

令和 3 年 11 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15121

研究課題名(和文) シングルセル遺伝子発現解析による多段階白血病発症機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of multistep leukemogenesis by scRNA sequence

研究代表者

坂本 智子 (Sakamoto, Satoko)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：70648427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：急性巨核芽球性白血病 (AMKL, acute megakaryoblastic leukemia)の発症に関わる分子機序を明らかにすることを目的に、転写制御機構であるDNAメチル化プロファイルの解析を行った。正常血液前駆細胞とAMKLの比較では、AMKLに特異的なDNAメチル化状態は、赤芽球や巨核球の前駆細胞が持つ特徴的なプロファイルであった。ヒトiPS細胞から分化誘導された血液系譜細胞のシングルセルRNAシーケンシング (scRNA-seq) では分化過程の軌跡を描くことに成功した一方、白血病細胞のscRNA-seqは十分なクオリティが得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子変異の蓄積が白血病をはじめとするがんの多段階発症に関与することが知られている。本研究では、遺伝子発現解析およびメチル化解析の両方から、正常の血球前駆細胞 (HSC, MPP, CLP, CMP, GMP, MEP)、TAM、DS-AMKL由来細胞の特徴や違いを捉え、TAM、AMKL細胞の起源細胞の推定を行った。本研究により、TAM、AMKLにおける多段階白血病発症機構のさらなる理解が進むものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To address molecular basis of Down syndrome's acute megakaryoblastic leukemia (AMKL), we employed DNA methylation analysis and found DNA methylation profile of the AMKL was similar to the that of common myeloid progenitors (CMPs) and megakaryocyte/erythroid-progenitors (MEPs). We then conducted single cell RNA-sequencing of iPS cell-derived hematopoietic cells and could describe trajectory of differentiation. However, quality of scRNA-seq of leukemia cells was not sufficient for further analyses.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：遺伝子発現解析 メチル化解析 シングルセル解析 ダウン症候群 白血病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の高齢妊娠の増加に伴い、ダウン症の発症数が増加している。ダウン症児の 5~10%は、TAMと呼ばれる前白血病を発症するが、その多くは自然寛解して治癒する。一方で自然寛解後、TAM 発症者の 20%が生後 4 歳までに真の白血病である急性巨核芽球性白血病 (DS-AMKL) へと進展する。DS-AMKL はダウン症児、つまりまず染色体 21 番のトリソミーのゲノム状態において発症するが、その過程においてはまず GATA1 変異によって生じる前がん状態の TAM となり、そしてさらにエピゲノム制御因子のゲノム変異によって DS-AMKL へ進展することが明らかとなった(Yoshida et al., Nat Genet, 2013)。このような多段階発がん過程が明らかになっている一方で、TAM や DS-AMKL の腫瘍起源細胞はいまだ明らかではない。

2. 研究の目的

転写制御機構の一つである DNA メチル化は、細胞分化に深く関与するが、既報では、TAM と AMKL の間では DNA メチル化状態に大きな差がないとされてきた (Malinge.S. et al, Blood 2013)。一方で、我々が芽球の比率の高い、定量性の高いサンプルのみを解析した結果、TAM と AMKL の DNA メチル化状態が大きく異なることを見いだした。このことから、ゲノム変異に加えてエピゲノム異常ががんの進展に寄与していることが示唆された。さらに、TAM および DS-AMKL 細胞において、その遺伝子発現状態が細胞ごとに異なることが予想された。

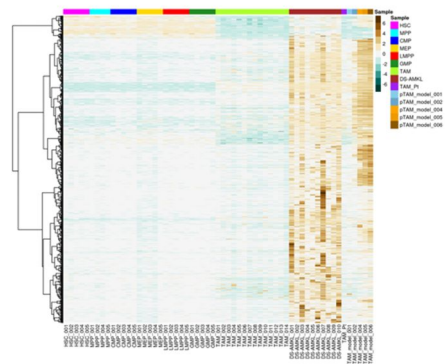
本研究では、TAM や DS-AMKL の腫瘍起源細胞を明らかにするため、正常の血球前駆細胞および TAM、DS-AMKL の遺伝子発現やエピゲノムの比較解析を行うことで、正常細胞からがん化する過程の分子機序を明らかにすることを目的とした。さらに、細胞間に存在する遺伝子発現やエピゲノム状態の不均質性を解析することで、腫瘍細胞の階層性に迫ることを試みた。

3. 研究の方法

ゲノム DNA 及び RNA は、TAM または AMKL を発症したダウン症児の末梢血または骨髄より精製した。DNA メチル化は、イルミナ社の Infinium HumanDNA methylation 450K array を用いて解析した。RNA シークエンスは、SMARTer Ultra Low Input キット (TaKaRa) 及び Nextera XT (Illumina) を用いて作製されたライブラリを HiSeq2500 でシークエンシングした。シングルセル遺伝子発現解析については、単一細胞の回収及び cDNA 合成は C1 Cell Autoprep 及び SMARTer Ultra Low Input キット (TaKaRa) を用いて行った。その後、Nextera XT (Illumina) でライブラリを作製し、HiSeq2500 でシークエンシングを行った。

4. 研究成果

まず、我々の先行研究で取得した TAM 及び AMKL 患者の末梢血または骨髄の DNA メチル化データと、公共データベースより取得する正常血液前駆細胞の DNA メチル化プロファイルと比較し、TAM や AMKL の DNA メチル化プロファイルがどの前駆細胞の DNA メチル化状態に近い解析した。血液前駆細胞である HSC、MPP、CMP、MEP の間で異なる DNA メチル化を示したプローブを用いて、TAM 及び AMKL の DNA メチル化状態を調べた結果、CMP および MEP に近いプロファイルを示した (図 1)。



このことは、TAM および AMKL の腫瘍起源細胞が CMP から MEP に移行する過程の細胞であることを示唆している。一方で、RNA シークエンシングによる遺伝子発現解析では、TAM 及び AMKL の発現プロファイルが CMP や MEP を含む正常血液前駆細胞と大きく異なっていた。これらのことから、DNA メチル化は正常細胞からがん化するプロセスを記憶しているが、遺伝子発現は細胞の状態に対応して、動的に変化している可能性が示唆された。以上の結果より、TAM や AMKL の起源細胞の候補が CMP および MEP であることを提案する。

次に、TAM と AMKL の二群の間で異なる DNA メチル化プローブを解析した結果、CTCF や EZH2 の結合部位であることが見いだされた。これらの転写因子は AMKL で特異的に観察されるゲノム変異の標的であることから、TAM から AMKL に変化する過程で起こるゲノム変異が DNA メチル化プロファイルの変化を介して悪性化に寄与していることが考えられた。同時に実施した、ヒト TAM 細胞を免疫不全マウスに連続移植して作製した TAM から AMKL への進展モデルマウスの DNA メチル化

解析でも、ヒト臨床検体と同様の結果が得られた。そして、TAM 検体のうち、将来 AMKL を発症するものと自然寛解するものの DNA メチル化プロファイルの違いを調べた。その結果、107 箇所のシトシンが AMKL 発症群でメチル化が増加することを見だし、この傾向はマウスモデルでも再現された(図2)。

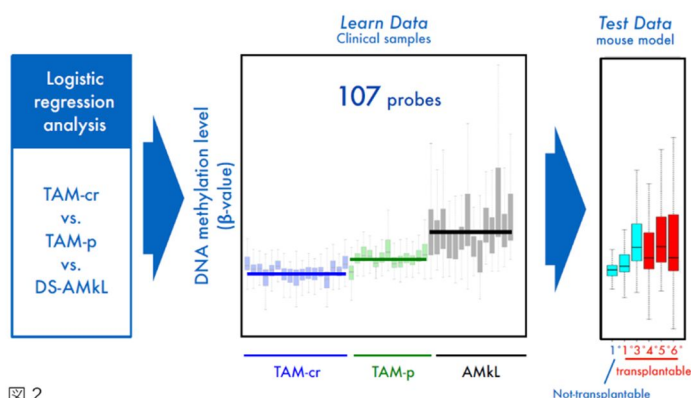


図 2

続いて、腫瘍内不均質性を解析するために AMKL に対するシングルセル RNA シークエンシングを実施した。まず、アレル特異的な発現を解析するために、遺伝子の全長領域を対象とした cDNA 合成およびライブラリ作製を行った。そして、シーケンシングリードの塩基情報を解析することで、AMKL で特異的に検出されるゲノム変異の存在を示す GATA1 のスプライシングバリエーションを検出した。これは、正常細胞と AMKL 芽球が混在する中で、AMKL の細胞のみを選択して解析できることを示している。

本研究では、DNA メチル化解析によって TAM および AMKL の起源細胞の探索を行い、CMP および MEP が候補であることを示した。このことは、DNA メチル化が長期メモリであることから、過去の分化状態を推定することに応用できることを示唆している。さらに前がん状態である TAM と AMKL の DNA メチル化解析では、AMKL 特異的なゲノム変異を受ける転写因子の結合部位の DNA メチル化異常を同定した(図3)。さらに、DNA メチル化プロファイルの解析が AMKL の発症を予測できる可能性を示した。本研究が示した上記の解析結果はこれまでに不明であったダウン症における起源細胞から白血病を発症する多段階発がん過程を分子レベルで示しており、新しい診断方法や治療薬の開発につながることを期待される。

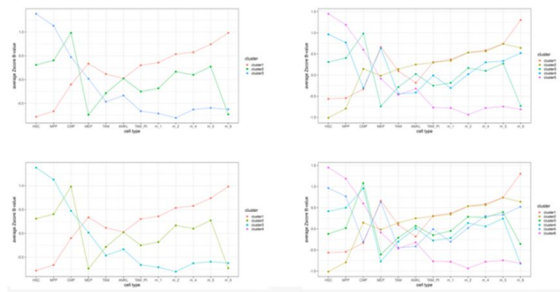
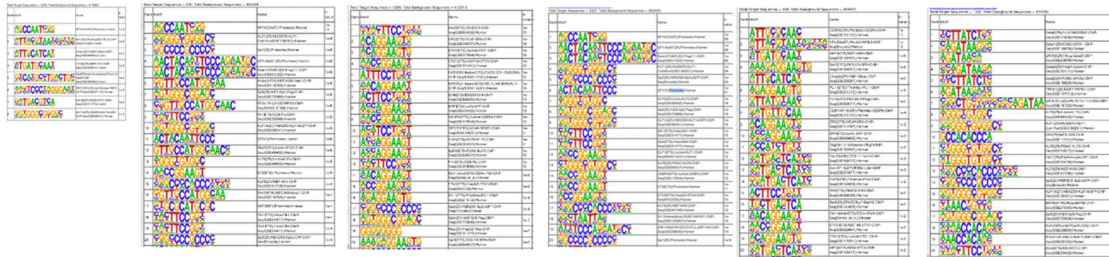


図3 (A)正常血液前駆細胞とTAMおよびAMKLのメチル化パターンの変動。(B)異なる変動パターンを示すメチル化プローブ近傍に濃縮する転写因子結合サイト



< 引用文献 >

- 1 . Yoshida et al., Nat Genet. 2013; 45:1293-9.
- 2 . Malinge.S. et al., Blood. 2013;122:e33-43.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6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 1件）

1. 著者名 坂本智子、前伸一、長船健二、岡田千尋、樺井良太郎、渡辺亮.	4. 巻 153
2. 論文標題 細胞運命決定機構を明らかにするシングルセル遺伝子発現解析.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 61-66
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 渡辺亮、坂本智子	4. 巻 61
2. 論文標題 シングルセル解析の最前線	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 整形・災害外科	6. 最初と最後の頁 427-431
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18888/se.0000000417	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 坂本智子、渡辺亮	4. 巻 71
2. 論文標題 シングルセルゲノミクスによる細胞個性の解析が展開する免疫学研究.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 448-454
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 坂本智子、渡辺亮	4. 巻 9
2. 論文標題 日常化するシングルセル遺伝子発現解析が展開する医学研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 遺伝子医学	6. 最初と最後の頁 116-121
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 龍岡久登、坂本智子、渡辺亮、稲垣暢也	4. 巻 37
2. 論文標題 細胞運命決定機構を明らかにするシングルセル遺伝子発現解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 シングルセルゲノミクス 組織の機能、病態が1細胞レベルで見えてきた！実験医学増刊	6. 最初と最後の頁 68-72
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 Tsujimoto H, Kasahara T, Sueta SI, Araoka T, Sakamoto S, Okada C, Mae SI, Nakajima T, Okamoto N, Taura D, Nasu M, Shimizu T, Ryosaka M, Li Z, Sone M, Ikeya M, Watanabe A, Osafune K.	4. 巻 31
2. 論文標題 A Modular Differentiation System Maps Multiple Human Kidney Lineages from Pluripotent Stem Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 107476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.03.040	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3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 喜多 知子、坂本 智子、松永 麻美、長谷川 晶子、岡田 千尋、中川 隆之、渡辺 亮.
2. 発表標題 Challenge to Regeneration of Hair Cells in the Cochlea Sensory Epithelia by Single Cell Transcriptomics.
3. 学会等名 第41回 分子生物学会 年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂本 智子、龍岡 久登、矢部 大介、稲垣 暢也、渡辺 亮.
2. 発表標題 膀胱の再生を明らかにするシングルセル遺伝子発現解析.
3. 学会等名 第41回 分子生物学会 年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂本智子、渡辺亮
2. 発表標題 シングルセルゲノミクスが展開する発生学研究 -シングルセル遺伝子発現解析でせまる胚 細胞再生メカニズムの解明
3. 学会等名 岡山大学次世代研究拠点シンポジウム2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

本研究は、研究代表者の退職に伴って、当初の研究期間より短い期間で終了した。

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