

第10回 都医学研シンポジウム

ゲノム機能解析の進展と その医科学への応用

日時：2020年11月27日(金曜日) 15:00~18:00

主催：公益財団法人東京都医学総合研究所

座長：川路 英哉（東京都医学総合研究所 ゲノム医学研究センター 副センター長）

次 第

司会:川路 英哉 (東京都医学総合研究所)

第 1 部

- 15:00 **開会挨拶**
正井 久雄 (東京都医学総合研究所 所長・ゲノム医学研究センター センター長)
- 15:10 **脳ゲノム解析による精神疾患の病因病態解明**
岩本 和也 (熊本大学大学院 生命科学研究部 分子脳科学講座 教授)
- 15:40 **大規模並列レポーターアッセイが紐解く細胞分化、進化、疾患**
井上 詞貴 (京都大学 ヒト生物学高等研究拠点(ASHBi) 特定准教授)
- 16:10 **百寿者免疫細胞のシングルセルトランスクリプトーム解析**
橋本 浩介 (大阪大学 蛋白質研究所 計算生物学研究室 准教授)
- 16:40 休憩(10 分間)

第 2 部

- 16:50 **骨髄異形成症候群の分子発症機序解明を目指して
～造血器腫瘍トランスレーショナル研究の実践～**
原田 浩徳 (東京薬科大学 生命科学部 生命医科学科 腫瘍医科学研究室 教授
都立駒込病院 血液内科)
- 17:20 **RNA 5' 末端の測定が明らかにするゲノム転写制御領域の重層性と
医療・創薬への活用**
川路 英哉 (東京都医学総合研究所 ゲノム医学研究センター 副センター長)
- 17:50 **閉会挨拶**
川路 英哉 (東京都医学総合研究所 ゲノム医学研究センター 副センター長)

脳ゲノム解析による精神疾患の病因病態解明

岩本 和也 (いわもと かずや)

熊本大学大学院 生命科学研究部 分子脳科学講座 教授

【講演要旨】

統合失調症や双極性障害(躁うつ病)は、民族集団、地域、時代を問わず約 100 人に 1 人が罹患する重篤な精神疾患である。両疾患共に思春期前後に好発期があり、疫学研究等の研究から遺伝と環境の複雑な相互作用によって発症に至ると考えられている。近年のゲノムワイド関連解析から、効果量の小さな多数の因子の関連が、また、コピー数多型解析やエクソーム解析などから、効果量は大きいが高頻度が稀な因子の関連が報告されている。大規模なゲノム解析が進展し、精神疾患の genetic architecture が詳細に明らかにされる一方、疫学研究で報告されているような 70%程度の高い遺伝率はゲノム研究単独では説明し得ないこともまた明らかになりつつある。

我々は、祖先から受け継ぎ子孫に遺伝する生殖系列細胞における変異や、患者に新規で生じる de novo 変異に加え、環境要因によって影響を受けるエピゲノム状態や脳神経系における体細胞変異の蓄積が、精神疾患の病因・病態に大きく関係すると想定し、脳神経系ゲノム DNA の包括的な解析を行っている (Nishioka et al., Mol Psychiatry 2019)。

最近では、一卵性双生児間でのゲノム差異や死後脳での体細胞変異の頻度解析などを報告し (Nishioka et al., npj Schizophrenia 2018)、特に統合失調症患者神経細胞において、トランスポゾン LINE-1 のゲノムコピー数の上昇が認められること、上昇の背景として遺伝的要因に加え妊娠期のウイルス感染などの可能性があることを明らかにした (Bundo et al., Neuron 2014)。また、統合失調症患者におけるセロトニントランスポーターの DNA メチル化変化と脳構造変化の関連を明らかにした (Ikegame, Bundo et al., Schizophrenia Bull 2020)。

本シンポジウムでは、高深度ゲノム解析、単一神経細胞ゲノム解析からの体細胞変異の同定や、動物モデルでの検証を含めて最近の成果を紹介すると共に、今後の展望について議論したい。

大規模並列レポーターアッセイが紐解く 細胞分化、進化、疾患

井上 詞貴 (いのうえ ふみたか)

京都大学 ヒト生物学高等研究拠点 Bourque グループ Co-PI/特定准教授

【講演要旨】

ヒトゲノムのうち 98%以上はタンパク質をコードしないノンコーディング DNA である。ノンコーディング領域には、エンハンサーと呼ばれる転写調節シスエレメントが多数点在している。エンハンサーは、細胞内外のシグナルやストレスに応答し、遺伝子発現の時期・組織特異性や発現量を厳密に調節することで、細胞分化や個体発生など様々な生命現象を制御している。また、その多型や変異は、遺伝性疾患や病気の罹りやすさ、表現型の個人差、そして生物種間の差を生む主要因であると考えられる。従って、疾患の分子メカニズムの解明や、細胞分化、進化をゲノムレベルで理解するには、ノンコーディングゲノムに含まれるエンハンサーの詳細な機能解析が必要不可欠である。

エンハンサーの機能解析は、ルシフェラーゼや蛍光タンパク質などを用いたレポーターアッセイを行うことがかつての主流であったが、これはエンハンサー配列を一つ一つレポーターベクターへクローニングし、個々のエンハンサーの活性を測定するという低効率なものであった。私達が開発してきた大規模並列レポーターアッセイ法(Lentivirus-based Massively Parallel Reporter Assay: lentiMPRA)は、転写バーコードを次世代シーケンサーにより定量することで、数千-数万のエンハンサーの活性を大規模並列的に定量解析できる新技術である。

私達はこれまで、この lentiMPRA により、神経分化など様々な生命現象に関わるエンハンサーの機能解析を行ってきた。例えば、ヒト ES 細胞から誘導した神経幹細胞の異なる 7 タイムポイント(誘導後 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 時間)において、エピゲノム解析(RNA-seq、アクセシブルクロマチンを同定する ATAC-seq、活性型ヒストンマーク H3K27ac を同定する ChIP-seq)と共に lentiMPRA を行い、1,547 個のエンハンサー配列を同定した。この経時的かつ網羅的解析から、5 つの転写因子(BARHL1, IRX3, LHX5, OTX1, OTX2)が神経エンハンサーの活性化に重要であることを示した。

lentiMPRA は他にも、様々な疾患に関わる遺伝子の転写制御エレメントについて、1 塩基レベルでの機能解析に利用することができ、ゲノムワイド関連解析(GWAS)では不明であった疾患原因 SNP の同定に繋がる。あるいは、チンパンジーやネアンデルタールゲノムとの種間比較により見出される塩基配列の差について、中立的か機能的かを判別することを可能とし、ヒト進化がいかんにしてドライブされたのかを知る手がかりとなる。

本講では、lentiMPRA の方法論およびこれらの応用例について紹介し、機能ゲノミクス研究の新展開について議論したい。

百寿者免疫細胞の シングルセルトランスクリプトーム解析

橋本 浩介 (はしもと こうすけ)

大阪大学 蛋白質研究所 計算生物学研究室 准教授

【講演要旨】

スーパーセンテナリアンは110歳に到達した特別長寿な人々のことを指し、自立的な生活を送る期間が長いことから、理想的な健康長寿のモデルと考えられています。本研究では、長年にわたって老化研究を行っている慶應義塾大学医学部 百寿総合研究センターと共同で、スーパーセンテナリアン7人から採血を行い、末梢血単核球を抽出して1細胞レベルのトランスクリプトーム解析を行いました。その結果、スーパーセンテナリアンの血液中から、「CD4陽性キラーT細胞」という通常あまり存在しない特殊なT細胞が高い割合で検出されました。一般的にT細胞は「CD4陽性ヘルパー」と「CD8陽性キラー」の2種類に分類されます。スーパーセンテナリアンで増加しているCD4陽性キラーT細胞はこれら両方の特徴を併せ持つT細胞で、110歳という超高齢者で顕在化した例外的なT細胞といえます。更に、T細胞受容体の配列を1細胞レベルで解析したところ、多くのCD4陽性キラーT細胞が同一の受容体を持つことが明らかになり、特定の抗原に対してクローン性増殖を起こしたことが示唆されました。このようなT細胞がいつ、どのように増加してきたのかはまだ明らかになっておらず、今後の研究によって、老化や長寿において果たす役割の解明が期待されます。

骨髄異形成症候群の分子発症機序解明を目指して ～造血器腫瘍トランスレーショナル研究の実践～

原田 浩徳 (はらだ ひろのり)

東京薬科大学 生命科学部 生命医科学科 腫瘍医科学研究室 教授
都立駒込病院 血液内科

【講演要旨】

骨髄異形成症候群(Myelodysplastic syndromes, MDS)は、造血幹細胞に生じた遺伝子異常によって発症する難治性の血液がん(造血器腫瘍)である。造血器腫瘍として認知度の高い急性白血病は、全年齢層に認められ、腫瘍化した白血病細胞の異常増殖であるのに対し、MDSは主に60歳以上の高齢者に発症し、血球減少による貧血・易感染状態などの「骨髄不全症」と、約半数の症例が白血病へ移行する「前白血病状態」の二つの側面を有する疾患である。慢性かつ進行性の経過をたどり、予後不良である。根治療法は造血幹細胞移植であるが、高齢ゆえに適応患者は少なく、また唯一の治療薬であるDNAメチル化阻害剤の効果は限定的であることから、MDS病因・病態の本質の解明による新規薬剤の開発が急務とされている。

近年の次世代シーケンシング技術の飛躍的な進歩により、MDSの発症に関わる遺伝子変異の全容が明らかになりつつある。しかし、多くの遺伝子変異はMDSに特異的なものではなく、他の造血器腫瘍においても頻繁に同定される異常であり、遺伝子変異から多彩なMDSの病態を説明することは困難である。造血幹細胞に複数の遺伝子異常を獲得してクローン性造血が進展してゆく過程で、さまざまなMDSの分子病態を呈することが推測される。

我々の研究グループでは、MDSの責任遺伝子としてRUNX1変異を同定して以降、MDSの分子発症機序の解明および新規診断・治療法を開発を目指したトランスレーショナルリサーチを実践している。現在、国内有数の造血器腫瘍患者数を有するがん・感染症センター都立駒込病院(血液内科)において、MDS患者症例の網羅的な遺伝子変異・発現解析を行い、得られた遺伝子解析結果をもとに東京薬科大学腫瘍医科学研究室においてマウスモデルを作成している。このモデルマウスの解析から、MDS特有のさまざまな病態の分子機構を明らかにし、さらに創薬開発へとつながる解析結果を得ている。本講演では、これまでに明らかになったMDSの分子病態を紹介し、MDS病態の一つである骨髄不全について、MDS患者の臨床データおよび遺伝子解析を素に基礎研究から得られた新たな発症メカニズムについて紹介したい。

RNA 5' 末端の測定が明らかにする ゲノム転写制御領域の重層性と医療・創薬への活用

川路 英哉 (かわじ ひでや)

東京都医学総合研究所 ゲノム医学研究センター 副センター長

【講演要旨】

遺伝子発現の第一段階はゲノム DNA を鋳型として RNA を合成するプロセスつまり転写であり、その開始を近傍より指示するゲノム領域はプロモーター、遺伝子とは離れた位置より調節する領域はエンハンサーと呼ばれる。転写が終結した後、イントロン部を除去するプロセスつまりスプライシングを経由することで RNA は成熟した構造となり、タンパク質は成熟 RNA の塩基配列を元に翻訳される。発生や刺激応答、恒常性維持といった細胞機能に必要な成熟 RNA 分子群は、プロモーターやエンハンサー、スプライシングパターンの違いといった遺伝子発現制御の変化によって生み出され、その乱れはがんをはじめとする様々な疾患において観察される。

RNA 5' 末端を測定する CAGE (Cap Analysis of Gene Expression) 法を用いることで、ゲノム上で起きる転写の開始を一塩基単位で定量的に測定することができる。プロモーターは転写開始位置近傍に存在すること、エンハンサーからは転写が僅かにかつ双方向に起きる性質を利用した計算処理アルゴリズムを用いることで、CAGE データよりこれら転写制御領域を同定することが可能である。CAGE 法を数千種のサンプルに適用した国際共同研究プロジェクト FANTOM5 の実施、細胞内で転写されたばかりの新生 RNA を対象とする CAGE 法 (NET-CAGE) の開発を通じ、タンパク質コード遺伝子の約 15 倍もの転写制御領域がヒトゲノム上に存在することが明らかになった。

これまでに実施されてきた様々なゲノム研究によって、疾患等と遺伝的に相関するゲノム上の多型が数多く報告されてきたが、遺伝子の構造を指定する領域 (タンパク質コード領域) に存在するものはごく一部である。これら疾患関連多型の分布を調べると、CAGE 法で同定された転写制御領域に集中的に存在することが見出された。疾患をゲノムから理解する際の大きな手がかりとなる多型情報は、遺伝子の分子機能を担うタンパク質の構造のみならず、遺伝子の発現制御を加味した解釈が必須であること、そして我々の同定したゲノム領域はその解釈を推し進める基盤となることを示す結果である。

CAGE 法やこれを元にしたスプライシングパターンの測定は、上述のようなゲノム機能の理解を推し進める研究に加え、診療バイオマーカー探索、医薬品開発等へも活用されている。前者の例としては、子宮体がんにおけるリンパ節転移の術前診断、肺癌サブタイプの病理学的鑑別困難例において、既存マーカーを上回る性能を持つ分子が同定されている。後者としては、近年大きく注目を集めている核酸医薬 (人工合成した核酸を作用させることで RNA 等を標的とする医薬品) 創薬の共通基盤としてゲノム・RNA データベースの構築が進められている。近年の技術革新、特に一細胞解析や長鎖シーケンスによって RNA 測定の適用可能性が更に開かれつつあることから、本シンポジウムでは将来の展望も含めて RNA 測定が明らかにするゲノム機能とその医療・創薬活用について議論したい。

第 10 回 都医学研シンポジウム抄録

編集・発行 公益財団法人 東京都医学総合研究所

研究推進課 普及広報係

〒156-8506

東京都世田谷区上北沢 2-1-6

電話:03-5316-3109

FAX:03-5316-3150

<http://www.igakuken.or.jp>