

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域  
「統合 1 細胞解析のための革新的技術基盤」  
研究課題  
「細胞チップ MS システムを用いた  
1細胞マルチ分子フェノタイピング」

研究終了報告書

研究期間 2015年10月～2021年3月  
(新型コロナウイルス感染症の影響を受け2021年9月まで延長)  
(1年追加支援により、2022年3月まで延長)

研究代表者:馬場 健史  
(九州大学生体防御医学研究所、  
教授)

## § 1 研究実施の概要

### (1) 実施概要

本研究では、「**①** 1細胞分離・特性計測プラットフォーム開発」、「**②** 高感度マルチ分子フェノタイプング基盤技術開発」、「**③** システムの統合・汎用化」、「**④** マルチ分子フェノタイプングによる細胞多様性解析」の各研究題目に取り組み、世界的に前例のない1細胞マルチ分子フェノタイプング解析プラットフォーム(1細胞プロテオーム解析および1細胞メタボローム解析)を構築した。

「**①** 1細胞分離・特性計測プラットフォーム開発」においては、山村 G によって、「1細胞チップの開発」、「1細胞チップにおける特性計測技術の開発」が完了し、馬場 G、松本 G と連携しながら、「1細胞回収システム」のさらなる設計と作製を行い、1細胞チップから1~100個程度の標的単一細胞を半自動的に回収できるシステムの開発に成功した。さらに、馬場 G、松本 G によって、回収した細胞内の代謝物あるいはタンパク質をロスなく調製するために、微小空間内で前処理操作が可能なナノピペットデバイス(フューズドシリカキャピラリー内に充填剤等を担持させたもの)の開発にも成功した。「**②** 高感度マルチ分子フェノタイプング基盤技術開発」では、分析システムの高感度化を達成するために、「カラム内径のダウンサイジング(馬場 G、松本 G)」、「マイクロ流路分離デバイスの開発(向 G)」、「イオン化・MS部分(MSへのイオン導入の効率化)(向 G、馬場 G、松本 G)」の開発を進めた。実際に、典型的な動物1細胞(HeLa 1細胞)から比較的内生量の多い代謝物およびタンパク質の検出が可能な超高感度計測システムを構築した。また、株式会社島津製作所より、分析の短時間化と堅牢性に優れ、一般のユーザーでも活用しやすい高感度のLCシステムNexera Mikrosを2018年1月に上市した。「**③** システムの統合・汎用化」においては、課題**①**および課題**②**で開発した要素技術の統合をチーム全体(馬場 G、松本 G、山村 G、向 G)で取り組み、1細胞~少数細胞からのマルチ分子フェノタイプング解析プラットフォームを構築した。「**④** マルチ分子フェノタイプングによる細胞多様性解析」の課題については、開発したマルチ分子フェノタイプング解析プラットフォームを用いて、個々の細胞の多様性評価を行った(馬場 G、松本 G、山村 G)。

新型コロナウイルス感染症の影響を受け6ヶ月間研究期間を延長し、本CREST領域内外のグループとの共同研究を推進した(課題**④**)。また、個々の細胞の多様性を明らかにするために、1年間研究期間を延長し、N数を増やして細胞周期を加味した1細胞マルチ分子フェノタイプ解析を実施した(課題**④**)。さらに、微小切片組織あるいは少数細胞からのマルチオミクス解析(核酸、タンパク質、代謝物)を達成するためのサンプル調製法についても検討を行った(課題**③**)。



本研究で開発した各種装置およびそれらを統合したマルチ分子フェノタイプング解析システム

## (2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

### 1. 1 細胞チップを用いた細胞特性計測および 1 細胞回収技術の開発 (原著論文 11、32)

概要: 浮遊性および接着性の各種がん細胞を 1 細胞に分離し、抗体多重染色後、標的 1 細胞のみを回収できる 1 細胞チップを開発した。また、1 細胞チップ上に配置した細胞の中で、特徴的な 1~100 細胞を迅速かつ半自動で回収可能な 1 細胞回収システムの開発にも成功した。

### 2. 極小内径キャピラリーカラム調製技術の開発と性能評価 (原著論文 10、17、23)

概要: 内径 30  $\mu\text{m}$  以下の極小内径キャピラリー内でのモノリス型シリカ分離媒体の調製およびその性能評価を実施した。内径 15  $\mu\text{m}$  のモノリス型シリカカラムを用いたナノフロー液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (Nano-LC/MS/MS) により、1 amol 以下の検出感度で標準ペプチドが検出できたことから、カラムダウンサイジングによる飛躍的な感度向上が可能であることが例示され、超高感度のプロテオーム分析法の基盤技術が整った。

### 3. 1 細胞マルチ分子フェノタイプ解析システムの開発 (原著論文 24、29)

概要: 一般的な動物 1 細胞からのメタボロームおよびプロテオーム解析を可能にするために、(1) 顕微鏡下で標的とする細胞を迅速に単離する技術、(2) サンプルロス低減のための微小空間内での前処理技術、(3) Nano-LC/MS/MS による高感度分析、(4) 微量試料を分析系に導入する技術を統合した 1 細胞マルチ分子フェノタイプ解析システムの開発に成功した。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

### 1. 感度とスループットの両方の特徴を兼ね備えたマイクロ流量 LC/MS システム「Nexera™ Mikros」の上市 (国際特許出願 PCT2~PCT9)

概要: Nexera Mikros は、2018 年 1 月 29 日に株式会社島津製作所より上市したマイクロ流量 LC/MS システムである。本装置は、100~500  $\mu\text{L}/\text{min}$  程度の流量範囲で測定するセミマイクロ LC/MS システムよりも目的成分を高感度に検出でき、かつ一般のユーザーでは取り扱いが難しい数 10 nL/min~1  $\mu\text{L}/\text{min}$  の流量範囲で測定するナノ-LC/MS システムと比べて分析の短時間化と堅牢性に優れている。

### 2. 細胞単離・回収システムと細胞試料前処理デバイスの開発

概要: 1 細胞チップにて分離、蛍光を指標に特性計測した個々の細胞をユーザーの目的に応じて 1~100 個、迅速に回収可能な細胞回収システムの開発を進めている。プロジェクト終了後には、1 細胞回収システムの開発を連携して進めたヨダカ技研株式会社から 1 細胞分子フェノタイプ解析に資する「改良版の 1 細胞ピッキング装置 (超微小液量操作ピッキング TOPick システム)」や「1 細胞マイクロアレイチップ」を販売開始する予定である。

### 3. 新規 LC/MS/MS 分析法による包括的な代謝物測定法の開発 (国内特許出願 JP2、JP3)

概要: 代謝物は、極性、電荷特性、分子量といった物性の範囲が幅広いいため、単一手法での包括的測定には至っておらず、第一選択となるメタボローム分析法の開発は未だ発展途上の段階であった。我々は親水性相互作用と陰イオン交換作用を連続的に組み合わせた親水性相互作用/陰イオン交換クロマトグラフィータンデム質量分析法 (Unified HILIC/AEX/MS/MS) を提案し、1 細胞メタボローム解析に資する分析法の開発に成功した。

<代表的な論文>

### 1. 定量プロテオミクス測定技術の開発 (原著論文 7)

概要: 世界で初めてゲノムワイドに作製した組換えタンパク質を用いて、大規模かつ超高感度にタンパク質の絶対定量を可能にする方法論である iMPAQT (in vitro proteome assisted

MRM for protein absolute quantification)を構築した。iMPAQT システムを用いることで、例えば、各代謝酵素の絶対量の算出が可能となり、がん細胞の悪性化等に伴う代謝酵素の発現変化を定量的に観測できるようになった。Matsumoto M, et al., A large-scale targeted proteomics assay resource based on an in vitro human proteome. Nat Methods. 14, 3, 251-258, 2017.

### 2. 1 細胞プロテオーム解析法の開発(原著論文 24)

概要:1 細胞ショットガンプロテオーム分析を行うために、試料調製中の損失が低く、消化効率の高い前処理法である ISPEC (in-line sample preparation for efficient cellular proteomics, ISPEC)を開発した。ISPEC 法と高感度 Nano-LC/MS/MS 分析法を組み合わせることで、少数細胞 (100, 10, 1 細胞) からのプロテオーム解析が可能となり、単一 HeLa から 60 個のタンパク質の同定に成功した。Hata K, et al., In-line sample processing system with an immobilized trypsin-packed fused-silica capillary tube for proteomic analysis of a small number of mammalian cells. Anal Chem. 92, 4, 2997-3005, 2020.

### 3. 1 細胞メタボローム解析法の開発(原著論文 29)

概要:1 細胞プロテオミクスと同様の戦略で、1 細胞メタボロミクスに資する細胞前処理および Nano-LC/MS/MS 分析法を開発した。さらに、22 個の単一 HeLa 細胞のメタボロームデータを用いて階層的クラスタ分析を行った結果、細胞の間に代謝レベルで一定の類似度を示すサブクラスが複数存在することを示した。Nakatani K, et al., An analytical system for single-cell metabolomics of typical mammalian cells based on highly sensitive nano-liquid chromatography tandem mass spectrometry. Mass Spectrometry, 9, 1, A0080, 2020.

## § 2 研究実施体制

### (1) 研究チームの体制について

#### ①「馬場」グループ

- ・研究代表者:馬場 健史(九州大学生体防御医学研究所 教授)
- ・研究項目

##### ①:1 細胞分離・特性計測プラットフォーム開発

- ・3) 1 細胞回収・プロセス技術の開発
- ・4) ナノピペットシステムの設計

##### ②:高感度マルチ分子フェノタイピング基盤技術開発

- ・1) 分析システムの高感度化開発:カラム内径のダウンサイジング
- ・3) 分析システムの高感度化開発:イオン化・MS 部分
- ・4) 高感度メタボローム分析技術の開発:試料プロセスの微小化
- ・6) 微量試料直接導入システムの開発

##### ③:システムの統合・汎用化

- ・1) システム統合・最適化:細胞チップ MS システムの開発
- ・2) 微小切片組織からのマルチオミクス解析のためのサンプル調製法の開発

##### ④:マルチ分子フェノタイピングによる細胞多様性解析

- ・1) マルチ分子フェノタイピングによる細胞多様性解析
- ・2) 細胞周期を加味したマルチ分子フェノタイピングによる細胞多様性解析

#### ②「松本」グループ

- ・研究代表者:松本 雅記(新潟大学医歯学総合研究科 教授)
- ・研究項目

##### ①:1 細胞分離・特性計測プラットフォーム開発

- ・3) 1 細胞回収・プロセス技術の開発
- ・4) ナノピペットシステムの設計
- ②: 高感度マルチ分子フェノタイピング基盤技術開発
- ・1) 分析システムの高感度化開発: カラム内径のダウンサイジング
- ・3) 分析システムの高感度化開発: イオン化・MS 部分
- ・5) 高感度プロテオーム分析技術の開発: 試料プロセスの微小化
- ・6) 微量試料直接導入システムの開発

③: システムの統合・汎用化

- ・1) システム統合・最適化: 細胞チップ MS システムの開発
- ・2) 微小切片組織からのマルチオミクス解析のためのサンプル調製法の開発

④: マルチ分子フェノタイピングによる細胞多様性解析

- ・1) マルチ分子フェノタイピングによる細胞多様性解析

### ③「山村」グループ

・研究代表者: 山村 昌平(産業技術総合研究所健康医工学研究部門 研究グループ長)

・研究項目

①: 1 細胞分離・特性計測プラットフォーム開発

- ・1) 1 細胞チップの開発
- ・2) 1 細胞チップにおける特性計測技術の開発
- ・3) 1 細胞回収・プロセス技術の開発

③: システムの統合・汎用化

- ・1) システム統合・最適化: 細胞チップ MS システムの開発
- ・2) 微小切片組織からのマルチオミクス解析のためのサンプル調製法の開発

④: マルチ分子フェノタイピングによる細胞多様性解析

- ・1) マルチ分子フェノタイピングによる細胞多様性解析

### ④「向」グループ

・研究代表者: 向 紀雄((株)島津製作所分析計測事業部 ビジネスユニット長)

・研究項目

②: 高感度マルチ分子フェノタイピング基盤技術開発

- ・2) 分析システムの高感度化開発: マイクロ流路分離デバイスの開発
- ・3) 分析システムの高感度化開発: イオン化・MS 部分

③: システムの統合・汎用化

- ・1) システム統合・最適化: 細胞チップ MS システムの開発
- ・2) 微小切片組織からのマルチオミクス解析のためのサンプル調製法の開発

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

本研究プロジェクトでは、株式会社島津製作所より、高感度かつ汎用的な LC/MS 分析系であるマイクロ流量 LC/MS システム「Nexera™ Mikros」を上市し、1 細胞分子フェノタイプ解析のための 1 細胞回収システムはヨダカ技研株式会社と共同で開発した。また、1 細胞あるいは微量細胞試料からのマルチ分子フェノタイプ解析を波及させていくために、国内のアカデミアの生物系および臨床系の研究者とコンタクトを取り、現在、様々な応用研究を共同で取り組んでいる。さらに、本プロジェクトを通じて、日立化成テクノサービス株式会社と新規のメタボローム計測用のカラム担体を開発し、また、大陽日酸株式会社とは定量メタボロミクスに向けた基盤技術の構築を行った。

以上のことから、業界内のネットワークはアカデミアだけでなく、様々な企業や分析装置関連・試薬メーカー等多岐に渡ることから、今後、1 細胞解析研究を推進していくための産業界とのネットワークは既に形成できているといえる。