

体細胞キメラのいろいろと
次世代シーケンシング法における
キメラ検出・キメラ割合の計算の
統計学的基礎

法数学勉強会

2020/01/25

京都大学(医)統計遺伝学分野

山田 亮

キメラ（キマイラ）

ブラック黒沢 2017年11月1日

モンスターペディア

ファンタジーモンスター図鑑



概要

キメラ（またはキマイラ、chimera）は、ギリシャ神話に登場するモンスターである。様々な動物が組み合わさった合成獣の代表的な存在としてよく知られている。

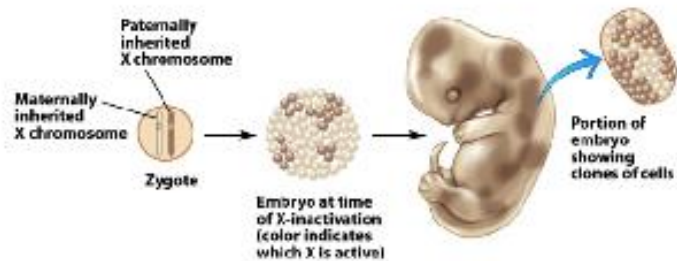
テュポーンとエキドナとの間に生まれた12体の子供のうちの一つで、兄弟にはケルベロスやヒュドラなどがある。

形態

ライオン頭に山羊の体、毒蛇の尻尾をもつものが典型的なキメラの姿である。ただし多種多様な亜種が存在するモンスターであるため、必ずしもこの限りではない。基本的にライオンの頭部をもつ合成獣がキメラと呼ばれるのが慣例とされている。

キメラ母とその仔

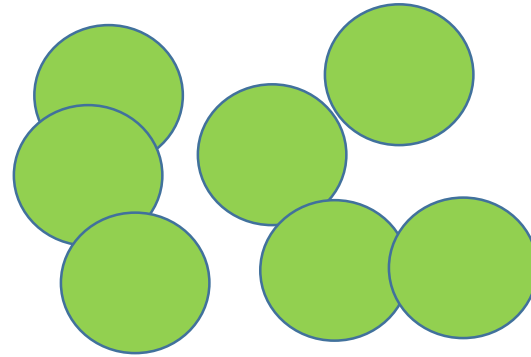
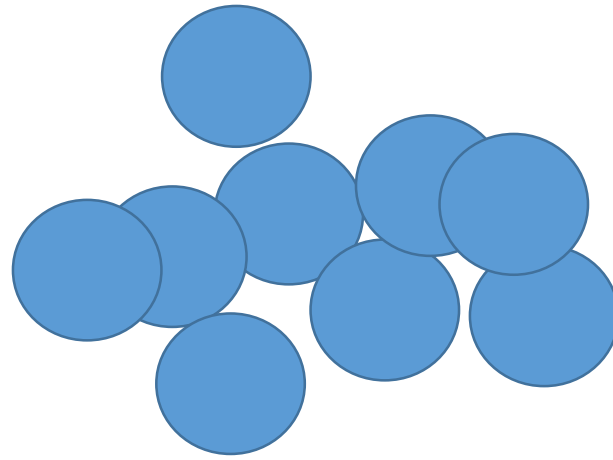
- 母
 - 場所によって白・黒、異なる
- 子1
 - 全身 黒
- 子2
 - 全身 黒



Source: Goldsmith LA, Katz SL, Gleichner BA, Poller AS, Leffell DJ, Wolff K: Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 8th Edition: www.accessmedicine.com

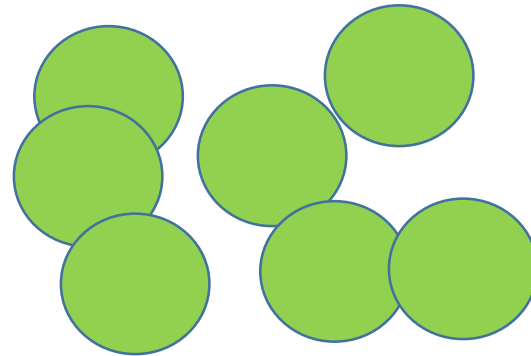
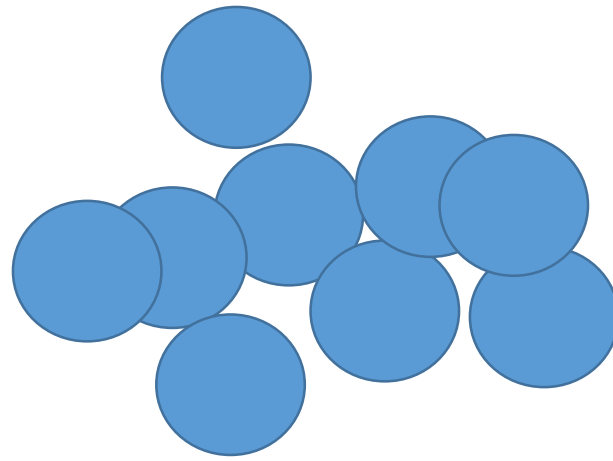
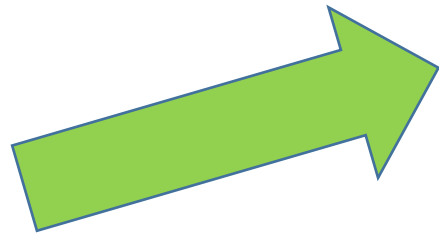
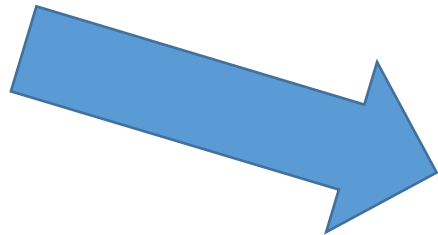
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

モザイクとキメラ



- 1 個の受精卵
- 発生途中で突然変異
- 身体の一部は青、他は緑
- これは体細胞モザイク

モザイクとキメラ



- 複数の受精卵
- 発生途中で混ぜ混ぜ
- 身体の一部は青、他は緑
- これはキメラ

加齢とモザイク化・その顕在化

- 多くの臓器・組織は、よく分化した細胞によって構成されている
- 細胞は新陳代謝する
- 新しい細胞は幹細胞から増殖・分化する

- 加齢とともに、各臓器・組織の幹細胞の数が減ってくる
- 若いときには目立たなかったモザイク割合が顕著になりうる
 - 隠れていたキメラも顕著になりうる
- 細胞増殖の速い臓器・組織で目立つ
 - 血液、消化管粘膜など

幹細胞移植・骨髄移植

- フル移植
 - すべての骨髄細胞を他人の骨髄に取り換える
- ミニ移植
 - 自己の骨髄細胞も残しつつ、他人の骨髄移植も同居させる
- 骨髄は完全に入れ替わる/キメラになる
- 骨髄幹細胞は他の臓器の幹細胞に変化することもできる
 - 他臓器・組織のキメラ化も起きる

Original Article | Published: 10 December 2018

The genetic profile of bone marrow transplant patients in different samples of forensic interest

[Elena Sanz-Piña](#), [Ana Santurtún](#) , [Javier Freire](#), [Javier Gómez-Román](#), [Mercedes Colorado](#) & [María T. Zarrabeitia](#)

Forensic Science, Medicine and Pathology **15**, 178–183(2019) | [Cite this article](#)

**Table 1. Total number of HCTs performed in the United States and reported to CIBMTR*
2013-2017**

	YEAR											
	2013		2014		2015		2016		2017		Grand Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Grand Total	19,699	19	20,224	19	21,487	20	21,839	21	22,863	22	106,112	100

*CIBMTR captures data from U.S. transplant centers for > 95% of allogeneic (unrelated and related) HCT. CIBMTR captures data for approximately 80% of autologous HCT performed in the United states -- these are reported voluntarily by HCT centers.

骨髄バンク登録状況（速報値）

	集計内容	集計値	説明
1	<u>ドナー登録者累計数</u>	815,251	骨髄バンク発足時から集計時点までに登録したドナー登録者の累計総数
2	ドナー登録者現在数	528,161	1から年齢超過の方や登録辞退された方を除いたドナー数
3	検索対象ドナー登録者数	388,510	患者さんのドナー候補者となりうるドナー数
4	11月ドナー登録者数	3,904	該当月に登録したドナー数
5	11月ドナー取消者数	1,766	該当月に年齢超過や本人申告等の理由で登録取消したドナー数
6	患者登録累計数	58,086	患者登録総数（再登録を含みます。）
7	患者登録現在数	1,960	6から登録取消者、移植実施者を除いた患者登録数 現在適合ドナーをさがしている、あるいはコーディネート中の患者さんの数
8	コーディネート対象ドナー数	318,476	患者さんとHLA型が適合し、コーディネートの対象となったドナー候補者の累計数 複数回適合した場合でもダブルカウントはしない
9	HLA適合患者数	46,193	HLA型の適合したドナー候補者が見つかった患者さんの数
10	<u>移植実施数</u>	23,868	骨髄バンクを介した移植実施数

- 米国が日本より圧倒的に多いというわけでもない
- 米国で気にする程度には日本でも気にする必要あり、か

Table 1 Chimerism analysis of 20 blood and nail samples of bone marrow transplant patients and some information concerning patients

Samples	Age of patient	Months from transplantation	Type of conditioning	GVHD	Donor DNA percentage	
					Blood sample	Nail sample
1	52	3	Non-myeloablative	Yes	100%	0,56%
2	55	5	Myeloablative	Yes	100%	1,63%
3	70	2	Non-myeloablative	No	93,7%	0,07%
4	42	1	Myeloablative	Yes	100%	7,90%
5	53	4	Non-myeloablative	Yes	100%	29,46%
6	67	4	Non-myeloablative	Yes	100%	1,57%
7	67	5	Myeloablative	No	98,7%	19,45%
8	71	3	Non-myeloablative	No	93,80%	18,32%
9	59	1	Non-myeloablative	No	89,9%	0,68%
10	45	1	Myeloablative	No	100%	5,05%
11	57	1	Myeloablative	No	99%	14,94%
12	65	3	Non-myeloablative	No	97,8%	3,20%
13	60	1	Non-myeloablative	Yes	98,1%	0,66%
14	68	1	Non-myeloablative	No	99,7%	4,06%
15	57	1	Myeloablative	No	100%	1,25%
16	55	9	Non-myeloablative	No	98,4%	23,31%
17	67	4	Non-myeloablative	No	99,1%	21,26%
18	58	2	Non-myeloablative	No	96,97%	3,56%
19	70	4	Non-myeloablative	No	97,24%	2,28%
20	50	3	Non-myeloablative	No	100%	0%

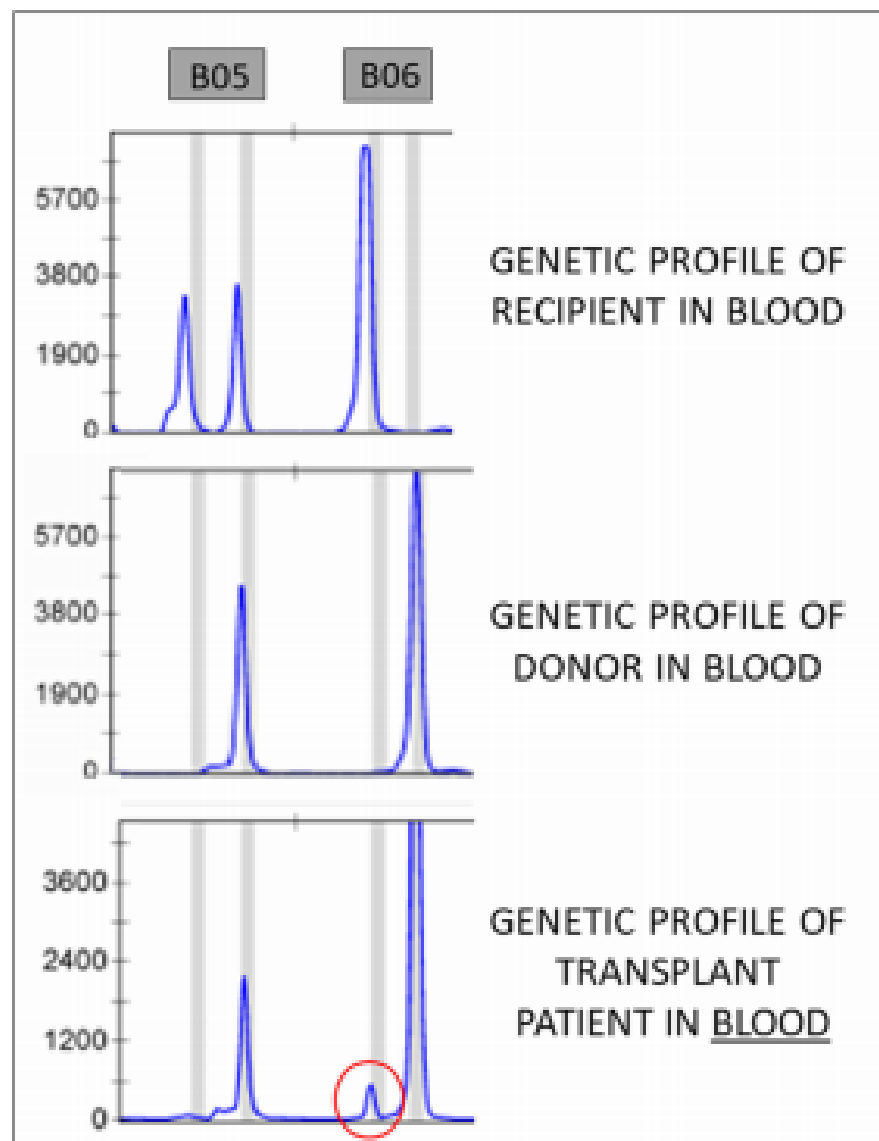
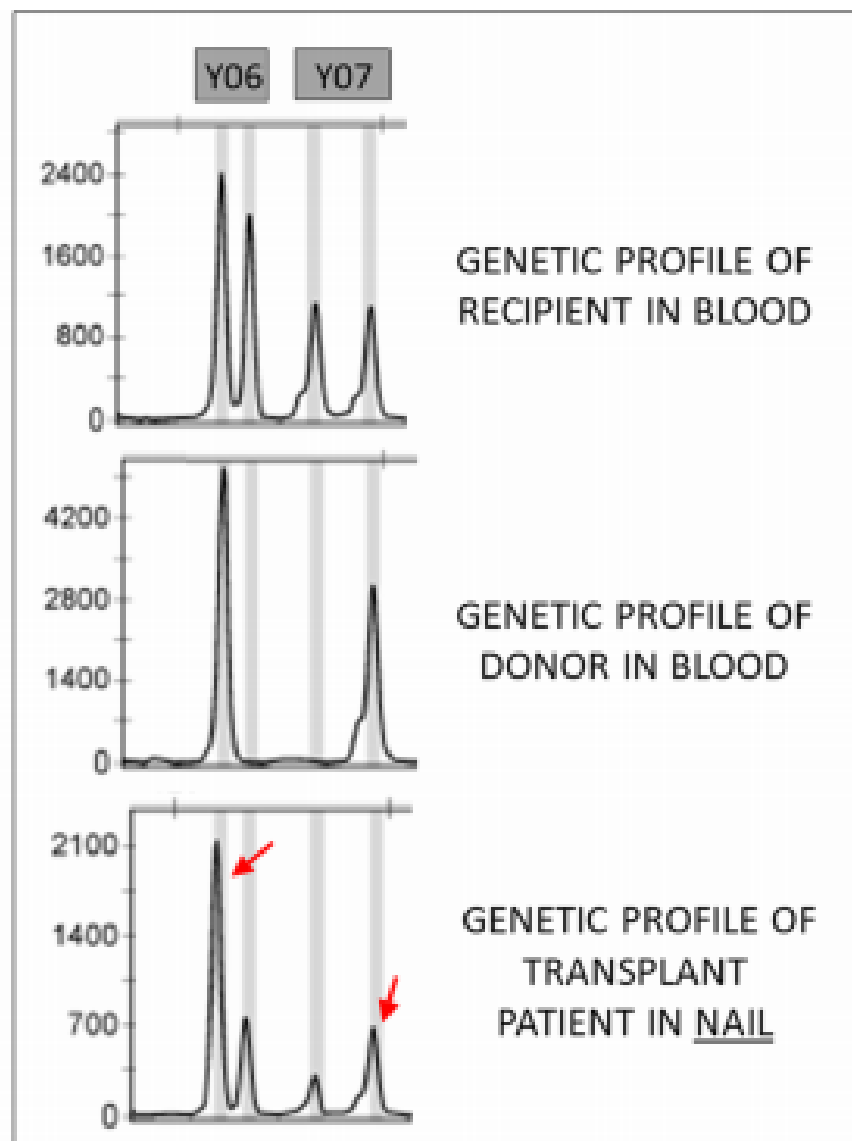
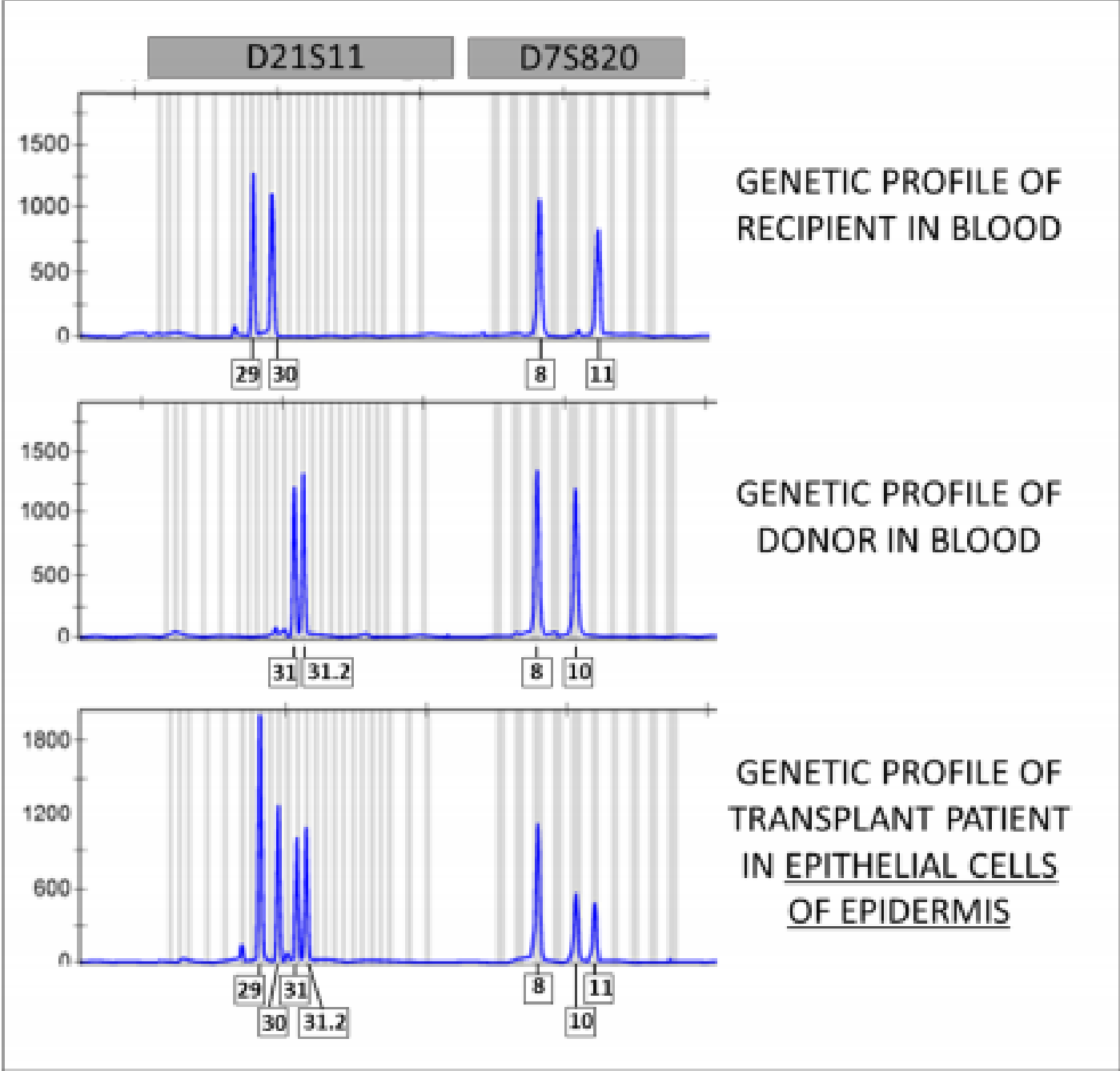


Fig. 1 Visualization of some InDels (of the 38 analyzed) extracted from electropherograms of blood and nail samples belonging to bone marrow transplant patients, including the donor and recipient's genotypes. The blood sample of the transplant patient shows a peak corresponding to the receptor allele (red circle), so this sample contains both receptor and



donor DNA. The nail sample of the transplanted patient shows very disbalanced peaks (alleles that has in common with donor are much higher than the receptor alleles), that indicates presence of donor DNA in this nail sample. Both cases present chimerism

Fig. 2 Visualization of D21S11 and D7S820, 2 autosomyc STRs (of the 15 analyzed), extracted from an electropherogram of epithelial cells of an epidermis sample from a bone marrow transplant patient, and the donor and recepients genotypes. In the sample of epithelial cells of epidermis, the two loci possess peaks of both donor and receptor. Therefore, this sample shows chimerism



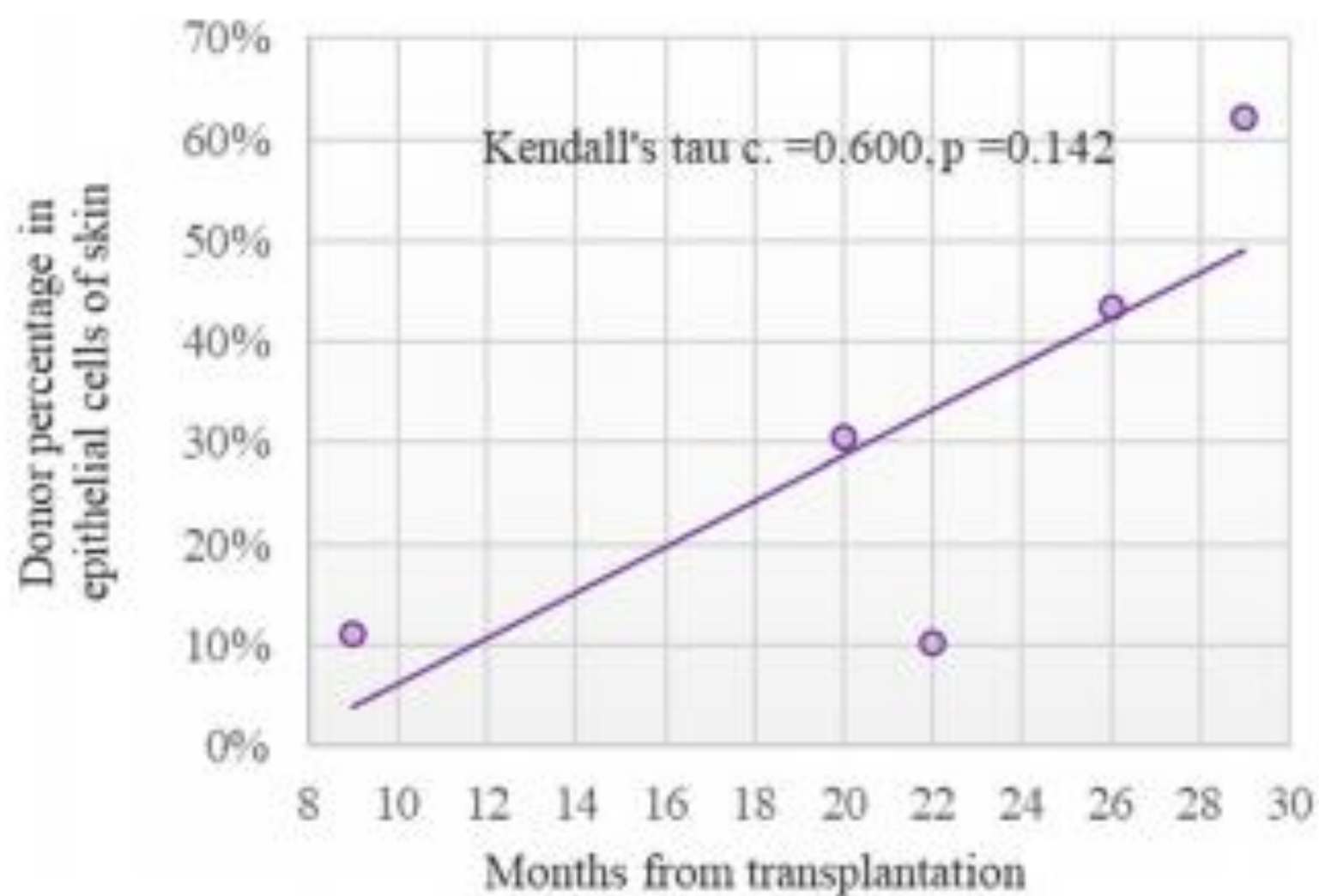


Fig. 3 Comparison between the time elapsed from transplantation and the percent donor chimerism in samples of skin epithelial cells isolated in cutaneous biopsy of bone marrow transplanted patients

先天的キメラ～双子の血液はキメラ


- 1 卵性双生児の 2 人は、DNA鑑定的に同一
- 2 (複)卵性双生児の 2 人は、DNA鑑定的に他人(同胞)
- 「血液だけのキメラ」 Hematopoietic chimerism
 - 2 (複)卵性双生児であっても、骨盤で血球の混合が起きるので、2 (複)卵性双生児の造血細胞はキメラであることがある
 - 割合はいろいろ

『双子キメラ』

A case of chimerism-induced paternity
confusion: what ART practitioners can do to prevent
future calamity for families

Authors

Authors and affiliations

Kayla M. Sheets , Michael L. Baird, Julie Heinig, Debra Davis, Mary Sabatini, D. Barry Starr

- 発生初期には 2 (複)卵性双生児だったが、片方が発生初期死亡し、その細胞が生き残った胎児と一緒にになると、「生まれ」は双生児では「ない」が細胞はキメラ
- 妊娠が多胎妊娠であったことが確認されたうえで、1 人だけが生まれることはある
- 妊娠判明時には、1 子として判明したが、遡ってどうだったかはわからないこともある
 - 一人っ子出産 8 件あたり 1 件は双生児妊娠というデータもある
 - 割合はいろいろ

四配偶子キメラ Tetragametic chimerism

- 1個の卵子 + 1個の精子 = 1個の受精卵
- もう1個の卵子 + もう1個の精子 = もう1個の受精卵
- 2個の受精卵が合わさって、1人として発生・出生する

生殖補助医療と双対キメラの増加

- 関連があるかどうか、不明
- 原理的に、増加要因の可能性は否定できない

2. 生殖補助医療による出生児数の推移

年	生殖補助医療出生児数(人)	総出生児数(人)	割合(%)
2007年(H19)	19,595	1,089,818	1.80
2008年(H20)	21,704	1,091,156	1.99
2009年(H21)	26,680	1,070,035	2.49
2010年(H22)	28,945	1,071,304	2.70
2011年(H23)	32,426	1,050,806	3.09
2012年(H24)	37,953	1,037,231	3.66
2013年(H25)	42,554	1,029,816	4.13
2014年(H26)	47,322	1,003,539	4.71
2015年(H27)	51,001	1,005,677	5.07
2016年(H28)	54,110	976,978	5.54

(注: 生殖補助医療出生児数は、新鮮胚(卵)を用いた治療数と凍結胚(卵)を用いた治療数の合計(日本産科婦人科学会の集計による)。総出生児数は、人口動態統計による。

厚生労働省資料(H30/11/28)『生殖補助医療を巡る現状について』

キメラ・モザイクとDNA鑑定

- 相当数の細胞数を採取してマーカータイピングをする場合
 - 混合試料様の結果になる
- 親子鑑定の際の、「親側」がキメラ・モザイクである場合には、卵巣・精巣が「どちら側」かによる。「伝達遺伝情報はキメラ」ではない
- 微量試料の場合は、試料を構成する細胞のキメラ・モザイク比率にランダムなばらつきの影響が大きく出る



キメラ・モザイクのジェノタイプ判定

- 小児科領域の、メンデル型遺伝病で、モザイク判定・モザイク比率推定が課題となった
- 「いかにもあるタイプのメンデル遺伝病だ」が親に原因変異がない
 - → de novo 変異型（配偶子に新規に起きた原因突然変異による）
 - 調べれば原因変異であることがすぐわかる

キメラ・モザイクのジェノタイプ判定 2

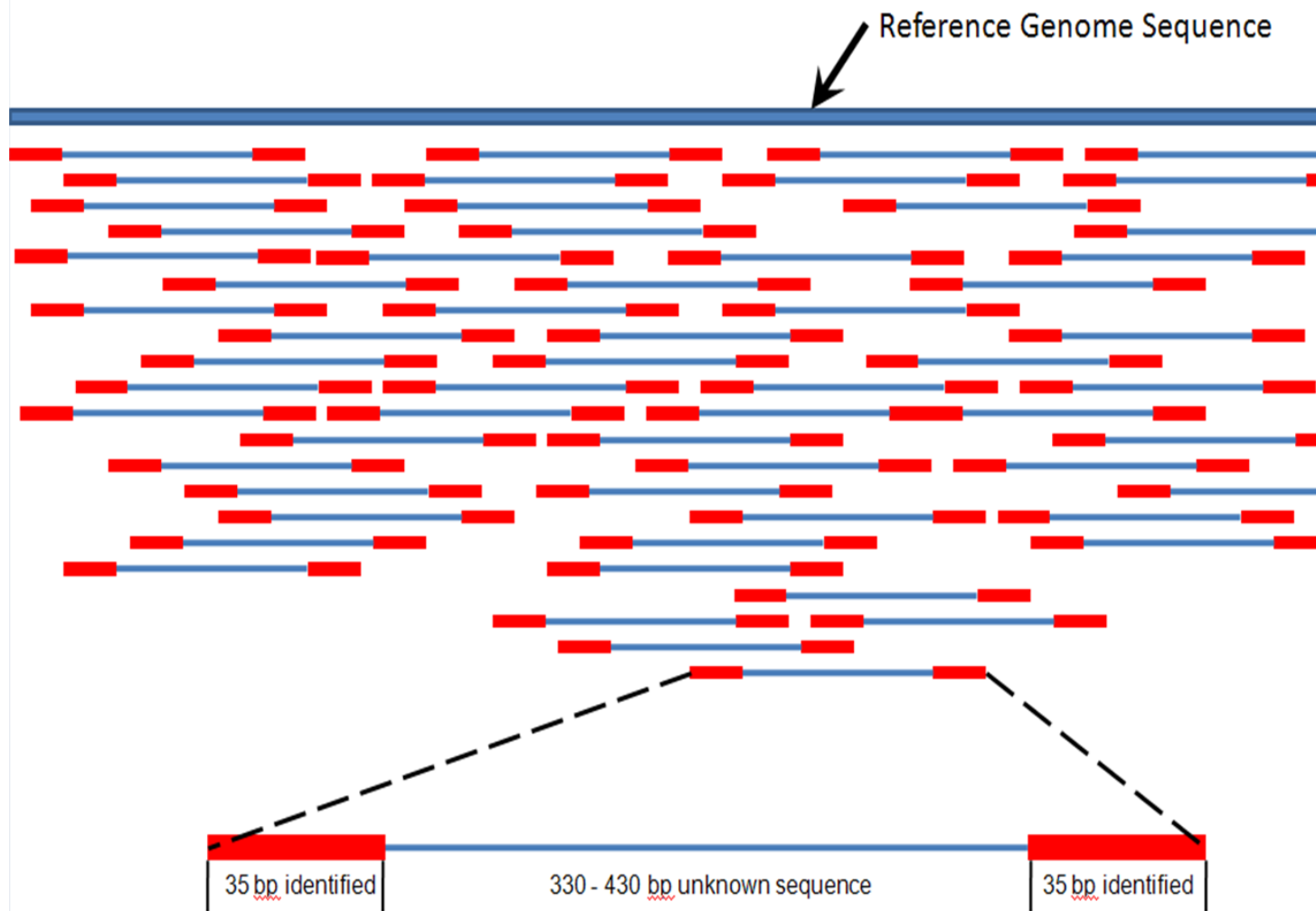
- 「メンデル遺伝病っぽいが、症状が軽く、言い切れない。親にも原因変異がない
 - → 発生途上で原因変異が起こり、患児は原因変異あり・なしのモザイクだった（発生時体細胞変異型）
 - ジェノタイプが、MM, Mm, mm の3タイプだと思って探しても見つからない
 - M が80%、m が20% とかだったりする
- 通常のジェノタイピング法では判定しづらかった
- 次世代シーケンサーを使ったら、80% vs. 20%の推定もできた
 - お金もかかったが・・・

ここから数学

- 次世代シーケンサーを用いたジェノタイプ判定と、モザイク率・キメラ率の推定

シーケンサーデータ

- ショートリード
- マッピング
- 値は、0,1,2,...

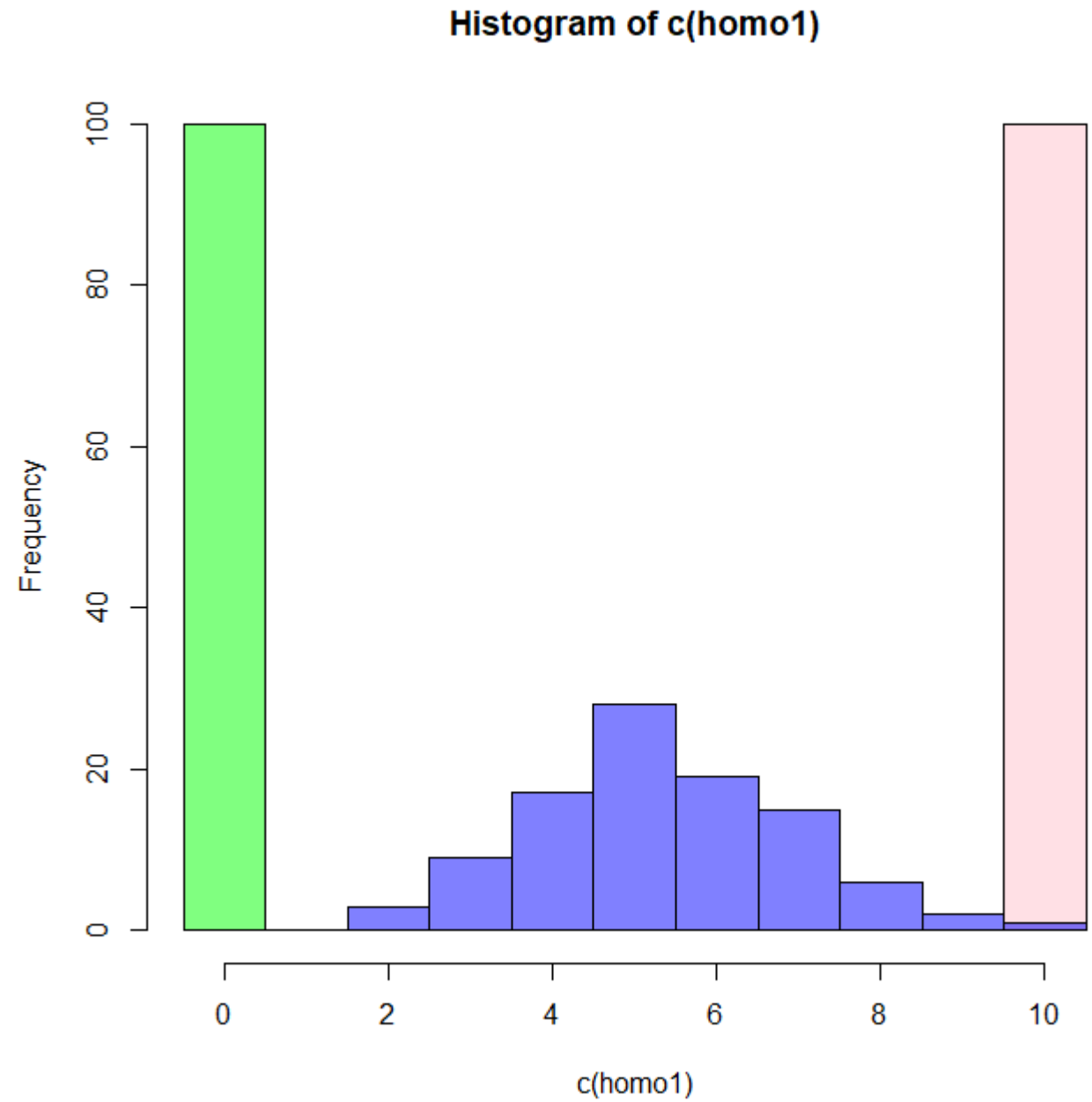


ホモかヘテロか

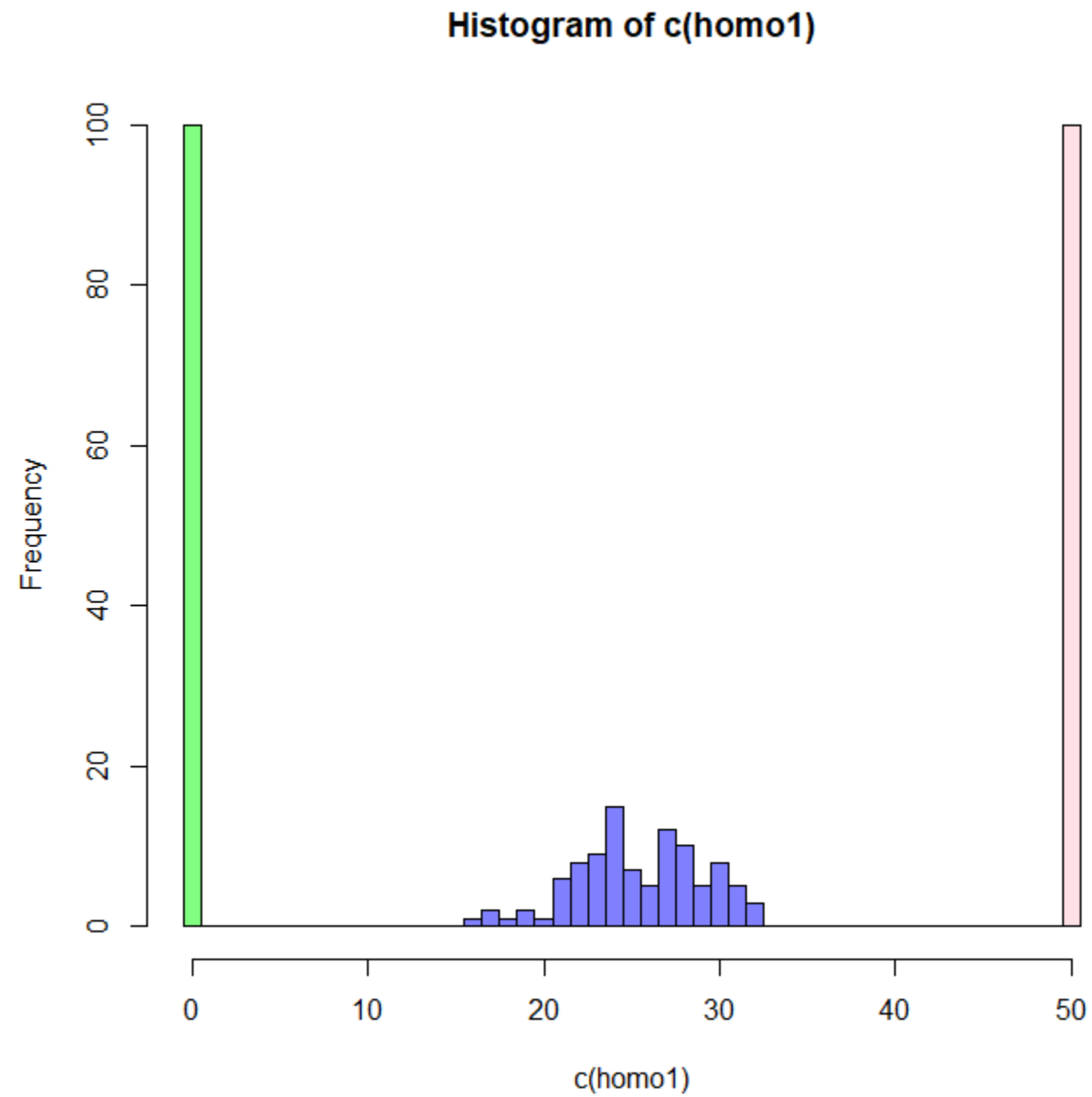
調べたい場所に必要マップ本数

- 0本 $(A,G) = (0,0)$
- 1本 $(A,G) = (1,0), (0,1)$
- 2本 $(A,G) = (2,0), (1,1), (0,2)$
- 3本 $(A,G) = (3,0), (2,1), (1,2), (0,3)$
- . . .
- N本 $(A,G) = (N,0), (N-1,1), \dots, (N/2, N/2), \dots, (1, N-1), (0, N)$

Read depth = 10



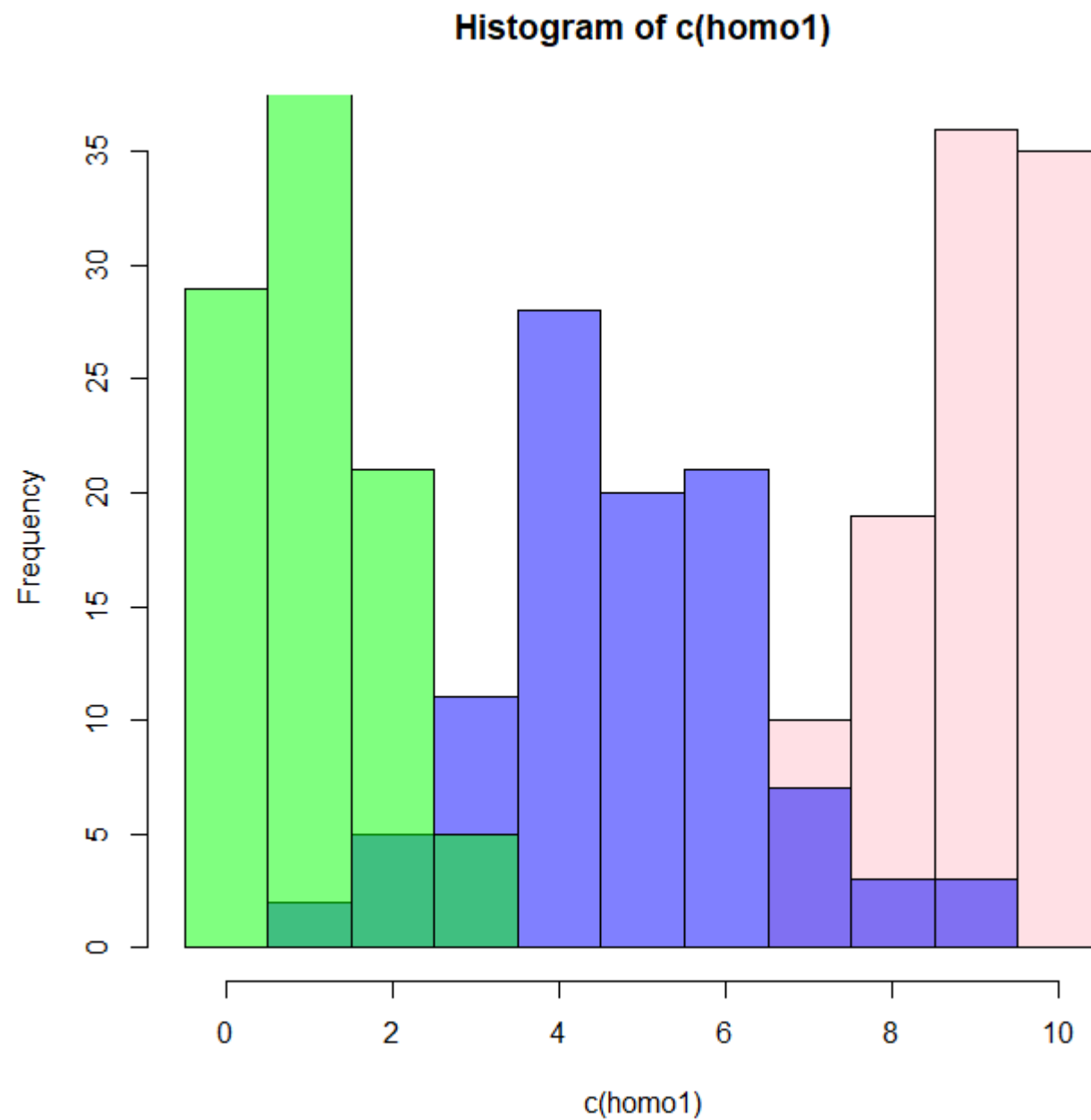
Read depth = 50



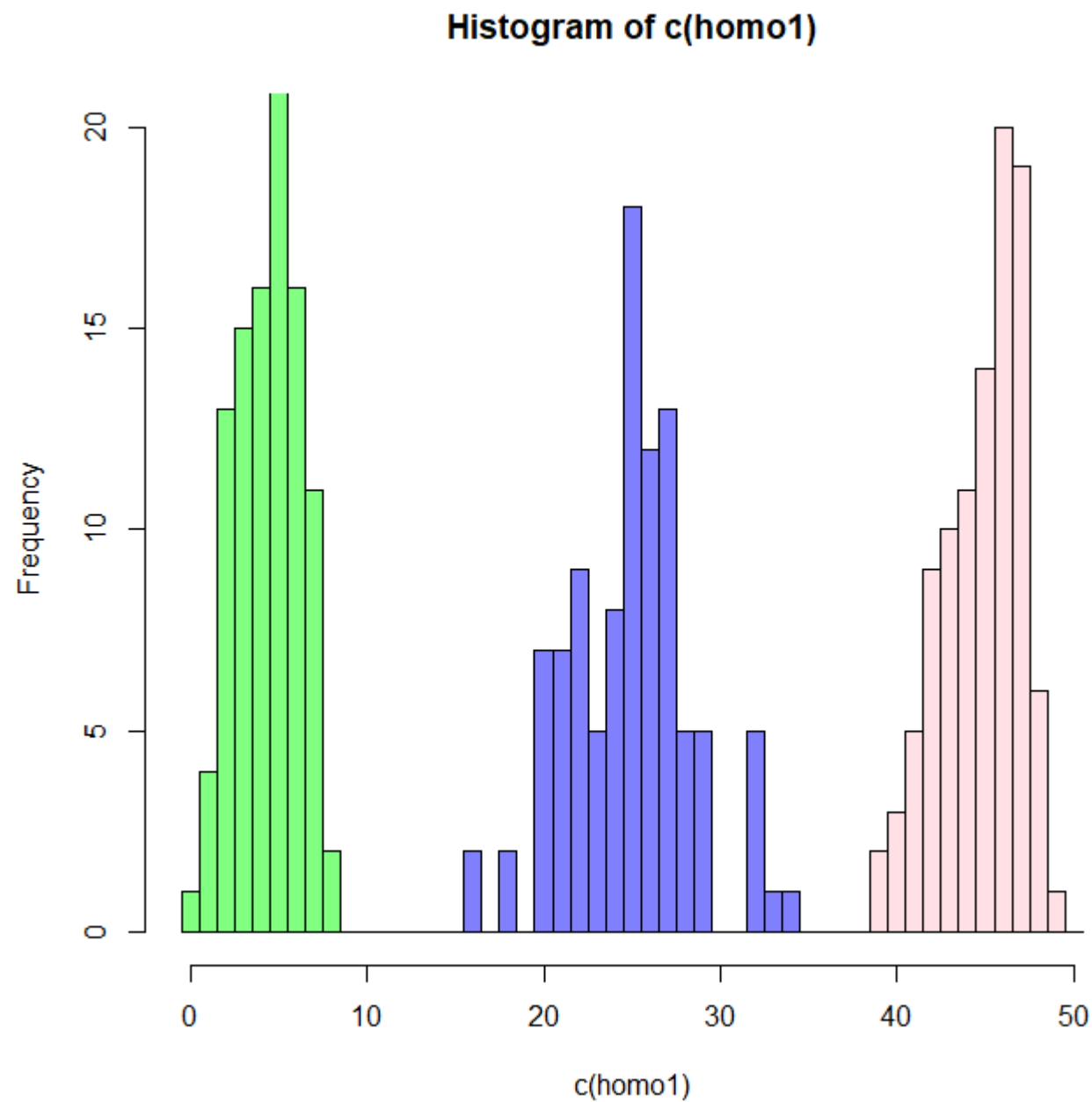
ホモ接合体のときの N の内わけ ヘテロ接合体のときの N の内わけ

- 分布
 - 「コールエラー確率」の想定が必須
- そのうえで、「十分な尤度比」が出る総リード数と
 - ホモとみなすべき内わけと
 - ヘテロとみなすべき内わけと
 - 決められない内わけと

Read depth = 10
コールエラー率 0.1



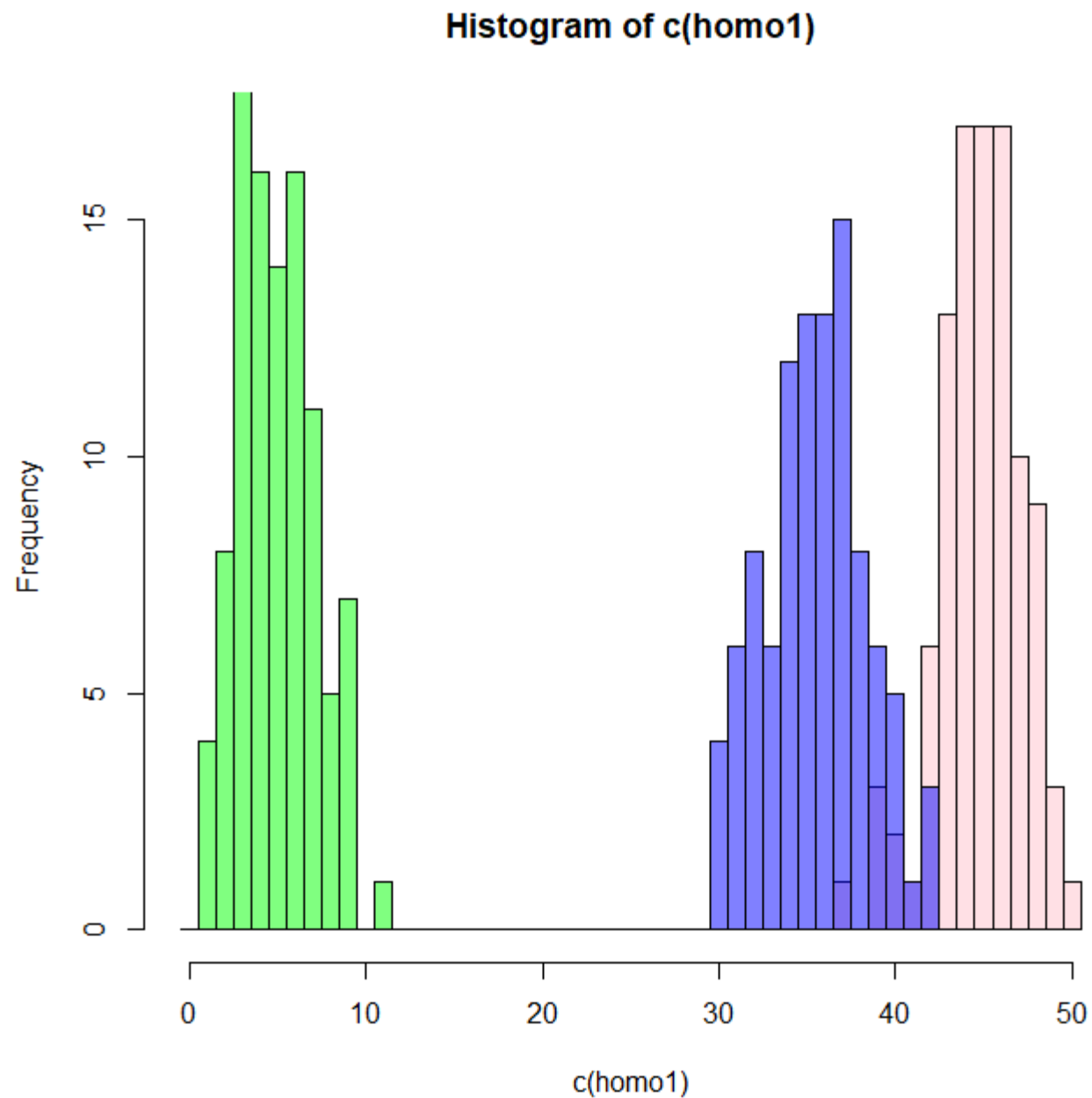
Read depth = 50
コールエラー率 = 0.1



ホモ・ヘテロ・逆ホモ 1 : 0.5 : 0 ... は簡単

- キメラ・モザイクだと…
 - 1 : r : 0
 - r は未知
 - r の想定が0.5からずればずれるほど、判定は難しくなる
 - 判定が難しいとは、デプスを深くする必要があることを意味する
 - デプス = お金
- キメラ・モザイクでも「ホモ接合体」かもしれないし…

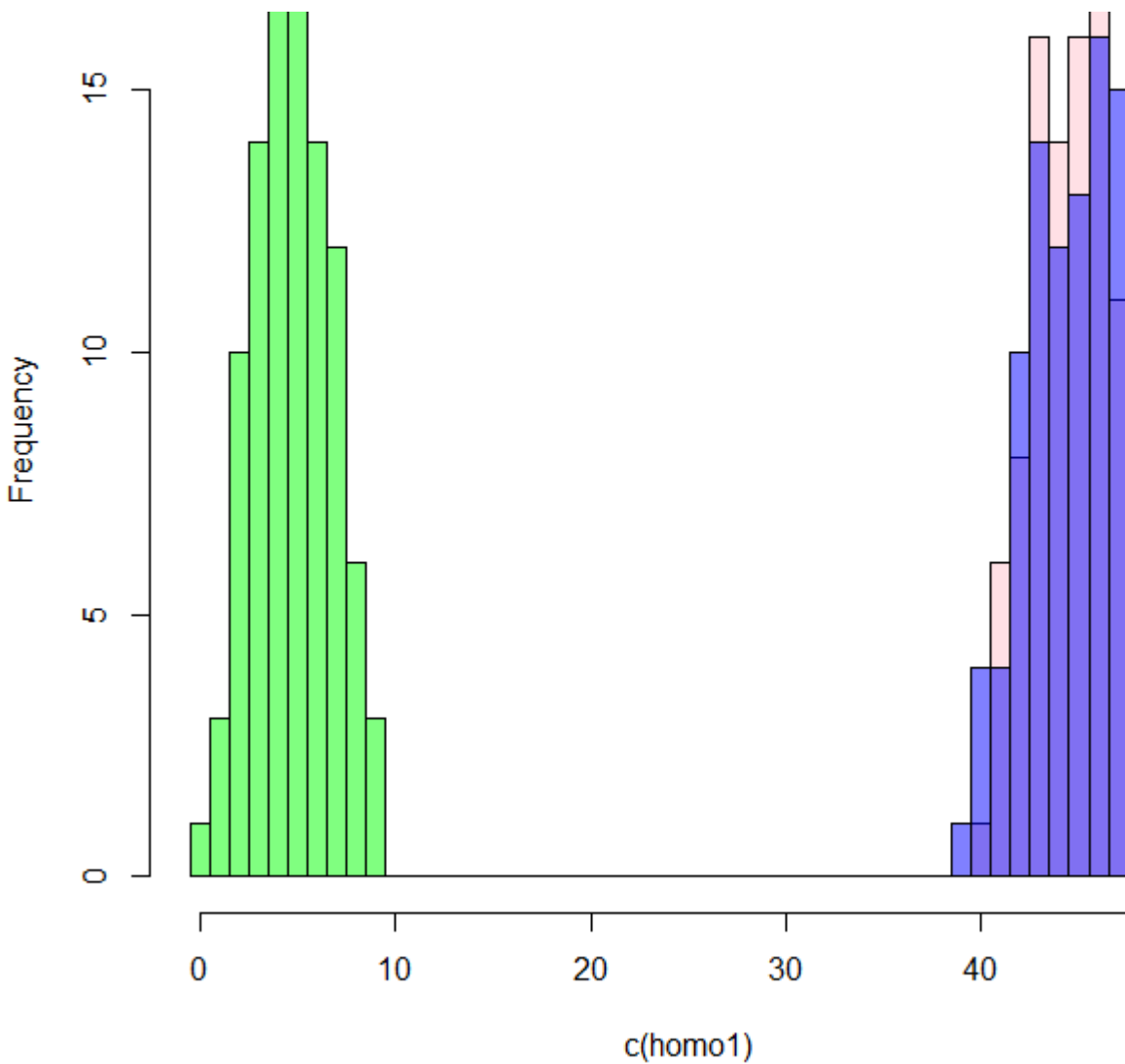
Read depth = 50
コールエラー率 = 0.1
モザイク率 = 0.3



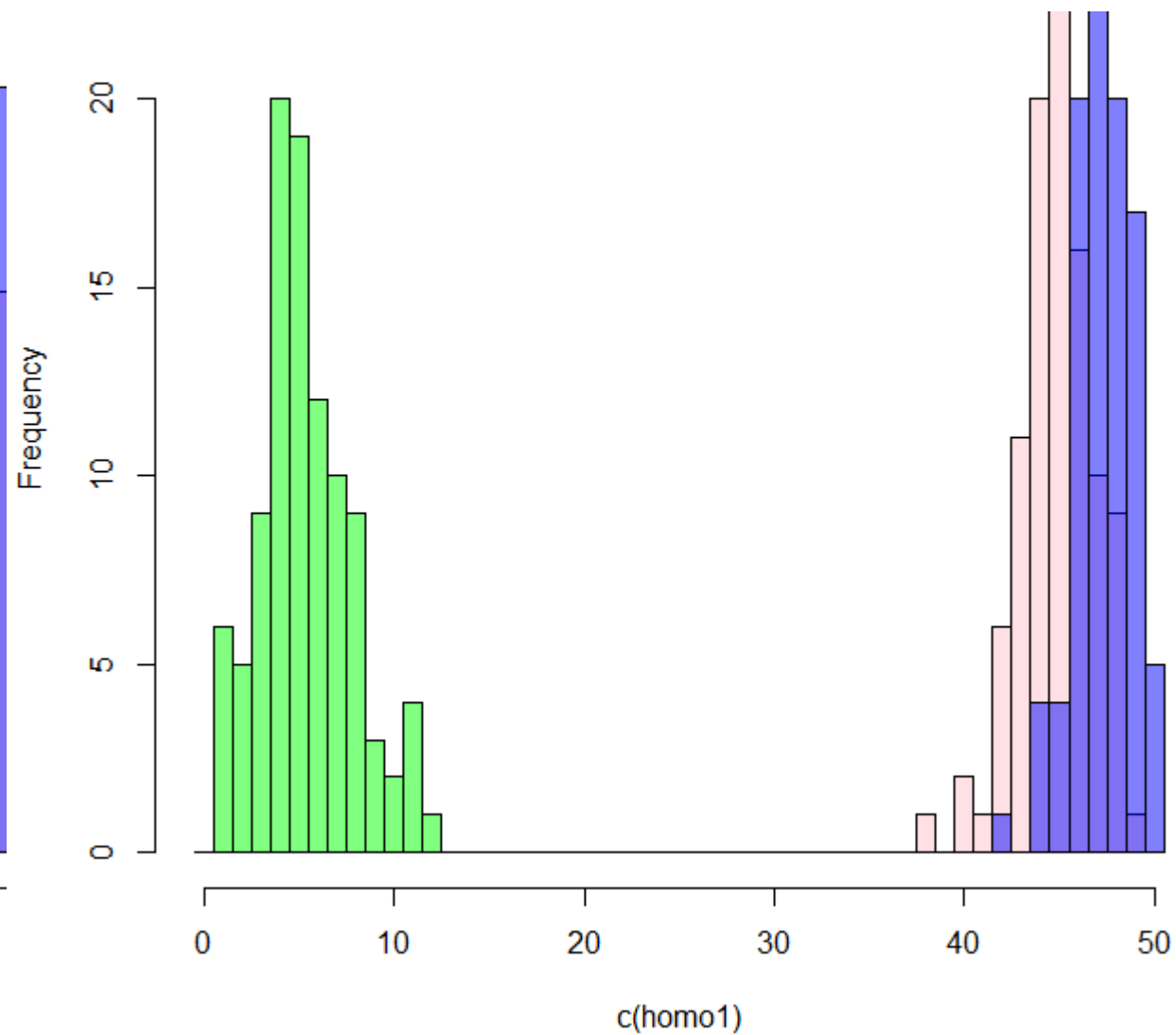
キメラ・モザイクではなく
混合試料だとしたら？

- 混合比は不明
- かなり低いかも

Read depth = 50
コールエラー率 = 0.1
混合率 = 0.1



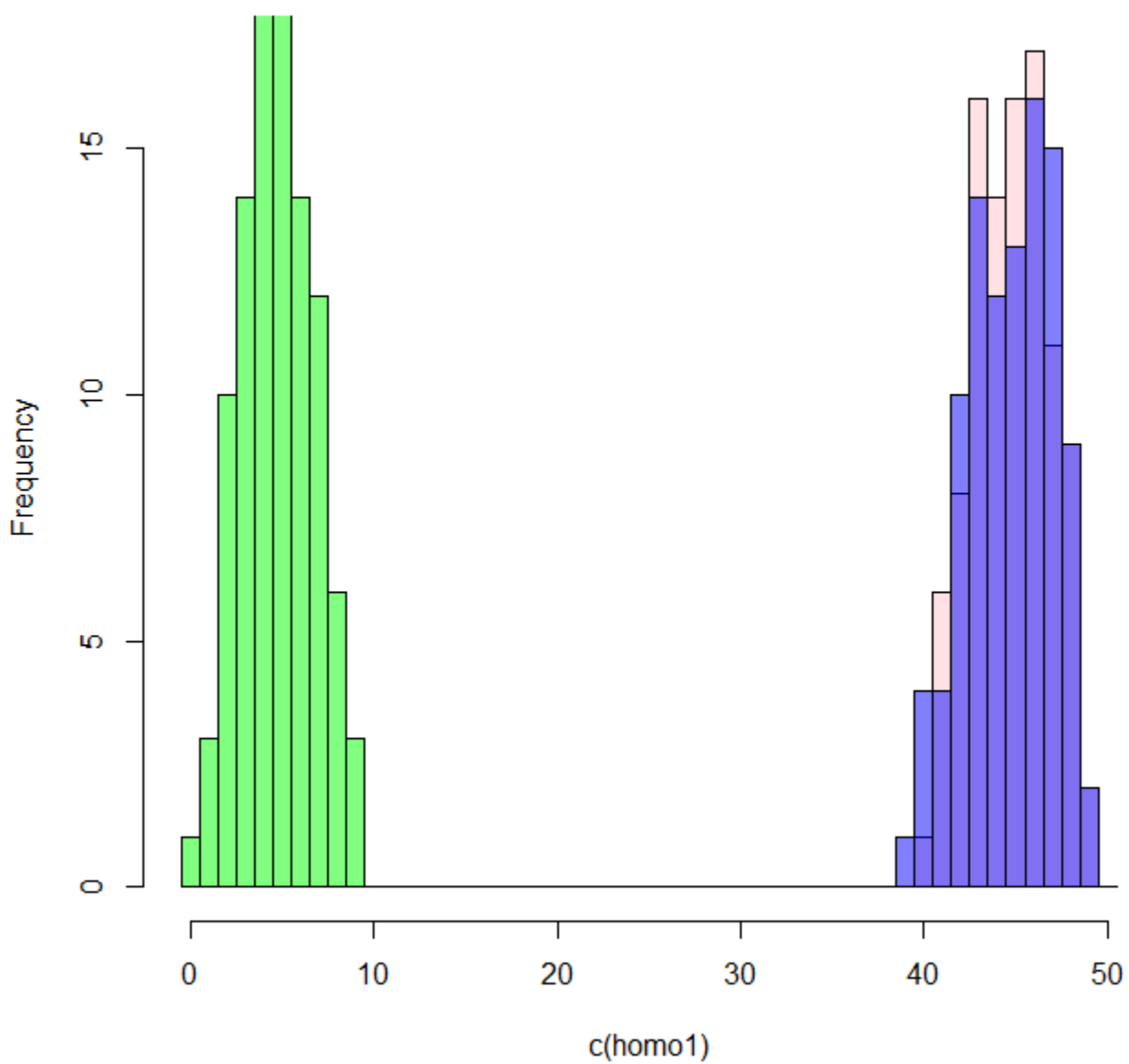
Read depth = 50
コールエラー率 = 0.1
混合率 = 0.05



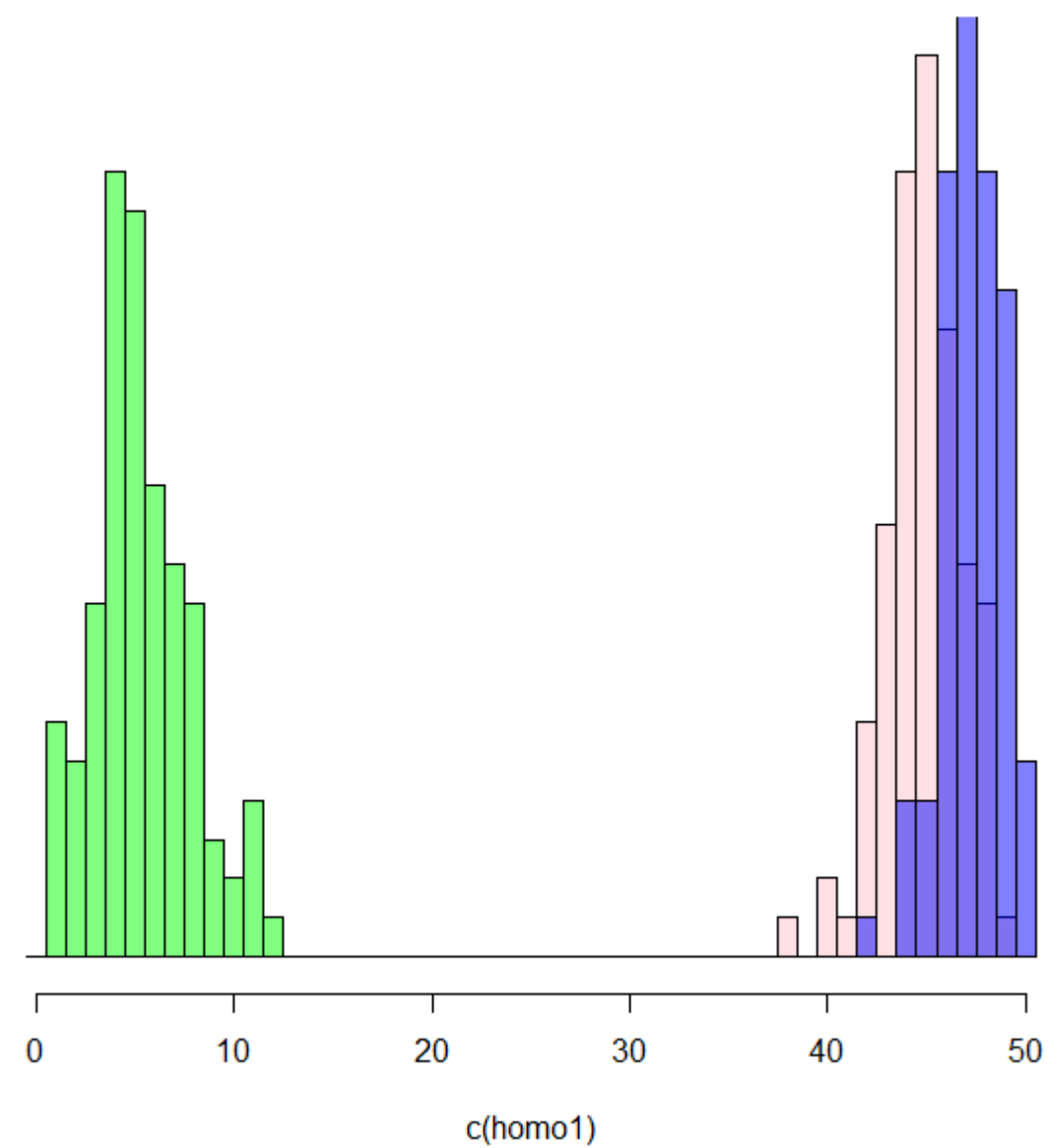
1 か所ではなくて、そこから中調べたい？

- 混合比はゲノムの座位によって異なるかも

Histogram of c(homo1)



Histogram of c(homo1)



全ゲノムをちゃんと調べたい

- 場所によってマップされるリード本数にばらつきが出る
- 0, 1, 2, 3, . . .
- ? 分布 ?

マップ本数の分布

- ポアソン分布
- 負の二項分布

「最低限でもこれだけのデプス」を確保したい

- ゲノムの9割を 10 デプス以上でカバーしたい
- ポアソン分布
 - 必要なリード全本数は？
- 負の二項分布
 - 必要なリード全本数は？
 - どちらがたくさん必要？ = どちらが高額？

今日のまとめ

- 体細胞キメラ
 - 生理的なもの
 - 現代医療由来のもの
 - 珍しいが、遭遇しない、というほどのものではない
- 混合試料判定と重複する考え方が必要
- シークエンサー利用を想定して考える場合に必要な数学
 - 二項分布とその分離
 - コールエラー率
 - 混合比
 - リードデプスがコントロールできないこと

本日のヒストグラムに用いたソース

<https://gist.github.com/db10913b64d4d0955e2cc36b13995d4d.git>



本日のスライド



<https://github.com/ryamada22/atom/blob/master/Lectures2019/chimeraNGStyping2020Jan.pdf>