

## ミニレビュー

## 分子病理学ハイライト

## No. 1

## シングルセル解析の動向とその有用性

## Recent advances in single cell analysis

先端核酸医療講座：梅津知宏

Department of Advanced nucleic acid medicine :

Tomohiro UMEZU

## 1. はじめに

今回のミニレビューは「最近2年間に発表された論文の中から、興味深い内容を含んでいる論文(2~3編)のエッセンスを紹介する」ということで、近年のマルチオミックス解析が主流となる風潮の中でキーテクノロジーとして注目されている「シングルセル解析」を用いた論文を取り上げてみたい。ここ数年におけるシングルセル解析技術の発展は、従来の細胞分化や個体発生の領域における基礎的な知見をも覆す様な新たな発見を導き出してきた。現在では、再生医療やがん免疫を含む多領域で、未解明であったり推測の域を超えられなかった部分を明らかにするための技術として用いられている。

## 2. シングルセル遺伝子発現解析とは

Science 誌が選ぶ2018年のBreakthrough of the year (Science 362 ; 1344, 2018)の1位が「分子バーコード技術を用いたシングルセル遺伝子発現解析」であった(ちなみに、2019年のトップは「ブラックホールの撮影に初成功」)。従来の細胞「集団」として見てきた遺伝子発現解析とは異なり、シングルセル遺伝子発現解析とは、字の如く単離したシングルセル(1細胞)毎で行う遺伝子発現解析である。シングルセルの単離(クローニング)は、抗体医薬の研究開発や再生医療の分野で発展してきた重要な技術である。古くは限界希釈法やセルソーターを用いてシングルセルに単離していたが、これまでは下流の解析系の感度がまだ十分ではなく、シングルセルを培養して増殖させるというステップが必要であ

り、細胞種によってはシングルセルに分離すると増殖しなくなるという制限があった。したがって、次世代シーケンサーやデジタルPCRなどの検出技術の目覚ましい向上が、シングルセル解析の普及の起因となっていると思われる。

この検出感度向上の要となる技術の一つが「分子バーコード」である。1万個程度のシングルセルをドロップレットやウェルなどの区画に、個別バーコード配列を持ったビーズやゲルなどのmRNA補足粒子とペアで単離する。この単離の際に2個の細胞が同区画内に入る確率(ダブルレット率)がプラットフォームとサンプルの相性により変わり、ダブルレット率が高いと検出精度に影響が及ぶ。今ではシングルセル分離の標準機となっているFludigm C1だが、この発売をきっかけにしてシングルセル解析が一気に普及した。現在では様々なプラットフォームが誕生しており(表1)、シングルセル単離処理を簡便でかつ廉価で行うことが可能となってきている。

## 3. 幹細胞とシングルセル解析

幹細胞・発生研究の分野でシングルセル解析が大きなbreakthroughを生み出している理由の一つが、一つの細胞に目印をつけて細胞系譜を特定してそれを遡ることができることにあると思われる。2019年4月のScienceに報告されたShakibaらの論文では、MEF(mouse embryonic fibroblast: マウス胚由来線維芽細胞)がOct4, Klf4, c-Myc, Sox2(OKMS)の導入によりリプログラミングされてiPS細胞になるまでの系譜を「DNAバーコード」を用いたシングルセル遺伝子発現解析で追跡している<sup>1)</sup>。これまで山中4因子を用いた体細胞のリプログラミングにおいて、2つの可能性が考えられていた。一つはMEFの中からリプログラミングされる細胞が確率的に選ばれる「Neutral model」、もう一つはMEF集団の中にはじめからリプログラミングがされやすい細胞が存在している「Elite model」である。しかし、

表1 シングルセル分注プラットフォームの種類と分注原理

メーカー	機器名	分注原理
Fluidigm	C1 Single-Cell Auto Prep system	マイクロ流体回路
10X Genomics	Chromium Controller	マイクロエマルジョン
Bio-Rad	ddSEQ Single-Cell Isolator	マイクロ流体・ドロップレット
BD	BD Rhapsody	マイクロウェル
Cellenion	CellenOne X1	非接触型ピエゾ

実際はどちらのモデルが正しいのか明らかにされていなかった。この論文では、レンチウイルスを用いてMEFに個別のDNAバーコードを導入し、リプログラミング後の細胞がリプログラミング前のどの細胞から由来していたか追跡できるようにした。シングルセルに分離した状態からのリプログラミングと、集団（バルク）の状態でのリプログラミングを比較し、分子バーコードによる追跡の結果からバルクでのリプログラミングでは1週間後に最大80%のクローンが排除されていることが明らかとなった。すなわち、リプログラミング時に集団内で高度なクローン選択（細胞競合）が生じており、リプログラミング前のMEFにiPS細胞になりやすいエリート細胞の存在が示唆された。さらにこの論文ではマウスモデルを用いた系統追跡により、これらのエリート細胞が中胚葉発生に関連するWnt1発現集団、すなわちneural crest（神経堤細胞）に由来することも証明している。

これまでの細胞集団としてバルク解析ではその平均値を見ていたことになるが、この論文でも用いられていたようなシングルセル解析によって集団内での細胞競合を定量化してそのメカニズムを解明でき、正常の組織発生のみならず疾患の発症メカニズムの解明に結びつくと考えられる。

#### 4. 間質細胞のシングルセル解析

シングルセル解析は、細胞集団においてそれぞれ

の細胞の見分けが付きづらければ付きづらいほど威力を発揮する技術であると思われる。「間質細胞（stromal cells）」がその良い例となる。上皮細胞が管腔を形成している組織では、形態学・病理学的に上皮層の裏打ちとして間質細胞層がある。この細胞層には間質細胞に加え血管内皮細胞や神経細胞など多数の細胞が混在している。上皮細胞の機能はその器官の特徴に直接反映されており、形態的にも、発現している因子群においても判別が付きやすい。一方で、間質細胞は上皮細胞の機能をサポートするという重要な役割を担っているにもかかわらず、特徴的な分子マーカーも乏しく、培養下でもほとんどが線維芽細胞様の形態を示しており、間質細胞の多様性が示唆されつつも、その実態は明らかとなっていなかった。

Kinchenらのグループは、シングルセルプロファイリング技術を用いて、腸管間質細胞のクラスタリングを行うとともに、炎症性腸疾患（Inflammatory bowel disease: IBD）の重症度に寄与する間質細胞のサブグループの同定を行なっている<sup>2)</sup>。この論文では、健常者およびIBD患者のバイオプシー腸組織から間質細胞を分離し、16,500個以上の間質細胞を用いてシングルセルRNAシーケンス（scRNA-seq）を行った。そのデータセットを用いてMesenchymal Atlas（図1）を作成し、間質細胞集団を、血管周辺細胞や筋線維芽細胞に加え、4種類の間質細胞サブセットに分類することに成功している。さら

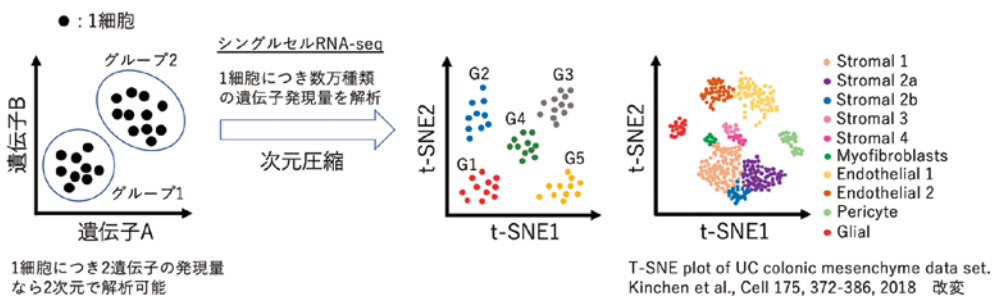


図1 次元圧縮法 t-SNE を用いたクラスタリングと Mesenchymal Atlas

に、Sox6、F3 (CD142)、WNT を発現している間質細胞 (Stromal 2 (S2) サブセットと命名) が、腺窩上皮 (クリプト) におけるニッチを形成する細胞として機能していることも突き止めた。すなわち、この S2 間質細胞が腸管上皮幹細胞の維持に重要であることが示唆された。また、マウスモデルとオルガノイド培養系を用いた IBD モデルでの解析から、炎症部位では S2 間質細胞が減少し、活性化型の間質細胞 (S4 サブセット) が増加して、上皮ニッチの調節異常が生じると考えられた。

このように腸管組織以外の様々な器官・組織においても、シングルセルプロファイリングによって新しい分子マーカーも発見され、「stromal cells」と一括りにされていた間質細胞の多様性が解像度高く解析できるようになっている。また、間質細胞の分類が進めば、上記の論文のように疾患に直接的に関与する間質細胞の機能を制御するような新たな治療法の開発に結びつくとも期待される。

### 5. がん細胞のシングルセル解析

シングルセル解析の技術発展にともない、医学分野にもその効果が及んできた。がん細胞のサブクローン進化のメカニズム解明にシングル解析が期待を集めている。ゲノム上にドライバーとなる遺伝子変異が生じてがんが誘導されてからも、別の遺伝子変異が蓄積しながら進化していく。この過程で異なる変異を有するサブクローンが発生し、腫瘍内不均一性が生じる。腫瘍全体の 5% ほどだったサブクローンがクローン拡大により再発時に優勢なクローンとなる場合があり、再発を防ぐには腫瘍内に存在する全てのクローンを明らかにすることが重要となる。次世代シーケンサー技術の向上によりディープシーケンスを行えば 1% 程度のサブクローンを検出可能ではあるが、このようなレアクローンを標的とした治療法を見出すにはシングルセル解析が有用となると思われる。

2018 年 12 月の Nature Medicine に発表された Ledergor らの論文では、多発性骨髄腫患者の形質細胞と正常人の形質細胞を用いてシングルセル RNA プロファイリングを行い、骨髄腫細胞の多様性を調べている<sup>3)</sup>。多発性骨髄腫は、骨髄内で腫瘍性に増殖した形質細胞が集積する難治性造血器腫瘍である。レナリドマイド、プロテオソーム阻害剤、CD20 抗体などの登場で長期に維持が可能になって

いるが、根治は至らないことが多く、その原因の一つとして骨髄腫細胞自体が多様化していることが考えられる。Ledergor らのグループは、シングルセル RNA-seq を用いて、11 人の健常者と、29 人の多発性骨髄腫患者から採取した 20,568 個の形質細胞を解析した。その結果、多発性骨髄腫患者 29 人中 10 人について、広範なサブクローンの存在が明らかとなり、考えられていた以上の多様性が示された。一方で、多様ではあるものの、無症状である MGUS 患者群とくすぶり型 (無症候性) 患者群を明確に定義するマーカー発現のパターンを定義することも可能であった。前癌病態である MGUS やくすぶり型多発性骨髄腫は無治療経過観察が原則であり、症候性多発性骨髄腫に移行した時点で全身化学療法を開始することになっているが、シングルセル RNA プロファイルの結果から、くすぶり型骨髄腫患者骨髄内にも、個別化治療に抵抗性を示すような骨髄腫細胞と類似の分子特性を持つ悪性化形質細胞が存在することが明らかとなった。これらの悪性化形質細胞は治療後の微小残存病変 (MRD) を有する患者でも検出された。

### 6. 最後 に

シングルセル解析の結果がもたらす新たな知見は、これまでの常識をも覆す発見に繋がり、それが医療などの応用面にも影響が及びはじめている。今後、検出技術の発展にともなってさらに解像度の高い解析が可能になっていくと思われるが、今後は AI など用いた膨大な情報量を処理する技術分野との融合により新たなステージへと向かっていくのではないだろうか。

### 文 献

- 1) Shakiba N, Fahmy A, Jayakumaran G, McGibbon S, David L, Trcka D, Elbaz J, Puri MC, Nagy A, van der Kooy D, Goyal S, Wrana JL, Zandstra PW: Cell competition during reprogramming gives rise to dominant clones. *Science* **364**: pii: eaam0925, 2019
- 2) Kinchen J, Chen HH, Parikh K, Antanaviute A, Jagielowicz M, Fawcner-Corbett D, Ashley N, Cubitt L, Mellado-Gomez E, Attar M, Sharma E, Wills Q, Bowden R, Richter FC, Ahern D, Puri KD, Henault J, Gervais F, Koohy H, Simmons A: Structural remodeling of the human colonic mesenchyme in inflammatory bowel disease. *Cell* **175**: 372-386, 2018
- 3) Ledergor G, Weiner A, Zada M, Wang SY, Cohen

YC, Gatt ME, Snir N, Magen H, Koren-Michowitz M, Herzog-Tzarfati K, Keren-Shaul H, Bornstein C, Rotkopf R, Yofe I, David E, Yellapantula V, Kay S, Salai M, Ben Yehuda D, Nagler A, Shvidel L, Orr-Urtreger A, Halpern KB, Itzkovitz S, Landgren O,

San-Miguel J, Paiva B, Keats JJ, Papaemmanuil E, Avivi I, Barbash GI, Tanay A, Amit I: Single cell dissection of plasma cell heterogeneity in symptomatic and asymptomatic myeloma. *Nat Med* **24**: 1867-1876, 2018