

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860236

研究課題名(和文) 神経細胞の分化と腫瘍化の境界の解明

研究課題名(英文) Molecular understanding of gliomagenesis using neural differentiation system

研究代表者

渡辺 亮 (Watanabe, Akira)

京都大学・iPS細胞研究所・助教

研究者番号：60506765

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)：本研究の目的は、脳腫瘍の発生のメカニズムを理解するために、まず正常な神経分化における遺伝子発現の変化を捉え、次にそこから逸脱して腫瘍化するメカニズムを捉え、脳腫瘍を征圧することである。本研究課題では、単一細胞遺伝子発現解析技術を用いることで、分化過程において変動する遺伝子発現を高解像で捉えることに成功した。さらには細胞表面抗原を使用することで、目的の神経細胞になる集団と逸脱する集団の同定に成功した。これらの結果は、脳腫瘍の発症の理解に寄与することが期待される。さらに、脳腫瘍以外の癌においても同様の戦略で癌発症のメカニズムが解明できることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to address the early event of gliomagenesis. I hypothesized that initiation of tumorigenesis is deviation from a normal neural differentiation. First, I established a methodology of single cell gene expression analysis, which enables to analyze dynamics of transcriptome during the differentiation. By combination with bioinformatical analysis, I successfully re-order the single cell samples in order to differentiation stage. Then, I applied this technique to neural differentiation, and demonstrated the dynamic alteration of transcription during neural differentiation. And also, I could identify cell populations that deviated from normal differentiation. The molecular mechanism that is responsible for branching may facilitate the molecular understanding of gliomagenesis.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：シングルセル 脳腫瘍

1. 研究開始当初の背景

予後が非常に不良である神経膠腫が発症する分子機序を理解することは新規治療法の開発や診断の効率の向上に必須であるとされる一方で、ほとんど解明されていない。例えば、代表的な神経膠腫である星状細胞腫はアストロサイトに由来することが示唆される一方で、終末分化したアストロサイトが脱分化して発生したのか、より未分化なグリア前駆細胞からの分化の異常によって生じたのか明らかになっていない。

申請者は、マイクロアレイを用いた DNA コピー数及び遺伝子発現の解析によって、固形腫瘍の発生機序の解明を試みてきた (*Nat. Cell Biol.*, 2006; *Cancer Sci.*, 2008; *Nat. Cell Biol.*, 2008)。そして、神経膠腫の癌抑制遺伝子の探索から染色体 13q21 に存在する *DACH1* 遺伝子のホモ欠失を発見した。神経膠腫由来 U87MG 細胞株に *DACH1* をドキシサイクリンで誘導発現できる細胞株を用いて、*DACH1* が *in vitro* 及び *in vivo* で腫瘍の増殖を抑制することを示した。無血清培地で培養した U87MG 細胞に *DACH1* を発現誘導すると幹細胞に特徴的なニューロスフェアの形成が抑えられ、分化が誘導されたことより、*DACH1* が脳腫瘍で欠失を示す癌抑制遺伝子であり、癌幹細胞の分化に関与することが示された (*Watanabe et al., PNAS*, 2011)。このように、申請者はこれまでに腫瘍が形成されるメカニズムの解明を試み、特に神経膠腫では無限な増殖能の獲得より異常な細胞分化が腫瘍化の最も早期のイベントであるという考えに至った。すなわち、未分化な細胞がアストロサイトなどの神経細胞へ分化する際に正常分化から逸脱する「正常な細胞分化と腫瘍化の境界」を解明することで脳腫瘍の発生する瞬間が捉えられると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、分化の異常に基づく神経膠腫の発生機序を明らかにすることである。神経上皮性腫瘍の大部分を占める神経膠腫は、神経幹細胞からアストロサイトへの分化異常によって生じると考えられているが、分化の異常が誘導されるメカニズムは未だ不明

である。本研究では、神経膠腫に特異的な遺伝子変異をもつ多能性幹細胞が正常な神経分化から逸脱する瞬間を検出し、神経膠腫の発生機序を明らかにする。本研究は正常な神経分化と腫瘍化の境界を解析することで、神経膠腫が発生するメカニズムを明らかにし、新規の診断方法・治療薬の開発方法を提案する。

3. 研究の方法

多能性幹細胞から神経細胞への分化においてダイナミックに変動する遺伝子発現ネットワークを捉えるには、マルチポイントにおけるデータ収集が必要である。細胞集団のヘテロ性を解析できるシングルセル遺伝子発現解析は、このような多点解析に有用な手法である。そこで、シングルセル遺伝子発現解析法を開発を行った。まず、同一培養ディッシュ上の 201B6 iPS 細胞についてシングルセル化した後に、フローサイトメトリーを用いて、1 細胞を 1 ウェルに単離した。48 個の単一細胞について、SMARTer Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing を用いて、RNA 抽出及び cDNA 合成を行った。同時に、同じ培養皿から得られた iPS 細胞について、自動単一細胞解析装置 (C1 Autoprep, Fluidigm 社) 及び SMARTer Ultra Low Kit を用いて cDNA 合成を実施した。これらの cDNA は NexteraXT を用いて、イルミナ社のアダプタを付加したライブラリを作製した。これらのライブラリについて、イルミナ社の HiSeq2500 を用いて、シングルエンドで 100 サイクルのシーケンシングすることで配列決定を行った。その後、RPKMforGene を用いて遺伝子の発現量に変換した。同様の実験を iPS 細胞から神経分化誘導をかけた 3, 7, 12, 21, 28 日目の細胞についてシングルセル RNA-seq を実施した。各タイムポイントについて、20 以上の単一細胞から cDNA を合成し、RNA-シーケンシングを実施した。シーケンシングデータは RPKMforGene を用いて遺伝子の発現量に変換した。解析の条件検討を行うために、心筋細胞への分化誘導をかけて 3, 5, 7, 9, 11, 21, 30 日目の細胞についても同様の実験を行っ

た。

4. 研究成果

(1) シングルセルから cDNA 合成する条件の最適化

cDNA 合成について、フローサイトメトリーで単離された細胞に対してマニュアルハンドリングで行ったものと C1 Autoprep で作製したサンプルで、検出できる遺伝子数を比較した。その結果、どの比較においても C1 Autoprep で作製したサンプルの方がより多くの遺伝子を検出できる傾向にあった。

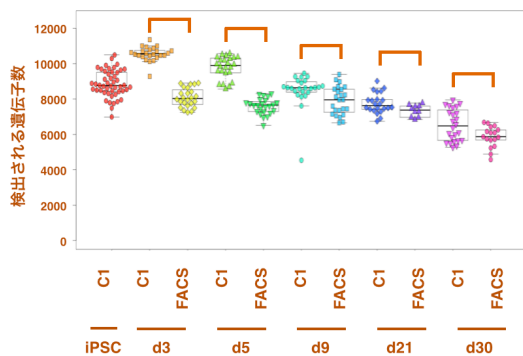


図1 シングルセル RNA-seq で検出された遺伝子数。1プロットがひとつのシングルセル RNA-seq で得られた遺伝子数を示す。

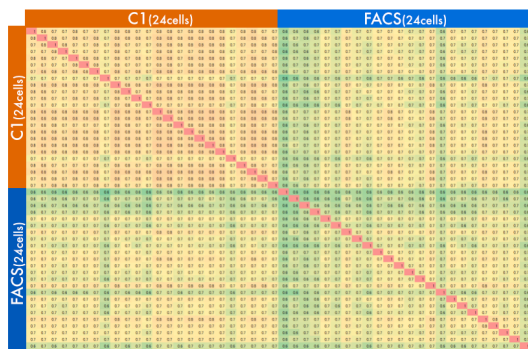


図2 シングルセル RNA-seq による遺伝子発現の相関。緑に比べ赤の方が高い相関を示す。FACS 及び C1 Auto-prep の各 24 サンプルについて、相関を調べた結果、C1 同士の方が高い相関を示した。

シングルセル RNA-seq で得られた遺伝子発現プロファイルについて、二細胞間比較を行った。その結果、C1 Auto-prep で作製

したサンプルは、全ての組み合わせにおいて相関係数が 0.7 を超していた。一方で、フローサイトメトリー及びマニュアルハンドリングで調製されたサンプルは相関係数が 0.5~0.7 だったことから、C1 Auto-prep でサンプル調製を行う法がより高い信頼性をもつデータを取得できることが示唆された。

(2) iPS 細胞から神経細胞への分化における遺伝子発現プロファイルの変化

iPS 細胞から神経細胞へ分化誘導をかけたサンプルについてシングルセル RNA-seq を実施した。得られた遺伝子発現データを用いて主成分分析を行った結果、細胞を回収した日ではなく、細胞の分化の度合いに従った細胞の並び替えが可能になった。

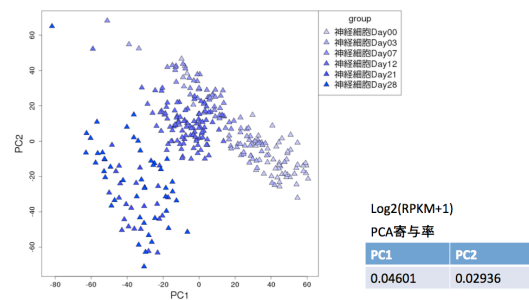


図3 iPS 細胞から神経細胞へ分化誘導させた細胞における遺伝子発現プロファイルの変化。主成分分析によって、サンプルの並び替えを行った結果、おおよそサンプリングの日付に従った並びとなったが一部順番が逆転したサンプルが見受けられた。

また、この系譜から逸脱する細胞集団についても同様の実験を行い、正常の分化パスウェイとは異なる遺伝子発現を示すことが示された。このことより、神経分化の実験系と単一細胞遺伝子発現解析で、正常分化とそこからの逸脱を可視化することに成功した。同様の実験を iPS 細胞から分化させた心筋細胞系譜でも行い、神経細胞系譜における遺伝子発現の変化とは異なるパスウェイを経由することを明らかにした。これらの結果から、本研究課題である「神経分化における正常とそこからの逸脱のイベントの同定」について、成果が得られたと判

断した。さらに、これらの結果は、細胞分化の過程でダイナミックに変化する転写ネットワークを捉えることを可能にただけでなく、細胞の分化状態を予測する応用ができることを示唆しており、今後の展開も期待される。

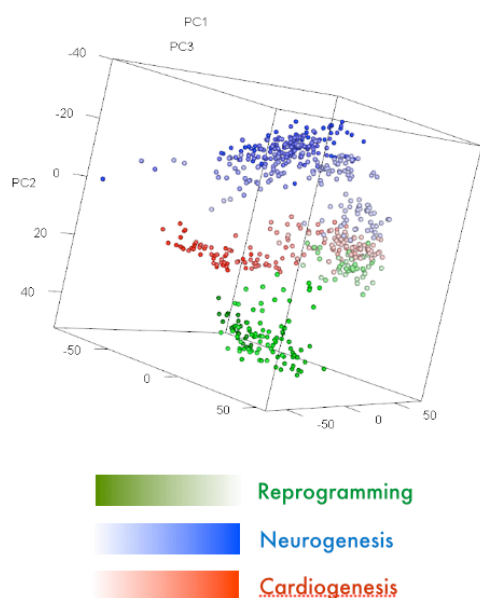


図4 各種細胞に分化する過程で変動する遺伝子発現プロファイルをシングルセルRNA-seq及び主成分分析で観察した。

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5件)

①Evaluation of safety of induced pluripotent stem cells by genome integrity.

Watanabe A, Amano N, Tokunaga Y, Unyane P, Yamanaka S

Inflammation and Regeneration, 34: 87-93 (2014)

②Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient Induced Pluripotent Stem Cells by TALEN and CRISPR-Cas9

Li HL, Fujimoto N, Sasakawa N, Shirai S, Ohkame T, Sakuma T, Tanaka M, Amano N, Watanabe A, Sakurai H, Yamamoto T, Yamanaka S, Hotta A.

Stem Cell Reports, 4(1):143-54 (2015)

doi: 10.1016/j.stemcr.2014.10.013.

③Dynamic regulation of human endogenous retroviruses mediates factor-induced reprogramming and differentiation potential.

Ohnuki M, Tanabe K, Sutou K, Teramoto I, Sawamura Y, Narita M, Nakamura M, Tokunaga Y, Nakamura M, Watanabe A, Yamanaka S, Takahashi K.

Proceeding of the National Academy of Science U.S.A, 111(34):12426-31 (2014)

doi: 10.1073/pnas.1413299111.

④Expandable megakaryocyte cell lines enable clinically applicable generation of platelets from human induced pluripotent stem cells.

Nakamura S, Takayama N, Hirata S, Seo H, Endo H, Ochi K, Fujita K, Koike T, Harimoto K, Dohda T, Watanabe A, Okita K, Takahashi N, Sawaguchi A, Yamanaka S, Nakauchi H, Nishimura S, Eto K

Cell Stem Cell, 14(4):535-48 (2014)

doi: 10.1016/j.stem.2014.01.011

⑤Generation and characterization of induced pluripotent stem cells from Aid-deficient mice. Shimamoto R, Amano N, Ichisaka T, Watanabe A, Yamanaka S, Okita K.

PLoS ONE, 9(4):e94735 (2014)

doi: 10.1371/journal.pone.0094735

[学会発表] (計4件)

① Akira Watanabe

“Single Cell Transcriptome Analysis Dissects Cell Fate Determination From iPS Cells to Cardiomyocyte” Molecular Clock 2015, 2015年3月, 京都(招待講演)

② Akira Watanabe

“Single Cell Transcriptome Analysis Dissects Cell Fate Determination From iPS Cells to Cardiomyocyte” QBRI-Kyoto University Joint Symposium, 2015年2月, Qatar(招待講演)

③ Akira Watanabe

“Single Cell Transcriptome Analysis Dissects Cell Fate Determination from iPS Cells to Cardiomyocyte” International Symposium on Bio-imaging and Gene Targeting Science in Okayama, 2015年3月(招待講演)

④ 渡辺 亮

「次世代シーケンサーを用いたマルチオミクスとバイオインフォマティクスが支える再生医療」第14回日本再生医療学会総会、横浜、2015/3/20(招待講演)

[図書] (計4件)

①シングルセル解析が変える生命科学研究のパラダイムシフト

渡辺 亮

実験医学, Vol. 33, No.1, pp2-6, 2015

②次世代シーケンス解析スタンダード
「NGSのアプリケーションと今後の展望」

渡辺 亮、野宮 唯、北岡 文美代、中村 正裕

実験医学別冊「次世代シーケンス解析スタンダード」 pp10-17 (2014)

③次世代シーケンス解析スタンダード
「NGSの試薬選択ガイド」

渡辺 亮、田中 梓、北野 優子、桑原 順子

実験医学別冊「次世代シーケンス解析スタンダード」 pp18-30

④幹細胞・発生研究におけるシングルセル遺伝子発現解析

中村 正裕、野村 真樹、溝曾路 祥孝、吉田 善紀、渡辺 亮

実験医学, Vol. 33, No.1, pp15-19, 2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 亮 (WATANABE, Akira)

京都大学 iPS 細胞研究所 特定拠点助教

研究者番号: 60506765