

「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

H29 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
 - ・ヒトがん組織(大腸癌、腎細胞癌、乳癌、舌癌、悪性黒色腫)からの単細胞単離
 - ・ヒトがん組織からの単細胞分離法の最適化

(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 (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)

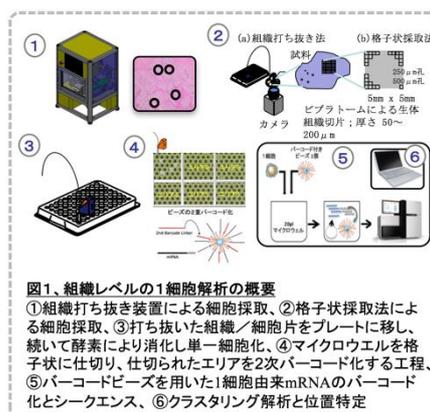
② 研究項目

・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、我々が開発した1細胞由来の mRNA にランダムにバーコードをつける技術(Nx1-Seq)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。この微小组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)細胞採取装置の開発及び解析用マイクロウェルの改良

昨年に引き続き、工程①、②において、打ち抜き法及び格子状法による細胞採取装置の開発を行った。また、本年度は打ち抜く場所の位置情報を担保する画像位置合わせソフトも合わせて開発した。打ち抜き法においては、ニードルによる細胞採取装置の試作が終了し、多くの組織による採取が可能であることが確認できた。一方、これまでに試作した格子状デバイス(金属メッシュタイプ)は、メッシュ構造部分の厚さが0.2mmと薄いため、物理的な強度が低く、組織切片を格子状デバイスに押し付ける際にあまり大きな力で押し付けることが出来ず、組織片の切れ残りが多く生じていた。そこで、本年度は格子状デバイスの物理的強度を上げることを目的とし、細穴加工とワイヤー加工によるデバイスの厚みを増大した改良型格子状デバイスの試作検討を行った。これにより、高い強度を持つデバイスとなり様々な組織を含む腫瘍組織であっても、良好な組織片切断が可能であることを確認できた。実際に試作した改良型格子状デバイスを用いて、マウス乳がん組織より作製した腫瘍組織の未固定組織切片(厚さ:200 μ 固)に対して、組織断片の切り出しを実施した。

工程④に関して、解析デバイス(PDMS製)は空気中の酸素により長期保存することが困難であった。そこで、特定のゼラチンによるゾル-ゲル相転換現象を利用して解析デバイスを空気中から保護した結果、親水性長期間保持が可能となり課題解決がなされた。

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

昨年引き続き、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。組織の状態により分散条件が異なると予想されることから、本年度は大腸がん、悪性黒色腫、肝細胞がん、乳がん、頭頸部がんの組織検体を各種の酵素で消化し、酵素の種類と消化方法の最適条件について解析した。また、大腸がんと悪性黒色腫、肝細胞がんにおいてはNx1-seqにより1細胞の遺伝子発現解析を実施し、各細胞の特徴遺伝子抽出手法の検討による階層的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。

代表的な原著論文

Hashimoto, S., et al., Comprehensive single-cell transcriptome analysis reveals heterogeneity in endometrioid adenocarcinoma tissues. *Sci Rep.*
doi:10.1038/s41598-017-14676-3, (2017)