

戦略プロポーザル

“ライブセルアトラス” 多次元解析で紐解く生命システムの ダイナミクス

～オミクス×イメージング×データ・モデリングによる
基盤技術の創成～

STRATEGIC PROPOSAL

Live Cell Atlas

Deciphering Dynamics of Biological Systems
via Multi-Dimensional Analysis

研究開発戦略センター(CRDS)は、国の科学技術イノベーション政策に関する調査、分析、提案を中立的な立場に立つて行う公的シンクタンクの一つで、文部科学省を主務省とする国立研究開発法人科学技術振興機構(JST)に属しています。

CRDS は、科学技術分野全体像の把握(俯瞰)、社会的期待の分析、国内外の動向調査や国際比較を踏まえて、さまざまな分野の専門家や政策立案者との対話を通じて、「戦略プロポーザル」を作成します。「戦略プロポーザル」は、今後国として重点的に取り組むべき研究開発の戦略や、科学技術イノベーション政策上の重要課題についての提案をまとめたものとして、政策立案者や関連研究者へ配布し、広く公表します。

公的な科学技術研究は、個々の研究領域の振興だけでなく、それらの統合によって社会的な期待に応えることが重要です。「戦略プロポーザル」が国の政策立案に活用され、科学技術イノベーションの実現や社会的な課題の解決に寄与することを期待しています。

さらに詳細は、下記ウェブサイトをご覧ください。
<http://www.jst.go.jp/crds/>

エグゼクティブサマリー

「ライブセルアトラス」とは、生体分子間あるいは細胞間の相互作用ネットワークの動態に注目した動的な細胞地図、あるいはその作成に係る取組みを指す。ライブセルアトラスの実現は、生命現象の一層の解明や創薬効率化等、基礎から応用まで幅広い活用が期待される。そこで本プロポーザルに基づく研究開発戦略では、このライブセルアトラスを究極の目的として、その実現に向けて必要となる科学技術的基盤の創成を目標とする。具体的には、ゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム・メタボローム等の各階層にある多様な細胞内分子の階層内さらには階層間に及ぶ相互作用ネットワークのダイナミクスと、そのダイナミクスに基づく組織・臓器等の多細胞における制御システムのより定量的な解明に資する技術の開発戦略について提言する。

生体を構成している多種多様な細胞の中には、核酸（DNA、RNA）、タンパク質、代謝産物（有機酸、アミノ酸、脂質、糖など）などの分子からなるいわゆるセントラルドグマに基づく階層構造がある。そしてそれぞれの階層内あるいは階層間の分子間相互作用ネットワークが生体内外からの刺激等に反応し、ダイナミックに変化することにより、生命機能を発揮している。つまり、生命現象は、細胞という微小な空間内に分布する生体分子の相互作用により構成される細胞内の分子間ネットワーク（インタラクトーム）と、臓器等を構成する細胞間のコミュニケーション（細胞間相互作用ネットワーク）、及びそれらの時間的変動（ダイナミクス）として捉えることができる。

しかしながら、こうした観点から生体制御システムの定量的な解明をより一層深めるにあたっては、乗り越えるべき技術的障壁がある。それは、これらのネットワークを構成している各要素（分子および細胞）の時空間的位置と定量値（mRNA やタンパク質分子等の数量）の経時的変化の解析である。すなわち、“4次元データ（位置×時間）×多数要素（生体分子・細胞等）の定量値（絶対量）”という“多次元”データを解析しなければならず、またその測定技術が必須となる。

以前は、このような定量的な多次元データの取得は困難であった。しかし生体分子の定量値の測定では次世代シーケンサーを用いることにより1細胞レベルで mRNA の発現を絶対定量的に解析する“トランスクリプトーム解析”が可能になっており、また生体分子の時空間的な分布では超解像顕微鏡の開発により 100 nm の空間分解能でミリ秒レベルでタンパク質等のダイナミクスが計測できるようになってきた。こうした最先端の機器・技術を駆使することで、上述の多次元的なデータを定量的に計測・取得・解析することは今や夢ではなくなってきた。

もう一つの技術的障壁は数理モデル化である。生成される大量の多次元データを処理し、その中から生体分子間の相互作用ネットワークを定量的に記述する数理モデルを見出すための技術開発が必要となる。

以上を踏まえ、本戦略の下で推進する研究開発では、オミクスとイメージングの組み合わせにより時間発展的に変動する組織・細胞・生体分子間相互作用ネットワークを計測し、ネットワークを構成する複数要素の計測値（多次元データ）を AI や機械学習の活用により解析し、さらにこれらネットワークのダイナミクスを数理科学により定量的に可視化、数理モデル化する。こうした、“オミクス×イメージング×データ・モデリング”を実現するための基盤技術開発課題を以下に示す。

- 1) 組織等細胞集団において1細胞単位で生体分子等を網羅・定量的に解析する技術の開発
 - ・組織等からの細胞単離分別技術

- ・ RNA 等の生体分子の発現状態を維持し、かつ位置情報を保持したまま解析する技術
- ・ プロテオーム、メタボロームの 1 細胞単位での定量解析技術

2) 細胞および生体分子の時空間分布を高分解能で測定する技術の開発

- ・ mRNA の空間分布計測技術 (in situ sequence 技術) のハイスループット化
- ・ 多数のタンパク質、代謝産物の時空間分布解析可能なプローブ技術
- ・ 1 細胞レベルの分解能で組織等の細胞集団全体をイメージングできる広視野高分解能イメージング技術
- ・ 発生等の計測に適した培養下長時間イメージング技術・自動フォーカス技術・細胞追跡技術

3) 生体分子・細胞の動的ネットワークの定量理解に向けた数理モデルの創出

- ・ 多量のおミクス・イメージングデータを保存・活用する総合的データベース
- ・ オミクスデータとイメージングデータの統合解析技術
- ・ 生体分子間・細胞間相互作用ネットワークを定量的に可視化する数理モデリング

ライブセルアトラスに関連する動向として、米国では、ヒトの全身細胞の 1 細胞レベルでの遺伝子発現マップを作成し、各臓器を構成する細胞の種類、状態、系統を分類し、カタログ化・マッピングする目的で“Human Cell Atlas (HCA)”という壮大な国際プロジェクトを推進するなど、近年のおミクス技術を背景に、網羅定量的に生体情報を取得しようとしている（日本からは理化学研究所が本プロジェクトに参画）。また欧州では次期 Future and Emerging Technologies Flagship として“Life Time initiative”を 2019 年 3 月から開始している。このイニシアチブでは、「ゲノムが細胞内でどのように機能しているかを理解することや、細胞がどのようにして組織を構成し、また病気の進行時にどのようにダイナミックに変化するかを理解することが必要である」との考えに基づき、1 細胞のゲノミクスとイメージングを統合した 1 細胞レベルの病理学の実現や、電子健康記録 (Electronic Health Record) と 1 細胞レベルのマルチオミクス等のビッグデータを統合解析することによる病気の予測モデルの構築等に取り組むとしている。

このような各国動向に対して、本プロポーザルで提案する戦略は日本に強みのあるイメージング関連技術の中核とした我が国独自の研究開発戦略となっている。これを推進することで、ライフサイエンス研究における世界的なプレゼンスを高めることが期待できる。また生命現象の制御システムの解明及びモデル化は、生命を理解するという学術的側面のみならず、創薬の効率化等への貢献も期待できる。例えば近年の創薬において、臨床研究で失敗する原因の大半は有効性不足と安全性の問題（重篤な副作用や毒性の発生）である。ヒューマンサイエンスの観点から生命現象のネットワークを定量的に可視化し、各病態の理解を進めることができれば、創薬ターゲットとする薬剤による影響の定量的なシミュレーションが可能になり、有効性や副作用の予測につながる。

なおこれらの研究課題を推進するにあたっては、イメージング、オミクス、数理科学、医学・生物学等の様々な関連分野の研究者が連携、融合する研究領域を形成することが重要になる。そのためには“アンダーワンループ型”の研究推進体制を構築することが一つの方策と考えられる。これによりユーザーとなる医学・生物学研究者のニーズを素早くイメージング・オミクス研究者に伝えることで、効率的に最先端技術が開発できる。また、この体制下に企業の技術者が参加することで、迅速な最先端機器の市場への投入が期待できる。

Executive Summary

What is Live Cell Atlas?

The Live Cell Atlas (LCA) will be made up of comprehensive four-dimensional reference map of cells, with a focus on dynamics of interactive networks between biomolecules and cells, including cell-cell communications. It will contribute as a basis for wide range of life science research, from basics to applied, such as understanding the fundamentals of biological events and acceleration of drug discovery. This proposal covers the strategies to build the scientific and technological foundations that are required to establish the LCA. The LCA project focuses on the dynamics of the interaction networks of wide range of biomolecules that can be found in a cell, however, the dynamics shall be analysed not only in a single cell manner, but also in multicellular systems. The dynamics will be captured in a spatial, temporal, and quantitative manner, contemplating to build up mathematical models that simulate the behaviour of each molecule in the biological system. Deciphering the regulatory system of life and the effort to build up mathematical models that could simulate the biological event with following the uncovered regulatory system would strongly contribute for applied biology area, such as streamlining drug discovery process, as well as to deepen our understanding of rules of life as basic research. For example, it is thought that in the recent drug discovery scene, the major bottlenecks of the clinical test are the insufficient efficacy and safety issues (severe side effects and toxicity). Quantitative visualisation of biological process from the aspect of human science could provide better understanding of clinical condition, which enables to simulate the effects of the candidate drug on the biological target. Such work flow in the drug discovery process would facilitate more streamlined and effective prediction of efficacy and the side effects of the candidate drugs.

Background and present state

Any biological events consist of the dynamic changes of intra-cellular interactome, where the networks of the various types of biomolecules that interact each other within a minute space of a cell, and cell-cell interaction networks. The biomolecules can be categorised into several levels following the canonical central dogma in molecular biology: like nucleic acids (DNA & RNA), proteins, and metabolites. The interaction between these biomolecules occur in both intra- and inter-cellular manner. Qualitative and static information, such as the list of biomolecules involved in certain interaction networks and the nature of interactions, has been relatively well collected; however, the dynamics of interactome and cell-cell interaction have not been well described. This is partially because of that all the conventional analytical methods have been invasive and brought critical damage to the living system; the molecular consequences in living cells have been left almost untouched. In other words, knowledge regarding truly “living” cell has been surprisingly limited, as majority of data have been actually collected from dead cells.

Challenges to be conquered

Here comes the “Live” Cell Atlas. In order to capture the dynamics of interactome and cell-cell communication to decipher the living status of cells and multicellular system, the changes in location and its quantity of the biomolecules and cells should be acquired in a time course manner in living cell(s). The acquired data for LCA have at least four-dimensional information: location (three dimensional), time, and quantity. As each element of LCA would contain such four-dimensional information, whole LCA would have a structure of super multidimensional data. It used to be very challenging to obtain such multidimensional data at single cell level, however, recent dramatic advances in next generation sequencing technology allowed us to quantify mRNA at single cell level. Moreover, the invention of super-resolution microscopy has opened a new door for the quantification of protein dynamics at the spatiotemporal resolution of 100 nm and millisecond order. Now that such state of art analytical instruments are progressively advancing, to obtain above described super-multidimensional data in (a) living cell(s) is becoming more and more feasible research strategy. Development of new technologies to obtain multidimensional quantitative data of cellular dynamics, however, is still a big issue. In addition, in order to integrate such multidimensional big data in a sensible way, mathematical models have to be build up to simulate the state of living cells.

List of proposed research targets

- 1) To develop new technologies for the comprehensive and quantitative analysis of biomolecules in multi-cellular system at single cell level.
 - ✓ Technologies involved in the separation of cells following certain categorisation.
 - ✓ Technologies that allow to analyse the location and expression status of biomolecules (such as RNAs) in intact living cells.
 - ✓ Proteome and metabolomes at single cell level
- 2) To develop technologies that enable to capture spatiotemporal distribution of biomolecules/cells with high resolution.
 - ✓ To develop high-throughput *in situ* sequencing
 - ✓ Multi-channel probe technologies that facilitate the spatiotemporal analysis of various proteins metabolites in a simultaneous manner.
 - ✓ Imaging technologies that allow to observe whole multi-cellular system at cellular level resolution (wide view field and high resolution).
 - ✓ Development and improvement of imaging technologies required for long time live imaging, such as observation of developmental process, for example, auto focusing and cell tracking.

- 3) Building up mathematical models that facilitate the understanding of dynamics of biomolecules and cells, in a quantitative manner.
 - ✓ To build up integrative database to store and utilise the various omics and imaging big data.
 - ✓ To develop integrative analytical technologies which facilitate to overarching omics and imaging data.
 - ✓ To build up mathematical models to visualise the interaction networks of biomolecules and cells in a quantitative manner.

The LCA would bring together wide variety of experts, such as imaging, omics, mathematical modelling, medical science, and biological science in an integrative research environment, where ideally, all the experts could work together under one roof. Such an integrative research centre would promote speedy and effective technology development, as new technological requirements arisen from medical/biological scientists could smoothly be passed to imaging/omics experts. Participation and cooperation of analytical instruments industry to such an integrative research centre would accelerate the development of cutting edge new analytical instruments to worldwide market.

Above described integrative, comprehensive and quantitative analysis of living cells with high resolution is now a kind of worldwide trend. For example, a US led cell biology project, Human Cell Atlas (HCA) aims to catalogue all the human cells via gene expression data; the type, status, and lineage of all the human cells in all the tissues and organs will be stated on a reference map. status and of to build up a reference map of human cells. “Life time initiative” led by EU Horizon 2020 (started March 2019), is another example of this direction. The European initiative focuses on human cells during disease and will pursue to understand how genomes function within cells, and how cells form tissues and dynamically remodel their activities when tissues progress towards disease. This initiative also has an emphasis on the integration of genomics and imaging aiming to deliver single cell level pathology.

Comparing to these oversea big projects, our proposal has a unique aspect which highlights on imaging related technologies where researchers in Japan retain world class reputations. By driving this project forward, Japan would strengthen its presence in bioscience research at worldwide level.

目 次

エグゼクティブサマリー

Executive Summary

1. 研究開発の内容	1
2. 研究開発を実施する意義	4
2-1. 現状認識および問題点	4
2-2. 社会・経済的効果	7
2-3. 科学技術上の効果	8
3. 具体的な研究開発課題	10
3-1. 組織等細胞集団において1細胞単位で生体分子等を網羅・定量的 に解析する技術の開発	11
3-2. 細胞および生体分子の時空間分布を高分解能で測定する技術の開発	11
3-3. 生体分子・細胞の動的ネットワークの定量理解に向けた数理モデルの創出	12
4. 研究開発の推進方法および時間軸	13
付録1. 検討の経緯	17
付録2. 国内外の状況	22
付録3. 専門用語	25

1. 研究開発の内容

生体は核酸（DNA、RNA）、タンパク質、代謝産物（有機酸、アミノ酸、脂質、糖など）などの分子からなるいわゆるセントラルドグマに基づく階層構造とそれぞれの階層内あるいは階層間の分子間相互作用ネットワークが生体内外からの刺激等に反応し、ダイナミックに変化することにより、生命機能を発揮している。つまり、生命現象は生体を構成する単位である細胞という微小な空間内に分布している生体分子の相互作用により構成される分子間ネットワーク（インタラクトーム）および細胞間相互作用のネットワークとその時間的変動（ダイナミクス）という側面から捉えることができる。ヒトを構成する約37兆個の細胞も、それぞれの組織・器官において、細胞内外での様々な階層における分子間相互作用を通して機能している。

このように、生命現象とは細胞という微小な空間内に分布している多数の生体分子により構成されている分子間あるいは細胞間の相互作用ネットワークの構造とその時間的変動（ダイナミクス）であるという側面で捉えると、生命現象を理解するためには、これら細胞内の多数の分子の時空間分布というダイナミクスを可視化すること、すなわち多数の生体分子の位置およびその定量値と時間的変動、“多数分子×4次元データ（xyz×t）”という多次元データを解析することが必要となる。

従来のネットワーク研究では、その定量値は細胞集団の平均値と試験管内での均一系での分子間反応の計測を基にネットワークを推定しているため、定性的な理解にとどまることが多かった。しかし、生命現象の予測や制御を考えた場合には定量的な理解が欠かせない。それは、図1-1に示すように、ネットワークの定性的な記述では、例えば遺伝子G1の発現→タンパク質P1の生成→G2→P2→代謝産物M1からM2への代謝の促進、という流れはわかるが、M1からM2への反応の触媒としてどの程度の量のP2が生成されるかはわからないため、M2の生成量を推定することができないからである。定量的にネットワークを記述することができれば、G1の発現量に応じて、P1、G2、P2の発現量を解析でき、M2の生成量の定量値を推定することが可能になる。

本プロポーザルでは、このようなネットワークの相互作用による生体制御システムの定量的な記述・理解を目的として、そのために必要な基盤技術の創成を目標としている。具体的にはゲノムトランスクリプトームープロテオームーメタボロームという多階層におよぶ細胞内分子ネットワークとそのネットワークに基づく細胞間の制御機構の解明に資する技術の開発を提言する。

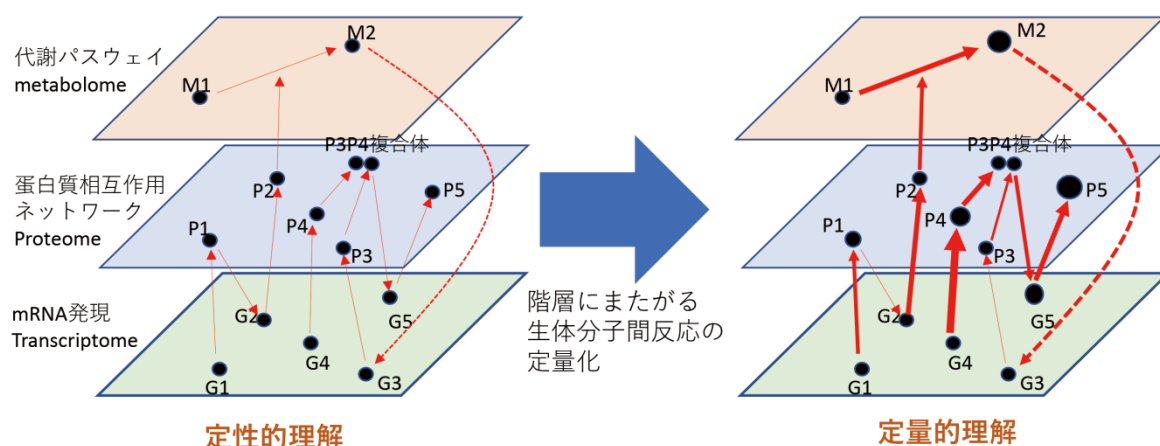


図1-1. ネットワークの定性的な理解から定量的な理解へ

近年のシーケンシング技術の進化や、各種オミクス技術、イメージング技術および AI 等の計算科学の進展に伴い、生命をシステムとして理解し、その動態を予測可能な数理モデルとして確立を目指すことは不可能ではない目標となった。これを達成するためには、時空間情報を伴い、かつ定量的な相互作用（ネットワーク）の解明が必須であり、各種オミクス技術とイメージング技術を統合し、さらに適切な情報解析を行ったうえで数理的な検討を行うことが不可欠である。定量的理解のために取り組むべき研究課題を以下に示す。

1) 組織等細胞集団において 1 細胞単位で生体分子等を定量的に解析する技術の開発

単一細胞のトランスクリプトーム解析は実用段階に入ったと言える。そこでトランスクリプトーム解析では組織に存在する細胞を内部の RNA の発現状態を維持したままで 1 細胞ずつ単離する技術や組織内の細胞位置情報を保持する技術が重要である。多階層におよぶ生体分子間の相互作用解析のためには mRNA のみならずタンパク質、代謝産物の 1 細胞レベルでの定量解析が重要である。そのため、プロテオームやメタボロームの高感度化も重要な課題である。

2) 細胞および生体分子の時空間分布を高分解能で測定する技術の開発

組織内での mRNA 発現解析を効率良く行うためには、組織切片上の細胞で mRNA 発現解析を行う *in situ sequence* 技術の効率化が必須であり、そのためには AI や機械学習による自動化が必要である。また、階層横断的に解析するためには、多数のタンパク質、代謝物質の時空間分布を計測するためのプローブ技術が必要である。

生体分子間の相互作用の動態を解析するためには、時空間情報が必須であり、1 細胞レベルでの空間分解能で観察できる広視野高分解能イメージング技術が必要となる。さらには発生、分化現象を解析するためには細胞、組織を生かしたまま長時間計測しなければならない。生きたままの細胞を長時間計測する場合、培養条件下で経時的に計測することが望ましい。細胞内の分子間相互作用と細胞間相互作用の同時計測のためには、多数の細胞を同時に長時間計測するための細胞追跡技術や自動フォーカス技術が必要である。

3) 生体分子・細胞の動的ネットワークの定量理解に向けた数理モデルの創出

実験の自動化等による多量のオミクスデータやイメージング等による多量の時空間分布データ等、莫大な多次元データが生成されるため、これらの大規模データを保存・活用する総合的データベースが必要になる。画像データについては、これまで、各研究者によって注目分子が解析されていたため、研究者による恣意的、主観的に活用にとどまっていた。オミクスデータとの統合解析のためにはこれらの画像データを AI、機械学習等によって処理するデータ駆動型解析技術の開発が必要である。これらのデータを統合的に解析、数理モデル化することで、分子間、細胞間のネットワークの定量的な理解につなげることができる。

これまでの生命科学の研究において、イメージング技術は工学系研究者、イメージングに使用される蛍光プローブ等は化学系もしくは生物物理系研究者、オミクス技術は生物系研究者、数理モデリングは数理系の研究者が主体となり、それぞれの研究領域が独立に発展してきた。しかし、上述のような研究課題を実行し、ネットワーク動態を定量的に理解し、数理モデル化をするためには、研究開発の最初から数理モデル化を念頭に置いたデータ取得をすることが肝要である。そ

のため、必然的に、従来型の個別研究から、物理、工学、科学、生命医科学、数理科学の研究者が連携し、融合型の研究開発を行わなければならない。このような連携・融合型の研究を効率的に推進することにより、イメージングやオミクス技術の開発において、モデル化を最終目標とした場合のイメージングやオミクス技術に対する新たなニーズに基づいた技術開発が推進され、さらには新規に開発された最先端技術を用いることで、生命システムのダイナミクスの定量的な理解を深めることが可能となる。

本研究開発では、生物・医学と工学、計算機科学、数理科学、物理学、化学等の研究者が同一の生命現象について、連携、融合した研究を行うことが重要である。同一の生命現象としては、単一細胞におけるリン酸化等のシグナル伝達ネットワークの定量解析とそのモデル化や、細胞集団としてのオルガノイドを用いた分化と生体分子ネットワーク研究を同一の細胞種を用いて研究することなどが考えられる。ここで、肝要なことは、研究の最初からモデル化を視野にいたれた研究開発を行うことである。

対象とする生命現象のネットワークを解析するために必要な定量性や時間分解能、空間分解能を設定した上で技術開発を行うことで効率的な研究開発を行うことができる（図 1-2）。

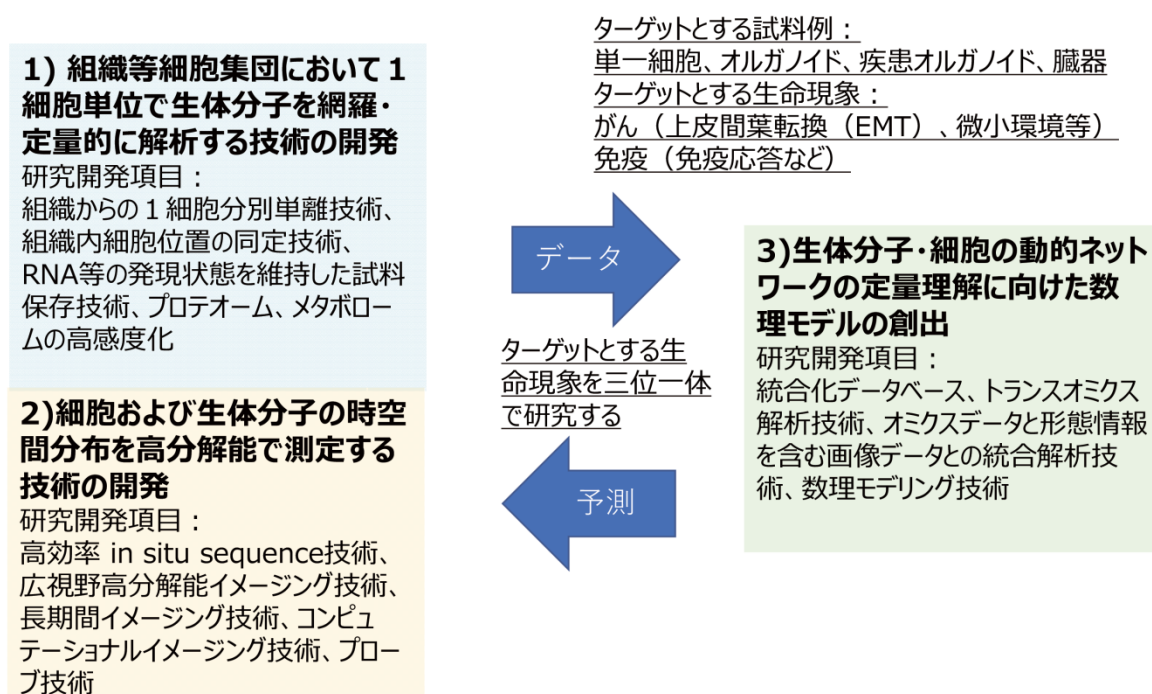


図 1-2. 研究課題とその関係性

2. 研究開発を実施する意義

2-1. 現状認識および問題点

1) ライフサイエンスにおける現状認識と問題点

1950年代からはじまった分子生物学により、様々な生命機能の仕組みが DNA、RNA、タンパク質などの生体分子群の複雑な相互作用ネットワークの動態にあることがわかってきた。つまり生命システムは、外部環境と情報交換を行いつつ、非可逆的に時間発展する組織・細胞・生体分子間の相互作用ネットワークシステムとして捉えることができる。そこで、生命をこのようなシステムとして理解するシステム生物学という概念が 2000 年前後に提唱された。生命をシステムとして理解するためには、生体を構成する基本単位である細胞内に存在する DNA、RNA、タンパク質等の生体分子の分子間相互作用を可視化しなければならない。しかし 2000 年当時の解析技術では細胞毎の分子情報を解析することは難しかった。たとえば、当時のシーケンサーは、電気泳動法によるものであり、1 細胞レベルでのゲノム配列解析は難しく、また、mRNA の網羅的発現解析であるトランスクリプトーム解析は DNA チップ等により行われており、やはり 1 細胞レベルの分解能による解析は困難であった。そのため、これらの解析は多数の細胞を集めて行っており、各測定値は多数細胞の平均値となっていた。また、ネットワーク解析に用いる酵素反応等の生体分子間反応の計測は、生体外の試験管 (in vitro) を用いた実験における計測値を用いていた。しかし、実際の細胞内の生体分子の濃度は試験管内では再現できないレベルの高濃度であることが知られており (分子夾雑)、in vitro で計測した反応定数や速度定数等の値を用いても、細胞内の状態を反映することはできない。そのため、生体分子の相互作用ネットワークの理解は定性的なものにとどまり、外部刺激による細胞や組織の反応を定量的に予測、あるいは制御することは難しかった。

しかし、近年の以下のような精緻・精鋭化した技術の進展により、これらの生体分子や細胞間の相互作用ネットワークの動態を定量的に解析することが可能になりつつある。

① オミクス技術の進展

次世代シーケンサーを利用した 1 細胞オミクス解析技術の進展が目覚ましい。mRNA の網羅的解析 (トランスクリプトーム解析) では、少ない RNA を増幅する方法や、1 細胞を分離する手法の違い等により、様々な手法が開発されている¹⁾。1 細胞中に存在する RNA は微量なため、RNA の配列を解読するためには増幅を行う必要があるが、配列により増幅量に差が生じ、それがバイアスとなり絶対定量性に欠ける面があった。しかし、近年 DNA を用いた分子バーコード法を応用することで、1 細胞から mRNA の量と種類を絶対定量的に計測する方法が開発された²⁾。トランスクリプトーム解析以外にも、DNA 変異、シトシン改変、高次染色体コンフォメーション、ヒストン改変等の単 1 細胞の遺伝およびエピゲノム特性を研究するための複数の技術が開発されている。

また蛋白質の網羅的解析であるプロテオーム解析でも iMPAQT 法 (in vitro proteome-assisted MRM for Protein Absolute Quantification) のような高感度で定量的な解析手法の研究開発が進展している。代謝物の網羅的解析方法であるメタボローム解析においても高感度化の研究開発が進んでいるなど³⁾、様々な階層における網羅的解析技術の開発が精力的に進められている。

② イメージング技術の進展

生体分子の時空間情報を取得する技術としてのイメージング技術も近年急速に進歩している。例えば、超解像顕微鏡では、通常の光学顕微鏡では超えられない分解能の壁である回折限界を超える数 10 nm の分解能で生体分子の位置情報が取得できる技術である。STED (Stimulated Emission Depletion) や PALM (Photo Activation Localization Microscopy) といった超解像計測法と、PALM の元になった 1 分子計測法 (ローカリゼーション法) は 2014 年度のノーベル化学賞を受賞している。STED や PALM は高い空間分解能がある反面、時間分解能に欠けるが、超解像顕微鏡法の 1 種である構造化照明顕微鏡 Structured Illumination Microscopy (SIM) では、空間分解能で 100 nm、時間分解能で 100 ミリ秒の時間分解能を達成している。また、超解像顕微鏡による多色イメージング法も開発されており、細胞内のタンパク質等を数 10 nm~100 nm の分解能で計測することが可能である⁴⁾。

さらに、イメージングをベースとした 1 細胞レベルのトランスクリプトミクス技術 (in situ sequencing) が開発されている。組織切片上での細胞の空間分布を保持したまま、数百から数千におよぶ mRNA の発現量を 1 細胞レベルの分解能で計測する方法として MERFISH⁵⁾ や seqFISH⁶⁾ といった方法が開発されている。またラマン分光を用いることで代謝物をイメージングする技術や、ラマン散乱光の波長特性を活かすことで従来の蛍光イメージングを超える 24 色のイメージングを行う技術が開発されている。

試料処理により従来はイメージングできなかった深部をイメージングする方法も開発されている。代表的な方法としては、組織透明化技術を挙げることができる。透明化技術は、固定標本を尿素やアミノアルコールなどをさまざまに組成した溶剤で脳組織内の水を置換し、溶剤と脳組織の屈折率を近づけて組織内散乱を低下させ、さらに脂質を溶剤によって洗い去るなどのプロセスで組織を透明化し、組織内の蛍光分子を光学顕微鏡で高速に 3 次元観察する手法である。Scale、CLARITY、SeeDB、CUBIC などの方法が開発され、現在も改良が続いている。この方法を用いて脳組織全体を透明化し、神経回路や神経活動を全脳スケールかつ 1 細胞レベルで捉えて解析する技術が実現している。この透明化技術と光をシート状に照射し、その蛍光像を取得する光シート顕微鏡により、マウスの全脳細胞の可視化が行われている。光シート顕微鏡を用いてマウス初期胚の細胞分裂や細胞の移動の実時間イメージング (ライブイメージング) が実現している。

③ 生物学研究における AI 技術の活用と数理モデリング

細胞内の分子間ネットワーク動態を解析するためには経時的に多数の細胞内生体分子の動態データを取得し解析することが必要になる。従来このような研究は、熟練した研究者が顕微鏡を用いて取得した動画から細胞を同定し、細胞内の目的とする生体分子 (多くの場合は蛍光等で標識された分子) を追跡することで研究していたため、効率が悪く得られるデータ数が限られていた。しかし、AI による画像解析技術の進展により細胞の同定や分子の同定がコンピュータで可能になった。また AI を活用したロボット化により測定の実自動化が可能になり、顕微鏡の操作から薬剤添加、細胞観察、画像解析に至る一連の計測・解析過程を自動化するシステムが開発されている⁷⁾。AI や機械学習により、分子間の相互作用を推定する萌芽的な研究も行われている。たとえば、創薬においてはタンパク質 (薬物標的分子) と薬 (分子) の未知の相関を機械学習により予測する研究が進展している。また、ホヤの遺伝子ネッ

トワークから分化を決定する鍵となる遺伝子を見つける新たな数理モデルの構築がなされている。

このような AI 技術やロボット技術の進展により、生体分子ネットワークの動態解析におけるビッグデータの取得や数理モデル化が可能な時代になりつつある。

上述のようにオミクスやイメージング技術等のライフサイエンス関連技術の進展は著しい。一方でこれらの技術は個別に深化・進展したものであり、これら技術を統合し、解析することを目指したものではない。しかしながら、本提言のように生体の制御システムの定量的理解を目指すためには、各種オミクス技術とイメージング技術を統合し、さらに適切な情報解析を行ったうえで数理科学的な検討を行うことが不可欠であり、このような統合解析に適したイメージング技術やオミクス技術の開発が必要となる。

2) 社会的ニーズ

近年新薬の開発コストが増大しており、1 剤の開発コストは 25 億ドルかかるといわれている。開発コストを低減するためには、臨床研究段階での中止を少なくすることが有効である。以前は薬物動態により臨床研究が中止されることも多かったが、近年は薬物動態のシミュレーションが発達しており、薬物動態で臨床開発を中止することは少なくなってきた。近年の臨床研究で失敗する原因の 59%は有効性不足であり、22%は安全性（重篤な副作用および毒性の発生）であるとの報告がされており⁸⁾、有効性や副作用等の効果的な予測は創薬における課題である。

さらには、薬剤に対して効果のある患者、効果のない患者、重篤な副作用の患者、でない患者がいることも薬剤開発を難しくしている。臨床試験を実施する際に、効果のある患者、重篤な副作用の出ない患者を層別化し、実施することで、創薬コストの低減を図ることができる。さらには創薬標的の枯渇も近年の問題点であり、標的分子と疾病の関係を推定する方法が求められている。

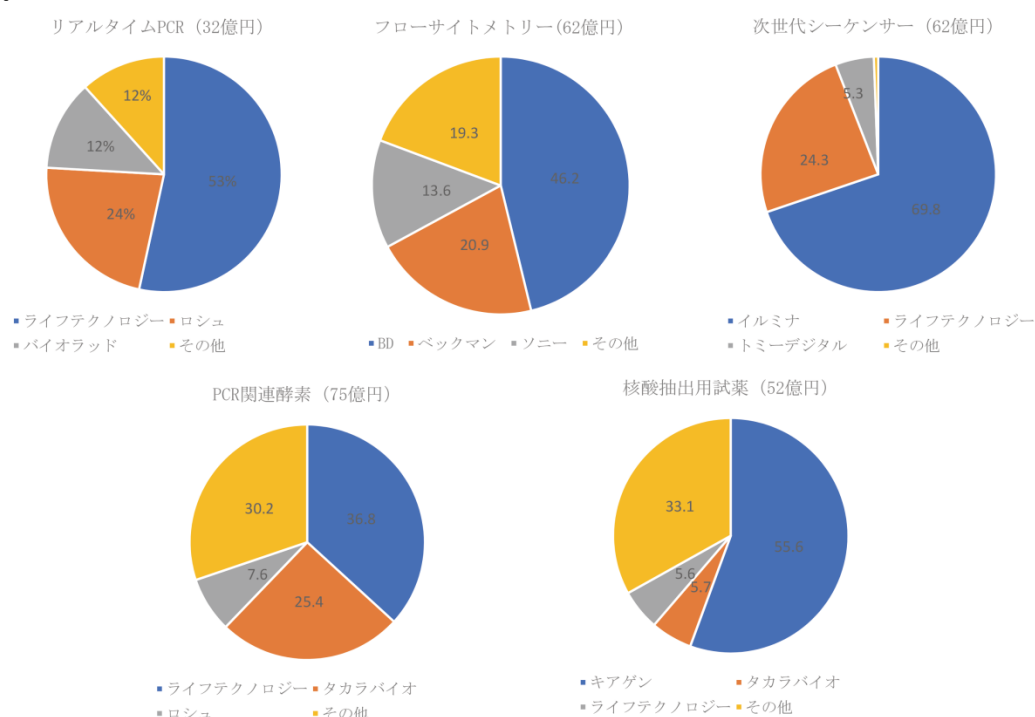


図 2-1. 日本国内で販売されている主な機器・試薬のマーケットシェア

(株式会社アール アンド ディ 科学機器年鑑 2015 をもとに作成)

また、我が国にはライフサイエンス関連機器の国際競争力にも問題がある。ライフサイエンス関連機器で国際競争力のあるものは、光学顕微鏡、電子顕微鏡等のイメージング関連機器であり、近年のライフサイエンス研究において大きな比重を占める次世代シーケンサーでは我が国発の機器は存在せず、最先端のライフサイエンス機器開発では世界に遅れをとっている。図 2-1 は 2014 年に国内で販売されたライフサイエンス関連機器、試薬のマーケットシェアの例であるが、装置ではフローサイトメトリーでソニーが約 14%のシェアをもっているが、リアルタイム PCR はライフテクノロジー社で 50%を超えるシェアであり、次世代シーケンサーはイルミナ社が 70%のシェアである等、我が国の機器はほとんど流通していない。試薬においても、PCR 関連酵素でタカラバイオが 25%のシェアを持っているもの、それ以外は海外メーカーに占められているなど、国内のライフサイエンス研究に投じた資金の多くは海外に流出していることになる。

2-2. 社会・経済的効果

1) ネットワークの定量的可視化による創薬研究の進展

前述のように新薬の開発コストが増大している。近年の臨床研究の中止の原因のほとんどは有効性不足と重篤な副作用や毒性の発生である。

創薬において、例えばあるタンパク質間の相互作用を遮断する薬の投与を考えた場合、定性的な記述であれば、その遮断がネットワークに対してどのような変化をもたらすか予測することはできない。一方でネットワークが、定量的に記述されモデル化されていれば、シミュレーションが可能になり、タンパク質間相互作用の遮断による効果や副作用の予測が可能になる。

疾患を健常状態のネットワークの破綻による疾患状態ネットワークへの遷移と捉えれば、疾患状態から健常状態に遷移させるためにネットワーク上のどの要素を制御すれば、構造を変化させることができるか、シミュレーションが可能となり、創薬ターゲットの候補を選定することが可能になることが想定される。

2) バイオマーカーの創出

本研究を推進することにより、病態や薬効、副作用に関連している生体分子を抽出することができれば、当該分子を新規のバイオマーカーとして利用することができる。創薬において、臨床試験を行う段階で患者層別化ができていれば、創薬コストの低減につながり、実際の治療方針の決定に役立つ。

さらには、AI や機械学習を用いて膨大で多様なオミクス情報と、各オミクスデータに紐付いたイメージング画像のデータセットを解析することで、イメージングデータからオミクスデータの推定が可能になることが考えられる。がんでは細胞の不均一性が知られており、イメージングデータから、遺伝子変異等を推定できれば、診断の迅速化や低コスト化につながる。

3) 疾患の理解の進展と治療方法の開発

本研究開発を通じて獲得した技術、方法論をもとにして、がん、難病等の疾患研究を行うことで、疾患の機序解明が進むことが想定される。例えば、がんにおいて分子標的薬は著効を示す患者がいる一方で効果のない患者群が存在し、著効した場合でも、耐性化が起り、効果がなくなること多い。耐性化のメカニズムに関しては、がんの不均一性に起因するのか、治療後に耐性

化が進むのか等のメカニズムがわかっていない。多数の細胞の平均像から1細胞レベルでの生体分子の動態を解析することで、疾患の理解が進展し、機序に基づく治療方法の開発につながるものが想定される。

4) 新規ライフサイエンス関連機器の創出

本研究開発を推進することにより、生体制御システムの定量的理解に適したイメージングおよびオミクス技術等の開発が期待される。これまで個別に進展してきたイメージング技術やオミクス技術から統合解析に適したイメージング技術等が開発されることで、新規ライフサイエンス機器の創出につながる。特に我が国に強みのあるイメージング関連機器を中核とした技術開発を行うことで、世界をリードする機器の創出が期待できる。

2-3. 科学技術上の効果

1) 生体分子間、細胞間の定量的相互作用ネットワーク解析による生命現象の理解

分子生物学研究に代表されるように、これまでの生物学研究は個々の分子に焦点を当てた要素還元的手法であった。しかし、近年のオミクス技術の進展により生体における生体分子を定量的に解析することが可能になってきた。これまでの分子生物学による個々の分子の機能と、オミクス技術による網羅的な定量データと、イメージングを用いた生体分子や細胞の時空間分布情報とを統合的に解析することで、1細胞単位での生体分子の相互作用ネットワークが定量的に可視化され、そのネットワークの定量的な解析が可能となる。例えば、発生・分化・再生という生命現象は生体内外からの刺激により時間発展的、非可逆的に細胞内の生体分子の振る舞いが制御されることにより細胞の増殖・移動・形態変化が起こり、さらには細胞間の相互作用により、適切な位置に適切な機能を持った細胞が配置され臓器等に分化している。これらの相互作用ネットワークを構成している生体分子や細胞の個々の要素の振る舞いやネットワークの経時的変化を定量的に記述し理解することで、発生・分化・再生等の機序の解明につながる。

2) イメージング・オミクス技術の進展

個別に発展、進展してきたイメージング技術、オミクス技術、バイオインフォマティクス、数理科学を融合した研究開発を進めることで融合研究に適したイメージング技術、オミクス技術の進展が期待できる。特に、イメージングデータを融合するためには、イメージングデータの定量性の向上が課題となる。AI時代において、イメージングデータをコンピュータサイエンスとして解析することは必須であり、本研究開発を進めることで、コンピュータサイエンスに適した定量的なイメージング技術が進展する。

3) 融合研究による新たな数理科学

本提言における研究開発では、生物・医学と工学、計算機科学、数理科学、物理学、化学等の融合研究になる。これまで接点の少なかった、数理系、物理、化学、工学系研究者と生物・医学研究者が統合的に研究を行うことで、たとえば工学的な発想からの生命現象のネットワーク解析に適した定量的解析技術や、これまでの数理モデリング理論を応用した、もしくは新たな数理モデリング方法の開発等が期待できる。

上述のように、生体の制御システムを数理モデル化し定量的に可視化することで、発生・分化、細胞系譜（発生過程における細胞の分裂過程の可視化）、分子間あるいは細胞間ネットワークのダイナミクスとしての細胞動態等の生命現象の理解や、がん等の疾患機序の理解の深化などの学術的側面に加えて、将来的には新規イメージング機器やオミクス機器の創出あるいは、創薬研究の進展や患者層別化とそれに伴うバイオマーカーの創出等につながる（図 2-2）。

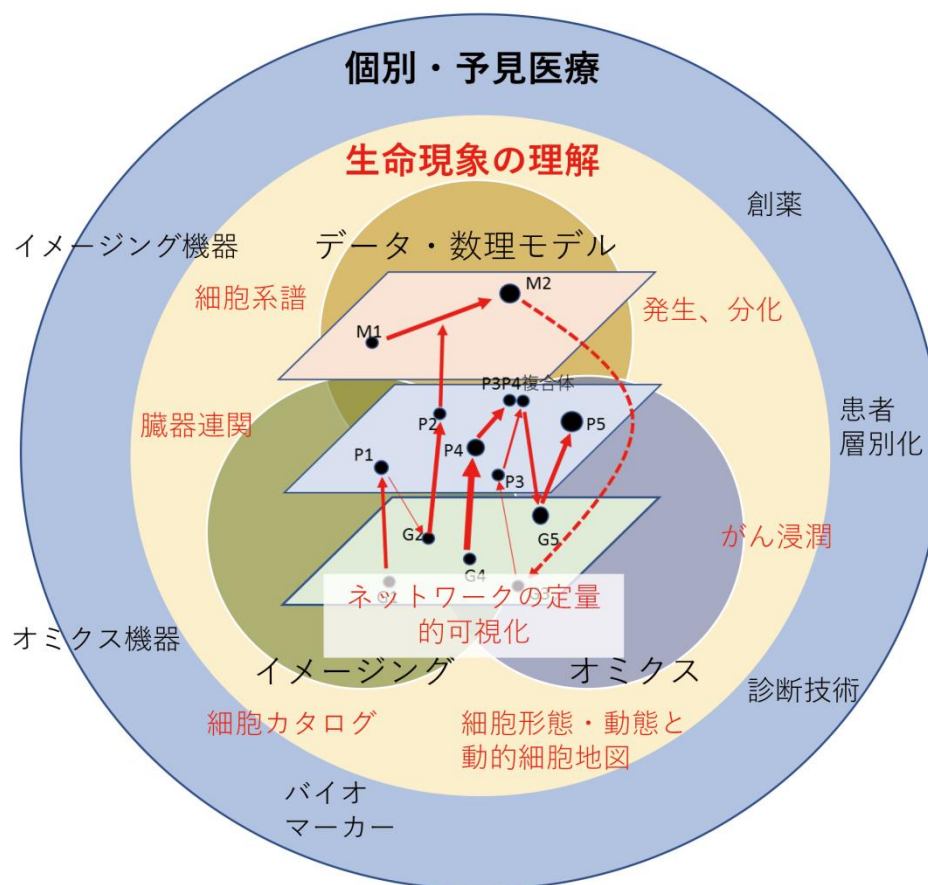


図 2-2. 本戦略プロポージアルの概念

生体分子間の相互作用ネットワークの定量的な可視化は、生命現象の解明を進めると同時に、創薬研究の進展や患者層別化への応用、それらに必要なバイオマーカーの創出等を通じて個別・予見医療への貢献にも繋がる。

3. 具体的な研究開発課題

従来のライフサイエンス研究は特定の遺伝子や分子に着目し、その機能を深掘りすることが主な研究スタイルであった。一方で、生命システムは外部環境と情報交換を行いつつ、非可逆的に時間発展する組織・細胞・生体分子間等のネットワークシステムとして機能することから、時空間的に変動する動的システムとして生命を理解することはライフサイエンス研究の究極の目標の1つである。しかしながら、これまでは計測や解析手法が限られており、その理解は、定性的であり静的な理解にとどまっていた。近年のシーケンシング技術の進化や、各種オミクス技術、イメージング技術および AI 等の計算機科学の進展に伴い、生命をシステムとして理解し、その動態を予測できる数理モデルの確立を目指すことは不可能ではない目標となった。これを達成するためには、時空間情報を伴い、かつ定量的な相互作用ネットワークの解明が必須である。前述のように、オミクス解析では、網羅・絶対定量的に生体分子情報を取得できるものの、細胞を採取し、破壊して解析するため、生体分子の細胞内の局在情報や、詳細な時間情報が犠牲になっている。その反対に、イメージング技術は分子や細胞の時空間分布情報が得られる一方で、相対定量的であり、またオミクス解析に比べると網羅性に欠けるという短所がある(図 3-1)。そこで、各種オミクス技術とイメージング技術を相互補完的に統合し、時間発展的に変動する組織・細胞・生体分子相互作用ネットワークシステムを、多次元情報(多数生体分子×4次元情報)として、機械学習、AIにより統合解析し、生命システムネットワークのダイナミクスを数理科学により定量的に可視化、数理モデル化する。

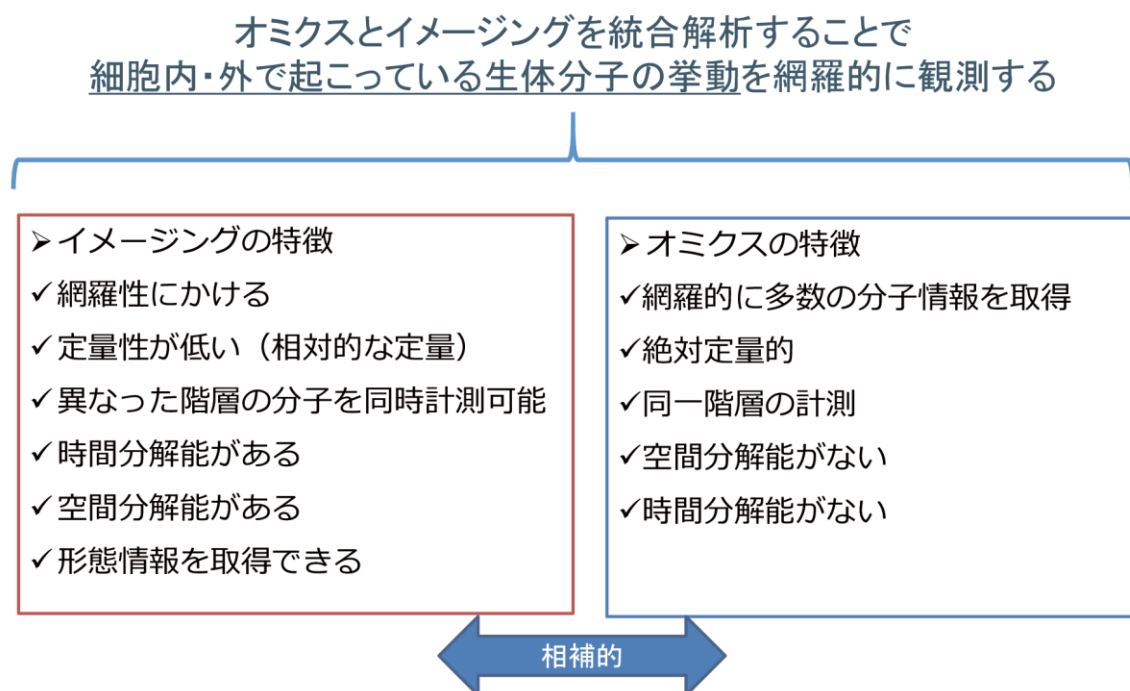


図 3-1. イメージング技術とオミクス技術の長所と短所

相補的に解析することで定量的な時空間分布情報を取得できる。

3-1. 組織等細胞集団において1細胞単位で生体分子等を網羅・定量的に解析する技術の開発

研究項目：組織からの1細胞分別単離技術、組織内細胞位置の同定技術、RNA等の発現状態を維持した試料保存技術、プロテオーム、メタボロームの高感度化、AI、自動化による多数データの取得

生体を構成する臓器等の組織は多種多様な細胞により構成されており、細胞が互いに連携し、細胞間相互作用により組織が機能している。細胞間相互作用はリガンド-受容体タンパク質の相互作用により行われているが、1細胞単位でのmRNAの発現解析(トランスクリプトーム解析)が可能になったことで、これらの相互作用を網羅的に調べるのが可能になりつつある。また、マウス脂肪組織における間葉系幹細胞の不均一性の1細胞レベルでの解析が行われるなど、1細胞レベルでの発現解析は実用段階に入ったと言える。トランスクリプトーム解析において今後重要な研究課題は、組織からの細胞単離分別技術である。組織での細胞間相互作用を研究するためには、組織に存在する細胞を内部のRNAの発現状態を維持したまま1細胞ずつ単離して解析しなければならない。また細胞を単離する場合、組織内での位置情報を保持していなくてはならず、組織内の細胞位置の同定技術も必要である。

また細胞はたとえクローン化された株化細胞であっても、外部刺激に対する応答性は同一ではないことが知られている。そのため1細胞単位でかつ多数細胞をその位置や形態情報を保持しながらデータを取得することが必要であり、正確に効率良くデータを取得するためには、AIを用いた画像認識技術と実験の自動化が必要である。生体は核酸(DNA、RNA)、タンパク質、代謝産物(有機酸、アミノ酸、脂質、糖など)などの分子からなる、いわゆるセントラルドグマに基づく階層構造とそれぞれの階層、および階層間のネットワークであることから、タンパク質や代謝物質の1細胞レベルでの解析が必要である。そのため、プロテオームやメタボロームの高感度化、1細胞レベルでの取得技術の開発も重要な課題である。

3-2. 細胞および生体分子の時空間分布を高分解能で測定する技術の開発

研究項目：高効率高分解能 in situ sequence 技術、広視野高分解能イメージング技術、長時間イメージング技術、プローブ技術

次世代シーケンサーや質量分析を利用したオミクス解析では、組織全体にわたるオミクス解析を行うことは難しい。そのため、組織切片上の細胞でmRNA発現解析を行う in situ sequence 技術が開発されている。この方法は、いわゆる in situ hybridization を連続的に行うことで実現している。臓器全体にわたって、高効率に in situ sequence を行うためには、ロボット化等により実験の自動化とAIによる自動解析が必須になる。

階層横断的に解析するためには、タンパク質や代謝物の時空間分布情報が必要である。タンパク質では蛍光タンパク質等による発現解析が可能であり、代謝物質ではラマン散乱を用いた計測が行われているが、現状では網羅性に欠けており、さらなるプローブ技術の開発が必要である。組織内の細胞における生体分子の空間分布情報を得るためには、いわゆる Google マップのように組織全体を観察しながら、1細胞レベルでの空間分解能で観察できる広視野高分解能イメージング技術も必要である。

また、経時的な変化を計測するためには、細胞、組織を生かしたまま長時間計測しなければならない

らない。生きたままの細胞を長時間計測する場合、培養条件下で経時的に計測することが望ましい。細胞内の分子間相互作用と細胞間相互作用の同時計測のためには、多数の細胞を同時に長時間計測するための細胞追跡技術や自動フォーカス技術が必要である。

これらの解析に必要な時空間分解能はターゲットとする生命現象により適切に設定することが肝要である。信号伝達系では、ミリ秒レベルの時間分解能、代謝系であれば、分のレベル、分化等の細胞レベルであれば、時間から日のオーダーとなる。また、空間分解能では、信号伝達系においては細胞膜から転写因子の核内移行やクロマチンの構造変化まで解析するためには 100 nm から μm レベルの分解能が必要となる。一方で細胞間相互作用であれば細胞の大きさの空間分解能を持ちながら、広域（数 10 mm）を数時間から数日計測する技術開発が必要である。

3-3. 生体分子・細胞の動的ネットワークの定量理解に向けた数理モデルの創出

研究項目：統合化データベース、トランスオミクス解析技術、オミクスデータと形態情報を含む画像データとの統合解析技術、数理モデリング技術

実験の自動化等による多量のオミクスデータやイメージング等による多量の時空間分布データ等、莫大な多次元データが生成されるため、これらの大規模データを保存・活用する総合的データベースが必要になる。画像データについては、これまで、各研究者により注目分子が解析されていたため、研究者による恣意的、主観的に活用にとどまっていた。オミクスデータとの統合解析のためにはこれらの画像データを AI、機械学習によって処理するデータ駆動型解析技術の開発が必要である。これらのデータを統合的に解析、数理モデル化することで、分子間、細胞間のネットワークの定量的な理解につなげることができる。たとえば、信号伝達機構のネットワークの定量的な理解は生命現象を理解する上で重要な課題である。がん等の増殖、悪性化はこれらの信号伝達機構の異常として捉えることができるからである。これらの信号伝達は細胞膜上の受容体から、タンパク質のリン酸化が順次伝達して、核内に伝達されていく。これらの過程は化学反応であり、生体分子の細胞質から核内への移行という、量的にも空間的にもダイナミクスを伴うものでもある。課題 3-1、課題 3-2 により取得されるデータを統合的に時空間ダイナミクスデータとして解析し、連立微分方程式等による数理モデルとすることで、外部刺激等に対する細胞の応答性を定量的に記述することが可能となる。また、生体分子ネットワークの経時的な変化と細胞等の形態変化を統合的に解析し、モデル化することも重要な課題である。発生、分化、再生、がんの浸潤などは細胞あるいは細胞集団の形態変化を伴う。これらの現象は、細胞内外からの刺激により、生体分子ネットワークを通じてタンパク質や代謝物質の発現が制御されていることにより起こっている。形態変化と生体分子ネットワークの経時的変動を統合的に解析することにより、発生、再生、分化等の形態変化と細胞内外からの刺激との因果関係の理解が可能となる。

4. 研究開発の推進方法および時間軸

【研究開発の推進方法】

研究開発の大きな流れは図 4-1 のようになると考えられる。これまで述べてきたように、オミクス解析技術では、網羅、定量的な生体分子の計測が可能になるが、細胞を破碎して情報を取得するために、時間的な分解能や空間的な分解能が犠牲になっている。一方でイメージング技術では、網羅性・定量性には欠けるが、時間、空間分解能は高い。そこで、オミクス解析により網羅的情報を取得し、その情報をもとにバイオインフォマティクス等によりネットワークに関連している鍵となる分子あるいは分子群（モジュール）を抽出し、更にイメージングによりその鍵分子の時空間情報を取得する。この鍵分子等の時空間におよぶ詳細な多次元情報をもとに、数理科学により、ネットワークを定量的に数理モデル化する。モデルの正しさを実証するためには、モデル上に存在する生体分子に何らかの摂動を与え、モデルから予測した分子の挙動とオミクス解析やイメージングによる計測によるデータを照合し、評価するというサイクルを回すことにより、ネットワークの定量的理解を目指す。また、数理モデル化を行い、モデルの検証を行うためには、多数の実験を行うことが想定される。このサイクルを効率的に回すためには、各技術において、AI、機械学習、ロボット技術によるハイスループット化が必要である。

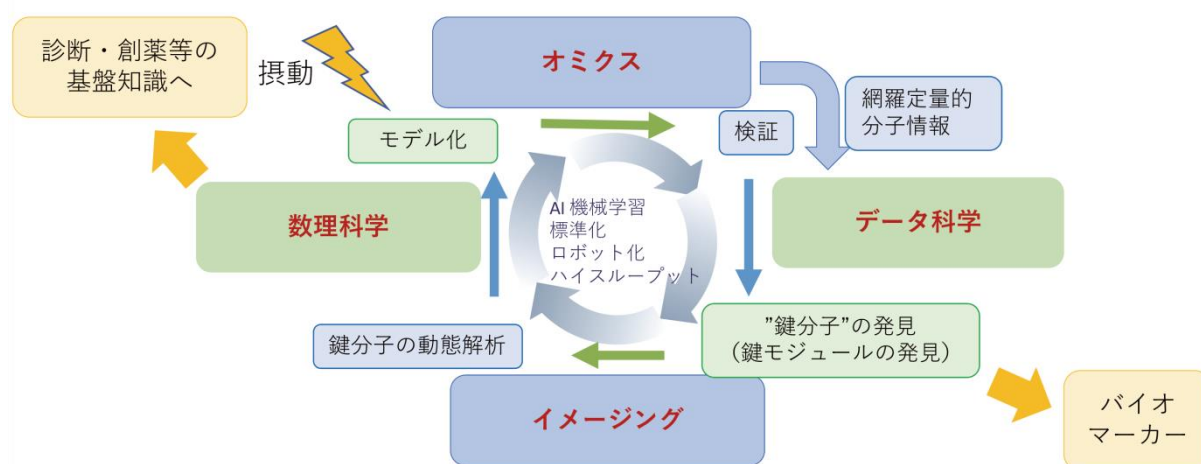


図 4-1. 研究開発のフロー

なお本研究開発では、生物・医学と工学、計算機科学、数理科学、物理学、化学等の研究者が連携、融合した研究を推進しなければならない。そのためには、同一の生命現象に対して、各研究者が連携して研究を推進することが肝要である。しかしながら、これまでの生命科学の研究において、イメージング技術は工学系・生物物理系研究者、イメージングに使用される蛍光プローブ等は化学系もしくは生物物理系研究者、オミクス技術は生物系研究者、数理モデリングは数理系の研究者が主体となり、それぞれの研究領域が独立に発展してきた。しかし、生体分子等の時空間にわたる多次元で定量的な情報を取得するためには、イメージングとオミクスを融合解析する技術が必要となる。さらに、これら多次元情報は数理モデルに適したものでなければならず、研究開発の最初から数理モデル化を念頭に置いて推進することが肝要である。そのため、必然的に、従来型の個別研究から、連携、融合型の研究開発への移行が必要となる。

また、図 4-1 のような研究開発フローを実現するための体制作りという観点では、世界に伍してこのような融合型の研究を強力に推進するために、多様な分野の研究者や技術者がアンダーワンループの下に集まる研究開発プラットフォームの構築が望ましい（図 4-2）。この研究開発プラットフォームにおいて、医学、工学、薬学、分子生物学、物理学、化学、ナノサイエンス、情報科学等の諸関連分野の研究者が、分野を超えて連携し研究開発を行う学際的な研究開発を行う。ここでは、本研究開発に関わる最先端の研究機器により上述のサイクルを回す研究者と、イメージングやオミクス等の新規なシステムを開発する研究者がアンダーワンループ型で研究開発を行う。このようなプラットフォーム上で研究開発を行うことで、イメージング技術やオミクス技術に対する新たなニーズに基づいた技術開発が推進され、さらには新規に開発された最先端技術を用いることで、生命システムの定量的な理解を深めることができるだろう。新規技術の開発現場に研究者からのニーズが速やかにフィードバックされる体制を整備することが、実用性の高い技術開発を効率的に進めるために必須である。またこのようなプラットフォームには企業の技術開発者も参画することが望ましい。そうすることで、ユーザーニーズに基づいた最先端な技術を素早く機器開発につなげることができ、国内のライフサイエンス機器の活性化につながる。

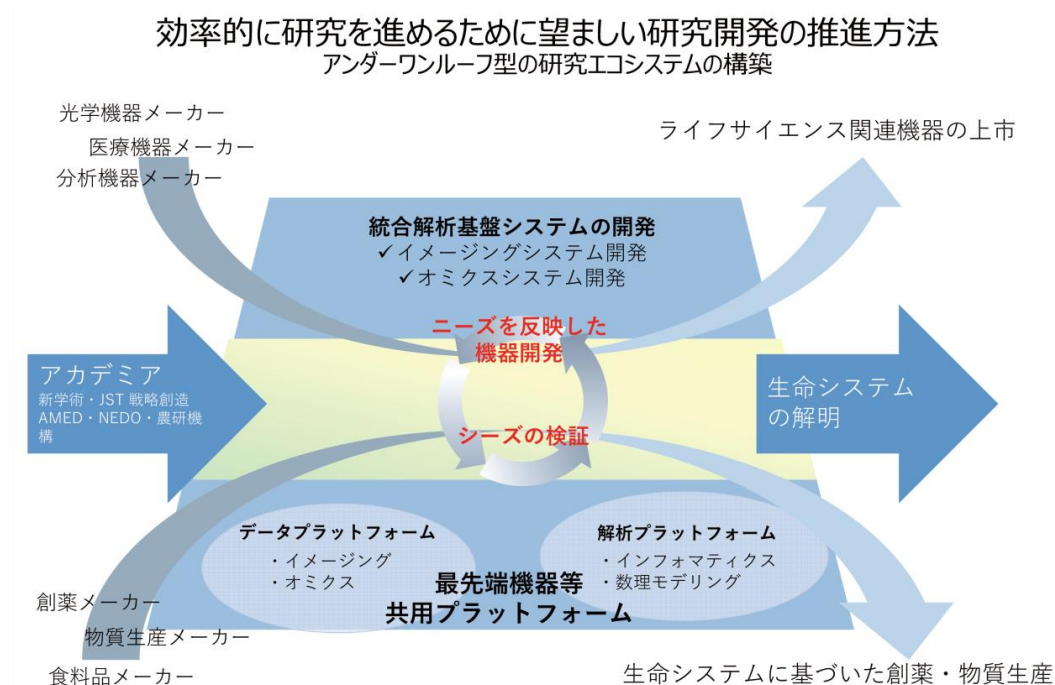


図 4-2. アンダーワンループ型の研究開発プラットフォーム

欧米では、このようなアンダーワンループ型の研究が進んでいる。米国の Broad Institute は「特定の分野で働く個々の研究室の伝統的な学術・行動様式は、生物医学の新たな課題に対応するようには設計されておらず、ヒトゲノムと生物システムの包括的な見方を得るために、高度に統合された方法で作業しなければならない」という理念のもとに、マサチューセッツ工科大学 (MIT) とハーバード大学が共同でアンダーワンループ型の研究所として 2004 年に設立された研究所である。また、2006 年にはハワード・ヒューズ医学研究所がジャネリアファームリサーチキャンパスを設立している。英国も同様の考えの下、2016 年にアンダーワンループ型でオープンサイエンスを実践する英国最大の生物医学研究機関であるフランシス・クリック研究所を設立している。

しかしながら、異分野の研究者を集めただけでは、連携した研究を推進することは難しいであろう。異分野の研究者が真に連携した研究を進めるためには連携研究を推進する施策を講ずる必要がある。その施策として、研究課題で言及したようにこれらの研究者が、“同一の生命現象をモデル化をする”という方向性を合わせた研究を行うこと、が肝要である。このような施策を行うことで、異分野間での対話、さらには異分野間の共通言語が生まれ、異分野連携・融合の土壌となる。このような土壌を創成した上でアンダーワンループ型の研究体制を構築することでアンダーワンループ型研究の効果を発揮することが可能になる。

【時間軸】

生体制御システムの定量的理解と予測可能な数理モデル化は生命科学における究極の目標のひとつであり、本来は長期にわたって研究開発を推進すべきものであるが、ここではその一部を強力に推進するにあたっての時間軸設定案を示す。その本質は、細胞内からより高度・複雑な細胞間のネットワークへ、という段階的な発展を目指す時間軸設定である（図 4-3）。

研究開発の第1段階（～5年）では、すでに1細胞レベルのオミクス解析が可能になっているゲノム、トランスクリプトームによるオミクスデータとイメージング技術を融合解析する技術開発を行い、株化細胞等の単一細胞において外部刺激に応答する生体分子ネットワークのダイナミクスを解析する技術開発を行う。また、プロテオーム解析、メタボローム解析の高感度化を進めるとともに、これらのデータから鍵分子をデータ科学、バイオインフォマティクスにより発見する技術を開発し、イメージングによる多階層での鍵分子の時空間動態解析技術を開発し、単一細胞におけるネットワークの定量的数理モデル化を推進する。

中期的（～15年）には、プロテオーム、メタボロームの高感度化やオルガノイド等の細胞集団からの単一細胞取得技術の開発、細胞集団中の生体分子イメージング技術を融合し、細胞集団における細胞内のネットワークダイナミクスと細胞間相互作用等の制御システム動態の可視化やその情報に基づく数理モデル構築を行う。長期的にはこれらの技術・方法論を組み合わせることで、制御システムの異常としての疾患の理解と理解に基づく治療方法の創出が可能となるだろう。

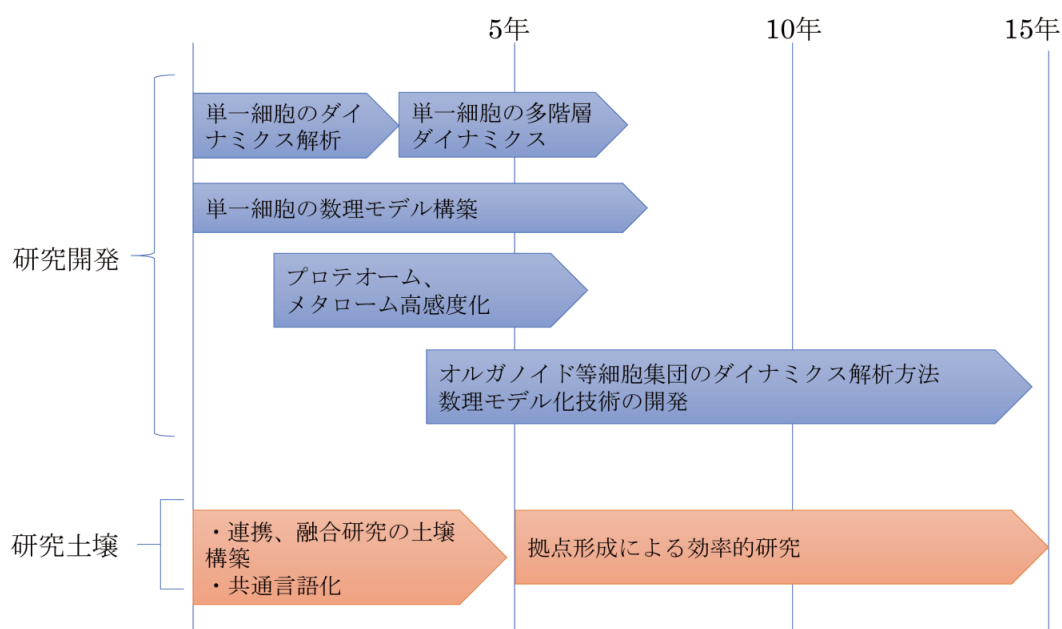


図 4-3. 研究開発の時間軸

【参考文献】

- 1) Hwang B, Lee JH, Bang D., Exp Mol Med., 50(8):96 (2018)
- 2) Sasagawa Y, Danno H, Takada H, et al., , Genome Biol. 19(1):29 (2018)
- 3) Hirayama A, Abe H, Yamaguchi N, et al., ELECTROPHORESIS , 39 (11), 1382-1389, (2018)
- 4) Kiuchi T, Higuchi M, Takamura A, et al., Nat Methods., 12(8):743-6.(2015)
- 5) Wang G, Moffitt JR, Zhuang X., Sci Rep., 8(1):4847. (2018)
- 6) Shah S, Lubeck E, Zhou W, Cai, et al., Neuron. 92(2):342-357 (2016)
- 7) Yasui M, Hiroshima M, Kozuka J, et al., Nat Commun., 9(1):3061. (2018)
- 8) Arrowsmith J, Miller P., Nat Rev Drug Discov. 2013 12(8):569. (2013)
- 9) Regev A et.al., Elife. Dec 5;6. pii: e27041.(2017)
- 10) 科学技術振興機構 研究開発戦略センター「(研究開発の俯瞰報告書) ライフサイエンス・臨床医学分野 (2017 年)」CRDS-FY2016-FR-06
- 11) 科学技術振興機構 研究開発戦略センター「(戦略プロポーザル) システムバイオロジーの推進 - 生命システムの動作機構の解明」CRDS-FY2006-SP-01
- 12) 江口至洋 細胞のシステム生物学 (共立出版 2008)
- 13) 久保田浩行 細胞をシステムとして理解する (共立出版 2018)
- 14) 荒木啓充, Daniel Hurley, et al., 生物物理, 51(4), 182-185, (2011)

付録1. 検討の経緯

JST 研究開発戦略センター (CRDS) では、平成 30 年度に戦略プロポーザルを作成すべきテーマの候補を CRDS 戦略スコープ 2018 策定委員会において指定し、平成 30 年 5 月に CRDS 内に検討チームを発足させた。その後、検討チームにおいて提言作成へ向けた調査・分析・検討を重ねた。

戦略プロポーザルの作成にあたっては、国内外の研究開発動向や技術水準を明らかにし、提言の方向性等を検討するために俯瞰ワークショップを開催し、44 名の有識者へのインタビュー、意見交換を実施し、意見交換会、未来戦略ワークショップの開催により仮説の検証、研究課題の抽出を行った。

■ 俯瞰ワークショップ

“多階層オミクスとイメージング；イメージングを基盤とした統合的生体機能の解明にむけて”

開催日時：平成 30 年 2 月 4 日（日） 13：00～18：00

場所：JST 東京本部別館 2F セミナー室

[プログラム]

13:00 - 13:05

開会挨拶：永井 良三（JST-CRDS 上席フェロー）

13:05 - 13:15

趣旨説明：堀 邦夫（JST-CRDS フェロー）

13:15 - 16:45

話題提供：

Session I 染色イメージング

“1 細胞オミックスのための生細胞イメージング技術”

岡田 康志（東京大学大学院理学系研究科/理化学研究所生命システム研究センター）

“生体システムの統合的理解、予測に必要な解析技術「トランススケールイメージング」”

永井 健治（大阪大学産業科学研究所 生体分子機能科学研究分野）

“多階層オミックス解析へ向けた電子顕微鏡画像のビッグデータ化”

片岡 洋佑（理化学研究所分子イメージング研究センター）

Session II 無染色イメージング

“ラマン散乱を用いた分子分析イメージング”

藤田 克昌（大阪大学大学院工学研究科）

“走査電子誘電率顕微鏡による液中生物試料のその場観察”

小椋 俊彦（産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門）

“イメージング質量分析で見えないものを「みる」”

新聞 秀一（大阪大学工学部生命先端工学専攻）

“Radiomics を包括する概念としての“Imageomics”：MRI を中心に”

青木 伊知男（量子科学技術研究開発機構 QST ラボ・量子 MRI 研究グループ/放射線総合医学研究所）

“走査プローブ顕微鏡による生体分子イメージングの現状と展望”

内橋 貴之（名古屋大学大学院理学研究科物質理学専攻）

SessionIII 解析

“生命現象の数量化イメージングからモデリングへ”

横田 秀夫（理化学研究所光量子工学研究領域 画像情報処理研究チーム）

“ダイナミクスに潜む制御を明かすーオミクスによる予測とイメージングによる検証ー”

岡田 真理子（大阪大学蛋白質研究所 細胞システム研究室）

“人工知能と細胞イメージング”

山本 陽一郎（理化学研究所革新知能統合研究センター 病理情報ユニット）

質疑・休憩

17:00 – 17:55

SessionIV 総合討論

ファシリテーター：菊地 眞（JST-CRDS 特任フェロー）、岡田 康志

17:55 – 18:00

閉会挨拶：永井 良三（JST-CRDS 上席フェロー）

参加有識者：

話題提供者：

青木 伊知男 量子科学技術研究開発機構 QST 未来ラボ・量子MRI 研究グループ グループリーダー/放射線総合医学研究所 分子イメージング診断治療研究部機能分子計測チーム チームリーダー

内橋 貴之 名古屋大学大学院理学研究科物質理学専攻 教授

小椋 俊彦 産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門 構造生理研究グループ主任研究員

岡田 真理子 大阪大学蛋白質研究所 細胞システム研究室 教授

岡田 康志 東京大学大学院理学系研究科物理学専攻 教授 /理化学研究所生命システム研究センター 細胞動態計測コア細胞極性統御研究チーム チームリーダー

片岡 洋佑 理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター 細胞機能評価研究チーム チームリーダー

新聞 秀一 大阪大学工学部生命先端工学専攻 准教授

永井 健治 大阪大学産業科学研究所生体分子機能科学研究分野 教授

藤田 克昌 大阪大学大学院工学研究科 准教授

山本 陽一郎 理化学研究所革新知能統合研究センター 病理情報ユニット ユニットリーダー

横田 秀夫 理化学研究所光量子工学研究領域 画像情報処理研究チーム チームリーダー

コメンテーター：

伊東 克英 浜松ホトニクス株式会社システム事業部システム設計部

及川 義朗 株式会社ニコンヘルスケア事業部マーケティング統括部マーケティング部 AE 課

菊地 奨 オリジナル株式会社イノベーション推進室 チーフフェロー

佐藤 孝明 プレシジョン・メディスン開発研究センター センター長/株式会社島津製作所
フェロー ライフサイエンス研究所長
須賀 三雄 日本電子株式会社経営戦略室 副室長

CRDS 特任フェロー：

菊地 眞 公益財団法人医療機器センター 理事長

■ 意見交換会

“多次元生命システム研究開発戦略 意見交換会”

開催日時：平成30年10月4日（木）14：00～16：00

場所：文部科学省 研究振興局 会議室（17F）

〔プログラム〕

14:00 - 14:15

開会挨拶：菅野 純夫（JST-CRDS 特任フェロー）

趣旨説明：西尾 陽介（文部科学省ライフサイエンス課）堀 邦夫（JST-CRDS フェロー）

話題提供：

14:15 - 15:30 第1部

洲崎 悦生 東京大学大学院医学系研究科 講師

岡田 眞里子 大阪大学蛋白質研究所 細胞システム研究室 教授

大川 恭行 九州大学生体防御医学研究所 教授

文東 美紀 熊本大学大学院生命科学研究部 准教授

岡本 康司 国立がん研究センター研究所 がん分化制御解析分野 分野長

15:30 - 15:55 第2部 総合討論

15:55 - 16:00

閉会の挨拶：菅野 純夫（JST-CRDS 特任フェロー）

参加有識者：

話題提供者：

大川 恭行 九州大学生体防御医学研究所 教授

岡田 眞里子 大阪大学蛋白質研究所 細胞システム研究室 教授

洲崎 悦生 東京大学大学院医学系研究科 講師

文東 美紀 熊本大学大学院生命科学研究部 准教授

岡本 康司 国立がん研究センター研究所 がん分化制御解析分野 分野長

CRDS 特任フェロー：

菅野 純夫 東京医科歯科大学難治疾患研究所 非常勤講師

坂田 恒昭 塩野義製薬株式会社 シニアフェロー

■ 未来戦略ワークショップ

多次元生命システム研究開発戦略

～「イメージング・オミクス」×「インフォマティクス・モデリング」による基盤技術の創成について～

開催日時：平成30年11月23日（金）13:00～18:00

場所：JST 東京本部別館 2F 会議室 A2

[プログラム]

13:00 - 13:00

開会挨拶：永井 良三（JST-CRDS 上席フェロー）

13:05 - 13:20

趣旨説明：堀 邦夫（JST-CRDS フェロー）

13:20 - 14:20

話題提供

第1部 Wet 技術

“統合プラットフォーム：ライブイメージング+オミックス+機械学習”

城口 克之（理化学研究所生命機能科学研究センター）

“マルチオミクスによる大腸がんの代謝解明”

曾我 朋義（慶応義塾大学先端生命科学研究センター）

“「木を見て、森も見る」イメージングの強み～10万細胞によるマクロ信号伝達動態の自己組織化プロセス～”

堀川 一樹（徳島大学 大学院医歯薬学研究部(医学系)）

“イメージング+ α で階層・次元を超える”

岡田 康志（東京大学大学院 理学系研究科物理学専攻）

14:35 - 16:35

第2部 Dry 技術

“生命現象を解明するための多次元多種情報処理”

横田 秀夫（理化学研究所光量子工学研究センター）

“がん診断・治療における医用画像解析の精密化に向けて”

浜本 隆二（国立がん研究センター研究所 がん分子修飾制御学分野）

“がん・免疫・微小環境の時空間挙動の科学”

角田 達彦（東京医科歯科大学難治疾患研究所 医学数理分野）

“生命システム解明のツールとしての数理理論”

望月 敦史（京都大学ウイルス・再生医学研究所 数理生物学分野）

“細胞状態の記述・予測・制御へ向けて：構成的実験と理論解析”

古澤 力（東京大学大学院理学系研究科 生物普遍研究機構）

“トランスオミクス解析を用いた生体応答のシステムの理解”

久保田 浩行（九州大学生体防御医学研究所 附属トランスオミクス医学研究センター）

“インフォマティクス・モデリングによる1細胞のメカニズムの同定と操作”

岡田 真理子（大阪大学蛋白質研究所 細胞システム研究室）

“創薬の研究・開発の立場から国内の分析・解析技術への期待”

小林 博幸（塩野義製薬株式会社デジタルインテリジェンス部）

16:55 - 17:55 総合討論：ファシリテーター（岡田 康志、菅野 純夫）

17:55 - 18:00 閉会挨拶：菅野 純夫（JST-CRDS 特任フェロー）

参加有識者：

話題提供者：

岡田 康志	東京大学大学院理学系研究科物理学専攻 教授／理化学研究所生命機能科学研究センター 細胞極性統御研究チーム チームリーダー
岡田 真理子	大阪大学蛋白質研究所 細胞システム研究室 教授
久保田 浩行	九州大学生体防御医学研究所 附属トランスオミクス医学研究センター 教授
小林 博幸	塩野義製薬(株) デジタルインテリジェンス部 部長
城口 克之	理化学研究所生命機能科学研究センター 細胞システム動態予測ユニット ユニットリーダー
曾我 朋義	慶応義塾大学先端生命科学研究所 教授
角田 達彦	東京医科歯科大学難治疾患研究所 医学数理分野 教授
浜本 隆二	国立がん研究センター研究所 がん分子修飾制御学分野 分野長
古澤 力	東京大学大学院理学系研究科 生物普遍研究機構 教授
堀川 一樹	徳島大学 大学院医歯薬学研究部(医学系) 教授
望月 敦史	京都大学ウイルス・再生医学研究所 数理生物学分野 教授
横田 秀夫	理化学研究所光量子工学研究センター 画像情報処理研究チーム チームリーダー

コメンテーター：

阿部 勝行	オリンパス(株)光学技術 2 部 部長
高畑 隆之	シスメックス株式会社中央研究所 先進医療研究ユニット 課長

CRDS 特任フェロー：

菅野 純夫	東京医科歯科大学難治疾患研究所 非常勤講師
-------	-----------------------

付録 2. 国内外の状況

近年の単一細胞解析に関連する技術の進展（単一細胞の網羅的 mRNA 発現解析等）により、ヒトの全細胞の mRNA を網羅的に解析し、標準的な細胞カタログを作ろうとするプロジェクトがはじまっている。

【米国】

・ Human Cell Atlas Project (HCA, 国際協調プロジェクト) 2017～

生命の基本単位としてヒトの細胞の包括的な参照マップを作り、“健康について理解するとともに、疾患の治療、モニター、診断することの基礎とする”ことをミッションとしたプロジェクトであり、表題にある“Cell Atlas”とは、人体内の何千もの細胞タイプのそれぞれを特徴付け、人体内の位置が参照できるようにしたマップということである。

国際的な研究コミュニティで推進し、さまざまな病気に関連する生物学的変化を体系的に研究し、病気に関連する遺伝子が体のどこで活性しているかを理解し、さまざまな細胞タイプの産生と活性を支配する分子メカニズムが分析できるようにする。さらに、さまざまな細胞タイプがどのように組み合わせられて組織を形成するかを分類することを目的にしている。具体的には、以下のような目標を掲げて推進している。

- ・すべての細胞タイプ（例えば、人体内の免疫細胞、脳の細胞）やサブタイプのカatalogを作る。
- ・各々の細胞タイプを組織内および体内の各々の位置にマッピングする。
- ・細胞の状態を区別する（例えば、病原体と遭遇していないナイーブ免疫細胞と細菌と遭遇して活性化された免疫細胞型との比較）。
- ・活性化や分化等の移行における細胞の重要な特徴の抽出。
- ・細胞系譜のトレース（例えば、骨髄中の幹細胞から機能的な赤血球までをトレースする）。

HCA は、2016 年 10 月にロンドンにおいて最初の国際会議を開催し、2017 年に CHAN ZUCKERBERG イニシアチブにより 38 のパイロットスタディに資金が提供された。2018 年 4 月にはヒトとマウスの細胞の遺伝子プロファイルが Human Cell Atlas のオンラインポータルに掲載され、2018 年 9 月には CHAN ZUCKERBERG イニシアチブから 12.5 百万ドルを 10 名のイメージング研究者にファンディングすることが発表された。また英国 MRC (Medical Research Council) により 2018 年 12 月に HCA に 6.7 百万ポンド投資することが発表された。

・ Human Biomolecular Atlas Program (HuBMAP) 2018～

NIH のコモンファンドであり、成人の人体の個々の細胞のマップを作成する研究コミュニティに対して助成する初めての開かれたグローバルなファンディングプログラムである。HuBMAP では、今後 4 年間で 5,400 万ドルを助成する。

HuBMAP のビジョンは、人体を高解像度でマッピングするためのフレームワークの開発を促進して、組織の構成と機能に関する理解を変えることであり、細胞の組織化や機能との関連性や個々の細胞の組織化の多様性について探求するための技術開発やデータ構築をサポートすることによって組織内の単一細胞研究を促進することを狙いとしている。

このプロジェクトは以下の項目の達成を目指している。

- ・ 様々な種類の生体分子の高分解能空間組織マッピングを構築する次世代技術の開発の促進

- ・ 評価されたハイコンテンツでハイスループットなイメージングやオミクス技術による基礎的な3次元組織マップの構築。
- ・ イメージングとオミクスのデータを統合、可視化、モデリングすることにより多次元マップを構築し、グローバルな研究コミュニティに対して迅速に検索可能、アクセス可能、相互運用可能、そして再利用可能にするオープンなデータプラットフォームの確立。
- ・ 人体をマッピングするためのフレームワークおよびツールを構築するために、他の資金提供機関、プログラム、および生物医学研究コミュニティと調整と協力を行う。
- ・ このプログラムにより開発されたリソースの価値を検証するためのパイロットプロジェクトをサポートする。

【欧州】

・ Life Time initiative 2019～

次期 FET (Future and Emerging Technologies) Flagship として、“Life Time”を採択し、2019年3月から開始している。

Life Time initiative の背景：

ゲノム配列のみではヒトのフェノタイプや病気を予測するモデルを構築することはできない。ゲノム配列の唯一の“通訳者”は細胞であり、ゲノムが細胞内でどのように機能しているかを理解すること、そして、細胞がどのようにして組織を構成し、病気の進行時にどのようにダイナミックに変化するのか、ということを理解することが必要である。これは、今世紀のサイエンスとテクノロジーのグランドチャレンジであるが、近年の破壊的な技術革新がより発展することで、これらの障壁を乗り越え基礎生物学や医学にパラダイムシフトを引き起こすことが可能である。Life Time の長期ビジョンは、医師が患者の組織の分子状態をリアルタイムで評価し、早期診断と効果的な介入を行うこととしている。

このビジョンを達成するためには、以下のような多数の融合的なチャレンジに取り組まなければならないとしている。

- a) シングルセルゲノミクスをイメージングと統合して、臨床グレードのシングルセル病理学を高い空間分解能で実現。
- b) EHR (Electronic Health Record) から予測モデルを導き出すコンピューショナルモデルは、遺伝子機能の AI モデルと単一細胞のマルチオミクス解析によるビッグデータを統合しなければならない。
- c) 新規オルガノイド技術は、ヒトの単一細胞の分解能でプロファイリングされ、ヒトを考慮した計算モデリングに最適化したものでなければならず、そうすることで CRISPR-Cas 技術と標的薬物スクリーニングを用いた摂動分析の理想的な手段として役立つ。
- d) 最終的には、これらの情報に基づいて適切な *in vivo* モデルを作成し、生体での因果関係を決定するために使われるようにする必要がある。

【中国】

- ・ 清華大学の Xuegong Zhang が HCA に参画している。

【日本】

国内では、本領域に関連するプロジェクトとして応用（疾患科学）、基礎（原理解明）領域で以下のような施策が行われている。

疾患科学関連では、ヒトを対象として分子のネットワーク解析やオミクス解析データと病態の関連性についての研究が行われている。基礎科学分野では、1細胞レベルでのオミクス解析やイメージング技術の開発、生命現象における数理モデリングの研究が行なわれている。

疾患科学関連

AMED CREST：

【恒常性】生体恒常性維持・変容・破綻機構のネットワーク的理解に基づく最適医療実現のための技術創出（2012－2019）

【疾患代謝産物】疾患における代謝産物の解析および代謝制御に基づく革新的医療基盤技術の創出（2013－2019）

文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究：

【システム癌新次元】がんシステムの新たな俯瞰と攻略（2015－2019）

基礎科学（原理解明）

JST CREST

【生命動態】生命動態の理解と制御のための基盤技術の創出（2012－2019）

【1細胞】統合1細胞解析のための革新的技術基盤（2015－2021）

文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域

【数理シグナル】数理解析に基づく生体シグナル伝達システムの統合的理解（2016－2020）

【レゾナンスバイオ】共鳴誘導で革新するバイオイメージング（2015－2019）

創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業：

生命動態システム科学推進拠点事業（2012－2016）

日本学術会議基礎生物学委員会・統合生物学委員会合同生物物理学分科会から、「生命科学の発展を加速する次世代統合バイオイメージング科学の研究推進」と題した提言が平成29年9月に発出された。

本提言では、「生命科学、物理学、化学、情報科学、計算科学、数理科学、計測分析機器開発工学などのあらゆる分野を統合し、生命システムの複雑な動態を「目で見て理解する」統合的なイメージング・計測・解析システムの開発が必須である。さらに、様々なデータを統合して質的に新しい生命理解と操作を実現するため、「計算機を通じて見る」データ駆動型研究を強力に推進する必要がある。」としている。

付録3. 専門用語

オミクス(Omics) :

生体内に存在する分子等を網羅的に解析、研究する分野。遺伝子ではゲノミクス、mRNA の転写物質ではトランスクリプトミクスなど。またタンパク質間の相互作用(interaction)を網羅的に解析するインタラクトーム(interactome)がある。

バイオインフォマティクス :

オミクス等により得られた生物情報を情報学の手法により整理・解析・情報の抽出を行う研究手法。

DNA チップ :

遺伝子の発現量を網羅的に解析するためにガラス等の基板上に多数の DNA プローブを高密度に配置・配列したチップ。検体の核酸と相補的に結合させ蛍光等で結合した核酸量を計測する。

次世代シーケンサー :

サンガー法を原理とした電気泳動法による DNA 配列決定方法とは異なり、DNA1 分子に対するシーケンス反応を並列的に行うことによって、ハイスループットに塩基配列を解読できるようにした装置。次世代シーケンサーの登場により、単一細胞における遺伝子の発現レベルなどの定量が可能になった。

ラマン分光法 :

光が物質に照射された時に照射光と異なる波長で散乱されるラマン散乱光を用いて物質の同定等を行う方法。

オルガノイド :

組織の細胞、ES 細胞または iPS 細胞等から in vitro で作られた臓器。

■作成メンバー■

永井 良三	上席フェロー	(ライフサイエンス・臨床医学ユニット)
堀 邦夫	フェロー・リーダー	(ライフサイエンス・臨床医学ユニット)
荒岡 礼	フェロー	(ナノテクノロジー・材料ユニット)
新田 英之	フェロー	(海外動向ユニット)
井上 貴文	フェロー	(ライフサイエンス・臨床医学ユニット)
佐々木麻起子	フェロー	(ライフサイエンス・臨床医学ユニット)
島津 博基	フェロー	(ライフサイエンス・臨床医学ユニット)
辻 真博	フェロー	(ライフサイエンス・臨床医学ユニット)
坂内 悟	フェロー	(システム・情報科学技術ユニット)
大隅 潤	主任調査員	(戦略研究推進部)

※お問い合わせ等は下記ユニットまでお願いします。

CRDS-FY2018-SP-09

戦略プロポーザル

“ライブセルアトラス”多次元解析で紐解く生命システムのダイナミクス ～オミクス×イメージング×データ・モデリングによる基盤技術の創成～

STRATEGIC PROPOSAL

Live Cell Atlas

Deciphering Dynamics of Biological Systems via Multi-Dimensional Analysis

平成 31 年 3 月 March 2019

ISBN 978-4-88890-638-8

国立研究開発法人科学技術振興機構 研究開発戦略センター
ライフサイエンス・臨床医学ユニット

Life Science and Clinical Research Unit,

Center for Research and Development Strategy, Japan Science and Technology Agency

〒102-0076 東京都千代田区五番町 7 K's 五番町

電話 03-5214-7481

ファックス 03-5214-7385

<https://www.jst.go.jp/>

crds/©2019 JST/CRDS

許可無く複写／複製をすることを禁じます。

引用を行う際は、必ず出典を記述願います。

No part of this publication may be reproduced, copied, transmitted or translated without written permission.

Application should be sent to crds@jst.go.jp. Any quotations must be appropriately acknowledged.

ATTAATC A AAGA C CTAAC T CTCAGACC

CT CTCGCC AATTAATA

TAA TAATC

TTGCAATTGGA CCCC

AATTCC AAAA GGCCTTAA CCTAC

ATAAGA CTCTAACT CTCGCC

AA TAATC

AAT A TCTATAAGA CTCTAACT CTAAT A TCTAT

CTCGCC AATTAATA

ATTAATC A AAGA C CTAAC T CTCAGACC

AAT A TCTATAAGA CTCTAACT

CTCGCC AATTAATA

TTAATC A AAGA C CTAAC T CTCAGACC

AAT A TCTATAAGA CTCTAACT

ATTAATC A AAGA C CT

GA C CTAAC T CTCAGACC

0011 1110 000

00 11 001010 1

0011 1110 000

0100 11100 11100 101010000111

001100 110010

0001 0011 11110 000101

ISBN 978-4-88890-638-8

