

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570231

研究課題名（和文） 南米全域のモンゴロイド系先住民族における遺伝的差異の比較解析

研究課題名（英文） Comparative genetical analysis among South American indigenous populations.

## 研究代表者

檀上 稲穂 (DANJO INAHO)

独立行政法人理化学研究所・細胞材料開発室・協力研究員

研究者番号：30415228

## 研究成果の概要（和文）：

南米全土の純粋な先住民族 2,500 個体より採取した末梢血単核球検体について、Epstein-Barr ウイルスを用いて 550 個体分の B 細胞株（EBV-B 細胞）を樹立し、南米各部族の遺伝的特徴の解明と部族間類縁関係の解析を実施した。人類遺伝学的解析に先立ち、アレイ CGH 解析を行い EBV-B 細胞の樹立過程および長期培養時のゲノム安定性を確認できた。人類遺伝学的解析として、性による影響を排除するために常染色体マイクロサテライト 8 領域を用いて地理的な位置関係に基づいて南米全土を 5 グループに分類し、各グループ間で遺伝的特徴に差異があることを明らかにできた。

## 研究成果の概要（英文）：

We established B lymphoblastoid cell lines (EBV-B cell) from peripheral blood mononuclear cell stocks obtained from 550 South American indigenous individuals. We performed analysis of genetical relationships among tribes to make clear the migration rout of mongoloid populations from Eurasia to South America. Before starting genetical analysis, we checked the genomic stability of EBV-B cells during establishment and long-term culture periods, and showed that the cells retain stable genome structures by genetical studies. For the genetical analysis, samples were divided into 5 groups according to the geographical location, and then figured out the genetical features with forensic microsatellite markers. The results showed that each group retained smaller heterogeneity and specific allele frequency patterns for each microsatellite locus. These results suggest that Amerind populations are not so homogenous as a whole but can be divided into some genetically-diverse groups.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	0	0	0
2009年度	0	0	0
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：人類遺伝学

科研費の分科・細目：人類学・応用人類学

キーワード：(1) 南米 (2) 先住民族 (3) 少数民族 (4) B-LCL (5) B細胞株  
(6) ゲノム解析 (7) マイクロサテライト (8) アレイ CGH

## 1. 研究開始当初の背景

鹿児島大学 園田俊郎教授 (2005年に退官) と愛知がんセンター 田島和雄研究所長らは成人 T リンパ球白血病ウイルス (HTLV-1 および HTLV-2) の疫学調査のために、20 年以上の年月をかけて世界中の純血の少数民族約 3,500 個体から血液サンプルを採取した。この中には、サンプル採取後に滅亡した民族や部族も含まれており、質・量ともに、同等のサンプルは二度と採取することができない世界的にも貴重かつ希少なコレクションである。このコレクションでは特に南米のサンプルが充実しており、南米先住民族の人類遺伝学的研究にも利用しうる汎用性の高いものとなっている。田島博士らはこのコレクションについて、部族ごとの HTLV-1 および HTLV-2 感染率を解析し、少なくとも 2 系統の祖先モンゴロイドが別個に南米に移動したという仮説を提唱した (Fujiyoshi et al., *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 15(14), 1235-1239, 1999)。

2005 年の園田博士の退官に伴い、このコレクションは鹿児島大学から本課題実施者の所属研究室に譲渡された。コレクションの実体は未培養の末梢血単核球で、各サンプルの総細胞数は  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^7$  程度であり、そのままでは有限の遺伝資源であった。本課題実施者は人類学的解析を行うために、Epstein-Barr Virus を用いて 5 年間かけて 500 個体分の B 細胞株 (EBV-B 細胞株) を樹立した。EBV-B 細胞株は正常なゲノム構造を安定に保つと考えられており、様々な研究分野の遺伝子解析研究に用いられている。しかし、ゲノム構造が安定であると考えられてきた根拠は、染色体 G バンド解析における染色体像や特定の遺伝子領域が正常に保たれているというものであり、高解像度で網羅的なゲノム解析は未だ行われていなかった。最近、継代数を経た EBV-B 細胞株において染色体数の不安定性が報告されており、EBV-B 細胞株のゲノム安定性を精査する必要があると考えた。

南米先住民族の人類学的解析においては、ミトコンドリア・ゲノム DNA の多型を利用した比較解析が進む一方で、Y 染色体多型領域の解析はミトコンドリア解析ほどには進行していないように思われる。本課題実施者は、解析を行うにあたり性によるバイアスを極力排除したいと考え、常染色体上のゲノム領域を対象にすることを計画した。本課題実施者の所属研究室では樹立した EBV-B 細胞株について法医学的マーカーを用いた個体識別検査を行い細胞の取り違えの無いことを確認しており、その過程で多型頻度に部族間における差

異が検出されていた。このことから、解析に用いるマイクロサテライトマーカーの候補として、法医学的マーカーを考えた。法医学的マーカーは、高い識別能から人類学的解析に用いられてきた実績があるが、人種や民族によるバイアスなども知られており、南米コレクションの解析に対する有効性および適切な検体数など、十分に検討されているとはいえない状況であると本課題実施者は考えた。

## 2. 研究の目的

EBV-B 細胞株は正常なゲノム構造を安定に保つと考えられており、様々な研究分野の遺伝子解析研究に用いられている。しかし、ゲノム構造が安定であると考えられてきた根拠は、染色体 G バンド解析における染色体像や特定の遺伝子領域が正常に保たれているというものであり、高解像度で網羅的なゲノム解析は未だ行われていないことから、本研究では EBV-B 細胞株のゲノム構造を詳細に解析し、EBV-B 細胞株が人類遺伝学的研究に適したゲノム安定性を保持するかどうかについて明らかにすることを目的とした。

南米先住民族の人類学的解析においては、ミトコンドリア・ゲノム DNA の多型を利用した比較解析が進む一方で、Y 染色体多型領域の解析はミトコンドリア解析ほどには進行していないように思われた。本研究では、常染色体上のマイクロサテライト多型を解析することで、性によるバイアスを極力排除した類縁関係の特定を目指した。

## 3. 研究の方法

以下の方法を用いて本研究を進めた。

### (1) 高密度マイクロアレイを用いたゲノムリアレンジメントの解析

EBV-B 細胞株のゲノムが安定であると考えられてきた根拠の一つに、染色体 G バンド解析において異常を検出しないという実験結果がある。そこで、マイクロアレイ解析を開始するに先立ち染色体 G バンド解析を行い、従来の染色体解析ではゲノムのリアレンジが検出されないことを確認した。

ゲノム DNA のリアレンジメント解析を行うための方法として、DNeasy Blood and Tissue kit (キアゲン) にて細胞からゲノム DNA を抽出し、SurePrint G3 Human CGH 2x400K アレイ (ゲノム 40 万カ所、アジレントテクノロジー) を用いて比較ゲノム解析 (Comparative Genome

Hybridization;アレイ CGH)のためのデータを取得した。個体間でゲノム領域のコピー数多型 (copy number variation) のあることが知られており、別個体の末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell; PBMC) をコントロールとして使用することができないことから、EBV-B 細胞株検体に対して同一個体の PBMC をコントロールとして用いた。得られたデータについて Genomic Workbench 解析ソフトウェア (アジレントテクノロジー) を用いて比較解析を行い、EBV-B 細胞株樹立過程におけるゲノム DNA のリアレンジメントを明らかにした。本研究では、10 株の EBV-B 細胞株についてアレイ CGH 解析を行った。

また、継代数を経た (30 継代程度) EBV-B 細胞株のゲノム DNA について、同様にアレイ CGH データを取得し、長期培養におけるゲノム安定性についても解析を行った。南米コレクションにはこのような古い EBV-B 細胞株がまだ無いため、申請者が以前に樹立し継代ごとに凍結保存しておいた日本人由来 EBV-B 細胞株を材料として使用した。この実験においても、PBMC コントロールは同一個体由来のものを使用した。

#### (2) 部族間・民族間における人類学的解析

本研究では、常染色体上マイクロサテライトマーカーとして法医学的マーカーを用いた。法医学的マイクロサテライトとして、D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA の 15 領域について多型データを取得した。マイクロサテライト領域の増幅には AmpF1STR Identifiler キット (アプライドバイオシステムズ) を使用し、310 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ) および 3130 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ) によるキャピラリー電気泳動を行い増幅された各領域の DNA フラグメント長を測定した。DNA フラグメント長の数値化およびマイクロサテライト繰り返し回数算出には GeneMapper ID ソフトウェア (アプライドバイオシステムズ) を用いた。マイクロサテライトデータを用いた人類遺伝学的解析には PHYLIP, DISPAN, Arlequin, PowerStat の各フリーソフトウェアを用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) EBV-B 細胞株樹立過程におけるゲノムリアレンジメント (Danjoh et al., 2011; Danjoh et al., 2012)

EBV-B 細胞株の樹立過程におけるゲノムリアレンジメントの有無を調べるために、継代数 15 程度の南米 10 検体についてアレイ CGH 解析を行った結果、全ての EBV-B 細胞株において Immunoglobulin (Ig) gene cluster 領域の欠

失および T cell receptor (TCR) 領域の増幅が認められた (図 1 パネル上)。Ig gene cluster は B リンパ球の分化過程でリアレンジメントが生じる領域であることから、EBV-B 細胞株で検出されたこの領域のリアレンジメントは樹

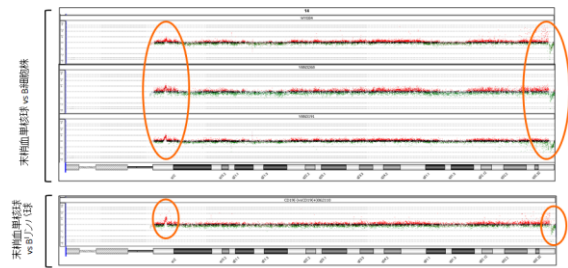


図1 B細胞株におけるゲノム安定性の解析(染色体の核型分析)

立以前に既に保持していたものであると考えられた。そこで、PBMC から B リンパ球を分画し PBMC をコントロールとして同様にアレイ CGH 解析を行ったところ、EBV-B 細胞株と同様の欠失パターンが認められた (図 1 パネル下)。また、TCR 領域の増幅に関しては、EBV-B 細胞

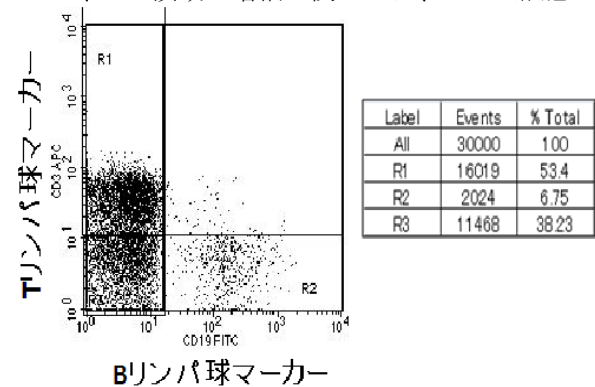


図2 PBMCのFACS解析

株での増幅ではなく PBMC の中で T リンパ球の割合が高くコントロールにおいてこの領域のコピー数が減少しているため比較解析の結果として相対的にコピー数が増加している可能性が高いと考えられた。この可能性を検証するために FACS 解析を行ったところ PBMC 中の T リンパ球の比率は約 50% であり (図 2)、TCR 領域の増幅はこのためであることが示された。EBV-B 細胞株の樹立過程で生じたと考えられるゲノムリアレンジメントは 4 カ所検出され、従来考えられていたように、EBV-B 細胞株は安

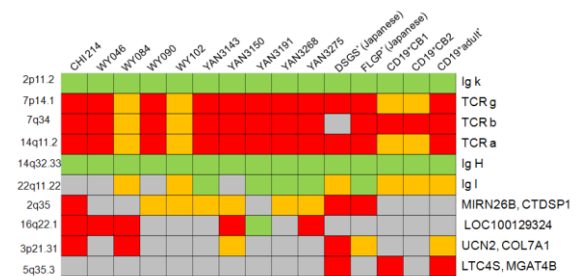


図3 検出されたゲノムリアレンジメントのまとめ

定したゲノム構造を保持することが明らかになった (図3)。

(2) 長期培養における EBV-B 細胞株のゲノム安定性 (Danjoh et al., 2013)

上記の研究結果から、EBV-B 細胞株の樹立過程におけるゲノムリアレンジメントはごく少数であることが確認されたことから、長期間 (30 継代程度) 継代した細胞株についても上記と同様にアレイ CGH 解析を行い、ゲノム安定性を解析した。

解析した 3 株中 1 株において、16 継代以上の細胞集団で 4 番染色体全域に渡る増幅が検出された (図4)。核型解析でこの細胞集団では 4 番染色体トリソミーが確認された (図5)

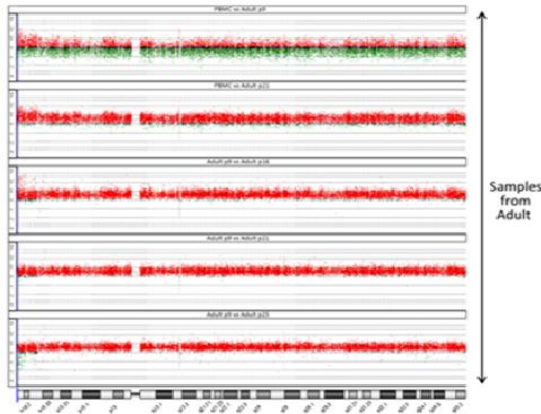


図4 長期培養におけるゲノムリアレンジメント

ことから、アレイ CGH で検出された 4 番染色体全域に渡る増幅は染色体数の増加であることが明らかになった。アレイ CGH 解析では、4 番染色体以外の領域では大きなゲノムコピー

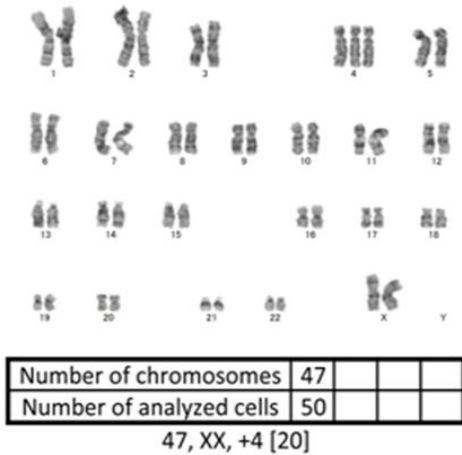


図5 核型解析

数の変化が検出されなかったことから、この変化が長期間の培養によるランダムな変異の蓄積の結果であるのかを確認するために、継代数の少ない EBV-B 細胞株と継代数を経た細胞集団について、V(D)J リコンビネーションパターンによる細胞クローンの解析を行った。

B リンパ球は成熟の過程で Ig heavy chain

を構成する V (40 遺伝子), D (6 遺伝子), J (25 遺伝子) の各遺伝子クラスターでリアレンジメントが生じ、最終的に各々1つずつの遺伝子が連結された V(D)J 配列がゲノム上に再構成される。各遺伝子はランダムに選択されることから、再構成された V(D)J 配列の長さは B リンパ球クローンにより異なる。従って、V(D)J 配列の長さを調べることで、B リンパ球クローンの異同を知ることができる。4 番染色体数に変化の無い継代数の低い細胞集団および 4 番染色体トリソミーとなった細胞集団について V(D)J リコンビネーション解析を行ったところ、両者は異なる B リンパ球由来であることが明らかになった (図6)。この結果は、1 種類の EBV-B 細胞株で認められた長

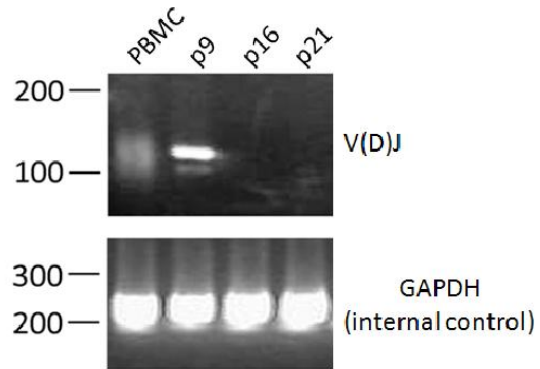


図6 V(D)Jリコンビネーション解析

期培養に伴うゲノム不安定性は新規突然変異の蓄積によるものではなく、細胞クローンの置換であることを示しており、細胞クローニングなどによりゲノム構造異常を持つ細胞集団を排除し正常なゲノム構造を持つクローンを維持できる可能性を示唆している。

(3) 部族間・民族間における人類学的解析 (論文投稿準備中)

本研究では、部族間の類縁関係を解析することにより南米先住民族の遺伝的特徴を明らかにすることを旨とした。まず、データ取得した 15 領域のうち D5S818, D7S820, D13S317, D16S539, CSF1PO, TH01, TPOX, vWA の 8 領域と比較的少数の検体を用いて予備的な解析を行った。この予備的な解析では、詳細な類縁関係を解析する前段階として、南米を地理的に近い 5 つの地域に分け、ある程度検体数を揃えて、各地域において遺伝的特徴および類縁関係について検討した。地域設定と内訳は、ベネズエラ (46 個体)・コロンビア (26 個体)・エクアドル (40 個体)・ボリビア (24 個体)・チリ (42 個体) とした (図7)。このグループ設定において、各集団内での Heterogeneity の傾向を知るために、各マイクロサテライト領域における総アレル数を算出した。集団内での Heterogeneity が高くなると総アレル数は増加し、Heterogeneity が低くなると総アレル

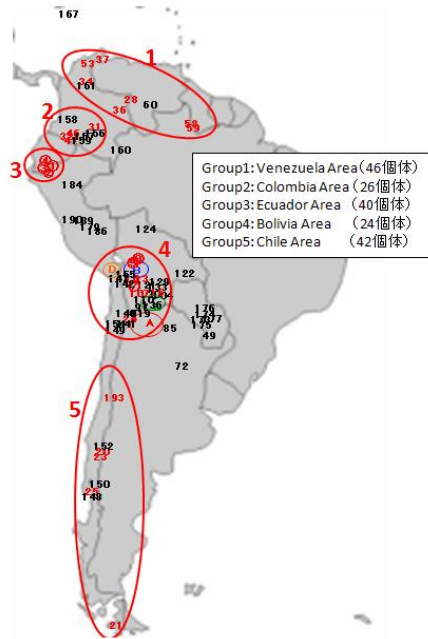


図7 地域設定と検体数

ル数は減少する。Heterogeneity を考える目安として、日本人集団（主に関東地方周辺が出身地と申告し、少なくとも親が欧米人ではない日本人 152 個体）についても総アレル数を

	Ven	Col	Ecu	Bol	Chi	All Am	Jap
D5S818	5	7	6	4	5	7	9
D7S820	7	5	6	4	6	7	8
D13S317	6	6	7	6	8	8	7
D16S539	6	6	8	6	5	8	7
vWA	4	5	6	4	6	6	7
TH01	3	4	5	3	5	5	6
TPOX	4	4	4	4	5	5	6
CSF1PO	6	5	6	5	7	8	7
Total	41	42	48	36	47	54	57

算出した。全マイクロサテライト領域の総アレル数は、南米全検体 (All Am) 54 アレルに対して日本人検体 (Jap) 57 と大きな差異は認められなかったが、グループごとの集計値では総アレル数は減少しており、グループごとに遺伝的特徴が異なることが示唆された (表1)。マイクロサテライトローカスごとにアレル頻度を算出したところ、総アレル数の結果と同様に、グループごとに各アレルの出現頻度が異なる

Locus:TH01	Venezuela(1)	Colombia(2)	Ecuador(3)	Bolivia(4)	Chile(5)	Japanese
Forensic						
Matching Probability	0.2731	0.2672	0.1763	0.3194	0.1338	0.1348
Expressed as 1 in ...	3.6618	3.7425	5.6738	3.1304	7.4746	7.4194
Power of Discrimination	0.7269	0.7328	0.8238	0.6806	0.8662	0.8652
PII	0.4992	0.4567	0.5997	0.4491	0.6697	0.6523
Paternity						
Power of Exclusion	0.2909	0.1139	0.2619	0.1875	0.4896	0.4242
Typical Paternity Index	1.2500	0.8333	1.1765	1.0000	1.9091	1.6522
Allele Frequencies						
Homozygotes	40.00%	60.00%	42.50%	50.00%	26.19%	30.26%
Heterozygotes	60.00%	40.00%	57.50%	50.00%	73.81%	69.74%
Total Alleles	90	50	80	48	84	304
Allele	Frequency					
6	51.11%	48.00%	43.75%	16.67%	35.71%	22.70%
7	37.78%	46.00%	33.75%	66.67%	25.00%	25.00%
8	0.00%	0.00%	2.50%	0.00%	2.38%	5.26%
9	0.00%	2.00%	2.50%	0.00%	8.33%	42.43%
9.3	11.11%	4.00%	17.50%	16.67%	28.57%	2.30%
10	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	2.30%

図8 アレル頻度の例

領域が見出された (図8)。これらの結果は、南米先住民族は地域ごとに特徴的な遺伝的背景を保持することを示唆しており、南米先住民族の全検体を用いて部族間の類縁関係を解析することの妥当性を示している。現在、マイクロサテライト15領域と南米の全検体を用いて、より詳細な類縁関係の解析が進行中である。

### 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)

- 1) I. Danjoh, R. Shirota, T. Hiroyama, Y. Nakamura; Dominant expansion of a cryptic subclone possessing an abnormal karyotype occurs in B lymphoblastoid cell lines during culture. *Cytogenetics and Genome Research*, 139, 88-96, 2013 (査読あり)
- 2) I. Danjoh, H. Sone, R. Shirota, T. Hiroyama, Y. Nakamura; Development of a robust method for establishing B cell lines using Epstein-Barr Virus. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 48, 393-402, 2012 (査読あり)
- 3) I. Danjoh, K. Saijo, T. Hiroyama, Y. Nakamura; The Sonoda-Tajima Cell Collection, a human genetics research resource with emphasis on South American indigenous populations. *Genome Biology and Evolution*, 3, 272-283, 2011 (査読あり)

[学会発表] (計 7 件)

- 1) I. Danjoh, Y. Nakamura; Development of a robust method for establishing B cell lines using Epstein-Barr Virus. 日本癌学会、札幌市、2012年9月19日-21日
- 2) I. Danjoh, R. Shirota, Y. Nakamura; Development of a robust method for establishing B cell lines using Epstein-Barr Virus. The American Society of Human Genetics Annual Meeting, San Francisco, USA, 2012年11月6日-10日
- 3) 檀上 稲穂、城田 涼子、中村 幸夫; Epstein-Barr virus を用いた B 細胞株樹立の効率に影響を与える因子の探索、日本分子生物学会、福岡市、2012年12月11日-14日
- 4) I. Danjoh, K. Saijo, M. Nagayoshi, Y. Nakamura; Genomic stability of B lymphoblastoid cell lines established

from the Sonoda-Tajima Cell Collection, the collection of South American indigenous populations. International Congress of Human Genetics, Montreal, Canada, 2011年10月11日-15日

- 5) 檀上稲穂、西條薫、永吉満利子、中村幸夫；南米モンゴロイド系先住民族コレクションより樹立した B 細胞株のゲノム安定性，日本人類学会、北海道伊達市、2010年10月1日-10月3日
- 6) I. Danjoh, K. Saijo, K. Fukami-Kobayashi, Y. Nakamura; Collection of peripheral blood mononuclear cells obtained from Amerindians and other Mongoloid minority groups. The American Society of Human Genetics Annual Meeting, Washington D.C. USA, 2010年11月2日-6日
- 7) 檀上稲穂、西條薫、永吉満利子、中村幸夫；南米モンゴロイド系先住民族コレクションより樹立した B 細胞株のゲノム安定性、日本分子生物学会、神戸市、2010年12月7日-10日

[図書] (計 4 件)

- 1) 檀上稲穂；がん細胞株・不死化細胞を用いた研究，目的別で選べる細胞培養プロトコール、pp40-45、中村幸夫編、羊土社、2012
- 2) 檀上稲穂；ゲノムインキュベーターとしての細胞を用いた研究，目的別で選べる細胞培養プロトコール、pp46-51、中村幸夫編、羊土社、2012
- 3) 檀上稲穂；B リンパ芽球様細胞株(B-LCL)－樹立培養方法および維持培養方法，目的別で選べる細胞培養プロトコール、pp176-186、中村幸夫編、羊土社、2012
- 4) K. Hiyama, E. Hiyama, I. Danjoh; Public databases useful for molecular diagnosis. Edited by Eiso Hiyama and Keiko Hiyama; Clinical application of molecular diagnosis in cancer, radiation effect, and human diseases; 21-34; Research Signpost Press, 2010

[その他]

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

檀上 稲穂 (DANJO INAHO)

独立行政法人理化学研究所・細胞材料開発室・協力研究員

研究者番号：30415228

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし