

シングルセルにおけるコピー数変異（CNV）及び一塩基変異（SNV）の同時検出

Takeaways

- Tapestri Platformは、同一細胞内のCNVとSNVを一度に検出することのできる、初のシングルセル解析プラットフォームです。
- 既存のTapestriワークフローとSingle-Cell DNA Panelを使用して、サンプル中のCNVとSNVの両方を、数千細胞のスケールで解析します。
- 遺伝子レベル、染色体レベルで増幅と欠失（LOHも含む）を計算します。

Abstract

がんは一細胞から発展するクローン性の疾患ですが、その生来の遺伝学的不安定性のために、その細胞集団は不均一に進化する傾向があります。一塩基変異（SNV）によって引き起こされる遺伝子変異に加え、ヘテロ接合性の欠失（LOH）を含むコピー数多型（CNV）もまた、がんの進展と進化に大きな役割を果たしています。がんの不均一性はSNVとCNVの相違によってもたらされ、いくつかのクローンは他のクローンよりも悪性で治療抵抗性です。クローン集団を正確に同定することやクローン系譜を再構築することは臨床研究にとって重要ですが、これらはシングルセル解析によってのみ達成されます。これまでは、同一シングルセル内のSNV及びCNVの状態を、スケラブルな費用とスループットで、決定することができませんでした。本アプリケーションノートでは、Mission BioのTapestri® Platformとその試薬が持つ、スケラブルなSNV及びCNVの解析能力を紹介し、Tapestri Platformの新しい機能であるシングルセルCNV解析は、全ゲノム増幅法ではなく遺伝子特異的アンプリコンによって、遺伝子レベル又は染色体レベルでのCNV検出を実現します。癌細胞株及び腫瘍サンプルの解析において、Tapestri Platformは、シングルセル又は単離したシングル核内のCNV及びSNVを一度に検出しました。この解析データは、Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) database¹で公開されているCNV及びバルクシーケンス結果と相関しました。こうしたシングルセルデータは、特徴的なCNV/SNVシグネチャによるクローン分集団の検出・定義を可能にし、僅かなクローンも高い感度で同定します。

スケラブルなSNV及びCNVの解析能力を紹介し、Tapestri Platformの新しい機能であるシングルセルCNV解析は、全ゲノム増幅法ではなく遺伝子特異的アンプリコンによって、遺伝子レベル又は染色体レベルでのCNV検出を実現します。癌細胞株及び腫瘍サンプルの解析において、Tapestri Platformは、シングルセル又は単離したシングル核内のCNV及びSNVを一度に検出しました。この解析データは、Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) database¹で公開されているCNV及びバルクシーケンス結果と相関しました。こうしたシングルセルデータは、特徴的なCNV/SNVシグネチャによるクローン分集団の検出・定義を可能にし、僅かなクローンも高い感度で同定します。

Experiment & Methods

Tapestri Single-Cell DNA AML Panel 及び Myeloid Panel で Muz-8、Raji、K562 及び Jurkat 細胞を解析しました。さらに、過去に発表した研究²で使用した2例の腎細胞癌（RCC）サンプルを、カスタムパネル（338アンプリコン、カバレッジ~67.9 kb）で解析しました。得られたilluminaシーケンスデータを、Tapestri Pipelineソフトウェアで解析しました。Tapestri PipelineソフトウェアからLoom及びbarcode distributionファイルをエクスポートし、更なる解析でSNV、indel、CNV及びLOHを同定しました。各々のサンプルは、Rの“tapestri-cnv”メソッドによって解析されました：



1. セルノーマライゼーション：まず最初に、細胞の総リード数で各細胞のリード数を正規化しました。そして、アンプリコンのリードの分布又はSNVに基づく階層クラスタ分析によって、細胞をグループ化しました。既知のCNVを有する細胞クラスターをコントロールとして同定し、全細胞のアンプリコン数をコントロールグループのアンプリコン数の中央値で除算しました。
2. LOHの検出：次の変異を除外しました：a. 5%未満の細胞でしか検出されなかった変異、b. 96%以上の細胞で野生型（WT）としてコールされた変異。グループ化された変異に基づいて細胞を分類し、広範囲にヘテロ接合性（HET）が連続してホモ接合性（HOM）又はWTであった領域をCNVとして同定しました。

Results

Tapestri Platformを用いた信頼性のあるCNV解析及びクローナルクラスタリング

Mutz-8、Raji、K562及びJurkat細胞を、それぞれ43%、26%、20%及び11%で混合し、Tapestri Platform及びSingle-Cell DNA AML Panelで解析しました。AML Panelのアンプリコンで正規化されたシークエンスリードの割合から、解析した各遺伝子のCNVを求めました。解析した全遺伝子のディプロイド状態が既知であることから、Jurkat細胞をコントロールとしました。CNVデータの教師なしクラスタ分析によって、これら4種の培養細胞株の特徴を解明し、ヒートマップで可視化しました（Figure 1a）。さらに、t-SNEプロットでCNVデータをグループ化し、純粋な細胞株で過去に確立した

SNVジェノタイプに基づいて着色しました（Figure 1b、Table 1）。このデータは、CNVベースのクラスターと細胞株固有のSNVシグネチャとの間に強い相関を示し、同一細胞内におけるCNVとSNVの測定を初めて示しました。すべての遺伝子にわたって計算されたCNV値のプロットは、Mutz-8、Raji及びK562細胞における、遺伝子特異的CNVコールの平均（整数）を示しています（Figure 2a）。Raji細胞及びK562細胞の13遺伝子で観察されたCNVを、COSMICデータベースから得た既知CNVと比較したところ、両者の間に強い相関（ $R^2 = 0.92$ ）がみられました（Figure 2b）。Mutz-8細胞では、COSMIC情報が利用できませんでした。

SNV	K562	RAJI	MUTZ-8	JURKAT
EZH2-148504817	WT	HET	WT	WT
EZH2-148504853	HOM	HET	HOM	WT
KIT-55599435	HOM	WT	HET	HET
TP53-7578114	HOM	HET	HOM	HOM
TP53-7578210	WT	HET	WT	WT
TP53-7578522	HOM	WT	WT	WT
TP53-7577580	WT	HET	WT	WT

Table 1：過去の実験で同定した各細胞株のSNVデータ。

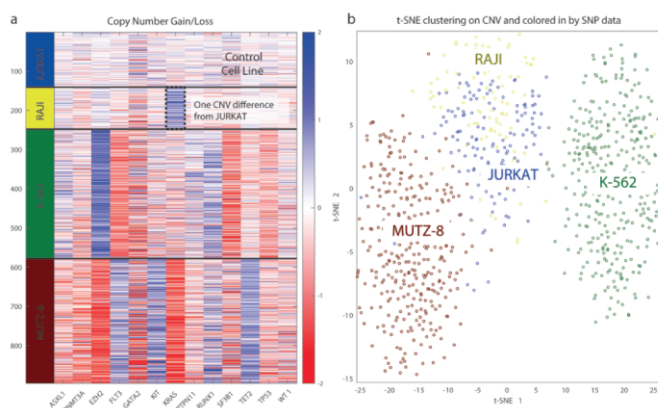


Figure 1：4種の細胞株の混合集団のCNVデータに基づく (a) ヒートマップ及び (b) t-SNEプロットは、CNVの状態に基づいて、細胞株の集団を明確に示しました。

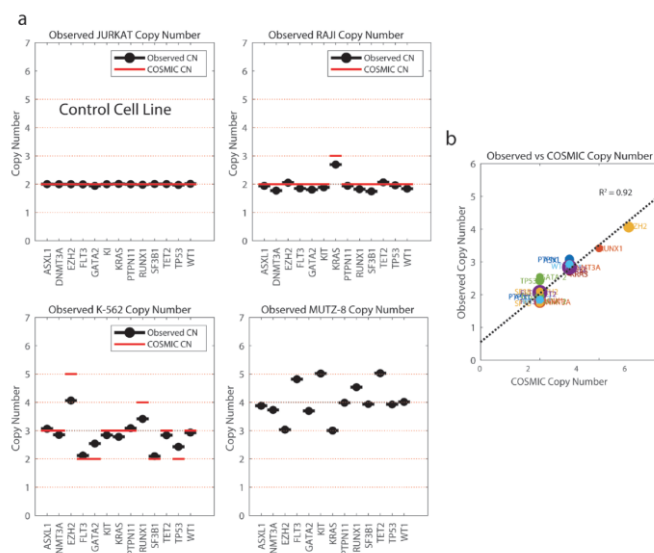


Figure 2：Tapestri Platformで測定した (a) CNVと (b) COSMICデータの比較は、観察CNV及び既知CNV間の強い相関を示しています。

CNVの検出感度を示すために、Raji細胞にK562細胞を50%、10%及び5%の割合で混合し、Tapestri Single-Cell DNA Myeloid Panelによって、SNVとCNVを解析しました。CNVデータに基づくヒートマップ (Figure 3a) 及びt-SNEプロット (Figure 3b) は、2種の異なる細胞タイプの集団を明確に示しました。このことは、このプラットフォームがCNVに基づいて、僅かな細胞集団を検出できることを示しています。

Tapestri Single-Cell DNA AML Panel及びMyeloid Panelの解析結果は、既存のTapestri Platformで小規模なパネル (AMLパネル、125アンプリコン) 又は大規模なパネル (Myeloidパネル、312アンプリコン) を解析することによって、一遺伝子ベースで、CNVを検出できることを示しています。

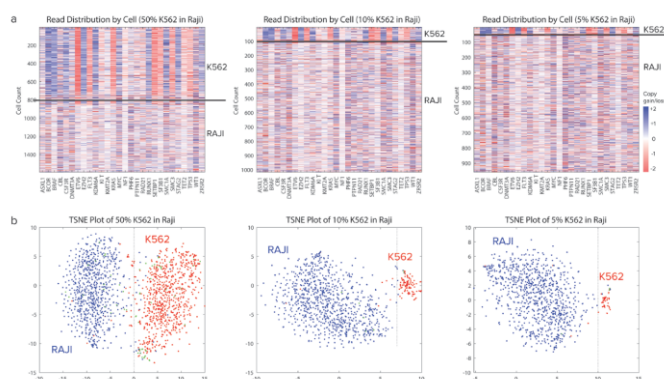


Figure 3 : Raji細胞及びK562細胞の混合集団のCNVで作成した、ヒートマップ (a) 及びt-SNEプロット (b) は、50%から5%の比率における、CNVのクラスタリングに基づいた集団を示しています。t-SNEプロットは、SNVデータに基づいて着色されています。

RCCサンプルで示されたLOH

RCCでは、3番、9番及び14番染色体を含む、いくつかの染色体領域において、LOHの割合が高くなっています³。これらの染色体の欠失は、重要な腫瘍抑制遺伝子の欠失をもたらし、がんの進展を促す可能性があります。Tapestri PlatformがRCCサンプル内のLOHを推測可能か検証するために、1番、3番、9番、10番、14番及びX染色体内の複数領域を標的としたカスタムパネルを用いて、同一腫瘍内で異なる領域から採取した2サンプル²を解析しました。アンプリコンの全体で計算したCNV値を染色体に沿ってプロットすることによって、Sample 1の3番、9番及び14番染色体、Sample 2の3番及び14番染色体でLOHが潜在する領域が示されました (それぞれFigure 4a及びFigure 4b)。

染色体全体でCNVの状態を計算し、プロットしました。こうしたデータは、Sample 2でLOHを有する細胞において、3番染色体上のVHL、SETD2、BAP1及びPBRM1、並びに14番染色体上のRAD51B、PTPN21及び他の遺伝子が欠失していることを示しました (Figure 4d)。Sample 1では、3番染色体上のVHL及びSETD2、9番染色体上のADAMTSL1及びCDKN2B、並びに14番染色体上のいくつかの遺伝子が欠失していました (Figure 4c)。

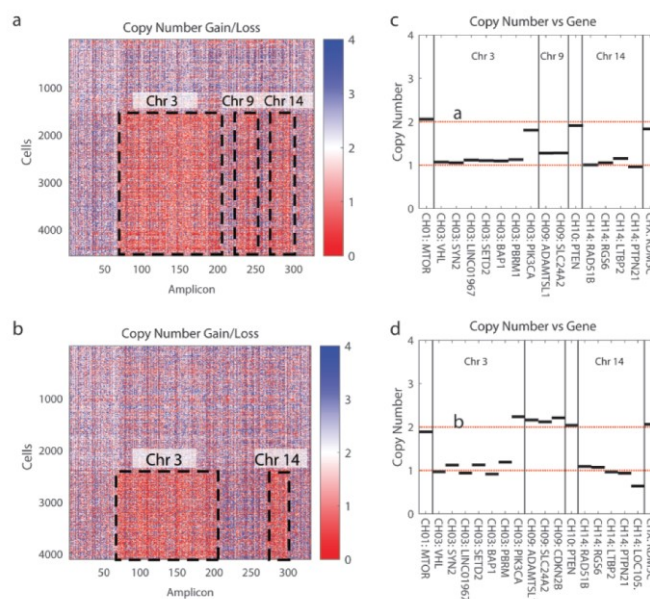


Figure 4 : (a-b) RCC患者サンプル2例から得たCNVのクラスター分析のヒートマップは、様々な染色体が消失したが細胞及び正常な2倍体細胞のグループを示しました。(c-d) 各遺伝子のCNVプロットは、特定遺伝子の欠失 (1コピー) を示しています。

Tapestri PipelineでコールしたWT、HET及びHOMのジェノタイプに基づく階層クラスター分析及びヒートマップにおいて、コピー数が減少しているクローンと2コピーを有する正常クローンを区別することができました。ここで再び、Sample 1において、3番、9番及び14番染色体にLOHの起きている集団が示されました (Figure 5a)。これに対し、Sample 2では、3番及び14番染色体にLOHの起きている集団が示されました (Figure 5b)。最後に、LOHに加えてSNVとindelを検出し、それらは同じサンプルで過去に得たバルク解析結果² (Table 2) と完全に一致しました (12/12)。このデータは、同一クローン集団からLOH、SNV及びindelをシングルセルレベルで検出するという、Tapestri Platformの能力を示しています。

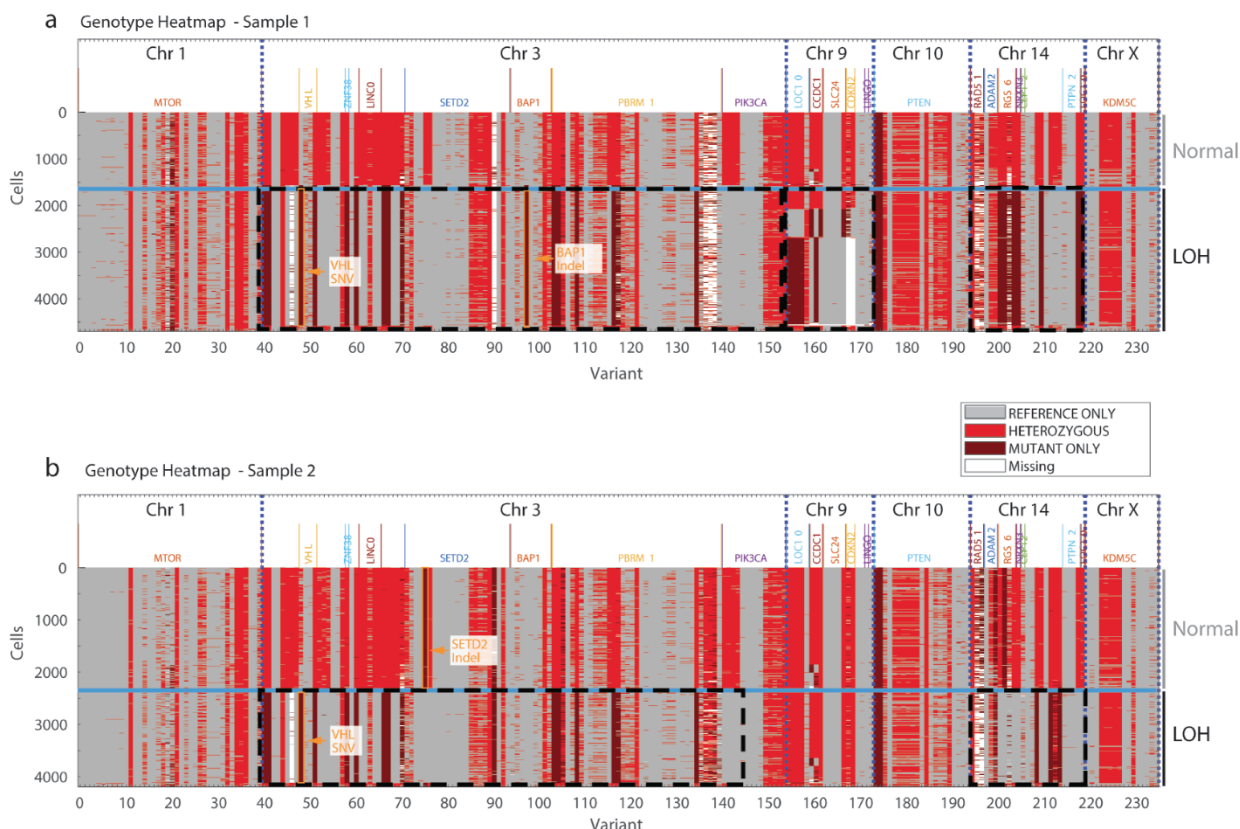


Figure 5 : (a-b) ジェノタイプによるクラスター分析は、LOH、SNV及びindelを示しています。

SNV/Indel or LOH	Sample 1	Sample 2
3p LOH	YES	YES
VHL SNV	YES	YES
SETD2 Indel	NO	YES
BAP1 Indel	YES	NO
9p LOH	YES	NO
14p LOH	YES	YES

Table 2 : 過去に発表したバルクシーケンスデータで発見した体細胞ドライバー変異。

Conclusion

Tapestri Platformによって、培養細胞株及び腫瘍サンプルから、シングルセルレベルでCNVとSNVを一度に検出しました。カタログ又はカスタムのTapestri Single-Cell DNA Panelによって、遺伝子コピーの欠失又は増幅を決定しました。SNVの検出に使用したアンプリコンでCNVを計算したことから、過去に取得したTapestriのシングルセルデータでも、このCNV解析を行うことができます。本アプリケーションノートでは、同一細胞からCNV、LOH、SNV及びindelを検出することのできる、初の製品を紹介しました。

References

1. Tate et al., COSMIC: the catalogue of somatic mutations in cancer. *Nucleic Acids Res*, 47(D1):D941-D947 (2019)
2. Turajic S et al., Deterministic evolutionary trajectories influence primary tumor growth: TRACERx renal, *Cell*, 173, 595-610 (2018)
3. Toma et al., Loss of heterozygosity and copy number abnormality in clear cell renal cell carcinoma discovered by high-density affymetrix 10K single nucleotide polymorphism mapping array, *Neoplasia*, 10(7): 634-642 (2008)

© 2020 Mission Bio, Inc. All rights reserved. 本製品は研究専用 (Research Use Only: RUO) です。診断用には使用できません。本アプリケーションノートの原文「AppNote_MissionBio_CNV_RevA」の翻訳には細心の注意を払っていますが、誤訳等があっても弊社は責任を負いかねます。

AppNote_MissionBio_CNV_RevA_JP_v3

フィルジェン 株式会社



代理店

【お問い合わせ】 試薬機器部

TEL : 052-624-4388 FAX : 052-624-4389

E-mail : support@filgen.jp URL : https://filgen.jp/

(Sept., 2024)