

プログラム名：セレンディピティの計画的創出による新価値創造

PM名：合田 圭介

プロジェクト名：1細胞多角的独自解析技術の開発

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書 (成 果)

平 成 2 7 年 度

研究開発課題名：

1細胞多角的独自解析技術の開発

研究開発機関名：

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻

研究開発責任者

上村想太郎

I 当該年度における計画と成果

1. 当該年度の担当研究開発課題の目標と計画

1細胞中の核酸を増幅せずに配列を測定する1細胞シーケンサーの開発を目指すチーム1の当該年度は、核酸捕捉基板（フローセル）に1細胞からの核酸抽出を実現するデバイスを組み込み、そのデバイスによって実際に1細胞サンプルを測定することを目標とした。1細胞の機能をイメージングし、遺伝子解析することが可能なチップの開発を目指すチーム3の当該年度は、全反射照明顕微鏡システムを使用した1細胞レベルでの機能イメージングの実サンプルへの応用を目標とした。また、イメージングされた機能を基準として1細胞毎に細胞を分取するためのシステム開発に着手した。

2. 当該年度の担当研究開発課題の進捗状況と成果

2-1 進捗状況

『1細胞中の核酸を増幅せずに配列を測定する1細胞シーケンサーの開発（チーム1）』

本チームの技術である高効率核酸捕捉基板に、新宅チームの基幹技術である1細胞を単離捕捉、細胞膜破壊しRNAを抽出できるデバイス（前処理デバイス）を組み込むことで、細胞破碎からシーケンスまでの一連の過程を同一デバイス内で実現できるようになった。それを用い1細胞サンプルを試みたところ、細胞由来の遺伝子配列が検出された。

『1細胞の機能をイメージングし、遺伝子解析することが可能なチップの開発（チーム3）』

① 1細胞レベルでの機能イメージングの実サンプルへの応用

当該年度は前年度構築した全反射顕微鏡システム並びに同じく前年度開発した全反射照明が可能な微細加工チップを用いて、特に細胞機能として液性因子分泌の1細胞イメージングを実際にソーターにより分取した細胞に対して達成した。ソーターとしては、当該研究プログラムが開発しているソーターが開発中であるため、既存のFACS（BD社Aria）を用いた。

② 機能イメージングされた細胞の1細胞分取システムの開発

Serendipiterにより分取された1細胞について機能解析をするプラットフォームを確立しているが、さらにその機能を指標として分取し、その後の培養や解析に供するシステムがあれば、Serendipiterを補完するシステムとして期待できる。そのため、1細胞機能イメージングを行うことで選別された1細胞を分取するシステムの開発に着手した。ガラスキャピラリーを用いたインジェクターを使用して分取を試みたが、操作が煩雑な上に、その後行うことができる解析の種類が限られてしまった。分取の精度に依存する問題と考えられ、さらなる改善が必要である

2-2 成果

『1細胞中の核酸を増幅せずに配列を測定する1細胞シーケンサーの開発（チーム1）』

前処理デバイスによって抽出したRNA分子を高効率核酸捕捉基板上に捕捉し、配列の決定を試みた。ただし、本シーケンサーではRNA分子配列を直接決定することは出来ず、図1に示すようなシーケンス前処理工程を必要とする(図1)。これらの一連の工程を経てシーケンスを行なった結果、1細胞由来の

サンプルから約 40 万のリード(塩基配列)が得られた。さらに精度を評価するためにゲノムにマッピングしたところ、約 90%のリードがゲノム配列に一致した。

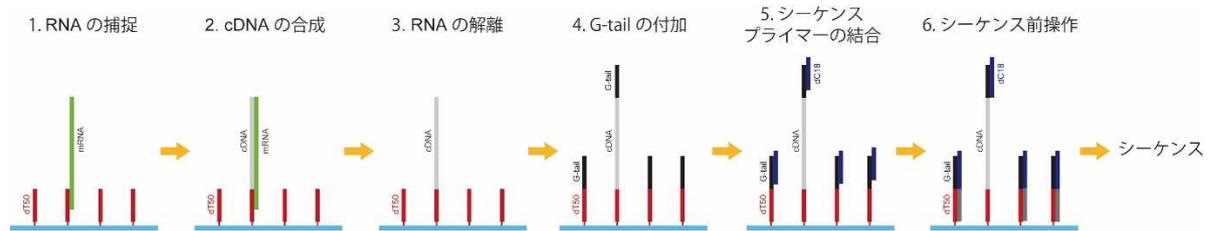


図 1. シーケンス前処理工程の模式図

『1細胞の機能をイメージングし、遺伝子解析することが可能なチップの開発 (チーム3)』

① 1細胞レベルでの機能イメージングの実サンプルへの応用

マウスより分取して数週間維持できる初代培養細胞、ならびに、ヒト末梢血中に存在する希少細胞を対象とし、サイトカインの分泌を指標とした1細胞機能イメージングを行った。ともに日間変動が大きいことがわかり、並列解析可能なチップを開発してこれらのサンプルに応用した。従来のバルク測定を用いた検証では、初代培養細胞では異なる刺激に対する応答の強度の違いが見られていたが、本計測により強度のみならず分泌動態の違いがあることが明らかとなった。また、ヒト末梢血中希少細胞では20 mL末梢血から数千個しか分取できない免疫細胞の測定を実施した。この分取した希少細胞は、従来のバルク測定では分泌活性を測定することができなかったが、本計測により非常に少数の細胞から大量のサイトカインが分泌されていることを検出した。

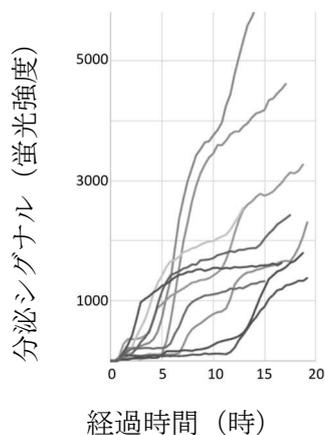


図 2 マウス免疫1細胞からの分泌動態の量的・時間的ばらつき

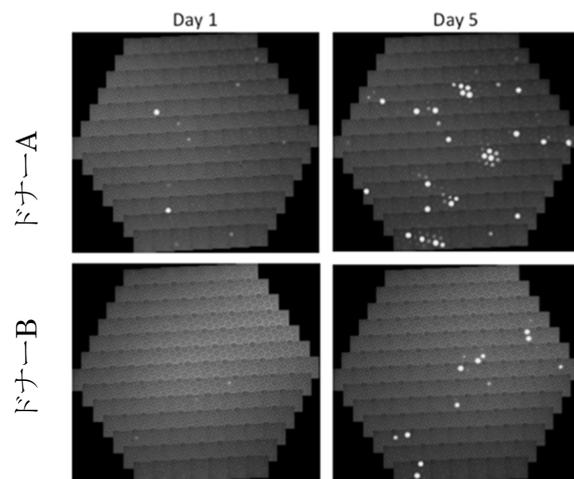


図 3 ヒト末梢血から得られた希少免疫細胞の分泌機能発現

② 機能イメージングされた細胞の1細胞分取システムの開発

当該年度は1細胞分取システムの構想並びに設計、構築を進めた。一方で、既存の圧力制御型シリッジとガラスキャピラリーを用いた細胞分取システムを使用して1細胞の分取を実施した。1細胞毎に回収し、定量PCRに資することが可能であったが、操作が煩雑で習熟が必要であること、また、持ち込み液量が大きく、後続の解析の種類によっては試薬反応の阻害等が課題となることが判明した。

2-3 新たな課題など

現状のシーケンス前処理を含むシーケンス法で得られたリードの約90%はゲノム配列に一致するものであったが、その位置を一意に決定できたものはその内の約7%にとどまり、実用レベルには厳しい状況にある。原因はシーケンス前処理工程にあるようだが、本質的な解決には至っていない。これを改善することでシーケンス精度の向上を試みている。

機能イメージングされた細胞の1細胞分取システムの開発に関して、細胞分取の操作確度を向上するためのシステムの構築、並びにハンドリング溶液の微量化が必須である。

3. アウトリーチ活動報告

2015年8月17日 東京大学理学部夏の高校生講座 「DNA暗号解読技術から読み解く生命の仕組み」
上村想太郎、東京大学理学部小柴ホール