

平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 補助事業名：創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業）
2. 補助事業課題名：包括的 1 細胞トランスクリプトーム解析
3. 研究開発代表者：国立大学法人金沢大学 医薬保健研究域医学系 特任教授 橋本真一
4. 研究開発の成果

個々の細胞のトランスクリプトーム解析は、異なる種類の細胞が混合している組織・臓器、あるいは分化状態や応答状態の異なる細胞が混合している細胞集団において、個々の細胞の性状を知るために用いられる。ところが個々の細胞がどのような物質を生産しているのかはほとんど明らかにされていない。あくまで細胞集団についてしか解明されていない。細胞集団の 1 細胞ずつの性格を明らかにし、真の細胞状態を把握することは生物学の研究にとって非常に重要である。

本課題では、微量/1 細胞トランスクリプトーム解析の支援と、我々が開発した包括的 1 細胞トランスクリプトーム技術を高度化した上で支援を行う。微量/1 細胞トランスクリプトーム解析法では、微量細胞から SAGE-Seq、RNA-Seq を行う。また、高度化での技術に関しては、1 細胞トランスクリプトームの発展系である。具体的には、1 個の細胞由来の RNA を 1 つのバーコードを含んだ DNA 結合ビーズでトラップし、それを増幅後シーケンスすることで、各バーコードは 1 細胞に由来し、数千から数万個の単位で 1 細胞の解析が可能となる方法のことである。

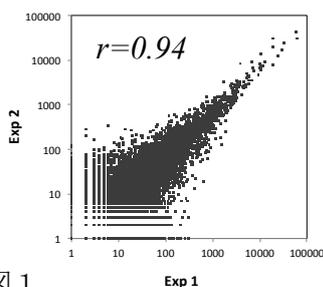
平成 27 年度は全部で 6 つの案件があり、内訳は支援（微量/1 細胞トランスクリプトーム解析法）が 4、高度化支援（1 細胞包括的遺伝子発現解析法）が 2 となっている。支援に関しては全ての案件がシーケンスデータの取得にまで至っており、研究者にデータを返却するための解析も含めて順調に進んでいる。本事業が開始した平成 26 年度はサンプルの抽出、輸送方法、倫理委員会への書類の提出等細かい点に調整が必要なこともあり、想定していた期間より多くの時間を必要としたが、現在では計画通りに遂行できている。平成 26 年度支援先の一つである金沢大学・向田直史教授のグループはこの事業の成果をもとに論文投稿しており、先日国際雑誌に掲載された。他にも支援の研究成果をもとにした論文準備/投稿がいくつも進められている。高度化支援に関しては、平成 26 年度から技術開発には目処が付き平成 27 年度からの開始となったが、外部研究者の施設で臨床検体を扱うこともあり、機器や試薬の準備といった調整に時間を要した。現在はこの問題も解消しつつあり、かつ、平成 28 年度は高度化支援の案件が増える見込みである。

「高度化」

数千から数万個の単位で個々の細胞の遺伝子発現プロファイリングを可能とする、マイクロウェルデバイス（PDMS）を用いた包括的 1 細胞遺伝子発現解析技術（Nx1-seq）を開発した。この技術は、バーコード化された oligo(dT) 付加ビーズを用いて多くの 1 細胞の遺伝子発現解析を行うものである。図 1 は実験の再現性と 1 細胞間の遺伝子発現における比較を示す。本年度は、1) マイクロウェルデバイス（PDMS）を用いた包括的 1 細胞遺伝子発現解析技術における幾つかの問題点について検討した。具体的にはバーコードビーズの作製法について emPCR 後、制限酵素を用いて末端を PolyT にしていたが、PolyA 付加ビオチンプライマーを用いることで簡便に合成出来ると共に分子識別子（UMI）の挿入にも成功した。この手法により、合成スピード、mRNA のトラップ率が向上した。さらに UMI の挿入により PCR のバイアスを補正出来る。2) PBMC を初めとする幾つかの細胞、組織を用いてこの方法の有用性を確かめた。さらに HBV 陽性の Hepatocellular carcinoma から樹立された細胞株の 1 細胞遺伝子発現解析を行

い、約 3,000 細胞中、たった 1 つの細胞が HBV mRNA を発現していることを見いだした。図 2 左は、シーケンスの read 数と遺伝子数の関係を示したものである。read 数によって 1 細胞あたり 1 万遺伝子以上も観察可能である。一方、HBV RNA 維持細胞とそれ以外の細胞の比較により HBV を細胞に維持する為の遺伝子 (X) を同定に成功し

実験の再現性



1 細胞同士の比較

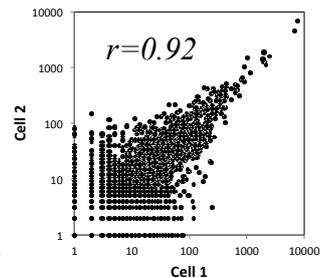


図 1

た。図 2 右は、遺伝子 (X) の shRNA と抗 HBV 薬であるエンテカビル (ETV) による HBV cccDNA の変化をヒト肝臓で観察したものである。同定遺伝子の shRNA による knockdown により HBV 感染細胞内の HBV cccDNA が低下したことからこの分子が創薬ターゲットとなると考えられた。

上に述べたように、高度化として実際のサンプルでも解析結果が出始めており、論文投稿準備に進んでいる。現在、シーケンス中の非特異配列を軽減する更なる改良も含めて支援を進めつつある。しかしながら、その際に使用するバーコードビーズやマイクロプレートに付いて安定的な供給ができていな

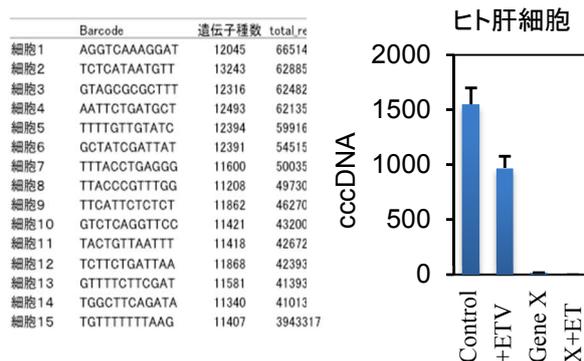


図 2

い。均一なバーコードビーズを安定的に供給出来る体制を早急に確立していきたいと考えている。

本技術革新は、病態における微小環境の細胞を解析することで、最適な治療薬を選択し、治療効果や副作用のモニタリングを可能とするバイオマーカー検査の基盤技術となると期待される。国際的にもこのような方法は、ほとんど使用出来る所が無く、支援による研究成果によって我が国の産業応用等が促進されると期待される。

課題の体制については、解析拠点、機能ゲノミクス領域内の研究者と相互訪問も含め、定期的に情報共有を行い、シーケンス解析、データ解析等の効率化を積極的に計っていった。さらに、事業外部の研究者とは情報共有・連携等について実施されており、技術の利点を最大限活用するような共同研究を推進している。一方、高度化された技術や支援の特徴を外部の研究者にも分かりやすく周知するといった取り組みが行えてこなかったため、これらの活動にも力を入れていきたい。