

日本医療研究開発機構 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 事後評価報告書



I 基本情報

補助事業課題名：（日本語）創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業

（プログラム名）（英語）Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research

実施期間：平成29年4月1日～令和4年3月31日

補助事業担当者 氏名：竹山 春子

Haruko Takeyama

補助事業担当者 所属機関・部署・役職：

（日本語）早稲田大学・理工学術院・教授

（英語）Waseda University・Faculty of Science and Engineering・Professor

II 補助事業の概要

多細胞生物において個々の細胞は独立して存在するのではなく、周囲を取り巻く細胞や細胞外成分と協調して機能を発揮している。これらの空間的な位置関係と細胞・組織としての機能には深い関わりがある。昨今のシングルセル解析技術の発展により、個々の細胞の遺伝子発現の多様性を明らかにできるようになった。細胞・組織の形態に多様性があるように、遺伝子発現にも多様性・不均一性がある。不均質な細胞が、空間的に制御された組織の中で複雑に相互作用することで生物学的、生理学的な役割を果たしていることを意味する。すなわち、空間的情報は組織・器官における遺伝子発現情報の理解を深める必須の情報である。

我々は、シングルセルレベルもしくは数十細胞からなる微小組織レベルでの遺伝子発現情報と空間情報を紐付けて包括的に捉えることが、薬物治療抵抗性の制御機構の理解や、疾病における特異的マーカー遺伝子の探索などの病態理解・創薬研究において有用であると考えてきた。本課題では、基礎生命現象の統合的理解や、臨床有用性の高い創薬標的の同定と検証を目指した研究の「支援」を実施した。具体的には、早稲田大学・和歌山県立医科大学で研究代表者・分担者が開発してきた 1細胞トランスクリプトーム解析、または、早稲田大学が開発した 微小組織トランスクリプトーム解析 を支援メニューとして提供した。これに加え、微小液滴に細胞を封入し液滴内で溶菌およびゲノム増幅を行う、微生物1細胞ゲノム解析の支援を2019年よりメニューに追加した。

加えて、「高度化」研究として、生体組織を顕微鏡下で観察しながら高速に微小領域を採取する装置開発、RNA-seq 及び空間情報を踏まえた包括的情報解析を実行する基盤構築を推進した。微小組織採取装置は、数十細胞を包含する微小組織を、反応を実施するサンプルチューブに回収することが可能である。本課題では、微小組織に含まれる mRNA、ゲノム DNA のみならず蛋白質や代謝物にも解析対象を拡大し、そのフローの構築および

応用を支援案件と連動させて進めた。また、保有するマイクロ流体デバイスと微量 RNA-seq 技術を統合し、RNA ウイルスの 1 粒子レベルでのゲノム解析技術の開発についても、新型コロナウイルス拡大後の追加研究項目として推進した。

以下、(1)支援と(2)高度化に分けて成果およびその意義について記載する。

(1)支援

支援においては、① 1 細胞～百程度の細胞を出発材料とした網羅的遺伝子発現解析 (1 細胞トランスクリプトーム解析)、②早稲田大学オリジナルの微小組織採取装置を用いて組織中から位置特異的に採取した 110 μm 径の微小組織を材料とした網羅的遺伝子発現解析 (微小組織トランスクリプトーム解析) および、③ピコリットル液滴に細胞を封入し液滴内で溶菌およびゲノム増幅を行う、微生物 1 細胞ゲノム解析 (2019 年 1 月よりメニュー化) の支援を実施した。また、分担者の和歌山県立医科大学橋本教授が技術開発を進める、バーコード DNA を用いて数千以上の 1 細胞遺伝子発現を解析するライブラリ調製法 (Nx1-seq 法) での支援も実施した。

(成果)

コンサルティング実施総数が 39 件あり、内 35 件について支援に対応し、全ての支援を 2022 年 3 月 31 日までに終了した (4 件は支援見送り)。1 細胞トランスクリプトーム解析では、マラリア感染や、寄生虫感染、連鎖球菌感染といった感染症に関する案件が 8 件と多く含まれた。また、微小組織トランスクリプトーム解析においては、癌に関連する支援が 3 件、アルツハイマーや脊髄損傷、多発性硬化症など脳に与える影響に関する支援が 4 件、ヒトパピローマウイルス(HPV)や新型コロナウイルスなどウイルス感染による宿主とウイルス遺伝子発現の相互機序に関する案件が 5 件であった。解析対象は、支援開始時は対象動物全件がマウスであったが、その後はマウスとヒトがほぼ同数で推移し、臨床検体を用いた創薬により近い支援を推し進めた。この中から、6 件が論文採択に至り (Kashima et al. *Sci. rep.* 2017, Tsuyuzaki et al, *Nat. Commu.* 2017, Matsumura et al. *Cell rep.* 2019, Sugeno et al. *Neural regen res.* 2021, Ueda et al. *Front. Mol. Neurosci.* 2021, Nakayama et al. *Dis. Models Mech.* 2022)、論文投稿中が 4 件、準備中が 5 件の成果へとつながった。

(意義)

支援依頼のあった対象組織が様々であり、特にヒト臨床検体は術後の採集条件や長期室温保管状態の影響を受け核酸の保存品質が低く、遺伝子解析のための試料調製に支障をきたすケースが散見された。これらの解決には 1 件毎丁寧に取り組み、5 年間の支援活動で扱った生物種 (マウス、ヒト、ブタ) や組織種 (脳、肺、腎臓、脊髄、角膜、肝臓、血管、心臓弁など) のそれぞれに合わせてフローを改良し知見を収集した。これらの支援実績により、我々の微小組織解析技術は様々な試料種に対応可能な汎用的な技術へと発展した。また、現在主流となっている空間的トランスクリプトーム解析は、mRNA の 3'末端の数十塩基のみに着目した解析が主流となっている一方で、我々の技術は 1 細胞および微小組織解析のいずれにおいても、末端だけではなく数百～数千といった広範囲遺伝子配列情報を獲得することに注力してきた。これにより、ウイルスゲノムが宿主ゲノムに取り込まれる様子を捉えたり、転写物の多様性を捉えたりする支援に対応することが可能であった。我々が提供する解析技術が対象によらず高い精度で実現できるものであるため、病態モデルマウスや臨床検体など多岐にわたる試料を有する様々な支援申請者とマッチングし、成果創出につなげることができた。

(2)高度化

高度化研究では、昨今注目を浴びている空間的トランスクリプトームデータ集積に、我々が開発を進めてきた位置特異的な微小組織採取装置をいち早く活用し、①微小組織採取システムの汎用化を目指したハードウェアおよびインターフェースの開発評価、および、②採取された微小組織サンプルを用いたマルチオミックスアプリケーションの拡充を目指した研究開発を推進した。また、③RNA ウイルス 1 粒子を対象とした全ゲノム解析技術の開発にもプロジェクト 4 年目より着手した。

(成果)

① 微小組織採取システムの汎用化を目指したハードウェアおよびインターフェースの開発評価

微小組織採取システムのハードウェアにおいては、市販の顕微鏡に搭載できる形状に改良することにより同時に小型化も達成した。顕微鏡に設置されたカメラ画像を PC モニタで確認しながら、採取部位を決定し専用のソフトウェアで採取からマイクロチューブへの回収までを自動実施できる構成とした。採取に使用する針は内径 110 μm を基本としているが、50 μm も動作確認済みである。採取切片は、汎用のマイクロチューブに個別に回収される。これにより、本システムの特徴である下流の反応条件を選ばないフレキシブルな実験系への対応を実現した。

② 採取された微小組織サンプルを用いたマルチオミックスアプリケーションの拡充

採取対象が凍結組織の場合、もしくはホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) された組織の場合が想定されたため、組織の保存状態に応じた試料の調製法の開発および評価を進めた。凍結組織が対象の場合では、組織薄切後の迅速なエタノール固定もしくは風乾での脱水による RNA 分解抑制のフローを構築し論文としてまとめた (Yamazaki et al. *Sci rep.* 2020)。また臨床検体として広く使用される FFPE 組織に対しては、タンパク質分解酵素と熱処理を効果的に組み合わせた前処理 (脱架橋処理) 工程により cDNA ライブラリの調製を可能にするフローを構築した (論文投稿中 ; Matsunaga et al. bioRxiv)。

微小組織採取システムで回収された組織切片を用いて、mRNA から得られる遺伝子発現情報に加え、ゲノム DNA 解析を同時に実施するフローを構築した。mRNA の精製において、ポリ T 修飾磁気ビーズにより mRNA のみを捕獲する工程に着目し、mRNA 回収後の残渣から DNA のみを分画した。この同時測定技術を順天堂大学林准教授より申請いただいた支援に適用した。本支援では、EGFR 変異 (19 番エクソン領域欠失) を認める肺癌患者に対して分子標的薬耐性獲得のマーカーとなる遺伝子探索を目指し、分子標的薬投与後に切除術により採取された組織を解析対象とした。治療後の寛解細胞と腫瘍細胞、間質細胞の不均一細胞集団についての解析評価を論文としてまとめ投稿中である。

マルチオミックス化に関しては、mRNA、DNA に加え、タンパク質及び代謝物の分画測定技術の開発について、九州大学馬場研究室 (馬場健史教授・和泉自泰准教授) と共同で着手した。微小組織採取システムで回収された切片 1 枚 (110 μm 径) から 1500 程度のタンパク質を同定できることを確認した。微小組織片から、代謝物を分画後、タンパク質変性の工程で mRNA を分画するフローの評価を進め、同時分画および測定の一定の目処を得た。

③ RNA ウイルス 1 粒子を対象とした全ゲノム解析技術の開発

新型コロナウイルス SARS-CoV-2 (一本鎖プラス鎖 RNA ウイルス、全長 29.9kb) は、塩基配列の変異に伴って宿主への感染力や病原性を大きく変化させ、2019 年末から現在に至るまで、世界規模でのアウトブレイクを引き起こしている。先行研究では、SARS-CoV-2 が感染したヒト体内で変異を起こし、同一感染者から複数株のウイルスゲノムが検出された例や、異なる株のウイルスが同一宿主に対して重複感染する例が報告されており、微量検体に含まれる変異株のゲノム情報を迅速かつ高感度に検出する手法が求められている。そこで、RNA ウイルスを 1 粒子単位でゲノム解析し、微量検体サンプルからウイルス変異株を高感度に検出する手法の開発に取

り組むこととした。代表者が有するマイクロ流体デバイスを用いた微小液滴制御技術を活用するとともに、2020年度追加予算により大規模シーケンサーNextSeq 2000 (イルミナ社)を導入し開発を進めた。東京医科歯科大の武内寛明准教授から申請いただいた支援により不活化された SARS-CoV-2 ウイルスより抽出された Total RNA を用い評価を進め、微小液滴内で一分子レベルでの cDNA 合成による増幅産物を確認した。またシーケンス情報から、ゲノム増幅領域に偏りがあるものの変異部分の配列が得られていることを確認した。

(意義)

国際的なトレンドとなっている空間的トランスクリプトームデータ集積に、我々が開発を進めてきた位置特異的な微小組織採取装置をいち早く活用してきた。市場に流通している技術は、数 mm² 程度の範囲から数千スポット以上の遺伝子発現をカバーするというものである。網羅性に優れている一方で、反応あたり数百万円という試薬コストがボトルネックである。我々の技術は、レーザーマイクロダイセクション法のようにフレキシビリティを備えつつ、針でパンチングするという対象組織へのダメージを最小限に抑え、かつ高速に多数箇所採取できるというところにアドバンテージがある。上記、網羅的な技術との差別化を図るため、遺伝子発現以外にも DNA 変異解析や、プロテオーム、メタボロームへアプリケーションの拡充を実現してきた。遺伝子発現と変異の同時解析は、支援に適用し論文化にまでつなげた。組織の前処理にも工夫を施し、凍結組織切片であっても風乾処理を施すことで、常温での輸送中の RNA 分解抑制が可能であることを実証し支援において効果を発揮した。すなわち、貴重な試料からの薄切切片の作成を支援申請者自身のラボにおいて実施し、その後送付という形態をとることが可能になった。以上のように、高度化研究の支援実施時に生じる試料の取り扱いなど具体的な課題を解決したことにより、支援領域の幅を広げ複数の成果へとつなげていくことができた。

In multicellular organisms, individual cells do not exist independently, but rather, they cooperate with surrounding cells and extracellular components to perform their functions. There is a deep relationship between the spatial positioning of these cells and their functions as cells and tissues. Recent advances in single cell analysis technology have made it possible to reveal the diversity of gene expression in individual cells. Just as there is diversity in cellular and tissue morphology, there is diversity and heterogeneity in gene expression. This means that heterogeneous cells play a biological and physiological role through complex interactions in spatially controlled tissues. In other words, spatial information is essential for a better understanding of gene expression information in tissues and organs.

We have been considering that a comprehensive understanding of gene expression information at the single cell level or at the microtissue level consisting of dozens of cells, coupled with spatial information, would be useful in understanding pathological conditions and drug discovery research, such as understanding the regulatory mechanisms of drug resistance and searching for specific marker genes in diseases. In this project, we provided "support" for research aimed at the integrated understanding of basic life phenomena and the identification and validation of drug targets with high clinical utility. Specifically, we provided support for single-cell transcriptome analysis, which has been developed by the principal investigators and co-investigators at Waseda University and Wakayama Medical University, and microtissue transcriptome analysis, which has been developed by Waseda University. In addition to this, support for microbial one-cell genome analysis, in which cells are enclosed in microdroplets and lysed and genome amplification is performed within the droplets, was added to the menu in 2019.

In addition, as part of the "advancement" research, we promoted the development of a device for high-speed micro-tissue sampling while observing biological tissues under a microscope, and the construction of an infrastructure for comprehensive information analysis based on RNA-seq and spatial information. The microtissue collection device is capable of collecting microtissues containing several dozen cells into a sample tube for conducting reactions. In this project, we expanded the scope of analysis to include not only mRNA and genomic DNA but also proteins and metabolites contained in microtissues, and worked on the construction and application of the flow in conjunction with the support project. In addition, the development of technology for genome analysis of RNA viruses at the single-particle level by integrating our microfluidic devices and trace RNA-seq technology was also promoted as an additional research item after the expansion of new coronaviruses.