

橋本 真一

金沢大学 医薬保健研究域医学系  
特任教授

## 1細胞遺伝子発現解析による組織微小環境情報の構築

### § 1. 研究実施体制

#### (1)「研究代表者」グループ

- ① 研究代表者:橋本 真一 (金沢大学・医薬保健研究域医学系、特任教授)
- ② 研究項目
  - ・包括的 1 細胞トランスクリプトーム解析システムの開発とがん組織構成細胞の解析

#### (2)「札幌医科大学」グループ

- ① 主たる共同研究者:鳥越 俊彦 (札幌医科大学・医学部、教授)
- ② 研究項目
  - ・がん組織・非がん部組織の病理組織学解析とシングルセル解析の統合による組織微小環境解明

#### (3)「東京大学」グループ

- ① 主たる共同研究者:鈴木 穰 (東京大学・大学院新領域創成科学研究科、教授)
- ② 研究項目
  - ・次世代シーケンサーによる測定と Fluidigm システムを用いたシングルセル cDNA ライブラリーの作成/測定

#### (4)「国立遺伝学研究所」グループ

- ① 主たる共同研究者:池尾 一穂 (国立遺伝学研究所・遺伝情報分析研究室、准教授)
- ② 研究項目
  - ・包括的 1 細胞トランスクリプトーム解析と組織多様性のバイオインフォマティクス

(5)「日立製作所」グループ

① 主たる共同研究者:久野 範人

(株式会社日立製作所 研究開発グループ基礎研究センター、主任研究員)

② 研究項目

・包括的 1 細胞トランスクリプトーム解析システムおよびデバイスの研究

## § 2. 研究実施の概要

組織の微小環境状態を理解する事は、診断や病態を改善する上で非常に重要である。その為には組織において位置情報を保持したまま、数千以上の 1 細胞の遺伝子発現情報を明らかにする必要がある。本研究では、1 細胞由来の mRNA にランダムにバーコードをつける技術を用いて、組織から数千～数万レベルの 1 細胞の位置情報を保持したまま遺伝子発現解析を行うことを目的としている。この微小組織片の自動採取システム開発によって得られた組織における細胞の位置情報により癌細胞等に対する創薬ターゲットの同定、診断基準の決定が可能となる。

具体的に右に示す解析方法で行う計画である。

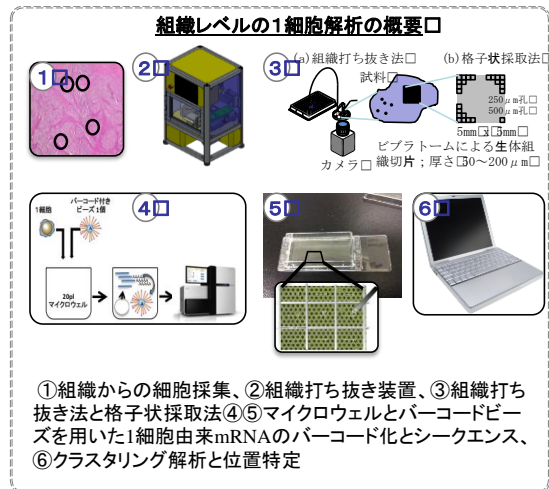
①生きたままの組織切片からビブラトームを用いて組織を単離、②,③細胞採取装置のニードル、または格子状細胞打ち抜き装置で打ち抜いた組織/細胞片をプレートに移し、続いて組織を酵素により消化し単一細胞化、④,⑤ 1 細胞にした細胞集団を 2 次バーコードで区画化された 1 細胞解析デバイス (マイクロプレート) に移す。⑤,⑥その後、包括的 1 細胞トランスクリプトーム解析を行う。

本年度の研究は以下の実施項目で行った。

### 1) 解析用マイクロウェルの改良および細胞採取装置の開発

ビブラトームにより、生きたままの組織切片を 50-500  $\mu\text{m}$  の厚さで薄切する基礎検討を行った。組織切片から直径 50-200  $\mu\text{m}$  のニードルで組織片を打ち抜くことにより採取する方法 (打ち抜き法) ③a に関しては、試作機の仕様を策定した後、設計及び試作②を行った。また、格子状デバイスにより、位置情報を保持し連続した組織片を採取する方法 (格子状分取法) ③b に関しては、格子状デバイスの仕様を検討し、金属素材からなる格子状デバイスを設計、試作した。一方、デバイスシステム化に関しては、解析デバイス (PDMS 製) 表面の親水性長期間保持に関して検討を行った。親水性長期間保持に向け、PDMS⑤への親水剤添加を検討した。その結果、少なくとも 60 日間は十分な親水性を保持できることを確認した。

### 2) がん細胞/組織の包括的 1 細胞の解析と各細胞のクラスタリング法による細胞の分類



新鮮ヒト腫瘍組織検体を酵素処理することによって単細胞に分離し、包括的 1 細胞遺伝子発現解析を実施した。1細胞分離による細胞生存率を、検体の酵素処理の濃度、時間に関して検討したところ 40-80%であり、検体ごとに条件の調整が必要と考えられた。

解析においては、現在までの手法とは異なり数千～数万の細胞の包括的な遺伝子発現プロフィールから各細胞の特徴をとらえ、細胞を同定する必要がある。本年度は、データの正規化と標準化の条件の検討を進め、1細胞トランスクリプトーム比較手法の検討を進めた。また、t-SNE、非階層的クラスタリング、機械学習の各手法に関して、その細胞分類の性能の評価を進め、テストデータの分類を行った。現在、一連の解析プロセスのパイプライン化を進めている。