

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03217

研究課題名(和文)非侵襲的ゲノム・エピゲノム解析による細胞の状態遷移の解明

研究課題名(英文)Dissection of cell fate regulation by non-invasive genome and epigenome analysis

研究代表者

渡辺 亮 (Watanabe, Akira)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：60506765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム変異やエピゲノム変化は細胞の分化やがん化に寄与する。細胞より抽出された材料を対象にした現行のゲノム・エピゲノム解析では、経時的な観察が不可能なため、細胞の遷移状態を詳細に捉えることができなかった。本研究課題では、細胞から漏洩する核酸を解析することで、細胞を破壊することなく、培養細胞のゲノムやエピゲノム状態を経時的にモニタリングできる技術を開発することを目的とした。本研究で実施した培養上清におけるcell-free DNAのコピー数は、核ゲノムのコピー数と概ね一致し、一部の細胞がもつ異常を捉えるモザイシズムの検出も可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本方法は、細胞を破碎せずにDNA状態を解析でき、一部の細胞で生じる変化を捉えることができる。すなわち、細胞培養中に生じるDNAコピー数変化を捉えられることから、再生医療用細胞の品質評価への応用が可能である。また、研究に用いる初代培養細胞や細胞株の拡大培養における品質評価も可能となっており、学術的および産業的に幅広い応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Genomic aberrations and alterations of epigenome are associated with cell differentiation and tumorigenesis. Current analysis for genome and epigenome after lysis of the cells is far from continuous observation of the status. We have established non-invasive assay by copy number analysis of cell-free DNA. The result was approximately close to DNA copy number analysis of genomic DNA obtained by lysis of the cells. We developed novel in silico tools to detect copy number mosaicism from results of the non-invasive DNA copy number analysis.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：DNAコピー数 非侵襲的解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年のゲノムシーケンシングによって、がんを含む疾患に関係する点変異や DNA コピー数異常が明らかとなっている (Collisson EA et al., *Nature*, 2014; Waddell NP et al. *Nature*, 2015; Wang K et al., *Nat. Genet.*, 2014; Fuchsberger C et al., *Nature*, 2016 他)。現行のゲノム解析法では、抽出された DNA を用いるために経時的な細胞状態のモニタリングを行うことが難しい。また、細胞集団の一部を用いて解析した場合、継続培養している細胞と解析対象の細胞は同一であると断定できない。

最近、がん組織におけるクローン進化が示されており (Hunter KW et al, *Nat Rev Cancer*, 2017)、細胞集団全体の理解のみならず、その中に存在する亜集団の解析、すなわち、がん組織におけるモザイシズムをゲノムレベルで解析することが必須である。がん細胞集団にこのような不均質性がある場合、一部のサンプルを採取して解析する現行のゲノム解析では、サンプリングされた解析対象に異常細胞が含まれていない可能性がある。

申請者は、世界初となる iPS 細胞から作製した細胞の移植において、ゲノム解析による細胞品質の評価方法を確立した (Mandai, Watanabe et al., *NEJM*, 2017)。しかしながら、この解析でも、実際に移植に用いた細胞と解析対象の細胞の同一性が担保されていない課題を抱えていた。また、移植する細胞より膨大な数の細胞をこの解析のために用意した経験から、細胞を壊さずにゲノム解析をする方法の開発が急務となった。

2. 研究の目的

解析対象の細胞を破壊することなく、そのゲノム状態を経時的にモニタリングできる方法の確立が強く望まれている。そして、この手法を用いて、培養細胞系におけるがん化や細胞分化過程などのゲノム変化を捉えることで、これまで未知であった細胞運命変化やがん化のダイナミクスに迫ることが期待されている。本研究では、非侵襲的に培養細胞のゲノム状態を同時に解析する方法を開発し、経時的なゲノム変化を捉えるシステムを提供する。さらに、ゲノム状態が異なる亜集団が示す細胞内モザイシズムを評価する。

3. 研究の方法

(1) 非侵襲的 DNA コピー数解析の手法の確立

ヒト iPS 細胞株やがん細胞株の培養上清から cell-free DNA (解析対象) を回収し、並列シーケンシングを実施する。同時に細胞抽出液から得られたゲノム DNA (コントロール) のシーケンシングも実施する。これらの DNA 断片のリード数から DNA コピー数を算出し、解析対象とコントロールの DNA コピー数を比較する。

(2) 自律的に DNA コピー数変化を判定する手法の開発

DNA コピー数変化が生じるエッジ領域を検出するアルゴリズムを探索し、DNA コピー数変化領域を自律的に検出する手法を開発する。そして、「10kbp の DNA コピー数異常を確実に捉える (高解像度)」「DNA コピー数異常を持つ 10%未満の亜集団を捉える (モザイシズム)」「日常的に実験できるコストで行える」アッセイを目指す。

4. 研究成果

まず、4種類のヒト iPS 細胞株、5種類のがん細胞株に対して、従来法である細胞内ゲノム DNA を用いて SNP アレイを用いた DNA コピー数解析を行った。そして、新しいアプローチとして培養上清から DNA (cell-free DNA, cfDNA) を回収し、ゲノムワイドに並列シーケンサーで解析することで、細胞を破碎せずに DNA コピー数を算出する試みを行った。その結果、従来法と非常に高い一致がみられることを確認した。さらに、ヒト iPS 細胞において、継代で DNA コピー数異常が増大するモデル細胞を用いて、モザイシズムの変化を捉えられることも確認した。このことから、細胞上清から得られた cfDNA で DNA コピー数を算出する方法が実用的であると判断し、培養上清より効率よく DNA を回収するために、複数の回収キットを比較し、得られた DNA の安定性を異なった温度や保存期間で評価を行うことで、再現良く実験を行う環境を整えた。

次に、シーケンシード量に基づいた DNA コピー数を判定するために、数学的処理の異なる複数のアルゴリズムを適用した。その結果、いずれの方法でも、細胞株毎に DNA コピー数の閾値を変える必要があることが明らかとなった。例えば、最適な bin サイズや移動平均距離はサンプル毎に異なっており、同じ解析条件で DNA コピー数変化を評価することができなかった。特にコントロールにする細胞について、ゲノムの全領域でシーケンシード量が均一に読まれていない場合、定量性に乏しい結果となることが示された。DNA コピー数異常が見られるゲノム領域にコードされる遺伝子を抽出するプログラムを実装することで、ゲノム DNA 及び細胞から放出された DNA のコピー数を判定し、両者の比較を行うことで、細胞を破壊せずに DNA コピー数変化を捉えることができるワークフローを完成させた。これらの結果、樹立方法などが異なる複数のヒト iPS 細胞について、継代を繰り返して変化する DNA コピー数を非侵襲的な方法で捉えることが可能となった。

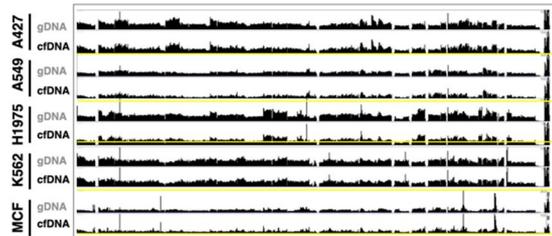


図1 培養細胞(gDNA)および培養上清(cfDNA)より得られたDNA量をゲノムスケールで表示したもの。各細胞株における両者のプロットは類似したパターンを示している。A427, 肺癌細胞株; A549, 肺癌細胞株; H1975, 肺癌細胞株; K562, CML細胞株; MCF7, 乳癌細胞株。

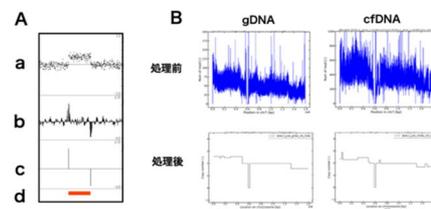


図2 (A) 自動的にDNAコピー数変化領域を同定するアルゴリズム。シーケンシード量をプロットしたもの(a)、隣の領域のDNAコピー数との差をヒストグラムで表示したもの(b)、差の最大値から求められた閾値(c)、閾値に挟まれた領域をDNAコピー数変化領域とコールしている(d)。(B) ノイズの多いデータからDNAコピー数を算出した事例。処理によってコピー数が増えるエッジが検出できた。

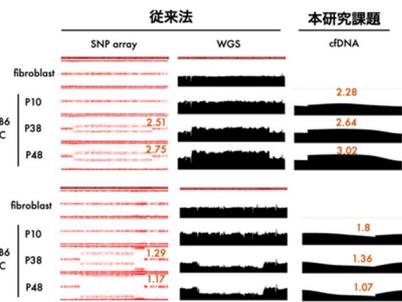


図3 培養細胞(gDNA)および培養上清(cfDNA)より得られたDNA量をゲノムスケールで表示したもの。各細胞株における両者のプロットは類似したパターンを示している。A427, 肺癌細胞株; A549, 肺癌細胞株; H1975, 肺癌細胞株; K562, CML細胞株; MCF7, 乳癌細胞株。

表1 従来法と本方法で測定したDNAコピー数の比較

Location	Length (Mb)	SNP array		gDNA-seq			cfDNA-seq		
		p38	p48	p10	p38	p48	p10 (Ctrl)	p38	p48
chr1:165,992,161-249,172,187	82	2.74	2.79	2.03	2.94	3.00	2.11	2.95	3.09
chr7:44,935-48,402,217	48	2.51	2.75	2.05	2.78	2.96	2.28	2.64	3.02
chr7:130,791,653-chr8:5,452,537	34	1.29	1.17	1.95	1.21	1.04	1.80	1.36	1.87
chr12:191,619-133,777,645	133	2.51	2.74	2.03	2.78	2.94	2.07	2.45	2.83
chr17:77,365,534-77,392,001	0.25	2.81	2.83	1.99	2.01	2.00	2.09	2.06	2.06

ヒトiPSC(404C2)で既知となっているDNAコピー数変化領域4箇所について、コピー数を数字で示している。p10, p38, p48は細胞の継代数。各領域において、SNP arrayやgDNA-seq (従来法) とcfDNAで類似したコピー数が算出されている。SNP arrayで検出が難しい1Mb未満の欠失も検出できている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Suong DNA, Imamura K, Inoue I, Kabai R, Sakamoto S, Okumura T, Kato Y, Kondo T, Yada Y, Klein WL, Watanabe A, Inoue H.	4. 巻 4
2. 論文標題 Induction of inverted morphology in brain organoids by vertical-mixing bioreactors. Suong DNA, Imamura K, Inoue I, Kabai R, Sakamoto S, Okumura T, Kato Y, Kondo T, Yada Y, Klein WL, Watanabe A, Inoue H.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02719-5	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 Tatsuoka H, Sakamoto S, Yabe D, Kabai R, Kato U, Okumura T, Botagarova A, Tokumoto S, Usui R, Ogura M, Nagashima K, Mukai E, Fujitani Y, Watanabe A, Inagaki N.	4. 巻 23(12)
2. 論文標題 Single-Cell Transcriptome Analysis Dissects the Replicating Process of Pancreatic Beta Cells in Partial Pancreatectomy Model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101774
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.101774	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 渡辺 亮、越前 佳奈恵、松島 早希、奥村 龍哉	4. 巻 276巻10号
2. 論文標題 発生・再生研究における1細胞遺伝子発現解析の現状	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 医学のあゆみ「一細胞解析 技術と応用」	6. 最初と最後の頁 1003-1009
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 Tsujiimoto H, Kasahara T, Sueta SI, Araoka T, Sakamoto S, Okada C, Mae SI, 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 2020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 -

1. 著者名 坂本智子, 渡辺亮	4. 巻 9
2. 論文標題 日常化するシングルセル遺伝子発現解析が展開する医学研究.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 遺伝子医学	6. 最初と最後の頁 116-121
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 37
2. 論文標題 医学・生物学研究に実装されるシングルセルゲノミクス	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学別冊「シングルセルゲノミクス」	6. 最初と最後の頁 22-28
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 龍岡久登, 坂本智子, 渡辺亮, 稲垣暢也	4. 巻 37
2. 論文標題 単細胞レベルでの膵内分泌細胞の不均一性と機能解明	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学別冊「シングルセルゲノミクス」	6. 最初と最後の頁 68-73
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 今村恵子, 渡辺亮, 井上治久	4. 巻 37
2. 論文標題 iPS細胞のシングルセル遺伝子発現解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学別冊「シングルセルゲノミクス」	6. 最初と最後の頁 145-148
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3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡辺亮
2. 発表標題 システムズシングルセルオミックスで迫る細胞運命と医療への展開
3. 学会等名 第83回 生化学会中部支部 例会・シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺亮
2. 発表標題 エピジェネティクスが解き明かすがんと発生
3. 学会等名 第13回エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺亮
2. 発表標題 シングルセルゲノミクスで実践する医学研究
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 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 実験医学別冊「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
研究 分担者	坂本 智子 (Sakamoto Satoko) (70648427)	京都大学・医学研究科・研究員 (14301)	退職によって、分担者の資格要件を失ったため、研究代表者が引き継いだ
研究 分担者	沖田 圭介 (Okita Keisuke) (90512434)	京都大学・iPS細胞研究所・講師 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関