BioSkryb GENOMICS

アプリケーションノート

がんの不均一性

info@bioskryb.com

正確なシングルセル解析ががん細胞の不均一性を解明する鍵となる

ゲノム技術の進歩により、がん細胞の不均一性に関する研究が著しく拡大しました。シングルセル全ゲノムシークエンシングは、異なる腫瘍細胞の遺伝的特徴を明らかにし、治療法決定や疾患管理にとって実用的な情報を提供することができます。本稿では、正確なシングルセル全ゲノム増幅法であるPrimary Template-directed Amplification(PTA)法について述べ、これを利用した細胞集団における低頻度のバリアントの検出をどのようにサポートするか例を示します。

がんの不均一性が転帰を左右する

2020年には、1,000万人ががんで命を落とし、その2倍の数の新たな症例が世界中で報告されました[1]。約50年間、世界でがん研究がされているにも関わらず、この数字は驚異的です。

細胞レベル、分子レベルのがんの不均一な性質に関する重要な知見は、1976年にPeter Nowellが発表した1976年の「がんのクローン進化理論」（図1）から得られ、その結果、疾患管理の改善と最新の標的治療の基礎が築かれました。それ以降、ゲノム技術の進歩により、がんの遺伝的基盤の解明が進みつつあります。とはいえ、知識のほとんどは、バルクオミックスアプローチにより得られたものです。混合細胞集団の解析は、腫瘍内および腫瘍間の複雑な不均一性を覆い隠し、サンプル中の最も豊富なバリアントのみを明らかにします。プレシジョン・メディシンは、保存された、稀なまたは新規の変異アレルを極めて高感度に検出することができる「シングル」病原性細胞のゲノム解析をルーチンに行うことによってのみ実現できるでしょう[2]。しかし今日まで、既存のシングルセル全ゲノム増幅法(WGA)の技術的な制限により、このアプローチは実現に至っていません。

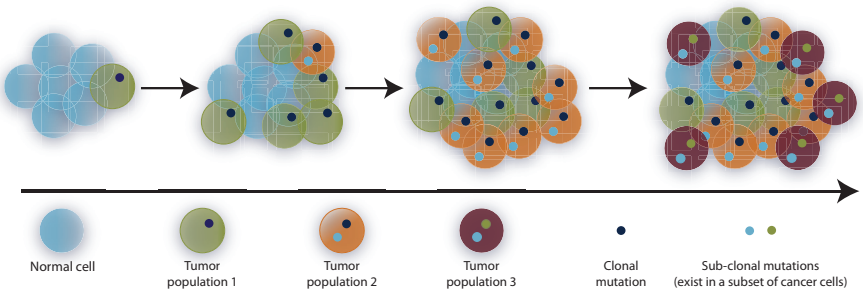

図1.がんのクローン進化理論　がんのクローン進化理論では、元は正常であった単一の細胞が何らかの原因によって「腫瘍性」となり、隣接する正常細胞よりも選択的に増殖することで、腫瘍が発生するとされています。免疫の回避に有利な変異、腫瘍の生存、転移、また治療抵抗性は絶えず生じており、小さな細胞集団の中で持続し、時間の経過とともに蓄積します。

「PTAは、一塩基バリアント検出のために、シングルセルから、再現性よく、効率よく、均一にゲノムを増幅したい場合私たちが選択する方法である。」

Christopher A. Walsh, MD P hD
Bullard Professor of Neurology, Harvard Medical School,
Chief, Division of Genetics and Investigator, Howard Hughes Medical Institute, Children's Hospital Boston

PTA法は正確なシングルセルゲノミクスを可能にする

Primary Template-directed Amplification（PTA）法は、極微量のDNAの一次鋳型から全ゲノム増幅を行う革新的なケミストリーを用いる新規の等温増幅法です。これにより、既存のWGA法の課題（不均一なカバレッジやアレルドロップアウトなど）が大幅に軽減され、単一のアッセイから一塩基変異（SNVs）、転座、コピー数多型（CNV）の検出が可能になります[3]。

本製品は研究用です。診断用には使用しないでください。

PTA法がシングルセルの分解能で個別のSNVsを識別できることを実証するため、AML細胞株（MOLM-13）にチロシンキナーゼ阻害剤のキザルチニブを作用させ、耐性を誘導しました。個々の親細胞と抵抗性細胞の全ゲノムシーケンシング（WGS）により、シングルセル解析が変異アレル頻度（VAF）の感度を有意に高めることが確認されました（図2）。追加研究では、よく特徴づけられているhypertriploidのヒト乳がん細胞株(SKBR3)のCNV解析が行われました。バルクサンプルでは区別できなかったCNVの不均一性が、個々のシングルセル間ではっきりと観察されました（図3）。さらに、PTA法はシングルセル遺伝子変異量（TMB）の解析も可能です[4]。

結論

BioSkryb社のResolveDNA™全ゲノムシーケンシングワークフローは、正確でスケーラブルなシングルセルシーケンシングを可能にするPTA法を採用しています。バイオインフォマティクス・プラットフォームBaseJumperは、非常に膨大なデータを分類、分析、解釈するために設計されています。この新しいデータ収集・処理プラットフォームは、従来のバルクシーケンシング法よりも精度が向上しています。

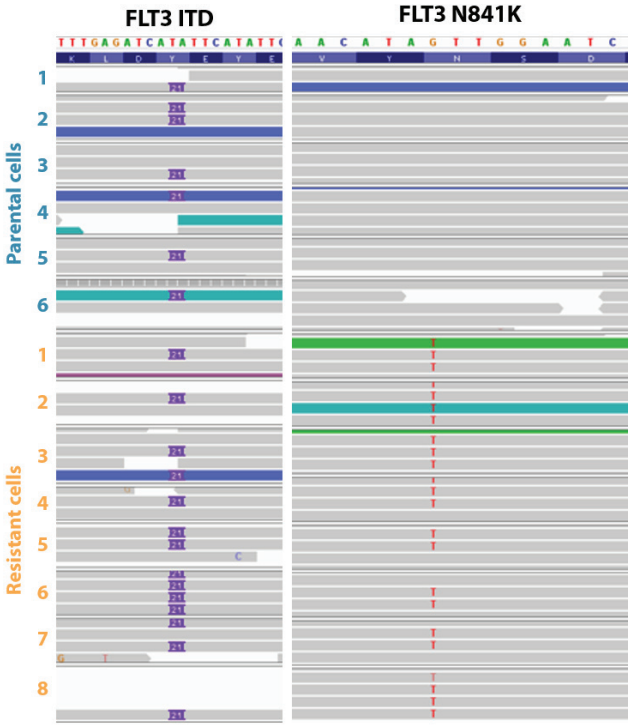

図2. シングルセルにおける体細胞変異のデジタル検出 親細胞とキザルチニブ耐性のあるAML細胞はともにFLT3遺伝子内のタンデム重複（FLT3 ITD、左）を含んでいることがわかりました。さらに、耐性細胞でのみ二次的なミスセンス変異(N841K)が検出されました（右）。この変異は、薬剤耐性の重要なドライバーである可能性が高く、親株ではまれだったものの、耐性細胞では優勢でした（qPCRで確認）。

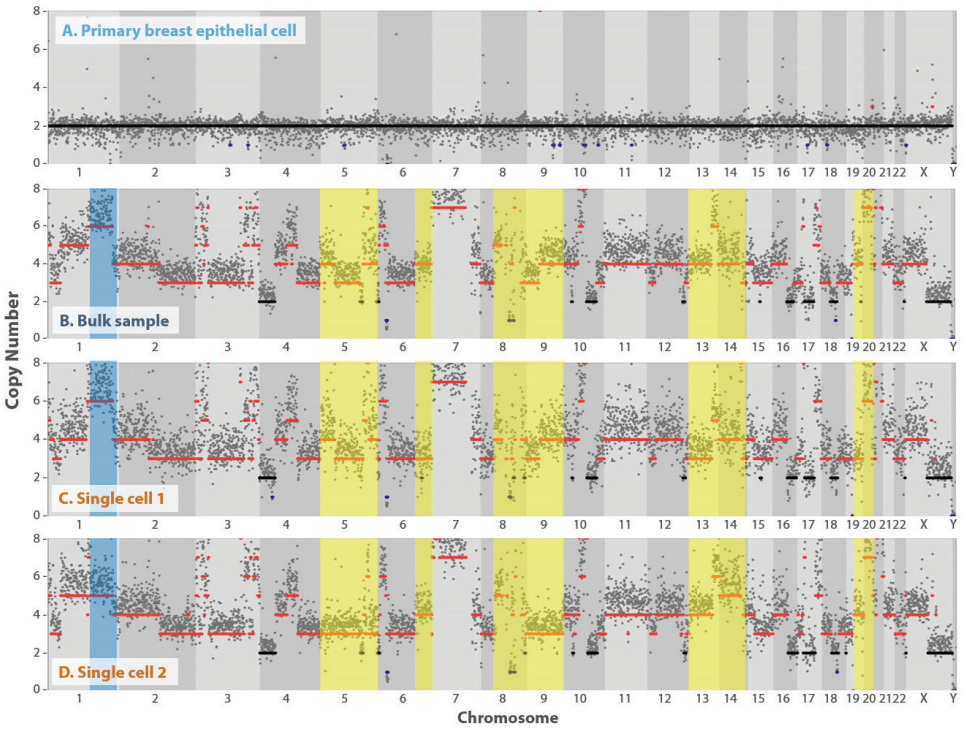

図3. バルクCNV解析とシングルセルCNV解析 染色体構造が損なわれていない（2倍体）の正常な単一の乳房上皮細胞（A）に比べ、SKBR3のバルクサンプル（B）のDNAでは、高度なコピー数変異が確認されました。CNVの不均一性はシングルセルレベルではっきりと観察されました。あるシングルセル（C）では、1番染色体のCNVパターン（青いパネル）はバルクDNAと同様でしたが、別のシングルセル（D）では重複の程度が低いという結果になりました。CNVパターンの違いは、他のほとんどすべての染色体についてシングルセルレベルで観察され、最も顕著な例は黄色で強調されています。500kbの各ウィンドウが複数の遺伝子を表しているとすると、これらの個々の細胞間のゲノムの違いは重要です。

参考文献

1. Sung J, et al. CA Cancer J Clin 2021;71:209-249. doi: 10.3322/caac.21660.
2. Nowell, PC. Science 1976; 194(4260):23-28. doi: 10.1126/science.959840.
3. Gonzalez V, et al. *bioRxiv*. 2020 Nov; doi: 10.1101/2020.11.20.391961.
4. West JAA, et al. Manuscript in preparation.

BioSkryb GENOMICS
701 W Main St, Suite 200
Durham, NC 27701
www.bioskryb.com
info@bioskryb.com

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.
BIOSKRYB and RESOLVEDNA are trademarks of BioSkryb Genomics, Inc.

© 2021. BioSkryb Genomics, Inc. All rights reserved.

お問合せ：
プライムテック株式会社
www.primetech.co.jp
ライフサイエンス事業部
バイオ試薬ソリューション部
東京都文京区小石川1-3-25 小石川大国ビル2F
Phone：03-3816-0851（代表）　Fax：03-3814-5080
E-mail：reagents@primetech.co.jp