

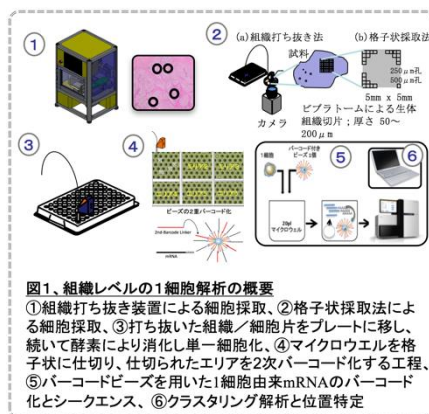
橋本 真一

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. 研究成果の概要

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)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、ニードル及び格子状細胞打ち抜き法による細胞採取装置の開発を行った。また、実際のサンプルを用いた評価を通して細胞採取装置および解析方法の最適化を行った。ニードル組織打ち抜き装置に関しては昨年度までに完成しているが、機器が大きく高価で汎用性に乏しいことが欠点である。一方で格子状採取装置に関しては、小型化、汎用性があり安価であることから上市が可能であると考えられる。これまでの格子状採取装置は、当初は超硬材

で製作したが耐久性が弱かったので、本年度はステンレスまたは腐食耐クロムダイを用いたデバイスに改良した。これらを用いて、マウス腫瘍組織及び臨床検体を用いて評価試験を実施し、実際には1 mm から1.5 mm 角の格子状デバイスにより腫瘍組織を分画して、包括的1細胞解析を実施したところ、微小環境の違いが得られた。ユーザー利用の観点から、より簡便な組織片回収が可能となる組織片切断・回収装置(又は、器具)を試作し、現状では、手動で押し付けるハンコ型、ハンドプレスに搭載する方法などを開発した。加えて格子状デバイスに関する位置合わせソフトに関しては、まず生組織を墨汁などで最低2点マーキングするだけで、生組織と事後の各種免疫画像を合致できる簡易的な位置合わせソフトを構築した。

工程③にあたる微小組織片より効率よく単一細胞化する上で、組織の微細化方法や組織毎の酵素処理条件及び Percoll などによる分散化組織の洗浄などの検討が必要であり、昨年に引き続き行った。

工程④では、バーコードビーズが入ったマイクロプレートは区画化され、区画ごとにバーコードビーズはさらに2次バーコードで標識した後、包括的1細胞トランスクリプトーム解析を行う。この1次バーコードは細胞を示し、2次バーコードは組織片から採取した細胞の位置情報を示す。しかし現状では100箇所程度の部位取得が現実的であり、すでに製作した区画化されたデバイスよりむしろ現在使用している1細胞解析デバイス(PDMSプレート)を小さくしようと考えた。そこで3Dプリンタを用いて1 cm x 1 cm 直方体または直径1cmの円柱など多様なサイズの使い捨て型のプレートを試作して検証した。その結果、組織細胞量によるプレートのサイズがそれぞれ決定され、幅広い応用が可能となった。

工程⑤のバーコードビーズについても、バーコードの塩基配列、ビーズの素材に関する検討を行い、細胞バーコードに関しては 4^{12} (通り)ではなく $9 \times 9 \times 9$ の細胞バーコードを使用した方がシーケンサーを考慮し使用できるread数が多いことが明らかとなった。

工程⑥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に関しては昨年に引き続き、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、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・書籍】

1. Yutaka Suzuki, "Single Molecule and Single Cell Sequencing", Advances in Experimental Medicine and Biology, Springer Singapore, Series Volume 1129, 150 pages, 2019
2. Masahide Seki, Eri Katsumata, Ayako Suzuki, Sarun Sereewattanawoot, Yoshitaka Sakamoto, Junko Mizushima-Sugano, Sumio Sugano, Takashi Kohno, Martin C Frith, Katsuya Tsuchihara, Yutaka Suzuki, "Evaluation and application of RNA-Seq by MinION", DNA Research. 2019; 26: 55-65.

§ 2. 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
 - ・がん組織構成細胞の解析
 - ・微小片組織採取デバイスの開発

(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
 - ・ヒトがん組織からの単細胞分離法と位置情報保持の最適化
 - ・ヒトがん組織からの単細胞遺伝子発現解析

(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
 - ・Nx1 システムと他のシステムのデータの比較
 - ・Nx1 システムと長鎖シーケンス技術の融合等、一連の新規技術開発
 - ・Nx1 システムの臨床検体への応用に向けての検討

(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 (国立遺伝学研究所ゲノム・進化研究系 准教授)
- ② 研究項目
 - ・組織1細胞データの取得
 - ・クラスタリングソフトの開発
 - ・データ解析

(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
 - ・微小片採取装置デバイスの研究