

令和 3 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19340

研究課題名（和文）胚発生期の自然発生変異に注目した高解像度な細胞系譜の解析

研究課題名（英文）Cell lineage analysis by using post-zygotic spontaneous mutations

研究代表者

内村 有邦（UCHIMURA, Arikuni）

大阪大学・生命機能研究科・招へい教員

研究者番号：20513063

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：多細胞生物の生体システムを理解するためには、発生段階からの細胞の系譜を理解することが重要である。本研究では、マウス成体の組織試料に対して全ゲノムシーケンシングを行い、初期発生期の細胞分裂とともに自然発生する変異（組織中ではモザイク状態の変異として観察される）を正確に捉え、組織中での変異の存在頻度を数理モデルにより解析することで、生体試料を直接シーケンシングするだけで「初期発生期の細胞系譜を解析できる方法論」の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発に成功した「細胞系譜の解析技術」は、既存の方法に比べて、大きな優位性をもつが、シーケンシング時のカバレッジを増加させれば、さらに詳細な細胞系譜図の構築が可能になる。また、遺伝子組み換え技術を必要としないため、ヒト検体でも、すぐに応用可能な方法論である。医学研究も含めて、今後の生命科学の様々な領域で活用されていくと考えられる技術であり、学術的にも社会的にも意義の大きい研究だと考えられる。

研究成果の概要（英文）：For understanding the developmental system of multicellular organisms, it is important to understand the cell lineages during the developmental stage. In this study, whole-genome sequencing was performed on adult mouse tissue samples to accurately identify mutations naturally occurring during early development (observed as mosaic-state mutations in tissues). By measuring their variant allele frequencies and analyzing them with mathematical model, we succeeded in developing a new methodology that enables to reconstruct early embryonic cell lineages.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：突然変異 次世代シーケンサー 細胞系譜

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の発生過程を理解する上で、受精卵からの細胞分裂で誕生する全ての細胞系譜を捉えることは重要である。これまで、個体レベルで細胞系譜を調べるための方法論として、「Cre-LoxP 配列などの遺伝子組み換えの技術を用いた方法」が存在するが、全ての細胞系譜を経時的に追跡することは難しかった。

私たちは、これまでに、主にマウスの生殖系列で新規に発生する突然変異の解析を行っており、親から子供に伝わる全ゲノム DNA に、世代あたりおよそ 30 か所の変異が起こることなどを明らかにしている (Uchimura et al., 2015)。私たちの研究では、突然変異を正確に捉えることが重要であり、そのための条件検討を重ねてきた。その結果、体組織中に存在するモザイク変異まで含めて正確に検出することができるのではないかと考えるようになった。そのための予備実験を行った結果、予想よりも多くのモザイク変異が検出された。これらのことから、胚発生期におけるモザイク突然変異の発生した順番を明らかにすることができれば、これまでに前例のない画期的な細胞系譜の追跡手法の開発が可能になると考え、本研究計画を立案した。

2. 研究の目的

マウスの組織中に存在するモザイク変異を正確に検出し、それらのアリル頻度の情報を利用して、初期胚の細胞系譜を再構築するための方法論を構築すること。本方法により、細胞系譜の再構築に成功した場合は、それらの方法の信頼性や再現性を確認し、その評価まで行う。

3. 研究の方法

(1)モザイク変異の同定方法の開発

私たちは、これまでに、生殖系列で発生する突然変異の特徴を明らかにするため、合計 7 匹のマウス個体に対して、イルミナ社の HiSeq を用いて、100×カバレッジの全ゲノムシーケンシングを行っており、このデータを利用して、モザイク変異の検出方法を探索した。具体的には、次世代シーケンサーで得られたリードデータをマウスの参照配列(mm10)にマッピングし、解析精度が特に高いリードデータのみを抽出し、それらを変異 caller にかけることで、体組織中にモザイク変異として存在する変異を同定した。

(2)モザイク変異のアリル頻度の測定方法の開発

上記で得られたモザイク変異候補は、ターゲットドアンプリコンシーケンシング法によって、真の変異か偽の変異かを区別した。また、同時に、組織中における、それらモザイク変異のアリル頻度(VAF)の測定も行った。当初は、イオンプロトンシーケンサーを用いて、アンプリコンシーケンシングを行ったが、VAF の測定頻度の精度が十分ではなかったため、イルミナ社のシーケンサーを利用して解析に取り組んだ。イルミナ社のシーケンサーを利用しても、一般的なプロトコールに従った実験条件では、細胞系譜の再構築を実現できるレベルでの高い精度をもつ VAF を測定することができなかった。デジタル PCR の利用や、アンプリコンシーケンシングの解析条件の変更などを繰り返すことで、安定して、高い精度で VAF を測定することが可能な方法論を構築した。

(3)モザイク変異のアリル頻度から細胞系譜を再構築するための数理的な方法論の開発

アンプリコンシーケンシングによって測定された個々のモザイク変異の VAF の値をもとに、数理的な解析手法を利用することで、モザイク変異が発生した順番を明らかにするための方法論の開発に取り組んだ。機械学習を用いた手法など、多くの方法を試した中で、もっとも信頼度が高い細胞系譜の作成手法を構築し、様々なデータに幅広く適用可能な方法論にするための改良を積み重ねていった。

(4)細胞系譜の再構築法の結果の確認

再構築された細胞系譜図が正しいことを確認するため、本研究では、2 種類の方法論を利用した。ひとつの方法は、細胞系譜の構築に利用したマウス個体に由来する複数の体細胞を用いて、シングルセルレベルでの全ゲノムを解析し、今回の方法論で再構築された細胞系譜の推定図が正しいかどうか、検証した。もう一方の方法は、解析に利用したマウス個体から、数多くの子マウスを作製し、それらのゲノム DNA を調べることで、推定された細胞系譜が正しいかどうか確認した。

4. 研究成果

(1)モザイク変異の同定方法の開発

低いアリル頻度をもつモザイク変異を検出す上では、全ゲノムシーケンシングの際のリードカバレッジを増やすことが必要である。基本的に二項分布に従うと考えられる変異アリルのリード数のバラつきが、検出の際に大きな制約となる。例えば、40×カバレッジのシーケンシング

データでは、10%以下のアリル頻度をもつモザイク変異を取り逃すことなく検出することは原理的に不可能である。また、全ゲノム中には、参照配列には記載されていない部分的に重複したゲノム領域が数多く存在することが知られており、それらの領域上に存在するヘテロ接合型等の変異も、全ゲノムシーケンシングの結果では、真のモザイク変異の場合と同様に、低いアリル頻度を示すため、それらを正確に区別することも必要になる。

私たちは、モザイク変異を高精度に検出するため、全ゲノムシーケンシングで得られたリードデータのうち、特に信頼性の高いリードデータのみを選択的に抽出して、それらのリードデータのみを変異解析に使うこととした。また、全ゲノム領域の中から、ゲノムの部分重複等が疑われるゲノム領域を解析対象から外すことで、正確なモザイク変異の検出を試みた。様々な変異 call の条件を検討し、その都度、検出された変異候補を確認することで、最終的には、変異リード数の二項分布に従う理論的な推定の結果とほぼ同程度の精度をもつモザイク変異の検出系を構築することに成功した。その結果、今回の解析で主に利用した 100×カバレッジの全ゲノムシーケンシングのデータでは、8%以上のアリル頻度をもつモザイク変異については、ほぼ取り逃しがない状態で変異検出を行うことが可能になった。なお、ここで構築された突然変異の検出系を応用することで、親マウスの放射線被ばくで、子どものマウスに誘発される突然変異の特徴等を明らかにすることにも成功している (Sato, et al. 2020)。

(2)モザイク変異のアリル頻度の測定方法の開発

イルミナ社のショートリード型の次世代シーケンサーである Miseq と HiSeq を用いて、実験プロトコルに独自の改良を加えたターゲットアンプリコンシーケンシング法を実施することで、モザイク変異のアリル頻度を従来法よりも高い精度で測定可能な新規の方法論を構築することに成功した。

(3)モザイク変異のアリル頻度から細胞系譜を再構築するための数理的な方法論の開発

(2)で測定されたモザイク変異のアリル頻度に基づいて、初期胚期の細胞系譜を再構築するために必要な数理モデルを開発した。当初は、マウス 1 匹分の測定結果を利用して、数理モデルの開発に取り組み、各種の解析条件を設計した。その後、解析対象のマウスを 4 匹分追加することで、どの検体に対しても、安定的な解析が可能になるような方法論の開発に取り組んだ。最終的には、同一のプログラムを利用して、全ての解析が可能になる方法論を構築することに成功した。

(4)細胞系譜の再構築法の結果の確認

シングルセル技術を利用した確認実験と細胞系譜の解析対象となったマウスの子どもを利用した解析により、(3)の数理モデルにより構築された細胞系譜の推定図は全て正しいことを確認することができた。これにより、100×カバレッジの全ゲノムシーケンシングの結果を利用すると、受精卵から 8-10 の細胞系譜に分岐するまでの過程を追跡可能な新規の方法論を確立することができた。

本研究では、当初、目的としていた「細胞系譜の再構築を実現するための方法論」の開発に高いレベルで成功した。そのため、研究期間を 1 年間延長することで、本方法論のより広い応用範囲の可能性を探索することにした。より大きなカバレッジをもつ全ゲノムシーケンシングのデータを利用すれば、より低頻度で存在するモザイク変異まで検出することが可能である。そこで、今回、解析したマウスの 1 匹について、追加で全ゲノムシーケンシングを行い、どこまで詳細な細胞系譜図が再構築可能になるか、解析した。その結果、同様の方法論を適用することで、少なくとも、受精卵から 32 の細胞系譜への分岐までの過程を完全に追跡することができた。このように高い解像度を持って、初期胚期系譜の追跡を可能にする技術は、世界的にも似たものはなく、本方法は、特に高い革新性を有する技術だと考えられる。

(5)まとめと将来展望

本研究では、全ゲノムシーケンシングのデータの中から、真のモザイク変異を検出するための方法論、検出されたモザイク変異の存在頻度を正確に測定するための方法論、それらの解析結果から、実際に胚発生中に生じた細胞系譜の再構築を行うための数理的手法の開発に取り組んだ。様々な条件検討を繰り返すことで、全ての過程において、予想を上回る高いレベルで、方法論を構築することに成功した。当初の予定では、受精卵から 8 細胞期程度までの過程を再構築することを目標としていたが、各過程の最適化が予想以上に順調に進んだため、より高い目標を設定して解析に取り組み、もっとも詳しく解析したマウス個体では、受精卵から 32 の細胞系譜に分岐する過程までが全て追跡可能になった。その結果、初期胚における、突然変異の発生機構が明らかになり、生体内における細胞系譜の解析も可能になった。私たちの研究では、この方法を利用して、胚発生の過程で、どのようにして生殖細胞につながる系譜と体細胞の系譜が生じてくるか、その様式を世界で初めて明らかにすることができた。本研究により、開発された方法論は、世界に先駆けた技術であり、幅広い分野で利用されていくものと考えられる。

<引用文献>

Uchimura et al, (2015). "Germline mutation rates and the long-term phenotypic effects

of mutation accumulation in wild-type laboratory mice and mutator mice." *Genome Res* 25(8): 1125-1134.

Satoh, Y., et al. (2020). "Characteristics of induced mutations in offspring derived from irradiated mouse spermatogonia and mature oocytes." *Sci Rep* 10(1): 37.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yasunari Satoh, Jun-ichi Asakawa, Mayumi Nishimura, Tony Kuo, Norio Shinkai, Harry M. Cullings, Yohei Minakuchi, Jun Sese, Atsushi Toyoda, Yoshiya Shimada, Nori Nakamura, Arikuni Uchimura	4. 巻 10
2. 論文標題 Characteristics of induced mutations in offspring derived from irradiated mouse spermatogonia and mature oocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-56881-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Arikuni Uchimura, Yasunari Satoh
2. 発表標題 De novo germline mutations and their phenotypic effects on future generations
3. 学会等名 第6回アジア環境変異原学会 / 日本環境変異原学会第48回大会 合同大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Arikuni Uchimura, Mayumi Higuchi, Yasunari Satoh, Yohei Minakuchi, Takahiro Tsuji, Masaaki Imanaka, Akiko Miura, Atsushi Toyoda, Takeshi Yagi
2. 発表標題 A new approach for de novo germline mutations using a mutation accumulation mouse model
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasunari Satoh, Mayumi Nishimura, Tony Kuo, Norio Shinkai, Harry M. Cullings, Yohei Minakuchi, Jun Sese, Atsushi Toyoda, Yoshiya Shimada, Nori Nakamura, Arikuni Uchimura
2. 発表標題 Mutation spectrum in the genome of offspring derived from irradiated mouse spermatogonia and mature oocytes
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	Arikuni Uchimura, Yasunari Satoh, Mayumi Higuchi, Yohei Minakuchi, Jo Nishino, Atsushi Toyoda, Takeshi Yagi
2. 発表標題	De novo germline mutations and the phenotypic effects of mutation accumulation in laboratory mice
3. 学会等名	The 16th International Congress of Radiation Research 2019 (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Yasunari Satoh, Jun-ichi Asakawa, Mayumi Nishimura, Harry M. Cullings, Yoshiya Shimada, Nori Nakamura, Arikuni Uchimura
2. 発表標題	Induced mutations in offspring derived from irradiated mouse spermatogonia and mature oocytes
3. 学会等名	The 16th International Congress of Radiation Research 2019 (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	内村有邦、樋口真弓、水口洋平、佐藤康成、辻隆弘、中本芳子、今中正明、三浦昭子、豊田敦、八木健
2. 発表標題	マウスの生殖系列で発生する挿入欠失変異の発生頻度とその特徴
3. 学会等名	日本放射線影響学会第61回大会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	内村有邦、樋口真弓、水口洋平、松本拡高、若山清香、若山照彦、佐藤康成、福村龍太郎、辻隆弘、今中正明、中本芳子、三浦昭子、権藤洋一、豊田敦、八木健
2. 発表標題	マウス生殖系列で発生するde novo変異から見る哺乳類ゲノムの進化
3. 学会等名	第41回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年	2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞系譜生成方法、プログラム、及び細胞系譜生成装置	発明者 内村有邦，八木健， 佐藤康成、松本拓高	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-139833	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------