

2.4.3 一細胞オミクス

(1) 研究開発領域の定義

一細胞ごとにゲノム、エピゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームなどのオミクスを計測・解析する技術の総称を指す。またこのような技術や一細胞での蛍光タンパク質、ないし DNA タグによる細胞標識・追跡技術との融合によって細胞分化の系譜を追跡し、オルガノイド系、胚発生系等の細胞社会、臓器を構成する一細胞の挙動を正確に理解し、究極的にはすべての細胞種のアトラスを構築するような研究が該当する。類似の領域に一細胞が持つ少種類の分子や細胞のマクロな形態・機能を計測する一細胞解析がある。

(2) キーワード

シングルセルゲノム、シングルセルトランスクリプトーム、シングルセルエピゲノム、空間的解析、オミックス同時解析、細胞系譜追跡、Human Cell Atlas (ヒト細胞アトラス)、RNA-seq、ライトシート顕微鏡、組織透明化、DNA バーコード法、バイオインフォマティクス

(3) 研究開発領域の概要

[本領域の意義]

多細胞生物は、1個の受精卵が分裂を繰り返し、複雑なからだを作り出す。細胞はその個数を増やすだけでなく、適切な細胞に分化することで、骨や皮膚、筋肉などの細胞に運命づけられ、新しい機能を獲得する。細胞は増殖と分化を繰り返しながら、適切な配置に移動し、臓器を形成する。正常な個体として発生する過程や成熟後に、がん化や老化してしまう細胞が現れたり、機能不全になって、個体に影響を及ぼしてしまう細胞も出現する。このように細胞には個性と多様性がありながら、全体として秩序が保たれている。個と全体の両者を見られれば、病気を引き起こす仕組みなどがより精緻にわかると期待されている。

個体の生命システム、そしてその破綻である疾患発症のメカニズムを解明するには、個々の細胞を包括的な分子の振る舞いから理解することが必要不可欠である。これまでも分子・細胞を標的として介入を行い、その効果を観察することが基礎研究としては可能であった。しかし、このような介入は実際には細胞レベルで行われているにも関わらず、そのアウトプットの計測は臓器もしくはディッシュレベルで行われてきた。細胞種に特異的なマーカー因子が同定されている場合は、そのマーカーを用いて細胞を選別する技術も存在する。しかし、多くの細胞種では細胞を選別するマーカーは知られていない。さらに標識された細胞も分化成熟度や老化などの影響で、不均一な細胞集団である。基礎研究だけでなく臨床検査や創薬の観点からも、生命システムの根幹を担う細胞のレベルで、その機能の分子機構を包括的かつ定量的に解析する技術が待望されていた。

現在組織学的には哺乳類個体を構成する細胞は形態的に異なる少なくとも 200 種類以上の細胞が存在していると考えられている。同じ細胞種であっても分化の成熟度や細胞周期、細胞老化など細胞状態が異なることを考えると細胞種類はさらに増えると考えられている。これまでは技術的限界から、受精卵が発生する過程における内・中・外胚葉分化とそれらに由来するそれぞれの臓器、組織細胞への分化に至る個々の細胞の挙動については限られた知識しかなかった。また各臓器、組織に存在する成体幹細胞の組織維持・障害後再生過程についても一細胞レベルでの挙動についての知見は限られていた。

多細胞生物がもつ細胞は、基本的にはほぼ同一のゲノム配列をもつ。そのため、細胞の機能を知るには、どの遺伝子がどのぐらい機能しているかを調べる必要がある。そのため、ゲノム配列やその変異だけでなく、

タンパク質を生産するために必要な中間物質である RNA や、RNA 量を変化させるゲノム DNA 修飾やクロマチン構造変化であるエピゲノム、タンパク質量、代謝産物量を一細胞で計測する必要がある。

近年の技術的進展の結果、個々の細胞のマルチオミクスデータが得られたことで、例えば複数の表面マーカーを複合したフローサイトメトリーにて高度に純化した成体幹細胞集団であっても、個々の細胞には想像以上の不均一性が認められたこと、また細胞周期などの細胞の状態によっても変化することが確認された。こうしたオミクスデータに基づいて細胞集団のさらなる小集団への細分化が行われている。それら集団間の分化系譜解析などができるようになった。

一方で、3 次元的に臓器全体がもつすべての細胞を顕微鏡観察する技術が発展し、様々な細胞ラベリング技術と組み合わせて、細胞の位置情報に加えて細胞種・細胞状態の情報を全臓器・全身スケールで収集する技術開発が進められている。将来的にはこうした研究の結果、各臓器・組織に存在する細胞の細分化とそれらの受精卵からの正確な発生系譜が明らかとなり、全身に存在する全ての組織細胞アトラスが作成されることが期待される。

これらの情報は臨床医学において疾患細胞、医療用細胞等の研究や現実の治療に用いられる細胞の品質評価に活用でき、従来の集団細胞での情報に比べて、より精緻な性質を捉えることを可能とし、正確な品質評価基準を与える。その他にも、診断や予防医学では一細胞解析を用いた生検データと細胞知識を集積したヒト細胞データベースと比較することによって、より正確に疾患のステージを把握し、それに基づいた精度の高い診断を行って治療計画の立案に貢献することが可能になると期待される。創薬においても疾患の原因となる細胞種を直接標的とする創薬を行うことで、副作用が少なく効果の高い薬の開発に繋がる。

[研究開発の動向]

近年ゲノム科学・工学・バイオインフォマティクスなど様々な分野の発展および連携により、一細胞レベルの解析技術が進歩し、生物学・医学研究において大きな変革が起きている。一細胞レベルでの包括的かつ定量的な分子プロファイルの記述が可能となり（一細胞レベルのゲノム、トランスクリプトーム、エピゲノム、プロテオーム、メタボローム解析がすでに可能）、そのデータは生命現象の本質的な分子機構の解明に有用であるだけでなく、時空間的な分解能を持った細胞挙動の解析、臓器・個体レベルの機能と連動した解析へと応用されており、単一細胞解析は生命現象の解析ツールとして確固たる地位を確立している。一細胞オミクス技術は極めて解像度の高い包括的な分子顕微鏡と考えることもできる。

・一細胞トランスクリプトーム解析技術

細胞は生体において、自らに内在する分子を組み合わせ、時間的かつ空間的に制御された機能を発揮している。一細胞トランスクリプトーム解析により、このような細胞の時間的・空間的・分子機序的な解析が同時に可能となる。またこれまでの臓器細胞集団としての解析では埋もれていた希少な細胞集団の存在を同定し、その細胞集団における特異的な遺伝子発現制御機構を明らかにする研究へと発展させることができる。

2007 年頃に登場した超並列型 DNA シーケンサーの登場により一細胞レベルの RNA をシーケンスする技術の開発が進められ、2009-2013 年頃には、現在利用されている 3 つの技術が、スウェーデン¹⁾(SMART-seq)、日本²⁾(Quartz-Seq)、イスラエル³⁾(CEL-seq) でそれぞれ開発され、一細胞 RNA シーケンス法が確立した。その後、計測できる細胞数を向上させる高出力型と遺伝子領域全長をカバーしようとする完全長型に大別され開発が続いている。高出力型はたくさんの細胞数を観測するかわりに RNA の一部しか配列決定しない。2020 年に後述する Human Cell Atlas 計画の一環で高出力型一細胞 RNA シーケンス法の国際的

性能比較研究が行われた。その結果、理研が開発したQuartz-Seq2が他の手法の1.5-5倍程度の遺伝子検出感度を持ち、細胞分類精度や他のデータの統合可能性などの評価を統合した総合スコアでも他を圧倒した⁴⁾。

完全長型はRNAの全長を捉えようとするがその分、反応の煩雑さとコストからたくさんの細胞を観測できない。この手法としてはSMART-seq2, SMART-Seq3⁵⁾ が発表され、日本からは非ポリA RNAをも検出できる唯一の手法であるRamDA-seqが理研で開発され東洋紡社からキットが発売されている。また2018年頃からPacBio社やOxford Nanopore社が開発した長鎖DNAシーケンサーを利用し、SMART-seqで得られたDNAをシーケンスする技術⁶⁻⁸⁾ が開発された。これにより1分子1細胞レベルの選択的スプライシングの解析が可能になりつつある。

一細胞 RNA シーケンス法では一細胞を容器に取り分けて、分子生物学的反応を行う。細胞の採取方法には、主にマイクロ流体装置や液滴形成流路、FACS ソーティング技術、マイクロウェルなどを利用する。2018年に10x Genomics社が装置を市販化し、高出力型一細胞 RNA シーケンスがさかんに実施されるようになった。FACSソーティングを除けば、半導体技術である微細加工を利用して作製されるもので、かつては日本で先行した技術であり研究グラントも多く存在したが、現在利用されているほとんどの技術は海外製である。

Hulsmansらは、房室結節におけるマクロファージをFACSでソートしてsingle-cell RNA-seq解析をすることで、マクロファージを3種類の状態に分類した⁹⁾。このように既存の細胞分類を超えた細胞不均一性を同定する上でシングルセル RNA-seq 解析は必須のツールとなる。心筋特異的 p53 ノックアウトマウスの心筋一細胞 RNA-seq 解析により、心筋リモデリングにおける p53 の意義をシングルセルレベルで明らかにした¹⁰⁾。あらゆる遺伝子や薬剤の意義をシングルセルレベルで評価できるため、組織全体を解析対象としていた以前の研究とは解像度の次元が大きく異なる。

・一細胞トランスクリプトームと情報技術

一細胞トランスクリプトームは全遺伝子が計測した細胞でどの程度働いているかという表(行列)を出力する。この行列から細胞種類や機能が似ている遺伝子を分類したり、疾患に関わる遺伝子や細胞を発見したりするには、機械学習が必要となる。このような一細胞オミクス行列から様々な生命機能を抽出・推定する技術が開発されている¹¹⁾。一細胞トランスクリプトームは、機械学習そのものの研究テーマの題材となり、情報技術の発展にも大きく寄与している。

代表的な技術として、一細胞トランスクリプトームから細胞分化系譜を予測する手法が開発されている。この手法を用いることで細胞の出自から細胞分化の仕組みを理解できる。これにより目的の細胞に分化させる必要のある再生医療などへの応用が期待される。データからの計測ノイズを除く手法、遺伝子同士の関連の予測、データベース中にある類似細胞の検索アルゴリズム¹²⁾、複数データの統合¹³⁾ など様々な分野で情報科学が用いられている。一方で情報科学者ではないユーザーが最新のアルゴリズムを利用しやすいよう統合解析ソフトウェア¹⁴⁾ の開発も進んでいる。

このような一細胞トランスクリプトーム情報から細胞の時間的系譜を推測する手法は疾患解析にも応用されている。特にがん領域では細胞進化の研究が盛んであり、悪性黒色腫¹⁵⁾、神経膠芽腫¹⁶⁾、乳がん¹⁷⁾、希突起神経膠腫¹⁸⁾、白血病¹⁹⁾などの病態解明に応用されている。例えば、希突起神経膠腫の患者のがん組織の細胞を一細胞レベルで解析することで、がん化してからがん組織を形成するまでの細胞進化の系譜が明らかとなり、がん幹細胞と考えられる細胞集団における特徴的な遺伝子発現プロファイルを同定し、個々の患者ご

との細胞分布を解析することで、細胞系譜と治療応答性との関係性が明らかとなっている²⁰⁾。

・一細胞トランスクリプトーム解析と細胞系譜計測法

多細胞生物は、1つの細胞が分裂と分化を重ねて、複雑な個体を形成する。細胞系譜と分化の関係を知らることができれば、多細胞生物の成り立ちや疾患になる仕組みが理解できる。これまでは顕微鏡観察によって細胞系譜が調べられてきた。例えば、蛍光タンパク質と蛍光イメージング技術の発展により、線虫の全細胞系譜の同定から始まり、様々な生物・組織で系譜解析が行われてきた。*in vivo*にて細胞（特に成体幹細胞）の運命を追跡する手法として、Cre-LoxPの組み換え技術により、任意の位置・時間に任意の蛍光タンパク質の組み合わせを発現させる技術や、CRISPR/Cas9を利用して、ゲノム配列中のバーコード領域に変異を入れることで、細胞を区別する方法²¹⁾などが登場した。

しかしこのような方法は見た目や細胞を標識したDNAだけが計測されるため、1つ1つの細胞の種類やその機能の情報は得られない。そこで顕微鏡観察で得られる画像やDNA標識と同時に1細胞RNAトランスクリプトームが得られる手法が開発されつつある。

1つずつの細胞のゲノム配列にバーコードを付加して、1細胞トランスクリプトームでバーコードとトランスクリプトームを同時に計測する手法として、ゲノム編集型と組み換えタンパク質型が報告されている。さらにそのバーコード配列の読み出しを次世代シーケンスではなく1分子蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (smFISH) で行うことで、組織像のような空間情報を保持したまま細胞系譜の追跡が可能となった²²⁾。

上記の一細胞オミクス、一細胞イメージング技術、多色ないしDNAバーコードを用いた一細胞系譜解析はすでに成体幹細胞研究、発生研究に応用されつつある。

- ・1つの流れはES細胞ないしiPS細胞の*in vitro*分化系を用い、一細胞トランスクリプトーム解析にて解析対象組織の発生系譜を解析する研究である。現状、*in vitro*分化技術の限界もあり、完全に正常発生を再現した形の結果は得られていない。
- ・2つめの流れは、成体幹細胞のオルガノイド培養系を用い、成体幹細胞・ニッチ細胞の正常および障害後再生過程における細胞動態を解析するものである。
- ・3つめの流れとして、受精卵ないし初期胚をもちいた発生系譜研究である。線虫、魚類については研究が先行し、哺乳類においても解析は進行中である。

・一細胞トランスクリプトームと他の情報を統合した空間的（空間発現パターン）解析

臓器において種々の細胞が綿密な空間的構造を構築して恒常性を保っている。空間情報を保持したまま遺伝子発現解析をすることで、疾患発症の分子病態の空間的なダイナミクスを解析できる。このような空間的関係性を理解する上でシングルセルRNA-seq解析は大きな意義を持っている。核酸のシーケンスは、一細胞を単離し、破壊して計測する必要がある。そのため、一細胞の組織内の位置や、分子の細胞内局在などは計測できない。そこで、細胞や分子を「本来の場所で (*in situ*)」で計測する手法の開発が盛んである。

1988年に、固定した組織に含まれるRNAを空間的な位置を保ったままcDNA合成をする技術が登場した。1996年には細胞の位置を記憶して細胞を採取し、cDNA増幅を行う実験がされている。2014年にはイメージ質量分析計や質量イオンビームイメージングなどが開発され、タンパク質の空間発現分布が観測できるようになった。2015-2016年には、空間構造を保持した細胞や組織切片中で直接RNAを逆転写あるいはプロービングし、1分子イメージングで配列をシーケンスする *in situ* sequencing と呼ばれる MARFISH²³⁾ や seqFISH²⁴⁾ が開発され、複数の遺伝子由来のRNAが計測できるようになった。

一細胞レベルまで分離することを要求しなければ、レーザーマイクロダイセクションなどによって空間情報を保持したまま細胞集団を抽出し、トランスクリプトームを得ることで十分解析可能である。これまでにゼブラフィッシュやマウスの胚発生²⁵⁾、心臓組織再生過程²⁶⁾における空間的トランスクリプトームデータが報告されている。SpatialDE²⁷⁾ や trendsceek²⁸⁾ というアルゴリズムを使うことで、シングルセル RNA-seq データから空間的特徴を持つ遺伝子発現パターンを予測できる。

また解析対象遺伝子が限られるが、RNA in situ hybridization によって空間情報を保持した遺伝子解析が可能である。このデータと一細胞 RNA-seq データを統合することで、特徴的なトランスクリプトームをもつ細胞の位置を概ね予想することができる²⁹⁾。

このような空間情報を維持した遺伝子発現解析もハイスループット化が急速に進展している。FISH の技術を多数のプロブを用いることで、同時に1つの細胞の数百の遺伝子の発現を解析する技術が構築されている²³⁾。またスライドガラスに RNA を補足するプライマーを約 1,000 種類程度配置しておき、その上に組織切片を貼り付けて溶解することにより、個々の細胞から溶出した RNA をその位置において捕捉し、その位置で cDNA 合成を行うことで位置情報を保持したままの cDNA ライブラリを作り、個々の細胞の網羅的な遺伝子発現情報を取得することができる³⁰⁾。2019年に10x Genomics社から空間トランスクリプトームを実施できるキット Visium が発売された。

・エピゲノム・遺伝子制御関係の解析への応用

ゲノム配列の修飾やクロマチン構造、クロマチンの開閉位置などエピゲノムは、遺伝子発現の制御に関わっており、細胞ごとに特異的なパターンを示すため、一細胞で計測できれば、細胞機能やその成り立ちの理解が深まる。転写因子のような制御性タンパク質は DNA と相互作用することによって、多くの遺伝子群を同時に制御し、細胞特有の機能を生み出している。このように同時に制御されている遺伝子群を、一細胞ごとのトランスクリプトームから抽出することができる。

例えば重み付き共発現ネットワーク解析によって、いくつかの細胞で共発現している遺伝子群を抽出することができる。神経細胞の一細胞解析に応用した結果、将来的に神経細胞やグリア細胞に分化する幹細胞集団に特徴的な遺伝子ネットワークが同定されている³¹⁾。これをゲノムワイドに予測する上で、エピゲノム情報は極めて重要である³²⁾。

近年一細胞レベルでエピゲノム情報を抽出する技術が生み出されたことで、遺伝子発現レベルではなく、制御領域のレベルで細胞の状態を定義することができるようになってきた。2013年以降、トランスポゼースの挿入位置をシーケンスすることで、(オープンクロマチン領域で)ゲノムの開構造をシーケンスする ATAC-seq^{33), 34)}、DNase-seq³⁵⁾ によって、ヒストン修飾(特定のタンパク質がゲノムのどこに結合するか)を CHIP-seq³⁶⁾ によって、DNAメチル化修飾を Bisulfite-seq^{37), 38)}、5hmC-seq³⁹⁾ によって、クロマチン高次構造(クロマチンの接近位置を特定する)を Hi-C⁴⁰⁾ によって、一細胞レベルでゲノムワイドに抽出する手法が報告されている。これらの手法によって、エピゲノムレベルで細胞集団を分類し、細胞系譜を詳細に解析することができる。しかしいずれの手法も、実験精度の問題で、ゲノム全体を真にカバーしているとは言えず、今後の技術開発の発展が期待される。また解析対象であるゲノム DNA が一細胞あたり2コピーしか存在しないので、RNA 解析とは異なり、偽陰性となる情報が多くなることを考慮した解析が必要となる。

最近になって、1つの細胞から遺伝子発現とエピゲノムを同時に抽出する技術も確立され、その関係性を解析することが可能になった。例えば、一細胞からエピゲノム(DNAメチル化)とトランスクリプトームを同時に抽出することにより^{41), 42)}、発生過程において転写因子がDNAに結合することにより誘導されるDNA脱

メチル化の程度が大きい細胞ほど、その標的となる遺伝子発現が高いことがわかった。

また制御関係を明確に示すためには、エピゲノム情報を遺伝学的な機能改変実験と統合することも重要である。遺伝子改変モデル生物から単離した細胞を一細胞レベルでトランスクリプトーム解析することにより、その遺伝子の機能を詳細に解析することができる。しかし遺伝子の機能を個別に解析するのは、スループットが低く、遺伝子間の関係性も不明瞭となる。現在は細胞レベルの表現型を一細胞トランスクリプトームとして解析できるようになったため、これを利用して CRISPR/Cas9 による網羅的な機能抑制ライブラリを用いて個々の細胞に別々の遺伝子の機能欠失を誘導し、そのアウトプットを一細胞 RNA-seq で解析し、改変遺伝子と表現型 (トランスクリプトーム) を連結する Perturb-seq⁴³⁾・CRISP-seq⁴⁴⁾・CROP-seq⁴⁵⁾ といった手法が開発され、遺伝子改変の影響を網羅的に解析できるようになった⁴³⁻⁴⁵⁾。このとき重要なのが、各々の細胞でどの遺伝子の機能抑制が働いたかの情報 (すなわち Cas9 のガイド RNA の情報) をトランスクリプトームと同時に抽出することである。最近この技術を用いた報告が相次いでなされ、様々な生命現象において重要な遺伝子を網羅的に同定するだけでなく、各遺伝子がどのような遺伝子群を制御しているかまで一気に明らかにしており、今後の疾患解析研究に重要な役割を果たすと考えられる。

(4) 注目動向

[新展開・技術トピックス]

・多検体計測装置としての一細胞 RNA-seq

一細胞 RNA-seq を大量サンプル計測法として捉えなおす動きがある。例えば、CRISPR/Cas9 による遺伝子ノックアウトライブラリによって、一細胞ごとにランダムに遺伝子をひとつずつ破壊し、一細胞 RNA-seq を実施することで、数千から数万の遺伝子破壊とその結果のトランスクリプトームを 1 度の実験で得られる^{44), 45)}。また、表面タンパク質に DNA バーコードを付加し、一細胞 RNA-seq によりトランスクリプトームと同時に DNA バーコードもシーケンスすることで、表面タンパク質の種類を同定する方法もある⁴⁶⁾。細胞が増殖・分化するまえに、一細胞ごとに異なる変異をゲノムに挿入し、増殖・分化後に、その変異をシーケンスすることで、細胞の系譜を同定することができる。

・in situ sequencing・細胞・組織中の遺伝子発現の直接大規模解析法

一細胞レベルでゲノムの 3 次元構造をも把握する SPRITE 法が報告され、これまでの理解に加えてゲノムは隣の染色体同士が遺伝子発現に影響しうることなどが明らかとなっている⁴⁷⁾。細胞の位置情報を保ったまま一細胞のトランスクリプトームデータを得る方法の開発 (STARmap)⁴⁸⁾。本報告では培養細胞のみならず、150 μ m 厚の 3D in situ sequencing に成功するなど今後の研究に風穴を開ける可能性がある。また、シーケンス以外の方法としては Lunderberg ら (KTH Royal Institute of Technology、スウェーデン) による Spatial transcriptomics 法が報告されており、同様に注目を集めている³⁰⁾。

・多階層オミクスのシングルセルレベルでの統合

近年シングルセルレベルのゲノム・エピゲノム解析研究も発展しており、単一細胞から複数階層のオミクス情報を同時に取得する解析が構築されつつある。例えばゲノムとトランスクリプトームを同時に取得する手法として G&T-seq⁴⁹⁾、SIDR⁵⁰⁾ など、トランスクリプトームとエピゲノムを同時に取得する手法として scNMT-seq⁵¹⁾ などが開発されている。オミクス同時解析により、単一のシングルセルオミクス解析で同定された制御状態が他オミクスとどのように関連するかを詳細に解析でき、細胞の分子制御構造の詳細な理解に繋がる。

・ 10x Genomics 社の Chromium システム

2018 年 2 月の Advances in Genome Biology and Technology (AGBT 2018) にて、10x Genomics 社の Chromium システムを用いてシングルセルバーコード、シングルセルエピゲノム (ATAC-seq)、シングルセルコピー数多型解析 (CNV 解析) が可能となることが報告され、今後これらの解析技術が身近なものになると期待される。

・ データ解析パイプラインやソフトウェアの充実

シングルセル解析において実験間のバッチ差を取り除き生命現象の本質を浮き彫りにするアルゴリズムが開発されている⁵²⁾。また低発現の遺伝子に対して発現量をリカバーする MAGIC⁵³⁾ や SAVER⁵⁴⁾ などのアルゴリズムが開発され、発現量の低い転写因子の標的予測などを効率的に行えるようになった。このようなシングルセル解析を系統的に行うプラットフォームとして、Seurat⁵⁵⁾ や Scanpy⁵⁶⁾ などが開発されている。さらにトランスクリプトームの次元削減手法として定番となってきた tSNE よりもさらに詳細な細胞分類が可能となる UMAP というアルゴリズムが開発された⁵⁷⁾。1 細胞ゲノム科学は細胞を破碎してしまう。そのため時刻や空間ごとに計測しても 1 細胞として対応づかない。時刻や空間ごとに類似の細胞が含まれており、これを擬似的に同一の細胞系譜として解析できれば、細胞分化や空間的位置を再構築し解析に活かせる。現在、最適輸送問題を利用して異なるデータポイント間の 1 細胞を対応づける手法が開発されつつある⁵⁸⁾。これらの機械学習のアプローチだけでなく、化学反応モデルを利用したデータ解析手法も開発されている。RNA の転写・分解をモデル化し、1 細胞 RNA-seq で得られた exon, intron の量を学習することで、細胞分化の系譜や速度を予測できる⁵⁹⁾。

一般的な画像データ解析のためのオープンソースソフトウェアとして、米国、欧州を中心として ImageJ、Fiji や Icy などが開発され広く利用されており、様々なプラグインの開発も進められている。また、大規模なサイズ (GB-TB サイズ) のデータへの適応も進んでおり、TeraStitcher、BigStitcher、BigDataViewer などの解析ソフトの頒布が行われている。今後画像データ解析の需要はますます大きくなっていくと考えられており⁶⁰⁾、これらのプロジェクトの進展やファンディング状況は注視する必要がある。

顕微鏡を使ったタイムラプス蛍光イメージングでは、オルガノイド系、受精卵から胚への発生系など、解析対象が複雑化すれば、視野内に存在する多数の細胞を、またそれらを標識するために用いる多くの蛍光色を自動識別し追尾する必要が高まる。現在、慶應義塾大学、九州大学などを中心とし、AI を用いて多数の細胞を自動識別し、追尾するシステムが開発されつつある。

[注目すべき国内外のプロジェクト]

【海外】

・ NIH Common Found, The Single Cell Analysis Program (SCAP)

2012-2017 年に実施された。2018 年より NIH Common Found The Human BioMolecular Atlas (HuBMAP) が、568 万米ドルでスタートした。

・ Human Cell Atlas (HCA)

2017 年、ヒトの全細胞種類を同定する Human Cell Atlas (HCA) がスタート。ヒトの体を構成する全主要組織での一細胞トランスクリプトームによる、細胞種、細胞 3 次元位置、地理的、人種的な違いを考慮したヒト細胞の細胞地図を構築することを目指している。応用としては、発生、細胞周期、細胞状態、分子ネッ

トワーク、細胞相互作用、コホート研究を挙げている。これは下記のような考え方に基づいている。

- ・一細胞単位のデータ解析により細胞集団を構成する細胞の種類・状態・反応等における多様性を明らかにすること。
- ・組織内における3・4次元位置を個々の細胞に付加する技術（空間トランスクリプトーム）やこれを推定する解析手法を組み合わせることで元の組織を計算機内で再構築し、位置座標に基づいた細胞の地図を構築すること。
- ・細胞間相互作用などのこれまでにその詳細が明らかになっていない細胞集団として高次の性質を示す細胞間ネットワークを明らかにし、組織内や組織間での細胞間の関係性を明らかにすること。また、これらを統合することで、受精卵から専門化された様々な細胞（分化細胞）が形成されていく発生過程を追跡した細胞系譜や、機能的な特徴に基づいた細胞間の関係を示す細胞関連地図を構築できる。

HCA では、研究開発テーマの一般公募を行っている。2017年10月には、38プロジェクト（脳 / 免疫 / 消化管（胃腸） / 皮膚 / 組織サンプル調整技術 / 解析技術）の採択が発表され、2018年4月にはソフトウェアツールの85プロジェクトが選ばれた。2017年6月に発表されたData Coordination Centerが設立され、HCAで得られるデータの共有を目指す。HCAは国際プロジェクトであり、英国EMBL-EBI、米国Broad Institute、米国UCSC Genomics Institute、日本の理研などが参加している。各国のプロジェクト予算に基づいた国際連携の下、2020年10月の段階で74ヶ国、1,980名が参加している。

HCAではCOVID-19を踏まえて感染者の末梢血単球細胞など解析をいち早く実施し、実施者会議でその情報を共有している。

・ Chan Zuckerberg Initiative

スタンフォード大学やカルフォルニア大学などと連携し、2016年に、10年間6億米ドル以上の規模のChan Zuckerberg BioHUB拠点を設立した。この研究拠点では、一細胞解析やHCAの研究開発を実施している。

・ Platform for Advanced Single Cell Manipulation and Analysis (PASCA)

欧州も、早期の段階から一細胞解析に着目しプロジェクトを展開した。英国を中心とする機関から組織される一細胞技術の開発や技術を用いた研究を行うSingle Cell Genomics Centre (SCGC) を発足させた⁶¹⁾。ドイツ連邦教育研究省 (BMBF) がSingle Cell Omics Germany⁶²⁾ などの一細胞解析技術を応用した研究を支援している。

・ EC Horizon 2020 PILOT ACTIONS TO BUILD THE FOUNDATIONS OF A HUMAN CELL ATLAS

HCAの構築に協力する研究者に対してファンドすることを決定した。2年間300-500万ユーロが予定されている。

・ LifeTime プロジェクト

EUが中心となり100以上の研究機関、80以上の企業が参加し、細胞ベース医療を開発することが目的である。一細胞技術の開発や医療応用に重きをおいておりHCAのメンバーと一部重複がある。

【国内】

・JST CREST/ さきがけ「統一細胞解析のための革新的技術基盤」

2014年に立ち上がり、一細胞 ChIP-seq や RNA-seq、系譜解析、プロテオーム、メタボローム、一細胞捕捉技術、イメージング技術などの開発が行われている。2019年度 JST CREST/ さきがけ「多細胞間での時空間的な相互作用の理解を目指した技術・解析基盤の創出」がスタートし、一細胞技術を応用し多細胞生物の定量生物学的な研究プロジェクトが進行している。

・内閣府 ImPACT「セレンディピティの計画的創出」(2014～2018年度)

一細胞を高速にイメージング・単離する周辺技術の開発を実施した。

その他新学術領域研究「細胞ダイバーシティの統合的解明と制御 (2018年度)」等、様々な研究領域でも一細胞遺伝子発現解析を中心技術に用いる場合も多く、組織発生や破綻の理解においても一細胞解析がもはやスタンダードな手法となっている。

(5) 科学技術的課題

・多彩な分子の一細胞オミクス計測

普及しつつある一細胞 RNA-seq であるが、機能性の非ポリA RNA や長鎖 RNA を捉えることができない。cDNA 合成法や PCR 増幅技術に限界があるためである。HCA で主に利用される高出力型一細胞 RNA-seq は、RNA の3'端しか検出できないため、ヒト細胞のアトラスが完成しても、RNA 配列の全長が得られない問題がある。そのためHCAの成果は、RNAを標的とした核酸医薬、RNA編集技術による創薬に貢献しにくい。現在は、これらの分子を一細胞で捉えられるのは日本発の技術である RamDA-seq のみである⁶³⁾。また、RNAは様々な修飾が知られているが、それらを一細胞でシーケンスした例はない⁶⁴⁾。今後は、エピトランスクリプトームの一細胞解析の開発が激化するだろう。

また、細胞のなかで起きる様々なイベントを polyA RNA に変換することができれば、一細胞 RNA-seq を利用して、数千から数万サンプルでも計測できる。現在のシーケンサーでは捉えることが困難である細胞間相互作用、タンパク質量、分子局在、細胞間空間配置などを生体内で polyA RNA に変換し、シーケンスする手法を開発する、という方向性がある。現在、細胞分化系譜、表面タンパク質、ゲノム編集ノックインライブラリのゲノム挿入位置をポリAの付加されたDNAバーコードで記録し、トランスクリプトームと同時に計測する方法が提案されている。

・リアルタイム一細胞計測

オミクスは基本的に細胞を破壊する計測であり、1つの細胞を時系列で観測することは困難である。今後は、イメージングと分子プローブ技術により、シーケンスを用いずに、分子を網羅的に計測する技術の開発が望まれる。また、細胞内でのイベントを細胞内の核酸に逐次記録することで、破壊的なシーケンス技術を利用しても、擬似的にリアルタイムに計測したことと同義となる方法の開発方向も有り得る。特にイメージングでは捉えられない in vivo の深部組織で数ヶ月から数年に渡っておきる現象をゲノム DNA に記録し、シーケンスによって読み出す方法が日米で開発されている。

・ DNA シーケンサーの開発

一細胞オミクスは、細胞バーコード法や combinatorial indexing、マイクロ流体装置などの技術発展により、大量のサンプルを調製できるようになった。しかし、それらのデータをシーケンスするには、現在のコストやスループットでは足りなくなっている。少なくとも 2-3 桁のスループットを持つ DNA シーケンサーの開発が必須である。現在の Sequencing by synthesis や Nanopore ベースとしたシーケンサーではこの限界を越えるのは困難であり、シーケンスの基礎原理からの開発が必要である。

Nanopore シーケンサーの登場で、長鎖 DNA 配列決定が可能となった。しかし、ポア数が少なく、DNA 分子数に対して決定できるシーケンス配列種の数も少ない。そのため、一細胞由来の微量な核酸をシーケンスすることは困難である。DNA をシーケンスに変換する効率の向上が期待される。また、微量 DNA を長鎖 DNA シーケンサーで配列決定するには、今まで通り核酸の増幅が必要である。長鎖 DNA は切断されやすく、増幅も困難であるため、長鎖 DNA シーケンサー向けのシーケンスライブラリ作製技術の発展が望まれる。

固定された 3 次元組織内で DNA シーケンスできる技術が開発されつつある。これによって、RNA の局在や組織内での発現分布が得られる。現在は、決定できる RNA 種類が千程度であるが、細胞あたり数千の RNA が発現しているため、より決定できる種類数が増えることが期待される。

・ 一細胞系譜追跡法の高度洗練化と AI による生物学的データ解析

1,000 色までの超多色細胞系譜追跡法と DNA バーコーディング法の融合、1,000 色までの超多色イメージングと 3 次元タイムラプスイメージング法と AI による個々の細胞識別とその追跡、あるいは上記超多色の自動識別技術の開発の組み合わせによって、オルガノイド、胚培養、ES/iPS 細胞分化系などによる対象一細胞（受精卵、生体幹細胞、単一 ES/iPS 細胞）の運命の追跡を可能とする研究開発が求められる。

SPRITE 法、STARmap 法など新しい技術の開発も行われ一細胞から得られる情報量はますます膨大となっている。さらに、一細胞の 3 次元タイムラプス解析（4 次元解析）による細胞の挙動、また複数細胞の相互作用（例えばニッチ細胞と幹細胞）などある組織の 1 場面に存在する数個から 1,000 個単位の細胞の挙動を一定時間観察しそれらのオミクスデータ画像データを解析するとなると、情報が膨大すぎ、従来の解析手法では無理が生じることが予想される。そうした膨大なデータの中から意味のある生命現象を見出すためには、AI 等によるビッグデータ解析を取り入れ、進展させて行く必要があると考えられる。

・ 日本人特有の細胞地図の構築

将来的に細胞系譜や細胞地図情報を臨床に応用することを目指した際、Human Cell Atlas 等の国際プロジェクトの報告を参照しつつ、日本人特有のリファレンスを作成することが重要になると考えられる。国際プロジェクトでは、人種間の細胞差を完全に考慮するのが困難であると予測されるため、日本人特有の細胞地図の構築は必須の課題となる。

・ 個体全細胞解析による臓器連関解析

イソギンチャク⁶⁵⁾ やマウス⁶⁶⁾ の個体全体におけるシングルセル解析が行われ、個体レベル解析による新規の細胞同定やその制御機構の解明、臓器間の細胞連関解析などが可能になった。様々な疾患や生命現象において他臓器連関をオミクスで解析することが可能となっており、シングルセルレベルの多臓器連関解析に発展することが期待される。

・シングルセルオミクス解析の臨床応用

シングルセル解析は少量検体でも解析可能であるため、臨床検体との相性が良い。がんの組織検体においてシングルセルレベルでゲノム変異とトランスクリプトーム変化を統合解析する研究が進んでおり⁶⁷⁾、患者ごとにがんの細胞進化過程を詳細に明らかにしている。また臨床検体は容易に単一細胞に単離できないことが多く、保存可能な凍結組織から単離した細胞核を用いた single-nucleus RNA-seq 技術も確立されており⁶⁸⁾、これにより single-cell RNA-seq と同様に細胞種分類・細胞機能解析を行うことができる。

(6) その他の課題

・分野連携

従来よりもさらに生命医学研究におけるデータ解析、数理モデル解析、工学的デバイスの開発、低分子化合物の作成とスクリーニング等々、複数の分野の研究者の共同研究が重要になっている。一方で、我が国の環境から、異分野は異なるキャンパスに存在していて学生、院生、ポスドク時代とそれぞれ物理的に分けられた状況で育ってきているという点も問題点として挙げられるだろう。現在、旧来の大学教育、大学院教育の枠組みのあり方、例えば理学部、工学部、薬学部、医学部といった古い枠組み自体がすでに時代の進歩についていないのではないかという考え方もある。また、欧米ではそれらを複合し共同研究に主眼をおいた研究施設がすでに意味を持った形で機能し、成果を上げつつあるも我が国にはほとんどない。

一般にヒト細胞を使用するプロジェクトには検体から組織を採取することが必要である。従って、医療現場等との密接な連携が重要であり、ここで示している一細胞解析により細胞系譜、地図の構築を目指す研究領域も該当する。そこで、プロジェクト設立時にどの程度のサンプルを必要とし共有化できるか、また、人材、施設、費用の面での要求及び法整備に関して準備が重要である。国内プロジェクトとして組織体制を整理した結果、効率よく各プロジェクトが大学病院等と連携し、検体サンプルを得て臨床医学のテーマにも貢献できると考えられる。

・人材育成

Human Cell Atlas では情報解析の組織化に莫大な投資を行っている。既に、細胞種決定のための機械学習等を用いた手法などが多数報告されており、特にバイオインフォマティクスの重要性が高まっているにも関わらず、その人材が欠如している。最大の原因は、日本では大規模なバイオインフォマティクス研究所が存在せず、旧来の実験研究所や情報科学研究所の一研究室で大部分の生命情報科学教育が行われていることである。また、両分野を習得するには膨大な時間がかかり、米国の様にダブルメジャーの体制が我が国では不十分であることも課題である。

またウェットとドライの両者をバランス良く理解した人材も今後多数輩出される必要がある。ENCODE や HCA などオミクスの国際プロジェクトは、バイオインフォマティクス研究者がオーガナイズしてきた。これは、オミクス技術の開発や利活用には、高度な情報処理が必須になっているためである。日本では、バイオインフォマティクス研究者がヘッドを務めるゲノム科学のラボや大型プロジェクトはほぼなく、国際競争力に乏しい。シーケンス技術の発展とともに我が国でも実験と情報科学の両方に明るい若手研究者が増えつつある。今後は、そのような人材に実験できる環境や予算配分を行い、研究室や大型プロジェクトをマネジメントできる人材を育成することが一細胞オミクス分野の発展において必須である。また、そのような人材育成プログラムも必要であろう。

・コアファシリティと高度な研究開発チームの両立

一細胞解析における一細胞マルチオミクスが強力な解析手段になり、この 2-3 年の中でも各臓器、各種悪性腫瘍などで次々と新しい知見が見出されている現状は広く知られている。これらの解析は一般的にコストが高く、限られた研究施設でしか行うことができないために我が国では裾野が広がらない現状があり、欧米との同種研究との競合力の点で明らかな差が認められている。新しいオミクス解析の技術開発とともに既存技術のコストダウン、スピードアップ、より簡便な技術開発が極めて重要である。

日本では欧米との試薬・装置の価格差によって、中国や韓国、米国などの受託企業でシーケンスの方が安価になっている。そのため、国内のコアファシリティのシーケンサーはほぼ稼動しておらずシーケンサーを所有する意義が減少してきている。しかしながら、ライフラインであるシーケンシングを海外に完全に依存することは、国内のシーケンス技術レベルの低下やデータの流出、科学発展の独立性を担保できなくなる恐れがある。感染症の診断など、迅速性が求められる分野では、国内ですぐに利用できるコアファシリティが必須である。以上の理由で、受託による安価な実験と国内のコアファシリティの育成を両立させなければならない。シーケンス技術が低下すると、一細胞オミクス技術の開発力や運用力も向上せず、低下するであろう。

他国は、一細胞オミクス技術を開発しているトップラボでは、もはや共同研究や自身のデータプロダクションを実施していない。研究所内外のコアファシリティに技術移転を行い、自身は研究開発に集中しつつ、国内のユーザーがデータを得られるように工夫されている。日本では、技術の開発者が、開発から共同研究、支援、起業、試薬市販化、データ解析環境開発、他技術導入・評価などを 1 つの研究室で行うのが一般的である。そのため研究開発の生産性が著しく低下し、国際競争力も低下しつつある。コアファシリティを運営できる人材育成やその評価システム、長期的な予算配分とともに、各研究者の大型機器購入制限などが必要であろう。単に既存の技術を提供する作業だけでなく、最先端の技術に精通するための技術導入費用の確保も必須である。

イメージング、データ解析の標準化、および巨大データのストレージの問題は未だに大きな課題である。目的に応じた顕微鏡や解析パイプラインを一部の主要な研究者らが自力で構築している状況であり、開発を担当していないユーザーサイドからは、透明化が簡便化される一方でその後のイメージング、解析の部分が大きなボトルネックとして感じられ、参入が進んでいない部分も大きい。このような状況から、研究コミュニティ全体として本技術を活用していく体制がまだ整っていない。特にライトシート顕微鏡など、現時点では高額であるが 3 次元観察に適した顕微鏡の普及が必要である。データ解析については、ギガバイトからテラバイトのオーダーのデータを、知識や技術のないエンドユーザーが簡便に扱えるソフトウェア・ハードウェアの開発・普及が必要となっており、オープンソースソフトウェア (ImageJ 等) と組み合わせ使用できる plugin 等の開発がヨーロッパを中心に進められている。これらの標準化は基礎研究分野のみならず、臨床診断技術等への応用の点でも非常に重要な課題となると考えられる。

・産学連携

一細胞解析や細胞系譜、細胞関連地図によって得られた結果を産業に提供し、活用するための枠組みを築くことが肝要である。解析プラットフォームを新規に構築しようとする企業とアカデミアによる共同研究や、商品化を目指す企業とアカデミアによる共同研究など、あらゆる面での産学連携が本研究領域で進む必要がある。英国、EU、米国を中心に、ライフサイエンスや製薬関連の企業との産学連携を目指す複数の学会会議を提供する Oxford global⁶⁹⁾ が活動しており、一細胞解析に特化した学会会議も含まれる⁷⁰⁾。

米国では一細胞オミクスを用いた創薬で大型のスタートアップが設立された。共同創設者は HCA の代表

者であり、一細胞オミクスの国際協力と並行して、産業界での競争がヒートアップしている。国内でも ICT 企業がヒトの遺伝子検査や健康診断データなどのヘルスケア情報の統合などに参入しており、アカデミアと産業界で人材流動性が非常に高まっている。日本においても、DNA シーケンスの利活用を基盤技術としたスタートアップが増加しているが、一細胞オミクスを産業応用しようとする例はほぼない。今後はより積極的な起業支援が必要であろう。例として、一細胞技術を用いたバイオプシー検査は予防医学の面で精度の高い診断を提供できるだけでなく、個人への医薬品の効果を分析するための情報源ともなり、精密医療につながる。そして、そのような医薬品に関する情報などが細胞関連地図に付加的な情報として付与されると、医薬品の品質を上げるような好循環を生み出す仕組みが産学連携により可能になると考えられる。HCAの代表者は大学をやめ Genentech 社の研究開発のトップとして転出した。日本では2018年に理研の1細胞RNA-seq技術を元にした Knowledge Palette, Inc. や早稲田大学の1細胞ゲノムシーケンス技術を元にした bitBiome 株式会社などのスタートアップ企業が創立されている。

(7) 国際比較

国・地域	フェーズ	現状	トレンド	各国の状況、評価の際に参考にした根拠など
日本	基礎研究	○	→	<ul style="list-style-type: none"> 一細胞完全長 Total RNA-seq 法 RamDA-seq や高出力・高感度を両立した一細胞 RNA-seq 法 Quartz-Seq2、世界最速の一細胞検索エンジン開発 CellFishing、jl 遺伝子制御ネットワーク予測 SCODE などで世界をリードしている (理研)。また1細胞エピゲノム解析 ChIL-seq で世界をリードしている (九大)。 生殖細胞 (京大) やオルガノイド (横浜市大) の一細胞オミックス解析で世界をリード。再生医療、がん、免疫分野への応用で発展が見込まれる。臨床応用例などほぼない。 生細胞での一細胞質量分析で、エレクトロスプレーイオン化法において世界をリードしている {Mizuno : 2008hk}。 理研・宮脇らの Scale 法、理研・今井らの SeeDB 法、東大 / 理研・上田らの CUBIC 法、北大・根本ら、東大・小野寺らの 2,2'-チオジエタノールによる透明化法、名古屋大・東山らの ClearSee 法、東京理科大・松永らの TOMEI 法など、動植物を対象とした多数の透明化法の開発・応用。Scale におけるアルツハイマー病組織の3次元観察、SeeDB 法における超解像度と組み合わせ、CUBIC 法における全細胞網羅的観察と解析パイプラインの整備、睡眠・覚醒の機能回路同定、がん細胞の全身転移観察、3D 病理学など。
	応用研究・開発	△	→	<ul style="list-style-type: none"> 横河電機が一細胞イメージング & 採取装置を開発しコンソーシアムを構築。Takara CloneTech 社が一細胞採取装置 iCELL8 を上市。 国内メーカーによる透明化試薬販売、ライトシート用 CMOS カメラ販売、最適化対物レンズ販売、ライトシート顕微鏡の個別受注開始等。 日本には産業と結びつけるための企業を積極的に受け入れる意見交流の場がないことが課題である。

2.4

俯瞰区分と研究開発領域
分子・細胞
基礎基盤科学技術

米国	基礎研究	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> ・ シングルセル解析の技術・応用が飛躍的に進展 ・ マイクロ流体デバイスを利用した高出力な一細胞 RNA-seq 法 Drop-seq/inDrop RNA-seq で世界をリードしている (Harvard大)。ゲノム編集ライブラリで網羅的な遺伝子ノックアウトを実施して一細胞 RNA-seq で捉える Perturb-seq (Broad Inst.)、トランスクリプトームと細胞表面タンパク質を同時に捉える CITE-seq (NYU) など一細胞 RNA-seq を利用した新技術開発が盛ん。 ・ 一細胞トランスクリプトームの解析環境 Seurat がデファクトスタンダードになりつつある (NYU) ・ Human Cell Atlas プロジェクトの提案にも米国のブロード研究所が中核機関として参画している。 ・ ヒト/マウス一細胞発現アトラス (CZI BioHub) がある。 ・ CLARITY、SWITCH、iDISCO、Ce3D などの透明化・3次元免疫染色手法の開発と応用例 (ウイルスラベル脳、cFos ラベル脳など)、ライトシート顕微鏡開発、Expansion microscopy法開発、in situ sequencing 開発
	応用研究・開発	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> ・ 高出力型一細胞 RNA-seq 用の装置を開発・販売 (10x Genomics, Inc) され、デファクトスタンダードになりつつある。HCA 代表者の一細胞オミクス技術を利用した創薬スタートアップ Celsius Therapeutic が 65Mドルを確保 ・ シングルセル解析の臨床応用も飛躍的に発展。例: Aviv Regev ラボなどが臨床検体を多数解析 ・ CLARITY 専用機の商品化 sCLARITY システム (Quorum Technologies Inc. カナダ) X-CLARITY システム (Logos Biosystems アメリカ・韓国) ・ iDISCO ベースの脳神経活動データベース化と起業化 (Certaera アメリカ) ・ 米国では Human Cell Atlas などのプロジェクトに資金を企業が提供しており、産業に結びつきうる体制がある
欧州	基礎研究	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> ・ SMARTer 法による一細胞 RNA-seq の開発でリード ・ 英国 (sangar, EBI/EMBL) やスウェーデン (Karolinska institutet) が HCA で中心的な役割を果たしている。ヒト脳やヒト発生 (胎児) 由来の網羅的な一細胞発現アトラスを構築中 ・ オランダ Hubrecht Institute は一細胞トランスクリプトームからの希少細胞同定、幹細胞予測ソフトウェア開発や消化器オルガノイドの解析でリード ・ BABB 法によるマウス全脳イメージングの最初期の報告、3DISCO、uDISCO、vDISCO、FluoClearBABB 法の開発、脊髄疾患モデルやウイルスラベル脳への応用例、2,2'-チオジエタノールを使用した透明化法、ヒト 3次元病理開発、ライトシート顕微鏡開発と透明化組織への応用 ・ Spatial Transcriptomics による組織からの空間的遺伝子発現解析 ・ 画像解析ツールの開発 (ilastik, Icy, TeraStitcher, BigStitcher, BigDataViewer, CARE 等)
	応用研究・開発	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> ・ スウェーデンでは、空間発現量を計測する手法や装置を開発している (Spatial Transcriptomics) ・ 顕微鏡メーカーによるライトシート顕微鏡の開発・販売 (Zeiss 社ドイツ、LaVision Biotec 社ドイツ)

中国	基礎研究	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> ・ 発表論文は玉石混合だが数的に急激に増加している。 ・ 世界的に利用されている技術は少ない。 ・ シングルセル解析でも欧米に負けずに結果を出している。マウスの全臓器を対象とした一細胞トランスクリプトームを世界で初めて実現：Mapping the Mouse Cell Atlas by Microwell-Seq. Cell 2018. Center for Stem Cell and Regenerative Medicine, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China ・ Scale/SeeDB/CUBIC 派生プロトコル (FLUIT 法、UbasM法) の報告
	応用研究・開発	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> ・ より低価格の一細胞 RNA-seq の試薬を 10x genomics と共同で開発 (MGI/BGI) ・ 欧米、日本に比べて倫理的規制が低く、ヒト臨床サンプルを用いた大胆な研究が行われている。
韓国	基礎研究	△	→	<ul style="list-style-type: none"> ・ 総合家電・電子部品・製品メーカーの付属研究所より一細胞マルチオミックス法やがんの一細胞トランスクリプトームの論文が出ている (Samsung Medical Institute) ・ CLARITY 派生プロトコル (ACT-PRESTO 法他) の報告 ・ Human Cell Atlas に参画する上で、一細胞解析に関する 2019 年から 2020 年までの予算を National Research Foundation (NRF) に計上
	応用研究・開発	△	→	<ul style="list-style-type: none"> ・ 安価にシーケンス受託する企業があり、アジアではシーケンス外注先になっている (Mircogen)。マイクロ流体装置の研究が盛んで、開発のポテンシャルがある。 ・ CLARITY 専用機の商品化 X-CLARITY システム (Logos Biosystems アメリカ・韓国)

(註1) フェーズ

基礎研究：大学・国研などでの基礎研究の範囲

応用研究・開発：技術開発（プロトタイプの開発含む）の範囲

(註2) 現状 ※日本の現状を基準にした評価ではなく、CRDS の調査・見解による評価

◎：特に顕著な活動・成果が見えている

○：顕著な活動・成果が見えている

△：顕著な活動・成果が見えていない

×：特筆すべき活動・成果が見えていない

(註3) トレンド ※ここ1～2年の研究開発水準の変化

↗：上昇傾向、→：現状維持、↘：下降傾向

参考・引用文献

- 1) D. Ramsköld et al., “Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells”, *Nat Biotech* 30, no. 8 (2012) : 777–782. doi : 10.1038/nbt.2282
- 2) Y. Sasagawa et al., “Quartz-Seq : a highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals non-genetic gene-expression heterogeneity”, *Genome Biol.* 14, no. 4 (2013) : R31. doi : 10.1186/gb-2013-14-4-r31
- 3) T. Hashimshony et al., “CEL-Seq: Single-Cell RNA-Seq by Multiplexed Linear Amplification”, *Cell Rep* 2, no. 3 (2012) : 666–673. doi : 10.1016/j.celrep.2012.08.003
- 4) Mereu E, Lafzi A, Moutinho C, et al. Benchmarking Single-Cell RNA Sequencing Protocols for Cell Atlas Projects *Nature Biotechnology* (2020)
- 5) Hagemann-Jensen, M. et al. *Nat. Biotechnol.* 38, 708-714 (2020)

- 6) Gupta I. et al. *Nature Biotechnology* volume 36, pages1197-1202 (2018)
- 7) Singh M. *Nature Communications* volume 10, Article number: 3120 (2019)
- 8) Volden R. et al. *PNAS* September 25, 2018 115 (39) 9726-9731
- 9) M. Hulsmans et al., “Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart”, *Cell* 169, no. 3 (2017) : 510-522. doi : 10.1016/j.cell.2017.03.050
- 10) S. Nomura et al., “Cardiomyocyte gene programs encoding morphological and functional signatures in cardiac hypertrophy and failure”, *Nat. Commun.* 9, no. 1 (2018) : 4435. doi : 10.1038/s41467-018-06639-7
- 11) L. Zappia, B. Phipson and A. Oshlack, “Exploring the single-cell RNA-seq analysis landscape with the scRNA-tools database”, *PLoS Comput. Biol.* 14, no. 6 (2018) : e1006245. doi : 10.1371/journal.pcbi.1006245
- 12) Kiselev VY et al. *Nat Methods*.2018 May;15 (5) :359-362., Sato K. et al. *Genome Biology* volume 20, Article number: 31 (2019)
- 13) Stuart et al., *Cell* 177, 1888–1902 June 13, 2019
- 14) Butler et al *Nature Biotechnology* volume 36, pages411–420 (2018)
- 15) I. Tirosh et al., “Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq”, *Science* 352, no. 6282 (2016) : 189-196. doi : 10.1126/science.aad0501
- 16) A. P. Patel et al., “Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma”, *Science* 344, no. 6190 (2014) : 1396-1401. doi : 10.1126/science.1254257
- 17) R. Gao et al., “Punctuated copy number evolution and clonal stasis in triple- negative breast cancer”, *Nat. Genet.* 48, no. 10 (2016) : 1119-1130. doi : 10.1038/ng.3641
- 18) J. Wang et al., “Clonal evolution of glioblastoma under therapy”, *Nat. Genet.* 48, no. 7 (2016) : 768-776. doi : 10.1038/ng.3590
- 19) S. Li et al., “Distinct evolution and dynamics of epigenetic and genetic heterogeneity in acute myeloid leukemia”, *Nat. Med.* 22, no. 7 (2016) : 792-799. doi : 10.1038/nm.4125
- 20) I. Tirosh et al., “Single-cell RNA-seq supports a developmental hierarchy in human oligodendroglioma”, *Nature* 539, no. 7628 (2016) : 309-313. doi : 10.1038/nature20123
- 21) A. McKenna et al., “Whole organism lineage tracing by combinatorial and cumulative genome editing”, *Science* 353, no. 6298 (2016) : aaf7907. doi : 10.1126/science.aaf7907
- 22) K. L. Frieda et al., “Synthetic recording and in situ readout of lineage information in single cells”, *Nature* 541, no. 7635 (2017) : 107-111. doi : 10.1038/nature20777
- 23) K. H. Chen et al., “RNA imaging. Spatially resolved, highly multiplexed RNA profiling in single cells”, *Science* 348, no. 6233 (2015) : aaa6090. doi : 10.1126/science.aaa6090
- 24) S. Shah et al., “In Situ Transcription Profiling of Single Cells Reveals Spatial Organization of Cells in the Mouse Hippocampus”, *Neuron* 92, no. 2 (2016) : 342–357. doi : 10.1016/j.neuron.2016.10.001
- 25) J. P. Junker et al., “Genome-wide RNA Tomography in the zebrafish embryo”, *Cell* 159, no. 3 (2014) : 662-675. doi : 10.1016/j.cell.2014.09.038

- 26) C. -C. Wu et al., “Spatially Resolved Genome-wide Transcriptional Profiling Identifies BMP Signaling as Essential Regulator of Zebrafish Cardiomyocyte Regeneration”, *Dev. Cell* 36, no. 1 (2016) : 36-49. doi : 10.1016/j.devcel.2015.12.010
- 27) V. Svensson, S. A. Teichmann and O. Stegle, “SpatialDE : identification of spatially variable genes”, *Nat. Methods* 15, no. 5 (2018) : 343-346. doi : 10.1038/nmeth.4636
- 28) D. Edsgård, P. Johnsson and R. Sandberg, “Identification of spatial expression trends in single-cell gene expression data”, *Nat. Methods* 15, no. 5 (2018) : 339-342. doi : 10.1038/nmeth.4634
- 29) R. Satija et al., “Spatial reconstruction of single-cell gene expression data”, *Nat. Biotechnol.* 33 (2015) : 495-502. doi : 10.1038/nbt.3192, K. Achim et al., “High-throughput spatial mapping of single-cell RNA-seq data to tissue of origin”, *Nat. Biotechnol.* 33, no. 5 (2015) : 503-509. doi : 10.1038/nbt.3209
- 30) P. L. Ståhl et al., “Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics”, *Science* 353, no. 6294 (2016) : 78-82. doi : 10.1126/science.aaf2403
- 31) Y. Luo et al., “Single-cell transcriptome analyses reveal signals to activate dormant neural stem cells”, *Cell* 161, no. 5 (2015) : 1175-1186. doi : 10.1016/j.cell.2015.04.001
- 32) F. Paul et al., “Transcriptional Heterogeneity and Lineage Commitment in Myeloid Progenitors”, *Cell* 163, no. 7 (2015) : 1663-1677. doi : 10.1016/j.cell.2015.11.013
- 33) J. D. Buenrostro et al., “Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation”, *Nature* 523, no. 7561 (2015) : 486-490. doi : 10.1038/nature14590
- 34) D. A. Cusanovich et al., “Multiplex single cell profiling of chromatin accessibility by combinatorial cellular indexing”, *Science* 348, no. 6237 (2015) : 910-914. doi : 10.1126/science.aab1601
- 35) W. Jin et al., “Genome-wide detection of DNase I hypersensitive sites in single cells and FFPE tissue samples”, *Nature* 528 (2015) : 142-146. doi : 10.1038/nature15740
- 36) A. Rotem et al., “Single-cell ChIP-seq reveals cell subpopulations defined by chromatin state”, *Nat. Biotechnol.* 33, no. 11 (2015) : 1165-1172. doi : 10.1038/nbt.3383
- 37) S. A. Smallwood et al., “Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity”, *Nature Methods* 11, no. 8 (2014) : 817-820. doi : 10.1038/nmeth.3035
- 38) M. Farlik et al., “Single-cell DNA methylome sequencing and bioinformatic inference of epigenomic cell-state dynamics”, *Cell Rep.* 10, no. 8 (2015) : 1386-1397. doi : 10.1016/j.celrep.2015.02.001
- 39) D. Mooijman et al., “Single-cell 5hmC sequencing reveals chromosome-wide cell-to-cell variability and enables lineage reconstruction”, *Nat. Biotechnol.* 34, no. 8 (2016) : 852-856. doi : 10.1038/nbt.3598
- 40) T. Nagano et al., “Single-cell Hi-C for genome-wide detection of chromatin interactions that occur simultaneously in a single cell”, *Nat. Protoc.* 10, no. 12 (2015) : 1986-2003. doi : 10.1038/nprot.2015.127

- 41) C. Angermueller et al., “Parallel single-cell sequencing links transcriptional and epigenetic heterogeneity”, *Nat. Methods* 13 (2016) : 229-232. doi : 10.1038/nmeth.3728
- 42) I. C. Macaulay et al., “G&T-seq : parallel sequencing of single-cell genomes and transcriptomes”, *Nat. Methods* 12, no. 6 (2015) : 519-525. doi : 10.1038/nmeth.3370
- 43) A. Dixit et al., “Perturb-Seq : Dissecting Molecular Circuits with Scalable Single-Cell RNA Profiling of Pooled Genetic Screens”, *Cell* 167, no. 7 (2016) : 1853-1866.e17. doi : 10.1016/j.cell.2016.11.038
- 44) D. A. Jaitin et al., “Dissecting Immune Circuits by Linking CRISPR-Pooled Screens with Single-Cell RNA-Seq”, *Cell* 167, no. 7 (2016) : 1883-1896.e15. doi : 10.1016/j.cell.2016.11.039
- 45) P. Datlinger et al., “Pooled CRISPR screening with single-cell transcriptome readout”, *Nat. Methods* 14 (2017) : 297-301. doi : 10.1038/nmeth.4177
- 46) M. Stoeckius et al., “Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells”, *Nat. Methods* 14, no. 9 (2017) : 865-868. doi : 10.1038/nmeth.4380
- 47) A. Q. Sofia et al., “Higher-Order Inter-chromosomal Hubs Shape 3D Genome Organization in the Nucleus”, *Cell* 174, no. 3 (2018) : 744-757.e24. doi : 10.1016/j.cell.2018.05.024
- 48) X. Wang et al., “Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states”, *Science* 361, no. 6400 (2018) : eaat5691. doi : 10.1126/science.aat5691
- 49) I. C. Macaulay et al., “Separation and parallel sequencing of the genomes and transcriptomes of single cells using G&T-seq”, *Nat. Protoc.* 11, no. 11 (2016) : 2081-2103. doi : 10.1038/nprot.2016.138
- 50) K. Y. Han et al., “SIDR : simultaneous isolation and parallel sequencing of genomic DNA and total RNA from single cells”, *Genome Res.* 28 (2018) : 75-87. doi : 10.1101/gr.223263.117
- 51) S. J. Clark et al., “scNMT-seq enables joint profiling of chromatin accessibility DNA methylation and transcription in single cells”, *Nat. Commun.* 9, no. 1 (2018) : 781. doi : 10.1038/s41467-018-03149-4
- 52) L. Haghverdi et al., “Batch effects in single-cell RNA-sequencing data are corrected by matching mutual nearest neighbors”, *Nat. Biotechnol.* 36, no. 5 (2018) : 421-427. doi : 10.1038/nbt.4091
- 53) D. van Dijk et al., “Recovering Gene Interactions from Single-Cell Data Using Data Diffusion”, *Cell* 174, no. 3 (2018) : 716-729. doi : 10.1016/j.cell.2018.05.061
- 54) M. Huang et al., “SAVER : gene expression recovery for single-cell RNA sequencing”, *Nat. Methods* 15 (2018) : 539-542. doi : 10.1038/s41592-018-0033-z
- 55) A. Butler et al., “Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species”, *Nat. Biotechnol.* 36, no. 5 (2018) : 411-420. doi : 10.1038/nbt.4096
- 56) F. A. Wolf, P. Angerer and F. J. Theis, “SCANPY : large-scale single-cell gene expression data analysis”, *Genome Biol.* 19 (2018) : 15. doi : 10.1186/s13059-017-1382-0
- 57) L. McInnes, J. Healy and J. Melville, “UMAP : Uniform Manifold Approximation and

- Projection for Dimension Reduction”, *arXiv* (2018) : 1802.03426v1. <https://arxiv.org/abs/1802.03426> (2021年2月1日アクセス)
- 58) Schiebinger G. et al. *Cell*. 2019 Feb 7;176 (4) :928-943.e22
- 59) La Manno G. et al. *Nature* volume 560, pages494-498 (2018)
- 60) BBSRC Strategic Review of Bioimaging 2018
- 61) <https://www.ebi.ac.uk/about/news/press-releases/single-cell-centre> (2021年2月1日アクセス)
- 62) <http://icb-scog.helmholtz-muenchen.de/> (2021年2月1日アクセス)
- 63) T. Hayashi et al., “Single-cell full-length total RNA sequencing uncovers dynamics of recursive splicing and enhancer RNAs”, *Nat Commun* 9, no. 1 (2018) : 619. doi : 10.1038/s41467-018-02866-0
- 64) V. Davalos, S. Blanco and M. Esteller, “SnapShot : Messenger RNA Modifications”, *Cell* 174, no. 2 (2018) : 498–498.e1. doi : 10.1016/j.cell.2018.06.046
- 65) A. Sebé-Pedrós et al., “Cnidarian Cell Type Diversity and Regulation Revealed by Whole-Organism Single-Cell RNA-Seq”, *Cell* 173, no. 6 (2018) : 1520-1534. doi : 10.1016/j.cell.2018.05.019
- 66) X. Han et al., “Mapping the Mouse Cell Atlas by Microwell-Seq”, *Cell* 172, no. 5 (2018) : 1091-1107. doi : 10.1016/j.cell.2018.02.001
- 67) C. Kim et al., “Chemoresistance Evolution in Triple-Negative Breast Cancer Delineated by Single-Cell Sequencing”, *Cell* 173, no. 4 (2018) : 879-893. doi : 10.1016/j.cell.2018.03.041
- 68) B. B. Lake et al., “Neuronal subtypes and diversity revealed by single-nucleus RNA sequencing of the human brain”, *Science* 352, no. 6293 (2016) : 1586-1590. doi : 10.1126/science.aaf1204
- 69) <https://www.oxfordglobal.co.uk/> (2021年2月1日アクセス)
- 70) <https://www.oxfordglobal.co.uk/singlecell-congress/> (2021年2月1日アクセス)

2.4