

二階堂 愛

理化学研究所生命機能科学研究センター
ユニットリーダー

臓器・組織内未知細胞の命運・機能の 1 細胞オミクス同時計測

§ 1. 研究成果の概要

本課題は、臓器・組織は、そこに含まれる幹細胞の増殖や死、分化により、細胞が置き換わり、機能が維持される。しかし、臓器によっては、幹細胞の発見や機能解析が進んでいない。そこで、臓器・組織の細胞へ 1 細胞ずつ異なる目印をつけて、その命運を追跡しつつ、同時に細胞機能を計測する技術を開発する。これにより様々な臓器から未知幹細胞を同定し、その機能を知ることで、健康な臓器を誰もが維持できる社会を目指す。

(二階堂 G)

本年度は、幹細胞の 1 細胞レベルの長期追跡を可能とするため、(1)高出力 1 細胞 RNA-seq 法開発、(2)1 細胞長期追跡法の開発を、昨年度に続き実施した。また、上野グループとの連携をさらに深めるため、上野グループへの 1 細胞採取技術の移転と、二階堂グループでの 1 細胞 RNA-seq の実施を進めた(3)。

(1)については、昨年度までに開発した、マルチウェルプレートを利用したハイスループット型 1 細胞 RNA-seq 法のベンチマーキングを進めた。Human Cell Atlas の一環として、ハイスループット型 1 細胞 RNA-seq法の国際的なベンチマークコンテストが実施され、アジア・オセアニアで唯一招待参加した。主催者から送られてきた細胞カクテルを我々のラボでソーティングし、1 細胞 RNA-seq 法で数千細胞のデータを取得し、その結果を主催者に送った。この結果は、世界中の 1 細胞 RNA-seq 開発者によって得られたデータと比較され、現在、論文投稿準備中である。

Human Cell Atlas のように大量の 1 細胞遺伝子発現データを収集する国際プロジェクトが開始しているが、これらのデータと各研究者がデータを比較しやすいよう、1 細胞遺伝子発現に基づいた細胞類似性検索エンジンを開発した(Sato K. et al. Genome Biol. 2019)。このアルゴリズムは、世界最高精度・最高速度・省メモリを達成した。

(2)については、遺伝子組み換え技術等を用いて、細胞を長期に標識する方法の開発を進めた。

(3)については、昨年度は 384 ウェルプレートベースの 1 細胞ソーティング技術を移転した。この方法を用いて、上野 G で作製した複数種類の臓器由来オルガノイドを、上野 G で 1 細胞ソーティングを実施した。その後、二階堂 G へ輸送後し 1 細胞 RNA-seq を実施した。これにより連携可能であることを示した。これらの結果の一部は、論文を投稿し、現在査読中である。

【代表的な原著論文】

1. Kenta Sato, Koki Tsuyuzaki, Kentaro Shimizu, Itoshi Nikaido. CellFishing.jl: an ultrafast and scalable cell search method for single-cell RNA-sequencing. **Genome Biology**. 20:31. 2019.

(上野 G)

本年度は、超多色蛍光コーディングマウス(Fluoro-coding マウス)の開発を継続している。

前年度に蛍光コードとする蛍光タンパク質 cDNA を複数作製し、MDCK 細胞に transfection して発現蛍光タンパク質の発現を確かめることで、使用可能な組み合わせを選定し、ターゲティングベクターの構築を進めた。

Fluoro-coding マウスが完成した際には、6色の蛍光タンパク質と5種類の細胞内局在を組み合わせた 1000 色の細胞を識別しなくてはならないが、機械学習による自動識別を行うために、10 色の蛍光タンパク質を発現した組織、オルガノイド、また 5 種類の局在を有する MDCK 細胞を用いて機械学習の予備的検討を進めた。

また、前年度までの研究において、オルガノイドおよび組織の single-cell RNA-seq および多色細胞系譜追跡法にて、味蕾幹細胞、食道上皮幹細胞を同定した。本研究計画においては、オルガノイドの解析を通じて全身の未同定の成体幹細胞を同定することになっている。そのため、成体幹細胞が未同定である口腔上皮、扁桃上皮、喉頭上皮オルガノイド培養系を確立し、予備的検討を進めた。

§ 2. 研究実施体制

(1)「二階堂」グループ(研究機関別)

- ① 研究代表者:二階堂 愛 (理化学研究所生命機能科学研究センター、ユニットリーダー)
- ② 研究項目
 - ・1 細胞の長期追跡とマルチオミクス計測法の開発

(2)「上野」グループ(研究機関別)

- ① 主たる共同研究者:上野 博夫 (関西医科大学医学部、教授)
- ② 研究項目
 - ・超多色蛍光コーディング法開発