

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290071

研究課題名(和文)単細胞トランスクリプトームによる細胞階層性構造の解明

研究課題名(英文)Classification of the cell hierarchy structure by single cell transcriptome

研究代表者

橋本 真一 (Hashimoto, Shinichi)

金沢大学・医学系・特任教授

研究者番号：00313099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞集団の1細胞ずつの性格を明らかにし、真の細胞状態を把握することは生物学の研究にとって非常に重要である。本研究では微量/1細胞トランスクリプトーム解析法を開発し、がん細胞や免疫細胞の細胞集団の階層性を明らかにし、真の細胞状態を把握することで将来的に臨床研究に役立てることを目的とする。本研究では単一細胞遺伝子発現解析の発展系として数百以上の1細胞の遺伝子発現を同時に観察出来る革新的な技術(Nx1-seq)を開発した。この方法を用いて新たにかん細胞株、免疫細胞の1細胞遺伝子解析を行い有用性を確認した。

研究成果の概要(英文)：A tissue, an organ, or even a differentiated state of cells are composed of heterogeneous cell populations. Single-cell gene-expression profiling allows you to identify and characterize various types of each cell. Here, we have developed the novel strategy (Nx1-seq) of single-cell transcriptome analysis for thousands of single cells. In our approach, single cells are deposited in a high-density microwell plate and lysed in situ. mRNA is then captured on barcoding microbeads developed by emulsion PCR and reverse transcribed. By applying this Nx1seq method for thousands of cells per experiment, we have successfully characterized 1) complex heterogeneous types of cells in the human endometrioid adenocarcinoma cancer cell line and 2) immune cells at a certain differentiated state.

研究分野：分子生物

キーワード：遺伝子発現 1細胞 癌細胞 がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

現在まで SAGE 法を用いヒト血液細胞、ヒト癌細胞など転写産物を解析した。さらに転写開始点の情報を含んだまま発現解析が出来る 5' SAGE 法を開発し、種々のゲノム解析を行った。さらに、この 5' SAGE 法を進展させ、次世代シーケンサーを利用した遺伝子発現解析法を SOLiD の開発元であるアプライドシステムズと共同開発し、従来と比べ非常に高解像度の情報(すなわち、1 copy/cell でも検出可能)が、短期間に低コストで得られることが可能となった。しかしながら、これらの方法により特定の細胞集団の発現するすべての遺伝子を測定できることが可能となったが、それは個々の細胞の総和での平均であり、本来の細胞の遺伝子発現を反映していない可能性がある。そこで我々はこれらの問題を解決するため単細胞トランスクリプトーム法の開発に取り組んだ。単細胞からの遺伝子を観察する方法として real-time PCR や cDNA 増幅と次世代シーケンサーを合わせた方法がある。しかしながら real-time PCR は特定の遺伝子だけの観測で包括的な計測には向かない。また、cDNA 増幅と次世代シーケンサーを合わせた方法は系が複雑で数十～数百同時に解析し細胞を性格づけた報告は今だされていない。我々は、単細胞の包括的な遺伝子発現解析法を、DNA/RNA hybrid primer を用いた等温増幅技術/PCR 法の 2 つの方法と遺伝子配列の一部だけを観察し遺伝子の種類と頻度を同定する SAGE 法を組み合わせで開発した。本研究ではこの手法を用い、モデルとしてがん幹細胞、免疫細胞に焦点を当て細胞階層性構造を解析する。腫瘍細胞の不均一性は、長い間知られているがその詳細は明らかになっていない。単細胞トランスクリプトーム解析を使用することで腫瘍の亜集団を同定し、推定される真のがん幹細胞を検出することができると思われる。

2. 研究の目的

遺伝子発現解析は細胞の表現型を示すことから生物学や医学の分野で多く使用されている。しかしながら最近の研究では明らかに類似した細胞タイプでさえ遺伝子発現が多様性を示すことが明らかになっており、また、癌組織でも癌細胞集団は多様性を呈していることが知られている。もし、均一の細胞集団から成り立っていない集団を解析すると、細胞個々の平均値としての解析がなされ、真の特徴は得られないことが多い。本研究では

単一細胞を数十～数百同時に解析する方法を確立することで細胞集団の階層性を明らかにし、真の細胞状態を把握することで将来的に臨床研究に役立てることを目的とする。1 個の細胞を組織から分離し解析することにより、非侵襲的に希少または貴重な生体試料を用いて人間の病気の進行状況を監視するだけでなく、監視する遺伝子発現のネットワークを分析でき連続的な遺伝子発現の動態を追跡することが可能となる。

3. 研究の方法

1) 単細胞トランスクリプトーム法：細胞を可溶化後、DNA/RNA hybrid oligo(dT)Beads を用い同試験管内にて磁石で mRNA を精製、続いて逆転写し cDNA を合成する。その後 2nd スtrand を合成し、RNaseH /polymerase 存在下で DNA/RNA hybrid primer により DNA を増幅する (Ribo-SPIA amplification technology 法を改良した)。この時の増幅は PCR 指数関数的増幅と異なり直線的増幅であるのを特徴とする。増幅した 1 本鎖 DNA を TdT にて末端に A を付加後、特異的リンカーで PCR を用い 2 本鎖合成する。続いて通常の SAGE-seq 法により次世代シーケンサーに対するコンストラクトを作製する。またこのとき、リンカーにバーコード配列を用い、サンプルを合わせて処理することでサンプルの識別や作製時間の短縮が可能となる。

2) 包括 1 細胞発現解析：この方法は主に以下の 2 つの技術の組み合わせにより開発された。1) マイクロビーズ上にバーコードが

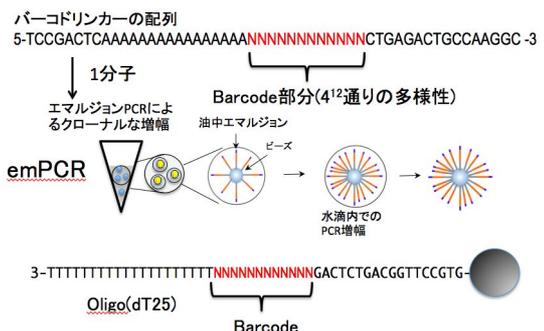
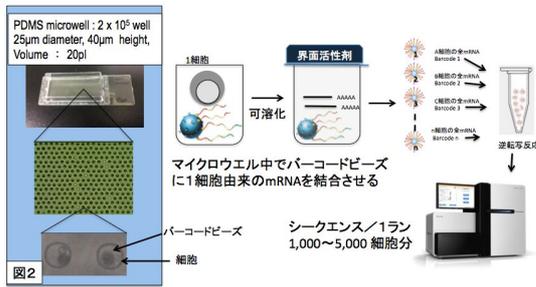


図1 Emulsion PCRで作製したバーコードビーズの多様性

付いたオリゴ dT を合成する過程 (図 1)。これはエマルジョン PCR を利用してバーコード部分 (N の部分 4¹² の多様性) をもつオリゴ DNA 1 分子をマイクロビーズ上で合成する。2) 1 個の細胞由来の RNA を、ウェル幅 25 μm、深さ 40 μm、容積が 20pl のマイクロウェル中にてバーコードオリゴ dT 結合ビーズでトラップし、それを逆転写、増幅後シーケ



ンスする(図 2)。各バーコードは1細胞に由来し、これをシークエンスすることで、数千から数万個の単位で1細胞の解析が可能となる。

4. 研究成果

1) DNA/RNA hybrid primer の配列と長さについて検討し、増幅率の増加、また、tube のシリコンコーティング並びに液量を半分にする事で RNA の回収率の改善が見られた。次に大腸癌細胞株、HT29 を対象に Hoechst 33342 dye の取り込みにて、side population(SP)と main population(MP)を分離後、単一細胞トランスクリプトーム解析を行った。16 細胞ずつの解析でいくつかの遺伝子で SP 特異的発現が観察された。その中で特に IL-8 は SP では 16 細胞中 5 細胞で発現が確認されたが、MP 細胞では発現している細胞はなかった。さらに spherical colony formation と造腫瘍性を確認した SP と MP でバルク細胞(10,000 細胞以上)でのこの遺伝子についての遺伝子発現解析を SAGE 法と DNA アレイ法で行い比較したところ、単一細胞トランスクリプトームの結果と一致して SP で発現量が高かった。タンパク発現についても免疫染色で確認されたことから、がん幹細胞分画である SP で IL-8 が高発現していることが確認された。

2) 単細胞遺伝子発現解析の発展系として数百以上の1細胞の遺伝子発現を同時に観察出来る革新的な技術(Nx1-seq)を開発した(方法参照)。バーコード化されたオリゴ dT ビーズに1細胞由来の mRNA を容積 20 pl のウェル中で結合させる。この方法により数千個から数万個の複数の単一細胞を解析することが出来る。また、この方法は前法よりも効果的にデータを得られることから、この方法を用いて新たにがん細胞株、末梢血単核球の1細胞遺伝子解析を行った。その結果、がん細胞株では数百から数千の個々の1細胞の遺伝子発現情報が得られると共に、1細胞からの約1万個種類の遺伝子について解析

出来た。同一がん細胞株間の1細胞同士の相関は0.89以上で良好であった(図3)。一方、末梢血単核球は単球、T細胞、B細胞、NK細胞にクラスタリングされこの方法により細胞の多様性が測定出来る事が明らかとなった(図3)。さらにこの方法により得たがん細胞

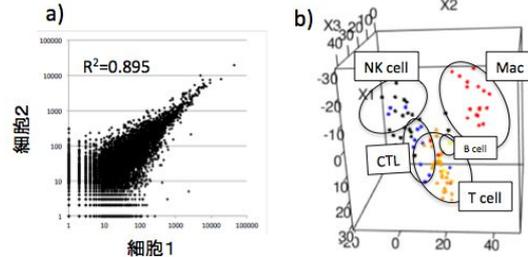


図3. a) 1細胞間の遺伝子発現の比較とb)末梢血単核球のPCA解析

細胞株のデータを基にクラスタリング解析し、がん幹細胞と考えられる細胞から特異的/選択的に発現するマーカーを幾つか同定した。今後、この分子の確認と共に得られた結果を基に細胞の階層性ならびに分化メカニズムを明らかにする。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Shichino S., Abe J., Ueha S., Otsuji M., Tsukui T., Kosugi-Kanaya M., Francis HW Shand, Hashimoto S., Suzuki I. H., Morikawa T., Inagaki Y., Matsushima K., Reduced Supply of Monocyte-derived Macrophages Leads to a Transition from Nodular to Diffuse Lesions and Tissue Cell Activation in Silica-induced Pulmonary Fibrosis in Mice. Am.J.Pathol.185, 2015, 2923-2938, 査読有り
doi: 10.1016/j.ajpath.2015.07.013.

Nakatani Y., Mello C C., Hashimoto S., Shimada A., Nakamura R., Tsukahara T., Qu W., Yoshimura J., Suzuki Y., Sugano S., Takeda H., Fire A., Morishita S. Associations between nucleosome phasing, sequence asymmetry, and tissue-specific expression in a set of inbred Medaka species. BMC Genomics, 16, 2015, 978, 査読有り doi: 10.1186/s12864-015-2198-5.

Abe J., Shichino S., Ueha S., Hashimoto, S., Tomura M., Inagaki Y., Stein J.V., Matsushima K. Lymph Node Stromal Cells Negatively Regulate Antigen-Specific CD4+ T Cell Responses. J Immunol, 193, 2014, 1636-1644, 査読有り
doi: 10.4049/jimmunol.1302946

Iwata, Y., Furuichi, K., Hashimoto, S., Yokota, K., Yasuda, H., Sakai, N., Kitajima, S., Toyama, T., Shinozaki, Y., Sagara, A., Matsushima, K., Kaneko, S., and Wada, A. Pro-inflammatory/Th1 gene expression shift in high glucose stimulated mesangial cells and tubular epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.*443, 2014, 969-974, 査読有り
doi:10.1016/j.bbrc.2013.12.072.

Murakami, R., Denda-Nagai, K., Hashimoto, S., Nagai, S., Hattori, M., Irimura, T. A unique dermal dendritic cell subset that skews the immune response toward Th2. *PLoS One*, 9, 2014, e73270 査読有り
doi:10.1371/journal.pone.0073270.

Saito, T.L., Hashimoto, S., Gu, S.G., Morton, J.J., Stadler, M., Blumenthal, T., Fire, A., and Morishita, S. The Transcription Start Site Landscape of *C. elegans*. *Genome Res.*23, 2013, 1348-1361 査読有り
doi: 0.1101/gr.151571.112.

Hashimoto, S., Ogoshi, K., Sasaki, A., Abe, J., Qu, W., Nakatani, Y., Ahsan, B., Oshima, K., Shand, F. H., Ametani, A., Suzuki, Y., Kaneko, S., Wada, T., Hattori, M., Sugano, S., Morishita, S., Matsushima, K. Coordinated changes in DNA methylation in antigen-specific memory CD4 T cells. *J. Immunol.*, 190, 2013, 4076-4091, 査読有り
doi: 10.4049/jimmunol.1202267.

Tsukui, T., Ueha, S., Abe, J., Hashimoto, S., Shichino, S., Shimaoka, T., Shand, F.H., Arakawa, Y., Oshima, K., Hattori, M., Inagaki, Y., Tomura, M., Matsushima, K. Qualitative rather than quantitative changes are hallmarks of fibroblasts in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am.J.Pathol.*, 183, 2013, 758-773 査読有り
doi: 10.1016/j.ajpath.2013.06.005.

〔学会発表〕(計 2 件)

橋本真一、Comprehensive single-cell transcriptome reveals heterogeneity in cancer tissue、Cold Spring Harbor Laboratory, Single cell meeting、2015 年 11 月 12 日、NY (USA)

橋本真一、がん組織における包括的 1 細胞遺伝子発現解析、第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場(愛知県)2015 年 10 月 08 日

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：単一細胞由来核酸の解析方法
発明者：橋本真一、金子周一、松島綱治
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2014 - 095011
出願年月日：2014 年 05 月 02 日
国内外の別：国内

名称：抗 B 型肝炎ウイルス薬
発明者：橋本真一、金子周一、本多政夫、白崎尚芳、山下太郎
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2015-219183
出願年月日：2015 年 11 月 09 日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 真一 (HASHIMOTO, Shinichi)
金沢大学・医薬保健研究域医学系
・特任教授
研究者番号：0313099

(2) 研究分担者

土井 晃一郎 (Doi, Kouichiro)
東京大学・新領域創成科学研究科
・特任講師
研究者番号：10345126
(平成 25 年度まで)

(3) 連携研究者

松島 綱治 (MATSUSHIMA, Kouji)
東京大学・医学系研究科・教授
研究者番号：50222427

鳥越 俊彦 (TORIGOE, Toshihiko)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：20301400