

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04318

研究課題名(和文) 一細胞解析を目指したマルチオミクス解析手法の開発

研究課題名(英文) Mutli-Omics single cell analysis

研究代表者

鈴木 穰 (Suzuki, Yutaka)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：40323646

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、単一細胞を対象としたシングルセル転写開始点解析、エピゲノム解析(オープンクロマチン解析とDNAメチル化解析)手法の基盤技術開発を行った。DNAメチル化については、単一細胞におけるバイサルファイト反応の制御を厳密に行うことが困難であり、安定的にデータを産生することが可能な実験系の構築開発をすることができなかったが、その他の項目については実験系を確立し、多くの研究者に対して共同研究の形でデータを提供することができた。すでに実施可能であった単一細胞でのRNA Seq解析と併せて、単一細胞マルチオミクス解析のモデル解析を試行することができたと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have attempted to develop a series of methods by which single cell multi-omics analysis is enabled. We have successfully developed a suite of single cell analytical methods for transcriptional start sites analysis and open chromatin analysis, even though single cell DNA methylation analysis was not enabled mainly due to the difficulties in strict control of the bisulfite reaction. We have applied the developed method to monitor the diverse expression regulations between individual cells. We described fluctuating transcriptional responses invoked by the anti-cancer drugs either in susceptible or resistant lung cancer cell lines. We further examined transcriptome data from clinical specimen using a public cancer genome database and found that similar response seems to also occur in vivo. In addition to applying the developed method for our own purposes, we provided it to a number of researchers via collaborations.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：多層オーミクス解析 シングルセル解析

1. 研究開始当初の背景

がん細胞の細胞間多様性を解明すべく、いわゆる単一細胞解析が始められている。しかし、現在、行われている解析は遺伝子発現量解析を行うものがほとんどである。本研究開発では、これを多層オミクス解析に拡張する一連の方法論的開発とその実践を行う。

2. 研究の目的

次世代シーケンサーの急速な普及から、多くの実験系において全ゲノム/エキソーム解析、エピゲノム解析(ChIP Seq, Bisulfite Seq (BS Seq))、トランスクリプトーム解析(RNA Seq)より得られたデータを統合的に解析し、遺伝子発現制御の網羅的な理解につなげようというマルチオミクス統合ゲノム解析が一般に行われるようになってきている。申請者らも科研費「ゲノム支援」におけるゲノム解析拠点として、独自の基盤技術開発、既存の技術の普及を通じて広くデータの産出と解析に貢献 (<http://www.genome-sci.jp/>) してきた。自身でもがんゲノム解析において見出された突然変異の機能的意義の理解を目指して体系的なマルチオミクスデータの産出と解析に取り組んでいる。今年度、申請者らは26種類の肺腺がん細胞株についてマルチオミクス解析(全ゲノムシーケンス、RNA-Seq、BS Seqおよび8種類のヒストン修飾系の ChIP Seq)を行い、同一試料中においてゲノム、エピゲノム、トランスクリプトーム異常がどのように相関するか横断的な解析を行った(Suzuki et al NAR, 2014)。その結果、細胞株間で共通して遺伝子発現レベルに異常の見られる遺伝子であっても、そのDNAメチル化、ヒストン修飾パターンを介した抑制化あるいは活性化の機構は、細胞株によってあるいは遺伝子の種類によって大きく異なることが明らかになった。

単一細胞間での遺伝子発現の多様性の理解は、特に、がん細胞における抗がん剤耐性獲得あるいは転移のメカニズムを理解において重要であると考えられている。がん細胞集団中に本来的に存在する突然変異の不均一性を明らかにすることは、がんの発生と進展の理解、特に抗がん剤薬剤耐性あるいは転移能の獲得に関連する分子メカニズムの同定に不可欠な要件である。近年、単一細胞が盛んに行われるようになった結果、このような細胞間多様性についての解析が数多く行われるようになってきている。しかし、現在、行われている解析は遺伝子発現量解析を行うものがほとんどであって、単一細胞レベルでの多層オミクス解析を行う手法は未だ開発途上にある。

本研究では、単一細胞レベルの解析に応用可能な転写開始点解析、エピゲノム解析(オープンクロマチン解析とDNAメチル化解析)手法の基盤技術開発を行う。開発される

手法に既に実施可能な単一細胞でのエキソーム解析、RNA-Seq解析と併せて、単一細胞マルチオミクス解析を試行する。特に、遺伝子の発現量および転写開始点のゆらぎの細胞間多様性を明らかにし、そのエピゲノム状態のゆらぎとの相関について網羅的に記載する。解析にはヒト肺腺がん由来培養細胞株および抗がん剤耐性を獲得したその分離株を用いる。さらに種々の抗がん剤を添加することで、エピゲノム-トランスクリプトームの関係の変化を観察し、がん細胞の多様な細胞表現型の分子基盤を明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

単一細胞において、転写開始点解析、オープンクロマチン解析、DNAメチル化解析を行う方法論的開発を行う。それぞれ template-switching 法、ATAC 法、RRBS 法を基盤技術として C1 システムへの転化を行う。開発の概念図を下に示す。

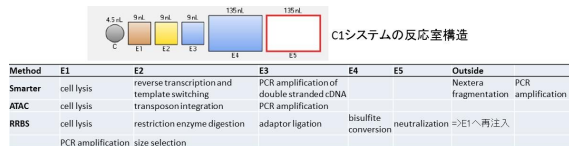


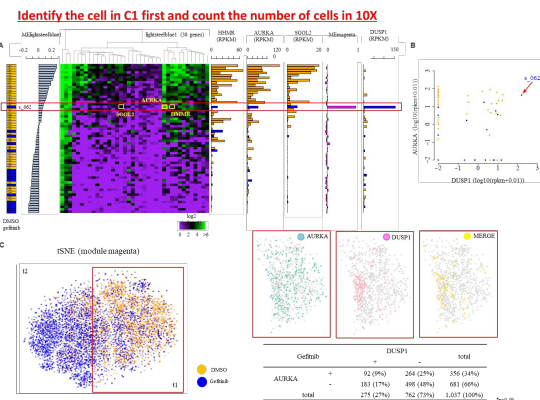
図4: 各系における反応室内での反応

開発モデル系には肺腺がん由来培養細胞数 LC2/ad を用いる。転写開始点の微視的あるいは巨視的な多様性が単一細胞において、それぞれのエピゲノム状態とどのように相関しているのかを明らかにする。さらに抗がん剤耐性獲得分離株と親株の間でそれらの異同を比較する。マルチオミクスデータは個々には異なる単一細胞から収集する。さらにキナーゼ阻害剤、クロマチン修飾阻害薬剤を含む薬剤の投与試験による摂動実験を行う。

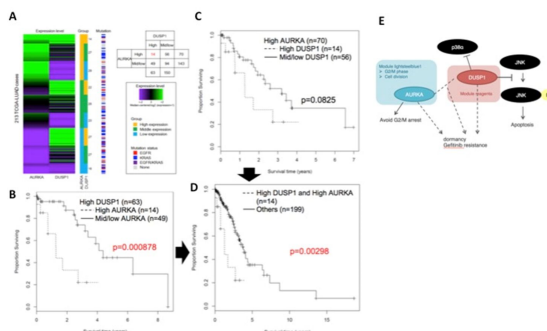
4. 研究成果

本研究では、単一細胞レベルの解析に応用可能な転写開始点解析、エピゲノム解析(オープンクロマチン解析とDNAメチル化解析)手法の基盤技術開発を行った。これを用いて遺伝子の発現量および転写制御機構の細胞間多様性について網羅的な記載を試みた。基盤技術の構築については、DNAメチル化等の一部技術については、安定的な実験系の確立には至らなかったものの、その他の項目については基盤技術を確立することができた。また、構築された技術基盤を多くの研究者に共同研究の形で提供することができた。申請者自身でも、構築された実験系を用いて、がん細胞における遺伝子発現の揺らぎについての解析を行った。解析にはヒト肺腺がん由来培養細胞株および抗がん剤耐性を獲得したその分離株を用いた。抗がん剤には、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 Gefitinib および RET 融合遺伝子に有効性を持つマルチチロシンキナーゼ阻害剤 vandetanib を用いた。前者については感受性細胞として PC9

細胞株、耐性細胞として H1975 細胞株を、後者については、感受性細胞として LC2/ad を、また感受性株については当研究グループで樹立した LC2/ad-R 細胞株を用いた。特に LC2/ad-R 細胞株については、エキソーム解析から相互にほぼ同一のゲノム配列を有しながらも、一部の遺伝子について遺伝子発現量が単一細胞間で顕著な多様性を示すことを明らかにした。PC9 細胞及び H1975 細胞における薬剤刺激時の細胞応答から、薬剤感受性株においては、細胞集団中に数%の頻度の細胞において、DUSP 遺伝子等の細胞の休止化に関連する遺伝子の発現誘導が惹起されることが観察された(下図)。



また、公共がんゲノムデータベース TCGA を用いて臨床肺腺がんにおいて同様のプロファイルを検索したところ、生存予後に劣る症例について同様の遺伝子発現制御の切り替えが行われている可能性が示唆された(下図)。



これらの成果は下記論文 1 として報告することができた。さらに、現在、これを多層オミクス系へと拡張した系での計測データの収集を完了しており、に拡張データを用いた解析を進めている。

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 1 件)

Yukie Kashima, Ayako Suzuki, Ying Liu, Masahito Hosokawa, Hiroko Matsunaga, Masataka Shirai, Kohji Arikawa, Sumio Sugano, Takashi Kohno, Haruko Takeyama, Katsuya Tsuchihara & Yutaka

Suzuki. Combinatory use of distinct single-cell RNA-seq analytical platforms reveals the heterogeneous transcriptome response. Scientific Reports volume 8, Article number: 3482 (2018) 査読あり doi:10.1038/s41598-018-21161-y

[学会発表](計 6 件)

鈴木穰、「ゲノム解析新技術：ロングリード解析とシングルセル解析」、日本内分泌学会(招待講演)、2017

鈴木穰、「シングルセル解析」、日本癌学会、2017

鈴木穰、「シングルセル多層オミクス解析によるがん細胞の多様性の分析」、日本がん分子標的治療学会、2016

鈴木穰、「シングルセル解析～トランスクリプトームから多層オミクス解析へ」、アジレントゲノミクスフォーラム(招待講演)、2016

⑤鈴木穰、「がん細胞の多層オミクス解析」、日本癌学会(招待講演)、2015

鈴木穰、「がん細胞の多様性解析」、日本人類遺伝学会、2015

鈴木穰、「がん細胞多様性の解明にむけて」、肝フロンティア(招待講演)、2015

鈴木穰、「肺腺癌細胞の多層オミクス解析」、トランスオミクスシンポジウム、2015

[図書](計 4 件)

鈴木穰、「実験医学別冊 NGS アプリケーション RNA-Seq 実験ハンドブック」、羊土社、2015、282p

鹿島幸恵、鈴木絢子、鈴木穰、「週間医学のあゆみ 一細胞オミクス解析～がん微小環境の解明にむけて～」、医歯薬出版、2015、258(1)72-78

鈴木絢子、鈴木穰、「バイオサイエンスとインダストリー シングルセル解析を用いたがん細胞の多様性と分析;現状と展望 Single Cell Analysis of Cancer Cells」、バイオインダストリー協会、2015、74(3) 221-223

鹿島幸恵、鈴木絢子、鈴木穰、「週間医学のあゆみ 一細胞解析技術とその応用」、医歯薬出版、2015、258(4) 269-273

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 穰 (SUZUKI, Yutaka)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・
教授
研究者番号：40323646

(2) 研究分担者

土原 一哉 (TSUCHIHARA, Katsuya)
国立がん研究センター・先端医療開発セン
ター・分野長
研究者番号：00415514

山下 理宇 (YAMASHITA, Riu)
東北大学・東北メディカルメガバンク機
構・准教授
研究者番号：10401259

河野 隆志 (KOHNO, Takashi)
国立がん研究センター・研究所・分野長
研究者番号：80280783