

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： 細胞解析技術開発

委 託 研 究 開 発

実施状況報告書(成果)

平成 28 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(チーム1)』

H27年度において、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、それにより1細胞由来の核酸検出(シーケンス解析)が可能となった。H28年度ではシーケンス精度の向上を目的として、H27年度に開発したシーケンス前処理工程の改良を図る。

『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、前年度に完成させたプラットフォーム上でイメージングした機能を指標として一細胞毎に分取し、その後の培養や解析に供するシステムの開発を目標とした。

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)』

H27年度において1細胞由来の核酸分子の検出に至ったが、各々の分子配列の配列決定精度は実用に不十分であることが分かった。H28年度においてはシーケンス前処理工程の改良を図り、シーケンス精度の向上を試みた。

『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)』

前年度に着手した、機能イメージングされた細胞の1細胞分取システム開発を引き続き行うとともに、液性因子分泌を機能指標とした実サンプルの機能イメージングによって、機能発現のタイミングが細胞毎に大きく異なることが明らかになったため、機能が発現した瞬間の細胞を分取する実時間細胞回収システムの構築を行った。

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)』

シーケンス精度の向上に向け、特にリード長と検出効率の向上を狙った前処理工程の改善を行った。リード長と検出効率は、配列情報と濃度情報が既知であるサンプル(ERCC)を用いることで、正確に定量し評価した。その結果、リード長(~25bp)に向上は見られたものの、検出感度(~1%)は低いままにとどまった。

『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 機能イメージングされた細胞の1細胞分取システムの実現

前年度から検討を行っていた既存の圧力制御型シリンジとガラスキャピラリーを用いた細胞分取システムによって、一細胞網羅的遺伝子発現解析を可能とする工程を確立した。確立した工程を用い、実サンプルでの実施可能性を検討した。前年度に行ったヒト末梢血中希少細胞のサイトカイン分泌を指標とする1細胞機能イメージングでは、単一であると期待される細胞集団であっても、機能を発現する細胞は非常に少数であることが明らかになっていた。そこで、機能発現した細胞としなかった細胞の違いを明らかにするために、それぞれの1細胞毎、または1クローン毎で複数個を対象として、本システムに適用した。その結果、機能発現の有無は機能発現に関わる遺伝子群における発現量の明瞭な差を反映していたことが明らかになり、本システムの実用性を実証する結果となった。

② 実時間細胞回収システムの構築

前年度に完成させた1細胞レベルでの機能イメージングによって、機能を発現するタイミングも非常に大きな多様性を持つことが明らかになった。これは、均質な刺激を与えた細胞集団においてもさまざまな活性化段階を含むことを示しており、一括に細胞回収を行って解析に供する従来の回収法ではヘテロな集団を観察することになる。そのため、1細胞の機能イメージングを行いながら、目的とする機能を発現した細胞をその場で回収して解析に供する実時間細胞回収法を考案、これを実現するシステムを構築した。このシステムを用い、マウス初代培養細胞のサイトカイン分泌を指標とした実時間回収を行い、qPCR法を用いて分泌サイトカイン自体の遺伝子発現を定量したところ、実時間回収を行った細胞群は従来のような一括回収を行った細胞群と比べて、発現量レベルのばらつきが極めて小さいことが明らかとなり、細胞の状態を揃えた回収が実現可能であることを実証した。

2-3 新たな課題など

『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）』

前処理工程の中で特に、mRNAをcDNAに逆転写する効率が、低いことが明らかになった。1細胞非増幅シーケンスの実現に向け、解決すべき重要な課題である。

『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細胞分取システムの開発に関して、あらゆる細胞に対応するためには、細胞分取の操作確度の向上と、ハンドリング溶液の微量化が必須であり、分取操作の自動化並びに微量化に向けた新規溶液ハンドリング技術を開発中である。

3. アウトリーチ活動報告