

多細胞間での時空間的相互作用の理解を目指した定量的解析基盤の創出
2021 年度採択研究代表者

2021 年度
年次報告書

新宅 博文

理化学研究所 開拓研究本部
理研白眉研究チームリーダー

RNA movie による多細胞運命分岐のダイナミクスアノテーション

§ 1. 研究成果の概要

これまでのオミックス解析の多くはエンドポイント解析、すなわち計測のために対象の細胞や組織の生命活動を中断させる必要があった。本研究では、ナノ電場を利用した低侵襲分子サンプリング技術、それに基づくオミックス動画(RNA movie)撮影技術を開発し、転写制御ネットワークを動画で理解する枠組みを構築する。そして、RNA movieを通して、疾患・発生機構における重要な運命分岐ダイナミクスに関する理解の深化を目指す。2021年度は、RNA movie撮影技術の、要素技術であるナノエレクトロポレーションによる非破壊的 mRNA 抽出法の条件検討、光学的に読み出しが可能なカラーコード付きハイドロゲルビーズの開発、および空間トランスクリプトームの実現のためのライブラリ作製法の開発をそれぞれ進めた。細胞周期への摂動を最小化しつつ RNA の採取を可能にするナノエレクトロポレーション条件を探索し、2.5 時間間隔、合計 4 回の RNA 採取が可能な条件を特定した。HeLa 細胞の場合、細胞周期を乱すことなく 1 回あたり total RNA 換算でおよそ 0.83 pg 採取できる。採取した RNA を鋳型として次世代シーケンスライブラリを作製したところ、有効なシーケンスリードが取得でき、また細胞周期を厳密に定義した 100 細胞を使った RNA-seq 結果とも整合性の高いデータが得られた。マウス大腿骨から造血幹細胞を採取し、polyvinyl alcohol(PVA)を用いた拡大培養を2週間にわたって実施した。そして造血幹細胞を含む拡大培養細胞群に対してナノエレクトロポレーションを実施し、細胞生存率を維持しつつも細胞膜に一過的な微小孔を形成する電圧条件を探索した。がん細胞と組織構成細胞の相互作用を標識する sGRAPHIC を活用した 1 細胞 RNA-seq 解析を進めた。マウス肝転移病巣においてがん細胞と相互作用した肝細胞を単離するプロトコルを開発し、がん細胞との相互作用の結果 GFP 標識された肝細胞を FACS により単離し、1 細胞 RNA-seq 解析を進めた。

§ 2. 研究実施体制

(1) 新宅グループ

- ① 研究代表者:新宅 博文 (理化学研究所 開拓研究本部 理研白眉研究チームリーダー)
- ② 研究項目
 - RNA movie 技術開発と検証
 - RNA flowmetry
 - RNA movie に基づくダイナミクス解析

(2) 阪上-沢野グループ

- ① 主たる共同研究者:阪上-沢野 朝子 (理化学研究所 脳神経科学研究センター 研究員)
- ② 研究項目
 - 高時間分解能型細胞周期プローブ:Fucci3.2:CCRainbow の開発と応用
 - RNA movie による endoreplication 現象の探求

(3) 錦井グループ

- ① 主たる共同研究者:錦井 秀和 (筑波大学 医学医療系 准教授)
- ② 研究項目
 - 低分子化合物を用いた新規ヒト HSC 増幅システムの構築
 - RNA movie によるヒト HSC の階層ゆらぎの定量
 - HSC→Meg-biased HSC-Meg 増幅システムの構築と分化能変動の可視化

(4) 口丸グループ

- ① 主たる共同研究者:口丸 高弘 (自治医科大学 データサイエンスセンター 講師)
- ② 研究項目
 - RNA movie によるがん関連線維芽細胞の起源
 - 生体組織の細胞間相互作用オミックス解析に基づくがん関連線維芽細胞の機能
 - 多重近赤外発光イメージングによるがん関連線維芽細胞の生体内動態