

2.3.6 一細胞オミクス・空間オミクス

(1) 研究開発領域の定義

1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、メタボロームなどを計測・解析する学問領域、およびそれにかかわる技術の総称を指す。またこのような技術や蛍光タンパク質、DNAタグによる細胞標識・追跡技術、CRISPR技術との融合によって1細胞レベルで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、臓器を構成する細胞の挙動の正確な理解の研究が該当する。これによって、疾患発症に関わる細胞種の特徴を解明することやすべての細胞種のアトラスを構築することが可能になる。類似の領域に1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1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、シングルセルマルチオーム解析、空間的トランスクリプトーム解析、空間的エピゲノム解析、Human Cell Atlas (ヒト細胞アトラス)、細胞系譜追跡、DNAバーコード技術、マイクロ流体

(3) 研究開発領域の概要

[本領域の意義]

ヒトは約37兆個の細胞から構成されており、それらが階層的かつ空間的に配置され、多数の機能を生み出し、個体としての生理学的状態を維持している。トランスクリプトーム解析に代表される生命科学研究技術の進捗に伴い、臓器や組織を構成する細胞群の違いが明らかとなり、これらが臓器・組織固有の機能発現に繋がるという知見が見出されつつある。しかし、細胞ひとつひとつが分子レベルでどのような状態にあり、相互作用し、機能しているかという包括的かつ詳細な情報は未だに得られていない。これらの解明に向け、異なる細胞種で作られる三次元的組織における細胞-細胞間、あるいは細胞-細胞外マトリックス間における相互作用を1細胞解像度で理解することは重要である。これは正常な生体機能を理解するだけでなく、疾患あるいは老化に伴った細胞の状態および相互作用変化を捉えることも可能とし、新しい診断法および治療法の開発にもつながる。

ヒト一個体の体細胞のゲノムは基本的に同一の配列を有するが、上記多様な機能を発現するために、細胞種ごとに異なるエピゲノム状態を持っている。そして、このエピゲノム状態に応じた特定のRNAが転写され、この量に応じたタンパク質が翻訳される。これら異なる分子階層における状態や発現量は、細胞機能を推定する上で重要な手がかりとなる。様々な1細胞オミクス技術が開発され、現在ではヒト全臓器に含まれる細胞の分子プロファイルが詳細に調べられるようになった。このような取り組みにより、分子階層間の制御機構の一端が明らかになりつつある。また、国際的なプロジェクトにより大規模な1細胞オミクス解析が実施され、ヒトを含む様々なモデル動物の全臓器細胞分子プロファイルが報告されており、健康状態にある細胞のレファレンスデータとしての活用が期待されている。加えて疾患や老化に伴う細胞の分子プロファイルの変化についてもデータの収集が始まっており、基礎研究だけでなく、臨床検査や創薬への応用が進みつつある。

[研究開発の動向]

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を記述する技術（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、メタボローム解析など）は、特定時点における個々細胞のスナップショット解析のみならず、時空間的な分解能を持った細胞挙動の解析や組織・臓器レベルの空間的解析へと応用され始めている。

・トランスクリプトーム解析技術の動向

1細胞レベルの包括的かつ定量的な分子プロファイリング技術は生物学や医学研究において、もはや欠くことのできない存在になっている。特にトランスクリプトーム解析は他のオミクス解析に先んじて開発が進められており、2015年に報告されたマイクロ流体装置を使った前処理方法であるDrop-seq¹⁾/inDrop RNA-seq²⁾あるいはマイクロウェル(例えばCytoSeq³⁾およびSeq-Well⁴⁾)を使った方法により、数万個単位の細胞を一度に処理し1細胞のトランスクリプトーム解析が可能になった。これを実現する装置は、現在では10x Genomics社をはじめ複数の会社から販売されており、一般の生物学研究者が使える技術として汎用化し、基礎技術開発のフェーズから活用のフェーズへと転じた状況にある。一方で、2017年に報告された、細胞集団の分配と集合を繰り返しながら最終的に1細胞ごとにユニークなDNAバーコードを付与するsplit-pool barcoding⁵⁾はマイクロ流体装置を必要とせず、旧来の生化学実験手法のみで前処理を行えるという利点がある。これら様々なトランスクリプトーム解析法の性能比較は米国のBroad Instituteのグループの報告⁶⁾および国際研究グループの報告⁷⁾を参照されたい。大規模前処理方法のうち、国際プロジェクトHuman Cell Atlas(HCA)で最も広く活用されているのは10x Genomics社のプロトコルである。

ここ数年の動向としては、2017年より開始したHCAプロジェクトを中心とした国際共同研究により、ヒトの全細胞の分子プロファイルカタログ化するプロジェクトが進められ、10x Genomics社の技術を活用した多くの研究データが報告された。これに加えて2016年から発足したTabulaプロジェクト(Chan Zuckerberg InitiativeによるCZ Biohub拠点としたプロジェクト)は、10x Genomics社のプロトコルに加えてウェルプレートベースのSmart-seq2⁸⁾を活用し、ショウジョウバエ(2022)⁹⁾、マウス(2018)¹⁰⁾および老化マウス(2020)¹¹⁾、ネズミキツネザル(2021)、ヒト(2022)¹²⁾の全臓器1細胞トランスクリプトームデータを収集した。これらの研究報告に先んじて、中国の浙江大学のグループは2018年にマウスの全細胞トランスクリプトームデータ¹³⁾、そして2020年にはヒトのデータを報告しており¹⁴⁾、これらはCytoSeqとSmart-seq2を組み合わせたMicrowell-seqという方法が用いられた。また、Human Developmental Cell Atlas(HDCA) initiativeというヒトの発達過程の1細胞分子プロファイルレファレンスを構築する取り組みがHCAの一環として進められており、そのロードマップが2021年に示された¹⁵⁾。さらに、ワシントン大学のグループはsplit-pool barcodingを使った方法によりマウス胚から採取した細胞のデータを2019年に¹⁶⁾、ヒト胎児の臓器から採取した細胞のトランスクリプトーム¹⁷⁾およびオープンクロマチンデータ¹⁸⁾を2020年に報告している。一方で、2018年には人のゲノムの10倍以上の塩基対を有するメキシコサンショウウオの全ゲノムが解明され、同年中に別のグループが四肢組織再生中の1細胞トランスクリプトーム解析を実施しており¹⁹⁾、非モデル生物に対する全細胞分子プロファイルも進められている。以上のように様々な種や発達ステージにおける細胞の分子プロファイリングが進んだ。

・一細胞エピゲノム解析

ゲノムやヒストンのメチル化・アセチル化修飾、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深く関わっている。遺伝子発現に細胞ごとの多様性があるように、エピゲノム状態も細胞種や個々の細胞ごとに特異的なパターンを示すため、一細胞で計測することで細胞機能やその成り立ちを遺伝子発現制御レベルで理解することができる。こうしたニーズに応えるべく、近年一細胞レベルでエピゲノム情報を解析する技術が多く生み出されてきている。具体的には、トランスポゼースの挿入位置からゲノムの開構造をシーケンスするATAC-seq^{20, 21)}やDNase-seq²²⁾、ヒストン修飾領域を免疫沈降してシーケンスするChIP-seq²³⁾、DNAメチル化修飾領域をシーケンスするBisulfite-seq²⁴⁾や5hmC-seq²⁵⁾、クロマチンの相互作用部位から3次元構造をシーケンスするHi-C²⁶⁾して、一細胞レベルでゲノムワイドに解析する手法が報告されている。この中で最も研究利用が進んでいるのがシングルセルATAC-seqであり、シングルセルトランスクリプトーム解析にも使用されているマイクロ流体経路によるドロップレット技術を利用することで単一細胞の核からゲノム開構造をシーケンス解析することができる。2018年には10x Genomics社からシングルセルATAC-seqキット

の市販も開始され、本キットを用いたがん免疫療法前後のバイオブシーサンプルの解析から、治療応答性の新規T細胞サブセットがクロマチン制御レベルで同定されている²⁷⁾。以来、シングルセルATAC-seqは一細胞研究分野に必須の解析技術として広く利用されており、ヒトの大脳皮質形成過程における運命決定と相関するクロマチン状態²⁸⁾や、胸腺内で他組織の自己抗原を発現誘導するクロマチン制御機構²⁹⁾など、数多くの重要な発見をもたらしている。さらに最近では、細胞核をサンプルとしてシングルセルトランスクリプトーム解析とシングルセルATAC-seqを同一細胞にて行う技術（シングルセルマルチオーム解析）も市販されている。従来手法ではエピゲノムとトランスクリプトームを別々のサンプルで解析してから統合的理解を図ることしかできなかったが、このシングルセルマルチオーム解析技術を用いることで、同一細胞内におけるエピゲノムとトランスクリプトームを同時観察することが可能となった。この手法を用いて、例えば眼疾患のGWASからリスク因子として同定されていた機能未知の複数SNPsが実際に遺伝子発現調節に関わっていること³⁰⁾や、介在ニューロンの分化運命決定に関わる転写ネットワーク³¹⁾などが明らかにされている。シングルセルマルチオーム解析は市販されて間もないことから出版論文数は多くないが、プレプリントでは徐々に論文数が蓄積されつつあり、今後数年間で一細胞解析分野の常套手段として確立されるものと考えられる。

一方で、ヒストン修飾を対象としたシングルセルChIP-seqの技術開発では、2015年に初めてなされた手法報告²³⁾に関して、その後実際の研究報告が続いておらず、技術的・機器的な問題から再現性がとれていない可能性が示唆される。ChIP-seqは特定ゲノム領域を免疫沈降するために多くの細胞数を必要とすることから、シングルセルレベルの技術開発が長らく低迷していたが、この分野において日本発のChIL-seq³²⁾が一細胞解像度のヒストン修飾解析に成功しており、今後コスト面等の改善により世界的に普及する可能性を秘めている。また、クロマチン相互作用部位やDNAループ特定のため大量のサンプルを必要とするHi-Cについても、報告されている一細胞解像度の手法²⁶⁾で得られるデータは非常にスパースであるという課題が残っている。それ故、ATAC-seq以外の一細胞エピゲノム解析手法に関しては今後さらなる技術開発の必要性があると言える。

• マルチオミクス解析の大規模化

1細胞トランスクリプトーム解析技術だけでなく、他の階層を対象とする解析技術、膜タンパク質発現情報、オープンクロマチン領域情報、エピゲノム情報を抽出する技術開発も進んだ。加えて、同一の細胞を対象として、トランスクリプトーム解析だけではなく、同時に別の階層（オミクス）情報を取得するマルチオミクス解析³³⁾に関する研究がここ数年の間に多く報告された。その一例として、2017年に報告されたCITE-seqおよびREAP-seqは、DNAバーコードが付与された抗体を用いて細胞を“染色”し、膜タンパク質発現とmRNA発現の同時定量を可能とする。このDNAバーコード標識抗体は、BioLegend社からDNAタグ付き抗体がTotalSeqというキットとして販売されている。加えて、DNAタグ配列を工夫することにより10x Genomics社の装置を活用した大規模化も実現している。また、2019年にはオープンクロマチン領域解析とトランスクリプトーム解析を同時に行うSNARE-seqが報告された³⁴⁾。さらに、2021年にはCITE-seqにATAC-seqを加えたASAP-seqという方法が報告され³⁵⁾、膜タンパク質発現、mRNA発現、オープンクロマチン領域の三階層の同時計測が可能になった。また、核内タンパク質と遺伝子の発現解析を同時に行うinCITE-seqという方法も報告されている³⁶⁾。ワシントン大学のグループはsplit-pool barcodingを使ってオープンクロマチン領域解析とトランスクリプトーム解析をマルチオミクス化した³⁷⁾。また、UCサンディエゴのグループは、CUT&Tag法を応用して、ヒストン修飾とトランスクリプトーム解析を同時に行うParied-Tagという方法を報告している³⁸⁾。

これらマルチオミクス解析だけでなく、得られたデータを統合し情報解析するツールの開発も進められた。データ統合により階層間の接続が行え、より詳細な分子メカニズムの解明が可能になりつつある。当初のマルチオミクス解析では、細胞サンプルを分割して、別々の1細胞オミクス解析を実施し、その後にデータを統合するというアプローチが主流であった^{39, 40, 41)}。なお、データ統合については、同一階層（例えば1細胞ト

ランスクリプトーム同士のバッチコレクション) においても重要な概念である⁴²⁾。

• 空間的トランスクリプトーム解析

従来の網羅的遺伝子発現解析では、組織を酵素処理して一細胞レベルに単離し、細胞を破壊してRNA抽出することが必須であったため、異なる細胞種間の空間的相互作用については理解することが叶わなかった。こうした背景をもとに近年登場した空間的遺伝子発現解析技術は、FFPE切片や凍結切片上での網羅的遺伝子発現解析を可能とする点が特徴であり、ここ数年のホットピックの一つとして2021年1月にNature methods of the Year 2020に選ばれている。

本手法は「空間網羅タイプ」、「局所深読みタイプ」の2つに大別される。前者は、所与の組織内の全ての細胞の位置情報と遺伝子発現情報を取得できるが、1細胞あたりから検出できる遺伝子数はあまり多くない。後者は、検出範囲は関心領域に限定されるが、1細胞あたりから検出できる遺伝子数を深く読み解くことができる。両タイプは空間網羅性と検出深度においてトレードオフの関係にある。

これらは、次世代シーケンス解析を活用する方法と顕微鏡ベースの方法に大別でき、ここでは次世代シーケンス解析を活用した方法に焦点を絞って紹介する。代表的なアプローチとしては、ユニークなバーコード配列を有したDNAをスライド基板上に空間配置し、組織切片などを密着させた状態でmRNAを基板上に転写捕捉し、バーコードでタグづけされたcDNAを作製し、シーケンスライブラリを作る方法である(空間バーコード法)。この潮流の大きな要因として、2019年に10x Genomics社から発売された空間トランスクリプトーム解析キットVisiumが挙げられる。Visiumでは、スライドガラス上の約5,000スポットにRNAを補足する空間識別用バーコードオリゴが配置されており、その上に組織切片を貼り付けて溶解することで個々の細胞から溶出したRNAをその位置で捕捉することができる。バーコード配列の空間配置方法としては、微小なビーズを活用する方法^{43, 44, 45)}、基板上でバーコード配列を増幅する方法^{46, 47)}、split-pool barcodingを活用する方法⁴⁸⁾、マイクロ流体装置を活用する方法^{49, 50, 51)}などが報告されている。その他のアプローチとしては、DNA microscopyと呼ばれる方法がある。この方法では、組織切片などにDNAバーコードをランダムに配置し、in situ PCRを行うことで、それぞれのDNAバーコードの近くにいるmRNAと近接するDNAバーコード同士を連結・増幅し、それらの相対的な繋がり情報をもとにして計算機上で空間再構築するものである。

局所深読みタイプでは、2021年に京都大学の沖と九州大学の大川らが開発した、光ケージ化合物を付したオリゴDNAを使用するPIC法がある(PMID: 34285220)。これを組織切片に滴下すると全ての細胞内で逆転写反応が進行するが、のちの光照射によってケージ化合物が脱離するため、その後のライブラリ合成で増幅され、シーケンスできる。他の光化学的抽出法と異なり、PICは同一切片の複数の関心領域を識別できないため空間網羅性に劣るが、世界最高レベルの空間解像度(サブミクロンレベル)と検出深度(1 μm^2 あたり数百のmRNAを検出可能)を兼ね備えているため、核内の微小構造体の高深度オミクス解析にも成功している。

疾患の理解への応用も進んでおり、この数年間で既に多くの重要な知見が蓄積されつつある。心筋梗塞患者と対照者の心筋組織に対して空間的遺伝子発現解析、シングルセルトランスクリプトーム解析、シングルセルATAC-seq解析を行った研究からは、損傷修復やリモデリングに関わる重要なトランスクリプトーム・エピゲノム変化が細胞間コミュニケーションに規定され得ることが明らかにされている⁵²⁾。前立腺がん組織を対象として空間的遺伝子発現解析とDNA FISHによる空間的CNV解析を組み合わせた研究からは、MycやPTEN等のがんドライバー遺伝子におけるコピー数変化やそれに伴う遺伝子発現変化は既に悪性化前の良性腫瘍の段階において起こっていることが示されている⁵³⁾。

疾患だけでなく正常組織を対象とした研究も盛んに行われており、例えば空間的遺伝子発現解析とシングルセルトランスクリプトーム解析を組み合わせた尿管組織の研究では、SHHを発現する尿路上皮前駆細胞と周囲の線維芽細胞・基底細胞とのクロストークが組織構築に重要であることなどがわかってきている⁵⁴⁾。生

殖腺発達のメカニズムをシングルセルトランスクリプトーム・エピゲノム解析と空間的遺伝子発現解析を用いて検証した研究からは、複数の性決定因子とその発現時期・パターンが明らかにされている⁵⁵⁾。10x社のホームページに記載のあるVisium関連のpublicationは未だ約100報程度であるが、以上のようにその生物学的新規性から多くがトップジャーナルに掲載されており、今後飛躍的に発表論文数も高まるものと予想される。

• 一細胞トランスクリプトーム解析を利用した細胞系譜追跡

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。この分野において、Nature Methods誌が選ぶ2022年のMethods to Watchの一つに”Tracing cell relationships”が選ばれているように、1細胞解析技術の発展とともにLineage tracingに関する様々な実験系の開発が進んでいる⁵⁶⁾。

本技術は、従来の静的な一細胞解析や細胞系譜推定手法とは異なり、実際の細胞進化軌跡の動的理解を可能とする技術である。この技術は、細胞を事前にDNAバーコードにてラベルする必要のないレトロスペクティブな実験系と、バーコードラベルした細胞をプロスペクティブに追跡する実験系に大別できる。レトロスペクティブな系は、娘細胞に受け継がれる体細胞変異の解析から細胞系譜を推定するものであり、ヒトの成長・発達や疾患発症に特徴的なクローンをシングルセルゲノム・トランスクリプトーム解析から追跡することが可能である^{57, 58)}。それゆえ、サンプリングが可能な範囲で実際の生体内の細胞系譜を追うことができるというメリットがあるが、体細胞変異を有さないクローンを追跡できないことや、遺伝子操作による影響を検証できないというデメリットも存在する。一方で、プロスペクティブな系はDNAバーコードにより細胞をラベルして追跡する技術であることから、*in vitro*培養系や*in vivo*移植系の様々なモデルでの利用が可能であり、興味対象の細胞を遺伝子操作下で追うことができる。初期のバーコードライブラリ⁵⁹⁾はDNAレベルでの解析のみに対応していたが、近年開発されたWatermelon⁶⁰⁾、LARRY⁶¹⁾では、DNAバーコード上流に発現カセットが組み込まれており、シングルセルトランスクリプトーム解析からバーコード情報を遺伝子発現情報と共に読み取ることが可能である。これらの技術とCRISPRを融合し、バーコード配列に変異を挿入して長期的な細胞分裂ヒストリーを記録する応用技術の開発も進んでいる⁶²⁾。以上の特徴から、これらのレトロスペクティブな系とプロスペクティブな系は相互補完的に機能し得るものであり、両分野における技術開発は今後も加速していくものと思われる。

こうした細胞追跡技術は既に多分野に応用されており、胚発生やがんの薬剤耐性・転移などにおける報告がなされている。例えば胎生期の胚の解析では、胚形成の過程で全能性が失われつつ分化していく細胞系譜を一細胞レベルで辿ることに成功しており、分化した細胞系譜から計算された”Lineage distance”が近いものほどトランスクリプトーム状態も似ていることがわかっている⁶³⁾。また、バーコード化したがん細胞を用いた進化軌跡解析からは、薬剤耐性細胞や転移細胞が治療前から存在する場合と治療開始後に出現する場合があることが実験的に証明されており、がん種や治療方法に応じて様々な遺伝子変異や遺伝子発現の変化がこうした悪性をドライブすることが明らかとなってきている^{64, 65, 66)}。これらの知見は、これまでの静的なスナップショット解析ではなし得なかった、生物の発達や疾患の発症・進展メカニズムの動的理解をもたらすものと期待されている。今後、一細胞エピゲノム解析との統合的解析研究も進んでいくものと考えられ、当該研究分野はさらなる技術発展と研究成果の蓄積が見込まれる。

(4) 注目動向

[新展開・技術トピックス]

• total RNA sequencingに関する研究

これまでの1細胞トランスクリプトーム解析ではpoly AのついたRNA、すなわち主にメッセンジャーRNAをターゲットにしたプロトコルが主流であった。そのため、成熟してもpoly Aが付与されないnoncoding RNAや転写途中のRNAに関するオミクス解析は1細胞レベルでほとんど行われて来なかった。バルクレベル

ではあるが2021年にpoly A-鎖も含むtotal RNAに関する大規模調査が報告されるなど、poly A-鎖の網羅的調査とその機能解明を目指した研究に注目が高まっている⁶⁷⁾。1細胞レベルの研究としては、2018年にRamDA-seqと呼ばれる全長total RNAをシーケンス解析するプロトコルが理研によって開発された。そして、2021年⁶⁸⁾および2022年⁶⁹⁾に新しいプロトコルが報告された。特に2022年に報告されたVISA-seqという方法は、マイクロ液滴の形成・合体を実施するマイクロ流体装置およびDNAバーコードを用いることで大規模1細胞total RNAシーケンス解析を可能にする初の方法である。具体的な方法としてはRNAをフラグメント化した後、末端をpoly A化し、oligo-dTを用いてcDNAを合成する。通常の1細胞トランスクリプトームにおいて絶対定量に活用されるunique molecular identifier(UMI)はunique fragment identifier (UFI)として活用され、定量性にも優れた方法である。Intron領域の検出感度が高く、poly A+鎖のみをターゲットにしたプロトコルと比較してRNA velocityの予測精度も高いことが報告されている。

• 時間情報を抽出する研究

2018年にRNA velocityと呼ばれるexon量とintron量から細胞状態の変化の速度を予測する手法が報告された。また、新しく合成されたRNAを人工塩基によりラベル化するscEU-seq⁷⁰⁾、SLAM-seq⁷¹⁾やSci-fate⁷²⁾はスプライシングの速さで規格化した相対的なvelocityしか算出できないというRNA velocityの課題を解決する実験手法として開発され、Dynamo⁷³⁾と呼ばれるデータ解析の枠組みにより絶対的なRNA velocityを算出できることが報告された。RNA timestamp⁷⁴⁾と呼ばれるアデノシンを脱アミン化することでイノシンに変換しRNA ageを計測する方法や、AFMのカンチレバー状のデバイスで非殺傷的に同一の1細胞から複数のタイムポイントにおいてRNAを回収してトランスクリプトーム解析を実施するLive-seq⁷⁵⁾など、時間方向の情報を取得する技術開発が相次いでいる。RNAのラベル化法はゼブラフィッシュの胚発生へも用いられた⁷⁶⁾。また、velocityを算出するアプローチはオープンクロマチン領域解析にも拡張され、Chromatin velocity⁷⁷⁾と呼ばれる解析法やオープンクロマチン領域解析とトランスクリプトーム解析を統合したMultiVelo⁷⁸⁾と呼ばれる方法が報告された。

• 空間的一細胞マルチオミクス解析技術

2019年にMITのグループから報告されたSlide-seq⁷⁹⁾や、10x社が発売準備を進めているVisium HDなど、一細胞以下の解像度での空間的遺伝子発現解析を行うキットも来年には社会実装されるものと思われる。さらに、Yale大学のグループから空間的ヒストン修飾解析⁸⁰⁾が2022年2月に、空間的ATAC-seq解析⁸¹⁾が2022年8月にそれぞれ報告されている。いずれの手法も抗体結合領域やオープンクロマチン領域をトランスポゾンでラベルして切り出し、その後空間的位置情報を捉えるバーコードをその場でDNAに結合させてからライブラリーを作成して次世代シーケンサーにて読み取るというものである。この手法は他の転写因子やクロマチン制御因子の結合領域同定等にも応用可能であると考えられ、今後のさらなる技術開発と市場への早期流通が期待される。

• マイクロ流体装置の新たな活用例

これまでオミクス解析と融合されていなかった情報との統合が挙げられる。例えば、MITのグループはカンチレバーを用いた細胞の質量計測とトランスクリプトーム解析を融合し、薬剤応答との相関解析の可能性を示した⁸²⁾。コロンビア大学のグループは、DNAバーコードで修飾したマイクロビーズとマイクロウェルを活用したSCOPE-seq⁸³⁾という方法で、細胞画像とトランスクリプトーム解析を接続する方法を報告した。カリフォルニア大学ロサンゼルス校(UCLA)のグループは、nanovialと呼ばれる特殊な三次元構造のゲルビーズを開発し、ゲルビーズ上で培養した1細胞の分泌活性解析とトランスクリプトーム解析を融合したSEC-seqと呼ばれる方法を報告した⁸⁴⁾。以上の様に、薬剤応答、表現型あるいは活性状態等の情報(パラメータ)を、従来の1細胞オミクス解析に統合することで、ユニークなデータセットの取得が可能になってきた。また、オミ

クス解析との統合は達成できていないが、表現型のひとつとして細胞の変形能も注目を集める。この計測においてもマイクロ流体装置の活用が複数の研究グループで見られており⁸⁵⁾、UCLAの開発技術については敗血症の診断技術としてFDAの臨床試験にも至っている。細胞の変形能計測とトランスクリプトーム解析を統合できれば、変形能という表現型と背後にある分子メカニズムを紐づけることができ、最適な治療方針の決定などに活用できる可能性がある。

[注目すべき国内外のプロジェクト]

【海外】

• HubMAP

NIH Human BioMolecular Atlas Program (HubMAP)⁸⁶⁾ は2018年より開始し、Human Cell Atlas, Human Protein Atlas, LifeTime⁸⁷⁾等と連携してプログラムを進めることが2019年にNature紙において示された。HubMAPはHCA同様に1細胞オミクス解析を活用するが、タンパク発現、メタボローム解析等、幅広い計測モダリティへの展開、組織および空間情報への展開に重点が置かれている。

• CZ BioHub

CZ BioHubは2016年に10年間のプロジェクトとして発足し、BioHub研究拠点が創設された。スタンフォード大学やカリフォルニア大学バークレー校 (UCSF) の研究者が連携プロジェクトを進めている。Tabulaプロジェクトなど1細胞オミクス関係のプロジェクトが多数進められている。また2022年には若手PIに対して5年間で一人当たり百万ドルの研究費を提供することを決め、86人の若手PIが選ばれた。

• LifeTime Initiative

LifeTime Initiative⁸⁷⁾ は2018年より開始し、欧州全体から90の研究機関、80のサポーター企業から構成され、2020年までFSが行われた。本プログラムは健康状態から病気に遷移する過程を、1細胞マルチオミクス解析、イメージング、AIおよび患者由来病気モデルを用いて解析し、病気の進行を司る分子機構を特定し、それを基にした新規治療法の確立を目指すものである。健康状態の細胞を対象にしたHubMAPと比較すると、病気の進行に重点をおいたプログラムと考えられる。

• Human Tumor Atlas Network (HTAN)

2020年、ヒトのがん細胞アトラスプロジェクトがスタート^{88, 33)}。米NCIのCancer Moonshot主導のもと、様々ながん種、前がん病変を含む様々なステージ、治療前後や転移組織などのサンプルを対象とした一細胞解析を実施し、ヒトがん細胞地図を構築することを目指している。

• SenNet

The Common Fund's Cellular Senescence Network (SenNet) Program⁸⁹⁾ は2021年に開始した。このプログラムは老化細胞 (Senescent Cell) をターゲットにしており、HubMAPおよびHCAとも連携しながらデータ収集が行われ、SnC Atlasというデータベースが構築される計画である。

【国内】

• JST さきがけ / CREST 多細胞領域

2019年に立ち上がった研究領域。組織・器官・個体等の多細胞系における細胞間の時空間的な相互作用を解析し、動的な生命システムの理解を深めることを目指した研究プロジェクトが進行している。

(5) 科学技術的課題

• 一細胞解析の解像度

マイクロ流体経路を用いた一細胞トランスクリプトーム解析は、数万～数百万個の細胞のプロファイルを得ることができるハイスループット性と引き換えに、発現遺伝子の3'側の一部配列のみの情報しか得ることができない。そのため、スプライシングバリエーションや融合遺伝子の検出ができないという解析解像度の課題がある。

また、従来手法ではディープシーケンスを必要としているHi-C解析などに関しても、一細胞にて解析を行えるようになったものの得られるデータが非常にスパースであるという問題がある。

• 空間トランスクリプトーム技術

空間解像度、空間網羅性、検出深度、遺伝子網羅性の全てを兼ね備える手法は未だないため、研究の目的に応じて選択する段階である。今後、遺伝子発現情報だけでなく、その時空間的な制御を司るクロマチン情報やエピゲノム情報を空間情報に紐付けできる技術が期待されている。

(6) その他の課題

• 分野横断、人材育成

最先端の生物学および医学研究において数学、物理、工学、データ解析等、異分野および複数の分野を横断する知識が必要になってきている。一方で旧来の大学および大学院教育は医学部、理学部、工学部といった縦割りの枠組みになっており、さらに学部内でも分野が細分化されているため、学際研究を進める上で様々な障害を生んでいる。例えば、上記の学部、大学院は通常カリキュラムが全く異なり、また別々のキャンパスに点在している場合が多く、互いに人材交流がしにくい環境にある。さらに、若手研究者が学際研究を進め、その研究キャリアを続けた場合、最終的に受け皿となる学部および大学院が存在しないため、テニユアポジションを得にくい環境がある。当該分野を発展させるためには、学際分野で活躍できる人材を育成する環境づくり、その様な人材が最終的に安定したポジションを獲得できる雇用環境づくりから進める必要がある。

一例として、マイクロ流体装置に用いられている要素技術開発において当初わが国は欧米に先行していたが^{90, 91)}、最終的には1細胞オミクスへの応用研究は欧米のグループが先行した。分野横断的に活躍できる人材がわが国に少ないことが主な原因であると考えられる。さらに、最近では空間オミクス解析へもマイクロ流体装置が活用されており^{49, 50, 51)}、今後も中心的な要素技術として活用されることが予測される。

ENCODEやHCA、HTANなどのオミクス国際共同プロジェクトはバイオインフォマティクス研究者にオーガナイズされていることはもとより、海外ではバイオインフォマティクス研究者がラボに実験設備とウェット研究者を抱え、自身は手を動かさずともウェット研究全体の指揮を取ることも多い。ここでのポイントは「自身は手を動かさずとも」という点にあり、バイオインフォマティクス研究者自身は実際に実験ができない場合でも、生物学・医学の知識と研究をデザインする能力があれば、十分ハイレベルなウェット研究を成立させることができることを物語っている。また、publishされている海外発の論文にはウェットドライのコラボ（co-correspondingにそれぞれのラボヘッドが名を連ねている）が非常に多いことから、お互いの分野に対する理解が深く密にコミュニケーションを取れているであろうことが伺える。一方で、本邦でのウェットドライコラボ事例は海外と比べて極端に少ない。それゆえ、日本に今後必要となる具体的な人材像として、ウェットの生物学的思考を兼ね備えたドライ研究者や、ドライ解析の成り立ちを理解したウェット研究者などが挙げられるだろう。

海外では助教レベルで独立し、1千万円単位の所属研究機関からの立ち上げサポートに加え1-3千万円程度の継続的公的グラント（多くは3-5年間）を獲得して研究体制を整えることが主流である。このシステムにより、若手研究者はポスドクを雇用することが可能となり、研究設備等も整えることができるため、特に重要な研究期間である30-40代前半に自身の研究を加速度的に発展させることができる。このシステムにより、海外では多くの若手研究者が自国の一細胞解析を牽引する存在として飛躍している。一方、わが国においても若手研究者への支援を目的としたグラントは徐々に増えつつあるが、その額と期間は一細胞解析のようなコストのかかる研究を進める上では十分でない。また若手研究者にとって現状の国内グラントでは異分野連携の実現は困難である。そのため、本邦での一細胞解析を牽引しているのは若手研究者ではなく、すでに多くの実績のある研究室となっている。

• コアファシリティ人材の充実

他国のコアファシリティでは、通常 Ph.D. のスタッフが複数人所属しており、研究開発を強力にバックアップしている。当該分野に限らず、以前に比べるとわが国においてもコアファシリティが充実してきた。しかしながら、その予算の殆どは施設の建設や装置の購入に充てられ、コアファシリティの人材育成や人件費に対して十分に割り当てられてこなかった。その結果として、他国と比べてわが国のコアファシリティは人的リソースに乏しい。国内のコアファシリティでは、装置を貸しているだけか、スタッフのスキルが低い場合が多く、研究者自身で装置のオペレーションスキルを向上しないとイケない。また、総じてコアファシリティの装置稼働率が低く、効率的に資金を活用できていない点も課題である。以上の課題を解決するには、国内の博士研究者を増やすと同時にコアファシリティの雇用環境を大幅に改善する必要がある。博士課程の学生に対する経済的支援を強化することは当然のことながら、コアファシリティの待遇改善およびステータスの向上により、博士研究者をコアファシリティで雇用し、研究力を底上げする必要がある。

• 特許戦略・産学連携

欧米では、1細胞研究分野のトップ研究者がアカデミアから企業へ流出する事例が増えており、産業界での開発競争が過熱している。日本においてもアカデミアの研究成果を元にしたスタートアップ企業が複数創立されているが、欧米と比較するとその事例は少ない。その原因の一つとして、アカデミアにおける特許戦略あるいは日本の特許制度を言及する。大学や国立研究所のライセンス管理組織は欧米のそれと比較すると、マーケティング力と運用力が非常に弱いため、獲得した知財から効率的に収益が得られていない。その結果、資金力が脆弱であり、新規発明の出願および権利の維持に対して消極的である。これらがアカデミア発のスタートアップ企業が出にくい一因になっている。

(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"> ・ Human Cell Atlas (HCA) に理研が中核拠点として参画している。 ・ 1細胞完全長 total RNA-seq 法である RamDA-seq、高出力・高感度を両立した Quartz-seq2、などで世界をリードしている (理研)。 ・ 単一ヌクオソームレベルの分解能でゲノムの3次元構造を決定する手法を開発 (理研)。 ・ 1細胞の細胞質-核 RNA-seq を実現した SINC-seq および NanoSINC-seq が報告された (理研)。 ・ 理研が中心になって進めている FANTOM6 プロジェクトから long noncoding RNA の機能解析に関する研究が報告された。 ・ 一細胞エピゲノム解析手法の一つ ChIL-seq の開発で世界をリード (九大)。 ・ 2021年に発表された PIC 法では、同一切片の複数の関心領域を識別できないため空間網羅性に劣るが、世界最高レベルの空間解像度と検出深度を兼ね備えており、核内の微小構造体の高深度オミクス解析にも成功している (京大、九大)。 ・ がん免疫研究 (がんセンター) や生殖細胞 (京大) の一細胞解析で世界をリード ・ 一方、一細胞解析の膨大なコスト面をカバーできる研究施設が限られており、新規重要知見を積み重ね続けているのはごく一部の研究施設に限られる。
	応用研究・開発	○	→	<ul style="list-style-type: none"> ・ 理研発のプロトコルを実施する RamDA-seq のキットが販売された。 ・ Takara CloneTech 社が一細胞解析装置 iCELL8 を開発・販売している。 ・ Knowledge Palette 社や bitBiome 社などのスタートアップ企業が創立されている。 ・ イメージングフローサイトメトリ技術を活用した ThinkCyte 社および CYBO 社等のスタートアップ企業が創立されている。

2.3 俯瞰区分と研究開発領域
基礎基盤

米国	基礎研究	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> ・マイクロ流体経路を用いた一細胞解析技術 (Drop-seq及びinDrop、いずれもハーバード大) や空間的遺伝子発現解析技術 (Slide-seq、MIT) および空間的エピゲノム解析技術 (Spatial ATAC-seq及びSpatial -CUT&Tag、Yale大)、CRISPR 遺伝子ノックアウトライブラリーと一細胞トランスクリプトーム解析の融合技術 (Perturb-seq、Broad Institute) など、東海岸の主要研究拠点における技術開発が世界をリードしている。 ・Human Cell Atlas (HCA) やHuman Tumor Atlas Network (HTAN) の中核をBroad Instituteが担っている。 ・16の国際コンソーシアムが協働で統合データベースHuman Reference Atlas (HRA)⁹²⁾ の構築をNIHのHuBMAPの一環として進めており、HCA関連プロジェクトからも多くのデータが提供されている。 ・老化細胞をターゲットにしたSenNetが2021年に立ち上がった。 ・CZ BiohubではTabula projectを進めており、個体全臓器の細胞のトランスクリプトームデータを収集している。これまでに、ヒト、マウス、老化マウス、ネズミキツネザル、ショウジョウバエのデータが集められている。
	応用研究・開発	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> ・上記の技術群を北米全体での応用研究へと展開させるスピードが群を抜いており、胚発生を含む様々な組織発達の新たな機序の解明、免疫や神経等の細胞種の分子的理解、がんや心疾患などをドライブする新規分子機構の発見など、多岐に渡る知見を積み重ね続けている。 ・10x Genomics社が従来の自社一細胞解析装置を上回るハイスループット版としてChromium Xを開発・販売している。 ・10x Genomics社からin situ シーケンス解析システムXeniumが発売された。 ・Vizgen社からfluorescence in situ hybridizationを用いたMERFISH法を商業化したMERSCOPEが発売された。
欧州	基礎研究	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> ・Smart-seq3およびSmart-seq3xpressという新たなプロトコルが報告され、根強い人気のあるSmart-seq系プロトコルの感度やスループットが改善された。 ・Live-seqと呼ばれる非殺傷的なRNAサンプリングを利用した時系列トランスクリプトーム解析法が報告された。 ・Human Cell Atlas (HCA) にUKのサンガー研究所、スウェーデンのカロリンスカ研究所が中核拠点として参画している。
	応用研究・開発	◎	→	<ul style="list-style-type: none"> ・空間トランスクリプトームを活用して良性および悪性腫瘍におけるコピー数変異に関する研究が報告された⁹³⁾。 ・空間的トランスクリプトーム解析技術を世界で初めて開発したのがスウェーデン王立工科大学である。その後10xによる技術獲得が行われ、米国発Visiumの販売へと至っている。2010年に立ち上げられたSciLifeLabは空間オミクス解析も含む最新技術を提供している。
中国	基礎研究	◎	↗	<ul style="list-style-type: none"> ・近年、一細胞解析分野における出版論文数が飛躍的に伸びており、米国を追従する構えを見せている。 ・浙江大学のグループが、Microwell-seqを活用して、マウスの全臓器1細胞トランスクリプトーム解析、ヒトの全臓器1細胞トランスクリプトーム解析の結果を世界に先駆けて報告した。
	応用研究・開発	○	↗	<ul style="list-style-type: none"> ・BGIのグループがDNA nanoballを活用した空間トランスクリプトーム法を開発し、マウスの器官形成やメキシコサンショウウオの脳の再生に関する研究に適用された。
韓国	基礎研究	○	→	<ul style="list-style-type: none"> ・日本と比較するとマイクロ流体装置の研究が盛んである。
	応用研究・開発	△	→	<ul style="list-style-type: none"> ・一細胞解析の臨床応用が始まっている。

2.3

俯瞰区分と研究開発領域
基礎基盤

(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

参考文献

- 1) Macosko, E. Z.; A. Basu; R. Satija, et al., Cell 2015, 161, 1202-1214.
- 2) Klein, A. M.; L. Mazutis; I. Akartuna, et al., Cell 2015, 161, 1187-1201.
- 3) Fan, H. C.; G. K. Fu; S. P. Fodor, Science 2015, 347, 1258367.
- 4) Gierahn, T. M.; M. H. Wadsworth; T. K. Hughes, et al., Nature Methods 2017, 14, 395-+.
- 5) Cao, J.; J. S. Packer; V. Ramani, et al., Science 2017, 357, 661-667.
- 6) Ding, J.; X. Adiconis; S. K. Simmons, et al., Nat Biotechnol 2020, 10.1038/s41587-020-0465-8.
- 7) Mereu, E.; A. Lafzi; C. Moutinho, et al., Nat Biotechnol 2020, 38, 747-755.
- 8) Picelli, S.; A. K. Bjorklund; O. R. Faridani, et al., Nat Methods 2013, 10, 1096-1098.
- 9) Li, H.; J. Janssens; M. De Waegeneer, et al., Science 2022, 375, eabk2432.
- 10) Tabula Muris, C.; c. Overall; c. Logistical, et al., Nature 2018, 562, 367-372.
- 11) Tabula Muris, C., Nature 2020, 583, 590-595.
- 12) Tabula Sapiens, C.; R. C. Jones; J. Karkanias, et al., Science 2022, 376, eabl4896.
- 13) Han, X.; R. Wang; Y. Zhou, et al., Cell 2018, 172, 1091-1107 e1017.
- 14) Han, X.; Z. Zhou; L. Fei, et al., Nature 2020, 581, 303-309.
- 15) Haniffa, M.; D. Taylor; S. Linnarsson, et al., Nature 2021, 597, 196-205.
- 16) Cao, J.; M. Spielmann; X. Qiu, et al., Nature 2019, 566, 496-502.
- 17) Cao, J. Y.; D. R. O'Day; H. A. Pliner, et al., Science 2020, 370, 808-+.
- 18) Domcke, S.; A. J. Hill; R. M. Daza, et al., Science 2020, 370.
- 19) Gerber, T.; P. Murawala; D. Knapp, et al., Science 2018, 362, 421-+.
- 20) Buenrostro JD, et al. Nature. 2015 Jul 23 ; 523 (7561) : 486-90.
- 21) Cusanovich DA, et al. Science. 2015 May 22 ; 348 (6237) : 910-4.
- 22) Jin W, et al. Nature. Dec 3 ; 528 (7580) : 142-6.
- 23) Rotem A, et al. Nat Biotechnol. 2015 Nov ; 33 (11) : 1165-72.
- 24) Smallwood SA, et al. Nat Methods. 2014 Aug ; 11 (8) : 817-820.
- 25) Mooijman D, et al. Nat Biotechnol. 2016 Aug ; 34 (8) : 852-6.
- 26) Nagano T, et al. Nat Protoc. 2015 Dec ; 10 (12) : 1986-2003.
- 27) Satpathy AT, et al. Nat Biotechnol. 2019 Aug ; 37 (8) : 925-936.
- 28) Ziffra RS, et al. Nature. 2021 Oct ; 598 (7879) : 205-213.
- 29) Michelson DA, et al. Cell. 2022 Jul 7 ; 185 (14) : 2542-2558.e18.
- 30) Wang SK, et al. Cell Genom. 2022 Aug 10 ; 2 (8) : 100164.
- 31) Allaway KC, et al. Nature. 2021 Sep ; 597 (7878) : 693-697.
- 32) Harada A, et al. Nat Cell Biol. 2019 Feb ; 21 (2) : 287-296.

- 33) Jackson, C. A.; C. Vogel, *Mol Cell* 2022, 82, 248-259.
- 34) Chen, S.; B. B. Lake; K. Zhang, *Nat Biotechnol* 2019, 10.1038/s41587-019-0290-0.
- 35) Mimitou, E. P.; C. A. Lareau; K. Y. Chen, et al., *Nat Biotechnol* 2021, 39, 1246-1258.
- 36) Chung, H.; C. N. Parkhurst; E. M. Magee, et al., *Nat Methods* 2021, 18, 1204-1212.
- 37) Cao, J.; D. A. Cusanovich; V. Ramani, et al., *Science* 2018, 361, 1380-1385.
- 38) Zhu, C.; Y. Zhang; Y. E. Li, et al., *Nat Methods* 2021, 18, 283-292.
- 39) Stuart, T.; A. Butler; P. Hoffman, et al., *Cell* 2019, 177, 1888-1902 e1821.
- 40) Welch, J. D.; V. Kozareva; A. Ferreira, et al., *Cell* 2019, 177, 1873-1887 e1817.
- 41) Lin, Y.; T. Y. Wu; S. Wan, et al., *Nat Biotechnol* 2022, 10.1038/s41587-021-01161-6.
- 42) Argelaguet, R.; A. S. E. Cuomo; O. Stegle, et al., *Nat Biotechnol* 2021, 39, 1202-1215.
- 43) Rodriques, S. G.; R. R. Stickels; A. Goeva, et al., *Science* 2019, 363, 1463-1467.
- 44) Stickels, R. R.; E. Murray; P. Kumar, et al., *Nat Biotechnol* 2020, 10.1038/s41587-020-0739-1.
- 45) Vickovic, S.; G. Eraslan; F. Salmen, et al., *Nat Methods* 2019, 16, 987-990.
- 46) Cho, C. S.; J. Xi; Y. Si, et al., *Cell* 2021, 184, 3559-3572 e3522.
- 47) Chen, A.; S. Liao; M. Cheng, et al., *Cell* 2022, 185, 1777-1792 e1721.
- 48) Srivatsan, S. R.; M. C. Regier; E. Barkan, et al., *Science* 2021, 373, 111-117.
- 49) Liu, Y.; M. Yang; Y. Deng, et al., *Cell* 2020, 183, 1665-1681 e1618.
- 50) Deng, Y.; M. Bartosovic; S. Ma, et al., *Nature* 2022, 609, 375-383.
- 51) Deng, Y.; M. Bartosovic; P. Kukanja, et al., *Science* 2022, 375, 681-686.
- 52) Kuppe C, et al. *Nature*. 2022 Aug ; 608 (7924) : 766-777.
- 53) Erickson A, et al. *Nature*. 2022 Aug ; 608 (7922) : 360-367.
- 54) Fink EE, et al. *Dev Cell*. 2022 Aug 8 ; 57 (15) : 1899-1916.e6.
- 55) Garcia-Alonso L, *Nature*. 2022 Jul ; 607 (7919) : 540-547.
- 56) Mukhopadhyay M. *Nature methods*. 2022 Jan ; 19 (1) : 27.
- 57) Chapman MS, et al. *Nature*. 2021 Jul ; 595 (7865) : 85-90.
- 58) Ludwig LS, et al. *Cell*. 2019 Mar 7 ; 176 (6) : 1325-1339.e22.
- 59) Bhang HC, et al. *Nat Med*. 2015 May ; 21 (5) : 440-8
- 60) Weinreb C, et al. *Science*. 2020 Feb 14 ; 367 (6479) : eaaw3381.
- 61) Oren Y, et al. *Nature*. 2021 Aug ; 596 (7873) : 576-582
- 62) Raj B, et al. *Nat Biotechnol*. 2018 Jun ; 36 (5) : 442-450.
- 63) Chan MM, et al. *Nature*. 2019 Jun ; 570 (7759) : 77-82.
- 64) Hinohara K, et al. *Cancer Cell*. 2018 Dec 10 ; 34 (6) : 939-953.e9.
- 65) Quinn JJ, et al. *Science*. 2021 Feb 26 ; 371 (6532) : eabc1944.
- 66) Emert BL, et al. *Nat Biotechnol*. 2021 Jul ; 39 (7) : 865-876.
- 67) Lorenzi, L.; H.-S. Chiu; F. Avila Cobos, et al., *Nature Biotechnology* 2021, 10.1038/s41587-021-00936-1.
- 68) Isakova, A.; N. Neff; S. R. Quake, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021, 118.
- 69) Salmen, F.; J. De Jonghe; T. S. Kaminski, et al., *Nature Biotechnology* 2022, 10.1038/s41587-022-01361-8.
- 70) Battich, N.; J. Beumer; B. de Barbanson, et al., *Science* 2020, 367, 1151-1156.
- 71) Erhard, F.; M. A. P. Baptista; T. Krammer, et al., *Nature* 2019, 571, 419-423.
- 72) Cao, J.; W. Zhou; F. Steemers, et al., *Nat Biotechnol* 2020, 10.1038/s41587-020-0480-9.
- 73) Qiu, X. J.; Y. Zhang; J. D. Martin-Rufino, et al., *Cell* 2022, 185, 690-+.

- 74) Rodriques, S. G.; L. M. Chen; S. Liu, et al., *Nat Biotechnol* 2021, 39, 320-325.
- 75) Chen, W.; O. Guillaume-Gentil; P. Y. Rainer, et al., *Nature* 2022, 608, 733-740.
- 76) Holler, K.; A. Neuschulz; P. Drewe-Boss, et al., *Nat Commun* 2021, 12, 3358.
- 77) Tedesco, M.; F. Giannese; D. Lazarevic, et al., *Nat Biotechnol* 2021, 10.1038/s41587-021-01031-1.
- 78) Li, C.; M. C. Virgilio; K. L. Collins, et al., *Nature Biotechnology* 2022, 10.1038/s41587-022-01476-y.
- 79) Rodriques SG, et al. *Science*. 2019 Mar 29 ; 363 (6434) : 1463-1467.
- 80) Deng Y, et al. *Science*. 2022 Feb 11 ; 375 (6581) : 681-686.
- 81) Deng Y, et al. *Nature*. Sep ; 609 (7926) : 375-383.
- 82) Kimmerling, R. J.; S. M. Prakadan; A. J. Gupta, et al., *Genome Biol* 2018, 19, 207.
- 83) Yuan, J.; J. Sheng; P. A. Sims, *Genome Biology* 2018, 19, 227.
- 84) Cheng, R. Y.-H.; J. De Rutte; A. R. Ott, et al., 10.1101/2022.08.25.505190, Cold Spring Harbor Laboratory, 2022.
- 85) Urbanska, M.; H. E. Munoz; J. Shaw Bagnall, et al., *Nature Methods* 2020, 17, 587-593.
- 86) Snyder, M. P.; S. Lin; A. Posgai, et al., *Nature* 2019, 574, 187-192.
- 87) Rajewsky, N.; G. Almouzni; S. A. Gorski, et al., *Nature* 2020, 587, 377-386.
- 88) Rozenblatt-Rosen O, et al. *Cell*. 2020 Apr 16 ; 181 (2) : 236-249.
- 89) Wei, X.; S. Fu; H. Li, et al., *Science* 2022, 377, eabp9444.
- 90) Nisisako, T.; T. Torii; T. Higuchi, *Lab Chip* 2002, 2, 24-26.
- 91) Tan, W. H.; S. Takeuchi, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104, 1146-1151.
- 92) Borner, K.; S. A. Teichmann; E. M. Quardokus, et al., *Nat Cell Biol* 2021, 23, 1117-1128.
- 93) Erickson, A.; M. He; E. Berglund, et al., *Nature* 2022, 608, 360-367.

2.3