

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2017～2019

課題番号：17KT0108

研究課題名(和文) シングルアリル解析による転写シグナルのデジタル化及びインシリコ発生システムの構築

研究課題名(英文) Digitalization of transcription by single allele analysis

研究代表者

渡辺 亮 (Watanabe, Akira)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：60506765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：転写は、細胞運命を規定する重要なメカニズムである。本研究では、シングルセル RNAシーケンスのデータを用いて転写の最小単位である1アリルレベルで遺伝子発現解析を行い、細胞集団を対象とした従来法で観察できなかった現象に迫ることを目的とした。X染色体上のアリル特異的遺伝子発現を解析した結果、多能性幹細胞における分化度の詳細を示した。さらには、神経疾患特異的なゲノム変異を対象としたシングルアリル特異的解析によって、疾患の原因遺伝子の発現制御が細胞ごとに異なっていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、転写の最小の構成単位であるアリルレベルでの解析方法を提供した。従来の細胞集団を対象とした遺伝子発現解析ではできなかったX染色体のアリル転写制御を解析したことで、多能性幹細胞における分化能を判定することが可能となった。また、疾患モデル細胞における変異アリルから転写される遺伝子の解析では、疾患細胞の不均質性が示された。これらの結果は、シングルアリルレベルでの転写解析が細胞運命の理解や疾患の発症の基本原理の理解へとつながる可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：We conducted single cell RNA-sequencing in combination with SNP genotyping to describe allelic regulation of the genes. Our analysis of human ES cells displayed allelic expression of genes on X chromosome, of which epigenetic status is closely linked to pluripotency of ES and iPS cells, and found several genes in prime-type ES cells were escaped from inactivation of the chromosome. In addition, we found differential regulation of allelic expression at single cell level for Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) cells.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：シングルセル 遺伝子発現解析 アリル特異的発現 iPS細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 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、数百種類からなる数十兆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、細胞分化を理解するために多能性幹細胞から種々の体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である。その原因として、細胞分化の実験においては個々の細胞の分化状態が異なるため、細胞集団を対象にした転写解析などは分化状態を反映した正確な状態を反映していないことが上げられる。すなわち、真の分化状態を反映した転写制御を明らかにするためには単細胞レベルでの解析が必要である。さらには、単一細胞の中の遺伝子は2本のアリルから転写を受けることより、単一アリルでの転写解析を行うことが望ましい。

### 2. 研究の目的

本研究では、シングルアリル単位で転写制御及び遺伝子発現を観察することで、転写イベントをオン・オフの二値化で表現し、ヒトの発生過程における転写ダイナミクスをデジタル的に理解する。我々はシングルセル遺伝子発現解析によって、細胞の分化過程を描写したほか、世界で初めて実施されたヒト iPS 細胞に由来する網膜色素上皮細胞の移植において、その品質評価としてシングルセルレベルで細胞の成熟度を解析した(NEJM, 2016)。これらの研究で養われたゲノム解析やシングルセル遺伝子発現解析の技術を融合し、シングルアリルでの遺伝子発現制御機構の解明に迫る。

### 3. 研究の方法

まず、概念検証として、ヒト iPS 細胞のゲノム DNA を対象とした SNP アレイ (Illumina) を実施することでジェノタイピングを行い、ヘテロ SNP を同定した。同一細胞に対して、遺伝子の全長領域を解析対象とするシングルセル RNA シークエンシングを実施した。具体的には SMARTer Ultra Low Input キット (Clontech) と C1 Cell Autoprep(Fluidigm)を用いてシングルセル単離と cDNA 合成を行った。ライブラリ作製は Nextera XT Library preparation Kit(Illumina)を用いて行った。ライブラリ分子の塩基配列決定は HiSeq2500(Illumina)を用いて行い、ヒト参照配列にマッピングすることで各遺伝子における発現量とその塩基配列を決定した。ゲノム DNA の SNP 解析で同定されたヘテロ SNP を含むシーケンズリードにおける塩基のカウントによって、各アリルから発現している RNA 量の比を推定した。

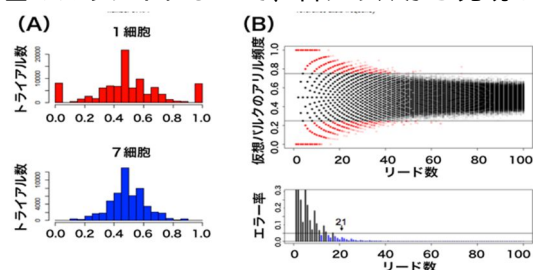


図1 予備的に実施したアリル特異的発現解析の条件検討。(A)シミュレーションではノイズである片アリル発現が減る7細胞以上を解析に用いた方がよいことが示唆された。(B)シーケンズリード数について、信頼性の高いのは21カウント以上である。

次に、この手法の応用として、ヒト多能性幹細胞における X 染色体の不活性化の解析を行った。ES 細胞や iPS 細胞では、その分化能で着床前胚に近いナイーブ型か着床後胚に近いプライム型に大別される。ナイーブ型では、生殖細胞や胎盤への分化が可能である一方、プライム型ではそれができない。ナイーブ型とプライム型の多能性幹細胞の違いはゲノムワイドな DNA メチル化状態や X 染色体の不活性化状態などの特徴で判定される。ナイーブ型では X 染色体上の遺伝子は両親由来の2本のアリルから発現されている一方で、プライム型は片親由来の X 染色体が不

活性化を受けていることより、1本のアレルからしか発現していない。すなわち、X染色体上にコードされる遺伝子のヘテロ SNP におけるシーケンスリードの塩基を解析すれば、その遺伝子が2本のアレルから発現されるナイーブ型なのか、片方のアレルからしか発現していないプライム型なのか判定できる。そこで、プライム型のヒト ES 細胞と遺伝子導入および培養条件を変えることで作製されたナイーブ型 ES 細胞 (Takashima et al., Cell, 2014) における X 染色体のアレル特異的遺伝子発現を解析した。さらに、創薬への応用として筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS) の患者由来 iPS 細胞から分化させたモーターニューロンにおけるシングルセル遺伝子発現解析を行った。この患者は片側のアレルに SOD1 に変異 (L144FVX) をもつため、この部位における野生型と変異型のシーケンスリードの数をカウントし、その比率を計算した。コントロールとして、SOD1 のゲノム変異を CRISPR/Cas9 で野生型に入れ替えた iPS 細胞より分化誘導されたモーターニューロンを用いた。

#### 4. 研究成果

本研究では、全長の cDNA 配列を解析対象としているが、遺伝子の領域によって cDNA の収量が大きく異なることが観察された。これは、ファーストストランド合成においてポリ A から逆転写はじめるために 3'側がより cDNA が合成されやすいことに起因すると考えた。また、同一遺伝子上にヘテロ接合型を示す塩基多型 (SNP) が複数存在するときのアレル別遺伝子発現の定量の手法の確立が必要であることが明らかとなった。本来は同一遺伝子上ではどの SNP 領域も同一のアレル発現バランスを示すべきであるが、実際の解析結果では同一遺伝子上の異なる SNP で判定したアレル別発現量が異なる遺伝子が複数確認された。これらの問題を解決するために、アレル別発現の判定方法を再検証した。その結果、3'末端に最も近い SNP 領域の発現が安定した結果を出力することが示されたため、同一遺伝子上に複数のヘテロ接合型 SNP が存在する場合は 3'末端に最も近い SNP を解析対象とした。また、シーケンスリードの数に対してフィルターをかけることで、少ないリード数に起因する誤判定を低減させることに成功した。ナイーブ型およびプライム型のヒト ES 細胞を用いたシングルセル RNA シークエンス及び X 染色体上の遺伝子に対するアレル特異的遺伝子発現解析では、全てのナイーブ型 ES 細胞では両アレルからの発現 (バイアレル発現) が見られたのに対し、プライム型では多くの遺伝子が一方のアレルからの発現 (モノアレル発現) であることを示していた。驚くべきことに、いくつかの遺伝子ではプライム型でもバイアレル発現を示す遺伝子があり、これらのゲノム領域がエロージョンと呼ばれる現象の影響下にあることが示唆された。

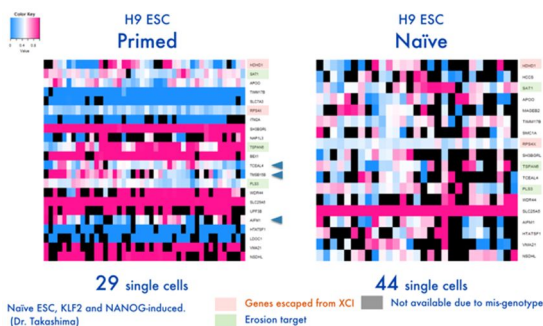


図2 プライム型のヒト ES 細胞とナイーブ型 ES 細胞における X 染色体上のアレル別遺伝子発現。青または赤は一方のアレルからの発現を示し、白は両アレルからの発現を示す。黒はリード数が少ないことから判定できなかったものである。

ヒト ALS 患者から作製された iPS 細胞に由来するモーターニューロンのシングルセル RNA シークエンシング及びアレル特異的遺伝子発現解析では、患者特異的なゲノム変異配列をもつ SOD1 遺伝子の発現する細胞と野生型 SOD1 しか検出されない細胞が存在した。この二群に対する Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) の解析では、神経関連の転写ネットワークに違いがあることが

示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計19件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tsujimoto H, Kasahara T, Sueta S, Araoka T, Sakamoto S, Okada C, Mae S, Nakajima T, Okamoto N, Taura D, Nasu M, Shimizu T, Ryosaka M, Li Z, Sone M, Ikeya M, Watanabe A, Osafune K	4. 巻 31
2. 論文標題 A Modular Differentiation System Maps Multiple Human Kidney Lineages From Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.03.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Karagiannis P, Takahashi K, Saito M, Yoshida Y, Okita K, Watanabe A, Inoue H, Yamashita JK, Todani M, Nakagawa M, Osawa M, Yashiro Y, Yamanaka S, Osafune K.	4. 巻 99
2. 論文標題 Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physiological Reviews	6. 最初と最後の頁 78-114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/physrev.00039.2017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Minagawa A, Yoshikawa T, Yasukawa M, Hotta A, Kunitomo M, Iriguchi S, Takiguchi M, Kassai Y, Imai E, Yasui Y, Kawai Y, Zhang R, Uemura Y, Miyoshi H, Nakanishi M, Watanabe A, Hayashi A, Kawana K, Fujii T, Nakatsura T, Kaneko S.	4. 巻 23
2. 論文標題 Enhancing T Cell Receptor Stability in Rejuvenated iPSC-Derived T Cells Improves Their Use in Cancer Immunotherapy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 850-858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2018.10.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chen X, Yamashita A, Morioka M, Senba T, Kamatani T, Watanabe A, Kosai A, Tsumaki N.	4. 巻 25
2. 論文標題 Integration Capacity of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cartilage.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tissue Eng Part A,	6. 最初と最後の頁 437-445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ten.TEA.2018.0133	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Higaki K, Hirao M, Kawana-Tachikawa A, Iriguchi S, Kumagai A, Ueda N, Bo W, Kamibayashi S, Watanabe A, Nakauchi H, Suzuki K, Kaneko S.	4. 巻 12
2. 論文標題 Generation of HIV-Resistant Macrophages from iPSCs by Using Transcriptional Gene Silencing and Promoter-Targeted RNA.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Ther Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 723-804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2018.07.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueda N, Uemura Y, Zhang R, Kitayama S, Iriguchi S, Kawai Y, Yasui Y, Tatsumi M, Ueda T, Liu TY, Mizoro Y, Okada C, Watanabe A, Nakanishi M, Senju S, Nishimura Y, Kuzushima K, Kiyoi H, Naoe T, Kaneko S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Generation of TCR-Expressing Innate Lymphoid-like Helper Cells that Induce Cytotoxic T Cell-Mediated Anti-leukemic Cell Response.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1935-1946.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2018.04.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Rand TA, Sutou K, Tanabe K, Jeong D, Nomura M, Kitaoka F, Tomoda E, Narita M, Nakamura M, Nakamura M, Watanabe A, Rulifson E, Yamanaka S, Takahashi K.	4. 巻 23
2. 論文標題 MYC Releases Early Reprogrammed Human Cells from Proliferation Pause via Retinoblastoma Protein Inhibition.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 361-375.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.03.057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 坂本智子、渡辺亮	4. 巻 71
2. 論文標題 シングルセルゲノミクスによる細胞個性の解析が展開する免疫学研究.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科,	6. 最初と最後の頁 448-454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 坂本智子、前伸一、長船健二、岡田千尋、樺井良太郎、渡辺亮.	4. 巻 153
2. 論文標題 細胞運命決定機構を明らかにするシングルセル遺伝子発現解析.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 61-66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oshima Koichi, Watanabe Akira, Nakahata Tatsutoshi, Saito Megumu K. et al.	4. 巻 497
2. 論文標題 Human AK2 links intracellular bioenergetic redistribution to the fate of hematopoietic progenitors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 719 ~ 725
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.02.139	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kotaka Maki, Toyoda Taro, Yasuda Katsutaro, Kitano Yuko, Okada Chihiro, Ohta Akira, Watanabe Akira, Uesugi Motonari, Osafune Kenji	4. 巻 7
2. 論文標題 Adrenergic receptor agonists induce the differentiation of pluripotent stem cell-derived hepatoblasts into hepatocyte-like cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16734
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-16858-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hosokawa Yoshiya, Toyoda Taro, Fukui Kenji, Baden Megu Yamaguchi, Funato Michinori, Kondo Yasushi, Sudo Tomomi, Iwahashi Hiromi, Kishida Marina, Okada Chihiro, Watanabe Akira, Asaka Isao, Osafune Kenji, Imagawa Akihisa, Shimomura Iichiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Insulin-producing cells derived from 'induced pluripotent stem cells' of patients with fulminant type 1 diabetes: Vulnerability to cytokine insults and increased expression of apoptosis-related genes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.12727	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Toyoda Taro, Kimura Azuma, Tanaka Hiromi, Ameku Tomonaga, Mima Atsushi, Hirose Yurie, Nakamura Masahiro, Watanabe Akira, Osafune Kenji	4. 巻 9
2. 論文標題 Rho-Associated Kinases and Non-muscle Myosin IIs Inhibit the Differentiation of Human iPSCs to Pancreatic Endoderm	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 419 ~ 428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2017.07.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imamura Keiko, Izumi Yuishin, Watanabe Akira, Yamanaka Shinya, Inoue Haruhisa et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 The Src/c-Abl pathway is a potential therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Science Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 eaaf3962
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scitranslmed.aaf3962	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kondo Yasushi, Toyoda Taro, Ito Ryo, Funato Michinori, Hosokawa Yoshiya, Matsui Satoshi, Sudo Tomomi, Nakamura Masahiro, Okada Chihiro, Zhuang Xiaotong, Watanabe Akira, Ohta Akira, Inagaki Nobuya, Osafune Kenji	4. 巻 60
2. 論文標題 Identification of a small molecule that facilitates the differentiation of human iPSCs/ESCs and mouse embryonic pancreatic explants into pancreatic endocrine cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Diabetologia	6. 最初と最後の頁 1454 ~ 1466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00125-017-4302-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Itaru, Nishinaka Yoko, Nakamura Masahiro, Watanabe Akira, Nakahata Tatsutoshi, Enver Tariq et al.	4. 巻 129
2. 論文標題 Hypoxic adaptation of leukemic cells infiltrating the CNS affords a therapeutic strategy targeting VEGFA	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 3126 ~ 3129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood-2016-06-721712	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する



1. 著者名 渡辺亮、坂本智子	4. 巻 61
2. 論文標題 シングルセル解析の最前線	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 整形・災害外科	6. 最初と最後の頁 427-431
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 渡辺亮	4. 巻 -
2. 論文標題 幹細胞・発生研究とシングルセル解析	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 実験医学別冊「シングルセル解析プロトコール」.	6. 最初と最後の頁 26-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 渡辺亮、中村正裕、岡田千尋	4. 巻 -
2. 論文標題 エピゲノムデータベースの現状と活用	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 実験医学別冊「エピジェネティクス実験スタンダード」	6. 最初と最後の頁 1917-211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Akira Watanabe
2. 発表標題 Epigenetic Landscape in Multi-step Leukemogenesis in Down Syndrome.
3. 学会等名 International Symposium on Epigenome 2019 (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 渡辺亮
2. 発表標題 シングルセル遺伝子発現解析が変える生命科学.
3. 学会等名 第41回 分子生物学会 年会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Akira Watanabe
2. 発表標題 Epigenetic Dysregulation is a Key Signature in Multi-step Leukemogenesis in Down Syndrome.
3. 学会等名 第80回 日本血液学会 学術総会.
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 渡辺亮
2. 発表標題 腫瘍学及び再生医療に応用されるシングルセルマルチオミックス
3. 学会等名 第77回 日本癌学会 学術総会.(招待講演)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 渡辺亮
2. 発表標題 シングルセル遺伝子発現解析で迫る細胞運命決定機構
3. 学会等名 生命医薬情報学連合大会2018.(招待講演)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 渡辺亮
2. 発表標題 臍臓の再生を明らかにするシングルセル遺伝子発現及びマルチオミックス解析.
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会 年次学術集会.(招待講演)
4. 発表年 2018年~2019年

1. 発表者名 喜多 知子、坂本 智子、松永 麻美、長谷川 晶子、岡田 千尋、中川 隆之、渡辺 亮.
2. 発表標題 Challenge to Regeneration of Hair Cells in the Cochlea Sensory Epithelia by Single Cell Transcriptomics.
3. 学会等名 Challenge to Regeneration of Hair Cells in the Cochlea Sensory Epithelia by Single Cell Transcriptomics.第41回 分子生物学会 年会.
4. 発表年 2018年~2019年

1. 発表者名 坂本 智子、龍岡 久登、矢部 大介、稲垣 暢也、渡辺 亮.
2. 発表標題 臍臓の再生を明らかにするシングルセル遺伝子発現解析.
3. 学会等名 第41回 分子生物学会 年会
4. 発表年 2018年~2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 渡辺亮、鈴木穰(編)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 219
3. 書名 シングルセルゲノミクス	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----