

「統合 1 細胞解析のための革新的技術基盤」
平成 27 年度採択研究代表者

H28 年度 実績報告書

橋本 真一

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科
特任教授

1 細胞遺伝子発現解析による組織微小環境情報の構築

§ 1. 研究実施体制

(1)「金沢大学」グループ

- ① 研究代表者:橋本 真一 (金沢大学大学院医薬保健学総合研究科、特任教授)
- ② 研究項目
 - ・包括的 1 細胞トランスクリプトーム解析システムの開発とがん組織構成細胞の解析

(2)「札幌医科大学」グループ

- ① 主たる共同研究者:鳥越 俊彦 (札幌医科大学医学部、教授)
- ② 研究項目
 - ・がん細胞／組織の包括的1細胞の解析

(3)「東京大学」グループ

- ① 主たる共同研究者:鈴木 穰 (東京大学大学院新領域創成科学研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・次世代シーケンサーによる測定と他システムを用いたシングルセル cDNA ライブラリーの作成／測定

(4)「国立遺伝学研究所」グループ

- ① 主たる共同研究者:池尾 一穂 ((共)情報・システム研究機構国立遺伝学研究所生命情報研究センター、准教授)
- ② 研究項目
 - ・各細胞のクラスタリング法による細胞の分類

(5)「日立製作所」グループ

① 主たる共同研究者:久野 範人 ((株)日立製作所研究開発グループ基礎研究センター、主任研究員)

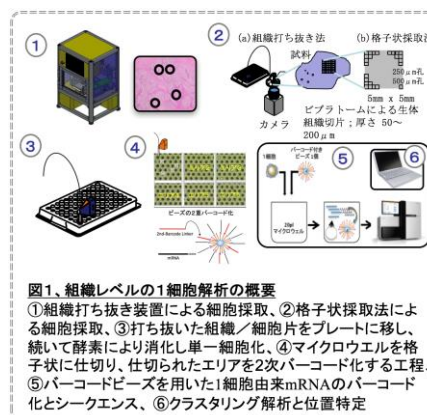
② 研究項目

- ・包括的 1 細胞トランスクリプトーム解析システムおよびデバイスの研究

§ 2. 研究実施の概要

組織の微小環境状態を理解する事は、診断や病態を改善する上で非常に重要である。その為には組織において位置情報を保持したまま、数千以上の1細胞の遺伝子発現情報を明らかにする必要がある。本研究では、1細胞由来のmRNAにランダムにバーコードをつける技術を用いて、組織から数千～数万レベルの1細胞の位置情報を保持したまま遺伝子発現解析を行うことを目的としている。この微小組織片の自動採取システム開発によって得られた組織における細胞の位置情報により癌細胞等に対する創薬ターゲットの同定、診断基準の決定が可能となる。

具体的に右に示す工程を検討することで組織細胞の位置情報を保持して1細胞遺伝子発現情報を取得する。①、②細胞採取装置のニードル、または格子状細胞打ち抜き装置で生きたままの組織を単離、③打ち抜いた組織/細胞片をプレートに移し、続いて組織を酵素により消化し単一細胞化、④マイクロウェルを格子状に仕切り、仕切られたエリアを2次バーコード化する工程、⑤、⑥包括的1細胞トランスクリプトーム解析(Nx1-Seq)を行う。本年度の研究は以下の実施項目で行った。



1)解析用マイクロウェルの改良および細胞採取装置の開発

工程①、②において、前年度に作製した細胞採取装置(打ち抜き法)について動作確認、さらに格子状分取法に関しては、デバイスの試作とその評価実験を主に行なった。その結果、打ち抜き法、格子分取法共に形状に合致した切断組織片が得られた。しかしながら、組織の状態によって打ち抜きが困難なこともあり、条件等さらなる検討が必要である。一方、染色法を用いた採取対象組織片の位置決めに関しては、装置の画像解析ソフトウェアを開発中である。

さらに切断後の組織断片を1細胞に分散させるプレートに移動させる手段として真空吸着エアピンの利用が有効であることが示された。

工程④に関して、解析デバイス(PDMS製)表面の親水性長期間保持のための条件を、PDMS表面への薄膜形成処理により親水性の付与、および長期間保持が可能かどうかを検討した。その結果、親水性は酸化ケイ素膜>シリコン窒化膜>アモルファスシリコン薄膜、の順となり、酸化ケイ素膜が最も高い親水性を示した。さらに、分画デバイス(図2)と、このデバイス分画格子への細胞懸濁液分注を自動で行う分注装置の試作も行った。

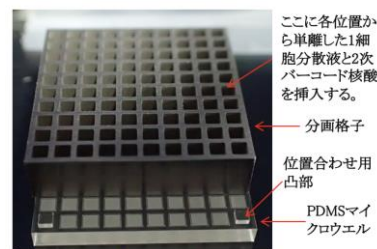


図2. デバイス分画格子

2)組織の包括的1細胞の解析とクラスタリング法による細胞の分類

昨年に引き続き、本年度は実際にビブラトームを用いた組織切片の作成方法と酵素処理に関して条件検討を実施した。その結果、特定の細胞においては生存率、細胞分散共に良好な結果を示した、さらに大腸がん組織では分散後の凍結保存検体であっても、1細胞遺伝子発現解析は可能であることが判明した。一方、Nx1-seqにより得られた大腸がん、肝細胞がんの階層的な分類手法の適用と評価、細胞系譜の可視化手法の確立を実施した。