

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  
「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」

## 研究終了報告書

研究期間 2016年10月～2022年3月

研究代表者：二階堂 愛  
(国立研究開発法人理化学研究所  
生命機能科学研究センター、  
チームリーダー)

## § 1 研究実施の概要

### (1) 実施概要

本提案では、臓器・組織内で増殖する数千から数万個を、異なる RNA バーコード、蛍光タンパク質で標識、その系譜情報を 1 細胞解像度で追跡しつつ、同時に 1 細胞オミクスで機能解析できる技術の開発をする。そのために 2 つの技術を確立する。まず、組織由来の 1 細胞の機能や状態を同定する高精度な 1 細胞オミクス解析プラットフォームを開発する。具体的には高精度で高スループットな 1 細胞 RNA-seq 法やそのデータ解析手法を開発する。次に細胞命運を追跡するために、組織内の細胞を 1 つずつ標識する技術を開発する。本提案では DNA バーコードによる標識と蛍光タンパク質による標識する方法をそれぞれ確立する。これらの技術を利用して組織幹細胞の同定や命運追跡を行う。

1 細胞オミクスプラットフォームについては、高出力型 1 細胞 RNA-seq 法 Quartz-Seq2(Sasagawa Y. et al. Genome Biol. 2018)、世界初の完全長 Total RNA-seq 法 RamDA-seq の開発に成功した(Hayashi T. et al. Nature Comm. 2018)。Quartz-Seq2 は Humac Cell Atlas にて世界最高性能を示した(Mereu E. Nature Biotech, 2020)。この技術をもとにナレッジパレット株式会社を設立し国内外の製薬企業等(田辺三菱製薬、小野薬品工業、マルホ、Axceed Drug Discovery Partners など)と研究開発を行っている。現在シリーズ A で総額 7 億円の資金調達に成功している。RamDA-seq については特許をライセンス化することで東洋紡社から 1 細胞 RNA-seq 試薬、qPCR 試薬として発売された。

これらの 1 細胞 RNA-seq 法のデータを活かすべく、世界最速、最高精度の 1 細胞遺伝子発現に基づいた細胞類似性検索エンジンの開発 (Sato K. Genome Biol. 2019)、アトラス級の大規模 1 細胞 RNA-seq データを高速・省メモリで次元圧縮するアルゴリズムの開発とベンチマーキング (Tsuyuzaki K. et al. Genome Biol. 2019)、細胞間の相互作用を予測するためリガンドレセプターペアのデータベースと scRNA-seq のデータを統合する新しいアルゴリズム (Tsuyuzaki T. et al. BioRxiv, 2019)、細胞特異的発現を示すゲノム領域を発見するアルゴリズム (Matsumoto T. et al. NARGB, 2020)とその可視化ツール (Ozaki H. GMB Genomics, 2020)、転写因子ネットワーク予測(Matsumoto T. et al. Bioinformatics, 2017)の開発を行った。

細胞命運の追跡法については DNA 型と蛍光タンパク質型の 2 つの技術の開発を行った。DNA バーコード型についてはゲノム編集型と組み換えタンパク質型の開発を行った。その結果両方の方式で ES 細胞、オルガノイド、マウス個体でバーコード化を薬剤依存的に引き起こすことができた(Sato T. et al. in prep.)。現在疾患モデルマウスを利用して系譜解析と 1 細胞 RNA-seq を組み合わせる実験を行っている。さらに最後に局所空間情報や細胞系譜情報を付与したまま 1 細胞 RNA-seq 法実施する方法を共同開発した。これにより、細胞系譜と位置、トランスクリプトームを同時と捉えられた (Morimoto R. Nature. 2021)。

次に蛍光タンパク質の色と局在によって細胞を染め分けるバーコード技術 Fluoro-coding を開発した。特許の都合上詳細には示さないが、通常使われている蛍光タンパク質組み換えマウスと比較して細胞を標識する種類数を大幅に向上できた。現在、ES 細胞やマウス個体での検証を行っており、scRNA-seq でデコードできるかを確認し、論文を準備する予定である。

これまで開発してきた命運追跡法と 1 細胞 RNA-seq を利用し、複数の組織から新規幹細胞の同定に成功した。さらに再生がほぼ起きないと思われていた組織からの幹細胞同定に成功した。これらは論文投稿中である。

### (2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

#### 1. Human Cell Atlas にて Quartz-Seq2 が世界最高性能を達成

概要: 国際的なヒト 1 細胞アトラスプロジェクト「Human Cell Atlas」で行われた 1 細胞 RNA-seq 法のベンチマーク研究に日本から唯一招待され、Quartz-Seq2 が他の 13 手法と比較し世界最高性能であることが示された<sup>1)</sup>。特に遺伝子検出感度は他の 2-5 倍程度高く圧倒的な性能差であった。

## 2. 高精度・高出力型 1 細胞 RNA-seq 法 Quartz-Seq2 の開発に成功

概要: 1 細胞ごとの機能・命運を捉えるには、1 細胞ごとのトランスクリプトーム(機能)と命運バーコードを同時に、かつ、1 細胞ごとに計測する必要がある。本方法は、既存手法と比較して、同等のコストやスループットでありながら、検出遺伝子が 2.6 倍以上捉えられる世界最高精度の方法である。1 細胞 RNA を増幅するために付加するタグ付加効率を 3.6 倍に、逆転写酵素を 6%まで削減、細胞バーコード法による混合反応の 3 点により、高精度と低コストを同時に実現した。

## 3. 世界初の 1 細胞完全長 Total RNA-seq 法 RamDA-seq の開発

概要: 1 細胞ごとに、複数のオミクスを計測するために、RamDA-seq を開発した。この方法では、ポリ A RNA だけでなく、非ポリ A 配列を検出できる。また、それらの RNA の全長を得ることができる。このため intron も含む gene body に含まれる多型情報や RNA 構造異常、エンハンサー RNA を介した転写活性などの情報もトランスクリプトームと同時に得られる。1 細胞でトータル RNA を完全長でシーケンスできる技術はほかになく、競争の激しい 1 細胞 RNA-seq 開発のなかで、まったく新しい領域を開拓した。

### < 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

#### 1. Quartz-Seq2 を基礎とした創薬・再生医療等製品の研究開発のための会社を起業

概要: 本研究で開発された Quartz-Seq2 をもとに創薬や再生医療等製品の開発を目指すスタートアップ Knowledge palette, Inc. は 2018 年度に設立した。NEDO、川崎市などの支援、2021 年 3 月にシリーズ A ラウンド、2021 年 8 月に追加投資を受け、トータル 7 億円以上の資金調達を達成した。ジャパン・ヘルスケアベンチャー・サミット 2020 の審査員特別賞、Startup Pitch@CIC Deep Tech で優勝を獲得した。複数の国内外の製薬企業(田辺三菱製薬株式会社、小野薬品工業株式会社、マルホ、Axcelead Drug Discovery Partners 株式会社など)と共同開発をスタートしている。

#### 2. RamDA-seq 法の研究用試薬の上市と診断薬の開発

概要: RamDA-seq 法の特許を東洋紡株式会社へのライセンスを行い、定量 qPCR 試薬、1 細胞 RNA-seq 試薬、RNA 増幅用プライマーセットの 3 製品を 2019 年に上市した。定量 qPCR 試薬については、2021 年に出願した 2 件の特許を東洋紡社にライセンスし 2022 年 1 月に、より高感度で汎用性の高い試薬キットを上市した。本手法を用いたがん診断法の開発のため診断薬開発企業へのライセンスの契約を進めている。

#### 3. 周辺装置やソフトウェアの上市・受託サービスの展開

概要: 本研究で開発した 1 細胞 RNA-seq 法を運用するための分注器具、DNA 精製用マグネットスタンドの製品化に成功した。1 細胞採取に関しては SONY 社とセルソーターの 1 細胞 RNA-seq への改良に貢献した。また RamDA-seq の自動化のため Fluidigm 社 C1 への実装に成功した。そのほか秘密保持契約があるため詳細には述べないが 1 細胞採取装置や解析ソフトウェアの企業と共同開発を行っている。

### < 代表的な論文 >

#### 1.

概要: 1 細胞ごとの機能・命運を捉えるには、1 細胞ごとのトランスクリプトーム(機能)と命運バーコードを同時に、かつ、1 細胞ごとに計測する必要がある。本方法は、既存手法と比較して、同等のコストやスループットでありながら、検出遺伝子が 2.6 倍以上捉えられる世界最高精度の方法である。1 細胞 RNA を増幅するために付加するタグ付加効率を 3.6 倍に、逆転写酵素を 6%まで削減、細胞バーコード法による混合反応の 3 点により、高精度と低コストを同時に実現した。

Yohei Sasagawa, Hiroki Danno, Hitomi Takada, Masashi Ebisawa, Tetsutaro Hayashi, Akira Kurisaki, Itoshi Nikaido.

Quartz-Seq2: a high-throughput single-cell RNA-sequencing method that effectively uses limited sequence reads.

Genome Biology. 2018.

## 2.

概要: 1 細胞ごとに、複数のオミクスを計測するために、RamDA-seq を開発した。この方法では、ポリ A RNA だけでなく、非ポリ A 配列を検出できる。また、それらの RNA の全長を得ることができる。このため、このため intron も含む gene body に含まれる多型情報や RNA 構造異常、エンハンサーRNA を介した転写活性などの情報もトランスクリプトームと同時に得られる。1 細胞でトータル RNA を完全長でシーケンスできる技術はほかになく、競争の激しい 1 細胞 RNA-seq 開発のなかで、まったく新しい領域を開拓した。

Tetsutaro Hayashi\*, Haruka Ozaki\*, Yohei Sasagawa, Mana Umeda, Hiroki Danno and Itoshi Nikaido.

Single-cell full-length total RNA sequencing uncovers dynamics of recursive splicing and enhancer RNAs.

Nature Communications.

## 3.

概要: 国際的なヒト 1 細胞アトラスプロジェクト「Human Cell Atlas」で行われた 1 細胞 RNA-seq 法のベンチマーク研究に日本から唯一招待され、Quartz-Seq2 が他の 13 手法と比較し世界最高性能であることが示された。特に遺伝子検出感度は他の 2-5 倍程度高く圧倒的な性能差であった。

Elisabetta Mereu, Atefeh Lafzi, Catia Moutinho, Christoph Ziegenhain, Davis J. McCarthy, Adrian Alvarez, Eduard Batlle, Sagar, Dominic Grün, Julia K. Lau, Stéphane C. Boutet, Chad Sanada, Aik Ooi, Robert C. Jones, Kelly Kaihara, Chris Brampton, Yasha Talaga, Yohei Sasagawa, Kaori Tanaka, Tetsutaro Hayashi, Caroline Braeuning, Cornelius Fischer, Sascha Sauer, Timo Trefzer, Christian Conrad, Xian Adiconis, Lan T. Nguyen, Aviv Regev, Joshua Z. Levin, Swati Parekh, Aleksandar Janjic, Lucas E. Wange, Johannes W. Bagnoli, Wolfgang Enard, Marta Gut, Rickard Sandberg, Itoshi Nikaido, Ivo Gut, Oliver Stegle, Holger Heyn.

Benchmarking Single-Cell RNA Sequencing Protocols for Cell Atlas Projects.

Nature Biotechnology. 06 April 2020.

## §2 研究実施体制

### (1) 研究チームの体制について

#### ① 「二階堂」グループ

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 チームリーダー)

研究項目

- ・細胞命運バーコードの開発
- ・1 細胞マルチオミクス計測法の開発

#### ② 「上野 博夫」グループ

主たる共同研究者: 上野 博夫(国立循環器病研究センター病態代謝部 客員研究員)

研究項目

- ・多色蛍光コーディングと 1 細胞・in situ イメージング法によるオミクスデータの検証

・マウス個体・オルガノイドを用いた成体幹細胞の同定と機能解析

(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

蛍光タンパク質型の命運追跡バーコードの画像からのデコードについては、舟橋啓(慶應義塾大学 理工学部 生命情報学科 准教授)らと共同で進めている。光変換蛍光タンパク質による命運追跡は理研 BDR の藤原研と共同研究を行っている。

Quartz-Seq2 のベンチマーキングについては Human Cell Atlas の一環として実施されており、スペインの CNAG-CRG、スウェーデンの Karolinska Institute、UK とドイツの EMBL、ドイツ Max-Planck-Institute と Max Delbrück Center、US の 10x Genomics、Fluidigm、Stanford Univ.、Bio-Rad 社、Broad Institute、MIT、Harvard Univ. などと共同で実施した。

現在、我々の開発した実験・データ解析技術をもとに、熊大、医科歯科大、慶応大、東大、京大、筑波大、新潟大、奈良先端大、リヨン第一大、ケンブリッジ大、国立がん研究所、かずさ DNA 研、理研、東農大、順天堂大、北大、富山大、遺伝研、藤田医科大、徳島大と共同研究を行っている。さらに国内外の 8 社と共同開発を進めている。