

scTAM-Seq Tapestriを活用した シングルセルDNAメチル化プロファイリング



TAPESTRIS[®] シングルセルマルチオミクス解析プラットフォーム

Introduction

エピジェネティック制御因子としてのDNAメチル化の重要性は、細胞や発生のプロセスにおいて、広く認知されています。CpGジヌクレオチドのメチル化は、特にプロモーター領域に存在する場合において、転写抑制に大きく関与するとされています。さらに近年では、DNAメチル化が疾患でどのような役割を果たすのかについて、注目されています。多くの多因子疾患において、DNAメチル化の変化は細胞活動を阻害することが知られています。例えばがんにおいて、DNAメチル化を介した転写阻害は、早い段階で悪性形質転換を起こすため、早期発見のための効果的なマーカーとして考えられています¹。メチル化の特性は、がんの種類または細胞の種類によって異なります。様々ながんにおけるこうした修飾の役割とその効果を理解することは、潜在的な治療標的を特定するために、極めて重要であると言えます。

DNAメチル化は、ヒストン修飾やクロマチンの接近可能性など他のエピジェネティックなメカニズムと比較して、安定でランダムなノイズも少ない傾向にあります。加えて、DNAメチル化に基づくバイオマーカーは、規制機関によって承認されており、研究および臨床応用の両方の分析に適しています²。

従来、DNAメチル化の評価には、ゲノムワイドなバルクシーケンスが最も一般的でした。しかし、バルクシーケンスから得られるメチル化シグナルは平均化されたものであるため、正常および疾患におけるメチル化シグネチャを細胞間で明らかにすることは不可能でした。近年では、こうしたシグネチャを解明するいくつかのシングルセルメチル化解析法が開発され、細胞の不均一性や希少な細胞タイプについての知見が得られるようになりました。しかし、バイサルファイトシーケンスなどによって、ゲノム全体のメチル化シグネチャをシングルセルレベルで解析することには、次のような課題が伴います：1) ゲノム全体のメチル化部位は散在しており、高深度で配列決定されたサンプルであっても、ゲノムカバレッジ（被覆率）は大幅に制限される；2) バイサルファイト処理はDNAの劣化につながり、サンプルを過度に失う恐れがある。

こうした現在のシングルセルDNAメチル化解析法の欠点を解決するために、スペイン、バルセロナにあるCentre for Genomic Regulation (CRG) のRenée BeekmanとLars Veltenの研究グループは、新たにバイサルファイトフリーなターゲットシーケンス法を開発しました。この手法は、Genome Biologyに発表され³、single-cell targeted analysis of the methylome (scTAM-seq) と名付けられました。この手法は、Tapestriマイクロ流体プラットフォームを用いることで、最大1万個の細胞で、生物学的に関連する650個のCpG部位を直接プロファイリングすることが可能です。

Key Takeaways

- scTAM-seqは、DNAメチル化ダイナミクスをシングルセル、シングルヌクレオチドレベルで解析することができる強力な手法です。
- scTAM-seqは、0.2%未満の偽陽性率、7%程度の偽陰性率を達成し、高い精度でDNAメチル化の評価を行うことができます。
- scTAM-seqは、体細胞突然変異や細胞表面発現解析と組み合わせることで、腫瘍内不均一性をより豊かに特徴付けることができます。

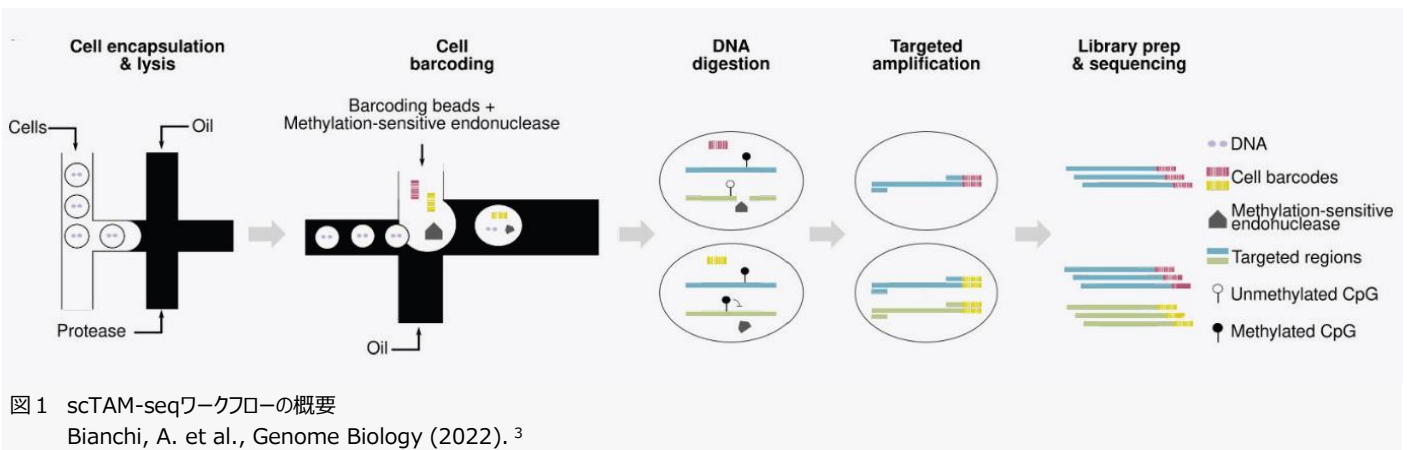
Description of the scTAM-seq assay

scTAM-seqは、制限酵素を用いるハイスループットな手法であり、DNAのメチル化状態をシングルセルレベルで解析します。この手法において、メチル化感受性制限酵素（MSRE）によってメチル化されていない認識部位は選択的に切断され、メチル化部位は維持されます。

本研究グループは、scTAM-Seqに適した60のMSREをいくつかの基準に基づいて選択し、その手法の適用範囲を拡大させました（選択基準については参考文献3をご参照ください）。使用する制限酵素は、メチル化を評価したい遺伝子や制御領域によって異なります。関心とするCpGは、公開されているバルクデータセットから特定することができます。また、本研究グループが構築したバイオインフォマティクスパイプラインは、GitHubリポジトリにて公開されています。

(<https://github.com/veltenlab/CpGSelectionPipeline>)

手順を要約すると、まず単離した細胞をTapestri Platformに充填し、プロテアーゼを含んだ液滴を形成させることでゲノムDNAを遊離させます。得られたヒストンフリーのDNAを含んだライセートで再び液滴を形成させることによって、メチル化感受性制限酵素、バーコードビーズ、PCRプライマー（単一の切断部位を含む）およびCpG部位を標的とする試薬と統合させます。その後、シーケン斯拉イブラリーを調製し、illumina社の次世代シーケンサー（NGS）でシーケンスすることで、リードを取得します。さらに、Tapestriのマルチオミクス解析機能は、scTAM-seqを体細胞突然変異と細胞表面マーカー発現の同時解析と組み合わせることを可能にします。



“scTAM-seqによって、数千細胞にわたる最大1,000のCpGをかつてない解像度で、初めて解析することが可能となり、正常と疾患の細胞状態に関するエピジェネティックプロファイリングを達成することができました。”

AGOSTINA BIANCHI PH.D. STUDENT,
RENÉE BEEKMAN LAB, CENTRE FOR
GENOMIC REGULATION, BARCELONA, SPAIN)



Experimental Design

高解像度でのDNAメチル化解析を可能とするTapestriプラットフォームを検証するためにCRGの研究グループは末梢血B細胞における細胞サブタイプを同定する研究を設計

制限酵素の選択

B細胞の分化に伴ってメチル化状態が変化するCpGを解析するための制限酵素として、HhaIエンドヌクレアーゼを選択しました。この酵素は、Tapestriへの適合性を含み、考慮すべき全ての基準を満たしていました（選択基準については参考文献3をご参照ください）。なお、HhaIでは、ヒトゲノム内で解析できるCpG数は176万個に制限されますが、SsiIなど、本手法と互換性のある他の酵素を使用することで、さらに多くの部位を解析することも可能です。

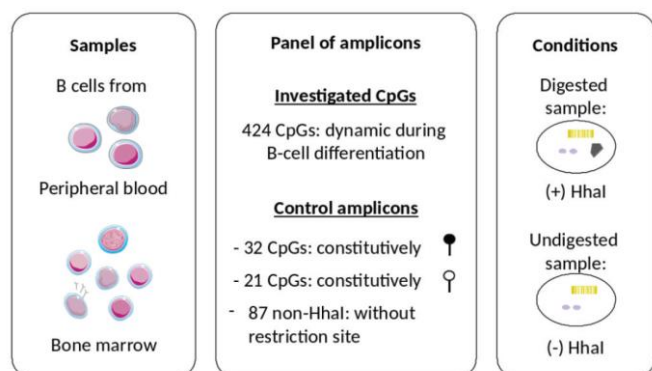


図2 実験デザインの概要
Bianchi, A. et al., Genome Biology (2022).³

DNAメチル化パネル

本研究グループは、scTAM-seq用のCpGを選択するパイプラインを構築し、GitHubで公開しています。
(<https://github.com/veltenlab/CpGSelectionPipeline>)

本研究では、Tapestri Designerソフトウェアを用いてカスタムパネルを設計しました。このパネルには、B細胞分化関連CpGに対応する424個のアンプリコンに加え、コントロールとして、HhaIの認識部位を持たない領域に対応する87個のアンプリコン（non-HhaI）、恒常的にメチル化されているCpGに対応する21個のアンプリコン、B細胞の分化過程で恒常的に非メチル化なCpGに対応する32個のアンプリコンも含まれています。詳細は、参考文献3のSupplementary Informationの表S1をご参照ください。

抗体 - オリゴヌクレオチドコンジュゲート(AOC)による細胞表面発現解析

45プレックスのTotalSeq-D Heme Oncology Cocktail (BioLegend; Cat. num. 399906) およびTotalSeq-D0154 anti-CD27 antibody (clone O323, BioLegend; Cat. Num. 302861) を用いて、46種の細胞表面タンパク質マーカーを解析しました。

解析サンプル

骨髓または末梢血から分離した120,000-140,000個のB細胞を、Tapestriのマイクロ流体カートリッジに充填しました。

サンプルの処理はTapestri User Guide V2に従って行いましたが、以下の表1で示されているように、いくつかの変更を加えました。詳細なプロトコルやその他の推奨事項については、参考文献3のMethodsセクションをご参照ください。

試薬/ステップ	プロトコルの変更点
Barcoding Mix	Tapestri Barcoding Mix V2 288μlに、高濃度HhaI酵素（150,000 U/mL, NEB; Cat.Num. R0139B-HC1）5μlを添加。 注：undigestedコントロールでは酵素未添加。
ターゲットのPCR増幅	ターゲットの増幅前に、37℃で30分間のステップを追加。

表1 標準プロトコルに追加する試薬/ステップ

実験条件

骨髓と末梢血サンプル用いて、2つの実験条件を検証しました。HhaI処理と未処理のサンプルを用意し、消化と未消化のサンプルをそれぞれ調製しました。

注：未消化サンプルの検証により、メチル化感受性酵素が無い状態での技術的ドロップアウトを評価しました。

バイオインフォマティクス解析

Mission BioのTapestri Pipeline v2ソフトウェアのカスタマイズ版を用いて、Rawシークエンスデータを処理しました。scTAM-seq法で得られたデータを解析するためのスクリプト集は、GitHubリポジトリに公開されています。
(<https://github.com/veltenlab/scTAM-seq-scripts>)

Results

scTAM-SEQは優れたパフォーマンスを示す

scTAM-seq法の性能を評価するため、non-HhaIコントロール アンプリコンの1細胞あたりのパフォーマンスに基づいて、実験条件ごとに4,706~9,583細胞のデータを選択しました。

DNAメチル化パネルにおけるコントロールアンプリコンは、骨髄および血液サンプルのいずれにおいても期待どりの結果を示しました。B細胞分化のCpGを標的とするアンプリコンは消化サンプルでリードの得られた細胞の割合が低く、これは非メチル化CpGが選択的に消化されていることを示しています。

未消化の骨髄コントロールサンプルから得られたB細胞分化アンプリコン (n=424) で偽陰性率 (FNR) の中央値を推定したところ、6.7%でした。また、消化された骨髄コントロールサンプルから得られた恒常的非メチル化アンプリコン (n=32) で偽陽性率 (FPR) の中央値を推定したところ、0.2%未満でした。

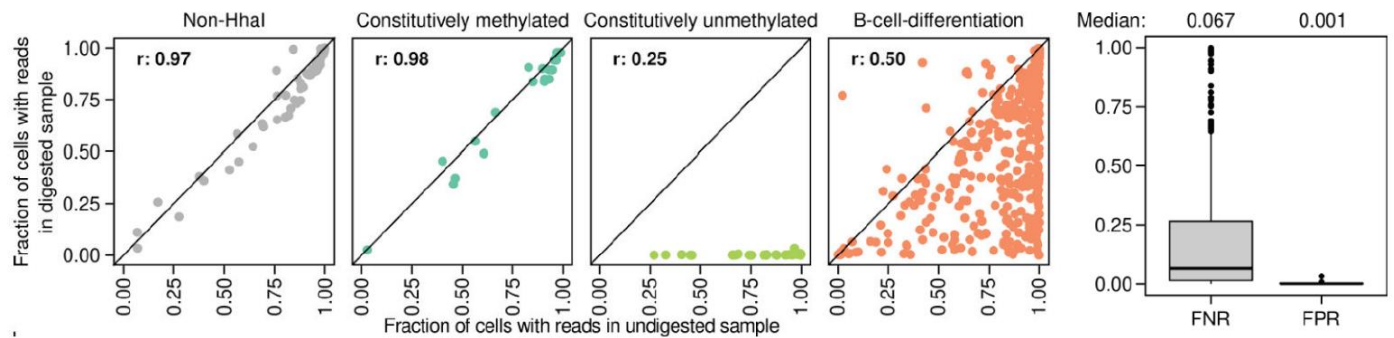


図3 左：消化骨髄サンプルと未消化骨髄サンプルにおけるアンプリコンのパフォーマンス

右：骨髄サンプルにおけるFNRとFPRの中央値

Bianchi, A. et al., Genome Biology (2022).³

“scTAM-seqは、Mission Bio社のTapestri技術により、DNAメチル化、体細胞突然変異、表面タンパク質発現の同時プロファイリングを可能にし、がんのクローン進化を容易に解析します。”

MICHAEL SCHERER (COMPUTATIONAL BIOLOGY POSTDOC,
LARS VELTON LAB, CENTRE FOR GENOMIC REGULATION,
BARCELONA, SPAIN)



Results

scTAM-SEQはB細胞集団を明確に分離する

scTAM-seqの持つB細胞集団の分離能力を評価するために、ハイパフォーマンスな313個のCpGアンプリコンで教師なしクラスター分析を行いました。合計9,583個の末梢血B細胞から得られたDNAメチル化プロファイルの解析により、3つのクラスターが分離されました。それらをバルクのDNAメチル化データを用いて解析した結果、ナイーブB細胞、ノンスイッチ（ns-）メモリーB細胞、クラススイッチ（cs-）メモリーB細胞として同定されました。さらに、表面タンパク質の発現データは、これらのクラスターの割り当てを確認しました。

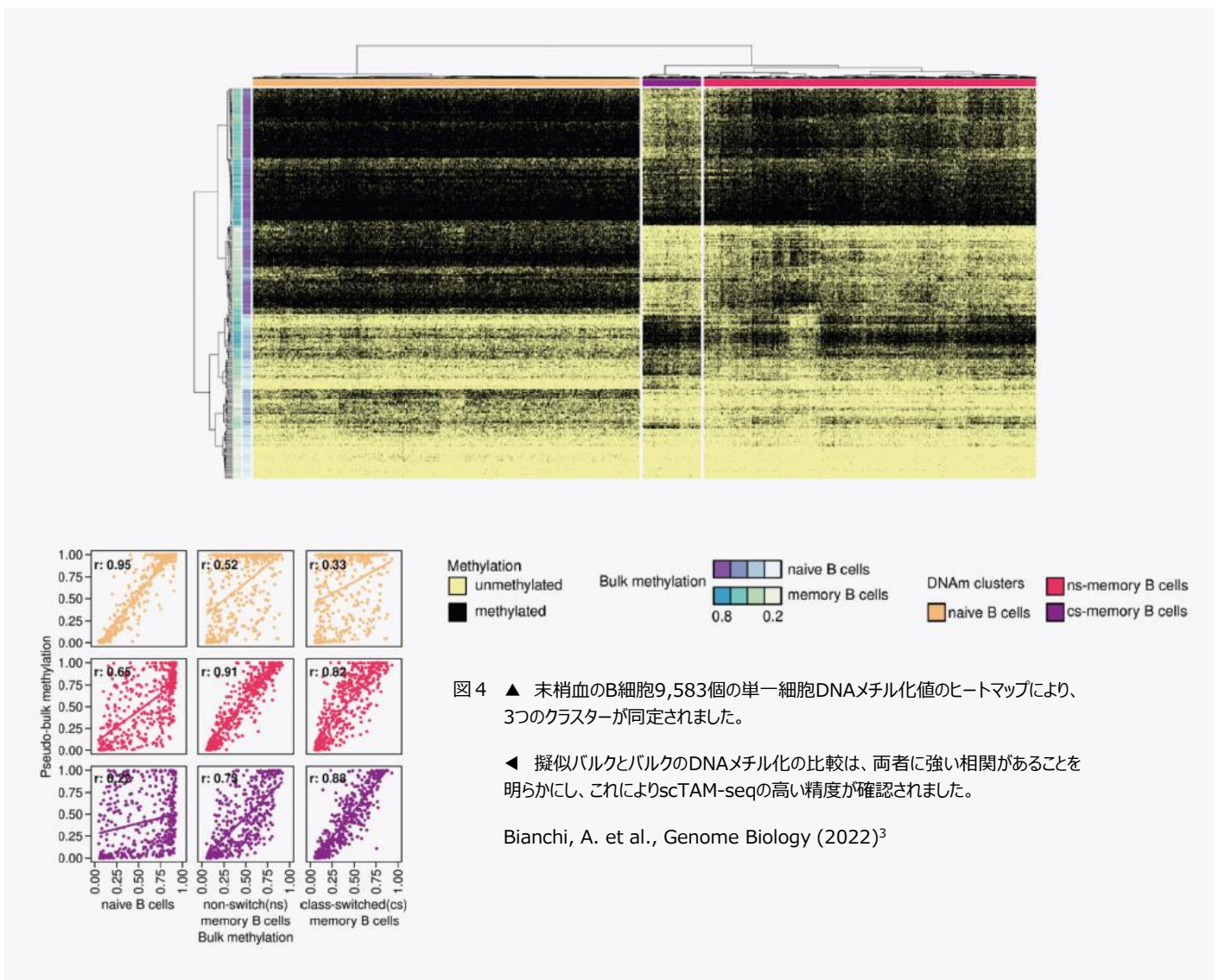


図4 ▲ 末梢血のB細胞9,583個の単一細胞DNAメチル化値のヒートマップにより、3つのクラスターが同定されました。

◀ 擬似バルクとバルクのDNAメチル化の比較は、両者に強い相関があることを明らかにし、これによりscTAM-seqの高い精度が確認されました。

Bianchi, A. et al., Genome Biology (2022)³

B細胞分化に関連する424個のアンプリコンに関する擬似バルクとバルクのDNAメチル化データの比較は両者における強い相関を明らかにし、scTAM-seqの高い精度が確認された。

本研究は、ns-メモリーB細胞集団内の集団内不均一性を明らかにするため、さらに拡大されました（本アプリケーションノート未掲載）。本研究グループは、細胞の分化と増殖が徐々に進行するにつれて、DNAメチル化レベルでnsメモリーB細胞集団内に実質的な不均一性が生じることを明らかにしました。

ADDITIONAL RESOURCES

- [Publication](#)
- [Webinar](#)
- [Single-cell Sequencing 101](#)

Conclusions

シングルセル・エピゲノミクスデータのマッピングにおける近年の進歩は、いつ、どこで、どれだけのCpGが生物学的に関与するのか、ゲノム制御において役割を果たすのか、についての理解を深めています。ヒトゲノムの2,800万のCpGのうち、比較的小さなサブセットのみがメチル化状態を変化させ、細胞内で何が起きているかについての情報を与えます。

- scTAM-seqは、容易に高解像度かつ高い信頼性で、生物学的に重要なCpGを評価することが可能なおうえ、通常の生物学および疾患に影響するDNAメチル化を理解するための、正確かつ費用対効果の高いソリューションです。
- scTAM-seqを用いることで、DNAメチル化（エピジェネティクス）、体細胞突然変異（遺伝子型）、表面マーカー発現（表現型）の同時評価が可能となり、腫瘍内または多様な細胞系列にわたるクローン構造を非常に豊かに把握することができます。

References

- ¹ J. Ibrahim et al., Methylation biomarkers for early cancer detection and diagnosis: Current and future perspectives. *European Journal of Cancer*. 178, 91-113 (2023)
- ² V. Davalos et al., Cancer epigenetics in clinical practice. *CA Cancer J Clin*. 1-49 (2022)
- ³ A. Bianchi et al., scTAM-seq enables targeted high-confidence analysis of DNA methylation in single cells. *Genome Biology*. 23, 229 (2022)

MISSIONBIO.COM

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

(June, 2023)