

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09926

研究課題名（和文）ハイスループットシングルセル RNAシーケンスによる残存病変の解析

研究課題名（英文）Analysis of residual disease using newly developed single cell RNA sequencing.

研究代表者

中川 正宏（Nakagawa, Masahiro）

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号：10431850

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：造血器腫瘍の難治化の主要な要因である、腫瘍内多様性に生じる難治性クローンの解析のため、高感度に変異を同定可能な、新しい単一細胞解析手法を開発した。本手法を用いて、造血器腫瘍の検体や、非血液疾患の高齢者の骨髄由来の造血前駆細胞の解析を行った。クローン拡大の初期の観察では、変異を有するクローン以外の一見正常な骨髄の造血前駆細胞にも特徴的な形質変化を認めた。このことはクローン拡大には、そのクローンに有利な環境が重要であることを示唆するものであり、新たな治療介入の実現に対する重要な知見と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した、高感度にドライバー変異を同定可能な単一細胞RNAシーケンス技術の適用範囲は極めて広い。変異細胞を区別して解析可能なため、腫瘍の初期発生から、多様な変異を有する細胞が混在する腫瘍内多様性の解析などで、変異の及ぼす細胞自律性の影響だけでなく、腫瘍細胞と環境の相互作用などの非細胞自律性の解析も可能となる。腫瘍のクローン進化のさらなる理解と新規の治療法の開発に向けた大きな意義ある一歩であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We have developed a new single-cell analysis platform that can identify mutations with high sensitivity for the analysis of refractory clones in intratumor heterogeneity, which is a major factor in the therapy resistance of hematological malignancies. Using this method, hematopoietic progenitors derived from the bone marrow of healthy individuals or patients with hematological malignancies were analyzed. We found that apparently normal hematopoietic progenitors show aberrant expression profiles compared to normal cells in healthy controls without driver mutations. These results suggest that a favorable environment for the clone is important for their expansion and was considered to be an important finding for the realization of a new therapeutic intervention.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：単一細胞解析 白血病 骨髄異形成症候群

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群 (MDS) や急性骨髄性白血病 (AML) をはじめとした造血器腫瘍は難治性であり、いったん治療に反応してもその多くは再発し、治療抵抗性となる。その大きな要因として、腫瘍の多様性があげられる。同一個体内において、腫瘍は様々な遺伝子異常を持つ複数のクローンから成り立っている。それらのクローンは時間経過とともにさらなる遺伝子異常を獲得していくが、増殖能の高いもの、あるいは個体が受けた治療に対する抵抗性の強いものが残存・増殖し、腫瘍全体としての治療抵抗性の獲得・高悪性度化につながっていく。この難治性のクローンの進展を標的とすることが可能であれば、造血器腫瘍に対する治療における格段の進展が期待される。

白血病が治療に反応し、寛解状態と成った場合、骨髄内の多くの細胞は正常細胞で占められている。しかし、その後再発するため、寛解時にわずかに白血病が残存していると考えられる。この残存病変を標的として除去することができれば、白血病治療のもっとも大きな障害の一つである再発を防ぐことができる。微小残存病変がなぜ治療を逃れて残存できるのかについては未だ明らかでないが、骨髄微小環境の寄与が示唆されている。

また、近年高齢者の末梢血や白血病症例の残存正常造血幹細胞において、機能的な異常は明らかでないものの白血病遺伝子異常を有する、前白血病クローンの存在が示されており、寛解時にも様々な段階の遺伝子異常を持つクローンが少量ずつ残存していることが予想される。

### 2. 研究の目的

本研究では多数の正常骨髄細胞の中に存在する、少数の遺伝子異常を有する異常クローンを同定・解析し、(1)どのような遺伝子異常を有するクローンが存在するのか、(2)そのようなクローンはそれぞれどのような遺伝子発現パターンをとるのか、(3)その遺伝子発現からクローン特異的な表面マーカーを特定し、バイオマーカーとしてソートが可能にできるか、(4)それぞれのクローンにおいて治療標的可能なシグナルは存在するか、を明らかにして、白血病再発を引き起こす、残存病変を標的とした白血病再発を防ぐ治療の確立を目的とした。

なお、変異を有する細胞を分離・純化することは不可能であるため、上記目的達成のためには、変異細胞を区別・解析可能な、新たな単一細胞解析技術の開発を新規に行うことが必要であった。

### 3. 研究の方法

多数の細胞を解析可能な単一細胞 RNA シーケンスでは、mRNA の 3'端のみシーケンスするため、ほとんどの遺伝子変異情報は失われてしまう。そこで我々は症例の変異領域を全長 cDNA の時点から増幅し、増幅領域と、細胞を識別するバーコードが存在する 3'端を結合させ、“バーコード近接化メイトペアライブラリ”の作製を行い、全長 cDNA の一部を用いて変異を同定する計画であった。

予め全エクソンあるいはパネルシーケンスを行った症例を解析に用いた。次世代シーケンサーでシーケンスを行った後、変異を持つ細胞と持たない細胞間で遺伝子発現パターンを比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) 変異と発現を同時に同定可能なハイスループット単一細胞シーケンス技術の開発

##### 1 既存の単一細胞シーケンス技術の評価

まず既存の単一細胞 RNA シーケンス技術での遺伝子変異の同定感度の評価を行った。多くの細胞を解析可能な系では、mRNA の 3'端のみ解析し、シーケンスのデータ量を抑制することでランニングコストを低く保っている。そのためシーケンスリードは 3'端に偏り、ほとんどの領域の変異は解析不可能であった。ただし、興味深いことに dT プライマーのミスアニーリングにより、3'端以外の領域の一部は浅くシーケンスデータが得られていた。全長 mRNA を解析する系でも変異の解析を行ったが、通常解析されるシーケンスの深度では mRNA 全体の深度は低く、特に発現量は遺伝子によって大きく異なるため、変異の同定感度は予想に反して非常に低いものであった。

##### 2 当初予定していたバーコード近接化メイトペアライブラリ法の開発

上述の結果からやはり、シーケンスコストを抑えることと変異領域のシーケンス深度を十分にとる必要があることから、我々の計画通り 3'端シーケンスによる遺伝子発現と、特定の変異領域の増幅による変異同定は理にかなっていると判断した。しかし、逆転写後の全長 cDNA からの、3'端の細胞識別バーコードと変異領域を含む PCR 効率是非常に低く、変異領域を増幅するプライマー投入のタイミング変更などによって改善は得たものの、依然十分な増幅効率が得られず、実験手法を見直すこととした。

##### 3 細胞バーコードを付加した変異領域プライマーによる新規手法開発

上記のメイトペア法で期待した効率が得られなかったため、実験系の再検討を行った。マイクロビーズを用いた系、マイクロウェルを用いた系、およびマイクロ流体を用いた系を比較検討し、より柔軟な仕様変更に対応しているマイクロ流体の系を用いることとした。遺伝子発現は当初の計画通り、データ量とコストを低減し、解析細胞数を増加させるためにメッセンジャーRNA の 3'端を解析した。遺伝子変異は変異の近傍にプライマーを設計し、メッセンジャーRNA と同じ細胞バーコードを付加したブ

プライマーを設計して加えることにより増幅を行った。プライマーの濃度や変異からの距離、PCR産物の長さなどの最適化を行い、最終的に変異部分の増幅に成功した。この実験系を用いて、造血器腫瘍で高頻度に認められるドライバー変異を有する細胞株と有しない細胞株との解析を行ったところ、高感度にドライバー変異を同定することが可能であった。同時に、遺伝子発現プロファイルの同定も可能であった(図1)。

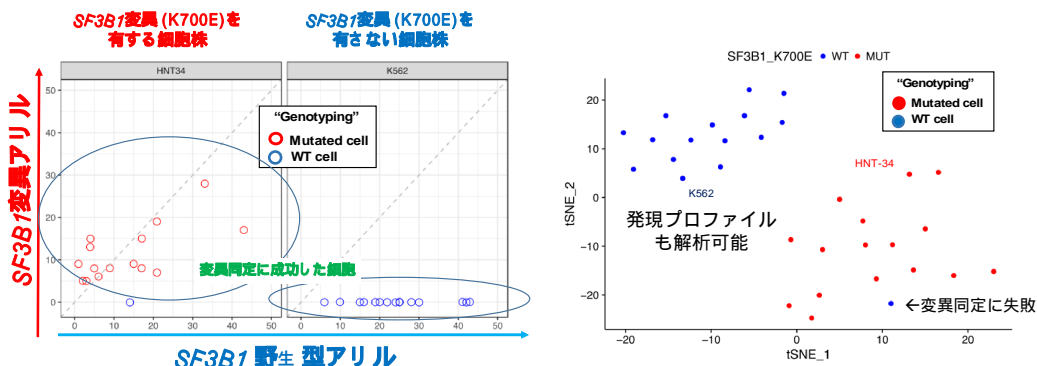


図1 細胞株での単一細胞での変異と発現の同定

4 ゲノムDNAの利用による高感度変異同定の実現

継続した実験系の最適化により、細胞株より遺伝子発現が全体的に低い凍結骨髄検体についても、発現量の高い遺伝子の変異部位増幅に成功した。しかし、発現量の低い遺伝子の増幅効率は乏しかった。そこでさらに改良を進め、適切なプロテアーゼ処理を加えることにより、ゲノムDNAも変異部位の増幅に利用することで、変異同定感度の著しい改善を得ることが可能となった(図2)。

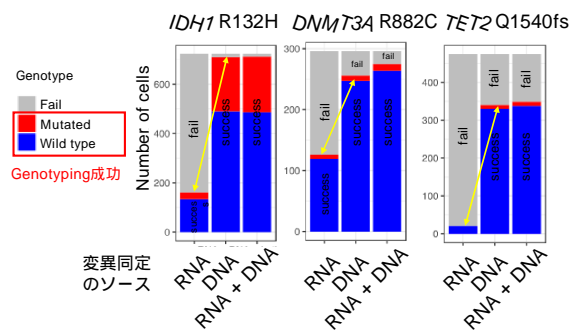


図2 ゲノムDNAを用いた高感度変異同定

(2) 開発した新規単一細胞解析手法を用いた臨床検体の解析

1 健常高齢者のクローン造血の解析

高齢者では高率(70歳代で約10%)に、白血病で高頻度に認められるドライバー変異が末梢血で検出される(クローン造血)。多くの正常細胞と共存する変異細胞の拡大の病態を理解するのに適しており、本研究で解析を行った。興味深いことに、クローン拡大の初期の観察では、変異を有するクローン以外の一見正常な骨髄の造血幹細胞・前駆細胞にも特徴的な形質変化を認めた。このことはクローンが拡大する際には、そのクローンに有利な環境が重要であることを示唆するものであり、新たな治療介入の実現に対する重要な知見と考えられた(Nakagawa et al. 日本血液学会 2019)。

2 化学療法後の腫瘍残存例での解析

TP53変異を有する難治性の白血病症例で、化学療法治療後に腫瘍が残存している症例の解析を行った。二度の化学療法後いずれの時点でも腫瘍が残存しており、時点2でより腫瘍の割合が増加しているが、興味深いことに正常細胞でも未分化前駆細胞の割合が時点2で増加しており、骨髄環境の変化が示唆される所見であった(Nakagawa et al. 米国血液学会 2018)。

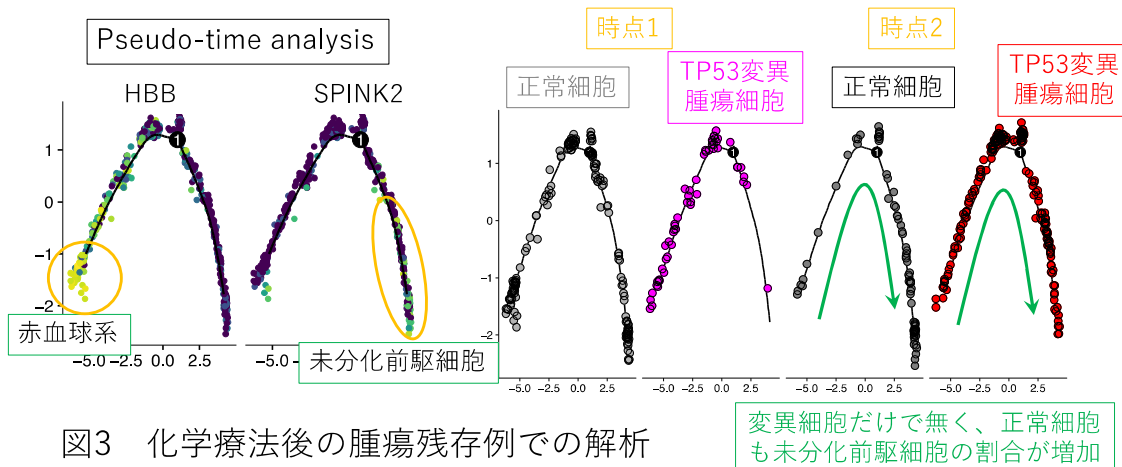


図3 化学療法後の腫瘍残存例での解析

変異細胞だけでなく、正常細胞も未分化前駆細胞の割合が増加

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1 . 発表者名 Ryosaku Inagaki, Masahiro M Nakagawa, Yasuhito Nannya, Xingxing Qi, Zhao Lanying, June Takeda, Akinori Yoda, Ayana Kon, Hisashi Tsurumi, Hideki Makishima, and Seishi Ogawa
2 . 発表標題 Analysis of mechanisms underlying clonal evolution of AML by a new single-cell sequencing platform
3 . 学会等名 61th ASH Annual Meeting ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Masahiro M Nakagawa, Ryosaku Inagaki, Yasuhito Nannya, Yutaka Kuroda, Zhao Lanying, June Takeda1, Xingxing Qi, Akinori Yoda, Ayana Kon, Hisashi Tsurumi, Hideki Makishima, Shuichi Matsuda and Seishi Ogawa
2 . 発表標題 Pathogenesis of clonal hematopoiesis revealed by single-cell RNA/DNA sequencing.
3 . 学会等名 第81回日本血液学会学術総会
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Masahiro M Nakagawa, Ryosaku Inagaki, Yasuhito Nannya, , Zhao Lanying, June Takeda1, Xingxing Qi, Akinori Yoda, Ayana Kon, Hisashi Tsurumi, Hideki Makishima, Shuichi Matsuda and Seishi Ogawa
2 . 発表標題 Intratumor heterogeneity and clonal evolution of myeloid malignancies revealed by single-cell RNA/DNA sequencing.
3 . 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Ryosaku Inagaki, Masahiro M Nakagawa, Yasuhito Nannya, Xingxing Qi, Zhao Lanying, June Takeda, Akinori Yoda, Ayana Kon, Hisashi Tsurumi, Hideki Makishima, and Seishi Ogawa
2 . 発表標題 Analysis of mechanisms underlying clonal evolution of AML by a new single-cell sequencing platform
3 . 学会等名 第81回日本血液学会学術総会
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名	Ryosaku Inagaki, Masahiro M Nakagawa, Yasuhito Nannya, Xingxing Qi, Zhao Lanying, June Takeda, Akinori Yoda, Ayana Kon, Hideki Makishima, and Seishi Ogawa
2. 発表標題	Analysis of mechanisms underlying clonal evolution in MDS to sAML transformation by single-cell sequencing
3. 学会等名	第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Masahiro M Nakagawa, Ryosaku Inagaki, Yasuhito Nannya, Zhao Lanying, June Takeda, Akinori Yoda, Ayana Kon, Tetsuichi Yoshizato, Hideki Makishima, and Seishi Ogawa
2. 発表標題	Mechanisms of the clonal evolution of MDS as revealed by single-cell sequencing.
3. 学会等名	第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Masahiro M Nakagawa, Ryosaku Inagaki, Yasuhito Nannya, Zhao Lanying, June Takeda, Akinori Yoda, Ayana Kon, Tetsuichi Yoshizato, Hisashi Tsurumi, Hideki Makishima, and Seishi Ogawa
2. 発表標題	Mechanisms of the clonal evolution of MDS as revealed by single-cell sequencing.
3. 学会等名	第80回日本血液学会学術総会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Masahiro Marshall Nakagawa, Ryosaku Inagaki, Yasuhito Nannya, Lanying Zhao, Yutaka Kuroda, June Takeda, Xingxing Qi, Akinori Yoda, Ayana Kon, Hisashi Tsurumi, Hideki Makishima, Shuichi Matsuda and Seishi Ogawa
2. 発表標題	Analysis of clonal evolution/heterogeneity of MDS by simultaneous detection of both mutation and gene expression by single cell sequencing
3. 学会等名	60th ASH Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名 Masahiro M Nakagawa, Ryosaku Inagaki, Yasuhito Nannya, Keisuke Kataoka, Tetsuichi Yoshizato, Hideki Makishima, Kenichi Yoshida, and Seishi Ogawa
2. 発表標題 Mechanisms of the clonal evolution of myeloid malignancies as revealed by single-cell sequencing.
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masahiro M Nakagawa, Ryosaku Inagaki, Yasuhito Nannya, Keisuke Kataoka, Tetsuichi Yoshizato, Hideki Makishima, Kenichi Yoshida, and Seishi Ogawa
2. 発表標題 Mechanisms of the clonal evolution of MDS as revealed by single-cell sequencing.
3. 学会等名 日本血液学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考