

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06921

研究課題名(和文) シングルセル遺伝子発現解析による細胞運命決定のメカニズム解明

研究課題名(英文) Dissecting Cell Fate Decision by Single Cell Genomics

研究代表者

渡辺 亮 (Watanabe, Akira)

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教

研究者番号：60506765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：シングルセル遺伝子発現解析を行い、細胞分化過程で遷移する遺伝子発現を擬似的にリアルタイムで観察し、(2)細胞分化の分岐点を同定することで、細胞の多様性を生み出す細胞の運命決定のメカニズムを明らかにすることを目的としシングルセルRNA-seqを実施した。時系列のATAC-seq及びバイオインフォマティクスを含めた多層解析によって、心筋分化に寄与する新規の候補転写因子を同定した。さらに、遺伝子発現状態の複雑さをエントロピーを用いて定量化することで胞の成熟度を測定する手法を開発し、相対的に成熟した心筋細胞が特異的に発現する膜表面タンパク質を同定した。

研究成果の概要(英文)：Human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes show promise for clinical application. To reach this potential, however, improved maturity and reduced cellular heterogeneity of in vitro differentiated cardiomyocytes is needed. Here, we addressed transcriptional heterogeneity in induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived cardiomyocytes (iPSC-CMs) by single-cell RNA sequencing. We successfully defined differentiation states at the single-cell level and clarified heterogeneities in the gene expression patterns of iPSC-CMs, especially those cultured over long periods. We developed a novel maturation index to perform in silico sorting and score the maturation level of the cells. Additionally, we identified a new cell surface marker of mature iPSC-CMs by which we could enrich well-matured iPSC-CMs from a heterogeneous population of iPSC-CMs. Our single-cell RNA sequencing approach could help clarify variation of in vitro differentiated cells.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：シングルセル 遺伝子発現 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒトは単一細胞である受精卵から発生し、数百種類からなる約 60 兆個の体細胞へと分化する。全てのヒトは同じ臓器を持つことからわかるように、その分化は極めて厳密に行われている。これまでに、マウスの *in vivo* の解析から、多能性幹細胞から種々の細胞系譜へどのように分化されるかを示すマップが作製されてきた。ポディプランの過程で初期胚は三胚葉に分化し、さらに種々の臓器を構成する細胞へと分化する。そして、培養過程で加える因子を変えることで、多能性幹細胞から神経細胞や血液、心筋細胞などへ分化誘導する *in vitro* の実験系が確立されてきたが、分化を制御する分子メカニズムについて依然不明なことが多い。例えば、途中まで同一の分化経路をたどる血液細胞と心筋細胞の分岐点を制御するメカニズムは明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、(1) シングルセル RNA-seq によって、細胞分化過程で遷移する遺伝子発現を擬似的にリアルタイムで観察し、(2) 細胞分化の分岐点を同定することで、細胞の多様性を生み出す細胞の運命決定のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) iPS 細胞から血液細胞へ分化遷移状態にある細胞のシングルセル遺伝子発現解析
まず、iPS 細胞から内胚系細胞への分化誘導を行い、分化遷移状態で濃度の異なる分化誘導因子を添加することで血液細胞と心筋細胞の各々が分化する条件を決定する。血液細胞または心筋細胞へ分化する過程で変化する遺伝子発現をシングルセル RNA-seq で観察する。

2) 主成分分析による細胞サンプルの分化系列への並べ替え

iPS 細胞から造血幹細胞への分化過程にある各シングルセル細胞の遺伝子発現状態を主成分分析によって次元圧縮して表示することで、分化度に従った細胞サンプルの並び替えを実施する。既報にある分化マーカーの発現との比較を行い、並び替えが妥当であるか評価を行う。データ取得済みである iPS 細胞から心筋細胞系譜への分化誘導過程における遺伝子発現と同時に主成分解析することで、心筋細胞と血液細胞の分化分岐点の同定を試みる。

3) バイオインフォマティクスを用いた心筋細胞と血液細胞の分岐点の同定
前年度で同定した分化分岐点における細胞の遺伝子発現変化を詳細に解析する。血液系細胞と心筋細胞の分化分岐点にある細胞について、シングルセル RNA-seq のデータを用いたバイオインフォマティクスによって、各々の系譜へ分化し始める遺伝子発

現変化を捉える。具体的には、Gene Set Enrichment Analysis(GSEA)や Tukey 検定を用いた統計解析等によって、二つの細胞系譜に入り始めた細胞各々で特異的に発現する遺伝子群の特徴を抽出する。

4) 分化制御に関わるゲノムワイドなエピゲノム制御の解析

分化分岐点で発現変動する遺伝子群について、実験及びバイオインフォマティクスによって、上流シグナルを推測する。まず、3) において変動する遺伝子群の上流に共通して存在する転写因子結合部位 (TFBS, transcription factor binding site) をバイオインフォマティクスによって探索し、分化分岐点を制御するマスター因子を同定する。次に、分化分岐点でクロマチン状態の異なる領域を、シングルセル ATAC-seq (Assay for Transposase Accessible Chromatin using sequencing) を行い、オープンクロマチン状態の異なる領域を検出し、その領域に存在する TFBS から転写制御機構の推定を行う。

4. 研究成果

シングルセル遺伝子発現解析を行い、細胞分化過程で遷移する遺伝子発現を擬似的にリアルタイムで観察し、(2) 細胞分化の分岐点を同定することで、細胞の多様性を生み出す細胞の運命決定のメカニズムを明らかにすることを目的とした。iPS 細胞から心筋細胞へ遷移する過程で変化する転写ダイナミクスを観察するために、分化誘導後 0, 3, 5, 7, 9, 21, 30 日後の 20 個以上の細胞に対してシングルセル RNA-seq を実施した。さらにその転写制御機構を明らかにするために時系列の ATAC-seq を行うことでクロマチンが開いている領域を決定した。バイオインフォマティクスを含めた多層解析によって、心筋分化に寄与する新規の候補転写因子を同定した。さらに、遺伝子発現状態の複雑さをエントロピーを用いて定量化することで細胞の成熟度を測定する手法を開発した。その結果、分化誘導後 21 及び 30 日目で観察される心筋細胞の成熟度の違いをシングルセルレベルで描写することに成功し、相対的に成熟した心筋細胞が特異的に発現する膜表面タンパク質を同定した。この表面抗原を指標に濃縮された細胞集団は電気生理的及び細胞構造的に成熟した心筋細胞であることが示された。さらに本研究課題で開発したシングルセル遺伝子発現解析の技術を用いて、臨床応用に用いる網膜色素上皮細胞の性質をシングルセルレベルで評価を行った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 9 件)

1. Mandai M*, Watanabe A*, Yamanaka S et al. (*筆頭著者、2 番目/39 名中) First-in-human

Clinical Study of Transplantation of Autologous iPSC-Retinal Pigment Epithelial Cell Sheet for Wet Age Related Macular Degeneration. *N Eng J Med* 376:1038-1046, 2017

2. Sugiyama H, Watanabe A, Yamanaka S et al. (9 番目/10 名中) Nat1 promotes translation of specific proteins that induce differentiation of mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114:340-345, 2017

3. Imamura K, Watanabe A, Inoue H et al. (3 番目/36 名中) The Src/c-Abl pathway is a potential therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Transl Med*. 9:eaaf3962, 2017

4. Kato I, Watanabe A, Enver T et al. (25 番目/27 名中) Hypoxic adaptation of leukemic cells infiltrating the CNS affords a therapeutic strategy targeting VEGFA. *Blood*. 129:3126-3129, 2017

5. Yahata Y, Watanabe A, Tsumaki N et al. (13 番目/15 名中) Pterostatin B prevents chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis in mice by inhibiting SIK3. *Nat Commun*. 7:10959, 2016

6. Samata B, Watanabe A, Takahashi J et al. (6 番目/9 名中) Purification of functional human ES and iPSC-derived midbrain dopaminergic progenitors using LRTM1. *Nat. Commun*. 7:13097, 2016

7. Sekine K, Watanabe A, Sasaki H et al. (7 番目/10 名中) Global Landscape and Regulatory Principles of DNA Methylation Reprogramming for Germ Cell Specification by Mouse Pluripotent Stem Cells. *Dev. Cell*, 39: 87-103, 2016

8. Nishizawa M, Watanabe A, Yoshida Y et al. (15 番目/18 名中) Epigenetic Variation between Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines Is an Indicator of Differentiation Capacity. *Cell Stem Cell*, 19: 341-354, 2016

9. Kitazawa K, Watanabe A, Masui S et al. (11 名中/16 名番目) OVOL2 Maintains the Transcriptional Program of Human Corneal Epithelium by Suppressing Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cell Rep.*, 15:1359-1368, 2016

〔学会発表〕(計 2 2 件)

1. 渡辺 亮：シーケンシングテクノロジーが支える再生医療・発生生物学。日本大学学部連携研究推進シンポジウム 2017 年 2 月 東京
2. 渡辺 亮：次世代シングルセルマルチオミクス解析で迫る細胞運命の理解と疾患研究。第 39 回分子生物学会 2016 年 12 月
3. Akira Watanabe: Digitalizing Transcription by Single Cell Transcriptomics. 13th MicRO Alliance 2016 年 11 月 京都
4. 渡辺 亮：臨床応用へ向けたゲノムシーケンスに求めるバイオインフォマティクス。第 5 回生命医薬情報連合大会 2016 年 9 月 29 日 東京
5. 渡辺 亮：シングルセルマルチオミクス解析による細胞個性の深層理解「筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の新規治療法開発をめざした病態解明」平成 28 年度ワークショップ 2016 年 9 月 東京
6. 渡辺 亮：次世代シングルセル解析が明らかにする細胞社会学。JASIS2016 ライフサイエンスイノベーション 2016 年 9 月 東京
7. 渡辺 亮：次世代シングルセル解析の実際。第一回慶應義塾大学共利研ラウンジフォーラム 2016 年 8 月 東京
8. 渡辺 亮：再生医療分野で活用される次世代シーケンサー。イルミナ ゲノムサミット 2016 年 6 月 東京
9. 渡辺 亮：シングルセル解析によって

可視化する臓器の発生過程．第 64 回日本輸血・細胞治療学会 2016 年 4 月 京都

10. 渡辺 亮：細胞の個性を理解する 次世代シングルセル解析 -発生から創薬まで-．第 15 回再生医療学会 2016 年 3 月 横浜

11. 渡辺 亮：「転写シグナルをデジタル化する次世代シングルセル解析」．東京農業大学先端研究プロジェクト発表会 2016 年 1 月 東京

12. 渡辺 亮：C1 システムを用いた様々な応用例：細胞運命の決定から創薬スクリーニングまで．CDB テクノロジーセミナー．2015 年 12 月 神戸

13. 渡辺 亮：臓器の発生過程を可視化するシングルセル遺伝子発現解析．第 38 回分子生物学会年会．2015 年 12 月 神戸

14. 渡辺 亮：シングルセル遺伝子解析が明らかにするヒト発生過程における細胞運命の決定．第 67 回日本生物工学会大会．2015 年 10 月．鹿児島

15. 渡辺 亮：臓器の発生過程を可視化するシングルセル遺伝子解析．第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会．2015 年 10 月．富山

16. Akira Watanabe: The Single Cell Epigenetics Dissects Cell Fate Specification. Top Global University Japan, 1st Joint Symposium of International Partners. 2015 年 10 月．京都

17. Akira Watanabe: Single Cell Transcriptome Analysis Dissects Cell Fate Specification. 第 53 回生物物理学会年会．2015 年 9 月．金沢

18. 渡辺 亮：シングルセル遺伝子解析による細胞運命決定の解明．東海大学マイクログロ・ナノ啓発会第 5 回学術講演会．2015 年 8 月．神奈川

19. 渡辺 亮：将来の臨床現場を支える次世代エピゲノム解析．イルミナ西日本ユ

ーザーミーティング 2015．2015 年 8 月．京都

20. 渡辺 亮：臓器の発生過程を可視化するシングルセル遺伝子解析．第 26 回臨床口腔病理学会総会学術集会．2015 年 7 月．北海道

21. 渡辺 亮：シングルセル遺伝子解析で明らかにする細胞運命：次世代創薬研究として．東海地区創薬支援研究交流会 2015．2015 年 5 月．名古屋

22. 渡辺 亮：シングルセル遺伝子発現解析の実際．イルミナシングルセルセミナー．2015 年 5 月．東京

〔図書〕(計 1 件)

1. 渡辺 亮：「シングルセル遺伝子発現解析による多能性幹細胞研究」 医学のあゆみ「一細胞遺伝子解析 (油谷浩幸編)」 258, 305-10. 2016 年 7 月発行

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
渡辺 亮 (WATANABE, Akira)
京都大学・iPS 細胞研究所・特定拠点助教
研究者番号：60506765

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()