

6. 縄文人 iPS 細胞の構築とその応用に向けた技術開発

東京大学 大学院理学系研究科 教授 太田 博樹

概要

【目的】縄文人の適応的表現型を *in vitro* で解析する実験系を構築する。【方法】縄文人由来ゲノム断片をもつ iPS 細胞を樹立し、分化誘導させ、網羅的かつ経時的に遺伝子発現及び代謝プロファイル进行分析し、現代日本人のそれと比較する。【結果】縄文人度の高い現代日本人の培養細胞から iPS 細胞を作製した。三胚葉分化誘導とその免疫染色により多能性を確認した。さらに、ゲノム編集によりアセトアルデヒド脱水素酵素 (ALDH2) 遺伝子の 10 塩基欠損株を作製、肝細胞 (hepatocyte) 分化誘導をおこなった。qPCR および免疫染色により肝細胞マーカー遺伝子の発現を確認、hepatocyte-like-cell (HLC) への分化誘導に成功した。

背景および目的

【海外の動向】マックスプランク進化人類学研究所のスヴァンテ・ペーボ博士は、絶滅人類であるネアンデルタール人の化石から DNA を抽出し、ヒトゲノム計画で解読された塩基配列と遜色無い精度でネアンデルタール人のゲノム解読に成功した。この功績でペーボの博士は 2022 年ノーベル生理学・医学賞に輝いた。このネアンデルタール人ゲノム情報にもとづき、欧米の複数のラボでネアンデルタール人の大脳皮質のオルガノイド作製が進められ、現生人類とネアンデルタール人の違いについて細胞生物学的研究が進められている。

【国内の現状】私たちの研究グループは、2018 年に縄文人の全ゲノム・ドラフト配列を発表した。その結果、縄文人が東ユーラシア大陸の基層集団に位置することを明らかにした。つまり、縄文人は現代東アジア人と現代東南アジア人が分岐する以前に分岐した非常に古い系統であった。現代日本人ゲノム中 10~20%が縄文人由来であることも明らかになったことから、ホモ・サピエンスが約 6 万年前にアフリカを出てユーラシア大陸の東端へ到達した直後のゲノムを現代日本人は、他のどの東アジア人よりも多く受け継いでいることになる。

【目的】縄文人の生物学的特性を明らかにすることは、現代日本人の体質や特性、それらの個人差を理解することに大きく貢献する。本研究は縄文人の生理的特性を明らかにする目的で、縄文人由来ゲノムを一部にもつ iPS 細胞を樹立し、特に肝細胞を分化誘導する (図 1)。この肝様細胞網羅的に遺伝子発現进行分析し、縄文人の適応的表現型を *in vitro* で解析する実験系を構築することを目標とする。

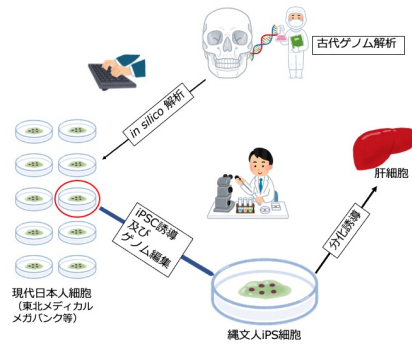


図 1. 縄文人 iPS 細胞の構築とその応用に向けた技術開発

方法

ゲノムの一部が縄文人由来である細胞をもちい、私たちの先行研究で縄文人と現代日本人で明確に遺伝子頻度が異なりかつ環境適応と関連する遺伝子が祖先型ホモである細胞をもちいて in vitro 実験系の構築をおこなった。着目する遺伝子としてアルデヒド脱水素酵素 II (ALDH2) 遺伝子を選んだ。ALDH2 遺伝子の 12 番目のエクソンにはアミノ酸置換をとまなう一塩基多型 (rs671) がある (図 2)。G アレルが祖先型で A アレルが派生型であり、後者をもつとグルタミン酸がリジンに置換し、酵素活性が欠損するため、飲酒時に顔面紅潮し吐き気をもよおすなど「お酒に弱い」表現型を示すことで知られている。縄文人ゲノム背景をもつ細胞でゲノム編集により派生型アレルの表現型を mimic した細胞を作製し、肝細胞 (hepatocyte) を分化誘導した。この肝様細胞 (HLC: hepatocyte-like-cell) をもちいてアセトアルデヒド添加実験をおこない、トランスクリプトーム解析により、その影響をモニタリングした。

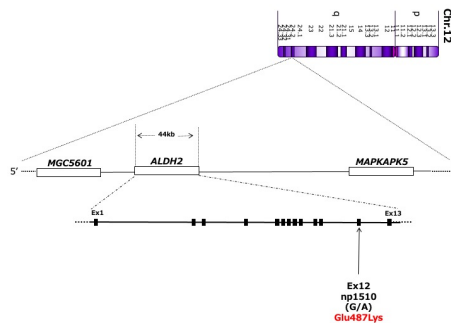


図 2. アルデヒド脱水素酵素 II (ALDH2) 遺伝子のエクソン 12 にある非同義置換

結果および考察

私たちは、私たちの培養細胞コレクションの中から、縄文人度合いが高い (縄文人由来ゲノムをより多くもつ) 不死化リンパ球を 4 株選抜した。これら 4 株の ALDH2 遺伝子は全て祖先型ホモであった。これらのリンパ細胞から iPS 細胞を誘導した (図 3)。

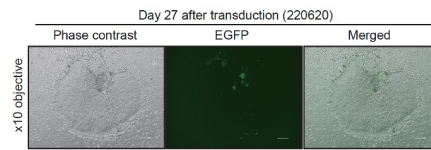


図 3. 縄文人型アレルを持つ現代日本人リンパ球細胞から iPS 細胞を誘導
4 株のうちの 1 株において、ゲノム編集によって 10 塩基欠損を入れ（図 4）、

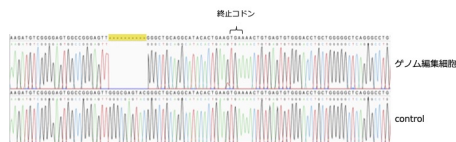


図 4. CRISPR-Cas9 により派生型 ALDH2 遺伝子を mimic
核型異常がないことを確認し（図 5）、

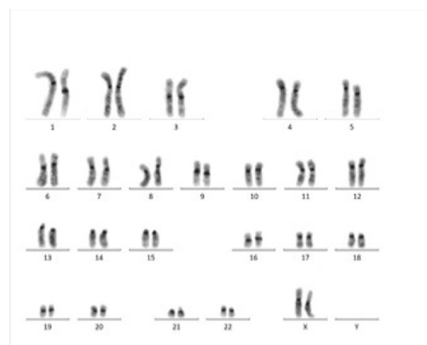


図 5. ゲノム編集細胞の DAPI gray karyotype inverted

肝細胞（hepatocyte）分化誘導をおこなった。免疫染色および qPCR により肝細胞マーカー遺伝子の発現を確認し、hepatocyte-like-cell（HLC）へ分化誘導できたことを確認した（図 6、7）。

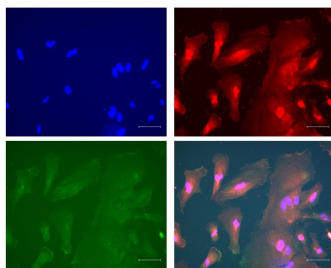


図 6. YA12-iPS-A6 から分化した HLC において Hepatocyte マーカの発現を確認
(Scale bar = 100 μ m)

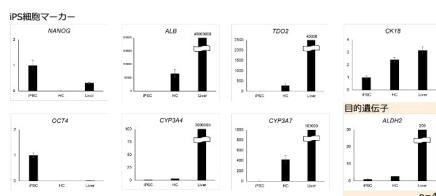


図 7. iPS 細胞よりも肝細胞マーカー発現量が上昇 (qRT-PCR)

これら HLC をもちいてアセトアルデヒドの添加実験をおこない、添加後の細胞における遺伝子発現変動遺伝子を検出する解析をおこなった (図 8)。

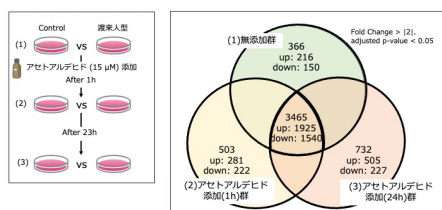


図 8. 派生型 ALDH2 遺伝子をもつ肝様細胞の発現変動遺伝子数

その結果、ALDH2 派生型アレルが、免疫刺激応答や癌と関連する可能性が示された。ALDH2 酵素が欠損することにより血中のアセトアルデヒド濃度が上昇することで生じる形質で、東アジアにおいて過去に派生型アレルに正の自然選択がはたらいたシグナルが多く、集団ゲノム解析で検出される。しかし、なぜ「お酒に弱い」表現型が子孫を多く残すことに有利であったかいまだ不明である。本研究では、この謎の解明に一步近づく実験系の構築を成し得た。今後は、縄文人アレルが現代日本人においてどのような生理的影響を与えるか、この細胞実験系をもちいて明らかにして行くことを新たな目標としている。

(完)

発表論文

- 1) Y. Nakamura, D. Waku, Y. Wakiyama, Y. Watanabe, K. Koganebuchi, T. Nagaoka, K. Hirata, J. Ohashi, R. Takahashi, M. Yoneda, H. Oota. (2024) Collagen of ancient bones gives an indication of endogenous DNA preservation based on the next-generation sequencing technology. *Anthropological Science* 132(2): 143-150. DOI: 10.1537/ase.240109
- 2) M. Imamura, R. Nakai, M. Ohnuki, Y. Hamazaki, M. Sato, Y. Harishima, M. Horikawa, M. Watanabe, H. Oota, M. Nakagawa, S. Suzuki, W. Enard. (2024) Generation of Chimpanzee induced pluripotent stem cell lines for cross-species comparisons. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - ANIMAL* 60(5):544-554. doi: 10.1007/s11626-024-00853-y.
- 3) L. Nishimura, A. Tanino, M. Ajimoto, T. Katsumura, M. Ogawa, K. Koganebuchi, D. Waku, M. Kumagai, R. Sugimoto, H. Nakaoka, H. Oota, I. Inoue. (2024) Metagenomic analyses of 7000 to 5500 years old coprolites excavated from the Torihama shell-mound site in the Japanese archipelago. *PLOS ONE* 19(1): e0295924. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0295924>
- 4) T. Nishimura, M. Motoi, H. Toyoshima, F. Kishida, S. Shin, T. Katsumura, K. Nakayama, H. Oota, S. Higuchi, S. Watanuki, T. Maeda. (2023) Endocrine, inflammatory and immune responses and individual differences in acute hypobaric hypoxia in lowlanders. *Scientific Reports* 13(1):12659. doi: 10.1038/s41598-023-39894-w.
- 5) K. Aoki, N. Takahata, H. Oota, J. Y. Wakano and M. W. Feldman. (2023) Infectious diseases may have arrested the southward advance of microblades in Upper Palaeolithic East Asia. *Proc. R. Soc. B* 290: 20231262. doi.org/10.1098/rspb.2023.1262
- 6) D. Waku, K. Koganebuchi, T. Gakuhari, M. Yoneda, O. Kondo, T. Masuyama, Y. Yamada, H. Oota. (2022) Complete Mitochondrial genome sequencing reveals double-buried Jomon Individuals excavated from the Ikawazu shell-mound site were not in a mother-child relationship. *Anthropological Science* 130(1): 39-45. doi.org/10.1537/ase.220129
- 7) M. Robbeets, R. Bouckaert, M. Conte, A. Savelyev, T. Li, D. An, K. Shinoda, Y. Cui, T. Kawashima, G. Kim, J. Uchiyama, J. Dolinska, S. Oskolskaya, K. Y. Yamano, N. Seguchi, H. Tomita, H. Takamiya, H. Kanzawa-Kiriyama, H. Oota, H. Ishida, R. Kimura, T. Sato, J. H. Kim, B. Deng, R. Bj, S. Rhee, K. D. Ahn, I. Gruntov, O. Mazo, J. R. Bentley, R. Fernandes, P. Roberts, I. R. Bausch, L. Gilaizeau, M. Yoneda, M. Kugai, R. A. Bianco, F. Zhang, M. Himmel, M. J. Hudson and N. Chao. (2021) Triangulation supports agricultural spread of the Transeurasian Languages. *Nature* 599(7886):616-621. doi: 10.1038/s41586-021-04108-8.
- 8) T. Sato, N. Adachi, R. Kimura, K. Hosomichi, M. Yoneda, H. Oota, A. Tajima, A. Toyoda, H. Kanzawa-Kiriyama, H. Matsumae, K. Koganebuchi, K.K. Shimizu, K. Shinoda, T. Hanihara, A. Weber, H. Kato, and H. Ishida. (2021) Whole-Genome Sequencing of a 900-Year-Old Human Skeleton Supports Two Past Migration Events from the Russian Far East to Northern Japan. *Genome Biology and Evolution* 13(9):evab192. doi: 10.1093/gbe/evab192.
- 9) H. Matsumae, P. Ranacher, P. E. Savage*, D. E. Blasig, T. E. Curriej, K. Koganebuchi, N. Nishidal, T. Sato, H. Tanabe, A. Tajima, S. Brown, M. Stoneking, K. K. Shimizu, H. Oota, and B. Bickel. (2021) Exploring correlations in genetic and cultural variation across language families in Northeast Asia. *Science Advances* 7(34):eabd9223. doi: 10.1126/sciadv.abd9223.
- 10) K. Koganebuchi, K. Sato, K. Fujii, T. Kumabe, K. Haneji, T. Toma, H. Ishida, K. Joh, H. Soejima, S. Mano, M. Ogawa, H. Oota. (2021) An analysis of the demographic history of the risk allele R4810K in RNF213 of moyamoya disease. *Annals of Human Genetics* 85(5):166-177. doi: 10.1111/ahg.12424.