

令和元年6月19日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07137

研究課題名(和文) iPS細胞誘導によるクローン性を利用したドライバーおよびパッセンジャー変異の検出

研究課題名(英文) Compilation of somatic mutations using the clonality of iPS cells

研究代表者

岡村 浩司 (OKAMURA, Kohji)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部・室長

研究者番号：80456194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：がんは多くの体細胞変異を保持し、また増殖にしたがって新規な変異を蓄積してゆく。これらはがん化に関わったドライバー変異とは異なり、細胞の生存とは関わらないパッセンジャー変異と呼ばれ区別される。がんの予防や治療には前者を同定することが重要であるが、診断、予後予測などにおいては後者の検出も軽視できない。本研究ではDNA修復関連遺伝子に変異を持つ患者の細胞からiPS細胞を樹立、全エクソーム解析を行い、親株との塩配列比較を行い変異を検出した。その結果、パッセンジャー変異の種類、多寡、周辺配列、内在性遺伝子のレトロトランスポジション頻度に、病変変異遺伝子それぞれの機能に依存した特徴的な違いが観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ドライバー変異とパッセンジャー変異の識別は困難で、多くの手法が提案されているがどれも予測にとどまる。また、低頻度の体細胞変異の検出にはかなりのシーケンシング量が要求されるという問題がある。本研究は、モザイク性とクローン性に着目し、上記2問題を解決するユニークでかつ強力な手法となった。がんは部位によって分類されていたが、関与する遺伝子で分類すべきである。またがんは変異群のプロファイリングによっても分類され、真のパッセンジャー変異を区別することで、いずれはドライバー変異との関係も明確になると期待され、これらの成果はがんの発生機序の理解から撲滅へと発展しうる、社会的にも意義深いものである。

研究成果の概要(英文)：Somatic mutations in cancers are either driver or passenger mutations. While a driver is within a gene that promotes cancer development, passengers are caused by its malignancy. It is important to identify a driver from an enormous number of mutations to understand the carcinogenesis. Because knowing patterns of passengers is also helpful in diagnose, prognosis, and treatment, methods to distinguish them are required. Unlike hereditary mutations, somatic mutations are usually buried in bulk and hard to be detected. Here, we established iPS cell lines from patients with DNA repair-deficient diseases, in which the causative germline mutation was employed as the driver, and performed whole-exome analyses. Making use of the clonality, we demonstrated a way to discriminate the two types of mutations and found discrete features of mutations in ATM-, XPA-, and ERCC2-deficient cells, respectively, in terms of number, size, sequence context, and retrotransposition.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：iPS細胞 色素性乾皮症 XPA ERCC2 ドライバー変異 パッセンジャー変異

## 1. 研究開始当初の背景

がん細胞は塩基置換に限らず規模の大きな構造変異も含め、多くの体細胞変異を保持しており、また増殖に従って新規な変異を蓄積してゆく。これらは、がん化に関わるドライバー変異とは異なり、細胞の増殖や生存とは関わりがないものがほとんどでパッセンジャー変異と呼ばれ区別される。がんの発生機序を理解し、予防や治療、創薬に役立てるために多数の体細胞変異からドライバー変異を同定することが重要となるが、診断、変異パターンのプロファイリングからがんの識別、免疫療法、予後予測などにおいてはパッセンジャー変異の検出も軽視できない。つまり両者を区別して検出することががん研究の一つの課題となっている。

次世代シーケンサの登場以来、ゲノムまたは転写産物の塩基配列に関しては、これまでとは比較にならないほど大規模なデータが得られるようになり、変異の検出効率も格段に上がった。ドライバー変異とパッセンジャー変異を区別する新しい手法が数多く試され、例えば、遺伝子の機能を比較 (Reva et al. *Nucleic Acids Res.* **39**, e118, 2011)、既知変異データを利用した機械学習 (Tan et al. *Bioinformatics* **28**, 2948, 2012)、アミノ酸置換による効果や遺伝病に見られる変異との比較 (Gonzalez-Perez et al. *Nat. Methods* **10**, 723, 2013)、転写産物の発現量の比較 (Lee et al. *PNAS* **109**, 929, 2012)、各変異の頻度を比較 (Lawrence et al. *Nature* **499**, 214, 2013) などの方法が報告されている。しかし、これらの手法は検出された個々の変異に対して予測するに過ぎず、そもそも体細胞変異は、遺伝病に見られる変異とは異なり、サンプルとして扱われる組織中に存在する割合がきわめて低く、検出自体に困難な問題を抱えている。がん化した細胞は増殖を繰り返し、その個々の細胞それぞれが全く独立して次々とパッセンジャー変異を生み出ししており、遺伝学的にはモザイクであることを忘れてはならない。

## 2. 研究の目的

再生医療の実現を視野にヒト iPS 細胞の樹立および継代におけるゲノム塩基配列の変異を調べている際、親株のモザイク性と iPS 細胞誘導におけるクローン性を利用することで、がんの要因となるドライバー変異、そしてその後生ずるパッセンジャー変異を区別して検出することが可能であることに気づいた。本研究ではそれら体細胞変異を識別するため、DNA 修復に関わる遺伝子に損傷を持つ疾患をモデルとし、患者の細胞から iPS 細胞株を樹立、全エクソーム解析を行うことでこの識別法を実証する。また、パッセンジャー変異群のプロファイリングを行い、ドライバー変異が生じた遺伝子の機能との関連を考察することで遺伝子に基づいたがんの分類を行い、発生機序の理解から予防、診断、治療、創薬へとつながる基盤研究を行う。

## 3. 研究の方法

JCRB 細胞バンクから毛細血管拡張性運動失調症および色素性乾皮症の患者線維芽細胞株 AT1OS, XP3OS, XPEMB-1, XP40OS を、およびコントロールサンプルとして健常者月経血からの細胞株 Edom22 を取得した。これらに対し、センダイウイルスによる OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC の発現により iPS 細胞株を樹立した。親株、iPS 細胞株からゲノム DNA を抽出、非翻訳領域や長鎖非翻訳 RNA 領域を含むおよそ 80 Mb をカバーする全エクソーム解析のライブラリを作成し、Illumina HiSeq プラットフォームによりペアエンドにてシーケンシングを行なった。データは INSDC に DRP001084, SRP058607, SRP059858 として登録し、公開している。

FASTQ データはアダプタ配列や低品質塩基のトリミングを行なった上で、デコイ配列を含むヒトゲノム参照配列にマッピングを行なった。サンプルごとに BAM を作成し、PCR 重複リードの除去、既知挿入欠失部位周辺のリアライメントを行い、所属研究所が以前取得した健常者データとともにヴァリエントコールを行なった。

各サンプルについて全エクソーム解析に加え、Illumina HumanCytoSNP-12 を用いた SNP タイピングにより、構造変異、コピー数多型、片親性ダイソミーなども調べ、コールされたヴァリエントのうち、これら構造変異に依存して検出されたものは今回の解析対象から排除した。マイクロアレイのデータは NCBI GEO に GSE47498, GSE55520 として登録し、公開している。

ドライバー変異に相当する常染色体劣性遺伝の原因変異が親株と iPS 細胞株の両方に見られることを確認し、パッセンジャー変異に相当する体細胞変異については、両細胞株の比較により検出し、その特徴を調べる。体細胞変異は、塩基置換、挿入および欠失、構造変異、内在性遺伝子のレトロトランスポジションを対象とした。

#### 4. 研究成果

毛細血管拡張性運動失調症サンプル AT10S からは、既知の原因遺伝子 *ATM* においてスプライシングのドナー部位にホモ変異が見つかった。色素性乾皮症サンプル XP3OS および XPEMB-1 からは、既知の原因遺伝子 *XPA* においてスプライシングのアクセプター部位に同一のホモ変異が見つかった。色素性乾皮症サンプル XP40OS については、相補性群 C の可能性が指摘されていたが、原因遺伝子として知られている *XPC* に病因変異は見られなかった一方、相補性群 D の原因遺伝子とされる *ERCC2* に複合ヘテロ変異があることが確認された。変異の一つは報告のある塩基置換 rs758439420 で、もう一方は翻訳領域の一部とスプライシングのドナー部位に渡る 23 塩基欠失であった。これらの変異は全て、親株と iPS 細胞の両方に検出された。

一方、親株と iPS 細胞株との比較から多くのゲノム塩基配列の相違が検出された。当初、これらはリプログラミングや長期に渡る細胞培養によって生じた新規変異であると考えられたが、親株にすでに存在し、バルクで観察するために隠されていた体細胞変異が、細胞クローニングの過程を経て顕著に検出されるようになったものであることが明らかになってきた。つまり、サンプリング前から患者の身体の中で発生し蓄積されていた体細胞変異が、単一細胞解析を行わなくても、iPS 細胞のクローン性を利用することであたかも生殖細胞系列の変異検出のように観察されていることになる。別々の細胞で生じた変異を網羅することはできないが、リプログラミングされたその細胞系列で生じた変異は全て漏らすことなく検出可能となる。

今回調べた 3 遺伝子 *ATM*, *XPA*, *ERCC2* それぞれのサンプルにおいて、きわめて特徴的な違いが観察された。DNA 二本鎖切断の認識に関わる *ATM* が機能しない場合、1 塩基置換ではなく、挿入欠失が多く、また大規模な構造変異も多発していた。親株から 4 つの iPS 細胞株を樹立させたが、*ATM* の変異を除き、株間で共通する体細胞変異は 1 つもなかった。一方、塩基除去修復に関わる *XPA* が機能しない細胞では、規模の大きな構造変異は 1 つも見られず、短い挿入欠失も有意に少なかったが、1 塩基置換の数が非常に多く、かつその大部分がジピリミジン配列の中で生じていた。塩基除去修復のためのヘリカーゼ活性を持つ *ERCC2* が機能しない細胞では、内在性遺伝子のレトロトランスポジションが多く観察された。

遺伝子のレトロトランスポジションは、プロセッシングを受けた通常の mRNA が、内在性トランスポゾンなどが持つ逆転写酵素により cDNA に変換され、ゲノム DNA 分子の中に組み込まれる現象である。多くの場合はイントロンを持つ遺伝子がスプライシングを受けるため、遺伝子座の大部分を占めるイントロンが除去された状態での転移であり、セグメントによる遺伝子重複とは明確に区別される。本研究は全エクソーム解析を検出手法とし、エクソーム配列のペイトによりゲノム DNA 断片を回収するため、レトロトランスポジションの検出に有効な方法であった。しかしゲノムのどこに挿入されたかについての情報は全エクソームデータから得るのは困難で、全ゲノム解析、できれば長いリード出力が得られるシーケンシングが必要となる。

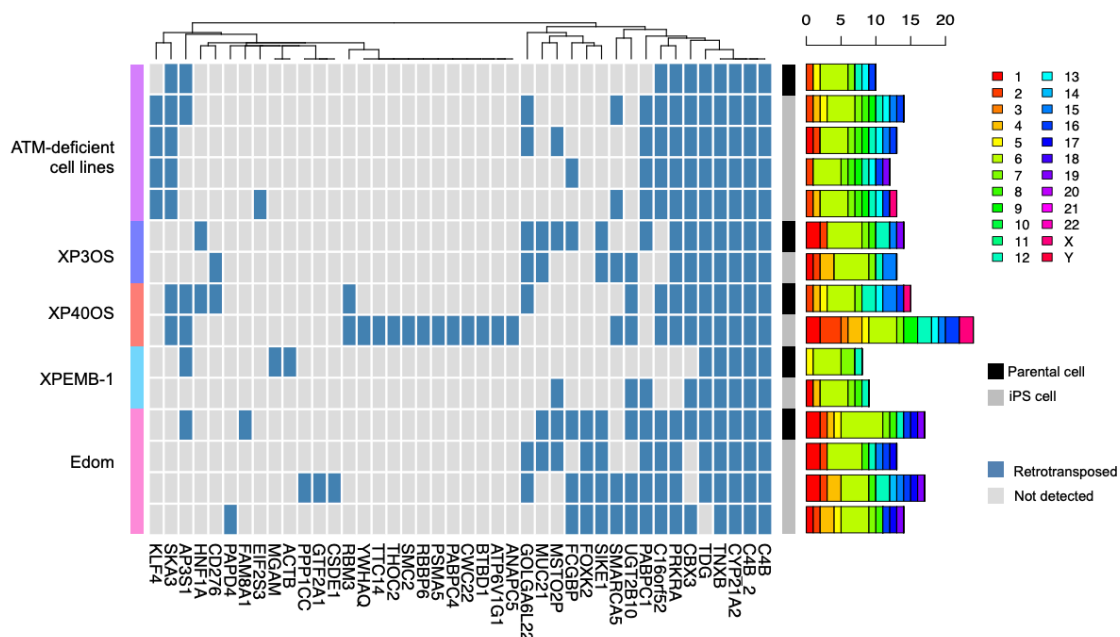


図 1. 各細胞株において検出された内在性遺伝子のレトロトランスポジション

これまでがんのドライバー変異とパッセンジャー変異を区別する手法が提案されていたものの、情報解析を駆使したもので、それらを明確に分けることは困難であった。今回、DNA修復に関わる遺伝子に損傷を持つ細胞をモデルに iPS 細胞のクローン性を利用して調べた結果、ドライバー変異とパッセンジャー変異に対応する両変異を、どのサンプルにおいても明確に区別することができた。さらにパッセンジャー変異、つまり体細胞変異は、その数、型、パターンにおいて、ドライバー変異に依存した特徴を示すことが分かった。このことは、パッセンジャー変異群のプロファイリングにより、ドライバー変異の同定や、その機能の推定ができる可能性を示唆し、将来的ながんの診断、識別、治療、予後予測、予防などに応用しうる知見が得られたと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 22 件) 全て査読あり

1. Transient multifocal genomic crisis creating chromothriptic and non-chromothriptic rearrangements in prezygotic testicular germ cells  
Hattori A, Okamura K, Terada Y, Tanaka R, Katoh-Fukui Y, Matsubara Y, et al.  
*BMC Med. Genomics* **12**, 77 (2019) DOI: 10.1186/s12920-019-0526-3
2. A novel *KMT2A-CTN2* fusion in infant B-cell acute lymphoblastic leukemia  
Yoshida M, Nakabayashi K, Ogata-Kawata H, Osumi T, Tsujimoto SI, Shirai R, Yoshida K, Okamura K, Matsumoto K, Kiyokawa N, Tomizawa D, Hata K, Kato M  
*Pediatr. Blood Cancer* (in press) (2019) DOI: 10.1002/pbc.27821
3. Whole transcriptome sequencing reveals a *KMT2A-USP2* fusion in infant acute myeloid leukemia  
Ikeda J, Shiba N, Tsujimoto SI, Yoshida M, Nakabayashi K, Ogata-Kawata H, Okamura K, Takeuchi M, Osumi T, Tomizawa D, Hata K, Kiyokawa N, Ito S, Kato M  
*Genes Chromosomes Cancer* (in press) (2019) DOI: 10.1002/gcc.22751
4. Novel *SIN3A* mutation identified in a Japanese patient with Witteveen-Kolk syndrome  
Narumi-Kishimoto Y, Araki N, Migita O, Kawai T, Okamura K, Nakabayashi K, et al.  
*Eur. J. Med. Genet.* (in press) (2019) DOI:10.1016/j.ejmg.2018.09.014
5. Clinical and molecular characteristics of *MEF2D* fusion-positive precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in childhood, including a novel translocation resulting in *MEF2D-HNRNPH1* gene fusion  
Ohki K, Kiyokawa N, Saito Y, Hirabayashi S, Nakabayashi K, Ichikawa H, Momozawa Y, Okamura K, Yoshimi A, Ogata-Kawata H, Sakamoto H, Kato M, et al.  
*Haematologica* **104**, 1, 128–137 (2019) DOI: 10.3324/haematol.2017.186320
6. Recurrent *RARB* translocations in acute promyelocytic leukemia lacking *RARA* translocation  
Osumi T, Tsujimoto SI, Tamura M, Uchiyama M, Nakabayashi K, Okamura K, et al.  
*Cancer Res.* **78**, 16, 4452–4458 (2018) DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0840
7. An unclassified variant of *CHD7* activates a cryptic splice site in a patient with CHARGE syndrome  
Katoh-Fukui Y, Yatsuga S, Shima H, Hattori A, Nakamura A, Okamura K, et al.  
*Hum. Genome Var.* **5**, 18006 (2018) DOI: 10.1038/hgv.2018.6
8. Protein-altering variants of *PTPN2* in childhood-onset Type 1A diabetes  
Okuno M, Ayabe T, Yokota I, Musha I, Shiga K, Kikuchi T, Kikuchi N, Ohtake A, Nakamura A, Nakabayashi K, Okamura K, Momozawa Y, Kubo M, Suzuki J, et al.  
*Diabet. Med.* **35**, 3, 376–380 (2018) DOI: 10.1111/dme.13566
9. Delayed degradation and impaired dendritic delivery of intron-lacking *EGFP-Arc* mRNA in *EGFP-Arc* transgenic mice  
Steward O, Matsudaira Yee K, Farris S, Pirbhoy PS, Worley P, Okamura K, et al.  
*Front. Mol. Neurosci.* **10**, 435 (2018) DOI: 10.3389/fnmol.2017.00435
10. Molecular characteristics of the *KCNJ5* mutated aldosterone-producing adenomas  
Murakami M, Yoshimoto T, Nakabayashi K, Nakano Y, Fukaiishi T, Tsuchiya K, Minami

- I, Bouchi R, Okamura K, Fujii Y, Hashimoto K, Hata KI, Kihara K, Ogawa Y  
*Endocr. Relat. Cancer* **24**, 10, 531–541 (2017) DOI: 10.1530/ERC-17-0117
11. Fetal therapy model of myelomeningocele with three-dimensional skin using amniotic fluid cell-derived induced pluripotent stem cells  
Kajiwara K, Tanemoto T, Wada S, Karibe J, Ihara N, Ikemoto Y, Kawasaki T, Oishi Y, Samura O, Okamura K, Takada S, Akutsu H, Sago H, Okamoto A, Umezawa A  
*Stem Cell Reports* **8**, 6, 1701–1713 (2017) DOI: 10.1016/j.stemcr.2017.05.013
  12. Potential roles of DNA methylation in the initiation and establishment of replicative senescence revealed by array-based methylome and transcriptome analyses  
Sakaki M, Ebihara Y, Okamura K, Nakabayashi K, Igarashi A, Matsumoto K, et al.  
*PLOS ONE* **12**, 2, e0171431 (2017) DOI: 10.1371/journal.pone.0171431
  13. ZNF384-related fusion genes consist of a subgroup with a characteristic immunophenotype in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia  
Hirabayashi S, Ohki K, Nakabayashi K, Ichikawa H, Momozawa Y, Okamura K, et al.  
*Haematologica* **102**, 1, 118–129 (2017) DOI: 10.3324/haematol.2016.151035
  14. Genome-wide multilocus imprinting disturbance analysis in Temple syndrome and Kagami-Ogata syndrome  
Kagami M, Matsubara K, Nakabayashi K, Nakamura A, Sano S, Okamura K, et al.  
*Genet. Med.* **19**, 4, 476–482 (2017) DOI: 10.1038/gim.2016.123
  15. Targeted DNA demethylation *in vivo* using dCas9–peptide repeat and scFv–TET1 catalytic domain fusions  
Morita S, Noguchi H, Horii T, Nakabayashi K, Kimura M, Okamura K, Sakai A, et al.  
*Nat. Biotechnol.* **34**, 10, 1060–1065 (2016) DOI: 10.1038/nbt.3658
  16. *In vivo* maturation of human embryonic stem cell-derived teratoma over time  
Akutsu H, Nasu M, Morinaga S, Motoyama T, Honma N, Machida M, Yamazaki-Inoue M, Okamura K, Nakabayashi K, Takada S, Nakamura N, Kanzaki S, Hata K, et al.  
*Regen. Ther.* **5**, 31–39 (2016) DOI: 10.1016/j.reth.2016.06.003
  17. *NR0B1* frameshift mutation in a boy with idiopathic central precocious puberty  
Shima H, Yatsuga S, Nakamura A, Sano S, Sasaki T, Katsumata N, Suzuki E, Hata K, Nakabayashi K, Momozawa Y, Kubo M, Okamura K, Kure S, Matsubara Y, et al.  
*Sex. Dev.* **10**, 4, 205–209 (2016) DOI: 10.1159/000448726
  18. Complex genomic rearrangement within the *GNAS* region associated with familial pseudohypoparathyroidism type 1b  
Nakamura A, Hamaguchi E, Horikawa R, Nishimura Y, Matsubara K, Sano S, Nagasaki K, Matsubara Y, Umezawa A, Tajima T, Ogata T, Kagami M, Okamura K, Fukami M  
*J. Clin. Endocrinol. Metab.* **101**, 7, 2623–2627 (2016) DOI: 10.1210/jc.2016-1725
  19. Distinctive features of single nucleotide alterations in induced pluripotent stem cells with different types of DNA repair deficiency disorders  
Okamura K, Sakaguchi H, Sakamoto-Abutani R, Nakanishi M, Nishimura K, et al.  
*Sci. Rep.* **6**, 26342 (2016) DOI: 10.1038/srep26342
  20. Human genetic variation database, a reference database of genetic variations in the Japanese population  
Higasa K, Miyake N, Yoshimura J, Okamura K, Niihori T, Saitsu H, Doi K, et al.  
*J. Hum. Genet.* **61**, 6, 547–553 (2016) DOI: 10.1038/jhg.2016.12
  21. Lists of HumanMethylation450 BeadChip probes with nucleotide-variant information obtained from the phase 3 data of the 1000 genomes project  
Okamura K, Kawai T, Hata K, Nakabayashi K  
*Genom. Data* **7**, 67–69 (2016) DOI: 10.1016/j.gdata.2015.11.023
  22. Complete genome sequence of the mitochondrial DNA of the sparkling enope squid, *Watasenia scintillans*  
Hayashi K, Kawai YL, Yura K, Yoshida MA, Ogura A, Hata K, Nakabayashi K, Okamura K  
*Mitochondrial DNA* **27**, 3, 1842–1843 (2016) DOI: 10.3109/19401736.2014.971251

[学会発表] (計 8 件)

1. 深層学習および線形分類を利用したトランススプライシングに関わる塩基配列の探索  
片桐 沙弥, 片桐 沙紀, 青砥 早希, 西野 光一郎, 岡村 浩司  
第 41 回日本分子生物学会年会 2P-0170 (2018 年 11 月 29 日) パシフィコ横浜
2. 細胞をリプログラミングすることで明らかにできた MMP ファミリーの遺伝子発現機構  
片桐 沙紀, 高澤 建, 由良 敬, 堀家 慎一, 西野 光一郎, 岡村 浩司  
第 41 回日本分子生物学会年会 2P-0138 (2018 年 11 月 29 日) パシフィコ横浜
3. オリゴヌクレオチドの位置関係と CNN を利用したプロモーター配列の解析  
青砥 早希, 岡村 浩司  
第 41 回日本分子生物学会年会 1PW1-12-3/2P-0169 (2018 年 11 月 28 日) パシフィコ横浜
4. Noonan 症候群様症状を示す一卵性双生児の全ゲノム解析  
青砥 早希, 岡村 浩司, 右田 王介, 高田 史男, 中林 一彦, 秦 健一郎  
第 40 回日本分子生物学会年会 3P-0525/4P2T18-02 (2017 年 12 月 09 日) 神戸国際会議場
5. ゲノム塩基配列における特定塩基長の頻度情報を利用した深層学習による種分類  
片桐 沙紀, 岡村 浩司  
第 40 回日本分子生物学会年会 3P-0524/4P2T18-01 (2017 年 12 月 09 日) 神戸国際会議場
6. 深層学習を利用したトランススプライシングに関わるゲノム領域の探索  
片桐 沙弥, 片桐 沙紀, 西野 光一郎, 岡村 浩司  
第 40 回日本分子生物学会年会 1P-0794 (2017 年 12 月 06 日) 神戸国際展示場
7. ヒトおよびアカゲザル CpG アイランドプロモータの配列比較解析  
青砥 早希, 伏見 麻由, 由良 敬, 岡村 浩司  
第 39 回日本分子生物学会年会 2P-0158 (2016 年 12 月 01 日) パシフィコ横浜
8. ハイブリッドアセンブリによる健常日本人男性の全ゲノム配列決定  
岡村 浩司, 三浦 巧, 中林 一彦, 秦 健一郎, 佐藤 陽治, 梅澤 明弘  
第 39 回日本分子生物学会年会 1P-0006 (2016 年 11 月 30 日) パシフィコ横浜

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

1. 名称: 非破壊的な細胞解析方法  
発明者: 梅澤明弘, 岡村浩司, 柴田眞侑, 野中秀紀, 山田雅雄, 横田京子  
権利者: 国立研究開発法人成育医療研究センター, ロート製薬株式会社,  
株式会社グライコテクニカ  
種類: 特許  
番号: 特願 2019-024097  
出願年: 2019 年  
国内外の別: 国内
2. 名称: 細胞判定装置、細胞判別方法及びプログラム  
発明者: 西野光一郎, 新井良和, 梅澤明弘, 阿久津英憲, 岡村浩司, 堀家慎一, 犬塚博之  
権利者: 国立大学法人宮崎大学, 国立研究開発法人成育医療研究センター,  
国立大学法人金沢大学, 国立大学法人東北大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2019-034684  
出願年: 2019 年  
国内外の別: 国内

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。