

# Full-length bulk and single-cell RNA sequencing for cancer research

バルクおよびシングルセルのトランスクリプトームを、アイソフォームレベルで特性評価する能力は、がん研究にとって非常に重要です。バルクトランスクリプトームデータでは、ショートリードはコンピュータによるアセンブリに頼って転写産物を推測しますが、この方法は多くの選択的スプライシングアイソフォームに対して課題があります。一方、シングルセルトランスクリプトミクスでは、ショートリードは遺伝子レベルの情報しか捕捉できませんし、他のロングリード技術ではUnique molecular identifier (UMI) および細胞バーコード (CBC) の同定に必要な精度が不足しています。

PacBio® HiFiシーケンシングを使用した全長RNAシーケンシングであるIso-Seq®法は、バルクおよびシングルセルレベル両方でアイソフォームの特性評価を明確にすることで、がん研究を前進させることが示されてきました。

[PacBio Kinnex™ RNA kits](#)は、cDNAなどのアンプリコンをより長いフラグメントに連結する[MAS-Seq法](#)に基づいており、HiFiロングリードシーケンサーのスループットをさらに向上させます。連結された分子のシーケンシングから生成されたHiFiリードは、元のcDNA配列を取得するために、バイオインフォマティクスの分割されます。Kinnex kitは標的となるアンプリコンサイズに応じて様々な連結数を提供し、スループットの向上を最大化します。

本資料では、バルクおよびシングルセルIso-Seqデータがどのように融合遺伝子を検出し、ワクチン候補のネオエピトープとなる可能性を持つ新規アイソフォームを同定したり、クローン進化を追跡するかを実証したりした、がん研究におけるIso-Seqの使用文献をハイライトします。



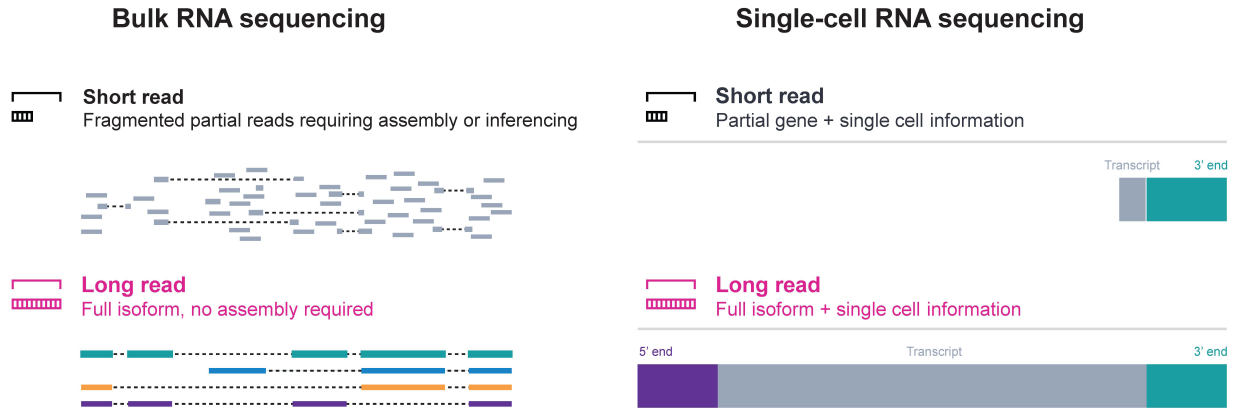


図1 ロングリードRNAシーケンシングとショートリードRNAシーケンシングの比較。バルクトランスクリプトームでは、ショートリードは転写産物の同定にコンピュータによるアセンブリまたは推測を必要とするが、ロングリードでは全長cDNA全体を捕捉する。シングルセルトランスクリプトームではショートリードはcDNA分子の末端に限定され、遺伝子レベルの情報しか提供できない。対照的に、ロングリードではシングルセルのアイソフォームレベルでの情報提供が可能。

## 融合転写産物の検出

ショートリードは容易に融合ジャンクションを同定できませんが、そのリード長が短いことから、個別の融合転写産物の構造を完全に解明することはできません。例えば、Iso-Seqを使用して実証した [Nattestad et al. \(2018\)](#) の例では、融合が2つ以上の遺伝子に渡る3-hop 融合遺伝子は、ショートリードでは2つの別のイベントとして誤認される可能性があります。

別の論文、[Dondi et al. \(2023\)](#) では、Kinnex連結法の初期バージョンが、卵巣がんサンプルのシングルセル全長RNAシーケンシングに適用されています。この論文のKinnexのデータでは、患者特異的な *IGF2BP2::TESPA1* 融合遺伝子を同定しています。これは以前、マッチしたショートリードデータ (図2) で3'融合パートナーのみを捕捉し、高 *TESPA1* 発現として誤って分類されていたものです。

[Qin et al. \(2024\)](#) の論文では、著者らは新しいロングリード融合検出ツールである [CTAT-LR-fusion](#) を開発し、Kinnexシングルセルの反復実験データで、SeraCare FusionStandard truth setにあるコントロール融合遺伝子16個全てを一貫して検出したことを示しました。しかしショートリードは一部の反復実験で9つのコントロール融合遺伝子を検出できませんでした。

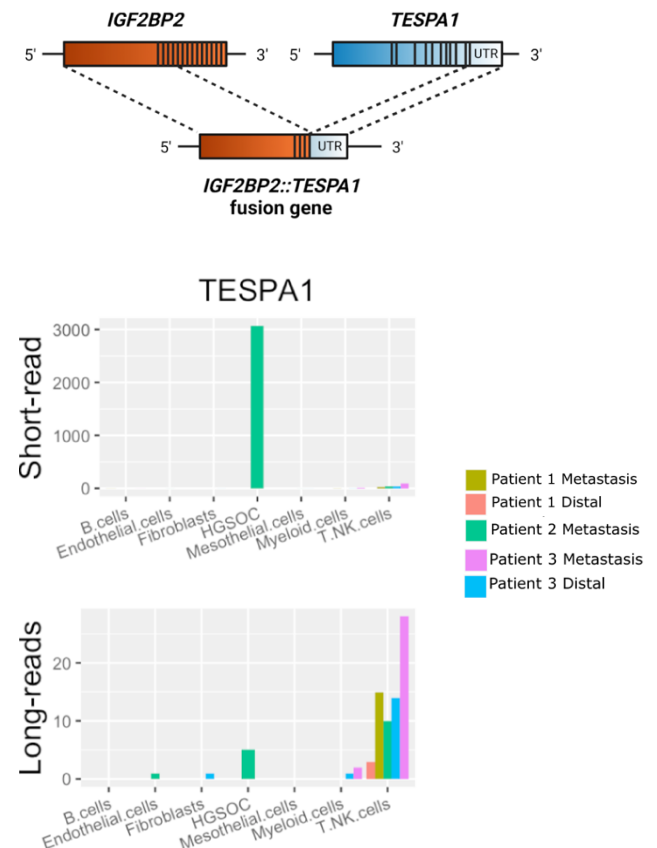


図2 ショートリードデータでは *TESPA1* の過剰発現として誤って分類されていた腫瘍特異的な融合遺伝子 *IGF2BP2::TESPA1* が、ロングリードシングルセルRNAシーケンシングで同定された。図はクリエイティブ・コモンズ・ライセンスに基づき、[Dondi et al. \(2023\)](#) より無改変で入手可能。

## トランスレショナルリサーチにおける新規アイソフォームの発見

スプライシングの調節不全は、多くのがんで広く見られる特徴ですが、異常スプライシングの一般的な様相についての理解は進んでいません。Iso-Seq法を用いた改良型 mRNA プロファイリングは、新たなバイオマーカーおよび治療ターゲットを同定できます ([Anczukow et al., 2024](#))。

Iso-Seqをバルクおよびシングルセルトランスクリプトームの両方で使用した最近の研究では、がんにも新規アイソフォームがどの程度豊富に存在するかを明らかにしています。[Veiga et al. \(2022\)](#) は、26の乳がん腫瘍サンプルをプロファイリングし、67%のアイソフォームが新規でオンコジーンに豊富にあり、多くの場合において予測されたタンパク質構造あるいは局在と異なっていることを発見しました。著者らはまた、生存率に関連する乳がんデータセット中に豊富な、35の選択的スプライシング (AS) イベントを発見しました。これら35のイベントのうち、21のイベント (60%) は、新規アイソフォームで、Iso-Seq データでは検出されましたが、GENCODE には含まれていませんでした。

[Wijeratne et al. \(2024\)](#) では、Kinnex連結法の初期バージョンを小児グリオーマサンプルの腫瘍および腫瘍隣接正常組織に適用しています。そしてショートリード単独では解明が難しかった、バイオマーカーとして役に立つ可能性のある、発現変動する新規アイソフォームを同定しました。

別の研究で、[Kohli et al. \(2017\)](#) では、去勢抵抗性前立腺がん (CRPC) におけるアンドロゲン受容体 (AR) アイソフォームの全体のエクソン構成を同定するため、ターゲット RNA シークエンシングを実施しました。AR バリエントの AR-V7 は AR ターゲット療法に対する前立腺がん抵抗性を促進することで知られています。ショートリード RNA-Seq を使用したこれまでの試みでは、その他の AR-V 種が AR-V7 と共発現し、抵抗性に寄与している可能性を示していました。しかし、これらの研究では共通エクソンの存在により、特定の共発現バリエントを解明することができませんでした。Iso-Seq の使用により、AR-V9 が AR-V7 と頻繁に共発現し、薬剤耐性上昇のバイオマーカーとなる可能性があることがわかりました。

[Huang et al. \(2021\)](#) では10の胃がん細胞株をIso-Seqでプロファイリングし、検出された>66%のアイソフォームが新規で、主に代替第1エクソン (AF) イベントにより生じることが発見されました。特に、*ARID1A* 遺伝子には2つの新規アイソフォームがあり、どちらもタンパク質コード配列を変える新規プロモーターを使用することがわかりました。臨床データセットと相関させることで、これらの新規アイソフォームは、胃がんにおける無増悪生存期間の不良と有意に関連することが示されたのに対し、既知プロモーターの使用時は有意差が見られませんでした (図3)。

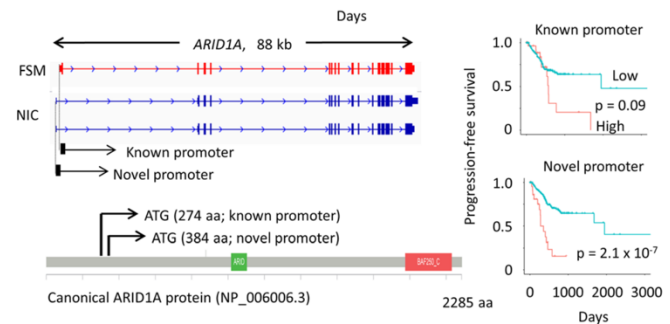


図3 Huang et al. (2021)の報告。新規プロモーター (NIC、青) を使用した新規アイソフォームは、胃がん生存率の低下と関連した。図はクリエイティブ・コモンズ・ライセンスに基づき、無改変で入手可能。

最後に、[Li et al. \(2024\)](#) では、シングルセルRNAシーケンシングを大腸がん (CRC) の研究に用い、腫瘍上皮細胞中に394の調節不全な転写産物構造を同定しました。この研究ではまた、腫瘍およびアイソフォーム特異的RNA編集イベントも同定しました。質量分析のサポートにより腫瘍特異的新規アイソフォームをフィルタリングした後、著者らはこれらの潜在的なネオエピトープをHLA結合親和性でランキングするアルゴリズムを開発しました。このアプローチを利用して、幅広いCRC患者に対して、がんワクチン候補となりうる、強力なHLA結合親和性を持つ、新規の4つの腫瘍特異的アイソフォームを発見しました。

### Long-read fusion gene detection tools

Several fusion gene detection tools have been developed specifically for long-read RNA data, including [CTAT-LR-fusion](#), [pbfusion](#), [PB\\_FLIP](#), and [JAFFAL](#).

## クローン進化の追跡

従来のショートリードシングルセルRNA-Seqでは、転写産物の5'または3'末端のみをカバーしていることから、体細胞腫瘍変異に基づく細胞の遺伝子型の決定能力が限られています。対照的に、シングルセルIso-Seqは複数のシングルセルプラットフォームからのcDNA全体をシーケンシングできます。

[Black et al. \(2024\)](#) では、*BTK* 耐性変異を持つ慢性リンパ性白血病 (CLL) サンプルに、10x Chromiumプラットフォームで調製したシングルセルcDNAに、Kinnex single-cell RNA kitを適用し、ジェノタイピング能力の劇的な改善を示しました。Illuminaのショートリードでは1%以上の細胞のバリエントの7.61%のみカバーしていましたが、Kinnexデータはこれらのバリエントの18.59%をカバーしました。これがサンプル中の、一つのサブクローン構造の改善に役立ち、これまで単一のサブクローンと誤認されていた2つの異なる変異サブクローンが示されました。

同様に、[Wedemeyer et al. \(2024\)](#) はKinnex single-cell RNA kitを既知の一塩基バリエント (*PIK3CA*:c.3139C>T) を持つ患者由来の線維芽細胞のシーケンシングに使用し、ロングリードでは細胞の15.3%でバリエントをカバーしたのと比較し、Illuminaのショートリードでは細胞のわずか1.2%のみしかカバーされていないことを示しました。さらに、変異細胞と野生型細胞を比較することで、一般に上皮間葉転換と関連する、異なる遺伝子発現とシグナル伝達経路を同定しました。

つまり、シングルセルRNAシーケンシングはシングルセルのバリエント検出とジェノタイピングを向上し、がん研究におけるクローン進化と体細胞モザイクの追跡の改善に役立ちます。

## 結論

がん研究において、バルクおよびシングルセルトランスクリプトミクスのロングリードRNAシーケンシング (Iso-Seq法) は、ショートリードではアクセスが容易ではない重要な洞察を明らかにできます。ここでハイライトした論文は新規アイソフォーム、融合転写産物、ネオエピトープの検出、およびシングルセルのジェノタイピングやクローン集団の追跡のために、大抵がより高いハイスループットを目的としてKinnexキットと組み合わせたバルクおよびシングルセルIso-Seq法を使用し、より完全ながんトランスクリプトームの理解をもたらしています。

表1 フルレンジスRNAシーケンシングを活用したがん研究論文の概要

Study	Samples	Method	Key findings
Nattestad et al. (2018)	SKBR3 cell line	WGS, Iso-Seq	SVs, 2- and 3-hop fusion genes
Dondi et al. (2023)	Ovarian cancer	Single-cell Iso-Seq with Kinnex*	Cell-type specific tumor isoforms, patient-specific fusion gene
Qin et al. (2024)	SeraCare FusionStandard	Single-cell Iso-Seq with Kinnex*	CTAT-LR-fusion long-read fusion detection tool
Black et al. (2024)	Chronic lymphocytic leukemia (CLL) samples with BTK resistance	Single-cell Iso-Seq with Kinnex*	Improved single cell genotyping and clonal evolution tracing
Wedemeyer et al. (2024)	Patient-derived PIK3CA-altered fibroblast	Targeted single-cell Iso-Seq with Kinnex*	Improved single cell genotyping
Veiga et al. (2022)	Breast cancer cell lines and tumor samples	Iso-Seq	Tumor-associated novel isoforms
Kohli et al. (2017)	Prostate cancer	Targeted Iso-Seq	Co-expression of AR-V9 with AR-V7
Huang et al. (2022)	Gastric cancer	Iso-Seq	Novel isoforms with alternative promoters associated with survival outcome
Li et al. (2024)	Colorectal cancer	Single-cell Iso-Seq	Tumor-specific isoforms, neoepitopes
Wijeratne et al. (2024)	HBR_SIRV, pediatric glioma sample	Iso-Seq with Kinnex*	Differentially expressed novel isoforms

\*Includes use of the original or modified versions of the MAS-Iso-Seq method, the MAS-Seq for 10x Single Cell 3' kit, and all Kinnex RNA kits.

研究用のみに使用できます。診断目的およびその手続き上の使用はできません。

© 2025 PacBio. All rights reserved. Research use only. Not for use in diagnostic procedures.

102-326-634 REV01 MAR2025



## 参考文献

- Al'Khafaji, A. M., et al. (2023). High-throughput RNA isoform sequencing using programmed cDNA concatenation. *Nature Biotechnology*, 1-5. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01815-7>
- Anczukow, O., et al. (2024). Steering research on mRNA splicing in cancer towards clinical translation. *Nature Reviews Cancer*, 24(12), 887-905. <https://doi.org/10.1038/s41568-024-00750-2>
- Black et al. (2024). Long-read single-cell RNA sequencing enables the study of cancer subclone-specific genotype and phenotype in chronic lymphocytic leukemia. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.03.15.585298>
- Dondi, A., Lischetti, U., et al. (2023). Detection of isoforms and genomic alterations by high-throughput full-length single-cell RNA sequencing in ovarian cancer. *Nature Communications*, 14(1), 7780. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-43387-9>
- Huang, K. K., et al. (2021). Long-read transcriptome sequencing reveals abundant promoter diversity in distinct molecular subtypes of gastric cancer. *Genome Biology*, 22, 1-24. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02261-x>
- Kohli, M., et al. (2017). Androgen receptor variant AR-V9 is coexpressed with AR-V7 in prostate cancer metastases and predicts abiraterone resistance. *Clinical Cancer Research*, 23(16), 4704-4715. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0017>
- Li, Z., Zhang, B., Chan, J. J., et al. (2024). An isoform-resolution transcriptomic atlas of colorectal cancer from long-read single-cell sequencing. *Cell Genomics*, 4(9). <https://doi.org/10.1016/j.xgen.2024.100641>
- Nattestad, M., et al. (2018). Complex rearrangements and oncogene amplifications revealed by long-read DNA and RNA sequencing of a breast cancer cell line. *Genome Research*, 28(8), 1126-1135. <https://doi.org/10.1101/gr.231100.117>
- Qin et al. (2024). CTAT-LR-fusion: accurate fusion transcript identification from long and short read isoform sequencing at bulk or single cell resolution. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.02.24.581862>

Veiga, D. F., Nesta, et al. (2022). A comprehensive long-read isoform analysis platform and sequencing resource for breast cancer. *Science Advances*, 8(3), eabg6711. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg6711>

Wedemeyer, M. A., et al. (2024). Defining the transcriptome of PIK3CA-altered cells in a human capillary malformation using single cell long-read sequencing. *Scientific Reports*, 14(1), 25440. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-72167-8>

Wijeratne, S., et al. (2024). Full-length isoform concatenation sequencing to resolve cancer transcriptome complexity. *BMC Genomics*, 25(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10021-x>

## リソース

Application note – [Kinnex full-length RNA kit for isoform sequencing](#)

Application note – [Kinnex single-cell RNA kit for single-cell isoform sequencing](#)

Webinar – [The Full-Length Transcriptomic Atlas of Human Colorectal Cancer from Single-Cell Isoform Sequencing](#) (speaker: Zhongxiao Li)

Webinar – [The RNA isoform landscape of cancer](#) (speaker: Olga Anczukow)

Webinar – [Detecting cancer-related RNA dysregulation with long-read sequencing](#) (speaker: Arthur Dondi)

Webinar – [Understanding clonal evolution using game theory and single-cell long-read isoform analysis](#) (speaker: Nathan Salomonis)

Research use only. Not for use in diagnostic procedures. © 2025 Pacific Biosciences of California, Inc. ("PacBio"). All rights reserved. Information in this document is subject to change without notice. PacBio assumes no responsibility for any errors or omissions in this document. Certain notices, terms, conditions and/or use restrictions may pertain to your use of PacBio products and/or third-party products. Refer to the applicable PacBio terms and conditions of sale and to the applicable license terms at [pacb.com/license](https://pacb.com/license). Pacific Biosciences, the PacBio logo, PacBio, Circulomics, Omniome, SMRT, SMRTbell, Iso-Seq, Sequel, Nanobind, SBB, Revio, Onso, Apton, Kinnex, PureTarget, SPRQ, and Vega are trademarks of PacBio.