

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19471

研究課題名（和文）転写型DNAバーコードを用いた癌オルガノイドにおける細胞ヒエラルキーの解明

研究課題名（英文）Analysis of cellular hierarchy by transcribed DNA barcodes

研究代表者

関元昭（Seki, Motoaki）

千葉大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：70714278

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、任意の異なる配列のDNAバーコードを分子タグとして各細胞に導入し、一細胞ごとの遺伝子発現解析およびエピゲノム解析においてそれらと細胞のクローン情報とを紐付ける技術を開発した。このDNAバーコードを導入した胃癌粘膜上皮細胞株を樹立し、この細胞へ腫瘍ウイルス（エプスタイン・パールウイルス、EBウイルス）を感染させて癌化のモデルとした。不均一な細胞集団の中で、どのクローンが感染後に濃縮するのか、それらの細胞はどのような遺伝子発現やエピゲノム状態を示すのか、について詳細な解析をしている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した一細胞遺伝子発現解析およびエピゲノム解析において判読可能なDNAバーコードライブラリーおよび不均一な細胞集団における細胞系譜情報と細胞プロファイルを紐付ける技術は、発癌や組織の発生、分化過程など、多様な細胞から構成される細胞集団の階層性やその振る舞いを理解する上で有用である。従って、前述のような生命現象の理解に加え、抗癌剤耐性の獲得機序やiPS細胞からの分化誘導過程などの解析から、治療薬開発あるいは再生医療への応用へも期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a technology in which each cell in a heterogeneous population is tagged with arbitrary DNA barcodes to link gene expression profiles and chromatin accessibility to the clone information. We established gastric mucosal epithelial cells with the DNA barcodes to be infected with Epstein-Barr virus. We are analyzing the clones enriched post-infection and their transcriptomic and epigenomic status.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNAバーコード

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 癌オルガノイドモデル

これまでの癌研究においては主に患者由来の癌組織、マウス発癌モデル、培養細胞である癌細胞株が解析対象であった。癌の臨床検体は患者の臨床情報と合わせ貴重な情報を提供するがサンプル量に限度があり、再現することも事実上不可能だった。一方、癌組織から樹立した癌細胞株は再現性を持って実験を行うことができるが、培養皿上で二次元的に培養をする過程で本来癌組織が内包している多様な分化度あるいは表現型を失ってしまっていた。近年培養法が確立されつつある癌オルガノイドは、細胞外基質等を含んだ培地中で三次元的に癌細胞を培養したもので、元の腫瘍組織の細胞群を保持し、組織学的あるいは生理学的にも模倣している。また、マウス発癌モデルやマウス移植モデルと異なり、*in vitro* での経過観察が可能で、外部からの遺伝子導入も他の実験系に比べ容易である。癌オルガノイドを用いることで癌幹細胞を可視化しつつ、腫瘍の形成をモニタリングする系が開発されており、大腸癌オルガノイド中の癌幹細胞ヒエラルキーの可塑性が示されているが、どのような細胞が脱分化して幹細胞性を再獲得するのかは未知であった。

### (2) DNA バーコードによる細胞不均一性の解析

組織幹細胞あるいは癌幹細胞の存在とそれらを含む細胞集団の多様性はこれまで蛍光タンパク質を用いた細胞標識によって可視化されてきた。例えば Brainbow に代表される多色の蛍光標識では、標識直後はランダムな蛍光像を示すのに対し、時間の経過と共に幹細胞が分裂し、同じ幹細胞を祖先とする細胞群が同じ蛍光色で塗り分けられていく。同法は幹細胞とその分裂細胞の識別に有効で経時観察にも適している半面、蛍光色に依存するために細胞毎の分解能が低く、多重の標識も困難であった。一方、Bhang らはランダムな塩基配列を用いた DNA 分子バーコードは十分に複雑度の高いバーコードプールを細胞に導入することで同時に  $1 \times 10^6$  個の肺癌由来培養細胞を識別した。抗癌剤処理前後における細胞集団の DNA バーコード配列と細胞のゲノム配列とを同時に解析し、抗癌剤耐性細胞特異的遺伝子変異を見出したが (Bhang et al. 2015 Nat Med)、癌幹細胞の可塑性を考慮すると幹細胞性はゲノム変異ではなく遺伝子発現によって規定されていると考えられ、遺伝子発現情報と DNA バーコードを紐付ける必要があった。

## 2. 研究の目的

癌はゲノム変異に端を発し、トランスクリプトームあるいはエピゲノム修飾の変化を介して種々のシグナル経路の破綻に至る疾患である。これまでに様々な腫瘍において細胞の不均一性と階層性が報告されており、正常組織幹細胞との比較から、癌幹細胞のマーカー遺伝子が同定された。癌幹細胞と非癌幹細胞との比較から、癌幹細胞が造腫瘍能を持ち、癌の発生、悪性化、浸潤、転移、薬剤抵抗性など、様々な性質に深く関与することが示されてきたが、非癌幹細胞の多様性も含めた細胞集団の全貌はいまだ明らかにされていない。本研究では当初、細胞系譜情報と一細胞遺伝子発現情報から、癌の発生メカニズム、特に癌幹細胞を頂点とする細胞ヒエラルキーとその性質を高解像度で明らかにすることとしていた。

## 3. 研究の方法

### (1) 転写型 DNA バーコードを使った系譜追跡トランスクリプトーム法の開発

不均質な細胞集団の形質を高解像度に観察するには、個々の細胞を識別するためにタグ付けし、それぞれの細胞のシングルセル遺伝子発現情報とタグ情報を紐付けて解析する必要があった。既存の DNA バーコードはランダムな DNA 配列がホストゲノムに挿入されることでタグ付けを行うが、この情報は RNA へと転写されないため、遺伝子発現解析ではバーコード配列を捕捉できない。そこでまず 50 塩基長の SW リピート (G または C 塩基と、A または T 塩基が交互に現れる) を含む DNA 断片を合成し、両端のプライマー結合配列を利用して PCR で増幅した。PCR 産物をレンチウイルスベクターのマーカー遺伝子の 3'UTR ヘクローニングし、大規模な大腸菌トランスフォーメーションによって高複雑度の DNA バーコードライブラリーを作成した (図 1A)。このプラスミドは混合プールのままパッケージングプラスミドとコトランスフェクションし、高複雑度のレンチウイルス粒子へとパッケージングし、このレンチウイルスライブラリーを細胞へ感染させることで、それぞれ任意の異なる DNA バーコードを獲得した細胞集団を得た。

### (2) 二重 DNA バーコードを使った、細胞集団の不均一性解析法の開発

転写型 DNA バーコードをさらに発展させ、クロマチンアクセスビリティを評価する ATAC-seq (Assay for transposase-accessible chromatin with sequencing) 法にて DNA バーコードを取得できるようにした。そのために、レンチウイルスベクターの、マーカー遺伝子のプロモーター配列の直下に DNA バーコード配列を挿入した。前述のとおり、高複雑度のプールのままプラスミドライブラリーを構築し、レンチウイルス粒子の作成、培養細胞株への感染を行った。DNA バーコードを導入した細胞を回収し、バーコード配列が回収可能か評価した。

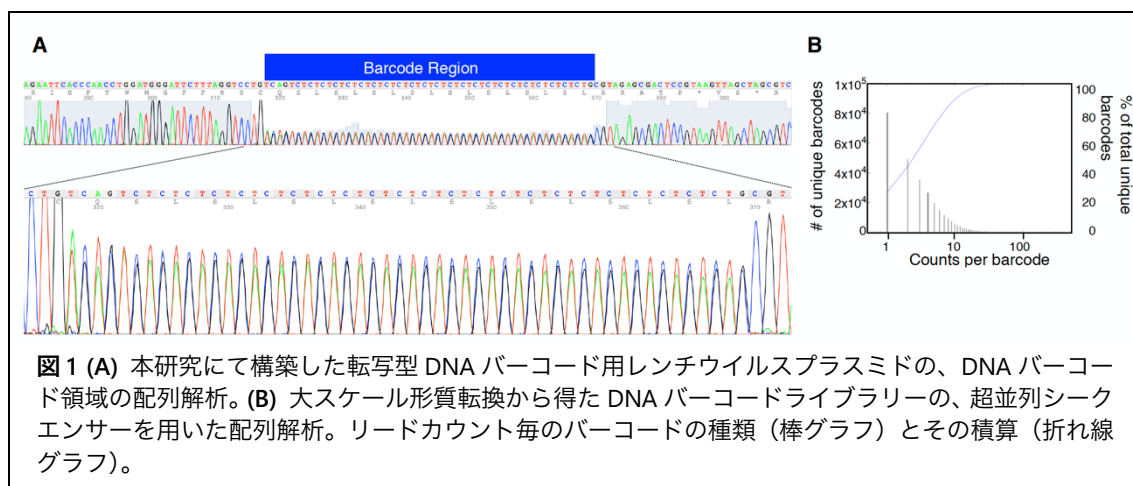
### (3) 癌細胞株における不均一性解析

申請時には癌オルガノイドモデルを用いて転写型 DNA バーコードの有用性の概念実証実験を行う計画であったが、適した細胞株の入手が困難となった。そこで、本研究にて作成した二重 DNA バーコードをレンチウイルスにて胃上皮細胞株へ導入し、腫瘍ウイルスであるエプスタインバー（Epstein-Barr virus）感染性に関する不均一性解析を行った。

## 4. 研究成果

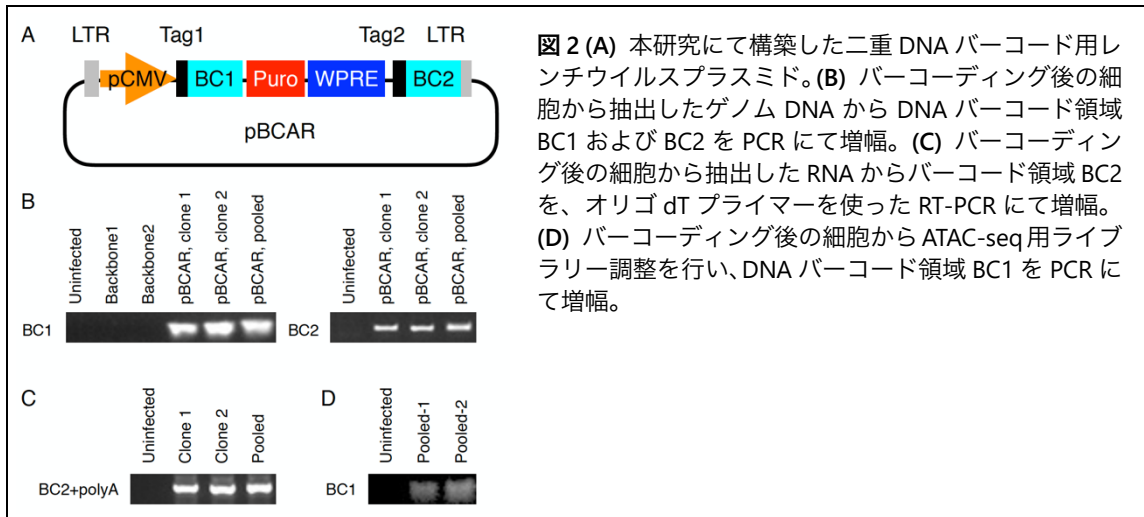
### (1) 一細胞遺伝子発現解析と細胞系譜の再構成を同時に行う技術

50 塩基長の SW リピートを含む DNA 断片を PCR で増幅し、レンチウイルスベクターのマーカ一遺伝子の 3'UTR ヘクローニングした。まず小スケールにて大腸菌を形質転換し、プラスミドを回収した。これをレンチウイルスにて HEK293Ta 細胞へ導入し、薬剤マーカ一で選択した細胞からゲノム DNA および RNA を抽出した。ゲノム DNA から PCR にて DNA バーコード領域を増幅することができ、サンガーシーケンシングにて正しい DNA バーコードが挿入されていることが確認された。同様に抽出した RNA からオリゴ dT プライマーで逆転写し、この cDNA をテンプレートとした PCR によって DNA バーコード領域が増幅でき、サンガーシーケンシングにてその配列を確認できた。以上より本研究で設計した転写型 DNA バーコード用レンチウイルスベクターの有効性が示された。次に大スケールにて大腸菌を形質転換し、寒天培地から全コロニーを回収し DNA バーコードプラスミドライブラリーを抽出した。プラスミドプールから DNA バーコード配列を PCR にて増幅し、得られたシーケンシングライブラリーを MiSeq (Illumina) にて解析した。その結果、このライブラリーに約 10 万種類の DNA バーコードが含まれていることがわかり、100K DNA バーコードライブラリーとした。



### (2) 二重 DNA バーコードを使った、細胞集団の不均一性解析法の開発

転写型 DNA バーコードをさらに発展させ、クロマチンアクセスビリティを評価する ATAC-seq 法にて DNA バーコードを取得可能とするために、まず、マーカ一遺伝子の ORF を、DNA バーコード配列を付加したプライマーで PCR にて増幅し、レンチウイルスベクターへクローニングした。小スケールにてプラスミドを抽出し、レンチウイルス粒子を作成して 293T 細胞へと感染させた。薬剤マーカ一で選択した細胞からゲノム DNA、RNA を抽出し、またトランスポザーゼ処理によって ATAC-seq 用サンプルを調整した。ゲノム DNA、RNA からオリゴ dT プライマーにて逆転写した cDNA、ATAC-seq 用サンプルのいずれからも PCR によって DNA バーコード領域の増幅が認められ、本研究で設計した二重 DNA バーコード用レンチウイルスベクターの有効性が示された。次に大スケールにて大腸菌をエレクトロポレーションで形質転換し、DNA バーコードプラスミドライブラリーを抽出した。プラスミドプールから DNA バーコード配列を PCR にて増幅し、得られたシーケンシングライブラリーを HiSeq (Illumina) にて解析した。その結果、1100 万リードの内、238 万種類のバーコードが 2 回以上読まれており、リードをポアソン分布に当てはめると約 450 万種類のバーコードが含まれていると予想された。そこでこのライブラリーを 4.5Mi pBCAR (Barcoding for Chromatin Accessibility and RNA) ライブラリーとした。



### (3) 癌細胞株における不均一性解析

前述の pBCAR ライブラリーからレンチウイルス粒子を作成して、不死化した胃粘膜上皮細胞株 GES1 へと感染させた。薬剤マーカーで選択した細胞の内、100 万細胞分を取り分け、これを 1Mi GES1-pBCAR 細胞ライブラリーとした。この細胞から増幅した 1000 万細胞をホストとして、Akata 細胞を用いた EBV の接触感染 (Imai et al. 1998 J Virol) を行った。感染後、薬剤マーカーによって非感染細胞を除去し、感染細胞集団から経時的にゲノム DNA を回収した。胃上皮細胞は、EBV への感染によってゲノム中の CpG アイランドに強いメチル化が入ることが知られている (Matsusaka et al. 2011 Cancer Res)。そこで抽出したゲノム DNA をバイサルファイト PCR 法によって、非メチル化シトシンをチミンへ変換後に増幅し、パイロシークエンサーを用いて EBV 感染と感染細胞における CpG アイランドメチル化を確認した。現在、これらの細胞に含まれている DNA バーコードのシーケンスを行っており、EBV 感染への感受性が元々高い細胞が存在するのか、あるいは感染自体がランダムに生じる、非選択的なイベントなのかを明らかにし、クローン間の遺伝子発現あるいはクロマチン状態について観察する予定である。

以上より、研究期間を通じて、一細胞遺伝子発現解析およびエピゲノム解析において判読可能な DNA バーコードライブラリーを開発し、不均一な細胞集団における細胞系譜情報と細胞プロファイルを紐付ける技術を確認した。本法は発癌や組織の発生、分化過程における細胞集団の振る舞いを理解する上で有用であり、生命現象の理解に加え、抗癌剤の開発あるいは再生医療への応用へも期待できる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nishimasu Hiroshi, Shi Xi, Ishiguro Soh, Gao Linyi, Hirano Seiichi, Okazaki Sae, Noda Taichi, Abudayyeh Omar O., Gootenberg Jonathan S., Mori Hideto, Oura Seiya, Holmes Benjamin, Tanaka Mamoru, Seki Motoaki, Hirano Hisato, Aburatani Hiroyuki, Ishitani Ryuichiro, Ikawa Masahito, Yachie Nozomu, Zhang Feng, Nureki Osamu	4. 巻 361
2. 論文標題 Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 1259 ~ 1262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1126/science.aas9129">https://doi.org/10.1126/science.aas9129</a>	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 該当する

1. 著者名 Nishizono Hirofumi, Darwish Mohamed, Uosaki Hideki, Masuyama Nanami, Seki Motoaki, Abe Hiroyuki, Yachie Nozomu, Yasuda Ryohei	4. 巻 158
2. 論文標題 Use of Freeze-thawed Embryos for High-efficiency Production of Genetically Modified Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 e60808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/60808	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 該当する

1. 著者名 Masoudi Mohammad, Seki Motoaki, Yazdanparast Razieh, Yachie Nozomu, Aburatani Hiroyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 A genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screening reveals SH3D21 as a sensitizer for gemcitabine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1038/s41598-019-55893-2">https://doi.org/10.1038/s41598-019-55893-2</a>	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	油谷 浩幸  (Aburatani Hiroyuki)  (10202657)	東京大学・先端科学技術研究センター・教授    (12601)	
研究協力者	谷内江 望  (Yachie Nozomu)  (60636801)	東京大学・先端科学技術研究センター・准教授    (12601)	