

18. iPS 化に伴い生じる点突然変異の低減化

安倍 真澄

*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

Key words : リプログラミング, 点突然変異, iPS 細胞, ntES 細胞

緒言

様々な疾患において、自己の iPS 細胞を用いた再生医療への期待は高い。しかしながら、その樹立および培養過程でゲノムに変異が生じ、癌関連遺伝子にも変異が入る可能性が指摘されている。このことが、再生医療への利用の障害となりうるため重大な懸念事項となっている。我々はこれまでに、iPS 細胞に生じるゲノム点突然変異の頻度が ES 細胞の 10 倍以上であること、ES 細胞と iPS 細胞でみられる変異に明らかに異なる特徴があることを見出した¹⁾。即ち、ES 細胞では SNP などの変異によく観られるトランジション優位の変異が、一方、iPS 細胞ではトランスバージョン塩基置換が頻発することを明らかにした。今回、まず、変異低減化が可能か否かを検討し、変異頻度や質の制御が可能であることを示した。更にその技術構築のために、変異発生メカニズムの解明を一部行い、最後に、実際に点突然変異の頻度制御の実験を試みた。

方法および結果

1. 点突然変異の頻度を変動させることは可能なのか？

現在まで、iPS 細胞ゲノムに観られる点突然変異の原因に関しては、大きく二つの説明がされてきた。ひとつが、用いた親体細胞の一部の細胞に既に存在していたものが、iPS 化という、単一細胞増殖の過程で、検出感度以上となり、見えてきた、というものであり、iPS 化に伴い、変異は発生していないという考え方である。そして、もうひとつが iPS 化に伴い変異そのものが生じたという考えである。つい最近も前者を支持する結果が報告された²⁾。もし前者が正しければ、変異の低減化は、あまり意味が無いことになるかもしれない。一方、後者であれば、変異の低減化は再生医療に用いる上で必要であるとともに、その機構研究は変異低減化技術の開発を超えて、ゲノム初期化機構そのものの理解を推し進めるかもしれない。

我々はこれまでに上述した結果以外に、iPS 細胞コロニー内の不均一性を見出している。即ち、コロニーを構成する全細胞に存在する変異以外に、コロニーの約半分の細胞のみに存在する変異、さらにはそのまた半分、そしてそのまた半分にしか存在しない変異が多数存在することを見出した。このことは、iPS 細胞コロニー内では、iPS 化の直後（即ち親体細胞の段階では存在しない）に連続的に多くの変異が生じたことを明確に示していた。この考察は、コロニーを形成する一つ一つの細胞の解析により、更に確認された¹⁾。

今回の目標である変異頻度の低減化を達成するためにはまずその前提として、変異の制御が可能か否か、即ち、変異頻度そのものに実験的に影響を与えることが出来るか否か？を明らかにする必要があると考えた。加えて、iPS 化に伴う点突然変異が iPS 化に必須か、それとも単なる副産物なのかを明らかにすることも、今後の低減化の取り組みにおいて極めて重要である。

そこで、今回、ゲノム初期化の方法、用いる親体細胞の違いが変異頻度、変異の質に影響を与えうるかを調べ、低減化が可能か、議論しうるものか否かを明らかにすることを試みた。親体細胞として同一フラクションの MEF を用いて、iPS 細胞と核移植 ES 細胞（以降、ntES 細胞）を樹立し、変異の数と質を解析した。次に、他の体細胞種を用いて、同じく、iPS 細胞や、ntES 細胞を用いて同様の解析を行った。

その結果、図1に示すように、ゲノム初期化の方法、また、用いた親体細胞の種類により、頻度、さらには質が異なることが明確に示された。また、今回解析した細胞株の中には、点突然変異の数が通常の~1/5にまで下がったものや、塩基置換がトランジション有意になった細胞株も存在した³⁾。今回の観察は、変異の頻度、質の制御が可能であることを示す重要なデータである。

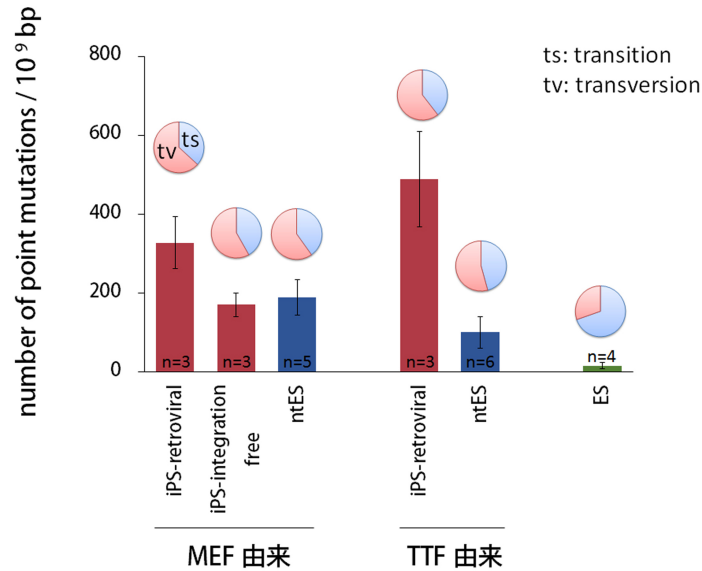


図1. リプログラミング手法及び体細胞種による点突然変異の頻度と質

棒グラフは、10⁹ bpあたりの点突然変異の頻度を示す。retroviral：レトロウイルスベクターによる4因子の発現により作製した株。integration free：プラスミドベクターによる4因子の一過性発現により樹立後、プラスミドのゲノムへのインテグレーションが無いことを確認できた株。MEF：mouse embryonic fibroblast。TTF：tail tip fibroblast。円グラフは、それぞれ検出された point mutation の塩基置換について transition (ts) と transversion (tv) の割合を示した。エラーバーはSDを示す（それぞれの n はカラム中に記載した）。

2. 変異発生機構の理解

このように、変異の数、質の制御が可能なが示された。しかしながら、低減化のためには、どのような刺激、環境を細胞に与えるべきか、について理解する必要がある、そのためには、変異発生機構の解明が求められる。これまで調べた iPS 細胞には 300~1,000/ゲノムもの点突然変異が、全ゲノム解析（以降 WGS）により検出されてきた。更に最近、iPS 化の初期に活性酸素（ROS）が発生するという、我々が見いだしたトランスポージョン優位の原因となる可能性のある興味深い結果が報告された⁴⁾。しかしながら、ゲノムにそのような膨大な修飾・損傷が起きた場合、DNA 修復機構が働き、更に修復が完了しない場合、アポトーシスなどで、損傷を有する細胞は系から取り除かれるはずである。例えば、ROS 発生と同時に DNA 修復能の低下が生じていたとしても、そのような細胞の多くは死に至ると考えられている。一方で、変異の蓄積が見られるものに腫瘍がある。腫瘍では多くの場合、p53 や Rb シグナルパスウェイの不活化により DNA 修復活性の低下に加えてアポトーシスも起こらなくなっている。結果、細胞に生じた変異が DNA 修復、アポトーシス、両方のフィルターにかかることなくサバイブすることになる。この両者の不活化を起こす、上流の機能が細胞周期チェックポイント機能である。

我々は、iPS 化において発癌のような、細胞周期チェックポイント機能低下が、一過性に起きているのではないかと考え、そのことを明らかにする為に、iPS 細胞形成の放射線感受性を調べた。もし我々の考えが正しければ、iPS 化の特定の時期に放射線耐性を示し、その時期にゲノム異常の蓄積が起こるはずである。現在、ROS 発生と同じ時期に細胞周期チェックポイントが一過性に不活化されているか否かを分子レベルで解析しながら、一方で、この時期と点突然変異発生時期について解析している。

3. 低減化の試み

1) 活性酸素のスキャベンジャーによる点突然変異低減化の検討

C57BL/6J マウス線維芽細胞からレトロウイルスを用いて、転写因子 (4F: Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc) を感染させ、種々の抗酸化物質 (N-アセチルシステイン、ビタミンC 等) を添加し iPS 細胞を樹立した。樹立した株について、Sugiura らの論文で報告した方法に従い、全ゲノムシーケンシングにて点突然変異の数および質を解析中である。これまでの結果では、低減化が観られる株と、低減化が全く観られない株の出現が確認されている。即ち、低減化の可能性は示されたが、株間の違いが大きく、最終的なデータには至っていない。

2) 活性酸素発生の抑制の試み

最近、iPS 細胞の樹立初期に一過性に酸化リン酸化が更新することが報告された⁴⁾。そこで、培地に酸化リン酸化を阻害する薬剤 (ロテノン) を添加し、iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞株の点突然変異解析を行った結果、変異の減少が示唆された細胞株が観察された一方で、意外にも、変異が大幅に増加したクローンも確認されており、現在更に多くの株の WGS 解析を行っている。

考 察

今回の研究で iPS 細胞や ntES 細胞ゲノムに含まれる点突然変異の頻度や質が、用いる体細胞やゲノム初期化の方法によって異なることが示された。このことは未だ、議論の中にある変異の原因が、もともとの体細胞に存在したのではなく、ゲノム初期化に伴って生じていることを示している点でも重要な結果である。今回、得られた細胞には変異の数が大きく減少しているものが存在した。更にトランジション優位の株も一株、得られた。これは、これまで解析してきた 50 以上の細胞株で初めて観られた現象である。これら我々が得た今回の結果は、変異の制御が可能であることを示している。しかしながら、低減化に必要な因子、環境に関してより正確な情報が必要で、更なる研究が求められる。現在進めているゲノム初期化と細胞周期チェックポイント制御の関係はこれらに大きなヒントを与えてくれるかもしれない。

文 献

- 1) 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; PubMed Central PMCID: PMC3916761.
- 2) Kwon EM, Connelly JP, Hansen NF, Donovan FX, Winkler T, Davis BW, Alkadi H, Chandrasekharappa SC, Dunbar CE, Mullikin JC, Liu P. iPSCs and fibroblast subclones from the same fibroblast population contain comparable levels of sequence variations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(8):1964-1969. doi: 10.1073/pnas.1616035114. PubMed PMID: 28167771; PubMed Central PMCID: PMC5338363.
- 3) Araki R, Mizutani E, Hoki Y, Sunayama M, Wakayama S, Nagatomo H, Kasama Y, Nakamura M, Wakayama T, Abe M. 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*. 2017;35(5):1189-1196. doi: 10.1002/stem.2601. PubMed PMID: 28233378.
- 4) Kida YS, Kawamura T, Wei Z, Sogo T, Jacinto S, Shigeno A, Kushige H, Yoshihara E, Liddle C, Ecker JR, Yu RT, Atkins AR, Downes M, Evans RM. ERRs Mediate a Metabolic Switch Required for Somatic Cell Reprogramming to Pluripotency. *Cell Stem Cell*. 2015;16(5):547-55. doi: 10.1016/j.stem.2015.03.001. PubMed PMID: 25865501; PubMed Central PMCID: PMC4427539.