

橋本 真一

和歌山県立医科大学医学部先端医学研究所
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

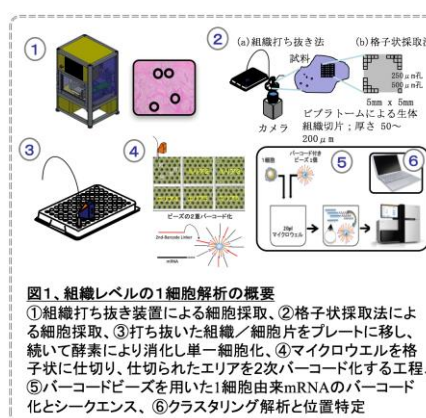
§ 1. 研究成果の概要

腫瘍組織を構成する様々な細胞集団(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。どの細胞集団が起因となり、腫瘍組織を構成するのか、という疑問だけではなく、その腫瘍組織に免疫担当細胞がどのように浸潤し、あるいはなぜ免疫担当細胞が浸潤しないのか、などを解決できる。そのためには組織において個々の細胞の場所(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。この位置情報を保持したまま微小組織片を採取するシステム開発により、がん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。

前年度までに右に示す概略を基にして、位置情報を保持したまま1細胞遺伝子発現解析を実施することが可能になった。具体的な工程は、①,② ビプラトームなどで新鮮な腫瘍組織を薄切し、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 打ち抜いた組織片をプレートに移し、酵素により消化して1細胞化、④ サイズの小さいマイクロウェルを打ち抜いた組織片分、準備する、あるいは格子状に仕切り、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)を行うものである。

本年度は、これら一連の中で②の格子状採取法の改良及びレバー式デバイスプレス装置の開発と、④にあたる細胞をマイクロウェルに播種するデバイスの開発、⑥にあたる大規模発現データ比較のための手法の比較検討とその結果による最適化を進め解析の精度及び再現性、効率化を



進めた。②に関して、昨年度までに開発したハンドプレス型の格子状採取装置は強力かつ均一な力で組織を区画化できる一方、重量があり汎用性が低かった。本年度に開発したレバー式の形状改良型格子状デバイス及び切断圧可視化ユニットの利用により、組織切片からの微小组織片作製の工程を再現性および安定性高く、簡便に実施することが可能な組織切片切断方法の基盤を確立した。

また腫瘍組織の位置情報の違いによる細胞集団の同定を実施するため、ヒト大腸がん、乳がんなどを用いた臨床研究へ移行した。マウス組織よりも手術残余検体は、そのサイズ、組織の場所により適切な1細胞分散処理の条件検討が必要となる。本年度は10例程度の手術検体に対して分散条件の検討を行い、包括的1細胞遺伝子解析を実施した(和歌山県立医大、札幌医大、東京大)。

【代表的な原著論文】

1. Tabuchi Y, Hirohashi Y, Hashimoto S, Mariya T, Asano T, Ikeo K, Kuroda T, Mizuuchi M, Murai A, Uno S, Kawai N, Kubo T, Nakatsugawa M, Kanaseki T, Tsukahara T, Saito T, Torigoe T, “Clonal analysis revealed functional heterogeneity in cancer stem-like cell phenotypes in uterine endometrioid adenocarcinoma”, *Exp Mol Pathol*. 2019 Feb; 106:78–881.

§ 2. 研究実施体制

(1) 和歌山県立医科大学グループ

- ① 研究代表者:橋本 真一 (和歌山県立医科大学医学部先端医学研究所 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
 - ・がん細胞/組織の包括的 1 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
 - ・ヒトがん組織からの 1 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 1 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
 - ・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
 - ・がん細胞/組織の包括的 1 細胞の解析

(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・システム研究機構生命情報研究センター 准教授)
- ② 研究項目
 - ・包括的 1 細胞トランスクリプトーム解析と組織多様性のバイオインフォマティクス
 - ・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:田邊 麻衣子 ((株)日立製作所研究開発グループ基盤研究センター 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開発及びデバイスの研究