

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440254

研究課題名(和文) 南米モンゴロイド系先住民族の環境適応に関わるゲノム領域の探索

研究課題名(英文) Searching genomic region participating adaptation to environment

研究代表者

檀上 稲穂 (DANJOH, Inaho)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・講師

研究者番号：30415228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：南米先住民族の居住地は、標高4,000mを超える高原であったり、主食となる植物に毒性があるなど、他の大陸での定住よりも過酷な選択がかかっていると考えられる。このような環境適応を明らかにすることで、南米における人類の移動や定住のプロセスが明らかになると期待される。本研究では、南米先住民族の血液サンプルから樹立したB細胞株を用いてゲノム網羅的SNPデータを取得し、環境適応に関連する一塩基多型(SNP)およびコピー数多型(CNV)を探索した。その結果、環境要因と相関すると考えられるSNPをいくつか同定することができた。

研究成果の概要(英文)：Amerinds, indigenous people in South America, are Mongoloid originated from Eurasian continents. During the migration path from Eurasian continent to South American continent approx. twelve thousand years ago, they have adapted to harsh environments; mountainous area height over 40,000 meters, or lowland where people take poisonous crops for staple. These life styles suggest that people have been underwent some adaptive selection. Analysis of genomic polymorphisms relating to environmental adaptations may reveal migration path of ancestors of Amerinds during prehistoric era. As a result of analysis, we identified several candidate SNPs relating to acclimatization to altitude and detoxification.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：南米 先住民族 ゲノム コピー数多型 SNP 適応

## 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 年の園田教授の退官に伴い、このコレクションは鹿児島大学から本課題実施者の前所属である理化学研究所バイオリソースセンター細胞材料開発室に譲渡された。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。本課題報告者は、Epstein-Barr Virus を用いて 2005 年から 2010 年まで 5 年間かけて 29 部族由来 550 個体分の B 細胞株 (EBV-B 細胞株) を樹立した。



図1 樹立した細胞株の検体採取地域 (Danjoh et al., GBE, 2011)

一般に 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。細胞

株樹立を進めていた時点で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行われていなかった。一方で、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いたことから、本実施研究の前に、マイクロアレイを用いた比較ゲノム解析法 (Array Comparative Genome Hybridization; Array CGH) を用いて EBV-B 細胞株のゲノム安定性を詳細に解析し、細胞株樹立後も安定したゲノム構造を保持することを明らかにした (Danjoh et al., *Genome Biology and Evolution*, 3, 272-283, 2011; doi: 10.1093/gbe/evr014)。

EBV-B 細胞株のゲノム安定性が保持されることが確認できたことから、米先住民族の人類遺伝学的解析を行うために、樹立した全ての細胞株について、SNP アレイを用いて約 70 万箇所のゲノム網羅的 SNP データを取得した。本課題研究では、この SNP データを用いて解析を行うこととした。

## 2. 研究の目的

南米先住民族はモンゴロイド系人種で、氷河期末期の約 12,000 前に当時陸続きであったベーリング海峡を渡りアメリカ大陸に到達したと考えられている。南米先住民族の祖先がユーラシア大陸のどこに居住していたか、どの部族であったのかは、明らかではない。また、北米大陸への移動と南北アメリカに拡散したルート等は諸説あり、今後の解析が待たれる。

現在の南米先住民族の居住地は、標高 4,000m を超える高原であったり、主食となる植物に毒性があるなど、他の大陸での定住よりも過酷な選択がかかっていると考えられる。このような環境適応を明らかにすることで、南米における人類の移動や定住のプロセスが明らかになると期待される。本研究では、環境適応に関連するゲノム領域として一塩基多型 (SNP) およびコピー数多型 (CNV) を探索し、適応すべき環境として高地と毒性植物を摂取する低地を設定した。

これまでの報告者らの法医学的マーカーを用いた解析で、南米先住民族では部族内での Heterogeneity が低いことが明らかになっていた。また、一夫多妻など血縁関係も複雑である。これらのことから、環境適応に関わるゲノム領域の同定に先立ち、詳細な集団構造解析を行い、南米先住民族の各部族の遺伝的特徴を明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

以下の方法を用いて本研究を進めた。

(1) 検体、SNP データ

前述した南米先住民族由来の EBV-B 細胞株 550 個体分を本課題研究に使用した。細胞株の樹立に用いた生体試料は連結不可能匿名化済みで、検体に付随する情報は性別・年齢・検体採取地域名・部族名のみである。細胞株樹立前の検体および EBV-B 細胞株は全て、理化学研究所バイオリソースセンターが保有している。この細胞株からゲノム DNA を抽出し、イルミナ社製 OmniExpress でゲノム網羅的 SNP データを取得した。本課題研究では、細胞の培養、DNA 抽出、SNP データの取得などは行わず、既を取得した SNP データを用いて解析を進めた。研究開始の前に、本課題研究の遂行について東北大学医学系研究科倫理委員会の承認を受けた。

## (2) 血縁解析

部族集団内の血縁関係の解析には plink ソフトウェアを用いて血縁関係の推定を行った。SNP ジェノタイピング・データについて、検体のクオリティ・チェック (QC) として下記の条件を満たす検体を選択した。individual missing rate (imiss) < 0.05 and individual heterozygosity < 0.35。QC をパスした検体について、下記の条件を満たす SNP を選択した。Hardy-Weinberg Equilibrium test P-value > 0.05, minor allele frequency (MAF) > 0.05, missing data rate per locus (lmiss) < 0.01。QC をパスした検体・SNP について、Linkage Disequilibrium based SNP pruning は下記の条件で実施した；200 SNPs のウィンドウを 4 SNPs ずつスライドさせ、相関係数  $r^2 > 0.1$ 、または  $> 0.2$  で PI-HAT 値を算出した。血縁関係の推定は、南米検体全体および、部族ごとに分けて解析を行った。

## (2) 遺伝的構造解析

Admixture, Eigenstrat, MEGA6 の各ソフトウェアを用いて遺伝的構造解析および集団構造解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 血縁解析

本課題研究を開始する以前に法医学的マーカーを用いて行った予備的な遺伝的多様性解析から、南米検体は多様性の低いことが示唆されていた。本課題研究でゲノム網羅的 SNP データを用いて行った血縁解析においても、検体間のゲノム共有率が全体的に高いことが示された (図 2 下、南米検体)。データ取得に使用したマイクロアレイの種類が異なるため直接の比較はできないが、日本人の SNP データから算出したゲノム共有率の程度を図 2 上に示す (図 2 上、日本人検体)。一

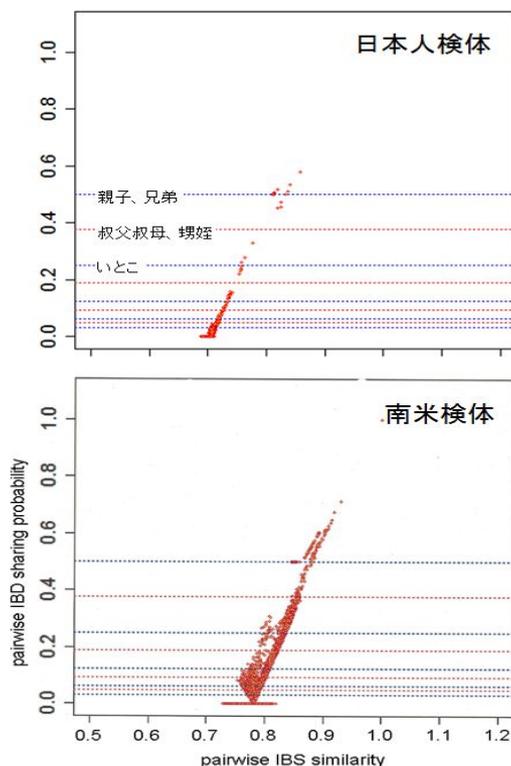


図2 日本人と南米人の血縁関連性

般的には  $PI-HAT > 0.1875$  となったペアの片方を解析する集団から除去するが、南米検体にこの条件を適用すると、かなりの数の検体が除去されてしまうことから、 $PI-HAT > 0.25$  となったペアの片方を集団から除去し、その後の解析を行った。

## (2) 遺伝的構造解析

Admixture ソフトウェアを用いて遺伝的構造解析を行った。本課題研究で解析を行う集団において、Cross-validation error 値が最小となるコンポーネント数を用いて各部族の遺伝的コンポーネントを算出した (図 3)。共同研究者らによる本課題研究とは別の Y 染色体の多型解析から、海沿いに居住する部族ではヨーロッパ人やアフリカ人との混血が進んでいることが示唆されており、本課題研究の解析からも、Wayu, Canar, Saraguro など図 1 に示す海岸近くで採血された部族の検体ではコンポーネント数の多いことが示された。Sanuma, Chaco など隔離された部族では遺伝的なコンポーネント数が少ないことが示された。また、地理的に近いにも関わらず、Sanuma と Ye' Kuana は遺伝的コンポーネントのパターンが大きく異なっていた。

## (3) 系統樹解析

系統樹解析は MEGA6 ソフトウェアを用いて行った。

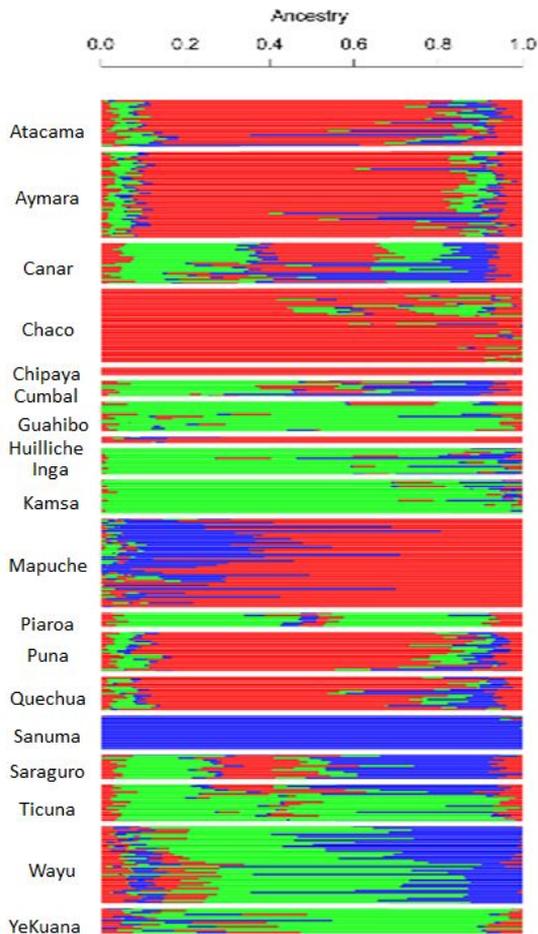


図3 南米検体の遺伝的構造

Genetic distance に基づいて系統樹を作成したところ、地理的な距離と遺伝的距離が近い傾向が認められた(図4)。主成分分析でも

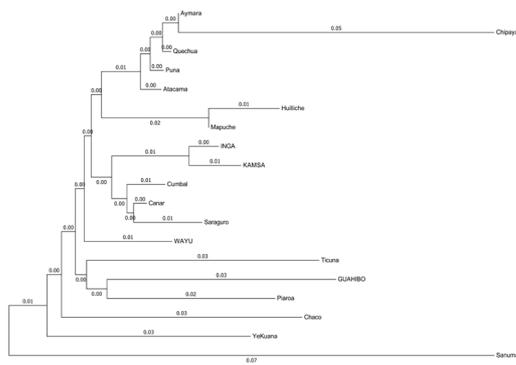


図4 系統樹解析

系統樹と同様の集団構造が認められていることから、遺伝的に近い部族で複数のグループを設定した。山岳地帯および低地に居住する部族を多く含むグループも設定できており、グループ間比較を進めて各グループを特徴付けるゲノム領域の候補がいくつか同定されている。同定されたゲノム領域について、これまでに報告されたか、機能的に環境適応と関連が考えられるか、などについて精査が進行中である。

## 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9件)

X Pan, Nariai, N Fukuhara, S Saito, Y Sato, F Katsuoka, K Kojima, Y Kuroki, I Danjoh, R Saito, S Hasegawa, Y Okitsu, A Kondo, Y Onishi, F Nagami, H Kiyomoto, A Hozawa, N Fuse, M Nagasaki, R Shimizu, J Yasuda, H Harigae, M Yamamoto; Monitoring of minimal residual disease in early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia by next-generation sequencing. *Brit J Haemat*, 査読有, Jan; 176(2):318-321, 2017 (doi:10.1111/bjh.13948)

A Nakayama, H Nakaoka, K Yamamoto, M Sakiyama, A Shaikat, Y Toyoda, Y Okada, Y Kamatani, T Nakamura, T Takada, K Inoue, T Yasujima, H Yuasa, Y Shirahama, H Nakashima, S Shimizu, T Higashino, Y Kawamura, H Ogata, M Kawaguchi, Y Ohkawa, I Danjoh, A Tokumasu, K Ooyama, T Ito, T Kondo, K Wakai, B Stiburkova, K Pavelka, LK Stamp, N Dalbeth, E Consortium, Y Sakurai, H Suzuki, M Hosoyamada, S Fujimori, T Yokoo, T Hosoya, I Inoue, A Takahashi, M Kubo, H Ooyama, T Shimizu, K Ichida, N Shinomiya, TR Merriman, H Matsuo; GWAS of clinically defined gout and subtypes identifies multiple susceptibility loci that include urate transporter genes. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 査読有, 76(5): 869-877, 2017 (doi:10.1136/annrheumdis-2016-209632)

S Koshiba, I Motoike, K Kojima, T Hasegawa, M Shirota, T Saito, D Saigusa, I Danjoh, F Katsuoka, S Ogishima, Y Kawai, Y Yamaguchi-Kabata, M Sakurai, S Hirano, J Nakata, H Motohashi, A Hozawa, S Kuriyama, N Minegishi, M Nagasaki, T Takai-Igarashi, N Fuse, H Kiyomoto, J Sugawara, Y Suzuki, S Kure, N Yaegashi, O Tanabe, K Kinoshita, J Yasuda, M Yamamoto; The structural origin of metabolic quantitative diversity. *Scientific Reports*, 査読有, 6, 31463, 2016 (doi:10.1038/srep31463)

H Matsuo, K Yamamoto, H Nakaoka, A Nakayama, M Sakiyama, T Chiba, A Takahashi, T Nakamura, H Nakashima, Y Takada, I Danjoh, S Shimizu, J Abe, Y Kawamura, S Terashige, H Ogata, S Tatsukawa, G Yin, R Okada, E Morita, M Naito, A Tokumasu, H Onoue, K Iwaya, T Ito, T Takada, K Inoue, Y Kato, Y

Nakamura, Y Sakurai, H Suzuki, Y Kanai, T Hosoya, N Hamajima, I Inoue, M Kubo, K Ichida, H Ooyama, T Shimizu, N Shinomiya; Genome-wide association study of clinically-defined gout identifies multiple risk loci and its association with clinical subtypes. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 査読有, 75(4), 652-659, 2016 (doi:10.1136/annrheumdis-2014-206191)

M Nagasaki, J Yasuda, F Katsuoka, N Nariai, K Kaname, Y Kawai, Y Yamaguchi-Kabata, J Yokozawa, I Danjoh, S Saito, Y Sato, T Mimori, K Tsuda, R Saito, X Pan, S Nishikawa, S Ito, Y Kuroki, O Tanabe, N Fuse, S Kuriyama, H Kiyomoto, A Hozawa, N Minegishi, J Engel, K Kinoshita, S Kure, N Yaegashi, ToMMo Japanese Reference Panel Project, M Yamamoto; Rare variant discovery by deep whole-genome sequencing of 1,070 Japanese individuals. *Nature Communications*, 査読有, Aug 21;6:8018, 2015 (doi: 10.1038/ncomms9018)

Y Kawai, T Mimori, K Kojima, N Nariai, I Danjoh, R Saito, J Yasuda, M Yamamoto, M Nagasaki; Japonica array: improved genotype imputation by designing a population-specific SNP array with 1070 Japanese individuals. *Journal of Human Genetics*, 査読有, 60(10), 581-587, 2015 (doi:10.1038/jhg.2015.68)

T Yamada, M Abei, I Danjoh, R Shirota, T Yamashita, I Hyodo, Y Nakamura; Identification of A Unique Hepatocellular Carcinoma Line, Li-7, With CD13(+) Cancer Stem Cells Hierarchy And Population Change Upon Its Differentiation During Culture And Effects of Sorafenib. *BMC Cancer*, 査読有, 15, 260, 2015 (doi:10.1186/s12885-015-1297-7)

IN Motoike, M Matsumoto, I Danjoh, F Katsuoka, K Kojima, N Nariai, Y Sato, Y Yamaguchi-Kabata, S Ito, H Kudo, I Nishijima, S Nishikawa, X Pan, R Saito, S Saito, T Saito, M Shirota, K Tsuda, J Yokozawa, K Igarashi, N Minegishi, O Tanabe, N Fuse, M Nagasaki, K Kinoshita, J Yasuda, M Yamamoto; Validation of multiple single nucleotide variation calls by additional exome analysis with a semiconductor sequencer to supplement data of whole-genome sequencing of a human population. *BMC Genomics*, 査読有, 15, 673-, 2014 (doi:10.1186/1471-2164-15-673)

I Danjoh, R Shirota, T Hiroshima, Y Nakamura; Dominant expansion of a

cryptic subclone possessing an abnormal karyotype occurs in B lymphoblastoid cell lines during culture. *Cytogenetics and Genome Research*, 査読有, 139, 88-96, 2013 (DOI: 10.1159/000343757)

[学会発表](計11件)

I Danjoh, K Tsuda, N Konno, R Saito, J Yasuda; Identification of Copy Number Variation in the genome of Japanese population. The American Society of Human Genetics Annual Meeting, 2015年10月6日 - 10日、Baltimore(アメリカ合衆国)

F Katsuoka, J Yokozawa, X Pan, K Tsuda, I Danjo, R Saito, S Saito, Y Kuoroki, S Ito, M Nagasaki, J Yasuda, M Yamamoto; A whole genome sequencing workflow optimized for a large-scale genome cohort at Tohoku Medical Megabank Organization (ToMMo). 国際ゲノム会議、2015年5月20日 - 22日、一橋講堂(学術総合センター)(東京)

T Yamada, M Abei, I Danjoh, R Shirota, T Yamashita, S Endo, I Hyodo, Y Nakamura; Identification of a hepatocellular carcinoma cell line capable of monitoring the differentiation of CD13(+)CD166(-) cancer stem cells and effects of sorafenib. American Association for Cancer Research Annual Meeting, 2015年4月18日 - 22日、Philadelphia (アメリカ合衆国)

S Nishikawa, R Saito, N Konno, G Tamiya, N Fuse, Y Nakamura, J Yasuda, I Danjoh; Population structure and genetic diversity by genome-wide SNP variation in 19 American ethnic groups across South America. The American Society of Human Genetics Annual Meeting, 2014年10月18日-22日、San Diego(アメリカ合衆国)

I Motoike, M Matsumoto, I Danjoh, F Katsuoka, K Kojima, N Nariai, Y Sato, Y Yamaguchi-Kabata, S Ito, H Kudo, I Nishijima, S Nishikawa, X Pan, R Saito, S Saito, T Saito, M Shirota, K Tsuda, J Yokozawa, K Igarashi, N Minegishi, O Tanabe, N Fuse, M Nagasaki, K Kinoshita, J Yasuda, M Yamamoto; Validation of genetic variant calls with different sequencing platforms: Ion Proton, HiSeq and Human-Omni systems. 生命医薬情報学連合大会、2014年10月2日 - 4日、仙台国際センター(仙台)

山田武史、安部井誠人、檀上稲穂、兵頭一之介、中村幸夫; 癌幹細胞の分化をモニター可能な肝癌細胞株の同定とヒエラルキーにおけるソラフェニブ・5FU の効果に関

する検討. A hepatocellular carcinoma line able to monitor cancer stem cells differentiation and effects of drugs targeting CSC. 日本癌学会、2014年9月25日 - 27日、パシフィコ横浜(横浜)

T Yamada, M Abei, I Danjoh, I Hyodo, Y Nakamura; Sorafenib Targets Cd13+ Cd166-Dormant Cancer Stem Cells But Not Cd13-Cd166+ Rapid Growing Progenitor Cells In A Hepatocellular Carcinoma Line. International Liver Cancer Association Annual Conference, 2014年9月5日 - 7日、ホテルグランピア京都(京都)

T Yamada, M Abei, I Danjoh, I Hyodo, Y Nakamura; Identification Of A Hepatocellular Carcinoma (Hcc) Line Capable Of Monitoring The Differentiation Of Cd13+ Cancer Stem Cells And Effects Of 5-Fu And Sorafenib On The Csc Hierarchy. International Liver Cancer Association Annual Conference, 2014年9月5日 - 7日、ホテルグランピア京都(京都)

勝岡史城, 横澤潤二, 潘小青, 齋藤さかえ, 津田薫, 檀上稲穂, 齋藤るみ子, 長崎正朗, 田邊 修, 布施昇男, 安田純, 山本雅之、東北メディカル・メガバンクにおけるシーケンス解析プラットフォームの紹介、第3回NGS現場の会、2013年9月4日-5日、神戸国際会議場(神戸)  
山本敏充、檀上稲穂、中村幸夫南米少数民族におけるY-STRハプロタイプのネットワーク解析、日本人類学会、2013年11月1日 - 4日、国立科学博物館(上野&つくば)

神澤秀明、久保充明、高橋篤、中村幸夫、檀上稲穂、Timothy A.J.Jinam、齋藤成也、園田・田島コレクション細胞のゲノムワイド SNP データを用いた南米先住民族の集団構造解析、日本進化学会、2013年8月28日 - 31日、筑波大学(つくば)

〔招請講演〕(計2件)

檀上稲穂、A large-scale genome cohort and a whole genome reference panel. 大規模ゲノムコホートと全ゲノムリファレンスパネル、日本癌学会(ランチョンセミナー)、2014年9月25日 - 27日、パシフィコ横浜(横浜)

檀上稲穂、日本人最適化カスタムアレイの作製 - 実験系研究者からの提言 -、日本人類遺伝学会(ランチョンセミナー)、2014年11月19日 - 22日、タワーホール船堀(東京)

〔図書〕(計 件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

該当無し

取得状況(計 件)

該当無し

〔その他〕(計1件)

檀上稲穂、リレーエッセー「医進伝心「大陸移動の道筋を刻む」、河北新報、2015年7月15日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

檀上 稲穂(DANJOH, INAHO)  
東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・講師  
研究者番号: 30415228

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし