

令和元年6月26日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19595

研究課題名(和文) 変異情報付きハイスループットシングルセルRNA-seqによる白血病のクローン解析

研究課題名(英文) Clonal architecture of myeloid malignancies as revealed by single-cell RNA sequencing.

研究代表者

小川 誠司 (OGAWA, SEISHI)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：60292900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：白血病は造血幹細胞のドライバー変異獲得とクローン選択が繰り返されることで発症し、腫瘍内には多様なクローンを有している。この腫瘍内多様性は治療抵抗性クローンを包含し、白血病の治療抵抗性の大きな要因の一つであると考えられている。本研究では単一細胞での網羅的RNAシーケンスに加えて、同一細胞でドライバー変異を同時に増幅・解析する手法を開発することで、ドライバー変異によって規定されるクローンの形質解析を可能とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、一見正常に見える組織においても、加齢や生活習慣によりドライバー変異を有するクローンの拡大が見られることが、我々や他のグループによって明らかになっている。これらのクローン拡大は、がんの初期発生に重要と考えられるが、その詳細な機構は未だ明らかでない。本研究で開発した手法は、さらなる最適化により、様々な組織におけるこのようなクローン拡大の解析に利用可能であり、がんの初期発生の理解の進展に大きく寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The development and progression of acute myeloid leukemia (AML) are shaped by multiple rounds of acquisition of new driver mutations and subsequent clonal selection. These clonal evolutions develop substantial intra-tumor heterogeneity, which is one of the major reasons of treatment failure and relapse.

Recent development of single-cell analysis method has provided a novel opportunity to understand this complexity, which however, is severely hampered by the difficulty to detect both mutations and expression profiles at the same time. To overcome this, we developed a robust method for simultaneous detection of both mutations and gene expression in this study.

研究分野：腫瘍生物学

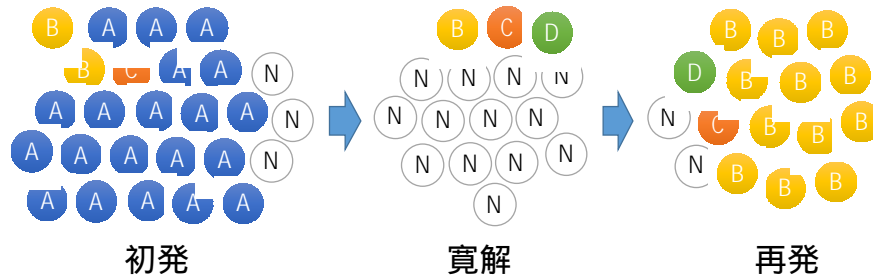
キーワード：骨髄異形成症候群 白血病 クローン進展 単一細胞解析 腫瘍内多様性

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する。シーケンス技術の著しい発展により、造血器腫瘍においても数多くの遺伝子変異が同定されているが、多くの病型では未だ画期的な治療法の開発には至っていない。

治療開発の大きな障害の一つとして、腫瘍の不均一性があげられる (図1)。同一個体内において、腫瘍は様々な遺伝子異常を持つサイズの異なる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。

図1 腫瘍内不均一性とクローン進展



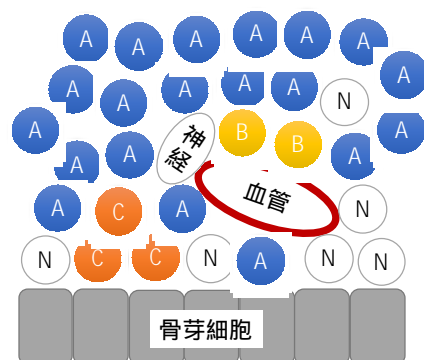
通常これらのクローンは数個のドライバー変異を有しているが、これらのドライバー変異の組み合わせはランダムでは無く、高頻度に共存する組み合わせが存在し、それらの変異が共存することが、クローンにとってより有利に働くと考えられる。また、同一の遺伝子変異であっても、異なる病型に存在することが多々あり、それは共存する変異や、クローンが複数の変異を獲得する順序などによって規定されると考えられている。変異の機能解析には通常細胞株や遺伝子改変マウスが使用されるが、複数の変異の様々な組み合わせや、順序だった変異の獲得などをモデル化するのは容易ではない。これらの変異の組み合わせの解析には実際に組み合わせの変異を有する白血病の解析が重要と考えられる。

また、白血病はそれぞれのクローン単独で存在することは希であり、常に複数の異なるクローン、正常細胞、微小環境との共存の元に存在している。白血病においても、正常血液細胞と同じく、幹細胞を頂点とした分化段階の構造を有していると考えられており、白血病幹細胞は造血幹細胞と同様に微小環境との相互作用が重要と考えられている。微小環境による支持が失われることで幹細胞が分化してしまい、造血細胞、白血病細胞の多くは体外で長期間培養することができない。各クローンの性質を正確に解析するには培養を経ない解析系が必要である。

2. 研究の目的

クローン進展の詳細な解析にはまず以下の四つの事項が必要である。第一はより詳細な変異の情報である。各クローンでどのような変異が共存しているか、どのようなクローンがどのような変異を獲得していくのかを知るのは治療標的とする上で必須である。そのためにはシングルセルレベルでの解析が望ましい。第二には、小さいサイズのクローンも同定するために多くの細胞を解析する必要がある。たとえば1%の割合で存在する細胞を20個解析するためには2000個の細胞を解析する必要がある。第三には、複数の遺伝子異常の集合が結果として何を引き起こしているかを知る必要がある。そのためにはゲノム情報だけでなく、トランスクリプトームを解析し、腫瘍細胞においてどのようなシグナルが活性化しているのか、そして標的に適しているかを解析する必要がある。第四に、トランスクリプトームを解析するにあたり、できるだけ生体内に近い状態の細胞を解析する必要がある。骨髄内において血液細胞は様々な細胞からシグナルを受けた状態で存在している。たとえば、造血幹細胞は骨芽細胞、血管内皮細胞、神経細胞、間葉系幹細胞、マクロファージ、あるいは細網細胞などの様々な細胞が形成する微小環境からの液性あるいは接着性のシグナルによって維持されている (図2)。また、AML や MDS においても微小環境との相互作用の重要性が示されている。たとえば、ヒト白血病を生着させたマウスに抗癌剤治療を行うと、骨芽細胞近くに腫瘍細胞が残存し、微小環境が腫瘍細胞の治療抵抗性に寄与していることが示唆されている。一方、白血病細胞は間葉系幹細胞などの微小環境細胞に影響を及ぼすこ

図2 骨髄内微小環境とクローン構造



とにより、腫瘍細胞に有利な環境を自ら作り出していることも示されている。従って、微小環境との相互作用の影響を保持した状態、つまり細胞を採取後速やかに解析することが望ましい。腫瘍細胞を一定期間培養したり、マウスに移植を行ったりして細胞数を増やす方法は本研究には不適當である。

本研究では白血病の多様性の理解のために、ドライバー変異によって規定されるクローンの構造の理解とその特徴の解析を、可能な限り生体内に近い状態で行うことを目的としているが、遺伝子異常の異なるクローンでは、遺伝子異常を直接のマーカースとして利用することは不可能であり、クローンに特異的な表面マーカースも不明であるため、各クローンをソートすることは不可能である。また、クローンサイズが小さい場合にはバルクでの解析では標的クローンの特徴を推察することは困難である。また、バルクの解析では変異が同一クローンに共存しているのかどうかの判定が不可能な場合も多く、クローンの正確な構造解析も不十分である。

組織の多様性の解析には、近年著しく進歩した単一細胞 RNA シーケンス技術が非常に有効である。しかしながら腫瘍において重要な遺伝子異常の同定感度は著しく低く、クローン構造の解析は非常に困難である。また、単一細胞の全ゲノム増幅による全エクソンシーケンスなどの網羅的解析も試みられているが、増幅のカバー率は非常に低く、変異の同定率は低い。さらに通常 2 コピーのゲノムを高度に増幅するため、一方のアリルのみが増幅するアリルドロップアウトが高頻度に発生してしまう。骨髓細胞を反固形培地で培養する系では、単一細胞由来の変異を同定することが可能になるが、一度に多数の細胞の解析は困難であり、また、骨髓内での微小環境との相互作用は失われ、多量のサイトカイン下での 10 日以上培養を経ることで、遺伝子発現には大きな影響があると考えられる。これらの困難を克服するため、本研究では単一細胞で同時に遺伝子発現と遺伝子変異を多数の細胞で解析する系を構築し、白血病のクローンの解析を試みた。

3. 研究の方法

コストを抑えて多くの細胞を解析するためにドロップシーケンシングを応用した技術を開発することとした。細胞特異的なバーコードを付加した全長 cDNA を作製し、一方では cDNA の 3' 側のみを使い遺伝子発現を解析し、他方では遺伝子変異部位とバーコード部位を近接化したライブラリーを作製しての変異情報の解析を行った。性能評価にはまず白血病細胞株をシーケンスした。

遺伝子発現のバックグラウンドを極力そろえるために造血幹細胞や造血前駆細胞などの分画をフローサイトメトリーでソートしてから単一細胞解析を行った。

パネルシーケンシングを行った上で生細胞として解凍可能な状態で凍結した造血器腫瘍のサンプルを用いた。

4. 研究成果

4-1. 既存の単一細胞 RNA 解析プラットフォームの性能評価。

最初に現状で利用可能な単一細胞 RNA 解析系の性能評価を行った。10X Genomics 社の Chromium、タカラバイオ社の ICELL8、Fluidigm 社の C1 ハイスルーブット等の多数の細胞を解析可能な系ではシーケンスデータ量を抑制するために RNA の一部(3' 端)のみ解析を行うため、変異が 3' 端から離れた部位にある場合は、予想通り解析は困難であった。Fluidigm 社の通常の C1 システム古典的な RNA の全長を解析する系においても、変異領域のシーケンス量は十分得られなかった。

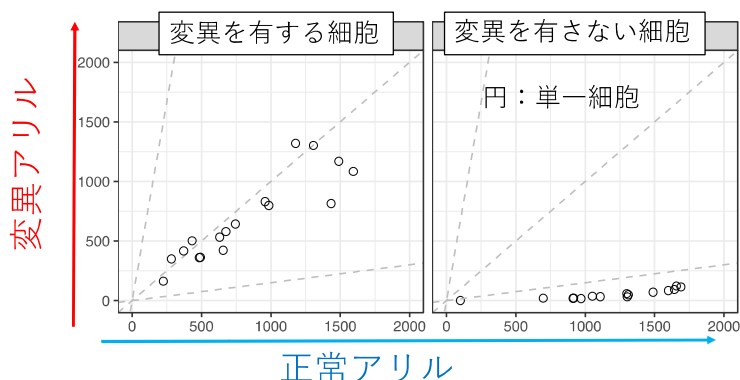
4-2. 新たな単一細胞解析プラットフォームの構築

小さなクローンの解析には多数の細胞の解析が必須であり、RNA の一部(3' 端)を解析する系に変異領域を増幅可能な系の構築を試みた。

当初の計画では、ドロップレット技術を用いて、細胞特異的なバーコードを付加した全長 cDNA を作製し、一方では cDNA の 3' 側を濃縮してライブラリーを構築して遺伝子発現を解析し、他方では遺伝子変異部位とバーコード部位を環状化により近接化したライブラリーを作製することによって、変異情報を解析する予定であった。しかしながら、変異部位が 3' 端から離れている場合には PCR の増幅長が長くなることで PCR の増幅効率が低下し、さらに細胞バーコードを含んだまま増幅する必要があるので nested PCR を行うことができないことも、多量の cDNA の中から標的領域の増幅効率の低下を招く要因となった。

そこで我々は大幅な実験手法の見直しを行い、マイクロ流路の系で、カスタム

図3 単一細胞RNAからの変異の同定



プライマーを用いる系に移行した。プライマーの設計部位や長さ、反応系の温度や酵素系の工夫など、丹念に条件検討を重ねることで、最終的に実用的な感度での同一細胞での変異の同定と遺伝子発現解析に成功した(図3)。

これらの開発と並行して、上記の実験系の検証、および技術的短所を補完する実験系の開発・最適化も進めた。微小領域や単一細胞由来培養細胞などでの網羅的変異解析技術を最適化することで、単一細胞由来のDNAから多くの変異を同定することが可能であり、クローン進展の経時的变化の推定を行うことが可能となった。

これらの解析系はさらなる最適化が必要であるが、腫瘍の多様性解析による治療抵抗性の理解に大きく寄与することが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

1. Kotani S, Yoda A, Kon A, Kataoka K, Ochi Y, Shiozawa Y, Hirsch C, Takeda J, Ueno H, Yoshizato T, Yoshida K, Nakagawa MM, Nannya Y, Kakiuchi N, Yamauchi T, Aoki K, Shiraishi Y, Miyano S, Maeda T, Maciejewski JP, Takaori-Kondo A, Ogawa S, Makishima H. Molecular pathogenesis of disease progression in MLL-rearranged AML. *Leukemia*. ;33:612-624. 2019. doi:10.1038/s41375-018-0253-3.
2. Yokoyama A, Kakiuchi N, Yoshizato T, Nannya Y, Suzuki H, Takeuchi Y, Shiozawa Y, Sato Y, Aoki K, Kim SK, Fujii Y, Yoshida K, Kataoka K, Nakagawa MM, Inoue Y, Hirano T, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Sanada M, Nishikawa Y, Amanuma Y, Ohashi S, Aoyama I, Horimatsu T, Miyamoto S, Tsunoda S, Sakai Y, Narahara M, Brown JB, Sato Y, Sawada G, Mimori K, Minamiguchi S, Haga H, Seno H, Miyano S, Makishima H, Muto M, Ogawa S. Age-related remodelling of oesophageal epithelia by mutated cancer drivers. *Nature*;565:312-317. 2019. doi:10.1038/s41586-018-0811-x.

[学会発表](計8件)

1. Ryosaku Inagaki, Masahiro M Nakagawa, Yasuhito Nannya, Keisuke Kataoka, Tetsuichi Yoshizato, Hideki Makishima, Kenichi Yoshida, Seishi Ogawa. Development of a method for high-throughput single-cell RNA sequencing with mutation information. 第76回日本癌学会学術総会. 2017.
2. Masahiro M Nakagawa, Ryosaku Inagaki, Yasuhito Nannya, Keisuke Kataoka, Tetsuichi Yoshizato, Hideki Makishima, Kenichi Yoshida, and Seishi Ogawa. Mechanisms of the clonal evolution of myeloid malignancies as revealed by single-cell sequencing. 第76回日本癌学会学術総会. 2017.
3. Masahiro M Nakagawa, Ryosaku Inagaki, Yasuhito Nannya, Keisuke Kataoka, Tetsuichi Yoshizato, Hideki Makishima, Kenichi Yoshida, and Seishi Ogawa. Mechanisms of the clonal evolution of MDS as revealed by single-cell sequencing. 第79回日本血液学会学術集会.
4. Masahiro M Nakagawa, Ryosaku Inagaki, Yasuhito Nannya, Zhao Lanying, June Takeda, Akinori Yoda, Ayana Kon, Tetsuichi Yoshizato, Hideki Makishima, and Seishi Ogawa. Mechanisms of the clonal evolution of MDS as revealed by single-cell sequencing. 第77回日本癌学会学術総会.
5. Ryosaku Inagaki, Masahiro M Nakagawa, Yasuhito Nannya, Keisuke Kataoka, Tetsuichi Yoshizato, Hideki Makishima, Kenichi Yoshida, Seishi Ogawa. Development of a single-cell sequencing platform enabling simultaneous detection of both gene mutation and expression. 第77回日本癌学会学術総会.
6. Masahiro M Nakagawa, Ryosaku Inagaki, Yasuhito Nannya, Zhao Lanying, June Takeda, Akinori Yoda, Ayana Kon, Tetsuichi Yoshizato, Hisashi Tsurumi, Hideki Makishima, and Seishi Ogawa. Mechanisms of the clonal evolution of MDS as revealed by single-cell sequencing. 第80回日本血液学会学術総会.

7. Masahiro M Nakagawa, Ryosaku Inagaki, Yasuhito Nannya, Zhao Lanying, June Takeda, Akinori Yoda, Ayana Kon, Tetsuichi Yoshizato, Hisashi Tsurumi, Hideki Makishima, and Seishi Ogawa. Development of a single-cell sequencing platform enabling detection of both mutation and expression. 第 80 回日本血液学会学術総会. 2018.
8. 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. Analysis of clonal evolution/heterogeneity of MDS by simultaneous detection of both mutation and gene expression by single cell sequencing. 60th ASH Annual Meeting. 2018.

〔図書〕(計 件)

該当なし

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：高折 晃史

ローマ字氏名：Takaori Akiumi

研究協力者氏名：宮野 悟

ローマ字氏名：Miyano Satoru

研究協力者氏名：中川 正宏

ローマ字氏名：Nakagawa Masahiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。