Key words : iPS 細胞, リプログラミング, p53, ゲノム安定性, 点突然変異

緒言

遺伝子導入により体細胞を多能性幹細胞へ転換させる iPS 細胞形成におけるゲノム安定性は、その機構の理解への貢献はもとより、免疫原性や造腫瘍性に直結する重要な問題である。これまでに、ゲノム維持機構の主役である p53 の抑制が iPS 細胞形成効率を上昇させることが発見され、実際に、ヒト iPS 細胞を樹立する際の効率改善の手法の一つとして応用されている。ゲノム異常の発生が危惧されているものの、p53 活性の抑制によるゲノムへの影響の詳細な解析は報告されていない。今回、iPS 化に伴って生じる point mutations を効率的に検出するシステムを構築し、p53 と iPS 細胞形成の関係について、主に point mutations の側面から検討を試みた。

方法および結果

1. *de novo* point mutation 検出を可能にする iPS 細胞樹立システムの構築

これまで exome sequencing や whole genome sequencing により、iPS 細胞ゲノム内に多くの point mutation の存在が報告されてきた^{1,2)}。しかし、一方でこれらの変異が、iPS 化以前に、即ち、用いた親体細胞ゲノム内に既に存在したもの (pre-existing と呼ぶ) であるという報告も続いている³⁾。このように、体細胞から iPS 細胞樹立過程そのものが point mutation を伴うか否かという、機構解明研究、更には臨床利用研究の観点からも極めて重要なこの問題は依然、議論の中にある。その解決には、pre-existing とそれ以外の *de novo* (新規) point mutations を区別できる解析法が必須である。

ヒト細胞を用いた研究では、受精卵から何十年も経過した、つまり、体細胞突然変異が長い期間蓄積した細胞を用いることになる。一方、マウスを対象とする場合、受精卵から 13 日しか経過していない様な胎児の細胞を用いることが可能となるため、これまで iPS 細胞ゲノムにおける詳細な point mutation 研究は、主にマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を用いて行われてきた。しかしながら、多くの研究で、それら MEF は複数匹の embryos を混ぜて調製され、解析されてきた経緯がある。これは、同一系統のマウス間ではゲノムに違いはほとんど無いと信じられてきたからである。加えて、1 匹の embryo で調製できる MEF の細胞数は少なく、実際の実験において困難を伴うことも要因であった。

これまで報告された解析法が多くの pre-existing 変異を含むこと、それらが親体細胞として用いた embryo 個体間の違い、即ち、系統内 SNP (single nucleotide polymorphism) であることを示唆するデータを我々は得た⁴⁾。更に、興味深いことに、pre-existing とそれ以外の *de novo* point mutation では変異の内容そのものが異なることも見出した (前者がトランジション優位、後者がトランスバージョン優位：図 1)。

*現所属：国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部 幹細胞研究チーム

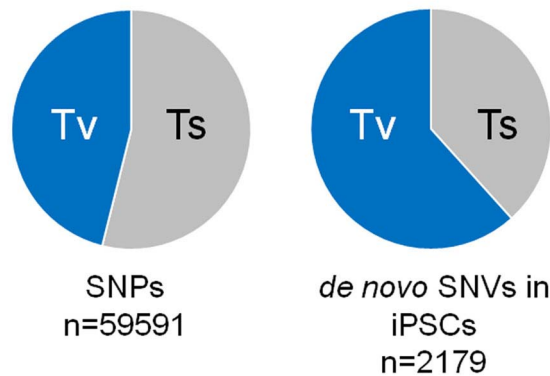


図1. ポイントミューテーションの内訳

C57BL/6 MEF から樹立した iPS 細胞の点突然変異の解析の過程で発見した系統内 SNPs (左) および *de novo* SNVs (右)。

トランジション変異：プリン同士、ピリミジン同士の置換、トランスバージョン変異：プリンとピリミジン間の置換。

2. p53^{-/-}ノックアウトマウスを用いた iPS 細胞樹立の試み

p53 が point mutation 頻度に与える影響を見るために、まず、p53 ノックアウトマウス MEF を用いて iPS 細胞樹立を試みた。実験には全て C57BL/6 系統を用い、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc (OSKM) をレトロウイルス発現系で導入した。

1) p53^{-/-}MEF を用いた iPS 細胞株樹立

2 匹の p53^{-/-} 個体から独立に調製した MEF を用いて、各 3 well ずつ樹立実験を行った。p53^{+/+} 株、即ちコントロールに比して、~10 倍のアルカリフォスターゼ陽性の細胞塊の出現を確認した (図 2)。しかし、これらの細胞塊ではシャーレ上で既に分化が起こっており、iPS 細胞や ES 細胞の様にコロニーとして周囲の細胞と分離することが出来なかった。

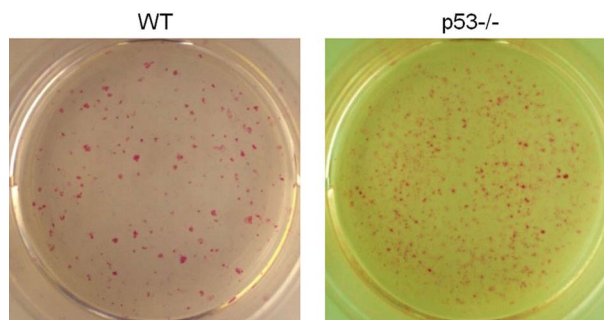


図2. p53^{-/-}MEF を用いた iPS 細胞株樹立

OSKM 作用後 day14 にアルカリフォスターゼ染色を行った。

2) p53^{+/-}MEF を用いた iPS 細胞株樹立

-/- 株と同じく、1 匹の p53^{+/-} 個体から調製した MEF を用いて、独立に 6 well の樹立実験を行った。結果、p53^{+/+} 株、即ちコントロールに比して、~5 倍のアルカリフォスターゼ陽性細胞の出現を確認した。+/- 株ではコロニーピックの時点では形態異常は見られず、計 13 ラインが樹立された。しかし、これらに関しても細胞株樹立後

分化するコロニーが次第に増加した。培養3週間までに樹立した全ての株が分化し iPS 細胞様形態を維持できなかった (図3)。

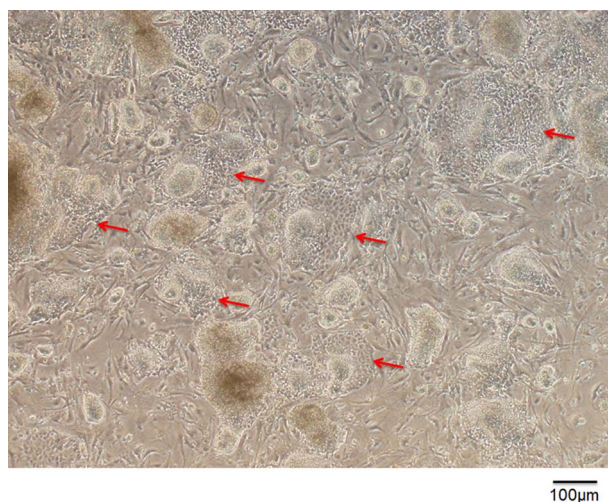


図3. p53 +/- MEF より樹立した iPS 細胞株
コロニーピック後、継代中に分化細胞が出現した (赤矢印)。

3. p53 一過性抑制による iPS 細胞株の樹立

上記の通り、ノックアウトマウスを用いた今回の一連の実験で、未分化コロニーの形状を維持する iPS 細胞株を樹立することは出来なかった。そこで、次にリプログラミング時のみ一過性に p53 を抑制する、p53 ドミナントネガティブ (p53DN) による iPS 細胞株の樹立を試みた。2種類の p53DN コンストラクトを作製し、レトロウイルスベクターに挿入した (p53DN-1、p53DN-2)。p53KO マウス同様、OSKC を用い iPS 細胞株を樹立した。3匹の個体から独立に調製した MEF を用いて、各 3 well の樹立実験を行ったところ、2種類のコンストラクトうちの一つのみ p53 ドミナントネガティブ効果が観察された (図4)。計 29 個の iPS 細胞株を樹立に成功した。p53DN では KO マウスのような分化は観られず、スムーズに細胞株が樹立され、その後の培養においても形態変化は観られなかった。

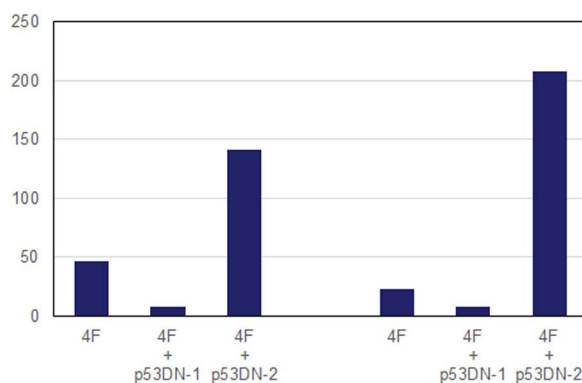


図4. 2種類のドミナントネガティブ変異体を用いた iPS 細胞樹立頻度
Y軸は 1 well 中のコロニーの数。

4. Whole genome sequencing

樹立した 4F-p53DN-iPSC 4 クローンおよび比較対象となる 4F-iPSC 4 クローンからゲノム DNA を調製し、Illumina HiSeq2000 (101bases、paired-end) を用いてゲノムシーケンシングを行い、それぞれ 3.5 億リード以上を取得した。

BWA によるリファレンスゲノム (mm9) への mapping および CLC genomic workbench を用いた SNV 検出を実施した。細胞株樹立には、既に全ゲノムシーケンスを取得済みの C57BL/6 マウス MEF (single embryo-derived MEF) を用いた。これら親株ゲノムとの比較から point mutations の同定を行っているところである。

考 察

ノックアウトマウスを用いた今回の研究の結果は、iPS 細胞の維持が p53 の量もしくは活性度に依存していることを示しているように見える。p53 の量が減るほど幹細胞状態の維持が困難になっている (+/+ > +/- > -/-)。その一方で、iPS 細胞の形成そのものには、従来の報告どおり p53 は、負に作用するようである⁵⁾。今後は更に、このメカニズムの解明に取り組みたい。一方、p53 の iPS 細胞形成に伴う point mutations への影響を、その頻度、および質に関して解析し、「p53 不活化は本当に変異を増加させるのか？」を明らかにする。

最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Gore A, Li Z, Fung HL, Young JE, Agarwal S, Antosiewicz-Bourget J, Canto I, Giorgetti A, Israel MA, Kiskinis E, Lee JH, Loh YH, Manos PD, Montserrat N, Panopoulos AD, Ruiz S, Wilbert ML, Yu J, Kirkness EF, Izpisua Belmonte JC, Rossi DJ, Thomson JA, Eggan K, Daley GQ, Goldstein LS, Zhang K. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011;471(7336):63-7. doi: 10.1038/nature09805. PubMed PMID: 21368825.
- 2) Araki R, Sugiura M, Hoki Y, Sunayama M, Nakamura M, Kasama Y, Abe M. Induced pluripotent stem cell generation-associated point mutations. *Inflammation and Regeneration*, 2015; 35(5): 226 - 232.
- 3) Young MA, Larson DE, Sun CW, George DR, Ding L, Miller CA, Lin L, Pawlik KM, Chen K, Fan X, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, Cook LL, Swift GW, Demeter RT, Wendl MC, Sands MS, Mardis ER, Wilson RK, Townes TM, Ley TJ. Background mutations in parental cells account for most of the genetic heterogeneity of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2012;10(5):570-82. doi: 10.1016/j.stem.2012.03.002. PubMed PMID: 22542160.
- 4) 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(1):52-63. doi: 10.1016/j.stemcr.2013.11.006. PubMed PMID: 24511470.
- 5) Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Kanagawa O, Nakagawa M, Okita K, Yamanaka S. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature*. 2009;460(7259):1132-5. doi: 10.1038/nature08235. PubMed PMID: 19668191.