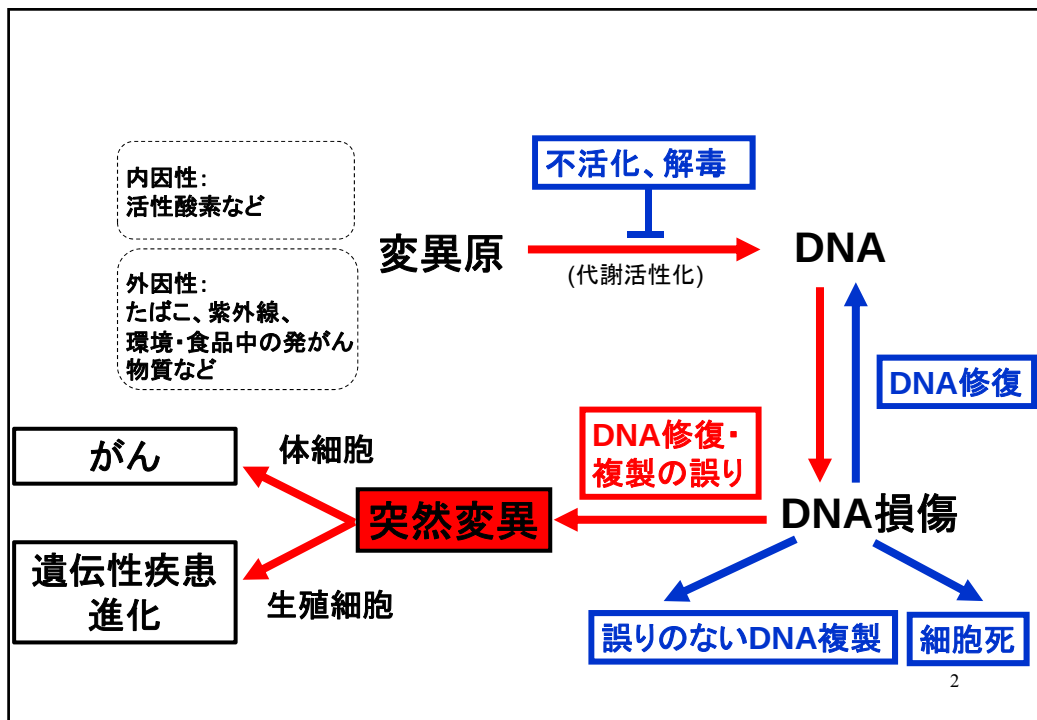


ゲノム解析による経世代突然変異の検出

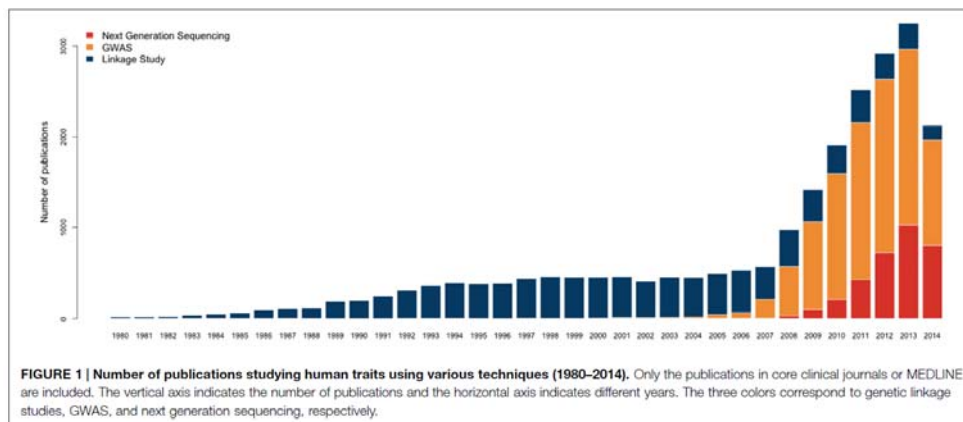
国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 増村健一

平成28年度 日本環境変異原学会公開シンポジウム
「Interaction between Genes and Environment
-大規模ゲノム解析データから見えてくるもの-」
2016.05.28

1



2



Wang et al., frontiers in Genetics 2015

ゲノム解析技術によって、ヒトの遺伝形質に関する研究が加速している。

3

次世代シーケンサー(NGS)を用いたゲノム解析技術の進歩によって、ヒトゲノム配列の大規模解析が行われるようになった。

目的: 疾患原因遺伝子変異の同定、診断法・治療法の開発、新薬開発、個別化医療の支援

> 近年の大規模ゲノムプロジェクト

- ・国際1000人ゲノムプロジェクト(<http://www.1000genomes.org/>) 2008~2015
- ・日本人1,070人分の全ゲノム解析(東北大学東北メディカル・メガバンク機構) 2015
- ・英国人の10万人ゲノムプロジェクト(<http://www.genomicsengland.co.uk/>) 2012~
- ・アジア人の10万人ゲノムプロジェクト(<http://genomeasia100k.com/>) 2016~
- ・製薬、バイオテック、ベンチャー企業の10万人ゲノムプロジェクトいろいろ(Human Longevity, Inc., Regeneron Pharmaceuticals, Inc., Amgen Inc. etc.)

> 臨床現場での利用

遺伝子診断、治療法の選択

4

遺伝子疾患の種類 (Wikipedia)

- 1 染色体異常症
- 2 単一遺伝子疾患(常染色体劣性、常染色体優性、X連鎖)
- 3 多因子遺伝疾患

ゲノム解析によって、多くの単一遺伝子疾患の原因遺伝子が同定されてきている。

家族性遺伝病だけでなく、孤発性の遺伝子疾患も大規模ゲノム解析で原因遺伝子の探索、同定が可能

稀少疾患から生活習慣病などのcommon diseaseまで解析対象

多因子性疾患では、個々の遺伝子の寄与度は異なる。
(複数の遺伝的因子、環境因子の相互作用)

5

生殖細胞の遺伝子突然変異

体細胞変異と異なり、生殖細胞系列に生じた遺伝子突然変異は次世代個体に伝わる。

ヒトゲノムのmutation rateはおおよそ 1×10^{-8} 塩基/世代
(世代あたり数10個の新たな変異が発生)

環境変異原によって生殖細胞に生じる遺伝子突然変異およびその次世代影響をどのように評価するか？

6

生殖細胞変異原性の評価

通常は、体細胞と同様の遺伝毒性試験(in vitro, in vivo)で評価

<理由>

- 1) 既存のデータから、体細胞で変異原性を示す変異原は生殖細胞でも変異原性ありとみなせる
- 2) 経世代の変異原性試験(特定座位試験など)が実施困難

<異論>

- 1) 既存データが不十分、陽性物質に偏っている
- 2) 生殖細胞特有のメカニズム(減数分裂、DNA修復不活化)

生殖細胞の遺伝毒性試験

- ・優性致死試験
- ・精子細胞を用いる染色体異常試験、コメット試験
- ・トランスジェニック動物遺伝子突然変異試験など

Report of the 2013 IWGT workshop on germ cell assays
Yauk et al. Mutation Research 2015

環境変異原によって生殖細胞に誘発された遺伝子突然変異の次世代影響をどのように評価するか？

→ゲノム解析の利用

Masumura et al. *Genes and Environment* (2016) 38:10
DOI 10.1186/s41021-016-0035-y

Genes and Environment

RESEARCH

Open Access

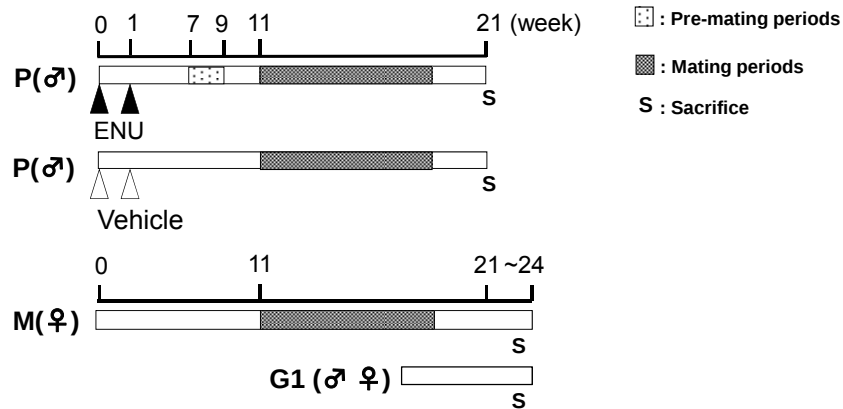


Estimation of the frequency of inherited germline mutations by whole exome sequencing in ethyl nitrosourea-treated and untreated *gpt* delta mice

Kenichi Masumura^{1*}, Naomi Toyoda-Hokaiwado¹, Akiko Ukai¹, Yoichi Gondo², Masamitsu Honma¹ and Takehiko Nohmi^{1,3}

マウスに変異原物質を投与し、生殖細胞突然変異および次世代個体ゲノムへの影響を全エクソーム解析を用いて測定した。

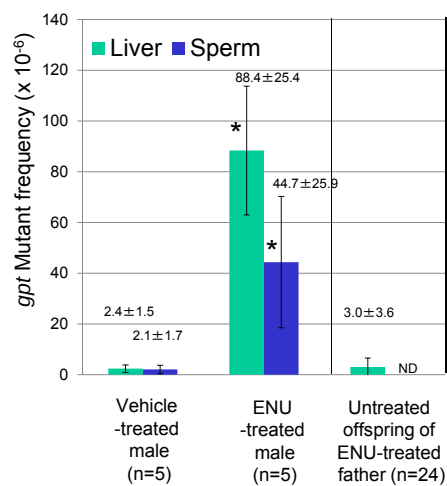
The 8 weeks old male *gpt* delta mice were treated with ENU weekly at 85 mg/kg b.w., i.p. for two weeks.



雄マウスに変異原物質(ENU)を投与し、10週後に無処理雌マウスと交配してG1個体を得た。

9

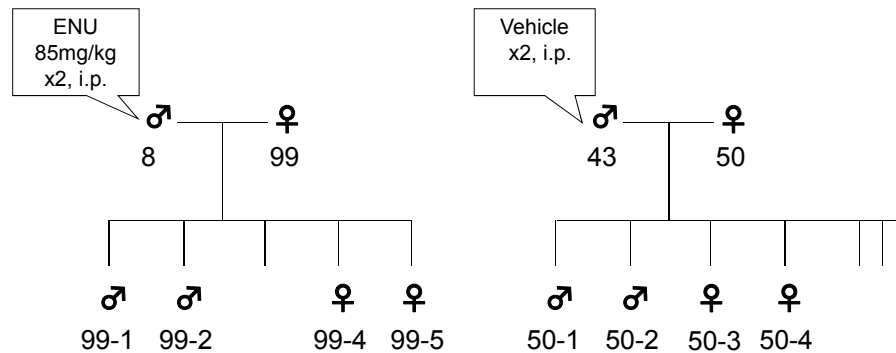
レポーター遺伝子を用いた遺伝子突然変異試験(*gpt* delta マウス)



ENU投与雄マウスの肝臓および精子において変異体頻度が増加した。F1個体の体細胞変異体頻度はバックグラウンド値であった。

10

全エキソーム解析



ENU投与群と対照群の各1家族について、全エキソームシーケンシングを行った。
各家族につき父、母、子4匹(雌雄各2)の計6匹を使用した。

11

マウスゲノムDNA (3 Gbase)

↓
断片化

↓
エキソン領域 (49.6Mb) を濃縮(SureSelect Mouse All Exon Kit, Agilent)

↓
シーケンシング (HiSeq2000, Illumina)(100bp pair-end)

↓
マウスゲノム参照配列にマッピング
※マッピング後の平均カバレッジ100×

↓
参照配列と比較して、1塩基変異(SNVs)の検出

↓
SNVsの親子間比較を行い、子で新規に見つかった変異(de novo mutations)を抽出(トリオ解析)

↓
変異候補の絞り込み

“Read depth ≥ 40 in all three mice (P, M and F1)” “Unique mutation only” etc.
fold-increase plotの作成

(performed by Beckman Coulter Genomics and Genaris Inc.)¹²

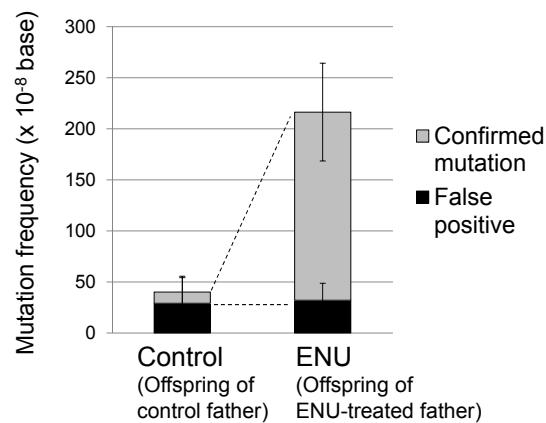
次世代個体ゲノムの突然変異頻度 (de novo SNVs)

Offspring	father ID	mother ID	No. of bases sequenced in exon (depth ≥ 40)	NGS-called mutation (depth ≥ 40)	Sanger seq-confirmed mutation	Confirmed mutation frequency ($\times 10^{-8}$ base)	Average	SD
ENU								
99_1 male	8	99	18,621,430	35	30	161.1		
99_2 male	8	99	13,301,379	42	34	255.6		
99_4 female	8	99	18,273,301	35	28	153.2		
99_5 female	8	99	18,590,333	36	31	166.8		
			68,786,443	148	123	178.8	184.2	47.9
Control								
50_1 male	43	50	6,874,190	2	2	29.1		
50_2 male	43	50	6,904,947	4	0	0.0		
50_3 female	43	50	6,743,247	2	1	14.8		
50_4 female	43	50	6,877,048	4	0	0.0		
			27,399,432	12	3	11.0	11.0	14.0

NGS解析によって検出された変異候補のうち、ENU投与群では83% (123/148)がサンガー法でも確認できた。陰性対照群では疑陽性が多く、25%(3/12) がサンガー法で確認できた。

13

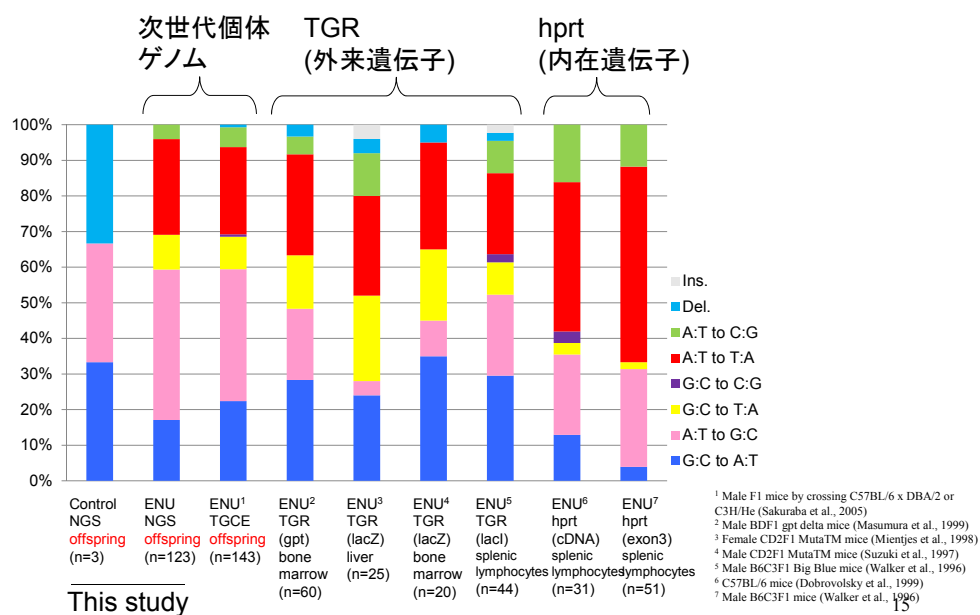
次世代個体ゲノムの突然変異頻度 (de novo SNVs)



ENU投与父マウスの子ゲノムにおいて突然変異頻度は対照群の17倍に増加した。

14

ENU誘発突然変異スペクトルの特徴



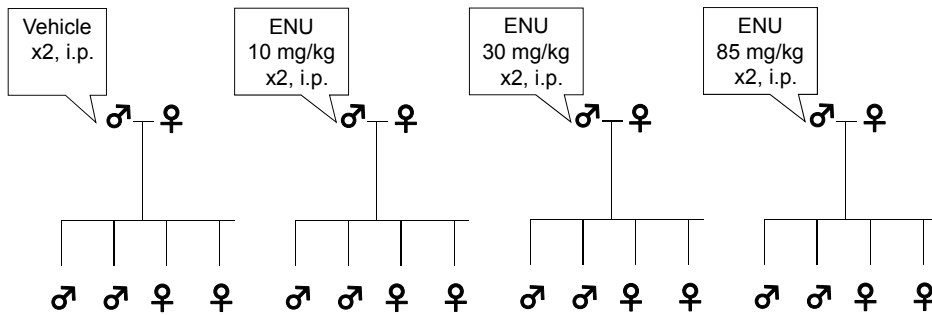
全エクソーム解析で検出されたde novo変異のタイプ

	ENU						Control					
	99_1	99_2	99_4	99_5	total		50_1	50_2	50_3	50_4	total	
	No.	No.	No.	No.	No.	%	No.	No.	No.	No.	No.	%
SYNONYMOUS_CODING	1	3	4	3	11	9					0	0
NON_SYNONYMOUS_CODING	14	17	12	12	55	45					0	0
FRAMESHIFT_CODING					0	0	1				1	33
STOP_GAINED	2	2	1	1	6	5					0	0
3PRIME_UTR	1		1		2	2					0	0
5PRIME_UTR		1		2	3	2					0	0
REGULATORY_REGION	2	1	4	2	9	7	1		1		2	67
SPLICE_SITE		2	1	4	7	6					0	0
INTRONIC	8	5	4	6	23	19					0	0
INTERGENIC	1	2			3	2					0	0
WITHIN_NON_CODING_GENE	1	1	1	1	4	3					0	0
total	30	34	28	31	123	100	2	0	1	0	3	100

ゲノム解析によって生殖細胞突然変異の次世代影響を測定することが可能である。

→再現性？用量反応性？

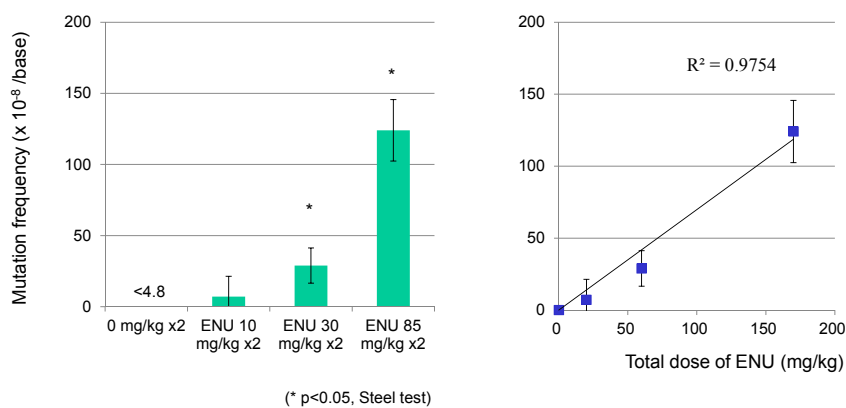
全エキソーム解析(3用量群)



中間用量2群を加えた全4家族(24匹)のエキソーム解析
変異候補の絞り込み条件の改良(疑陽性の低減)

¹⁷
Masumura et al., in press.

次世代個体ゲノムの突然変異頻度 (全エキソーム解析+サンガー法)



ENU投与雄由来の子マウスゲノムにおいて突然変異頻度が用量依存的に増加した。

¹⁸
Masumura et al., in press.

まとめ

次世代個体の全エキソーム解析を行い、germlineの突然変異頻度を測定した。

ENU投与雄由来の子マウスゲノムにおいて突然変異頻度が用量依存的に増加した。

得られた変異スペクトルはENU誘発変異の特徴(A:T bp塩基置換)を反映していた。

陰性対照群の突然変異頻度は低値であり、エキソーム解析では検出限界以下。

→データ量が大きい全ゲノム解析が必要

ゲノム解析による変異検出法は、変異原の次世代影響の測定に有効と考えられた。

今後、1細胞シーケンスや1分子シーケンスなどの技術の進歩によって、
低頻度の体細胞変異(モザイク変異、ランダム変異)の検出、構造変異を含めた詳細な
解析 などが可能になると期待される。

19

Acknowledgements

Naomi Hokaiwado¹

Akiko Ukai¹

Masamitsu Honma¹

Yoichi Gondo²

Takehiko Nohmi³

¹*Division of Genetics and Mutagenesis,
National Institute of Health Sciences (NIHS),*

²*RIKEN BioResource Center,*

³*Biological Safety Research Center, NIHS*

Genaris, Inc.

Beckman Coulter Genomics

Takara Bio Inc.

Grants-in-aid for JSPS KAKENHI (25281027)

20