

139. がん化の理解を目指した追跡可能な染色体融合系の開発

林 眞理

京都大学 白眉センター

Key words : テロメア, クライシス, がん, CRISPR/Cas9

緒 言

がん化のごく初期の過程である CRISIS (又はテロメアクライシス) 期には、細胞の性質を決定する染色体が不安定化し、腫瘍の悪性化や多様化に多大な影響を及ぼす。その分子メカニズムは、染色体末端を保護するテロメアの機能不全による染色体融合に端を発すると考えられているが、不明な点が多い。すでに定説である BFB (Breakage-Fusion-Bridge) サイクル仮説は、McClintock によって提唱されたモデルを基とし、がん化の染色体不安定性を説明する仮説として拡張された¹⁾。ところが我々のこれまでの研究によって、この仮説を再考する必要性が示された²⁾。

既存の方法論では、集団として染色体融合の影響を解析するため、集団内の一部の細胞で誘導された染色体末端融合と、その後の細胞の挙動との間に明確な因果関係を結論付けることはできなかった。また染色体融合には、複製後の姉妹染色分体間が融合する場合と、複製前の別々の染色体間が融合する場合とがあり、本来であればこれら異なる種類の染色体融合とその影響を個別に考える必要があるが、考慮されていない。そこでこれらの課題を克服するために、個々の細胞における個別の染色体融合の影響を追跡できる系の構築を目指した。

方法、結果および考察

1. CRISPR/Cas9 による染色体融合の誘導

配列特異的エンドヌクレアーゼ CRISPR/Cas9 による 2 つの異なる染色体領域の切断は、染色体転座を引き起こす³⁾。この報告は、2 つの異なるテロメア近傍領域を切断することで、特定の染色体間に染色体融合を引き起こすことが可能であることを示唆している。さらにこのとき複製後の姉妹染色分体が同時に切断されれば、姉妹染色分体間の融合も引き起こすことができると考えられる。そこでこの着想を確かめるため、X 染色体テロメア近傍の特異的な配列をターゲットにした CRISPR/Cas9 を発現した細胞において有糸分裂期の染色体を解析した。正常な細胞である IMR-90 細胞を使用したため、特異的なターゲット配列は相同染色体上に 2 箇所 (DNA 複製後は 4 箇所) 存在する (図 1A)。Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH) 法によってセントロメアとテロメアを可視化し、染色体融合の有無を解析したところ、CRISPR/Cas9 による切断で、姉妹染色分体間の融合、及び異なる染色体間の融合を引き起こせることが確認された (図 1B、C)。後者の融合は、相同染色体間で生じたと考えられる。

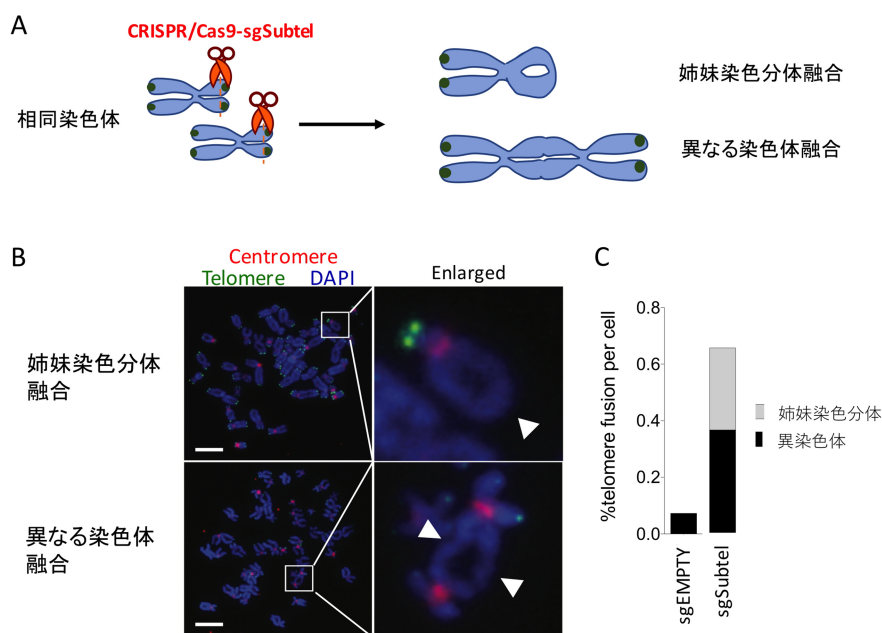


図 1. テロメア近傍をターゲットとする CRISPR/Cas9 による染色体融合の誘導

(A) 特異的なサブテロメア配列を切断する CRISPR/Cas9 の帰結の模式図。CRISPR/Cas9 による切断箇所は、通常そのまま修復されるが、稀に 2 つの異なる切断箇所が誤って修復されることがある。これが姉妹染色分体間で起きれば姉妹染色分体融合、相同染色体間で起きれば異なる染色体間の融合が引き起こされると予想される。(B) X 染色体短腕テロメア近傍の切断は、姉妹染色分体融合及び異なる染色体融合を引き起こす。ヒト肺由来の線維芽細胞 IMR-90 において染色体 Xp のテロメア近傍を CRISPR/Cas9 によって切断し、有糸分裂期の細胞を FISH 法によって解析した。赤はセントロメア、緑はテロメア。白い三角の部分で染色体が融合している。スケールバーは $10\ \mu\text{m}$ 。(C) CRISPR/Cas9 導入後 7 日後における 1 細胞あたりの染色体融合の割合。対照群 (sgEMPTY) と比較して 2 種類の染色体融合が上昇している。

2. 姉妹染色分体融合を可視化する細胞の確立

そこで次に、比較的安定に染色体を保持しているがん細胞株である HCT116 において、X 染色体短腕部のテロメア近傍領域に特殊な DNA 配列カセットを挿入した。HCT116 は性染色体を 1 本だけ保持しているため、DNA カセットは染色体上の 1 箇所のみ挿入されると予想された。この DNA 配列はスプライシング配列で分断した蛍光タンパク質 mCitrine を有し、C 末側がセントロメア方向を、N 末側がテロメア方向を向いている (図 2A)。またこのカセット内で N 末はプロモーターによって駆動され、スプライシングによって P2A-Neomycin resistant gene と繋がる設計となっている (図 2A 上)。P2A は翻訳における自己切断配列であり、このカセットを持つ細胞は Neomycin を発現して G418 耐性となる。これを利用して G418 耐性となったクローンを 20 個得て、PCR によってカセットの挿入を確認したところ、1 クローンにおいて目的のテロメア近傍領域にカセットが挿入された株 (HCT116 SIS15 clone) を得た (図 2B)。また FISH 法によって、カセットが染色体末端の 1 箇所のみ挿入されていることを確認した (図 2C)。この DNA カセットは、mCitrine-N 末と P2A 間の配列を切断すると、姉妹染色分体間の融合を引き起こし、mCitrine の N 末と C 末がスプライシングによって繋がるように設計してある (図 2A 下)。

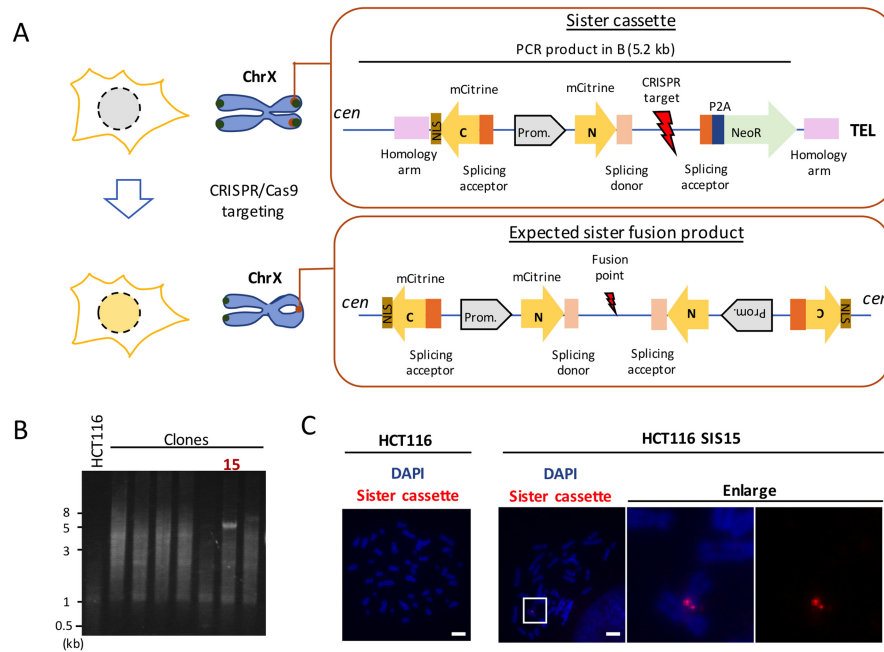


図 2. 姉妹染色分体融合を可視化する DNA カセットの X 染色体短腕テロメア近傍への挿入
 (A) X 染色体を 1 本だけ保持する HCT116 細胞株の X 染色体短腕テロメア近傍に挿入した DNA カセットの模式図 (上)。mCitrine が N 末と C 末にスプライシングによって分断され、それぞれセントロメア、テロメア方向に配置されている。N 末はプロモーターによって駆動され、P2A-Neomycin resistant gene に繋がっている。P2A は翻訳自己切断配列。B における PCR 予想産物の箇所を上を示す。DNA カセットを CRISPR/Cas9 で切断した際に生じる姉妹染色分体融合の模式図 (下)。A 上の CRISPR target の部位を CRISPR/Cas9 によって切断した際に、その切断箇所ですister染色分体が融合すると、mCitrine の N 末と C 末が同じ方向に配置し、スプライシングによって全長の mCitrine が生じる。(B) DNA カセットを挿入した HCT116 クローンの確認。A-上の DNA カセットを導入した細胞クローンを G418 選択によって得た後に、PCR によって狙った箇所に DNA カセットが挿入されたかを確認した。クローン 15(HCT116 SIS15)において Xp テロメア近傍に DNA カセット挿入されていることが PCR 産物のシーケンシングによって確認された。(C) FISH 法によるカセット挿入の確認。上記 DNA カセットをプローブとした FISH を行い、SIS15 クローンにおいて染色体上の 1 箇所にものみ DNA カセットが挿入されていることを確認した。スケールバーは 10 μ m。

3. 姉妹染色分体融合可視化システムの評価

HCT116 SIS15 細胞において、挿入した DNA カセット特異的に姉妹染色分体融合を引き起こさせるために、mCitrine-N 末と P2A 間の 19 のターゲット配列を CRISPR/Cas9 によって切断し、mCitrine の発現を Flow Cytometry によって解析した。すると mCitrine-N 末の下流 304 bp を最大として、いくつかのターゲット配列切断によって mCitrine の発現が誘導されることが確かめられた (図 3A)。ここで最も効率のよかった CRISPR/Cas9-sgFUSION11 を選択し、以降の解析に利用した。次に mCitrine 陽性細胞が、姉妹染色分体融合を引き起こしているかを確認するために、mCitrine 陽性細胞を FACS AriaIII を用いたソーティングによって分離し、有糸分裂期の細胞を FISH 法によって解析した。すると、mCitrine 陽性細胞においては、挿入した DNA カセット部位で姉妹染色分体が融合していることが確かめられた (図 3B)。

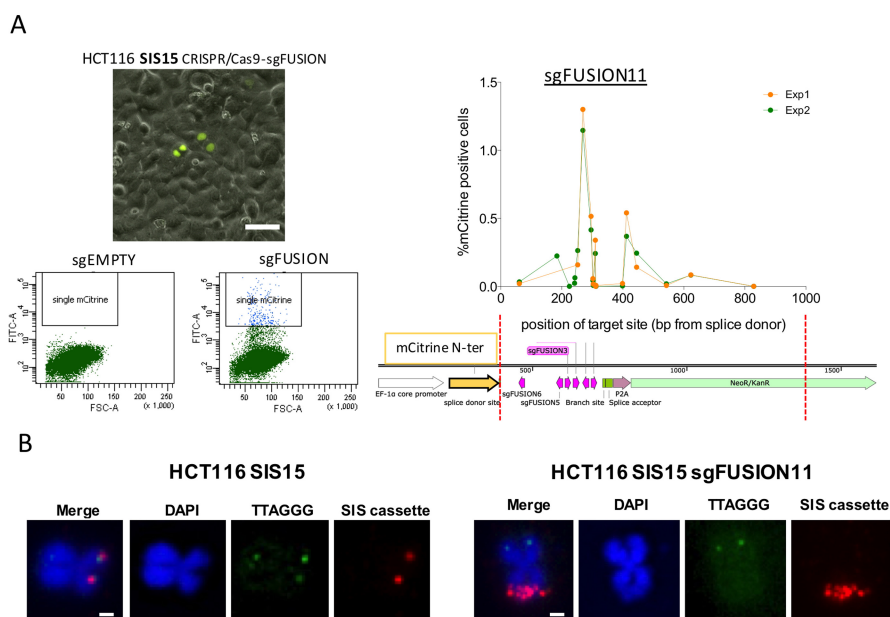


図 3. HCT116 SIS15 クローンにおける姉妹染色分体の融合と mCitrine 発現の誘導

(A) Flow cytometry による mCitrine 発現解析。HCT116 SIS15 株に mCitrine-N 末スプライシング配列下流 1 kb に渡る様々な部位を標的とした CRISPR/Cas9 を発現させ、6 日後に mCitrine を発現している細胞の割合を FACS AriaIII によって解析した。左上は mCitrine 陽性細胞の顕微鏡写真。スケールバーは 100 μ m。右側のグラフは横軸がスプライシング配列を基準とした CRISPR/Cas9 の標的サイトの箇所を、縦軸が mCitrine 陽性細胞の割合を示している。2 回の独立した実験の結果を示す。(B) mCitrine 陽性細胞の染色体融合解析。HCT116 SIS15 及び sgFUSION11 によって mCitrine 陽性となった細胞を FACS AriaIII によってソーティングした細胞群を FISH 解析した。青は染色体、緑はテロメア、赤は DNA カセット。mCitrine 陽性細胞 (右) では DNA カセットの部位がテロメアを失い、姉妹染色分体が融合している。スケールバーは 1 μ m。

4. 姉妹染色分体融合の運命解析

以上の結果により姉妹染色分体の融合を mCitrine の発現によって捕捉することが可能であることが示されたため、All-in-one 顕微鏡を用いたライブセルイメージングを行い、mCitrine 陽性となった直後の細胞 (HCT116 SIS15 sgFUSION11) の運命を解析した。対照群としては、HCT116 SIS15 株に完全長の mCitrine をレトロウイルスで導入した細胞 (HCT116 SIS15 mCitrine) を用いた。mCitrine 陽性になった後 2 回の有糸分裂を経るまでの運命を解析した結果、HCT116 SIS15 mCitrine 細胞群、HCT116 SIS15 sgFUSION11 細胞群共に、20% 程度の細胞が細胞周期停止などの異常を示した (図 4)。しかしながら、対照群と比較して HCT116 SIS16 sgFUSION11 は有意な異常表現型の増加を示さず、少なくとも 2 回の有糸分裂を一見正常に経過することがわかった (図 4)。この結果は、融合した姉妹染色分体が細胞周期停止や細胞死などの表現型を伴わず、次世代の細胞に継承されていることを示唆している。

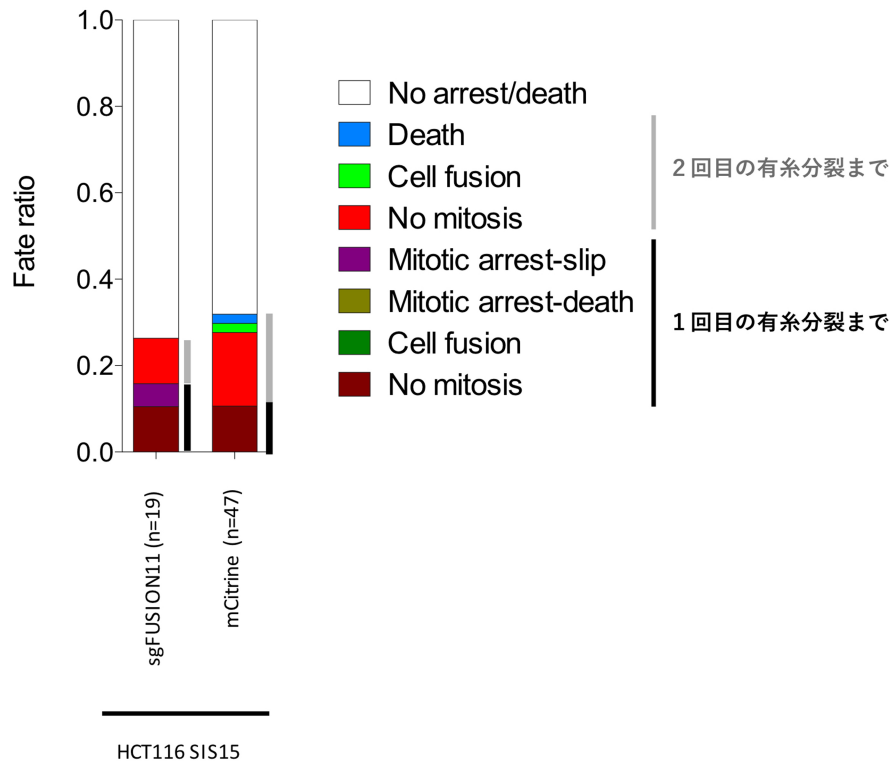


図 4. mCitrine 陽性細胞の細胞運命解析

HCT116 SIS15 クローンに CRISPR/Cas9-sgFUSION11 を発現させ、mCitrine 陽性となった直後の細胞周期をライブセルイメージングによって解析した。1 回目の有糸分裂まで、及び 1 回目から 2 回目の有糸分裂までに表示された各異常が起きたものの割合を示した。ほとんどの細胞は明らかな異常を示さずに 2 回目の有糸分裂を終了した。

5. 今後の展望

黄色蛍光タンパク質 mCitrine と青色蛍光タンパク質 mCerulean3 は同じタンパク質から派生した蛍光タンパクで、同じ N 末配列を持つ。これを利用し、HCT116 SIS15 株を宿主株として、さらに異なる染色体末端近傍に mCerulean3 の C 末を挿入する予定である。これによって姉妹融合による mCitrine 発現に加えて、異なる染色体末端が融合した際には mCerulean3 を発現するシステムの構築を行う。

本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Ishikawa F. Telomere crisis, the driving force in cancer cell evolution. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;230(1):1-6. doi: 10.1006/bbrc.1996.5928. PubMed PMID: 9020020
- 2) Hayashi MT, Cesare AJ, Rivera T, Karlseder J. Cell death during crisis is mediated by mitotic telomere deprotection. *Nature.* 2015;522(7557):492-6. doi: 10.1038/nature14513. PubMed PMID: 26108857
- 3) Mateos-Gomez PA, Gong F, Nair N, Miller KM, Lazzarini-Denchi E, Sfeir A. Mammalian polymerase θ promotes alternative NHEJ and suppresses recombination. *Nature.* 2015;518(7538):254-7. doi: 10.1038/nature14157. PubMed PMID: 25642960