

Single-Cell Multi-Omics Reveals Novel Correlations Between Genomic Variants and Protein Expression in AML Patient Samples

Takeaways

- Tapestri Platformは、同一シングルセル内のSNV、CNV及びタンパク質発現を解明する唯一のシングルセルマルチオミクスプラットフォームです。
- シンプルな抗体プロトコルをTapestriのシングルセル解析に追加するだけで、タンパク質発現データを取得することができます。
- 数千のシングルセルから、ジェノタイプ情報とフェノタイプ情報の両方を取ることができます。

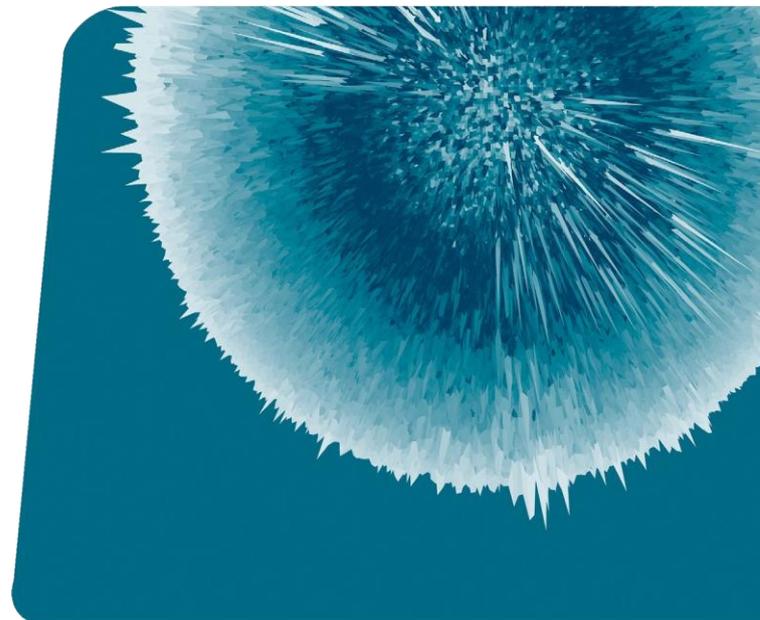
Abstract

ジェノタイプデータのみでは、細胞の種類や状態、機能に関して、部分的な洞察しか得ることができません。より完全に全体像を把握して細胞フェノタイプの特徴を明らかにするには、DNAプロファイリングを超えたマルチオミクスのアプローチが必要です。本アプリケーションノートにおいて、Tapestri Platformは同一シングルセル内のゲノム変異とタンパク質発現を一度に検出できるということを、初めて示しました。今や、一塩基変異 (SNV) やコピー数多型 (CNV) といったゲノム変異をタンパク質と同時に検出することが可能です。この新しい機能は、僅かな細胞集団や微細な細胞状態を明らかにする力を備えています。

このコンセプトを実証するために、4種類のがん細胞株の混合サンプルに対し、6種類のオリゴ結合抗体からなる抗体パネル及びTapestri Single-Cell DNA AML Panelを用いて、シングルセル解析を行いました。SNV、CNV及びタンパク質のデータを統合することで、個別に分析した場合よりも、4種類の培養細胞株をそれぞれのクラスターによく分離することができました。この結果は、不均一なサンプル内に存在する種々の細胞集団を同定する際、シングルセルレベルでゲノム変異データとタンパク質発現データの両方を取ることの利点を示しています。

この新しい技術の可能性を臨床サンプルにまで広げるために、6例の急性骨髄性白血病患者から取得した末梢血単核細胞 (PBMC) 及び骨髄 (BM) サンプルで、DNA変異とタンパク質発現を解析しました。カスタムパネル、Tapestri Platform及びTapestri Insightsソフトウェアを使用して疾患関連変異を同定し、共起している変異パターンを明らかにすることによって、各サンプル内でいくつかのクローンを同定しました。

6種類のマーカーによって、シングルセルレベルでタンパク質を検出し、種々の細胞状態にあるクローンを同定しました。数千細胞の規模で同一シングルセルから得たジェノタイプ及びフェノタイプデータを初めて統合したこれらの結果は、新しいシングルセルマルチオミクスのアプローチを示しています。



Experiment & Methods

Tapestri Single-Cell DNA AML Panelを使用して、Raji, K562, TOM1及びKG1細胞のSNV/indel及びCNVを解析しました。Tapestri Platformで細胞を処理し、オリゴタグの付加された6種類の抗体からなる抗体パネルを使用して、タンパク質の発現を解析しました。抗体には、CD19, CD33, CD45, CD90, HLA-DR及びマウスIgG1κを標的とするものを使用しました。いくつかのSNV/indel, CNV及びタンパク質を選択し、ダウンストリーム解析を行いました。

次に、AML, MPN及びMDSに関連する31遺伝子 (109アンプリコン) に対応するカスタムDNAパネルを用いて、6例のAML患者サンプルを解析しました。さらに、次の6種類のタンパク質を標的とするカスタム抗体パネルも使用しました：CD3, CD11b, CD34, CD38, CD45RA及びCD90。データ解析は、Tapestri Pipelineソフトウェアで行いました。Tapestri InsightsソフトウェアでSNV及びindelを同定し、Mission BioのR用の“tapestri-cnv”パッケージでCNVを解析し、そしてR用の“tapestri-protein”パッケージでタンパク質データを統合して解析しました。

Results

Single-cell multi-omics provides greater resolution for clonal clustering

Raji, K562, TOM1及びKG1細胞を同じ割合で混合し、Tapestri PlatformでSNV, indel, CNV及びタンパク質を解析しました。教師なしクラスタリング及び各アナライトのヒートマップによる可視化によって、4種類の変異に基づくSNVデータで3種類の培養細胞株を、CNV又はタンパク質データで4種類の培養細胞株を明らかにしました (Figure 1a)。SNV, CNV及びタンパク質データを組み合わせたt-SNEプロットは、4種類の培養細胞株の様々な分離パターンを示しました (Figure 1b)。t-SNE上において、SNV又はCNVをそれぞれタンパク質データと組み合わせると、培養細胞株の分離能が向上し、SNV, CNV及びタンパク質データすべてを組み合わせると、4種類の培養細胞株を最も厳密に分離しました。この結果は、同一シングルセルから多くのデータを取得するマルチオミクスのアプローチが、細胞を厳密に分離する際に有用であることを示しています。

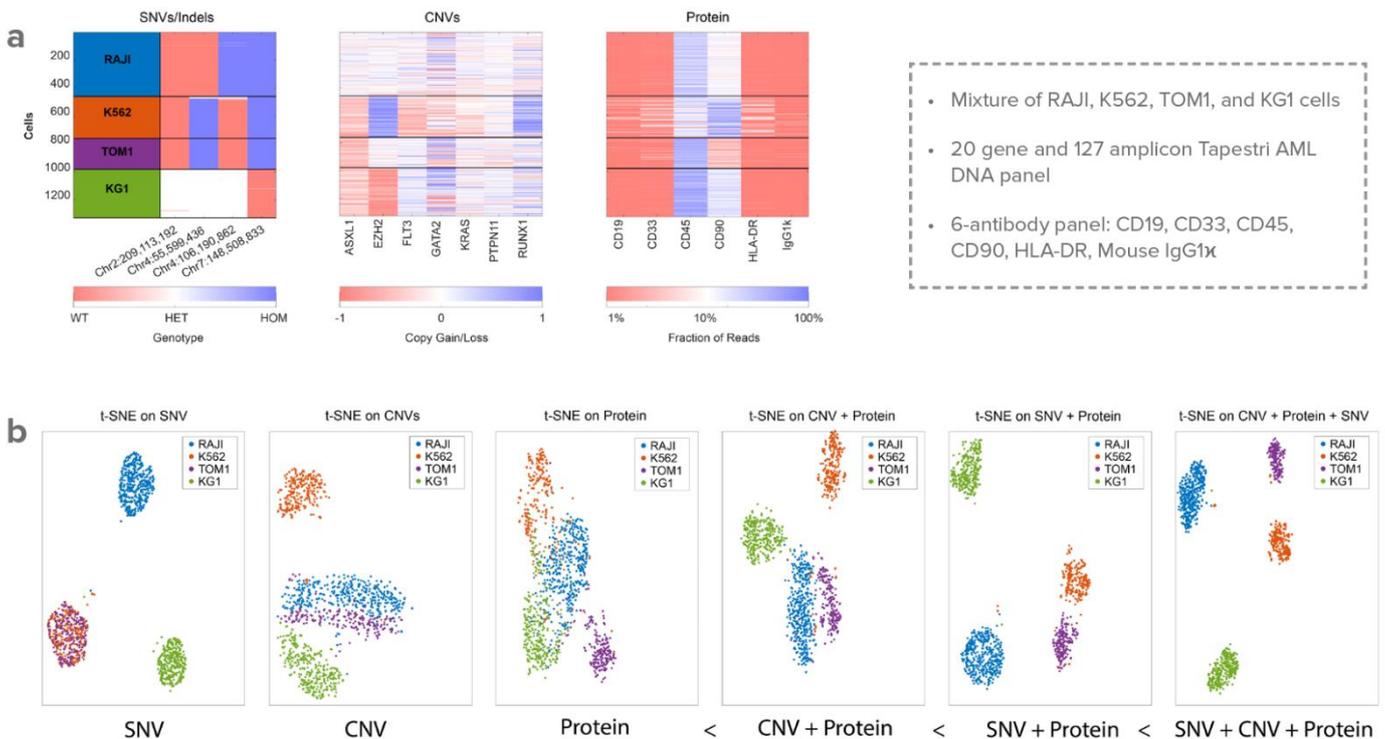


Figure 1. 4種類の培養細胞株の混合集団から取得したSNV, CNV及びタンパク質データに基づく (a) ヒートマップ及び (b) t-SNEプロット。過去に単一培養細胞株から確立したSNVジェノタイプに基づいて、t-SNEを着色しました。

SNV analysis of AML patient samples using Tapestri identifies clones with single mutations and co-occurring mutations

AMLは、連続で変異を獲得した未分化なミエロイド系細胞の増殖によって進化するがんです¹。白血病幹細胞や前駆細胞といった様々な状態の白血病細胞を、細胞表面に発現するマーカーから定義することができます。さらに、DNAの変異データを用いた白血病細胞のゲノム解析では、様々なクローン集団及び系譜を定義することができます。しかし、この解析で細胞の状態を明らかにすることはできません。本アプリケーションノートにおいて、シングルセルレベルでのゲノム解析及びタンパク質解析が、ゲノム多様性、細胞表面タンパク質発現及び推定された細胞状態を互に関連付けることを、初めて示しました。また、AML患者サンプルを用いた、Tapestri Platformのマルチオミクス解析能力の検証も行いました。

Memorial Sloan Kettering Cancer CenterのDr. Ross Levine研究室との共同研究により、過去に従来の次世代シーケンシング (NGS) で解析した6例のAML患者サンプルを用いて、Tapestri PlatformによるDNA及びタンパク質の解析を行いました。各サンプルの解析には、カスタムDNAパネル (31遺伝子, 109アンプリコン) 及びカスタム抗体パネル (6抗体) を使用しました。解析では、合計20,000以上のシングルセルをシーケンスしました。

あるサンプルのサブセットにおいて、カスタムパネルが対応しているすべての変異 (バルクシーケンシングで確認済み) の他に、過去に検出されなかった疾患関連変異を同定しました。各細胞集団内で共起しているSNV/indelを同定することによって、各サンプル内のクローン集団を明らかにしました (Figure 2)。変異を1つ有するクローンは青色, 2種類の変異が共起しているクローンは緑色, 同一シングルセル内で3種類の変異が共起しているクローンは赤色で示されています。DNMT3A R882H及びIDH1 R132Cを複数のサンプルで認めたのに対し、DNMT3A, IDH2, TP53, TET2, NRAS及びNPM1上の7種の変異は個々のサンプルに特異的でした。

Tapestri analysis of single-cell protein expression reveals distinct subpopulations

SNV/indel解析に加え、6例の患者サンプルのデータを統合して、DNAとタンパク質の同時解析を実施しました。ジェノタイプデータを基にt-SNEでクラスタリングしたデータを可視化したところ、期待されたとおりに、患者サンプルが分離されました。また、各サンプルは一意的なクローンにサブクラスタリングされていました (Figure 3a)。タンパク質データを基にt-SNEでクラスタリングしたところ、患者サンプルの分離能はジェノタイプによるクラスタリングよりも低く、タンパク質発現パターンは遺伝学的に異なる細胞集団間で共有されていました (Figure 3b)。

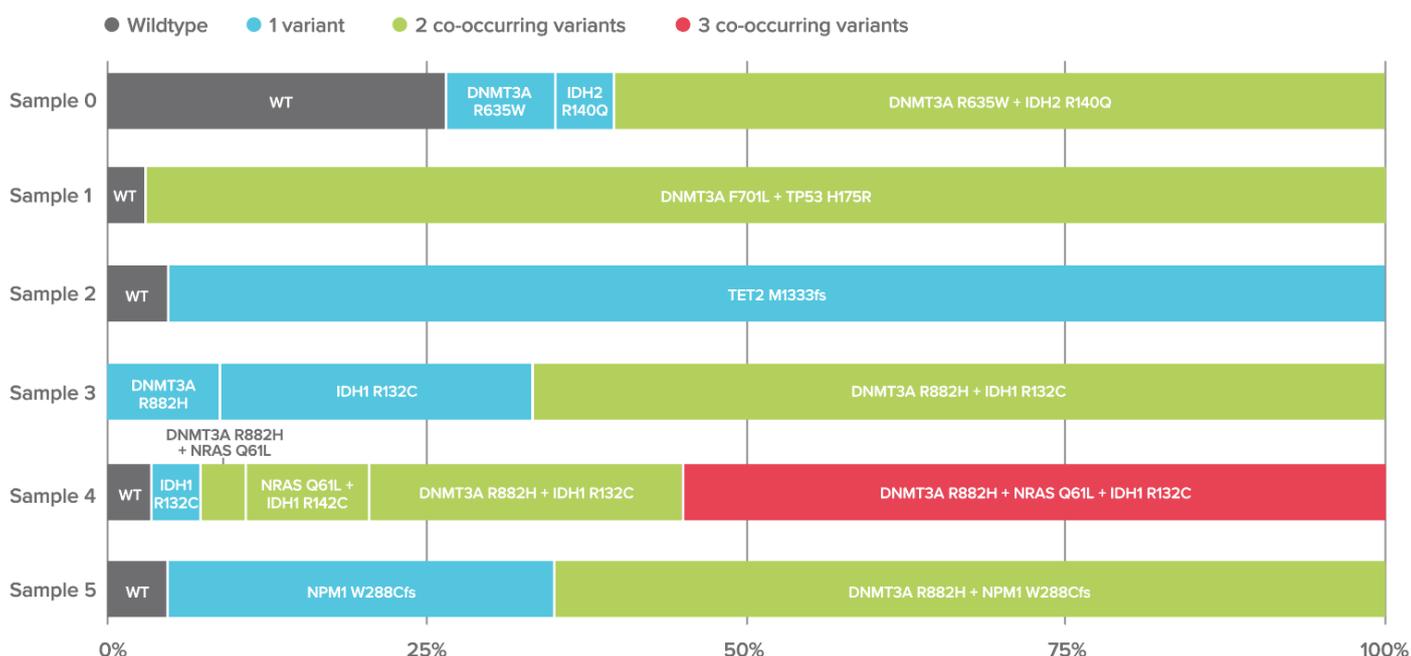


Figure 2. Tapestri PlatformとカスタムDNAパネルの解析によって、各患者サンプルで共起しているSNVとindelを同定し、様々なクローン集団を明らかにしました。

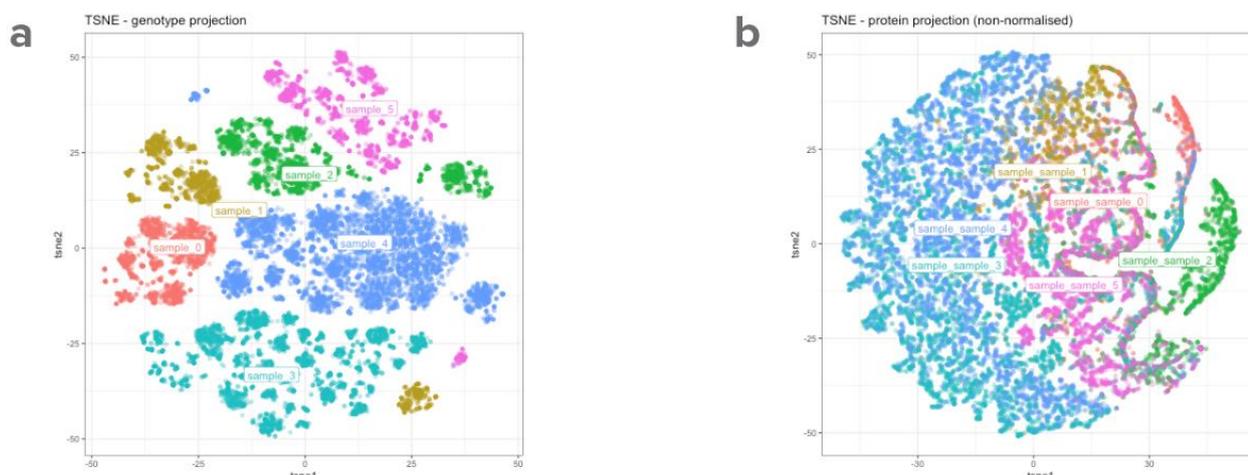


Figure 3. 6例のAML患者サンプルの (a) SNV/indel及び (b) タンパク質データによるt-SNEプロット。ジェノタイプデータに基づいたプロットは、タンパク質発現データに基づくものと比して、患者サンプルを明確に分離しています。プロットは、サンプル別に着色されています。

クローン集団内のSNV/indelはAMLの状態、進展及び再発の指標となり得るのに対し、細胞表面タンパク質の発現レベルはAMLの予後の指標となる可能性があります。前述の解析とは別の次元削減ツールを使用することによって、6例の患者サンプルのタンパク質発現データを基に、UMAPプロットを作成しました。このUMAPプロットに変異のサブセットを重ね合わせたところ、クローン集団の分布が明らかになりました (Figure 4a)。タンパク質発現データと合わせることによって、DNAの変異とタンパク質発現レベルの間に、様々な相関性があることを明らかにしました (Figure 4b-g)。

この研究で使用した6種類の抗体は、AMLの原因となるミエロイド系細胞のフェノタイプ的な状態 (幹細胞や前駆細胞、これらに対する野生型T細胞など) の解明に有用でした。CD11bは白血球に選択的に発現しており、AMLの予後不良と相関しています²。CD3は細胞傷害性T細胞で発現しているのに対し、CD45RAはナイーブT細胞に発現しています。CD34高発現でCD38低発現なフェノタイプ (幹細胞様状態) は、AMLの予後不良と相関

しています³。CD90は白血病幹細胞と関係があります。細胞集団のタンパク質発現データを基に、様々な細胞状態の多彩な細胞集団を同定し、それらをUMAPで示しました。重要なことに、CD3陽性T細胞及びCD11b陽性白血球がCD34陽性CD38陽性幹細胞/前駆細胞から区別されていました。さらに、CD3陽性T細胞は野生型ジェノタイプの細胞と相関していたのに対し、CD34陽性CD38陽性幹細胞群には変異を有する細胞が含まれていました。これらの興味深いジェノタイプとフェノタイプの情報は、20,000シングルセル以上のデータから示されました。

Single-cell multi-omics reveals correlations between AML genomic variants and protein expression

ジェノタイプとフェノタイプの関連性をより詳細に調べるために、Tapestri Insightsで過去に同定したSNV/indelのヒートマップと共に、6種のタンパク質発現のヒートマップを作成しました。

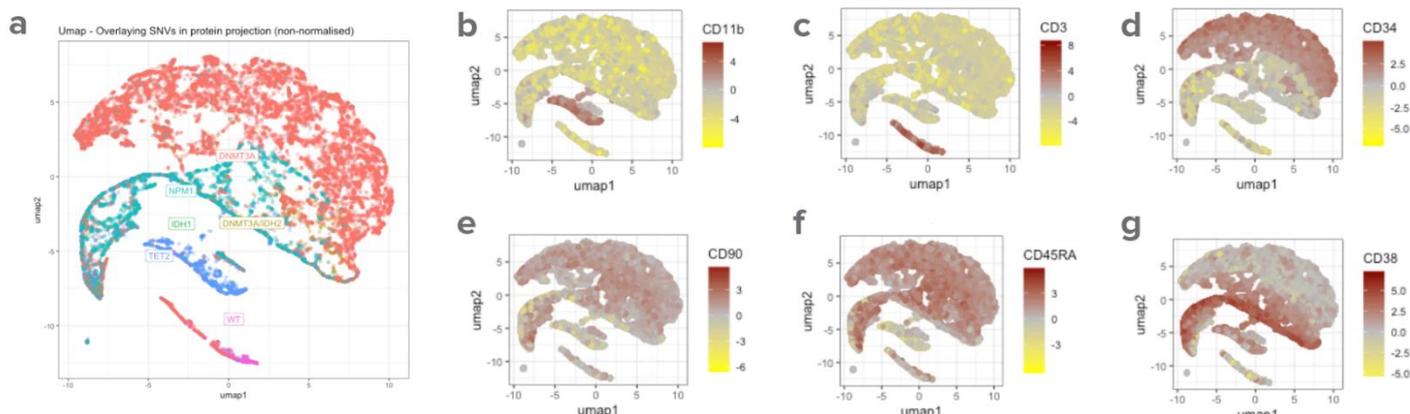


Figure 4. 細胞表面タンパク質のUMAPクラスタリングは、種々の細胞タイプを同定しました。

教師なしクラスタリングによって、タンパク質発現及びSNV/indel、並びにそれらの接合性及び共起性を詳細に推定しました (Figure 5a)。NPM1 W288Cfs変異とCD34低発現の間で、期待された相関が確認されたことは重要な点です⁴。

変異状態とタンパク質の相関性をより見やすくするために、6サンプルをすべて統合し、SNV/indelとタンパク質を相関させたヒートマップを作成しました (Figure 5b, 赤 = 正の相関, 青 = 負の相関)。これにより、TET2 M133fsはCD34_{low}/CD38_{high}フェノタイプと相関しているのに対し、NRAS Q61L, IDH1 R132C及びDNMT3A F701LはCD34_{high}/CD38_{low}フェノタイプと相関していることを見出しました。興味深いことに、3種類のDNMT3Aの変異は、CD38マーカーと様々な相関を示しました。DNMT3A R882Hでは相関を示さず、R635Wでは強い相関を示し、F701Lでは弱い相関を示しました。同一遺伝子で変異が異なる、又はそうした変異が他の

変異と共起しているかを問わず、この結果はジェノタイプの変化がフェノタイプに微妙な差異をもたらすことを示しています。以上のように、同一シングルセルのマルチオミクスデータを統合したデータは、がんの徴候に関して深く洞察することを可能にします。

Conclusion

Tapestri Platformは、同一シングルセルからタンパク質発現並びにゲノム上のSNV, indel及びCNVを検出するマルチオミクス解析能力を有しています。標準的なTapestriプロトコルとシンプルな細胞染色技術で細胞状態を決定したところ、ゲノム変異はタンパク質発現と相関していました。さらに、この新しい技術を培養細胞株と造血器腫瘍サンプルで検証しました。Tapestri Platformは、同一シングルセルからタンパク質, SNV/indel及びCNVを検出してジェノタイプとフェノタイプの関係を明らかにする、初のプラットフォーム製品です。

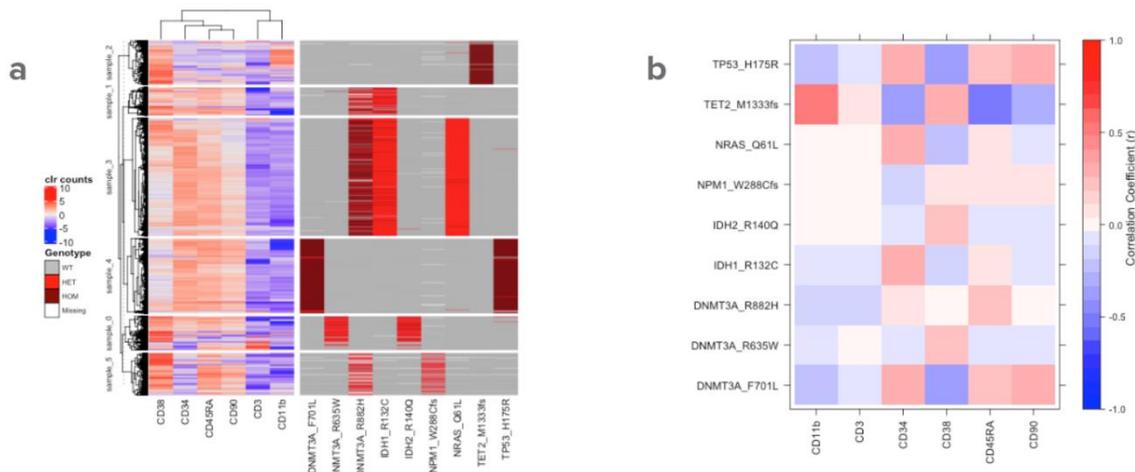


Figure 5. (a) 細胞表面タンパク質 (左) 及びSNV (右) に基づく、患者サンプルの教師なしクラスタリングのヒートマップ。(b) 細胞表面タンパク質発現とSNVの相関を示したヒートマップは特定の遺伝子とタンパク質レベル間の強い相関を示しています (赤 = 強い相関, 青 = 弱い相関)。

References

1. Viny AD et al., Roads Diverge--A Robert Frost view of leukemia development, *N Engl J Med*, 374(23), 2282-2284 (2016)
2. Xu S. et al., Prognostic value of CD11b expression level for Acute Myeloid Leukemia patients: A meta-analysis. *PLoS One*, 10(8):e0135981 (2015)
3. Plesa A et al., High frequency of CD34+CD38-/low immature leukemia cells is correlated with unfavorable prognosis in acute myeloid leukemia, *World J Stem Cells*, 9(12), 227-234 (2017)
4. Martelli et al., CD34+ cells from AML with mutated NPM1 harbor cytoplasmic mutated nucleophosmin and generate leukemia in immunocompromised mice, *Blood*, 116(19):3907-3922 (2010)

©2019 Mission Bio, Inc. All rights reserved. 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_Proteins_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_Proteins_RevA_JP_v3

フィルジェン 株式会社

【お問い合わせ】 科学機器部

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

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

代理店

(July., 2020)