

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21398

研究課題名(和文) 組織内の核内ゲノム構造を単一細胞レベルで高解像度に解析する技術の開発

研究課題名(英文) Development of technology for high-resolution analysis of genome structure in the nucleus of tissues at the single-cell level.

研究代表者

大川 恭行(Ohkawa, Yasuyuki)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：80448430

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)：生体は幹細胞あるいは前駆細胞が増殖分化することで、様々な機能を担う細胞、組織が分化増殖することにより形成される。この際に行われるのが選択的な遺伝子発現である。選択的遺伝子発現は、ゲノム領域に広範囲に分布する遺伝子の制御領域(エンハンサー、プロモーター)を介して特定の遺伝子座を活性化型クロマチン構造に変換し、遺伝子の転写活性を促進するゲノム構造を獲得させるダイナミックなイベントである。我々は、これまでのオミクス技術開発の過程で技術的なバイアスを解決しつつ、同時に技術的に極めて困難とされる単一細胞レベルのゲノム高次構造の解析技術の開発を行う技術の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

各細胞に固有のバーコードを付加する基本技術の構築を行い理論的におおよそ2000万細胞の固有ラベルを達成する技術を開発した。また、トランスクリプトーム解析をモデルとして単一細胞レベルでそれぞれの細胞内で非破壊的に固有のラベルを付加する技術を確立した。現在これらラベルの読み取り技術および同時解析技術の開発を進めている。これら技術は空間オミクスと呼ばれる組織の中の細胞の情報を取得する技術に活用できるとともに、ゲノム高次構造の解析にも有効であり、今後生物学上において重要な知見が得られることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Living organisms are formed by the proliferation and differentiation of stem or progenitor cells, which in turn differentiate and proliferate into cells and tissues that carry out various functions. In this process, selective gene expression takes place. Selective gene expression is a dynamic event in which a specific gene locus is converted into an activating chromatin structure via regulatory regions (enhancers and promoters) of genes that are widely distributed in the genome region, resulting in the acquisition of a genomic structure that promotes transcriptional activity of the gene. We have developed a technology that resolves technical biases in the process of developing omics technology, while at the same time developing a technique for analyzing genomic higher-order structure at the single cell level, which is considered technically extremely difficult. Along with the development of the new technology, we acquired reference data by conducting pilot experiments.

研究分野：トランスクリプトミクス

キーワード：エピゲノム クロマチン マルチオミクス 空間オミクス

1. 研究開始当初の背景

我々は腸骨リンパ節法を改良した独自の手法で高速且つ特異性の高いモノクローナル抗体を30以上開発し論文発表をしてきた。この抗体を用いた1分子イメージングを東京工業大学、徳永万喜洋グループと行ったところ、タンパク質を1分子レベルで識別できたことから、用いた抗体の判別ができれば、抗体を用いた遺伝子座の可視化が可能となるのではとのヒントを得た。現在の単一細胞解析には、血液細胞のような一部の細胞を除いて酵素処理によるバイアスが含まれる問題がある。酵素処理にもちいるプロテアーゼの多くは細胞表面の受容体と結合しストレス応答経路を活性化することが明らかとなっている。例えばトリプシンがTNF α 受容体を活性化することがあげられる。一方でこれら技術的問題を解決するために行われている方法は現在大きく分けて二つある。一つは細胞のストレス応答を抑制するために低温で酵素処理を行う低温プロテアーゼの開発であり、もう一つは細胞を応答不能にするために細胞核を単離して行う単一細胞核解析への転換である。いずれも一つの解決策ではあるが本研究プロジェクトでも対象にしている微小サンプルや生体の幹細胞・前駆細胞といった少数細胞での解析は技術的にはほぼ不可能である。そこで、ChIL法の開発でヒントを得た組織切片上にて解析を行うin situ オミクスへの取り組みを進めることとした。我々は、九州大学において、長年次世代シーケンサーをもちいたエピゲノム解析を多く受け入れ多くの共同研究実績をあげてきた。本共同研究の背景は、発生から病理研究にまで遺伝子発現制御を解析するうえで不可欠なエピゲノム解析が技術的に困難であった点にあった。特に生化学的手法の難易度の高いクロマチン免疫沈降法(ChIP法)やデータ解析が困難なHi-C、4Cといった手法は多くの研究者にとって導入が容易でなく、また共同研究においても大きな負荷を生みさせていた。そこで、申請者はChIL法を含めて多くの研究者が技術的またコスト的にも大きな負担を生じることなく研究を進められる技術開発が必要である

2. 研究の目的

生体では幹細胞あるいは前駆細胞が分化増殖することで、様々な機能を担う最終分化細胞、組織が形成される。この際に行われるのが選択的な遺伝子発現である。選択的遺伝子発現は、ゲノム領域に広範囲に分布する遺伝子の制御領域(エンハンサー、プロモーター)を介して特定の遺伝子座を活性化型クロマチン構造に変換し、遺伝子の転写活性を促進するゲノム構造を獲得させるダイナミックなイベントである。一方で、組織形成においては、様々な細胞が、増殖、分化していく極めて不均一な集団変化が起こり、その上個々の細胞においても少なくとも3000遺伝子座以上が協調的あるいは排他的に秩序だった制御を受け、遺伝子発現あるいは抑制に必要な高次構造の変換が行われる。特定の細胞分化・組織形成を理解するためには、全ゲノム上の遺伝子を対象とし不均一な組織細胞を単一細胞レベルで時系列変化を解析し理解する必要がある。近年の単一細胞解析の劇的な進展は、膨大な情報をもたらしつつある。一方で、組織内の幹細胞前駆細胞を解析する際の技術的なバイアスが発生することが明らかとなっており、現在様々な単一細胞解析を行っている国際プロジェクトは大きな問題に直面している。特に、大きな問題となっているが酵素処理を用いて組織を単一細胞化する際に生じる、細胞の変質である。この酵素処理の過程で細胞本来の遺伝子発現プロファイリング、特に転写産物の総体であるトランスクリプトームを大きく失うあるいは変質されることが立て続けに示されている(Cell Rep 2017,2018)。我々は、これまでのオミクス技術開発の過程で上記技術的なバイアスを解決しつつ、同時に技術的に極めて困難とされる単一細胞レベルのゲノム高次構造の解析技術の開発を行う着想を得た。そこで本研究では、新技術開発を行い、パイロット実験を行うことでリファレンスデータの獲得を目指した。

3. 研究の方法

本研究における技術開発では、細胞単離による幹細胞・前駆細胞の変質を避けるために、あらかじめ固定した組織切片を用いて単一細胞解析を行う。まず、本技術開発の基盤となるのは二つの独自技術である。ひとつは、クロマチン挿入標識法(以下ChIL法と略): Chromatin Integration Labeling Technology: ChIL (出願番号: PCT/JP2017/019309, Harada et al, Nature Cell Biol. 2019)、もうひとつはin vitro sequencing法である。ChIL法は、免疫染色法をベースとし、組織を非破壊的且つ、標的タンパク質の生化学的な物性を考慮せずにゲノムワイドに周辺ゲノム情報の獲得が可能である。従って免疫組織染色と同様に、イメージングを行うことが可能である。次の基盤技術がin vitro シーケンシング技術である。申請者は長年次世代シーケンサーの解析に携わってきた過程で、次世代シーケンサー用の蛍光基質を転用することにより、1分子のDNAをRolling Cyclic Amplification法により増幅後に、蛍光顕微鏡下で最大10塩基まで簡便に配列決定する技術を構築した(特許申請準備中)。この二つを組み合わせることによりあらゆる光学限界に至るあらゆる解像度で任意の短いDNA配列の決定とその空間的位置の決定を可能にした。そこで、本研究

では以下のスキームにより、組織切片上の多数の細胞核のゲノム構造を網羅的に解析する技術の開発を行った。以下に本研究で試みた手法の概略を示す。

(1) 任意の組織切片を作成する。本研究では、モデルとしてマウス胚 14.5 の神経管組織を用いる。(2) 切片上の細胞をゲノム上にほぼ等間隔に存在するヌクレオソームを認識する抗体 (anti-H2A-H2B) を ChIL プローブとして反応させる。ChIL 反応を行う。(3) 挿入された ChIL プローブ上の DNA を Rolling Cyclic Amplification により増幅させバーコード部分のみを *in vitro* シークエンスする。(核内における位置情報の取得)(4) 組織切片上の細胞を全て回収し ChILSeq を行い、空間バーコードが挿入されたゲノムの領域を決定し紐づけを行う。(5) ゲノムの位置情報と空間バーコードをあらかじめイメージングで取得した画像上で再構成する。Anti-H2A-H2B が細胞あたりに反応する分子の数は理想的には 1000 万となるが、最初の段階では RCA の反応効率を調整することで 3-5%、検出されるゲノム領域は 30-50 万箇所の解析を行う。この場合、ゲノム構造の空間解像度は従来のシークエンス法の解像度(但し単一細胞の解析ではなく複数の細胞の解析を合わせた平均値的解析)のおおよそ 200 倍となることを見込んでいる。対象とする細胞数は E14.5 の神経管に存在する細胞数(おおよそ 1 万程度)を検討する。予備検討の結果が良好な場合、解析対象となる領域を拡大し、更に RCA の反応効率を増やして対象となるゲノム領域の拡大も検討していくことを試みた。

4. 研究成果

本研究においてまず、Photoisolation Chemistry を PIC 法と融合させた新たな手法が必要であるが、こちらは原理部分を完成し、特許を申請中である。また、成果を論文としてまとめ投稿準備中である。

ChIL 反応が組織内で単一細胞レベルで可能であることは実証済みである(論文投稿中)。一方で Rolling Cycle Amplification は、反応効率が 20%程度とされている。本効率を逆に生かしてゲノム上に存在するヌクレオソームの位置のうち 20%程度を解析対象とする。この場合であってもゲノム上の 30 万箇所の位置決定が可能なため十分空間情報の解析は可能であると考えていたが、残念なことに想定内ではあったが RCA による増幅が不十分で *in vivo* sequencing が困難であり、国際共同研究を行っている seqFISH+を用いた連続蛍光ハイブリダイゼーションを用いた検出法を並行して取り入れる方法に変更を行った。ChIL のシグナルを検出する手法としての seqFISH 法の立ち上げにより効率的な解析が可能となり、RNA-FISH を基盤とした解析方法に転換した。その結果、短い ChIL 由来のシグナルであっても高効率で起点として確認できることを確認しており、現在成果をまとめている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Qianmei Wu, Takeru Fujii, Akihito Harada, Kosuke Tomimatsu, Atsuko Miyawaki-Kuwakado, Masatoshi Fujita, Kazumitsu Maehara, Yasuyuki Ohkawa.	4. 巻 -
2. 論文標題 Genome-wide analysis of chromatin structure changes upon MyoD binding in proliferative myoblasts during the cell cycle.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Biochem.	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） 10.1093/jb/mvab001.	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 Isao Tamura, Ryo Maekawa, Kosuke Jozaki, Yasuyuki Ohkawa, Haruka Takagi, Yumiko Doi-Tanaka, Yuichiro Shirafuta, Yumiko Mihara, Toshiaki Taketani, Shun Sato, Hiroshi Tamura, Norihiro Sugino.	4. 巻 520
2. 論文標題 Transcription factor C/EBP induces genome-wide H3K27ac and upregulates gene expression during decidualization of human endometrial stromal cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Cell Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 111085
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mce.2020.111085.	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 Yuki Sakamoto, Mayuko Sato, Yoshikatsu Sato, Akihito Harada, Takamasa Suzuki, Chieko Goto, Kentaro Tamura, Kiminori Toyooka, Hiroshi Kimura, Yasuyuki Ohkawa, Ikuko Hara-Nishimura, Shingo Takagi, Sachihiko Matsunaga.	4. 巻 11
2. 論文標題 Subnuclear gene positioning through lamina association affects copper tolerance.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 5914
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-19621-z.	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 Hiroki Inada, Miyako Udono, Kanae Matsuda-Ito, Kenichi Horisawa, Yasuyuki Ohkawa, Shizuka Miura, Takeshi Goya, Junpei Yamamoto, Masao Nagasaki, Kazuko Ueno, Daisuke Saitou, Mikita Suyama, Yoshihiko Maehara, Wataru Kumamaru, Yoshihiro Ogawa, Sayaka Sekiya, Atsushi Suzuki.	4. 巻 11
2. 論文標題 Direct reprogramming of human umbilical vein- and peripheral blood-derived endothelial cells into hepatic progenitor.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 cellsNat Commun.	6. 最初と最後の頁 5292
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-19041-z.	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 Tomoko Yamaguchi, Yumi Ikeda, Katsuhisa Tashiro, Yasuyuki Ohkawa, Kenji Kawabata.	4. 巻 50
2. 論文標題 The role of galanin in the differentiation of mucosal mast cells in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Eur J Immunol.	6. 最初と最後の頁 110-118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/eji.201848061.	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 Junichiro Yuda, Jun Odawara, Mariko Minami, Tsuyoshi Muta, Kentaro Kohno, Kazuki Tanimoto, Tetsuya Eto, Takahiro Shima, Yoshikane Kikushige, Koji Kato, Katsuto Takenaka, Hiromi Iwasaki, Yosuke Minami, Yasuyuki Ohkawa, Koichi Akashi, Toshihiro Miyamoto.	4. 巻 111
2. 論文標題 Tyrosine kinase inhibitors induce alternative spliced BCR-ABL Ins35bp variant via inhibition of RNA polymerase II on genomic BCR-ABL.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 2361-2373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14424.	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 Kenichi Horisawa, Miyako Udono, Kazuko Ueno, Yasuyuki Ohkawa, Masao Nagasaki, Sayaka Sekiya, Atsushi Suzuki Chromatin integration labeling for mapping DNA-binding proteins and modifications with low input.	4. 巻 S1097-2765
2. 論文標題 The Dynamics of Transcriptional Activation by Hepatic Reprogramming Factors.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Cell.	6. 最初と最後の頁 30502-30505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2020.07.012.	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 Tomoko Yamaguchi, Yumi Ikeda, Katsuhisa Tashiro, Yasuyuki Ohkawa, Kenji Kawabata.	4. 巻 50
2. 論文標題 The role of galanin in the differentiation of mucosal mast cells in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Eur J Immunol.	6. 最初と最後の頁 110-118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/eji.201848061.	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 Hiroshi Ochiai, Tetsutaro Hayashi, Mana Umeda, Mika Yoshimura, Akihito Harada, Yukiko Shimizu, Kenta Nakano, Noriko Saitoh, Zhe Liu, Takashi Yamamoto, Tadashi Okamura, Yasuyuki Ohkawa, Hiroshi Kimura, Itoshi Nikaido.	4. 巻 6
2. 論文標題 Genome-wide kinetic properties of transcriptional bursting in mouse embryonic stem cells. Sci Adv.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Adv.	6. 最初と最後の頁 eaaz6699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aaz6699.	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 Tetsuya Handa, Akihito Harada, Kazumitsu Maehara, Shoko Sato, Masaru Nakao, Naoki Goto, Hitoshi Kurumizaka, Yasuyuki Ohkawa, Hiroshi Kimura.	4. 巻 15
2. 論文標題 Chromatin integration labeling for mapping DNA-binding proteins and modifications with low input.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Protoc.	6. 最初と最後の頁 3334-3360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41596-020-0375-8.	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 Misuzu Kurihara, Kagayaki Kato, Chiaki Sanbo, Shuji Shigenobu, Yasuyuki Ohkawa, Takeshi Fuchigami, Yusuke Miyanari.	4. 巻 78
2. 論文標題 Genomic Profiling by ALaP-Seq Reveals Transcriptional Regulation by PML Bodies Through DNMT3A Exclusion.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Cell.	6. 最初と最後の頁 493-505.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2020.04.004.	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 Junichiro Yuda, Jun Odawara, Mariko Minami, Tsuyoshi Muta, Kentaro Kohno, Kazuki Tanimoto, Tetsuya Eto, Takahiro Shima, Yoshikane Kikushige, Koji Kato, Katsuto Takenaka, Hiromi Iwasaki, Yosuke Minami, Yasuyuki Ohkawa, Koichi Akashi, Toshihiro Miyamoto.	4. 巻 111
2. 論文標題 TKIs Induce Alternative Spliced BCR-ABL Ins35bp Variant via Inhibition of RNA Polymerase on Genomic BCR-ABL.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 2361-2373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14424.	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大川恭行
2. 発表標題 骨格筋特異的なヒストンが構成するクロマチン構造の解明.
3. 学会等名 第8回骨格筋生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大川恭行
2. 発表標題 クロマチンダイナミクスの理解に向けた同時マルチオミクスの開発.
3. 学会等名 『配偶子インテグリティの構築』 『全能性プログラム』 合同公開シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大川恭行
2. 発表標題 クロマチンダイナミクスの理解に向けた同時マルチオミクスの開発.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大川恭行
2. 発表標題 トランスクリプトミクスによる骨格筋細胞分化能の解明.
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大川恭行
2. 発表標題 Chromatin integration labeling Technology for expanding multi-omics.
3. 学会等名 理研エピゲノム操作プロジェクトセミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大川恭行
2. 発表標題 単一細胞マルチオミクスに向けたクロマチン挿入標識法の開発.
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計5件

1. 著者名 大川 恭行, 原田 哲仁, 前原 一満	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社 週刊医学のあゆみ	5. 総ページ数 6
3. 書名 1細胞エピゲノム解析技術開発の最前線	

1. 著者名 前原一満, 大川恭行	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社 実験医学 増刊	5. 総ページ数 8
3. 書名 scRNA-seqを用いた細胞系譜の軌跡推定-データの背後の流れを読み取る技術-	

1. 著者名 原田 哲仁, 大川 恭行	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社 実験医学	5. 総ページ数 7
3. 書名 骨格筋研究のための最先端解析技術.	

1. 著者名 原田 哲仁, 大川 恭行	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社 実験医学	5. 総ページ数 8
3. 書名 シングルセルでのエピゲノム情報の計測技術.	

1. 著者名 小松 哲郎, 大川 恭行	4. 発行年 2020年
2. 出版社 ニューサイエンス社 月刊細胞	5. 総ページ数 4
3. 書名 空間オミクス実現に向けたエピゲノム解析技術.	

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

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
---------	---------