

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：82401
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2018～2020
 課題番号：18K08377
 研究課題名(和文)絶対的遺伝子発現解析による造血幹細胞・ニッチ間分子コミュニケーションの全貌の解明

研究課題名(英文)Elucidate molecular communication between hematopoietic stem cells and their niche by definitive gene expression profiling

研究代表者
 清田 純 (Seita, Jun)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：40793790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は網羅的遺伝子発現解析を用いて、造血幹細胞とそれを取り囲む微小環境を構成する細胞間の分子コミュニケーションを解明することを目指すものであるが、申請直後に遺伝子発現解析の標準手法自体が大きく変化したため、まずは1細胞RNA-seq技術の確立を行った。その結果SMARTseq法を元に世界最高水準の1細胞RNA-seqを遂行することが可能なサンプル処理パイプラインとデータ解析パイプラインを開発することに成功した。現在、1細胞から約11000種類の遺伝子の発現を定量的かつ安定的に検出することに成功している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究が行われた3年間に、遺伝子発現解析に用いる技術はRNA-seq法へとドラスティカルに変化し、申請時に使用を予定していたマイクロアレイ法は2021年にはほとんど使われていない。本研究の開始当初にその変化に対応し、現在、深く読む1細胞RNA-seqの標準手法となったSMART-seq法を乱立する測定プロトコールから選出し、多数の大型機器を組み合わせる必要があるパイプラインを実装することが出来たことは、今後多数の医学生物学研究所の水準を上げることを可能とし、学術的に極めて意義があると考えている。

研究成果の概要(英文)：This study aims to elucidate the molecular communication between hematopoietic stem cells and the cells that forming the surrounding microenvironment using comprehensive gene expression profiling. Since the standard method for gene expression profiling itself evolved drastically immediately after the application, we first aimed to establish single-cell RNA-seq technology. As a result, we succeeded in developing a sample processing pipeline and a data analysis pipeline based on the SMARTseq method that can perform the world's highest level of single-cell RNA-seq. Currently, we have succeeded in quantitatively and stably detecting the expression of approximately 11,000 genes from a single cell.

研究分野：システムバイオロジー

キーワード：遺伝子発現 網羅的解析 造血幹細胞 ニッチ 分子コミュニケーション

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞の加齢に伴う機能変化には内因性のみならず外因性因子の関与が強く示唆されているが、その全体像は明らかにされていない。造血幹細胞と分子コミュニケーションを行う相手として微小環境（ニッチ）の概念が導入されて久しいが、ニッチ機能を担うのが造血幹細胞と 1:1 の関係にある特定の細胞なのか、それとも骨髄内に存在する多種類の非造血細胞が相互に関連するのか、また造血細胞もニッチの機能を担うのか、その全体像は依然不明瞭である。

申請者は全世界で公開されている網羅的遺伝子発現データを収集し、そのビッグデータから各遺伝子の発現ダイナミックレンジ、さらには有意に強く発現していると言える閾値を統計学的に決定する方法を開発し、この解析法を Gene Expression Commons というオープン・プラットフォームとして公開している。本研究ではこのプラットフォームをフル活用し幹細胞・ニッチ間の分子コミュニケーションの解明を目指す。

2. 研究の目的

本研究は申請者が開発した絶対的遺伝子発現解析プラットフォーム「Gene Expression Commons」を応用して、遺伝子発現プロファイリングを駆使することにより、造血幹細胞に外因性因子を提供する微小環境（ニッチ）との間の分子コミュニケーションの全貌を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究の申請時から 1 年で、遺伝子発現解析の標準はマイクロアレイから RNA-seq へと大きく変わった。また測定の対象も細胞集団から個々の細胞を測定する single cell RNA-seq (scRNA-seq) が急速に発展した。そのため本研究でもまず、遺伝子発現解析方法を scRNA-seq へと変更する方針とし、1) 測定プロトコルの策定・最適化と実装、2) データ解析プラットフォームである Gene Expression Commons を RNA-seq へと対応させる、の 2 点に取り組んだ。

4 . 研究成果

具体的には Smart-seq 法に準拠した scRNA-seq 手法をプロトコールとして選択し、テスト細胞を用いた手順の最適化と性能の評価を行った。1 回の scRNA-seq に対して、1 細胞の分取、96 チャンネルキャピラリー式 cDNA 定量装置による RT-PCR 産物の定量、ナノリットル・リキッドハンドリングロボットによるサンプル濃度の平準化とタグメンテーション、次世代シーケンサーによる cDNA 配列の解析など多数の大型機器を使用するため、その作業は困難を極めたが最終的に安定して設計通りの性能を出せるようになった。

また次世代シーケンサーから出力される膨大なデータの解析に対しても、ソフトウェアの開発を行い、生データの品質の評価、レファレンスゲノムへのマッピング、遺伝子発現情報へのデータ標準化、遺伝子発現情報の高次解析などの手法を整え、scRNA-seq パイプラインを完成させた。現在、1 細胞から約 11000 種類の遺伝子の発現を定量的に検出することに成功している。これは現在一般に用いられている手法が約 3000 遺伝子しか検出できないことと比較して、世界的に見ても最高水準の scRNA-seq 手法の実装であると言える。

その後、この完成したパイプラインを利用して、当初計画の細胞種に対する single cell RNA-seq を施行する予定であったが、COVID-19 の影響により研究遂行の遅延が起きている。状況が改善し次第、骨髄内に存在する極めてヘテロな各種細胞の遺伝子発現状態を網羅的に解析し、細胞間コミュニケーションのモデルを構築する。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Travaglini Kyle J., Nabhan Ahmad N., Penland Lolita, Sinha Rahul, Gillich Astrid, Sit Rene V., Chang Stephen, Conley Stephanie D., Mori Yasuo, Seita Jun, Berry Gerald J., Shrager Joseph B., Metzger Ross J., Kuo Christin S., Neff Norma, Weissman Irving L., Quake Stephen R., Krasnow Mark A.	4. 巻 587
2. 論文標題 A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 619 ~ 625
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-020-2922-4	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清田 純
2. 発表標題 1細胞RNAシーケンスによるヒト肺細胞分子アトラス
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清田 純
2. 発表標題 データ駆動型医科学に向けて
3. 学会等名 第5回IoMT学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------