

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2016～2019

課題番号：16KT0139

研究課題名(和文)1細胞遺伝子発現解析と数理モデリングによる、多能性幹細胞の細胞間ゆらぎの解析

研究課題名(英文) Analysis of cell-to-cell variability in pluripotent stem cells by single-cell gene expression analysis and mathematical modeling

研究代表者

中村 直俊 (Nakamura, Naotoshi)

大阪大学・数理・データ科学教育研究センター・特任准教授(常勤)

研究者番号：30554472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、幹細胞の遺伝子発現のゆらぎを1細胞レベルで記述し理解することであり、内在的ノイズ・外在的ノイズのコンセプトに基づいた数理モデル化と実際の実験データを用いる。数理モデリングに必要な数の細胞を、実行可能な研究費用で得るためには、より良い新規の装置を開発する必要が生じた。研究分担者の創意工夫により、その開発に成功し、幹細胞を用いてパイロットデータを得ることができた。研究分担者はその結果を、シンガポールで開催された国際学会でポスター発表した他、BD主催のイベントでも解析結果を口頭で発表する機会を得た。研究代表者は新規開発したLAVENDER法を論文および公表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

由来の同じ細胞であっても、細胞の示す実際の姿(表現型)には各細胞ごとにばらつきがあることが知られており、そのばらつきの原因や制御法を理解することは、細胞生物学として重要な研究テーマであるのみならず、細胞治療などの応用場面で細胞を有効に活用するためにも必須であるといえる。本研究では、近年開発された実験技術および研究者独自の実験技術・新規解析手法を用いて、そのばらつきの程度を可視化し、詳細に解析することに成功した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to describe and understand the fluctuations in gene expression in stem cells at the single cell level, using mathematical modeling based on the concept of intrinsic and extrinsic noise and actual experimental data. In order to obtain the number of cells needed for mathematical modeling at a viable research cost, it became necessary to develop a better and novel instrument. The co-investigator was able to develop it successfully and obtain pilot data using stem cells. He presented his results in a poster presentation at an international conference in Singapore, and also had an opportunity to present the results orally at an event organized by BD. The principal investigator has published a paper on the newly developed LAVENDER method.

研究分野：数理細胞生物学

キーワード：1細胞 遺伝子発現のゆらぎ

## 1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンシング技術により、1個1個の細胞の遺伝子発現量(mRNAの分子数)を高精度に定量することが可能になった。1個のヒトの細胞には2万種類の遺伝子が発現しているので、1個の細胞の遺伝子発現量は20000次元のベクトルとして表せる。ベクトルの成分は非負の実数である。多数(約1000個)の細胞に対して定量が可能なので、特定の遺伝子の発現量の細胞間の分布だけでなく、複数の遺伝子の発現量の同時分布も精度よく推定できる。

遺伝子発現のゆらぎ(細胞間不均一性)の原因は内在性ゆらぎと外在性ゆらぎに大別される。反応に参与する分子の少数性に由来する内在性ゆらぎは数理モデルで研究されているが、細胞周期や細胞の状態遷移、細胞の履歴などを反映する外在性ゆらぎはメカニズムが複雑なために数理モデル化が進んでいない。しかし、内在性ゆらぎの定常分布だけでは、一部の遺伝子で見られる二峰性の分布を説明できないという問題点があり、また培養細胞では細胞周期などの外在性ゆらぎが内在性ゆらぎよりも大きくなるという可能性も報告されている。これは外在性ゆらぎを真正面から数理モデルに取り入れる必要性を示している。

## 2. 研究の目的

細胞の時間発展は、Waddingtonのモデルに代表されるように、力学系の言葉(アトラクタ、勾配系など)を用いて記述される。これは概念モデルとして生物学の中でも受け入れられつつあるが、遺伝子発現・形・機能といった細胞の表現型と力学系との対応が明確に示された例はほとんどない。申請者は細胞の表現型の不均一性(ゆらぎ)に興味を持ち、上皮細胞においてゆらぎが維持されるメカニズムを研究し、ゆらぎが複数状態間を遷移するMarkov過程として記述されることを示した。本研究では、申請者の従来の研究をさらに発展させ、よりゆらぎが大きいとされる多能性幹細胞において、細胞の表現型のゆらぎが力学系のどのような性質を反映しているかを、細胞状態の遷移を考慮に入れた遺伝子発現ゆらぎの数理モデルを用い、1細胞ごとの遺伝子発現データを計測・解析することによって明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (a) 多能性幹細胞でのゆらぎの測定・解析・数理モデリング

ヒトの多能性幹細胞が、ゆらぎの観点からどのように異なるかを、1細胞ごとの遺伝子発現データを計測・解析することによって調べ、細胞状態の遷移を考慮に入れた遺伝子発現ゆらぎの数理モデルによる記述を試みる。

### (b) ゆらぎの細胞周期・細胞履歴への依存性

細胞周期は外在性ゆらぎの重要な原因となりうる。1細胞ごとの遺伝子発現データから、各細胞の細胞周期における位置(G1期、S期、G2/M期)を同定し、(a)で調べたゆらぎが細胞周期にどのように依存するかを調べる。また、ゆらぎが細胞の経てきた履歴にどの程度依存するかを、継代数の異なる細胞を比較することによって調べ、必要に応じてMarkov性を満たさない数理モデルに拡張する。

### (c) ゆらぎの摂動への依存性・ゆらぎのオリジンの同定・制御

薬物投与や遺伝子操作を用いて細胞に外部から摂動を加えた際に、ゆらぎの程度にどのような変化があるかを調べる。これにより、ゆらぎを生み出す遺伝子ネットワークを同定する。それに基づき、ゆらぎを制御する方法を開発し、細胞で検証する。

## 4. 研究成果

研究代表者は、研究分担者の協力を得て、1細胞遺伝子発現の解析手法の新規論文を網羅的にサーベイした。tSNE(t-distributed stochastic neighborhood embedding)やUMAP(Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction)などの非線形次元圧縮に基づく方法を経験的に用いて、多次元のデータから重要な要素を抽出する様々な方法が工夫されている。また、サンプルごとのバッチエフェクト(測定に起因するノイズ)を除去する方法にも進展があった。しかし、本研究が目指すような、細胞のゆらぎと力学系を結びつける研究は概念的に新しく、発展途上である。ここ数年で、1細胞遺伝子発現の公開データベースがしだいに充実してきていることから、公開されているデータを組み合わせた研究も可能になっている。ただし、公開されているデータの質が必ずしも均一でないことに留意する必要がある。データの増大に伴い、解析論文自体は続々出版されているが、数理モデルという観点から見直すことで、今後新たな発見や構造の解明が期待された。

本プロジェクトの主題である、1細胞の遺伝子発現の違いを可視化する方法を模索する中で、高次元空間内の遺伝子発現の分布をノンパラメトリック・バイアスフリーにとらえ、分布間の距離を計算することで座標空間への布置を行い、サンプルの多様性を司る重要な軸を抽出する新たな解析手法(ノンパラメトリック・ダイバージェンス推定とMDS再構築による潜在軸可視化解析、Latent axes discovery from multiple cytometry data using non-parametric divergence estimation and MDS reconstruction, LAVENDER法)を構想した。この手法はサンプル間の距離を保ったまま、低次元への縮約を実現することから、距離を改変することで低次元における可視化を行うtSNEなどの既存手法と補完的な解析手法となりうると考えられる。

1細胞の遺伝子発現への応用に先行して、FACSデータ・マスサイトメトリーデータへのLAVENDER法の適用を行い、長浜コホート0次事業の関連データから免疫応答の個人間の多様性に関する軸を抽出することができた。この結果を国内学会・国際学会において口頭発表し、有益なフィードバックを得た。国際学会での発表はYouTubeにおいて広く公開された。結果をまとめた論文をbioRxivに投稿した。

さらに、研究室の学部生の協力を得て、近年開発・公表された1分子RNA FISHの公開データを解析し、1細胞レベルでの遺伝子発現のゆらぎに関する理解を深めた。この結果はさらに解析を進め、後日論文として公表予定である。

研究分担者は、心筋分化過程の1細胞発現解析の研究を進め、英文論文を投稿した。その内容の概略について和文月刊誌の「シングル遺伝子発現解析」特集に寄稿した。iPS細胞から心筋分化の過程において、1細胞遺伝子発現データ(13000遺伝子)の主成分分析により、心筋分化の軌跡を同定した。Day0では幹細胞マーカー、Day3,5では中胚葉マーカー、Day9以降では心筋細胞マーカーの発現上昇が見られた。分化後の細胞にも遺伝子発現の不均一性(ゆらぎ)が確認された。また、Day9における「ソートなしの細胞」を主成分分析の平面に投射することで、分化の軌跡から逸脱した細胞群が発見された。

文献にもとづく調査や既存の装置を複数種類試行した結果から、数理モデリングに必要な数の細胞を、実行可能な研究費用で得るためには、既存の装置の単純な改良では困難であり、より良い新規の装置を開発する必要性が生じた。研究分担者の創意工夫により、その開発に成功し、幹細胞を用いてパイロットデータを得ることができた。研究分担者はその結果を、シンガポールで開催された国際学会Cell Symposia(Single Cells: Technology to Biology)でポスター発表した他、BD主催のイベントでも解析結果を口頭で発表する機会を得た。また、研究分担者は引き続き、幹細胞を用いたデータの解析をおしすすめ、論文化のための議論を重ねた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Naotoshi Nakamura, Daigo Okada, Kazuya Setoh, Takahisa Kawaguchi, Koichiro Higasa, Yasuharu Tabara, Fumihiko Matsuda, Ryo Yamada.	4. 巻 1
2. 論文標題 LAVENDER: latent axes discovery from multiple cytometry samples with non-parametric divergence estimation and multidimensional scaling reconstruction.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 673434
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/673434	査読の有無 無
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 中村正裕	4. 巻 1
2. 論文標題 Precision Health（プレジジョン・ヘルス、精密保健）の実現に向けて	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 IoMT学会誌（メディカルレビュー社）	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） 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 中村正裕、吉田善紀、渡辺亮	4. 巻 5月増刊号
2. 論文標題 心筋分化過程を描写するシングルセル遺伝子発現解析	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 印刷中
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 5件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Nakamura M, Hojo H, Kawabe.K, Takarada.T
2. 発表標題 Heterogeneity and its hierarchy of Prrx1-positive cells during limb development
3. 学会等名 Cell Symposia "Single Cells: Technology to Biology"（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村直俊
2. 発表標題 距離に基づく細胞間不均一性の解析
3. 学会等名 第11回光塾（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村直俊
2. 発表標題 実空間や情報空間の『形』を観る方法の開発
3. 学会等名 日本応用数理学会研究部会連合会発表会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村直俊
2. 発表標題 実空間や情報空間の「形」を観る方法の開発
3. 学会等名 生理研研究会「シグナル動態の可視化と操作に基づく多階層機能解析の新展開」（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村直俊
2. 発表標題 季節性インフルエンザワクチンに対する免疫応答から個人差を抽出する + 細胞の動く軌跡の空間の形
3. 学会等名 第5回先進イメージング医学研究会（第15回生体イメージング研究会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naotoshi Nakamura
2. 発表標題 LAVENDER extracts individual variability in the immune response to seasonal influenza vaccination
3. 学会等名 From Molecules and Cells to Human Health: Ideas and concepts (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村正裕
2. 発表標題 スマートフォンアプリケーションから描く健康状態の軌跡
3. 学会等名 MMDS公開講座「医療×AI」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村正裕
2. 発表標題 シングルセルマルチオミックス～心筋分化におけるシングルセル発現解析とオープンクロマチン解析～
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会(招待講演)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中村直俊	4. 発行年 2020年
2. 出版社 学術図書出版社	5. 総ページ数 88
3. 書名 高度情報リテラシー	

〔産業財産権〕

〔その他〕

LAVENDER extracts individual variability  
<https://www.youtube.com/watch?v=3f3Et2ToM1s>

国際学会における研究代表者の口頭講演の録画であり、広く公開されている。研究成果のわかりやすいまとめになっている。

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	中村 正裕  (Nakamura Masahiro)  (40634449)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・特任助教    (12601)	