

Tapestri® Platformによる、悪性黒色腫組織から単離した核のシングルセルDNA解析

Takeaways

- 新鮮凍結組織の単離核から高品質なシングルセルゲノムデータを取得します。
- 変異の同定において、シングルセルデータは対応するバルク次世代シーケンシング（NGS）データと強く相関します。
- シングルセルデータは、バルク解析では解決できない腫瘍サンプルのクローン構造と進化の独自の再構成を可能にします。
- Tapestri Platformは、バルク解析では検出できないような0.15%の僅かなクローンを検出するほど高感度です。

シングルセル解析は、バルク解析の課題を克服し、がん不均一性及び系統発生の複雑性について、細胞レベルで洞察することを可能にします。本アプリケーションノートでは、固形腫瘍組織サンプルの特徴を明らかにし、疾患の進化を理解するための、Mission BioのTapestri Platformの持つターゲット・シングルセルDNAシーケンス能力を紹介します。Mission BioとFrancis Crick InstituteのCharles Swanton Laboratory（ロンドン、イギリス）との共同研究において、悪性黒色腫が転移した組織と正常肝組織を用いて、Tapestri Platformのターゲット・シングルセルDNAシーケンス解析を行いました。同一検体内で空間的に離れている転移巣を解析することで、各サンプルのゲノムシグネチャを明らかにしました。

Abstract

近年のがんゲノム解析の発展により、がんは、体細胞変異を反復的に獲得し、クローンの拡大と選択によって進化することが明らかになりました¹。このため、腫瘍内及び腫瘍間のゲノム不均一性が主たる研究対象となりました。

バルク解析は、がんの生物学及びゲノミクスの理解に大きく貢献してきました。しかしながら、1細胞レベルの腫瘍の遺伝的不均一性は、バルク解析で得られる平均化されたデータでは見逃されてしまいます。バルク解析による低頻度変異の同定には極めて高いレベルのリードデプスが求められ、1%以下の変異を確実に確認することは依然として重要な課題となっています。さらに、選択された細胞集団内及び細胞集団間における、希少な変異及び共起している変異は、平均化されたデータでは不明瞭です。例えば、近年のある研究において、バルクエクソーム解析の偽陽性率の問題が浮き彫りになりました²。

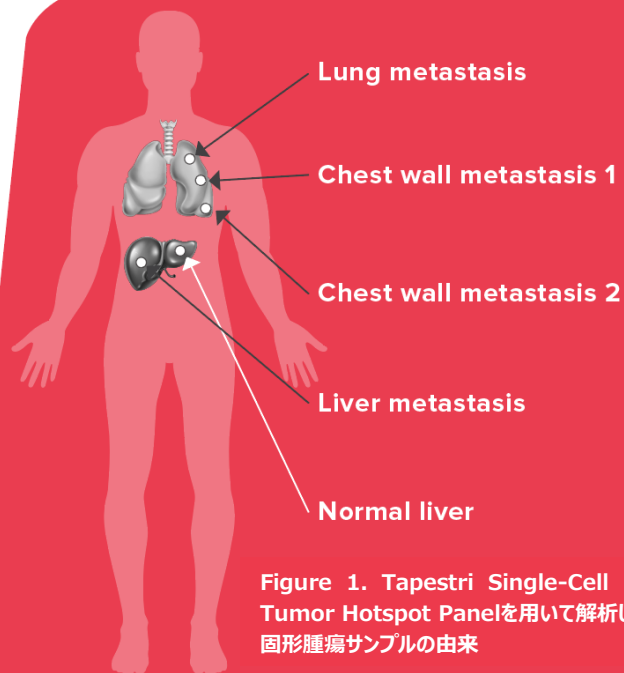


Figure 1. Tapestri Single-Cell DNA Tumor Hotspot Panelを用いて解析した各固形腫瘍サンプルの由来

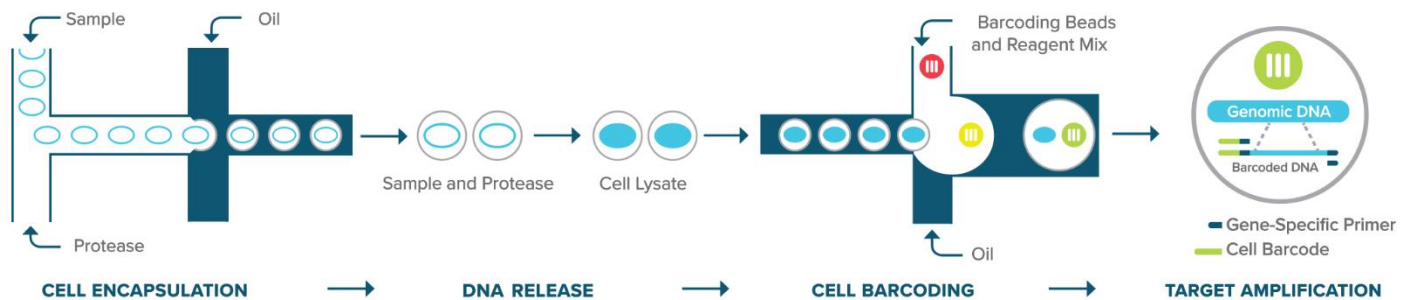


Figure 2. Tapestri Microfluidic Workflow

Introducing the Tapestri Platform

Tapestri Platformは、ハイスループットなターゲット・シングルセルDNA解析のコンプリートソリューションであり、質の高いバリエーションコール（SNV及びindel）を行います。液滴マイクロfluidイクスと新しい二段階ワークフロー、ハイマルチプレックスPCR及び細胞バーコードを採用しているため、数千シングルセル内でターゲット領域の増幅を一度に行うことができます。ベンチトップ型装置であるTapestri Instrument及び最適化されたTapestriキット（カートリッジと消耗品が含まれています）で調製したシングルセルライブラリーを、illumina®プラットフォームでシークエンスします。その後、直観的に使用できるソフトウェア（Tapestri Pipeline及びTapestri Insights）によって、データを解析して可視化します。

造血器腫瘍用³及び固形腫瘍用のカタログパネルが用意されていますが、これらは関心のある特定の領域に基づいてカスタマイズすることが可能です。Tapestri Platformは、こうしたパネルによって、サブクローン細胞集団内で共起している変異、変異の接合性及び僅かなクローン（最小0.1%）の検出を実現しています。さらに、培養細胞株、骨髄穿刺液、全血から単離したPBMC、新鮮凍結組織から単離した核など、様々なサンプルを解析することができます。

本アプリケーションノートでは、汎用的な核単離プロトコル、Tapestri Single-Cell DNA Tumor Hotspotパネル及びTapestri Platformによって、悪性黒色腫の転移巣の解析結果を紹介します。

Experiment & Methods

Tumor Hotspot Panelを用いた Tapestriワークフロー

Tapestri Platformは、シングルセルDNA解析のエンド・ツー・エンドソリューションです。新しい二段階マイクロfluidイクス技術によって、Tapestri Instrument内のカートリッジで数千のシングルセル又はシングル核を液滴内に封入しました（Figure 2）。プロテアーゼで核は溶解され、DNAが遊離されました。このライセート調製の後、サーマルサイクラーによる熱変性でプロテアーゼを失活させました。第2段階として、シングル核ライセートを先のカートリッジに戻し、ゲノム上の特定領域を増幅するために、バーコードビーズ、マルチプレックスPCRプライマー及び試薬と混合しました。この段階において、Tapestri Single-Cell DNA Tumor Hotspot Panelを使用しました。このパネルは、244のアンプリコンからなり、様々な固形腫瘍と幅広く関連する59の癌遺伝子及び腫瘍抑制遺伝子を標的としています（Table 1）。

バーコードの組み込みと標的領域の増幅が完了した後、ライブラリーの調製、精製及び定量を行い、illuminaプラットフォームでシークエンスしました。Tapestri PipelineソフトウェアでFastqファイル进行处理し、Loomファイルを作成しました。この過程で、リードは細胞バーコードに基づいてグループ化され、各細胞の変異プロファイルが構築されます。その後、Loomファイルをデスクトップ用ソフトウェアであるTapestri Insightsに読み込ませ、データのフィルタリング、可視化及び解釈を行いました。

59 GENES - TUMOR HOTSPOT PANEL

ABL1	CSF1R	FGFR1	IDH2	MLH1	RB1
AKT1	CTNNB1	FGFR2	JAK1	MPL	RET
ALK	DDR2	FGFR3	JAK2	MTOR	SMAD4
APC	EGFR	FLT3	JAK3	NOTCH1	SMARCB1
AR	ERBB2	GNA11	KDR	NRAS	SMO
ATM	ERBB3	GNAQ	KIT	PDGFRA	SRC
BRAF	ERBB4	GNAS	KRAS	PIK3CA	STK11
CDH1	ESR1	HNF1A	MAP2K1	PTEN	TP53
CDK4	EZH2	HRAS	MAP2K2	PTPN11	VHL
CDKN2A	FBXW7	IDH1	MET	RAF1	

Table 1. Tapestri Single-Cell DNA Tumor Hotspot Panel 遺伝子リスト。

メラノーマの転移巣からの核抽出

転移巣間の不均一性を明らかにするために、ある1検体に由来する4つの転移巣及び1つの正常肝組織がFrancis Crick Instituteから提供されました (Figure 1)。これらの組織は、採取後に極低温で凍結されました。凍結組織を滅菌処理済みメスでスライスして断片をまとめた後、Frozen Tissue for Single-Nuclei DNA Sequencing user guide⁴に従って、処理しました。このプロトコルはシンプルで、通常のTapestriのワークフローに追加されるハンズオンタイムは1時間程度です。各組織サンプルから平均 3.4×10^6 ($1.4 - 7.7 \times 10^6$) 個の核を単離し、最大150,000核/ランをTapestriの解析に使用しました。illumina HiSeq[®] 2500 systemによる解析に先立ち、各シングルセルライブラリーの一部をillumina MiSeq[®] systemでシーケンスしてライブラリーQCを行いました。

Results

質の高いパネルと新鮮凍結固形腫瘍核 シーケンシングデータ

単離核から高品質なシーケンスデータが得られ (Table 2)、5サンプルで合計26,549核 (平均スループット = 約5,300核/サンプル) がシーケンスされました。さらに、パネルの読み取り均一性は一貫して平均85%超であり、78X/アンプリコン/核のカバレッジデプスは高品質なバリエーションの実施に十分でした。

Tissue organ	Seq. read pairs	Nuclei	Panel uniformity	Reads per amplicon per nucleus
Chest wall metastasis 1	118M	4,346	86.1%	78x
Chest wall metastasis 2	113M	3,971	87.3%	85x
Lung metastasis	108M	5,772	91.4%	85x
Liver metastasis	131M	5,697	89.7%	65x
Normal liver	146M	6,943	90.2%	78x
Average	123M	5,346	88.9%	78x

Table 2. 各サンプルのパネル及びシーケンスのパフォーマンス。パネルの均一性 (Panel uniformity) は、平均カバレッジデプスの20%以上のカバレッジデプスでカバーされた領域の割合を表しています。

シングルセルデータはバルクNGSデータと強く相関

Tapestri Platformで検出された疾患関連変異は、過去にバルク解析で同定された変異と一致しました。さらに、疑似バルク解析 (Tapestriのシングルセルデータから細胞バーコードを情報解析で除いたもので行った解析) と比較して、疾患関連変異のバリエーションアレル頻度 (VAF) の集合は、バルクデータとよく相関しました。Figure 3は、肺転移サンプルにおける相関を示しています (y 切片 = 0.01、 $R^2 = 0.97$ 、傾き = 1.04)。このデータは、Tapestriのシングルセルデータの集合がバルク解析のVAFを、高い一致度をもって、再現することを示しています。

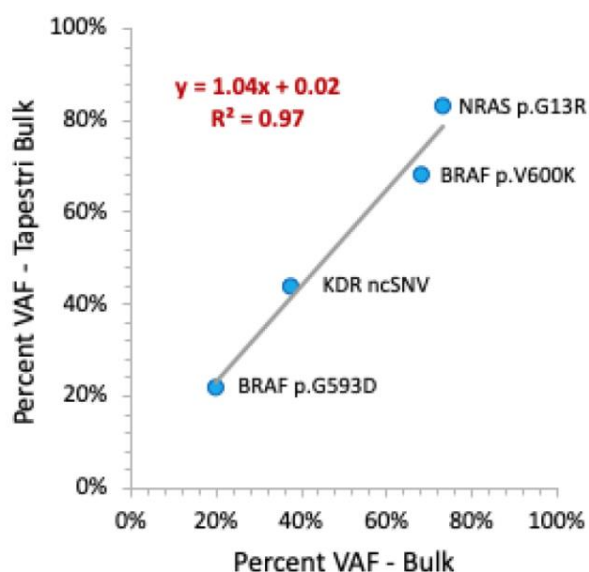


Figure 3. Tapestri Platformのシングルセルデータをバルクデータに変換して算出したVAFは、過去にバルク解析で得たデータと強く相関しました（肺転移サンプル）。

真のクローン構造の検出、転移巣全体の進化系統樹の再構築

様々な転移性腫瘍のシングルセル解析によって、腫瘍の不均一性、クローン構造及び疾患の系統樹に関する、他に類を見ない、多くの洞察を得ることができました。

各クローン内で共起している特異的な変異によって、各サンプル内のクローンの構成を決定しました。

すべてのサンプルの全細胞における変異の割り当てをTable 3に示しました。疾患関連変異を6種推定し、これを基に5つの組織で合計5種のクローンを同定しました。すべてのクローンに存在する変異パターンを基に、ファウンダークローンの候補を定義しました（BRAF p.V600K及びKDR ncSNVの二重変異）。

このデータを基に、2つのクローン進化の系譜を推定しました。ファウンダークローンの癌遺伝子NRAS p.Q61L変異の獲得によって、Clone 1を導く1つ目の系譜を定義しました。がんの進展に伴い、この癌遺伝子の変異アレルで増幅・野生型アレルの欠失が起こり、Clone 2が形成されると考えられました（BRAF p.V600K/ KDR ncSNV/ NRAS p.Q61L）。このクローンでは、野生型NRASアレルは検出されませんでした。そして、Clone 2はMTOR ncSNV変異を獲得し、四重変異クローンであるClone 3を形成しました。

Clone 4を形成するがん遺伝子NRAS p.G13R変異の獲得によって、2つ目の系譜を明らかにしました。このクローンは、BRAF p.G593Dの獲得によって、四重変異であるClone 5に進化しました。両系譜におけるBRAF p.V600K変異のVAFの増加は、シングルセル解析によってのみ観察可能であり、遺伝学的不均一性のさらなる層を明らかにし、体細胞遺伝子変異（増幅）による疾患の進展を表している可能性を表

Clones	Wild-type Clone	Founder Clone	Clone 1	Clone 2	Clone 3	Clone 4	Clone 5
Tissues containing clone	All	N/A	Liver Chest wall 1 Chest wall 2	Liver Chest wall 1 Chest wall 2	Chest wall 1	Lung	Lung
MTOR ncSNV	WT	WT	WT	WT	HET	WT	WT
NRAS p.Q61L	WT	WT	HET	HOM	HOM	WT	WT
KDR ncSNV	WT	HET	HET	HET	HET	HET	HET
BRAF p.V600K	WT	HET	HET	HET	HET	HET	HET
NRAS p.G13R	WT	WT	WT	WT	WT	HOM	HOM
BRAF p.G593D	WT	WT	WT	WT	WT	WT	HET

Table 3. Tapestri Platformによって全サンプル間で同定されたすべてのクローン。すべてのクローンに存在する変異パターンを基に、ファウンダークローンを推定しました。WTは野生型アレル、HETはヘテロ接合性変異、HOMはホモ接合性変異を表しています。

しています。Figure 4に系統樹モデルを示します。

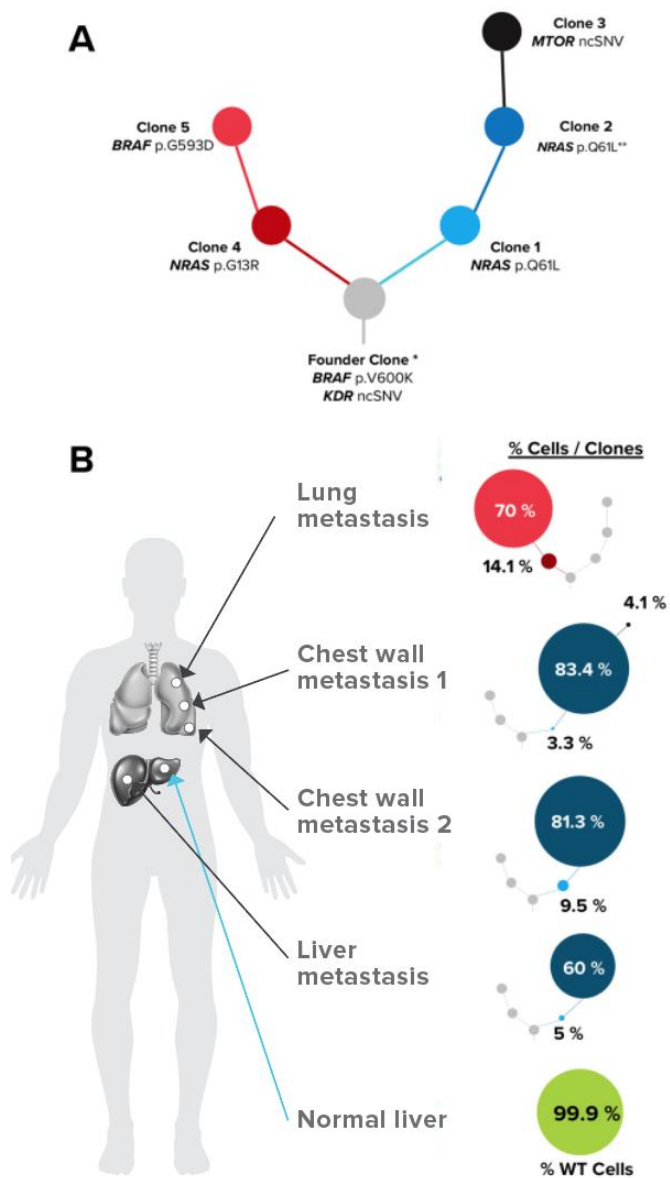


Figure 4. A. 各クローンの進化を表す系統樹。B. すべての組織サンプルにおけるクローンの分布。
*ファウンダークローン。**Clone 1と異なり、Clone 2では野生型アレルが検出されませんでした。

希少クローンの検出

Tapestri Platformは正常と推定される組織内で僅かなクローンが検出されたことは重要ですが、これはこのサンプルにおける悪性疾患の程度を考慮すると驚くことではありませんでした。三重変異クローン（Clone 1及びClone 2）が正常肝組織で検出されたことから、正常と推定される組織内における悪性疾患の存在が示唆されました（Figure 5）。これらのクローンは、合計0.15%（5細胞）を占め、過去のバルク解析では検出されませんでした。治療反応の追跡や疾患の寛解と再発のモニタリングにおいて、僅かなクローンを検出することは極めて重要です。

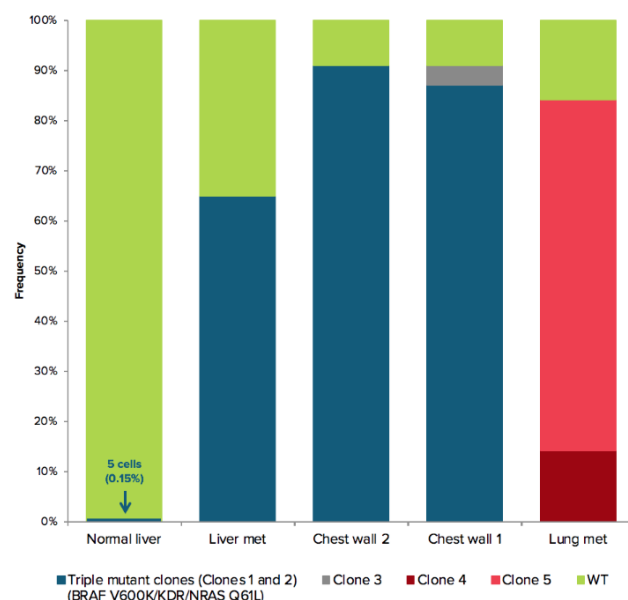


Figure 5. すべての組織における三重変異クローンの分布。正常組織で僅かな三重変異クローン（合計5細胞）が検出されたことは、野生型細胞の背景に存在する僅かながん細胞を検出するシングルセル解析の能力を表しています。

腫瘍純度の正確な測定

腫瘍の純度は、一般的に、病理医による組織切片の視覚的分析や画像解析によって決定されますが、本アプリケーションノートでは、各サンプル内の変異型又は野生型細胞の分布によって、純度を明瞭に決定しました。Figure 6では、Tapestri Platformのシングルセル解析で同定した各サンプル内の変異型及び野生型細胞の分布がまとめられており、組織学的解析よりも正確に腫瘍の純度を測定できる可能性が示されています。

Conclusion

- 様々な固形腫瘍サンプルから単離した核を用いて、ライブラリーが調製されました。
- シングルセル解析は、バルク解析と強く相関したため、確信をもって、過去に得た結果と比較することが可能です。
- シングルセル解析は、各サンプル内のクローンを明確に同定し、クローン系統樹の再構築を可能にします。
- 肺組織で観察された異なる系譜のクローンは、疾患の複雑な進展を表しています。
- 僅かなクローン（0.15%）を検出したことは、疾患の進展のモニタリングにとって重要です。
- シングルセルの遺伝子レベルで、腫瘍の純度が測定されました。

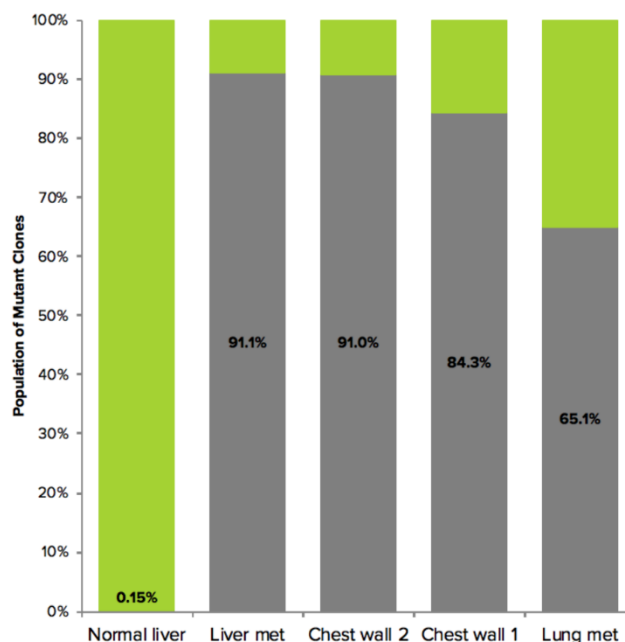


Figure 6. 全サンプルにおける変異型細胞の分布（灰色）は、腫瘍の純度の程度が多様であることを示しています。シングルセルのジェノタイプデータを用いることで、野生型細胞を直接的に検出し、ダウンストリーム解析から除外することができます。

References

1. Vogelstein *et al.*, Cancer Genome Landscapes. *Science*, 339, 1546-1558 (2013).
2. Shi *et al.*, Reliability of Whole-Exome Sequencing for Assessing Intratumor Genetic Heterogeneity. *Cell Reports*, 25, 1446-1457 (2018).
3. Pellegrino *et al.*, High-throughput single-cell DNA sequencing of acute myeloid leukemia tumors with droplet microfluidics. *Genome Res.* 28, 1345-1352 (2018).
4. *Nuclei Extraction from Frozen Tissue for Single-Nuclei DNA Sequencing*, Mission Bio 2018 user guide.

QUESTIONS?

missionbio.com
info@missionbio.com

6000 Shoreline Court, Suite 104, South San Francisco, CA
94080 USA
+1 (415) 854-0058

研究用途限定。診断用途では利用できません。Mission Bio及びフィルジェンは、本アプリケーションノートに記載されている情報の有用性、完全性又は正確性について、声明又は保証しません。本小冊子に記載されている製品、サービス及び仕様は、通知なく変更されることがあり、Mission Bio及びフィルジェンは、そうした変更についての責任を放棄します。本アプリケーションノートに記載されている情報について、明示的・黙示的を問わず、いかなる保証もされません。Mission Bio及びフィルジェンは、誤字、印刷時又は製造時の、製品、サービス又は仕様に影響する誤り又は変更について、一切の責任を放棄します。本製品及びサービスについてお客様が提案する用途について、十分に検証することはおお客様の責任です。Mission Bio及びフィルジェンは、品質、状態、安全性、特定の目的における商品性及び適合性の黙示的保証を含むがこれに限らない、明示的、黙示的又は法的その他のすべての保証を放棄します。Mission Bio及びフィルジェンは、本アプリケーションノートの内容に関連して生じた又は本アプリケーションノートに記載されている製品又はサービスの利用に関連して生じた偶発的、直接的、間接的、懲罰的又は派生的損害について、責任を負わないものとします。本アプリケーションノートの原文「AppNote_MissionBio_Solid_Tumor_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_Solid_Tumor_RevA_JP_v3

フィルジェン 株式会社



【お問い合わせ】 試薬機器部

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

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

代理店

(Feb., 2024)